

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Buněčná a vývojová biologie



Bc. Šárka Jarošová

Role DISP3 v malignanci meduloblastomové buněčné linie

Role of DISP3 in malignancy of medulloblastoma cell line

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Martina Zíková, CSc.

Praha, 2020

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.

Praha, 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Martině Zíkové za veškeré rady, trpělivost a pomoc, Janě Klementové za pomoc s experimenty, Petru Bartůňkovi za možnost být v laboratoři buněčné diferenciaci, všem ostatním členům naší laboratoře za ochotu a rady, dále Lukášovi Cupalovi za pomoc s ozařovacími experimenty. Také děkuji své rodině, příteli a kamarádům za podporu během celého studia.

Abstrakt

Při hledání nových genů, jež jsou regulovány thyroïdním hormonem, byl identifikován *DISP3*, nový člen SSD (sterol-sensing domain) proteinové rodiny. Analýza exprese ukázala, že *DISP3* je exprimován v buňkách neurálního původu a naše předchozí výsledky potvrdily, že nadprodukce tohoto genu ovlivňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Analýza databáze Oncomine také ukázala, že exprese *DISP3* je zvýšena v meduloblastomech, nejčastějších maligních nádorech centrálního nervového systému v dětském věku.

Předmětem diplomové práce je studium vlivu zvýšené hladiny *DISP3* na apoptózu buněk a jejich schopnost formovat kolonie. Při práci byly užity buněčné linie odvozené z meduloblastomů. Expresi genu *DISP3* v různých meduloblastomových liniích jsme porovnali pomocí kvantitativní PCR a k dalším experimentům vybrali vhodnou linii s nízkou expresí tohoto genu. Některé meduloblastomové linie mohou formovat neurosféry, a to, pokud jsou kultivovány v bezsérovém médiu. Pomocí kvantitativní PCR jsme porovnali expresi neurálních markerů u buněk kultivovaných jednak jako neurosféry a jednak jako přisedlé buňky. Transfekcí buněk plazmidem nadexprimujícím *DISP3* jsme připravili buňky se zvýšenou hladinou tohoto genu. Apoptózu jsme indukovali pomocí poškození buněk zářením v rozdílných dávkách. Apoptóza byla stanovena po 24 a 48 hodinách od ozáření na základě aktivace kaspáz 3 a 7 pomocí průtokové cytometrie. Následně jsme jednotlivé ozářené linie testovali na formaci buněčných kolonií.

Zjistili jsme, že v různých meduloblastomových liniích je *DISP3* exprimován v různých hladinách, nízkou expresi jsme našli u buněk DAOY, které jsme použili na následující experimenty. DAOY buňky kultivované v neurosférách jsou více heterogenní oproti adherentním buňkám. DAOY buňky s vyšší expresí *DISP3* vytvořily více kolonií oproti kontrolním buňkám.

Klíčová slova: *DISP3*, meduloblastom, apoptóza, metastatický potenciál

Abstract

In the search for new genes that are regulated by thyroid hormone, *DISP3*, a new member of the SSD (sterol-sensing domain) protein family, has been identified. Expression analysis showed that *DISP3* is expressed in cells of neural origin, and our previous results indicate that overexpression of this gene affects cell proliferation and differentiation. Oncomine database analysis also showed that *DISP3* expression is increased in medulloblastomas, the most common malignancies of the central nervous system in children.

The subject of this diploma thesis is studying the effect of increased *DISP3* levels on cell apoptosis and cell ability to form a colony. Cell lines derived from medulloblastomas were used in the work.

We compared the expression levels of the *DISP3* gene in different medulloblastoma lines by quantitative PCR and selected a line with low expression of this gene for further experiments. Some medulloblastoma cell lines can form neurospheres when cultured in serum-free medium. Using quantitative PCR, we compared the expression levels of neural markers in cells cultured both as neurospheres and as adherent cells. By transfecting cells with a plasmid overexpressing *DISP3*, we prepared cells with increased levels of this gene. We induced apoptosis by radiation at different doses. Apoptosis was determined 24 and 48 hours after irradiation by activation of caspases 3 and 7 measured by flow cytometry. Subsequently, we tested the individual irradiated lines for the formation of cell colonies.

We found that *DISP3* is expressed at different levels in different medulloblastoma lines, and we found low expression level in DAOY cells, which we used for the following experiments. DAOY cells cultured in neurospheres are more heterogeneous. DAOY cells with higher *DISP3* expression formed more colonies than control cells.

Key words: *DISP3*, medulloblastoma, apoptosis, metastatic potential

1. Obsah

Prohlášení	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Obsah	6
3. Seznam zkratk	8
4. Úvod.....	10
5. Literární přehled	11
5.1 DISP3	11
5.1.1 Proteiny obsahující sterol-sensing doménu	12
5.1.2 Současné znalosti o proteinu DISP3.....	13
5.2 Meduloblastomy.....	17
5.2.1 Histologie	18
5.2.2 Vývoj mozečku	18
5.2.3 Původ meduloblastomu.....	19
5.2.4 Molekulární podskupiny	20
5.2.5 Metastatický potenciál	24
5.2.6 In vitro modely meduloblastomů	26
5.2.7 Metody léčby meduloblastomů.....	27
5.3 Radioterapie.....	28
5.3.1 Radiorezistance.....	28
5.3.2 Následky radioterapie.....	29
6. Motivace a cíle práce	30
7. Materiál a metody	31
7.1 Materiál.....	31
7.1.1 Vektory a markery	31
7.1.2 Enzymy	32
7.1.3 Bakterie a růstová média	32

7.1.4	Eukaryotické buněčné linie	32
7.1.5	Média a reagenty pro eukaryotické buněčné linie	32
7.1.6	Chemikálie.....	33
7.1.7	Pufry a roztoky	33
7.1.8	Primery.....	34
7.1.9	Komerční kity	36
7.1.10	Přístroje.....	36
7.1.11	Software.....	36
7.2	Metody.....	37
7.2.1	Práce s nukleovými kyselinami	37
7.2.2	Bakteriální práce	39
7.2.3	Práce s buněčnými kulturami	41
7.2.4	Práce s proteiny	42
7.2.5	Iradiace.....	43
7.2.6	Statistická analýza dat	45
8.	Výsledky	45
8.1	Exprese DISP3 v různých meduloblastomových liniích.....	45
8.2	Kultivace DAOY buněčné linie v rozdílných podmínkách	47
8.2.1	Buněčná linie DAOY	47
8.2.2	Primery.....	48
8.2.3	Exprese markerů u buněk pěstovaných adherentně a jako neurosféry... 50	
8.3	Reakce buněk DAOY s nadexpresí DISP3 na ozáření	53
8.3.1	Ověření transfekce DISP3 v DAOY buňkách.....	53
8.3.2	Vliv zvýšené exprese DISP3 na apoptózu.....	54
8.3.3	Vliv zvýšené exprese DISP3 na formování buněčných kolonií.....	57
9.	Diskuze	58
10.	Závěr	65
11.	Seznam použité literatury	66

3. Seznam zkratek

7DHCR	7-Dehydrocholesterol reduktáza
APOE	Apolipoprotein E
BBB	Krevní mozková bariéra
BME	β -merkapt ethanol
CAS 3/7	Kaspáza 3 a 7
CNS	Centrální nervová soustava
CSF	Mozkomíšní tekutiny
DDR	DNA damage response
DISP3/PTCHD2	Dispatched 3
DSB	Dvojitý zlom vlákna
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGL	Extracelulární vrstva
FBS	Fetal bovine serum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
G418	Geneticin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-fosfát dehydrogenáza
GCP	Granule Cell Progenitor
GTR	Gross total resection
HH	Hedgehog
HMGCR	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktáza
IGL	Vnitřní granulózní vrstva
INSIG	Insulin-induced gene
LMD	Leptomeningeální diseminace

NFB	Normal Fetal Brain
NFGM	Normal Fetal Germinal Matrix
NPC1	NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1
P/S	Penicilin/Streptomycin
PBS	Fosfátový pufr
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PTC	Patched
PTCHD4	Patched Domain Containing 4
PTR	Patched related
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
ROS	Kyslíkaté radikály
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SHH	Sonic Hedgehog
SREB	Sterol regulatory element binding protein
SSD	Sterol sensing doména
STR	Subtotalní resekce
T3	Trijodthyronin
TAE	Tris acetát
TH	Thyroidní hormon
UBE2D2	Ubiquitin conjugating enzyme E2 D2
WHO	Světová zdravotnická organizace
WNT	Wingless/Int-1

4. Úvod

DISP3 byl identifikován v naší laboratoři při hledání nových genů regulovaných thyroidním hormonem. Je to protein, který nemá esenciální roli v lidském organismu, nicméně pokud je exprimován ve větším množství, tak ovlivňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Ve své struktuře obsahuje sterol-sensing doménu, která je známá svou rolí v metabolismu cholesterolu.

V lidském těle je tento protein exprimován především v neurálních tkáních jako jsou mozek a sítnice, méně pak ve varlatech. Analýza mozkových nádorů potvrdila zvýšenou expresi tohoto proteinu u pacientů s meduloblastomy.

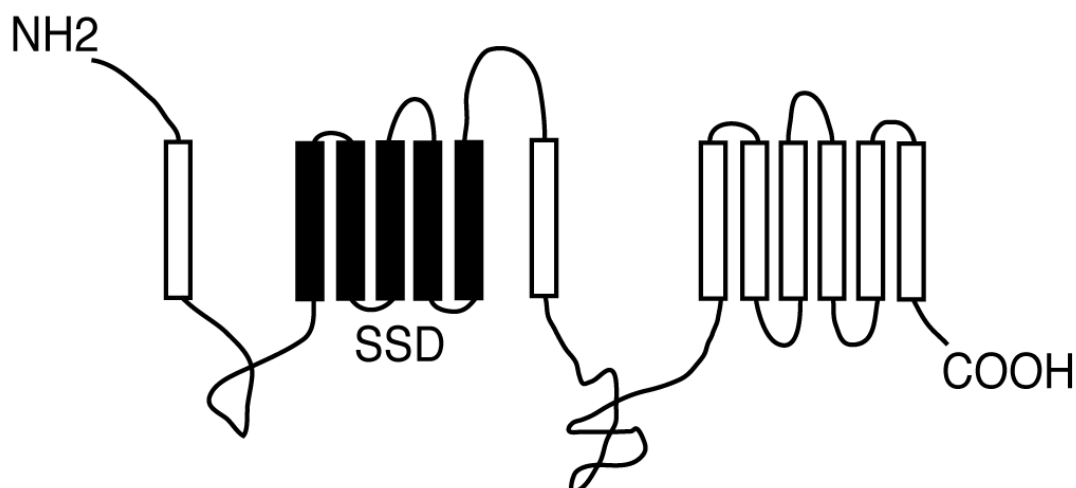
Meduloblastomy (podle WHO stupeň 4 v klasifikaci CNS nádorů) jsou dětskými maligními nádory mozečku a tvoří téměř 10 % dětských mozkových nádorů. I přes nedávné zlepšení léčby, 40 % dětí zažije opětovný výskyt nádoru a pro 20–30 % pacientů je tato nemoc smrtelná. Předpokládá se, že meduloblastomy vznikají z neurální kmenové nebo neurální progenitorové buněčné populace během ranného života. V roce 2012 byly ustanoveny 4 odlišné molekulární skupiny meduloblastomů (WNT, SHH, skupina 3 a skupina 4), které se liší prognózou, typem pacientů a histologií.

V této práci jsem se zaměřila na roli proteinu *DISP3* v malignanci meduloblastomových linií. Nejdříve byla stanovena endogenní exprese *DISP3* v různých meduloblastomových liniích a z nich byla následně vybrána linie s nízkou expresí. V druhé části práce byla tato linie kultivována v různých podmínkách (adherentně a v neurosférách) a byl porovnán expresní profil pomocí specifických markerů. V poslední části práce bylo studováno, jak zvýšení exprese *DISP3* v buňkách vybrané meduloblastomové linie ovlivňuje schopnost těchto buněk přežít ozařování a formovat buněčné kolonie.

5. Literární přehled

5.1 DISP3

Gen Dispatched 3 (*DISP3*, *PTCHD2* nebo *KIAA1337*) byl poprvé identifikován *in silico* v roce 2005 pomocí bioinformatiky spojením dvou necharakterizovaných cDNA (Katoh and Katoh 2005). U člověka se nachází na chromozomu 1, v oblasti 1p36.22, má 22 exonů a má konzervované homology u šimpanzů, psů, krav, myší, kuřat i dánií. Je to 1392 aminokyselin dlouhý protein, který má hmotnost přibližně 153 kDa. Predikce topologie ukazuje 13 transmembránových domén, z toho 5 z nich tvoří tzv. sterol-sensing doménu (SSD) (Obrázek 1). SSD je konzervovaná transmembránová struktura, která se vyskytuje u proteinů hrajících roli v transportu nebo metabolismu cholesterolu (Nohturfft, Brown, and Goldstein 1998).



Obrázek 1 - Schéma topologie proteinu DISP3, transmembránové domény jsou vizualizovány jako obdélníky, SSD jsou vybarveny černě (Zikova et al. 2009)

DISP3 je u člověka exprimován především v neurálních tkáních, nejvíce v mozku a sítnici, méně pak ve varlatech (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204624-DISP3>). Patří do PTCHD rodiny společně s několika dalšími proteiny (PTCHD1, PTCHD3 a PTCHD4 neboli PTCH53), které nejsou zatím detailně prozkoumány, ale některé z nich jsou spojeny s neurodegenerativními poruchami (Noor et al. 2010).

DISP3 je regulován thyroïdním hormonem a má roli v metabolismu cholesterolu a lipidů (Zikova et al. 2009), zvyšuje proliferaci a ovlivňuje buněčný osud neurálních kmenových

i neurálních progenitorových buněk směrem k diferenciaci (Konířová et al. 2017; Zíková et al. 2014). Jeho zvýšená exprese byla nalezena u metastazující osteosarkomové buněčné linie (Morrow et al. 2016) a zároveň jeho zvýšená exprese měnila expresi určitých genů (Zíková et al. 2014).

5.1.1 Proteiny obsahující sterol-sensing doménu

Sedm tříd proteinů má klíčovou roli při homeostázi cholesterolu nebo při signalizaci spojené s cholesterolem (a to v různých aspektech) a všechny tyto proteiny sdílí fylogeneticky konzervovanou sterol-sensing doménu (Kuwabara and Labouesse 2002).

SSD se skládá přibližně ze 180 aminokyselin organizovaných do 5 po sobě jdoucích, membránou procházejících domén. Konzervovaná rezidua se nacházejí především přímo ve dvojmembráně nebo blízko ní. I když není struktura SSD přesně determinována, početné studie ukazují, že zprostředkovává komunikaci mezi steroly a proteiny kontrolujícími sterolovou biologii. Shrnuto v (Theesfeld et al. 2011).

Proteiny obsahující SSD mají odlišné funkce, nalezneme zde proteiny, které mají centrální roli v udržování homeostáze cholesterolu jako je SCAP (SREB (sterol regulatory element binding protein) cleavage activating protein), který tak činí pomocí regulace sterol-dependentní transkripce genů syntetizujících cholesterol. Dalším enzymem obsahující SSD je 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktáza (HMGCR), což je klíčový enzym syntézy cholesterolu. U těchto dvou proteinů byla SSD původně identifikována (Kuwabara and Labouesse 2002). Tato doména byla také nalezena v 7-dehydrocholesterol reduktáze (7DHCR), což je protein, který konvertuje 7-dehydrocholesterol na cholesterol. Do této skupiny patří také proteiny zahrnuté v buněčné signalizaci, a to PTC, který je regulátorem hedgehog (HH) dráhy (Ingham 2001). Dále ji obsahují proteiny Dispatched (DISP), což jsou membránové proteiny, které umožňují uvolnění HH ligandů z buněk, které je produkují (Burke et al. 1999) a PTC-related protein (PTR), který má podobnou sekvenci jako PTC. Proteiny zahrnuté v intracelulárním transportu cholesterolu jako je Niemann-Pick C1 (NPC1) a Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) také sdílí tuto strukturu. Defekty v NPC1 způsobují vzácnou neurodegenerativní Niemann-Pickovu chorobu, u které se akumuluje cholesterol a glykosfingolipidy v endzomálních a lyzozomálních váčcích (Vanier 2010).

Cholesterol je sloučenina, která zásadně ovlivňuje buněčný metabolismus, strukturu i dynamiku buňky. Je důležitou součástí membrán a prekurzorem steroidních hormonů, některých vitaminů a žlučových kyselin. Hlavním orgánem zodpovědným za produkci v lidském těle jsou játra, která pomocí HMGCR a dalších enzymů katalyzují acetyl koenzym A. Homeostáza cholesterolu v buňce je regulována zpětnovazebnou smyčkou zahrnující tyto proteiny (Goldstein, DeBose-Boyd, and Brown 2006). Cholesterol je transportován cirkulací lipoproteinů (Huang et al. 2016).

V mozku se nachází 25 % celkového množství cholesterolu těla a téměř všechny je produktem tamní syntézy kvůli hematoencefalické bariéře, která efektivně zabraňuje výměně lipoproteinového cholesterolu v oběhu. Toto oddělení cholesterolu v mozku pravděpodobně reflektuje vysokou potřebu stability obsahu cholesterolu v membránách a myelinu. Apolipoprotein E (apoE) je za normálních podmínek považován za nejdůležitější transportní protein pro cholesterol v mozku (Bjorkhem and Meaney 2004).

Cholesterol hraje důležitou roli při vzniku rakoviny, je klinicky i experimentálně dokázáno, že hypercholesterolemie a vysoké množství cholesterolu z potravy může ovlivnit vznik rakoviny. Cholesterol je klíčovou komponentou lipidových raftů, které mají velkou roli při regulaci signalizace u rakoviny. Metabolismus cholesterolu je často u rakovinných buněk reprogramován. Shrnutí v (Ding et al. 2019). Bylo ukázáno, že cholesterol v roli druhého posla může aktivovat sonic hedgehogovou (SHH) dráhu vazbou na Smoothened receptor. Tato dráha je aktivovaná při vývoji a u některých typů rakoviny, vede k aberrantní buněčné proliferaci, diferenciaci a formaci nádorů (Huang et al. 2016).

5.1.2 Současné znalosti o proteinu DISP3

5.1.2.1 Regulace thyroïdním hormonem

Ve vyšších organismech jsou thyroïdní hormony (hlavní hormony produkované thyroïdní žlázou jsou 3,5,3' trijodothyronin T₃ a jeho prekurzor tyroxin T₄ a reverzní rT₃) důležité regulátory metabolismu a jsou nezbytné pro správný prenatální i postnatální vývoj široké škály orgánů v těle. Při nadbytku i nedostatku thyroïdního hormonu dochází k zásadním změnám metabolismu, např. změna klidového energetického výdaje, tělesné

hmotnosti, změna hladiny cholesterolu, lipolýzy a glukogeneze. Shrnutí v (Mullur, Liu, and Brent 2014).

In vivo analýza naší laboratoře ukázala, že je DISP3 regulován pomocí T3. Výsledky provedené na kuřatech ukázaly, že během vývoje je exprese DISP3 v sítnici ovlivněna T3. Další pokusy byly provedeny *in vitro* na buňkách z tkání se zvýšenou expresí *DISP3* a výsledky ukázaly, že exprese závisí na buněčném typu. Zatímco buňky z retinoblastomu při zvýšené hladině T3 zvýšily svou expresi *DISP3* více než pětkrát, u Sertoliho-like buněk způsobila zvýšená hladina T3 téměř třikrát nižší expresi *DISP3* (Zikova et al. 2009).

5.1.2.2 Role DISP3 v cholesterolovém metabolismu

Díky výskytu SSD byla stanovena hypotéza role DISP3 v cholesterolovém metabolismu. V určitých buněčných typech se při zvýšené expresi DISP3 zvedla hladina cholesterolu o 30 % a též se zvýšil obsah lipidických váčků v buňce (Zikova et al. 2009).

5.1.2.3 Role DISP3 v proliferaci a diferenciaci

V několika studiích bylo ukázáno, že DISP3 může mít různé efekty na buněčný osud. Pokud je DISP3 exprimován ve vyšším množství, což se díky změnám v genomovém uspořádání, které je u rakovin běžné, může stát, ovlivňuje buněčnou proliferaci. U myší neurální progenitorové linie buněk C17.2, derivované z mozečkových neurálních buněk z vnější zárodečné vrstvy (EGL) neonatální myši, bylo ukázáno pomocí thymidinové eseje, že buňky se zvýšenou expresí DISP3 se množí 1,7× rychleji. U těchto buněk byly také pozorovány změny v diferenciaci, buňky se zvýšenou expresí DISP3 nebyly schopny tvořit funkční neurity a počet diferenciovaných buněk v neurony a v astrocyty byl snížený oproti kontrolním buňkám (Zíková et al. 2014). Podobných výsledků bylo dosaženo i u neurálních kmenových buněk. Snížení hladiny DISP3 vedlo ke zvýšené diferenciaci do astrocytů a oligodendrocytů a zvýšení hladiny DISP3 naopak ke snížené diferenciaci oproti kontrole (Konířová et al. 2017).

5.1.2.4 Role DISP3 ve změna exprese genů

V buňkách C17.2 nadexprimujících DISP3 byla nalezena také změněná exprese genů *Epb4.13* and *Pre1p* (Zíková et al. 2014). U těchto buněk a u buněk z NS-5 (myší neurální kmenové buňky) s mutovaným *Disp3* (pomocí Crisper/Cas9) byla také nalezena změna

exprese určitých genů, a to insulin-like growth factor binding protein 7 (*Igfbp7*), lipoyl-transferase 1 (*Lipt1*), diacylglycerol kinase alpha (*Dgka*), brain serine/threonine kinase 1 (*Brsk1*) a endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 8 (*Edg8*) (Tabulka 1). Všechny tyto geny mají funkci ve vývoji mozku a/nebo byly zmíněny v různých nádorech. (Konířová et al. 2017)

Název genu	Změna exprese	Buňky
<i>Igfb7</i>	Snížená	NS-5 s mutací v DISP3
<i>Lipt1</i>	Snížená	NS-5 s mutací v DISP3
<i>Dgka</i>	Snížená	NS-5 s mutací v DISP3
<i>Brsk1</i>	Snížená	NS-5 s mutací v DISP3
<i>Edg8</i>	Zvýšená	NS-5 s mutací v DISP3
<i>Epb4.13</i>	Snížená	C17.2 se zvýšenou expresí DISP3
<i>Prelp</i>	Snížená	C17.2 se zvýšenou expresí DISP3

Tabulka 1 – Přehled změny exprese genů u modifikovaných buněk

IGFBP7 je protein, který váže inzulinové růstové faktory (IGF), které jsou zahrnuty v buněčném růstu a dělení a zabraňují buňkám vstup do apoptózy. Snížená exprese tohoto genu, popřípadě jeho delece byla nalezena u rakoviny prsu, plic, močového měchýře a tlustého střeva a nízké hladiny tohoto proteinu korelovaly se špatnou prognózou (Zhang et al. 2019).

Lipt1 kóduje lipoyl transferázu, která využívá volnou AMP-aktivovanou kyselinu lipovou jako substrát. Nemoci asociované s tímto genem jsou deficiencie lipoyltransferázy 1 a Leighův syndrom s leukodystrofií (Soreze et al. 2013).

Dgka je exprimován v oligodendrocytech, kde se podílí na vytváření myelinové pochvy a také je spojován s onkogenezí (Goto and Kondo 1996).

BRSK1 je AMP-aktivovaná serin/threonin kináza, která je nezbytná pro správnou polarizaci neuronů (Rodríguez-Asiain et al. 2011).

EDG8 receptor je exprimován především v oligodendrocytech a astrocytech, ovlivňuje diferenciaci radiálních glií do astrocytů, a ovlivňuje přežívání oligodendrocytů (Jaillard 2005).

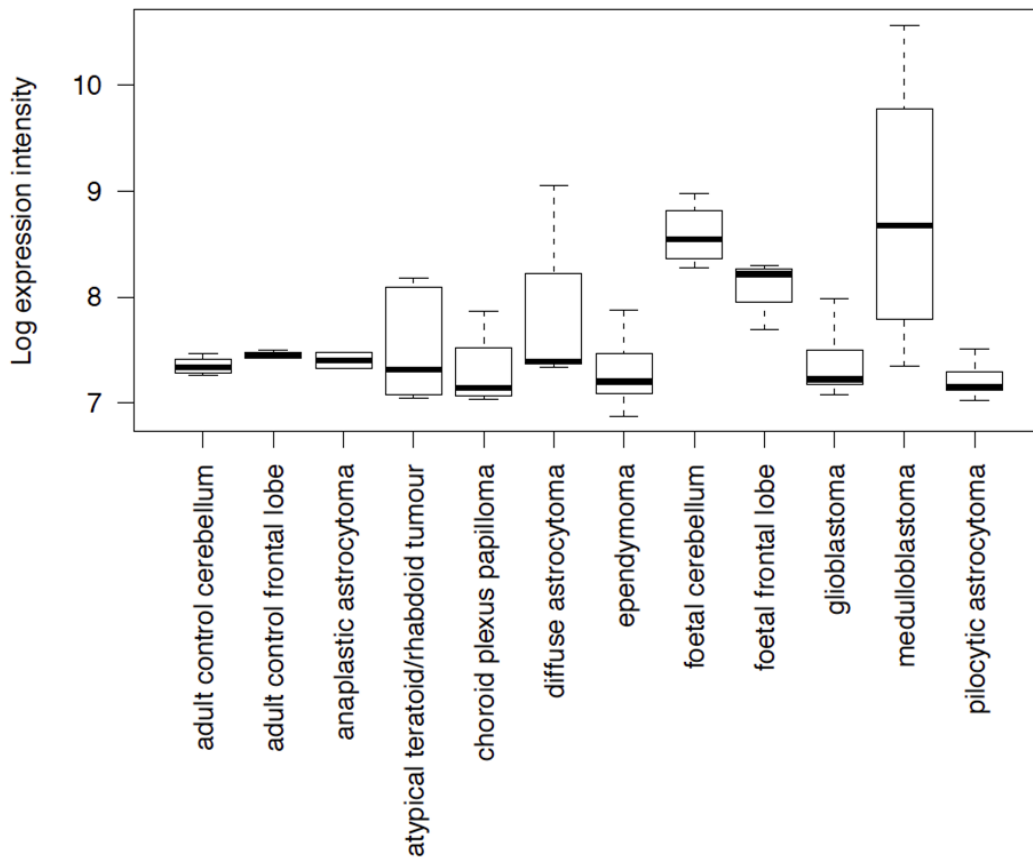
EPB4.L3 je tumor supresor, jehož mutace byly nalezeny u více typů rakovin. Proteiny ze stejné rodiny připojují transmembránové glykoproteiny k aktinovým vláknům a ovlivňují řadu procesů – jako je buněčná polarizace, migrace a proliferace (Bretscher, Edwards, and Fehon 2002). Bylo ukázáno, že u nádorů prostaty tento protein potlačuje vznik metastáz, buňky bez tohoto proteinu měly sníženou schopnost apoptózy, což mohlo zvýšit jejich invazivní fenotyp. EPB4.L3 protein potlačuje vznik metastáz rakoviny prostaty a snížení jeho exprese je dostatečné pro zvýšení metastatického potenciálu buněk (Wong et al. 2007).

5.1.2.5 Role DISP3 v metastatickém potenciálu buněk

Pro přežívání nehostinného prostředí nově osídlených oblastí musí metastázy radikálně zefektivnit translaci (Leprivier et al. 2015). V buněčné linii vysoce metastazujících osteosarkomů našli změněnou expresi několika genů oproti nemetastazující buněčné linii osteosarkomů. Mezi nimi byl i DISP3, ten byl vysoce exprimovaný u metastazujících buněk v plicích, ale byl sotva detekovatelný u nemetastazující linie (Morrow et al. 2016). Vysoce metastatické buňky vykazují lepší schopnost přežití a odolnost vůči apoptóze ve srovnání se špatně metastazujícími buňkami, což jim poskytuje selekční výhodu během nádorové progresy (Glinsky and Glinsky 1996).

Společně tato data napovídají, že DISP3 by mohl hrát roli při apoptóze a v metastatickém potenciálu buňky. Proto byla udělána *in silico* analýza mozkových nádorů z datasetů

microarray databáze Oncomine a největší exprese *DISP3* byla nalezena v meduloblastomech (Obrázek 2).



Obrázek 2 - Exprese *DISP3* v různých typech nádorů, *In silico* analýza z genového expresního profilu dětských a dospělých nádorů mozku se srovnání na zdravý mozek, databáze Oncomine, dataset: E-GEOD-66354 (Griesinger et al. 2015), analýza: (M. Kolář)

5.2 Meduloblastomy

Meduloblastomy jsou nejběžnějším maligním mozkovým nádorem u dětí a také nejčastějším primárním nádorem zadní jámy lebeční. Mají původ ve vermis mozečku a postupně rostou do 4. mozkové komory. Často metastazují do mozkomíšního moku a do tenkých mozkomíšních plen (*leptomeninges*), řídce se metastázy vyskytují v kostní dřeni, mízních uzlinách, játrech a plicích. Více než 80 % meduloblastomů je diagnostikováno do 15 let života, vrchol incidence je mezi 4. – 6. rokem života. U dospělých meduloblastomy nejsou tak časté a s věkem pravděpodobnost výskytu klesá. Meduloblastomy jsou embryonální nádory mozečku a předpokládá se, že vznikají z různých populací neurálních kmenových nebo progenitorových buněk během raného stádia života.

V České republice onemocní 10 – 12 dětí ročně, celosvětově je pak roční incidence 1,5 – 2 pacienti na 100 000 obyvatel. Meduloblastomy je možno dělit do různých skupin dle histologie a také do molekulárních skupin na základě různých molekulárních drah, které jsou v daném nádoru alterované. Tyto skupiny se liší v histologii, prognóze a věku i pohlaví pacientů. Shrnutí v (Northcott et al. 2019a; Zitterbart, Pavelka, and Zitterbartová 2010).

5.2.1 Histologie

Podle WHO rozhodnutí z roku 2007 můžeme meduloblastomy rozdělit do několika histologických skupin, a to na klasický meduloblastom, desmoplastický/nodulární meduloblastom (DN), meduloblastom s extenzivní nodularitou (MBEN), anaplastický meduloblastom (A) a velkobuněčný meduloblastom (LC). Anaplastický a velkobuněčný se často objevují společně, někdy bývají zmiňováni jako LC/A, dále kvůli podobnému histologickému vzoru se DN a MBEN klasifikují jako desmoplastický DMB (Borowska and Joozwiak 2016). Tyto jednotlivé skupiny se liší prognózou i zastoupením v molekulárních podskupinách. Tradičně se toto histologické rozdělení používá pro diagnózu. Přestože tyto histologické varianty částečně reflektují molekulární heterogenitu, nejnovější klasifikace podle WHO vyžaduje kombinaci histologických a genetických variant při diagnóze, pokud je to technicky možné. Shrnutí v (Northcott et al. 2019a).

5.2.2 Vývoj mozečku

Mozeček je jedna z neobvyklých struktur mozku, co se týče vývoje, protože populace neuronů se tvoří nejméně ze dvou odlišných zárodečných oblastí, a to z oblasti rhombic lip a ventrikulární zóny. Mozeček, jehož vznik je regulován organizérem zvaným isthmus, vzniká mezi středním a zadním mozkem. Neurální prekursorové, které se nacházejí v rhombic lip fetálního mozku migrují a vytvářejí extragranulární buněčnou vrstvu (EGL) vyvíjejícího se mozečku. Purkyňovy neurony a Bergmanovy glije se tvoří z prekursorů v subventrikulární zóně a migrují směrem k EGL. V EGL granulózní buněčné prekursorové pokračují v proliferaci ve vnější zóně. Postmitotické neurony se přesouvají do vnitřní zóny této vrstvy a poté migrují společně s Bergmanovými gliemi do vnitřní granulózní vrstvy (IGL),

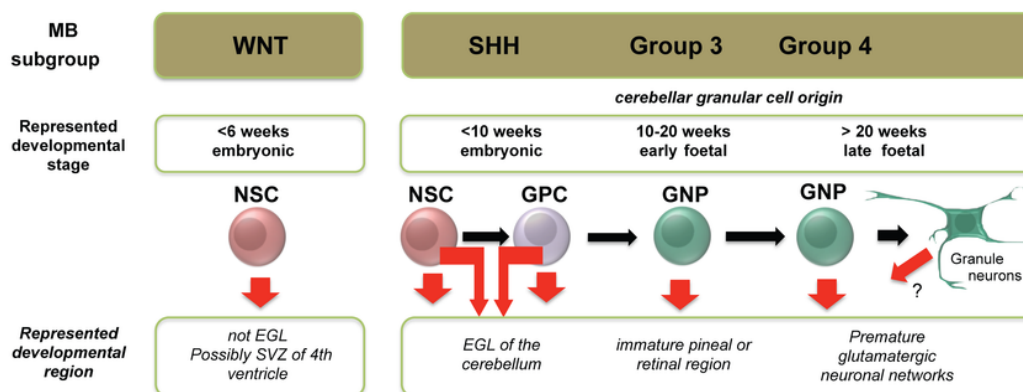
kde zůstávají. EGL nakonec zmizí a všechny postmitotické neurony se přesunou do IGL. Shrnuto v (Raffel 2004; Goldowitz and Hamre 1998).

Klíčovou roli ve vývoji mozečku hraje SHH signalizační dráha, která ovlivňuje proliferaci GCP (granule cell progenitor) několika mechanismy (reguluje expresi regulátorů buněčného cyklu jako je cyklin D1, cyklin D2 a cyklin E, zvyšuje expresi protoonkogenu Mycn) (Roussel and Hatten 2011).

5.2.3 Původ meduloblastomu

Meduloblastomy jsou nádory embryonálního původu vznikající v mozečku. *In situ* bylo pozorováno, že meduloblastomy diferencují společně s gliovými a neuronálními dráhami a z toho vyplývá, že tyto nádory se tvoří z primitivních, pluripotentních neuroepitelárních kmenových buněk. Bylo ukázáno, že některé meduloblastomy exprimují *ZIC*, gen, který je v normálním stavu exprimován pouze v EGL vyvíjejícího se mozečku a jeho derivátů, což znamená, že některé meduloblastomy vznikají z EGL prekurzorových buněk (Raffel 2004). Nicméně ukazuje se, že jednotlivé skupiny meduloblastomů pocházejí z jiných buněk a nádory mají i odlišné místo vzniku. SHH meduloblastomy se vyvíjí z vnější granulózní vrstvy a WNT nádory z lower rhombic lip (Zapotocky et al. 2018).

Analýza porovnání genových expresí a srovnání podobných meduloblastomů ukázala, že WNT a SHH skupiny se podobaly více NSCs (neural stem cells) a NPCs (neural progenitor cells), což indukuje podobnost mezi těmito meduloblastomovými skupinami a embryonálními buněčnými typy. Skupina 4 byla podobná více k NFB (normal fetal brain) nebo NFGM (normal fetal germinal matrix) ukazující na bližší vztah k brzkému fetálnímu buněčnému typu. Skupina 3 se nepřibližovala žádné kontrole brzkého vývoje. Meduloblastomové skupiny mohou reprezentovat stádia neuronální diferenciace – skupina 4 je více diferenciovaná než skupina 3, ta víc než SHH skupina a nejméně diferenciovaná z nich je WNT (Obrázek 3) (Hooper et al. 2014a).








Obrázek 3 - Původ meduloblastomu podle molekulární skupiny (Hooper et al. 2014b)

5.2.4 Molekulární podskupiny

Meduloblastomy byly identifikovány pomocí genové exprese jako samostatná skupina, odlišující se od ostatních embryonálních nádorů, jako jsou atypický teratoidní rhabdoidní tumor (AT/RT) a primitivní neuroektodermální tumor (PNET) (Pomeroy et al. 2002). Dalšími analýzami a profilováním bylo možné rozlišit skupiny meduloblastomů a v roce 2012 bylo přijato až do nynějška platící rozdělení meduloblastomů na 4 molekulární skupiny: WNT, SHH, skupina 3 a skupina 4. Tento konsenzus byl přijat základním i klinickým výzkumem a změnil způsob studia meduloblastomů jak v laboratoři, tak i to, jak jsou meduloblastomy diagnostikovány a zvládány na klinikách. Jednotlivé molekulární skupiny se liší skupinou pacientů, u který se vyskytují (podle věku i pohlaví), genetickým pozadím, histologií i prognózou (Obrázek 4). DNA metylační profilování nahradilo

použití analýzy genové exprese k identifikaci meduloblastomových podskupin a je považováno za zlatý standart pro určení statusu meduloblastomu. Shrnutí v (Northcott et al. 2019a; Taylor et al. 2012).

	WNT	SHH	Group 3	Group 4
Age group 				
Gender ratio M:F	1:1	1:1	2:1	3:1
Outcome	Very good	Infants good others intermediate	Poor	Intermediate
Metastasis	5-10%	15-20%	40-45%	35-40%
Genetic alteration	<i>CTNNB1</i> , <i>DDXD3X</i> , <i>SMARCA4</i> , <i>TP53</i> mutation	<i>PTCH1</i> , <i>SMO</i> , <i>SUFU</i> , <i>TP53</i> mutation, <i>GLI2</i> , <i>MYCN</i> amplification	<i>GLI1</i> , <i>GFL1B</i> activation, <i>MYC</i> , <i>OTX2</i> amplification, <i>SMARCA4</i> mutation	<i>KDM6A</i> mutation, <i>SNCAIP</i> duplication, <i>CDK6</i> , <i>MYCN</i> amplification
Cytogenetic aberration	Monosomy 6	3q gain 9q, 10q, 17p loss	i17q 1q, 7, 18 gain 10q, 11, 16q, 17p loss	i17q 7q, 18q gain 8p, 11p, X loss

Obrázek 4 – Molekulární skupiny meduloblastomů. M – muž, F – žena (M. Zíková podle Kuzan-Fischer et al., 2018)

5.2.4.1 WNT skupina

WNT skupina je pojmenovaná po WNT dráze, která je v těchto typech nádoru neustále aktivní díky stabilizaci β -kateninu. Přibližně 80–90 % WNT meduloblastomů má totiž mutaci v exonu 3 v genu *CTNNB1*, který kóduje β -katenin. Nádory z této skupiny představují nejvzácnější skupinu meduloblastomů (tvoří 10 %), distribuce mezi pohlavími je přibližně stejná. Většina těchto nádorů má klasickou histologii a pacienti mají nejlepší prognózu ze všech skupin, 95% z nich dosáhne desetiletého přežití (Kool et al. 2012).

Stabilizovaný β -katenin se akumuluje v jádře, kde se chová jako koaktivátor transkripčních faktorů TCF-LEF rodiny, což vede ke zvýšení exprese WNT responsivních genů, které vedou buňky k buněčnému růstu a proliferaci (Thompson et al. 2006). Pacienti z této skupiny, kteří nemají mutaci v *CTNNB1* mají často patogenní varianty tumor supresorového genu *APC* (Waszak et al. 2018).

Velmi dobrá prognóza u této skupiny je dána právě její molekulární charakteristikou. Mutovaný *CTNNB1*, který řídí konstantní onkogenní WNT signalizaci, současně umlčí

WNT signalizaci v okolních endoteliálních buňkách. V důsledku toho se mění charakteristika hematoencefalické bariéry, díky čemuž jsou nádory vnímavější k systémové chemoterapii (Phoenix et al, 2016).

5.2.4.2 SHH skupina

U skupiny pojmenované podle sonic hedgehog dráhy nalzáme často somatické mutace, mutace v zárodečné linii nebo jiné počty kopií kritických genů této dráhy, jako je delece nebo ztráta funkce u *PTCH1*, *SUFU* nebo aktivační mutace u *SMO*, amplifikace *GLI1*, *GLI2* nebo *MYCN* (Northcott et al. 2017). Tyto meduloblastomy se vyskytují u mužů a žen stejně a vyskytují se nejvíce v batolecím věku a u dospělých (Kool et al. 2012). Většina nodulárních/desmoplasmatických meduloblastomů patří do této skupiny, ale pouze 50% SHH meduloblastomů má tuto histologii, tyto nádory mohou mít i klasickou nebo LCA histologii (Taylor et al. 2012).

Alterace genů této dráhy a genů s nimi spojených vede k neustálé, na ligandech nezávislé aktivaci SHH signalizace, což vede buňku k buněčnému růstu a proliferaci. SHH meduloblastomy vykazují biologicky i klinicky relevantní heterogenitu v jednotlivých subtypech (SHH α , SHH β , SHH γ a SHH δ), navíc se meduloblastomy liší i u dětí a batolat. Shrnutí v (Cavalli et al. 2017; Schwalbe et al. 2017). Mutace v *TP53* jsou pozorovány u určité skupiny těchto SHH meduloblastomů a ta výrazně zhoršuje prognózu (Zhukova et al. 2013).

5.2.4.3 Skupina 3

Tato skupina není pojmenována po žádné hlavní signální dráze, ale vyskytují se u ní vysoké amplifikace *MYC* (přibližně v 17 % pacientů této skupiny), které se nevyskytují u jiných skupin. Má nejhorší stupeň přežití ze všech skupin, je to méně než 50 % a vyskytuje se častěji u mužů a batolat. Další somatické mutace na úrovni genů jsou u této skupiny méně běžné, nicméně často (25 % případů) dochází k izochromii 17q (q raménko je duplikováno a p raménko je ztraceno). Shrnutí v (Cavalli et al. 2017; Northcott et al. 2011).

Pacienti s meduloblastomem s *MYC* amplifikací mají výrazně horší prognózu a proteomická analýza ukazuje výrazné rozdíly u těchto meduloblastomů v ribozomálních proteinech (nebo proteinech spojených se sestavením ribozomů), mitochondriálních ribozomových proteinech a v proteinech zahrnutých v transkripci (Staal et al. 2015).

U této skupiny a také u skupiny 4 byly pozorovány strukturální varianty asociované s tzv. enhancer hijacking, kde strukturní varianty chromozomů vedou k blízkosti normálně vzdálených kódujících genomových oblastí a enhancerů nebo superenhancerů, což vede k overexpresi určitých genů. Toto vede k upregulaci onkogenů jako jsou u skupiny 3 např. *GFI1* nebo *GFI1B* (vzájemně se vylučujících), ty v běžné situaci regulují buněčný osud v hematopoetickém systému (Northcott et al. 2014).

5.2.4.4 Skupina 4

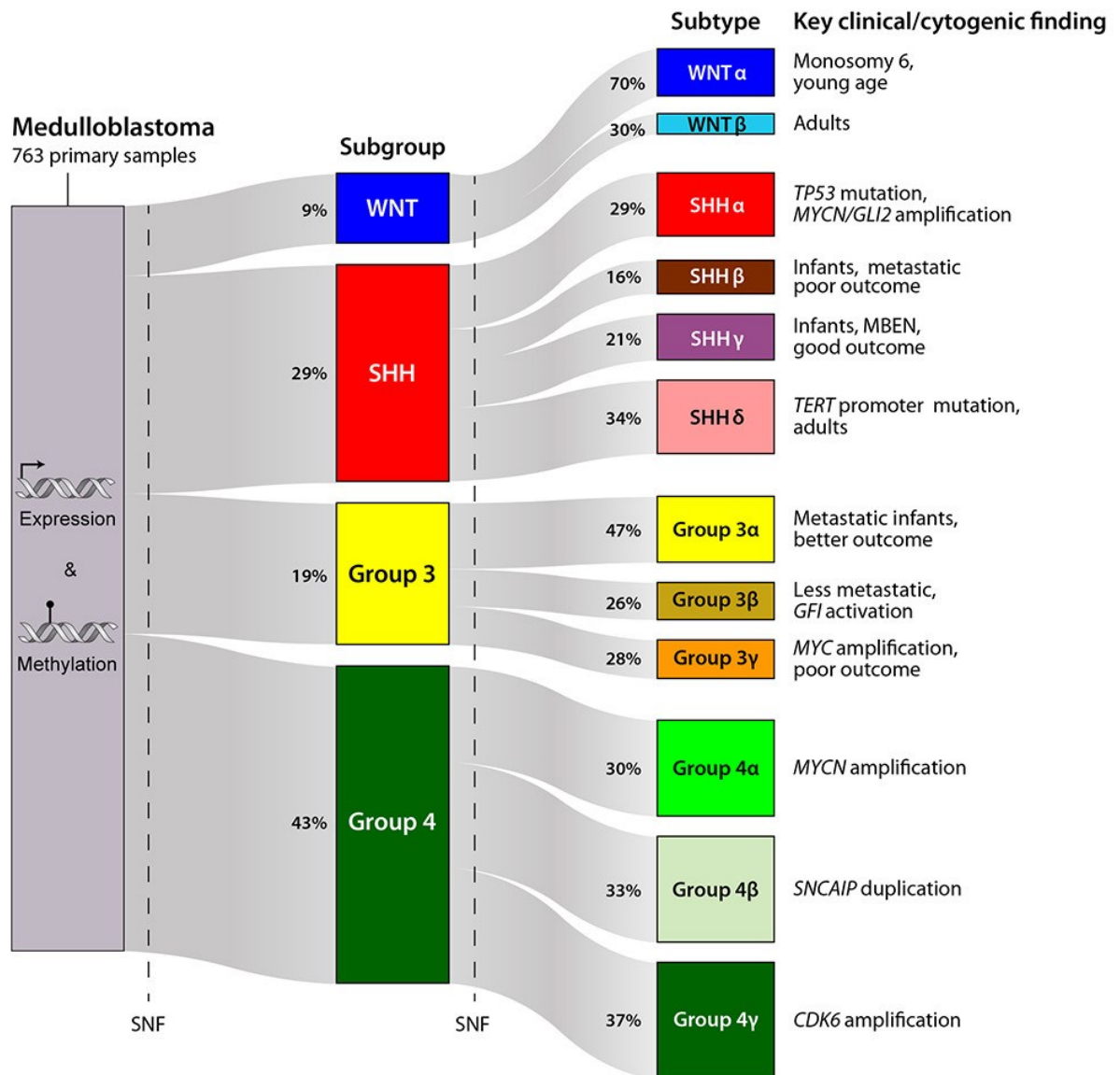
Tato skupina také nemá jasně definovanou signální dráhu, která by u ní byla mutována a mutace somatických genů jsou vzácné, nejčastější změnou je overexprese *PRDM6* (zprostředkována hijack enhancerem), kterou můžeme nalézt u 17 % pacientů. Je to nejčastější skupina meduloblastomů, patří sem 35–40 % pacientů, je běžnější u mužů. Přibližně 1/3 pacientů je diagnostikována s metastázemi, celkové přežití patří mezi střední (Taylor et al. 2012).

PRDM6 je chromatin modulující protein, který slouží jako transkripční represor vaskulárních progenitorů a progenitorů hladkých svalů, jeho přesná funkce u meduloblastomů ještě musí být objasněna. Další mutované geny jsou často proteiny modifikující histony jako je *KDM6A*, *ZMYM3*, *KMT2C* a *KBTVD4*, a dále pak amplifikace *MYCN*, *OTX2*, *CDK6* a také *GFI1* nebo *GFI1B* (Northcott et al. 2017; Northcott et al. 2019b).

5.2.4.5 Dělení na podskupiny

Rozdělení na tyto 4 skupiny se utvářelo poměrně dlouho, a ne každý meduloblastom se dá jednoduše do nějaké přidělit. Obzvláště mezi skupinami 3 a 4 je hranice někdy splývající. Skupina WNT se dá dělit dále na 2 subtypy, SHH skupina na 4 subtypy (Cavalli et al. 2017).

Nedávno bylo definováno 8 subtypů skupin 3 a 4 na základě DNA metylace, zahrnující i kategorii MYC řízených meduloblastomů (Northcott et al. 2017), v jiné studii byly tyto dvě skupiny rozděleny na 6 subtypů (Obrázek 5) (Cavalli et al. 2017).



Obrázek 5 – Jeden z modelů rozdělení skupin meduloblastomů na subtypy, zde rozřazeny na základě expresních a metylačních profilů z 763 primárních vzorků meduloblastomů (převzato z (Cavalli et al. 2017))

5.2.5 Metastatický potenciál

Metastázy se vyskytují u pacientů v době diagnózy zhruba ve 20–30 % (liší se u jednotlivých skupin: jsou relativně vzácné u WNT a SHH, ale častější u skupiny 3 a 4) a jejich diagnóza je spojena s horší prognózou. Zbývá procenta (70–80 %) metastáz jsou diagnostikovaná až v pozdější fázi onemocnění. Návrat nádoru nebo vznik metastáz je vysoce

specifický podle skupin, u SHH se často objeví nádor v originálním místě vyjmutého nádoru, a u skupiny 3 a 4 se relaps objevuje především diseminací metastáz (Zapotocky et al. 2018).

U případů, kdy pacienti nepřežijí, úmrtnost téměř vždy pramení z metastatické diseminace nádoru z jeho primární oblasti původu v zadní jámě lebeční (*posterior fossa*) do leptomenigeálního prostoru připojeného k omozečnici (*pia mater*), pod pavučnicí (*arachnoid mater*) v mozkomíšních tekutinách. Vzácněji, většinou u pacientů s velmi pokročilým a hodně léčeným stavem, se meduloblastomy šíří do částí mimo mozek jako jsou kosti, plíce, játra nebo lymfatické uzliny (Garzia et al. 2018).

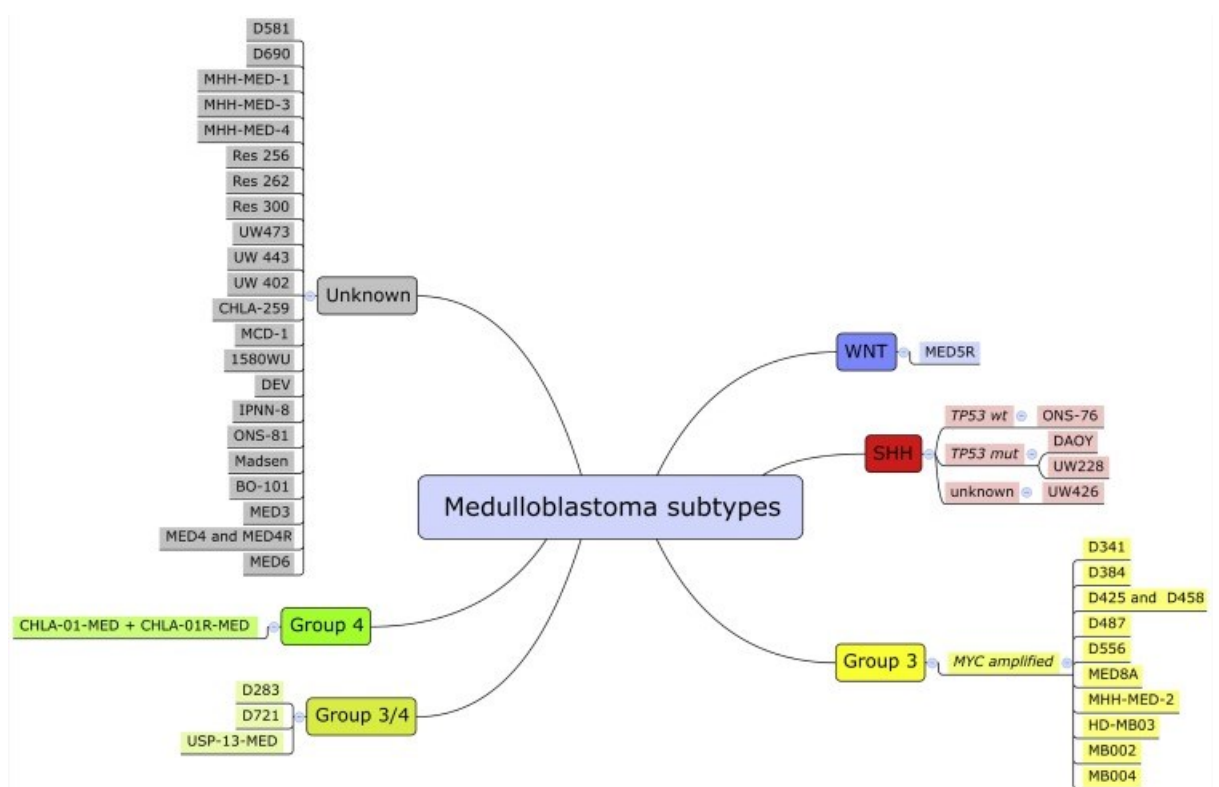
Pacienti ze skupiny SHH a 4 mají střední prognózu a mohou mít metastatickou diseminaci, konkrétně skupina 4, která zahrnuje většinu metastatických případů meduloblastomů (Van Ommeren et al. 2020).

Srovnávací analýza nádorů s metastatickou diseminací a bez ní odhalila některé geny a signální dráhy, které se vyskytují u metastatických populací. Jedna z prvních takových analýz odhalila zvýšenou expresi komponentů RAS/MAPK dráhy u metastazujících nádorů. Dalšími dráhami, které mají aberantní aktivitu jsou PI3K/AKT dráha, ta má roli v buněčné migraci, HGF/cMET dráha, která je regulátorem mozečkového vývoje a meduloblastomové patogeneze a NOTCH dráha, která je specificky aktivována u skupiny 3. Shrnutí v (Van Ommeren et al. 2020). Dále se objevují zmínky ohledně nekódujících RNA, které na tyto procesy mají taky vliv (Kim et al. 2018).

Leptomeningeální diseminace (LMD) je charakteristickým rysem metastáz u meduloblastomů. LMD je zodpovědná za 100 % meduloblastomových úmrtí, zůstává však nejméně prozkoumanou částí meduloblastomové patogeneze. Fakt, že meduloblastomy vzácně metastazují mimo CNS, ale většinou se šíří téměř především do míšních a leptomeningeálních prostorů, podpořil dlouhodobý názor, že se meduloblastomové buňky šíří pouze přes mozkomíšní tekutiny (CSF). Nicméně šíří se i přes krevní řečiště (Fults, Taylor, and Garzia 2019), cirkulující nádorové buňky se mohou šířit krví do leptomenigeálního prostoru, kde formují metastázy (Garzia et al. 2018).

5.2.6 In vitro modely meduloblastomů

Za posledních 40 let bylo ustanoveno okolo 44 stabilních meduloblastomových linií. Díky značné diverzitě v metodách charakterizace během této doby je složitější ustanovit celkový, kompletní obraz. V současné době je nezbytné přiřadit jednotlivé buněčné linie do molekulárních skupin, aby bylo možné propojit data získaná *in vitro* z těchto linií s poznatky o samotných nádorech. Genetická diverzita mezi jednotlivými liniemi není velká, například všechny linie ze skupiny 3 mají *MYC* amplifikaci a 50 % linií ze skupiny SHH má mutaci v *TP53* (obě tyto mutace jsou charakteristické pro vysoce agresivní meduloblastomy, to může znamenat, že jsou tyto meduloblastomy snadněji převedeny do *in vitro* podmínek a snáze se z nich ustanoví linie a/nebo že více agresivní buňky z nádoru (přestože představují minority v původním nádoru) jsou díky kultivaci zvýhodněny a linie je ustanovena pouze z nich). Pouze jedna buněčná linie (CHLA-01-Med a CHLA-01R-MED, obě derivované z jednoho pacienta) byla klasifikována, že patří do skupiny 4, přestože meduloblastomy ze skupiny 4 tvoří přes 40 % nádorů. Více než polovina dostupných linií nebyla prozatím charakterizována (Obrázek 6) (Ivanov et al. 2016).



Obrázek 6 - Meduloblastomové linie rozdělené do jednotlivých molekulárních skupin (Ivanov et al. 2016)

5.2.7 Metody léčby meduloblastomů

Nejběžnějším způsobem léčby meduloblastomů je maximální chirurgická resekce, následována iradiací kraniospinální osy (CSI) a cytotoxickou chemoterapií. Tímto způsobem léčby se dosahuje pětiročního přežití u 70–80 % dětí s radikální resekci, pokud u nich meduloblastomy nemetastazují a u 60 % dětí s metastatickými meduloblastomy a/nebo subtotální resekci. I přesto, že je přežití pacientů s meduloblastomy celkově poměrně vysoké, je nutné snížit vysokou toxicitu léčby. Efekty při CSI jsou vyšší, čím je dítě mladší (vyjma dětí do 3 let, ty radioterapii nedostávají). Různí pacienti, patřící do různých skupin meduloblastomů, kteří obdrželi stejné terapie, měli různé výsledky. Shrnutí v (Northcott et al. 2019a).

Současně je prognóza rozdělena do skupin standartního a vysokého rizika na základě věku, přítomnosti metastáz, rozsahu pooperačního rezidua nemoci a histologie. Všeobecně platí, že mezi pacienty standartního rizika, tj. 70 % meduloblastomových případů v době diagnózy, patří děti starší 3 let s žádným důkazem diseminace, postoperační residuální nádor je pod 1,5 cm² a histologická skupina je jiná, než velkobuněčná a anaplastická (Lannering et al. 2012). Metastatický status je určen na základě Changova kritéria, který rozlišuje 4 metastatické úrovně (Chang, Housepian, and Herbert 1969). Nicméně už v roce 2012 bylo ukázáno, že tato stupnice nedokáže předpovídat přesný výsledek u pacientů s metastázami (Dufour et al. 2012).

Aby byla limitována úmrtnost je třeba se vyhnout nadměrné léčbě u pacientů s dobrou prognózou anebo naopak zlepšit léčbu u pacientů, u nichž standardní léčebný postup nezabral (Thomas and Noël 2019). Byla udělána strategie na základě molekulárních skupin (Obrázek 7), nicméně klinická aplikace čelí technickým obtížím při hledání relativně jednoduché metody, jak molekulárně určit vyjmuté nádory, to speciálně platí pro skupinu 3 a 4 (Ramaswamy et al. 2016).

	5-year overall survival	Molecular profile
Very high risk	<50%	<ul style="list-style-type: none"> • Metastatic group 3 • SHH group with <i>TP53</i> mutation
High risk	50%–75%	<ul style="list-style-type: none"> • Metastatic or <i>MYCN</i> amplified SHH group • Metastatic group 4
Standard risk	76%–90%	<ul style="list-style-type: none"> • Localized SHH group without <i>TP53</i> mutation or <i>MYCN</i> amplification • Group 3 without <i>MYC</i> amplification • Group 4 without loss of chromosome 11
Low risk	>90%	<ul style="list-style-type: none"> • Localized WNT group • Localized group 4 with loss of chromosome 11

Note: Data from Ramaswamy et al.²⁴

Obrázek 7 - Návrh rozdělení pacientů do různých úrovní prognózy s ohledem na molekulární skupiny (Ramaswamy et al. 2016)

Téměř u 25 % pacientů, kteří absolvovali resekci meduloblastomu, se vyvine mozečkový mutismus (CMS). Je to unikátní postoperační syndrom, který typicky vyvstává 1 až 2 dny po resekci a skládá se ze snížené řeči postupující až k mutismu, emoční labilitě, hypotonii a ataxii. Téměř všechny děti se uzdraví do nějaké míry, avšak trvání syndromu se liší (Robertson et al. 2006).

5.3 Radioterapie

Od objevení ionizačního záření v roce 1895 radioterapie získala centrální terapeutickou roli a stala se zásadní léčbou u mnoha lidských maligních nemocí. Ozáření způsobuje buněčnou smrt především poškozením DNA a plazmatické membrány. Poškození je způsobeno ionizací vody uvnitř buněk, ta produkuje volné radikály, které poškozují DNA mnoha mechanismy, zahrnujícími poškození bází, depolymeraci, crosslinking a zlomy vláken. Shrnuto v (Ward 1988; Bucher and Britten 2008). Je stanoveno, že každý 1 gray způsobí 10^5 ionizací v každé buňce, což způsobí okolo 2000 jednovláknových a 40 dvouvláknových zlomů v DNA (Lewanski and Gullick 2001). Jelikož nádorové buňky ukazují citlivost k ionizačnímu záření, tak se radioterapie stala jedním z hlavních typů léčení rakoviny. Pokud je správně kombinovaná s chemoterapií nebo imunoterapií, může zvrátit nádorové hypoxické prostředí díky redukci spotřeby kyslíku nádorem a také změnit nádorovou imunitní odpověď, což může vést ke značnému klinickému zlepšení u mnoha typů nádorů (Tang et al. 2018).

5.3.1 Radiorezistence

Radioterapie má výhodu lokalizované aplikace, nicméně u ionizačního záření bylo ukázáno, že aktivuje několik epitel-mezenchymálních tranzičních transkripčních faktorů,

které podporují metastázy rakovinných buněk. Radiorezistence vede ke špatné prognóze pacientů a je hlavním důvodem pro selhání radioterapie, což může nakonec vést k návratu nádoru a vzniku metastáz. Shrnutí v (Tang et al. 2018).

Na mechanismy, stojící za rozvojem radiorezistence, se soustředilo mnoho studií a mezi hlavní faktory k ní vedoucí patří následující: oprava DNA poškození, zastavení buněčného cyklu, alterace onkogenů a nádorových supresorů, změny v nádorovém mikroprostředí, autofágie, tvorba nádorových kmenových buněk a změna nádorového metabolismu (Tang et al. 2018).

Radiorezistence se liší v různých fázích buněčného cyklu. Buňky jsou nejvíce rezistentní v G_0 , v brzké G_1 a v pozdní S fázi buněčného cyklu, nejvíce jsou citlivé na ozáření v pozdní G_1 , G_2 a M fázi buněčného cyklu. Radiorezistence v S fázi je pravděpodobně kvůli zvýšenému množství DNA syntézy a reparačních enzymů a zvýšené vnitrobuněčné hladiny glutationu, jež deaktivuje volné radikály. Zastavení cyklu v G_1 bodě po ionizačním záření poskytuje buňce čas na rozpoznání a opravu DNA poškození před začátkem DNA syntézy. Buňky jsou nejvíce citlivé během G_2/M fáze, pravděpodobně protože není tolik prostoru pro adekvátní opravu předtím, než započne segregace chromozomů (Sharda et al. 2002).

5.3.2 Následky radioterapie

Děti, které přežijí léčbu meduloblastomů, která zahrnuje CSI s nebo bez chemoterapie, mohou zažít poruchy v základních neurokognitivních funkcích, které vedou ke zhoršení inteligence a mají vyšší riziko selhání při vzdělávání. Pacienti, kteří dostali vyšší dávky CSI a mladší pacienti měli všeobecně větší problémy v neurokognitivních úlohách (Mulhern et al. 2005).

6. Motivace a cíle práce

Meduloblastomy jsou jedním ze zákeřných dětských rakovinných onemocnění, a i přes neustálé zlepšování léčby není prognóza ideální. Dětské pacienty mohou mít zhoršený stav po léčbě, proto je důležité porozumět molekulárním situacím a drahám pro zefektivnění léčebného procesu. Bylo ukázáno, že protein *DISP3*, který má vliv na proliferaci a diferenciaci neurálních buněk, je vysoce exprimován právě u meduloblastomů a může mít vliv na vznik metastáz a na apoptózu.

A proto jsme se rozhodli zaměřit na:

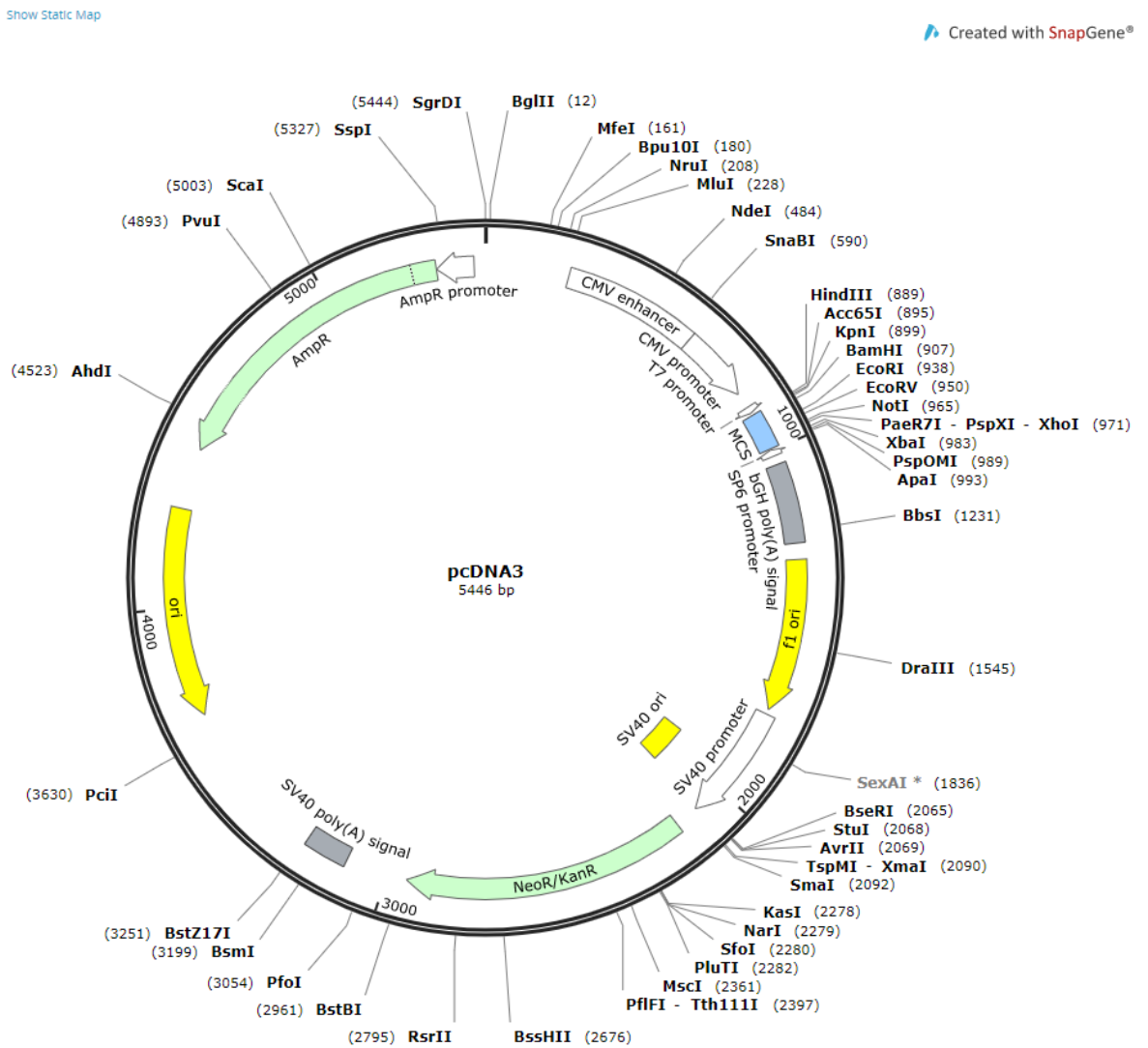
1. Porovnání exprese *DISP3* v různých meduloblastomových liniích
Pomocí qPCR bude zjištěno, v jakých dostupných meduloblastomových liniích je *DISP3* exprimován
2. Kultivaci vybrané meduloblastomové linie v různých podmínkách
Některé meduloblastomové linie mohou být kultivovány v různých podmínkách, a to adherentně nebo v neurosférách. Chceme popsat, jakým způsobem se pak tyto buněčné populace liší.
3. Reakci buněk meduloblastomové linie se zvýšenou expresí *DISP3* na ozáření.
Uměle zvýšíme expresi *DISP3* v jedné meduloblastomové linii (v obou kultivačních podmínkách), indukujeme buněčný stres iradiací a budeme sledovat, jak jsou schopné tyto buňky indukovat apoptózu a jestli mají jiné vlastnosti při tvorbě kolonií.

7. Materiál a metody

7.1 Materiál

7.1.1 Vektory a markery

pcDNA3 – do tohoto expresního vektoru byla zaklonována cDNA *DISP3* v plné délce



DNA Ladder Mix – Gene Ruler (Thermo Scientific)

7.1.2 Enzymy

DNA polymeráza Taq (BioLabs)

M-MLV Reverse transcriptase (200U/μl), M-MLV RT Buffer 5x (Promega)

Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl) (Promega)

7.1.3 Bakterie a růstová média

Bakterie: *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen)

LB médium: 1% trypton, 1% kvasinkový extrakt, 1% NaCl

LB agar: 1,5% agar v LB médiu

Selekční antibiotikum: Ampicilin (Sigma-Aldrich) ve finální koncentraci 100 μg/ml

7.1.4 Eukaryotické buněčné linie

DAOY – lidská meduloblastomová linie (ATCC® HTB-186™)

Následujících linie byly obdrženy pouze jako vzorek v lyzačním pufru:

CHLA-01-Med – lidská meduloblastomová linie (ATCC® CRL-3021™)

D 283 – lidská meduloblastomová linie (ATCC® HTB-185™)

D 341 – lidská meduloblastomová linie (ATCC® HTB-187™)

D 425 – lidská meduloblastomová linie (Sigma-Aldrich, SCC290)

ONS-76 – lidská meduloblastomová linie (JCRB Cell Bank, IFO50355)

HEK – lidská embryonální ledvinová linie (ATCC® CRL-1573™)

Y79 – lidská retinoblastomová linie (ATCC® HTB-18™)

H1 – lidské embryonální kmenové buňky (WiCell)

7.1.5 Média a reagensy pro eukaryotické buněčné linie

7.1.5.1 Reagensy

Improved minimum essential medium (iMEM) (Gibco)

Neurobasal medium (Gibco)
Fetal bovine serum (FBS) (Gibco)
L-glutamin (Gibco)
Penicilin/streptomycin (P/S) (Gibco)
Opti-MEM medium (Gibco)
Lipofectamine 2000 reagent, (Invitrogen)
Geneticin (G418) (Thermo Fisher Scientific)

7.1.5.2 Média

DAOY adherentní

- iMEM, 10% FBS, 1% P/S

DAOY neurosféry

- Neurobasal medium, 1% B27, 1% L-glutamin, 1% P/S, čerstvě přidáno: FGF-2 (20 ng/ml) a EGF (20 ng/ml)

7.1.6 Chemikálie

Agaróza Standard (ROTH)

Ethidium bromid 10 mg/ml (Roche)

Ethanol absolutní (PENTA)

6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)

Nuclease-Free Water (Ambion)

7.1.7 Pufry a roztoky

1× PBS: 150 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4

1× TAE: 40 mM Tris, 40 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 8,0

1 × Barvicí roztok: 5 g Genciánová violet, 250 ml methanol, 750 ml dH_2O

1x Trypsin: 0.05 % trypsin, 0.02 % EDTA

Lyzační pufr: 0.2 M NaOH, 2% SDS

Neutralizační pufr: 3 M K⁺, 5 M Ac⁻

7.1.8 Primery

Primery byly navrženy pomocí software Macvector, následně ověřeny na specificitu na stránce <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, objednány ve firmě Sigma-Aldrich.

Název	Sekvence (5' → 3')
KI67 – F	CGTCCCAGTGGGAAGAGTTGT
KI67 – R	CGACCCCGCTCCTTTTGATA
Sb100 – F	CGGAGGGAACCCTGACTACA
Sb100 – R	TCTGCATGGATGAGGAACGC
FGFR3 – F	TGGAGTCCACTGCAAGGTG
FGFR3 – R	GTAACGTAGGGTGTGCCGTC
CDK6 – F	TCCTGAGTGGCAAGCAGATG
CDK6 – R	GAATGAGGCGGGGGATTCT
MCM2 – F	TGGTACTGCTATGGCGGAAT
MCM2 – R	AAATGGTGGGAAGGTCACGGC
EGFR – F	CCTTGCCGCAAAGTGTGTAA
EGFR – R	CCACTGATGGAGGTGCAGTT
PROM1 – F	ACCCGGATCAAAAGGAGTCG
PROM1 – R	CGCCTTGCCTTGGTAGTGT
ASCL1 – F	GAAGTATGCGCTGCAAACG
ASCL1 – R	GTTGACCAACTTGACGCGG
DLX2 – F	CCTACCAGTACCAAGCCAGC

DLX2 – R	AGGGAGCGTAGGAGGTGTAG
CSPG4 – F	CATCCCACTAGAGGCGCAA
CSPG4 – R	CCCAGGAGAGTGGGGAAGTA
MAP2 – F	GGTGCTTTTTGGTGACCCAG
MAP2 – R	TGAGTGGTGTGGGTTTGCTC
NANOG – F	TCTTACCGTTTTTGGCTCTGTT
NANOG – R	ACGATGCAGCAAATACGAGAC
NES – F	GACCCTGAAGGGCAATCACA
NES – R	GGCCACATCATCTTCCACCA
SOX2 – F	ATGGGTTCCGGTGGTCAAGTC
SOX2 – R	CTGATCATGTCCCGGAGGTC
ACTB – F	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
ACTB – R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
GAPDH – F	AGCCACATCGCTCAGACAC
GAPDH – R	GCCCAATACGACCAAATCC
TUBB3 – F	GCTCAGGGGCCTTTGGACATCTTT
TUBB3 – R	TTTTCACACTCCTTCCGCACCACATC
GFAP – F	AGATCCGCACGCAGTATGA
GFAP – R	AGTCGTTGGCTTCGTGCTT
DISP3-PAN – F	CAGCAGCTTTGACCTCTTCA
DISP3-PAN – R	GCAACATCTGCAGGAAGGA
DISP3-H1337 – F	CAAAGCCACAGCCAATCG
DISP3-H1337 – R	TACCGCCATTCTTGCTCAG

UBE2D2 – F	AATGGCAGCATTTGTCTTGA
UBE2D2– R	CACACAACAGAGAACAGATGGAC

dNTP Mix, 10 mM (Thermo Fisher Scientific)

Random primery – hexamery v koncentraci 300 ng/μl (Thermo Fisher Scientific)

7.1.9 Komerční kity

PureLink RNA mini kit (Thermo Fisher Scientific)

6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)

SYBR Green I Master (Roche)

7.1.10 Přístroje

Muse® Caspase-3/7 Assay (Sigma Aldrich)

LightCycler 480II (Roche)

Centrifuge 5415R (Eppendorf)

Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

Thermal cycler TRIO 48 (Biometra)

Lineární urychlovač Clinac 600C/D DBX (Varian)

Inkubátor TS606 CZ/2 – Var (WTW)

CASY cell counter (OMNI Life Science)

7.1.11 Software

LightCycler® 480 Software, verze 1.5 (Roche)

GraphPad Prism (GraphPad Software)

Fiji ImageJ (NIH, USA)

MacVector (MacVector)

Muse™ Cell Analyzer (Sigma Aldrich)

7.2 Metody

7.2.1 Práce s nukleovými kyselinami

7.2.1.1 Kvantifikace nukleových kyselin

Koncentrace i kvalita RNA i DNA byly měřeny na Nanodrop ND 1000.

7.2.1.2 RNA izolace

RNA byla z buněk izolována pomocí PureLink RNA Mini Kitu (Thermo Fisher Scientific) podle přiloženého protokolu, během procedury byl použit Dnase treatment na odstranění DNáz ze vzorků. Izolace proběhla v podmínkách bez RNáz a vzorky byly skladovány na ledu.

7.2.1.3 Reverzní transkripce

1. K 1 µg RNA byla přidána voda tak, aby celkové množství bylo 14,5 µl (pokud reakce sloužila ke qPCR, bylo přidáno pouze 200 ng RNA, pokud k ověření účinnosti primerů, tak bylo přidáno 600 ng směsi RNA)
2. K této směsi bylo přidáno následně 0,5 µl hexamer primerů v koncentraci 300 ng/µl
3. Směs byla inkubována 5 minut při 70 °C a následně schlazena na ledu
4. Ke směsi bylo přidáno 10 µl premixu a toto bylo inkubováno při 37 °C 1 hodinu
5. Reakce zastavena inkubací 2 minuty při 95°C.
6. cDNA byla skladována v -20 °C.

Premix:

Pufr	5 µl
dNTP (10 µM)	1 µl
RNasin	0,3 µl
H ₂ O	3,4 µl
RTáza	0,3 µl

7.2.1.4 PCR

Reakční zkumavky byly udržovány na ledu, byla použita Taq polymeráza.

1. K 1 μ l cDNA byl přidán následující premix:

Pufr	2 μ l
dNTP	1 μ l
H ₂ O	14,7 μ l
polymeráza	0,3 μ l
Primery (F+R)	1 μ l

PCR byla provedena v dle následujícího programu

1. Počáteční denaturace trvala 5 minut při 95 °C
2. Denaturace byla provedena za 30 vteřin při 95 °C
3. Nasedání primerů bylo provedeno za 30 vteřin při 60 °C
4. Prodlužování bylo provedeno za 30 vteřin při 72 °C
5. Konečné prodlužování bylo provedeno za 5 minut při 72 °C
6. Konečné ochlazení bylo na 16 °C

Kroky 2–4 se opakovaly 30-34x.

7.2.1.5 Elektroforéza na agarózovém gelu

Elektroforéza proběhla v gelu vytvořeného z 1% - 2% (v závislosti na velikosti fragmentu) roztoku agarózy v TAE, ke kterému byl přidán etidium bromid (ředěn 1:10000). Napětí bylo nastaveno v rozmezí 7 – 9 mV/cm. Ke každému vzorku byla přidána 6x DNA loading barva. Pro stanovení velikosti fragmentů byl použit Gene ruler mix (Thermo Fisher Scientific).

7.2.1.6 qRT – PCR

Pro qPCR byla připravena cDNA pomocí reverzní transkripce z počáteční koncentrace 200 ng RNA. Dále byla cDNA naředěna 2x vodou. Každá reakce obsahovala 1 μ l cDNA a 4 μ l mastermixu a byla provedena v technických triplikátech.

Pro ověření účinnosti primerů byla směs cDNA ředěna 2x (S1) a dále 5x (=S2), 25x (S3) a 125x (S4) a na každém z těchto vzorků proběhla reakce v hexaplikátech.

Mastermix

SYBR green	2,5 µl
F+R primery (5 µM)	1 µl
H ₂ O	0,5 µl

Reakce proběhla následovně:

1. Počáteční denaturace trvala 3 minuty při 95 °C
2. Denaturace byla provedena za 15 vteřin při 95 °C
3. Nasedání primerů bylo provedeno za 20 vteřin při 61 °C
4. Prodlužování bylo provedeno za 15 vteřin při 72 °C
5. Konečné prodlužování bylo provedeno za 3 minuty při 72 °C
6. Konečné ochlazení bylo na 4 °C

Kroky 2–4 se opakovaly 44x.

7.2.2 Bakteriální práce

7.2.2.1 Příprava X-Gal misek

Na misky s LB médiem a antibiotikem (ampicilin) byl rozetřen rovnoměrně následující mix:

X-Gal	40 µl
IPTG (10mM)	100 µl
LB	100 µl

Vybrány byly bílé kolonie.

7.2.2.2 Transformace

1. 100 μ l kompetentních bakterií bylo rozmraženo na ledu
2. Plazmid DNA (1 μ l) byl přidán k buňkám, jemně promíchán a inkubován na ledu 10 minut
3. Tato směs byla inkubována 1 minutu ve 42 °C
4. Směs byla rychle schlazena na ledu a chlazena 10 minut
5. Ke směsi bylo přidáno 800 ml LB média a tato směs byla inkubována 30 minut při 37 °C
6. 100 μ l ze směsi bylo rozetřeno na plotnu, ty byly inkubovány ve 37 °C po dobu 12-18 hodin

7.2.2.3 Izolace DNA plazmidu

1. Z plotny byly vybrány požadované kolonie a každá byla kultivována se 2 ml LB média s antibiotikem při 37 °C a 270 rpm po dobu 16–20 hodin
2. Kultura byla centrifugována 5 minut při 13 000 rpm
3. Pelet byl resuspendován v 50 μ l TEG pufru
4. 50 μ l lyzačního pufru bylo přidáno do směsi a ta byla inkubována 5 minut v pokojové teplotě
5. Do směsi byl přidán neutralizační pufr (50 μ l) a směs byla vortexována
6. Do směsi byl přidán fenol/chloroform (150 μ l) a směs byla vortexována
7. Směs byla centrifugována 5 minut při 13 000 rpm
8. Horní fáze (125 μ l) byla přenesena do nové zkumavky a bylo přidáno 125 μ l izopropanolu
9. Směs byla vortexována a centrifugována 10 minut při 13 000 rpm
10. Supernatant bylo odstraněn a bylo přidáno 500 μ l 75% etanolu
11. Vzorek byl centrifugován 5 minut při 13 000 rpm
12. Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen
13. Pelet byl resuspendován ve vodě

7.2.3 Práce s buněčnými kulturami

7.2.3.1 Kultivace DAOY buněčné linie v adherentní stavu

Buňky byly kultivovány v 5% CO₂ atmosféře při 37 °C. Buňky byly udržovány v 60–90 % konfluenci a byly pasážovány jednou za 2 až 3 dny dle následujícího postupu.

1. Kultivační médium bylo odstraněno z misky
2. Buňky byly opatrně promyty PBS
3. Byl přidán trypsin a buňky byly inkubovány po dobu 5 minut
4. Trypsinová reakce byla zastavena přidáním média a celý objem byl přenesen do zkumavky
5. Následovala centrifugace 4 minuty při 120 g
6. Supernatant byl odebrán a buňky byly resuspenzovány v čerstvém médiu
7. Suspenze byla přenesena na misku v požadované koncentraci (koncentrace byla měřena v CASY cell counteru)

7.2.3.2 Kultivace DAOY buněčné linie v neurosférách

Buňky byly kultivovány v 5% CO₂ atmosféře při 37 °C. Byly pasážovány jednou za 2 až 3 dny dle následujícího postupu.

1. Médium s buňkami bylo přemístěno do zkumavky
2. Buňky s médiem byly stočeny 4 minuty při 120 g
3. Médium bylo odstraněno a buňky byly opatrně promyty PBS
4. Buňky v PBS byly stočeny 4 minuty při 120 g
5. PBS bylo odstraněno a byl přidán trypsin, buňky byly inkubovány 5 minut při 37 °C
6. Trypsin byl naředěn médiem
7. Buňky byly stočeny 4 minuty při 120 g
8. Buňky byly resuspendovány v médiu a v požadované koncentraci přeneseny do kultivační lahvičky (koncentrace byla měřena v CASY cell counteru)

Pokud byly buňky pěstovány za účelem pozorování jejich změny při kultivaci v neurosférách, postup se lišil.

1. Médium s buňkami bylo přemístěno do zkumavky

2. Buňky s médiem byly stočeny 4 minuty při 120 g
3. Médium bylo odstraněno a buňky byly opatrně resuspendovány v několika mililitrech nového média
4. Třetina objemu byla přenesena do nové kultivační lahvičky a doplněna čerstvým médiem.

Tímto postupem bylo dosaženo růstu větších neurosfér, v nichž buňky měly delší čas změnit svoje vlastnosti a případně diferenciovat.

7.2.3.3 Lipofectaminová transfekce

Buňky byly vysety den před transfekcí do 60 mm misky tak, aby v den transfekce měly 90–95 % konfluenci.

1. V den transfekce bylo rozpuštěno 8 µg DNA v 0,5 ml Opti-MEM a následně jemně promixováno dohromady a inkubováno při pokojové teplotě 5 minut
2. 20 µl lipofectaminu bylo rozpuštěno v 0,5 ml Opti-MEM a inkubováno při pokojové teplotě 5 minut
3. Poté byla zkombinována rozpuštěná DNA s rozpuštěným lipofectaminem, směs jemně promixována a inkubována 20 minut při pokojové teplotě.
4. Celý objem byl poté přidán na misku s buňkami
5. Misky byly inkubovány v 37 °C
6. Po 4–6 hodinách bylo vyměněno médium

Po 48 hodinách bylo přidáno selekční antibiotikum geneticin.

Transfekovány byly adherentní buňky, do neurosfér byly převedeny až po transfekci.

7.2.4 Práce s proteiny

7.2.4.1 Izolace proteinů a Western blot

1. Buňky na 60 mm miskách (se střední konfluencí) byly lyzovány ve 400 µl lyzačního roztoku (60 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% glycerol a 5% 2-merkптоethanol)
2. Dále byly inkubovány 5 minut při teplotě 95 °C a sonikovány

3. Proteiny byly rozděleny metodou SDS-PAGE s použitím 4-15% předpřipravených gradientových polyakrylamidových gelů (Biorad) a přeneseny na nitrocelulóзовé membrány (Whatman)
4. 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
5. 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) naředěné v roztoku 1% mléka v TBST
6. Po promytí byly membrány inkubovány s HRP-konjugovanou sekundární protilátkou (Anti-Rabbit IgG, GE Life Sciences; Anti-Mouse IgG, Cell Signaling)
7. Pozitivní signál byl detekován pomocí ECL kitu (GE Life Sciences) a zobrazen pomocí rentgenových filmů (Agfa)

7.2.5 Iradiace

Iradiace byla provedena fotonovým paprskem produkovaným v 4 MV Varian Clinac 600C/D DBX lineárním urychlovačem. Hodnota dávky byla 200 MU/minutu, kde 100 MU odpovídá dávce 1 Gy v hloubce 10 cm ve vodě.

Buňky byly ozařovány v dávkách 0, 2, 4 a 8 Gy při pokojové teplotě.

7.2.5.1.1 Adherentní buňky

Buňky byly vysety 24 hodin před ozářením a následně ozářeny přímo v kultivačních miskách.

Doba sběru po vysetí	Koncentrace
24 h	1×10^4 buněk/cm ²
48 h	$0,7 \times 10^4$ buněk/cm ²
72 h	$0,3 \times 10^4$ buněk/cm ²

Po ozáření bylo médium vyměněno za čerstvé.

7.2.5.1.2 Neurosféry

Pro iradiační pokusy byly buňky převedeny z adherentních do neurosfér tak, že byly kultivovány 5 dnů v neurosférovém médiu v lahvičkách a před samotným ozářením byly trypsinizovány. Ozářeny byly ve zkumavkách a následně vysety v určité koncentraci.

Koncentrace buněk při ozařování:

0 Gy	$0,5 \times 10^5$ buněk/ml
2 Gy	$0,5 \times 10^5$ buněk/ml
4 Gy	$0,75 \times 10^5$ buněk/ml
8 Gy	$1,25 \times 10^5$ buněk/ml

7.2.5.2 MUSE

Test apoptózy proběhl pomocí MUSE přístroje měřícího pozdní apoptózu pomocí Caspase-3/7 kitu. Vzorky byly zpracovány podle přiloženého protokolu a vyhodnoceny softwarem samotného přístroje.

7.2.5.3 Test buněčného přežití (Colony forming assay)

Po ozáření byly buňky poprvé vysety odhadem z předešlých experimentů (Tabulka 2) a následně při dalších pokusech byly z prvních výsledků stanoveny nové počty vysévaných buněk:

Tabulka 2 – Počet vysévaných buněk stanovený odhadem

	0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
DAOY	100	138	283	3965

Tabulka 3 – Počet vysévaných buněk po přepočtu

	0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
DAOY	100	140	251	1644

1. Buňky byly kultivovány po dobu 8–11 dní (dle viditelnosti kolonií)
2. Následně byly kolonie obarveny podle následujícího postupu
 1. Z misek bylo opatrně odpipetováno médium
 2. Na buňky byl přidán barvicí roztok tak, aby pokryl dno s buňkami a barvení trvalo 20 minut
 3. Barvicí roztok byl odsán a misky s buňkami opláchnuty kohoutkovou vodou a usušeny
3. Misky byly nafoceny a buňky byly spočítány dvěma způsoby, v softwaru ImageJ pomocí nástroje Cell counter a manuálně.

7.2.6 Statická analýza dat

Data byla zpracována pomocí počítačového programu Microsoft Excel a pomocí programu GraphPad Prism. Ve sloupcových grafech je znázorněna hodnota aritmetického průměru analyzovaných vzorků. Chybové úsečky ukazují velikost směrodatné odchylky. Statistická signifikance výsledků byla určena v programu GraphPad Prism pomocí 2-way ANOVY a hodnota p je uvedena v popisu grafu.

8. Výsledky

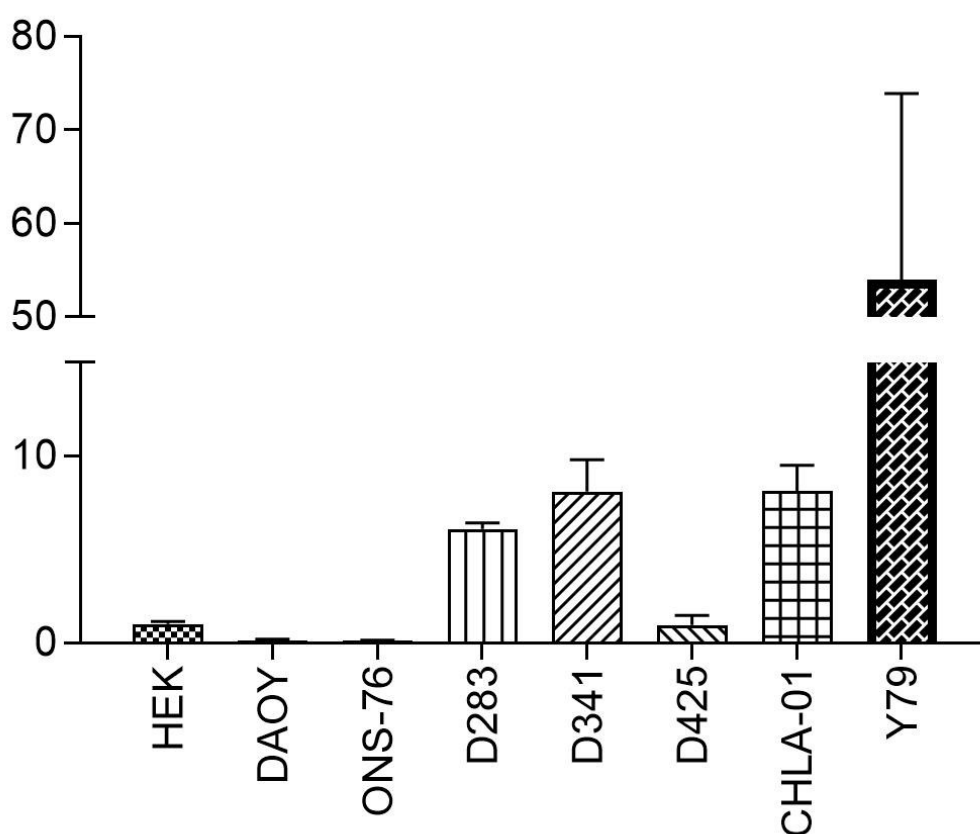
8.1 Exprese *DISP3* v různých meduloblastomových liniích

V první části našich experimentů jsme chtěli zjistit, jak se liší relativní exprese *DISP3* u různých meduloblastomových linií. Jednotlivé meduloblastomové buněčné linie je možné roztrdit do molekulárních skupin (Ivanov et al. 2016). V naší laboratoři jsou dostupné tyto linie: DAOY (skupina SHH), ONS-76 (skupina SHH), D283 (skupina 3 nebo 4), D341 (skupina 3), D425 (skupina 3) a CHLA-01-MED (skupina 4). V těchto buněčných liniích byla porovnána exprese *DISP3* pomocí qPCR.

Výsledky shrnuje Tabulka 4 a Obrázek 8, kde je vyjádřena hladina exprese mRNA *DISP3* vzhledem k referenčnímu genu glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenáze (*GAPDH*). Jako kontroly byly použity lidské buněčné linie HEK a Y79 a výsledky jsou normalizovány na hladinu exprese *DISP3* mRNA u HEK buněk.

	Q	SD
HEK	1,00	0,14
DAOY	0,14	0,05
ONS-76	0,12	0,03
D283	6,11	0,31
D341	8,10	1,69
D425	0,97	0,50
CHLA-01-MED	8,13	1,37
Y79	54,02	19,90

Tabulka 4 - Relativní exprese *DISP3*/*GAPDH* normalizována na buněčnou linii HEK v různých meduloblastomových liniích



Obrázek 8 - *DISP3*/*GAPDH* relativní exprese normalizovaná na expresi v linii HEK v různých meduloblastomových liniích a v retinoblastomové linii Y79

Jako druhý referenční gen byl použit *UBE2D2* (ubiquitin conjugating enzyme E2 D2) a výsledky byly podobné (graf neuveden). Výsledky ukazují, že se exprese *DISP3* mRNA liší v jednotlivých meduloblastomových liniích.

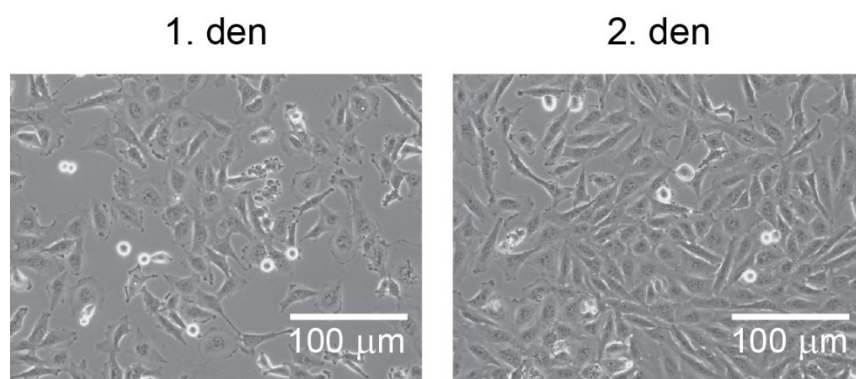
Expres *DISP3* je v porovnání s HEK buňkami nízká u buněčné linie DAOY a ONS-76, srovnatelná v buněčné linii D425 a 6–8× vyšší u buněčných linií D283, D341 a CHLA-01-MED.

Expres *DISP3* je tak nejvyšší u buněčných linií CHLA-01-MED, která patří do skupiny 4 a také u linie D341 ze skupiny 3 a u linie D283, u které není jasné, jestli patří do skupiny 3 nebo 4. Výsledky zároveň ukazují vysokou expresi *DISP3* mRNA u retinoblastomové buněčné linie Y79. Tyto výsledky nás vedly k rozhodnutí dále pracovat na buněčné linii DAOY, v níž je hladina *DISP3* mRNA nízká a tudíž je tato linie vhodná pro zvýšení hladiny tohoto genu.

8.2 Kultivace DAOY buněčné linie v rozdílných podmínkách

8.2.1 Buněčná linie DAOY

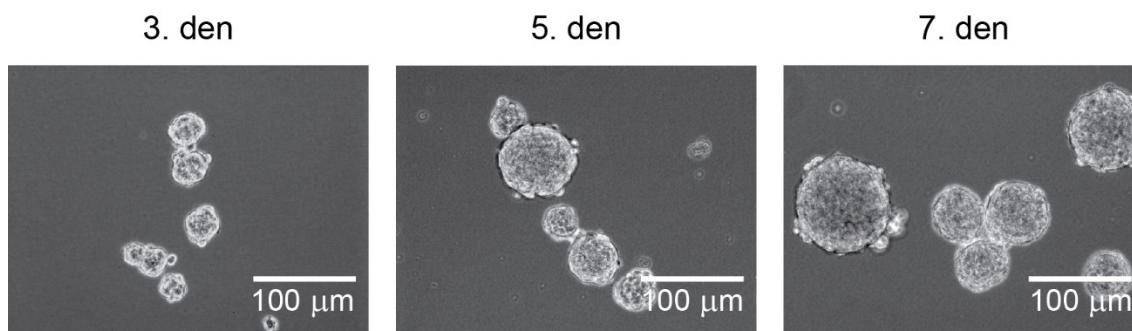
Meduloblastomovou linii DAOY je možno pěstovat ve dvou různých kultivačních podmínkách. Buňky mohou být pěstovány v médiu a na kultivačních miskách, kde tvoří adherentní populaci (Obrázek 9).



Obrázek 9 – DAOY buňky pěstované adherentně

Pokud ale pěstujeme buňky v neurobasal médiu a v lahvičkách s nepřilnavým povrchem tvoří tzv. neurosféry. Neurosféry, nebo též medulosféry (meduloblastomové neurosféry) tvoří kulaté skupiny buněk, jejichž expresní profil se může lišit oproti adherentním buňkám. Odlišnosti exprese některých genů mezi buňkami kultivovanými v adherentních podmínkách a neurosférách již byly ukázány (Zanini et al. 2013).

Pozorovali jsme růst neurosfér. Po vysetí buněk do příslušného média trvá přibližně 3 dny, než se začnou formovat malé skupiny buněk, po 5 dnech už můžeme pozorovat střední neurosféry, 7. den jsou neurosféry velké (Obrázek 10).

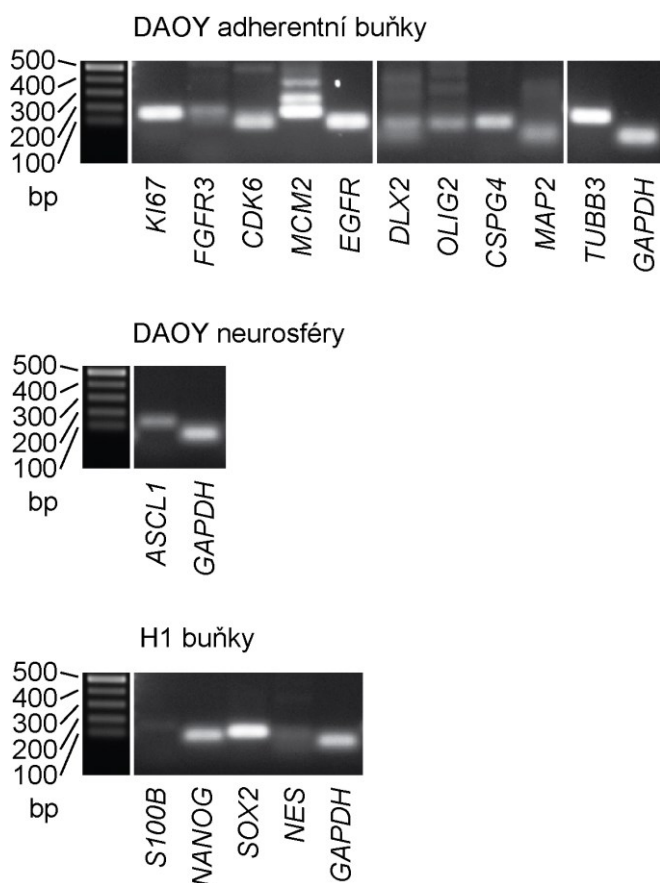


Obrázek 10 – Velikost a tvar neurosfér v průběhu 3., 5. a 7. dne

8.2.2 Primery

Pro porovnání vlivu rozdílných kultivačních podmínek na buňky meduloblastomové linie DAOY byla navržena sada primerů specifických pro proliferaci nebo diferenciaci neurálních buněk v různých stádiích vývoje. Byly vybrány markery quiescentních neurálních buněk *FGFR3*, *GFAP*, *PROM1*, *S100b* a *SOX2*, markery aktivovaných neurálních buněk *ASCL1*, *CDK6*, *EGFR*, *MCM2*, *KI67*, *NES* a *SOX2*, markery progenitorových buněk *ASCL1*, *CDK6*, *DLX2*, *NES* a markery neurálních buněk diferenciovaných do astrocytů (*GFAP*) a do neuronů (*MAP2*, *TUBB3*), shrnuto v Tabulka 5 (Michaelidesová et al. 2019).

Primery byly navrhnuty pomocí software MacVector, jejich specifita ověřena pomocí NCBI databáze a následně byla jejich funkčnost testována pomocí PCR. Primery byly testovány na různých buňkách, většina z nich na buněčné linii DAOY kultivované adhezentně (Obrázek 11). U těchto buněk byly ověřeny markery *KI67*, *FGFR3*, *CDK6*, *MCM2*, *EGFR*, *DLX2*, *CSPG4*, *MAP2*, *ACTB* a *TUBB3*. Některé markery nebyly však u těchto buněk detekovatelné, proto jsme další primery testovali na lidských embryonálních kmenových buňkách H1. U těchto buněk byly dobře detekovatelné markery *S100b*, *NANOG*, *SOX2* a *NES*. U buněk DAOY pěstovaných jako neurosféry byl detekovatelný marker *ASCL1* (Obrázek 11).



Obrázek 11 - PCR testování funkčnosti primerů na různých buňkách s kontrolou GAPDH

U každého nově navrženého primeru byla ověřena také efektivita jeho účinnosti pomocí qPCR. Směs RNA (z DAOY neurosfér i DAOY adherentních, 600 ng) byla reverzně transkribována do cDNA. Tato cDNA byla naředěna 2× (S1), S1 byla naředěna 5× (S2), 25× (S3) a 125× (S4) a pro každé ředění byla provedena qPCR v hexaplikátech. Výpočet efektivit primerů vychází z ideálního stavu, kdy by každý cyklus mělo dojít ke zmnožení DNA 2×. Konkrétní hodnota efektivit primerů byla stanovena na základě závislosti C_p na množství templátu (Tabulka 5).

Primer	efektivita	Jméno genu	Marker
<i>CDK6</i>	1,94	Cyklin dependentní kináza 6	Proliferace a neurogeneze
<i>MCM2</i>	1,91	Minichromosome maintenance Complex Component 2	Proliferace a neurogeneze
<i>DLX2</i>	1,95	Distal-less homeobox 2	Proliferace a neurogeneze
<i>KI67</i>	2,02	Antigen KI-67	Proliferace
<i>S100b</i>	1,89	S100 protein	Astrocyty

<i>FGFR3</i>	1,93	Fibroblast growth factor receptor 3	Astrocyte a quiescence
<i>EGFR</i>	1,98	Epidermal growth factor receptor	Proliferace
<i>PROM1</i>		Prominin (CD133)	Nádorové kmenové buňky
<i>ASCL1</i>	1,73	Achaete-scute family bHLH transcription factor 1	Proliferace a neurogeneze
<i>CSPG4/NG2</i>	1,96	Chondroitin sulfat proteoglycan 4	Ranné oligodendrocyty
<i>MAP2</i>	2,09	Microtubule-associated protein 2	Neurony
<i>TUBB3</i>	1,98	β -tubulin, třída 3	Neurony
<i>SOX2</i>	2,01	SRY-box 2	Kmenovost
<i>NANOG</i>	1,88	Nanog	Kmenovost
<i>NES</i>	1,91	Nestin	Kmenovost

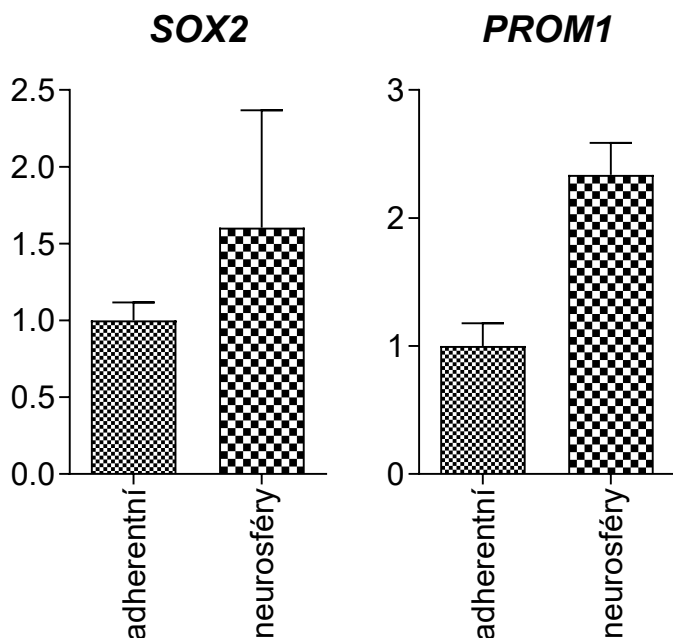
Tabulka 5 – Přehled primerů, jejich označení, efektivita, název a čeho jsou markery

Všechny tyto primery ukázaly efektivitu blížíící se 2 (vyjma *ASCL1*, kde byla hodnota 1,73 a *OLIG*, který pravděpodobně tvořil dimery) a tudíž byly vhodné pro požití na qPCR.

Po validaci těchto primerů jsme mohli přistoupit k samotnému porovnávání exprese jednotlivých neurálních markerů u neurosfér a adherentně pěstovaných buněk DAOY.

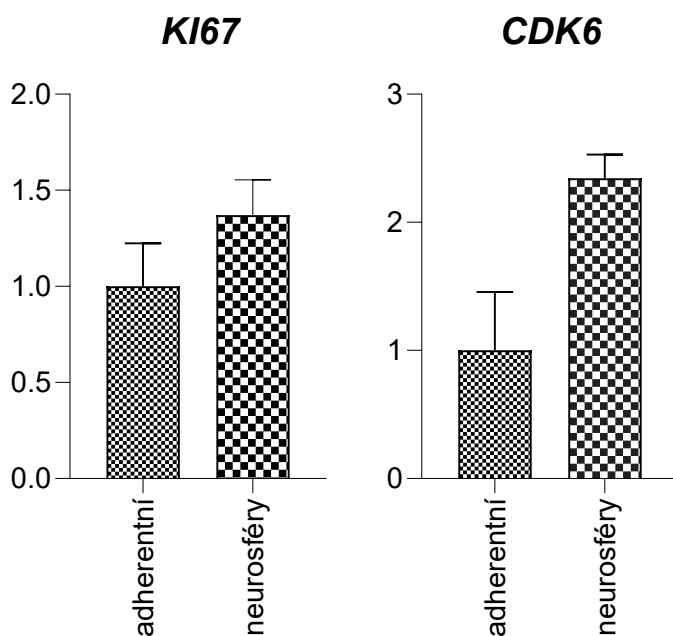
8.2.3 Expese markerů u buněk pěstovaných adherentně a jako neurosféry

Buňky neurosfér byly sbírány 5. – 7. den a ve stejný den byly sebrány i buňky adherentní. Z buněk byla izolována mRNA, z ní syntetizována cDNA, ze které pak byla v triplicátech provedena qPCR. Expese jednotlivých genů byla vztažena na expresi referenčního genu *GAPDH* a *UBE2D2* (data pro *UBE2D2* nejsou uvedena, nicméně výsledky jsou podobné). Z markerů vyšší kmenovosti, tedy ranějšího stádia buněčné diferenciaci, jsme pozorovali změnu v expresi u *SOX2* (Obrázek 12). *NANOG* a *NES* nebyly v buňkách exprimovány ani u jednoho kultivačního způsobu. Zajímavou změnu exprese jsme viděli u *PROM1* (marker nádorových kmenových buněk), který byl u neurosfér oproti adherentním buňkám exprimován více než 2x (Obrázek 12).



Obrázek 12 – Relativní exprese SOX2/GAPDH a PROM1/GAPDH v DAOY buňkách pěstovaných v odlišných kultivačních podmínkách

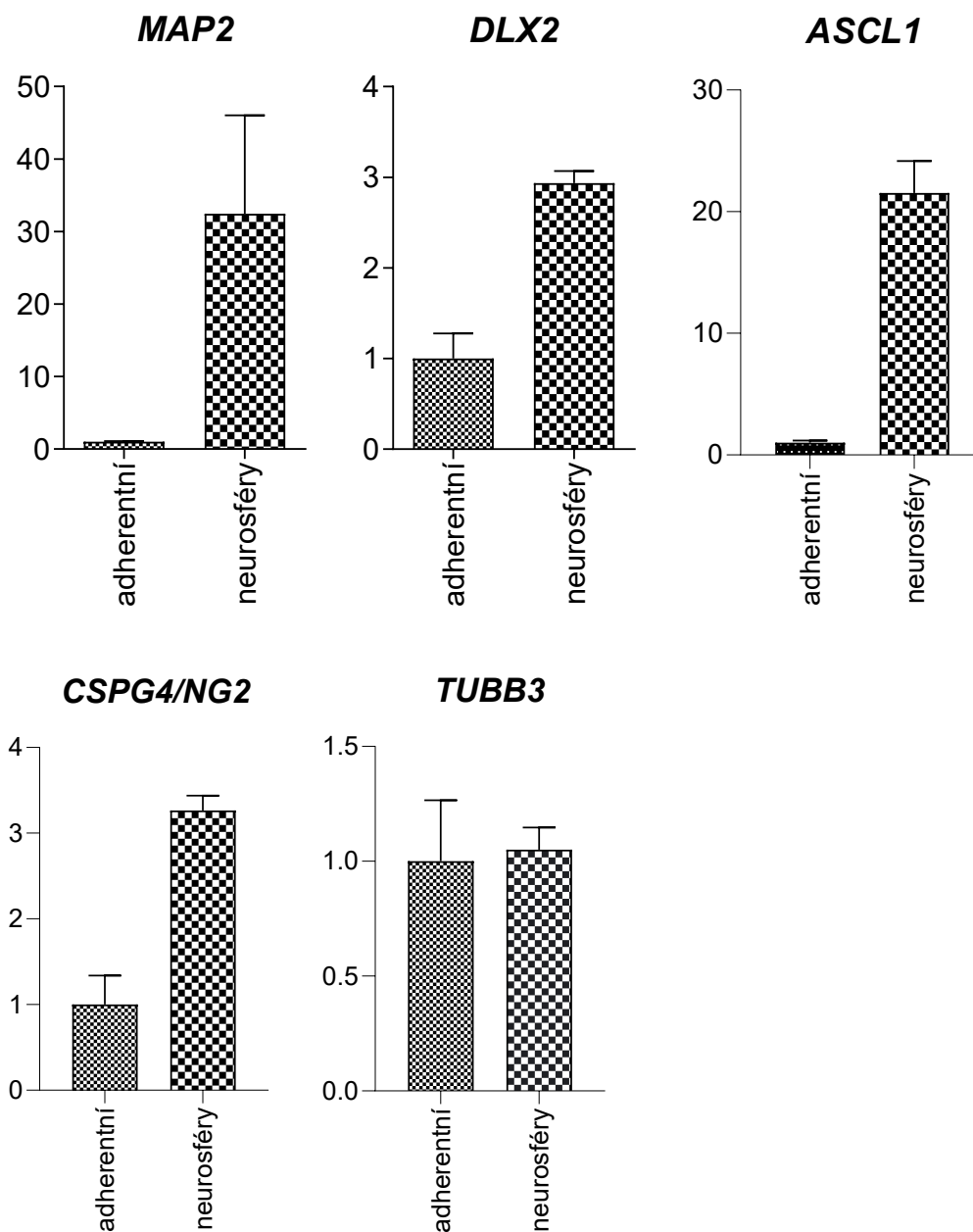
U proliferačních markerů *KI67* a *CDK6*, jsme viděli, že jejich exprese je u neurosfér také vyšší než u buněk adherentních. (Obrázek 13)



Obrázek 13 - Exprese *KI67/GAPDH* a *CDK6/GAPDH* v DAOY buňkách pěstovaných v odlišných kultivačních podmínkách

Dále jsme pozorovali výraznou změnu exprese u *MAP2*, což je marker diferencovaných neuronů. Ten byl u neurosfér exprimována více než 30x proti buňkám adherentním (Ob-

rázek 14). Překvapivě exprese *TUBB3*, který se vyskytuje také u diferenciovanějších buněk (směrem k neuronům), se mezi adherentními buňkami a neurosférami příliš nelišila (Obrázek 14). Expres *DLX* a *ASCL1*, které zvyšují svoji expresi u neurálních prekursorových buněk, tedy u buněk více diferencovaných, je u neurosfér vyšší v porovnání s buňkami adherentními. Také marker raných oligodendrocytů *CSPG4/NG2* měl vyšší expresi více než 3x u neurosfér. *GFAP* nebyl detekovatelný ani u jednoho způsobu pěstování buněčné linie DAOY (graf neuveden).



Obrázek 14 - Expres *MAP2/GAPDH*, *DLX/GAPDH*, *ASCL1/GAPDH*, *CSPG4/GAPDH* a *TUBB3/GAPDH* v DAOY buňkách pěstovaných v odlišných kultivačních podmínkách

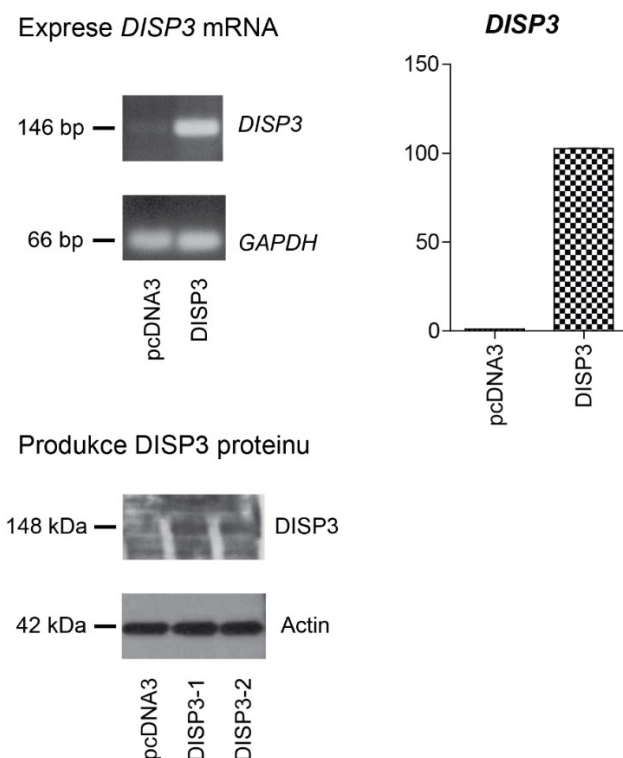
Z těchto výsledků vidíme, že se u neurosfér nezvýšily pouze markery vyšší kmenovosti *SOX2* a *PROM1*, nebo markery proliferace *KI67* a *CDK6*, ale i markery diferenciaci do neuronů *MAP2*, *ASCL1* a *DLX*. Z tohoto by mohlo vyplývat, že buňky rostoucí v neurosférách jsou více heterogenní (v neurosférách se nacházejí buňky více kmenové i buňky více diferencované do neuronů a ranných oligodendrocytů) než buňky pěstované adhe- rentně.

8.3 Reakce buněk DAOY s nadexpresí DISP3 na ozáření

V třetí části jsme se zabývali buňkami DAOY, u kterých jsme zvýšili expresi DISP3 pomocí lipofectaminové transfekce.

8.3.1 Ověření transfekce DISP3 v DAOY buňkách

Adherentní DAOY buňky byly tranfekovány vektorem pcDNA3 (kontrola) a pcDNA3-DISP3 a následně týden selektovány geneticinem. Účinnost transfekce byla ověřena na úrovni mRNA pomocí PCR a qPCR a na proteinové úrovni pomocí westernblotu (Obrázek 15).

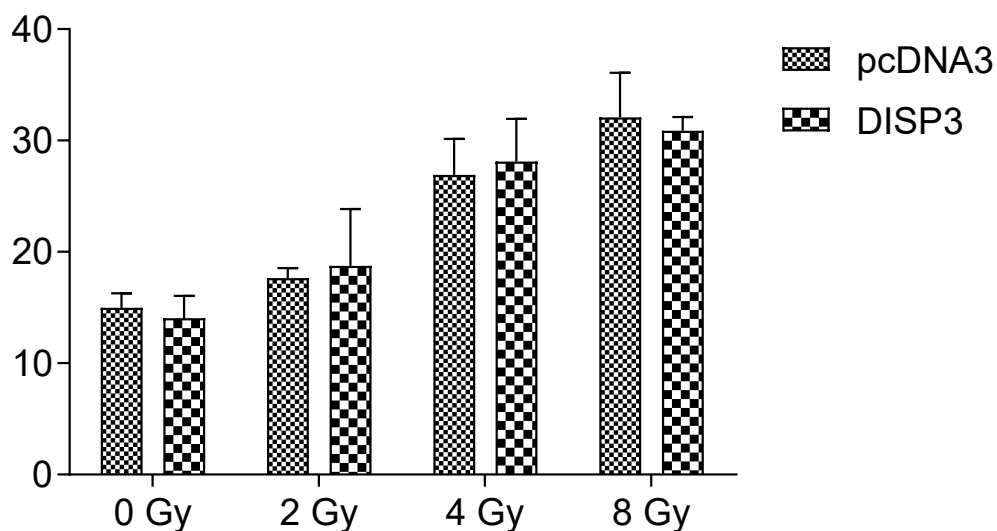


Obrázek 15 – Ověření úspěšné transfekce DAOY buněk vektory pcDNA3 a pcDNA3-DISP3, na úrovni mRNA pomocí PCR, qPCR a na proteinové úrovni pomocí westernblotu

8.3.2 Vliv zvýšené exprese DISP3 na apoptózu

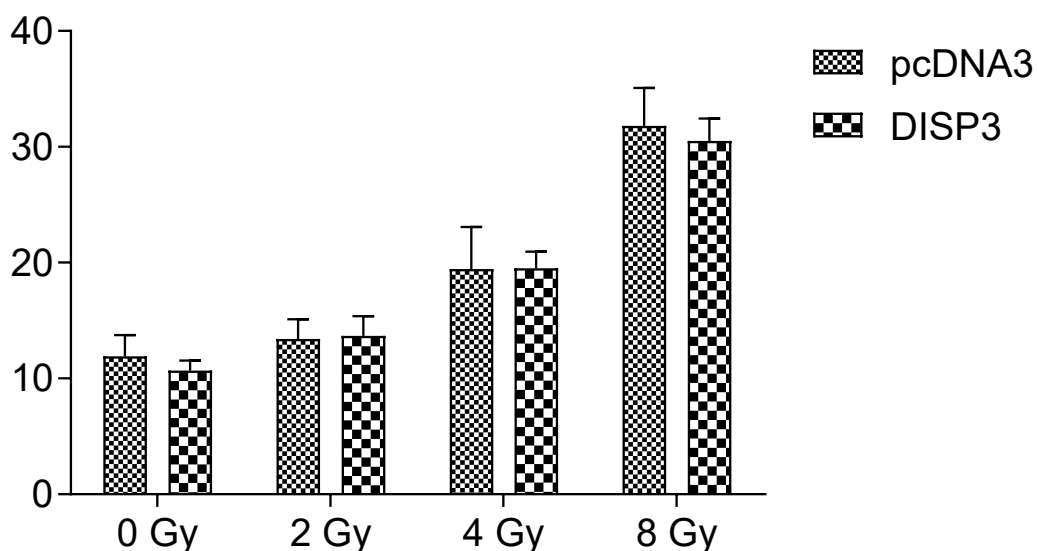
Po vytvoření kontrolních buněk a buněk se zvýšenou stabilní expresí DISP3 v 5 biologických replikátech byly buňky ozářeny ve 4 rozdílných dávkách (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy a 8 Gy) a byly sbírány po 24, 48 a 72 hodinách. Apoptóza byla testována stanovením hladiny kaspáz 3 a 7. Po 24 a 48 hodinách od ozáření jsme pozorovali malý rozdíl v počtu apoptotických buněk (Obrázek 16 a Obrázek 17), buňky sbírané 72 hodin po ozáření byly nehodnotitelné – většina buněk byla rozpadlá a/nebo mrtvá. Software na vyhodnocení experimentů Muse vyhodnocuje a rozděluje buňky do jednotlivých populací podle obarvení na kaspázy 3 a 7, velikosti a viability na buňky živé, apoptotické živé, apoptotické mrtvé a mrtvé. Uváděné grafy znázorňují procenta apoptotických buněk (součet apoptotických živých i apoptotických mrtvých). V grafech (Obrázek 16 a Obrázek 17) můžeme vidět slabý rozdíl mezi buňkami kontrolními a buňkami se zvýšenou expresí *DISP3*. V kultuře se zvýšenou expresí DISP3 je méně apoptotických buněk, nicméně tento rozdíl není signifikantní.

Apoptóza DAOY adherentní, 24 h



Obrázek 16 – Procenta apoptotických buněk (živé i mrtvé) u buněk linie DAOY pěstované adherentně, ozářené v rozdílných dávkách ukazují malý rozdíl mezi buňkami pcDNA3-DISP3 a pcDNA3 (kontrola)

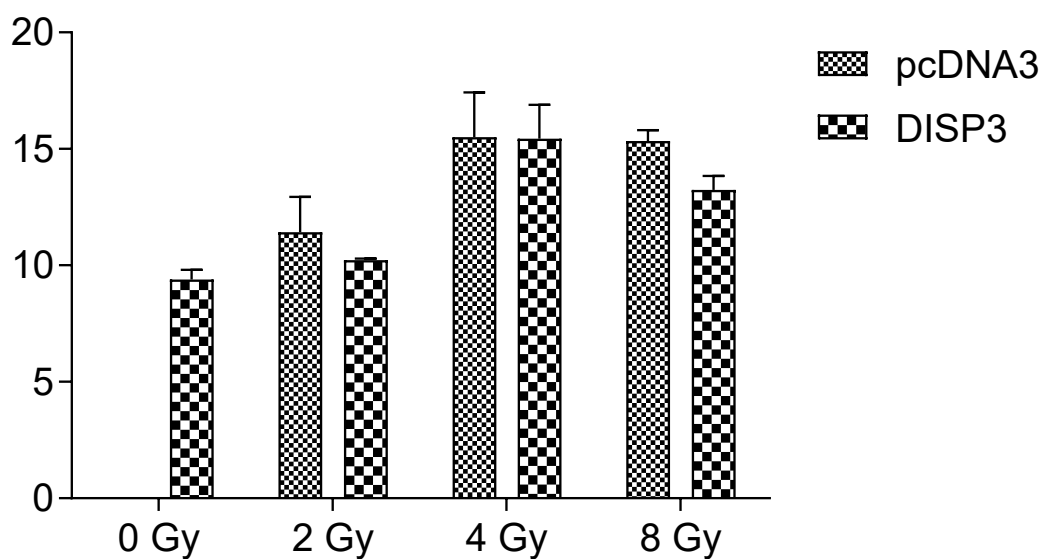
Apoptóza DAOY adherentní, 48 h



Obrázek 17 – Procenta apoptotických buněk (živé i mrtvé) u buněk linie DAOY pěstované adherentně, ozářené v rozdílných dávkách ukazují malý rozdíl mezi buňkami pcDNA3-DISP3 a pcDNA3 (kontrola)

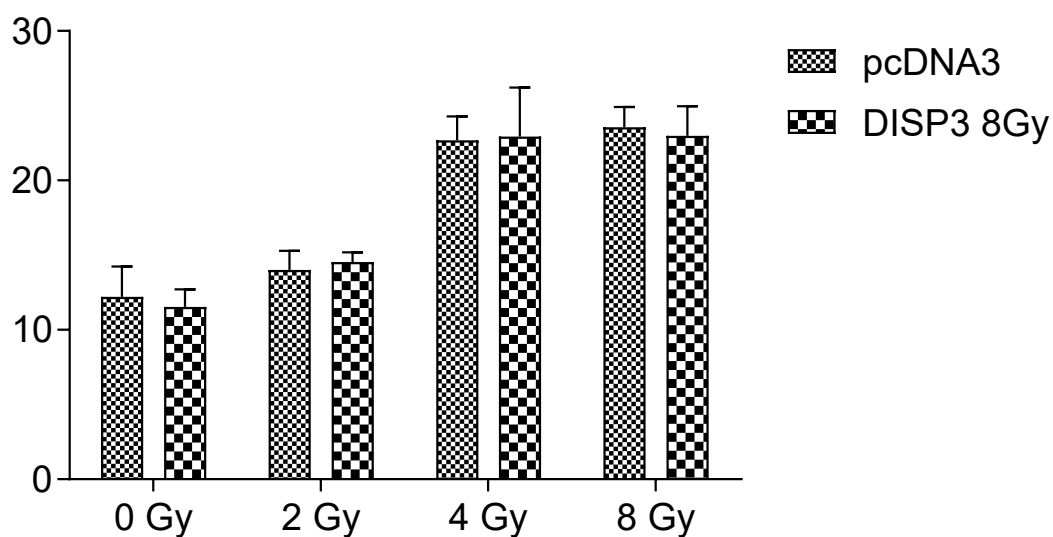
Stejný pokus byl proveden u DAOY buněk pěstovaných jako neurosféry. DISP3 byl nadexprimován stejným způsobem jako v adherentních buňkách a ty byly následně převedeny do neurosfér. Po pěti dnech růstu v neurosférách byly buňky trypsinizovány a ozářeny v lahvičce. Apoptóza byla měřena po 24 h a 48 h. Data z měření po 24 h (Obrázek 18) i 48 h (Obrázek 19) neukazují rozdíl v počtu apoptotických buněk mezi buňkami kontrolními a buňkami se zvýšenou expresí DISP3.

Apoptóza DAOY neurosféry, 24 h



Obrázek 18 – Procenta apoptotických buněk (živé i mrtvé) u buněk DAOY pěstovaných jako neurosféry ozářené různými radiačními dávkami neukazují žádný rozdíl mezi buňkami kontrolními a buňkami se zvýšenou expresí DISP3, u DAOY pcDNA3 0 Gy nejsou uvedena data z technických důvodů

Apoptóza DAOY neurosféry, 48 h

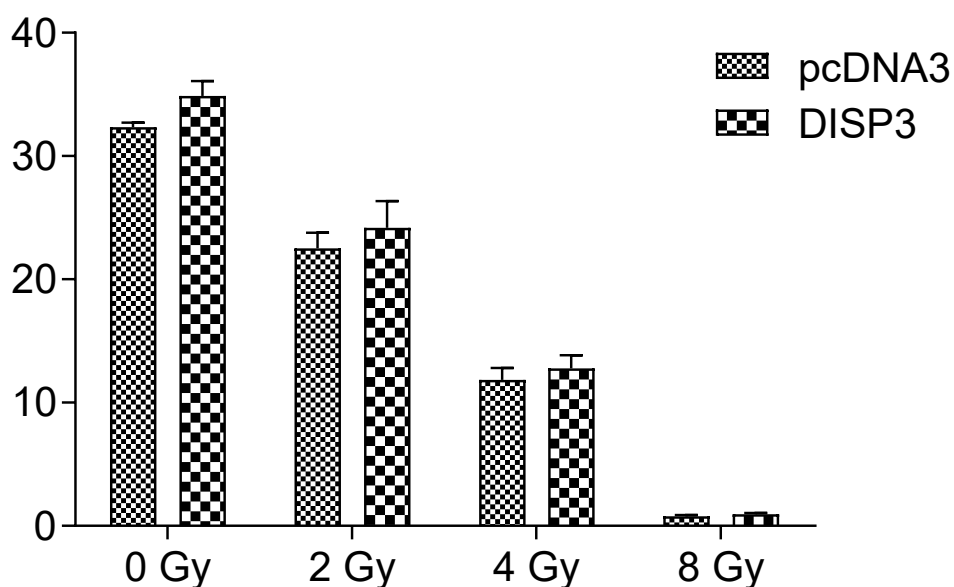


Obrázek 19 – Procenta apoptotických buněk (živé i mrtvé) u buněk DAOY pěstovaných jako neurosféry ozářené různými radiačními dávkami neukazují žádný rozdíl mezi buňkami kontrolními a buňkami se zvýšenou expresí DISP3

8.3.3 Vliv zvýšené exprese DISP3 na formování buněčných kolonií

Další metodou, pomocí které jsme studovali reakci buněk se zvýšenou expresí *DISP3* na ozáření, byl test buněčného přežití. Adherentní DAOY buňky byly po ozáření vysety v nízké koncentraci naisky, průběžně jim bylo měněno médium a po 9 dnech se zafixovaly a spočítaly (Obrázek 20). U těchto buněk jsme viděli rozdíl mezi kulturami, více buněk s nadexprimovaným *DISP3* je schopných dát vznik samostatné kolonii. Tento rozdíl jsme pozorovali ve všech testovaných dávkách ozáření, a také u neozařených buněk (0 Gy). Znamená to, že buňky s nadexprimovaným *DISP3* mají lepší šanci na přežití a vytvoření samostatné kolonie.

Test buněčného přežití DAOY adherentní



Obrázek 20 – Test buněčného přežití: V procentech uvedeno množství buněk, které byly schopné vytvořit kolonii. Buňky DAOY s *pcDNA3* (kontrola) a *pcDNA3-DISP3* ozářené různými dávkami, 2-way ANOVA $p = 0,0103$

9. Diskuze

V této práci jsme se zaměřili na gen *DISP3* a jeho expresi v různých meduloblastomových buněčných liniích, dále pak na porovnání dvou odlišných kultivačních podmínek (ve formě adherentních buněk a neurosfér) u meduloblastomové buněčné linie DAOY a na efekty proteinu DISP3 na buněčné přežívání a na schopnost buňky dát vznik kolonii u této buněčné linie.

Funkce proteinu DISP3 není přesně známá. Z predikce topologie víme, že obsahuje sterol-sensing doménu, která se vyskytuje u proteinů, které mají zásadní roli v metabolismu cholesterolu. U celé rodiny těchto proteinů (*PTCHD1*, *DISP3*, *PTCHD3* a *PTCHD4*), kam *DISP3* patří (Zikova et al. 2009), nejsou v současné době dostatečné poznatky o jejich molekulární funkci a zapojení do různých buněčných procesů. Dříve se předpokládala role v SHH dráze na základě podobnosti těchto proteinů s *PTCH1*, tento předpoklad však nemusí být správný, protože například u *PTCHD1* se ukázalo, že není schopen ovlivnit HH signalizaci v buňkách (Ung et al. 2018). U proteinů *PTCHD1* a *PTCHD3* z této rodiny se ukázalo spojení s rakovinou nebo neurodegenerativními poruchami. Mutace v *PTCHD1* nebo v jeho promotoru jsou spojeny s poruchami autistického spektra (Noor et al. 2010; Chaudhry et al. 2015), mutace v *PTCHD3* je spojována s kolorektálním karcinomem (Smith et al. 2013).

Bylo ukázáno, že *DISP3* ovlivňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci tak, že buňky s vyšší expresí *DISP3* se více množí a nejsou schopné tvořit diferencované funkční neurony (Zíková et al. 2014; Konířová et al. 2017). U buněk se zvýšenou expresí *DISP3* byly nalezeny změny v expresi některých genů, jedním z nich byl gen *Epb4.13*, jehož exprese byla snížena (Zíková et al. 2014). Tento protein má sníženou expresi u vysoce metastazujících nádorů, je často mutován v nádorech mozku, plic a prsou a mutace v tomto proteinu umožňuje metastazovat rakovině prostaty. Jeho zvýšená exprese zabraňuje růstu nádorových buněčných linií *in vitro* a v některých případech je potlačení růstu asociováno se zvýšenou apoptózou (Wong et al. 2007). Další studie (Morrow et al. 2016) ukázala expresi *DISP3* u osteosarkomové linie buněk, které metastazovaly do plic, ale mimo metastatické prostředí jeho hladina nebyla zvednutá. Díky těmto poznatkům jsme se rozhodli studovat, jak *DISP3* ovlivňuje v buňkách apoptózu a metastatický potenciál.

Z analýzy mozkových nádorů vyšel *DISP3* vysoce exprimovaný u meduloblastomů (Obrázek 2).

Meduloblastomy patří mezi nejběžnější maligní nádory mozku u dětí. Kvůli tomu, že se vyskytují během brzkého stádia života vedou k obrovskému snížení kvality života i u přeživších pacientů, a to i kvůli následkům léčby. V roce 2012 byl vydáno ustanovení rozdělující meduloblastomy do 4 molekulárních podskupin, které se mezi sebou liší histologií, prognózou, typem pacientů, ale především mutacemi, amplifikacemi a dalšími změnami v genových expresních profilech (Taylor et al. 2012). Velký důraz je nyní kladen na molekulární porozumění jednotlivým skupinám s cílem zefektivnit léčebný postup. Terapeutický přístup na základě rozdělení pacientů do různých rizik může zajistit lepší kvalitu života dětí, které jsou léčeny a vyhnout se tím negativním následkům nadměrné léčby. To můžeme vidět u WNT skupiny meduloblastomů, kde nejsou potřeba vysoké dávky léčebné iradiace, což je dáno právě molekulární charakteristikou této skupiny (Phoenix et al. 2016).

Porozumění meduloblastomům, a to především těm ze skupiny 3 a 4 je důležité pro optimalizaci léčby. Přestože meduloblastomy ze skupiny 3 mají nejhorší prognózu a meduloblastomy ze skupiny 4 jsou nejčastější, není u těchto skupin objasněna jejich molekulární podstata a nejsou nalezené markery, díky kterým by mohly být snadno diagnostikovány u pacientů na klinikách. Z analýzy různých mozkových nádorů (Obrázek 2) vidíme, že exprese *DISP3* u meduloblastomů dosahuje nejvyšší hladiny, ale má i nejvyšší rozptyl, což může ukazovat na to, že v různých meduloblastomech, možná i v jednotlivých skupinách může být exprese *DISP3* různá. Platnost této hypotézy podporuje i naše pozorování exprese *DISP3* v různých meduloblastomových liniích, která se u jednotlivých linií výrazně liší (Obrázek 8). *DISP3* byl exprimován více u meduloblastomových linií ze skupiny 3 a 4, proto je do budoucna důležitým cílem prozkoumat efekt exprese tohoto genu u meduloblastomových buněčných linií z těchto skupin.

Pro naše experimenty jsme chtěli vybrat linii, ve které je *DISP3* exprimován v malém množství, abychom tuto expresi mohli zvýšit. Nízkou expresi jsme viděli u linie DAOY a ONS-76 (tuto linii ale naše laboratoř získala až později). Z tohoto důvodu jsme vybrali linii DAOY. Tato linie je nejpoužívanější pro výzkum meduloblastomů. Analýza citací meduloblastomových linií ukázala, že články zabývající se DAOY linií tvoří 45 % publikací

zabývajících se meduloblastomovými liniemi (Ivanov et al. 2016). Tuto linii je možné kultivovat ve dvou formách, a to jako buňky adherentní a jako neurosféry. Neurosféry by měly přesněji reflektovat přirozené prostředí. V našich pokusech jsme potvrdili, že kulturní podmínky ovlivňují expresní profil buněk DAOY, a proto jsme některé naše pokusy udělali v obou kulturních podmínkách.

Pro vyhodnocení rozdílů u meduloblastomové linie DAOY kultivované v různých podmínkách byl navržen set PCR primerů, které odpovídaly určitým markerům kmenovosti a diferencovanosti buněk v mozku. Funkčnost těchto primerů jsme ověřovali v různých buněčných liniích pomocí PCR. Většinu primerů jsme ověřovali na buněčné linii DAOY, ale pro ověření některých primerů jsme museli najít jiné vhodné buněčné linie, například primer S100b byl ověřen na lidských embryonálních buňkách H1. U jednoho markeru (OLIG2) jsme pomocí qPCR zjistili, že tvoří tzv. dimery (váže se sám na sebe nebo na druhý primer) a proto jsme ho dále nepoužívali. Počítali jsme efektivitu každého primeru a analyzovali křivku T_m (melting temperature). Důležitou součástí testování exprese jednotlivých markerů pomocí PCR primerů byly kontroly, vždy jedna reakce probíhala s vodou místo cDNA a jedna s kontrolní „cDNA“, kdy do reakce syntézy cDNA nebyla přidána reverzní transkriptáza. Tyto kontrolní vzorky pak sloužily k ověření, že u nich není detekována žádná exprese daného primeru.

Neurosféry byly kultivovány v neurobasal médiu v lahvičkách s nepřilnavým povrchem a důležitou součástí jejich správné tvorby a růstu bylo přidání růstových faktorů FGF a EGF do média. Tyto faktory mohou mít různé efekty na buňky. EGF a FGF řídí proliferaci aktivací drah SHH, WNT a NOTCH (Basak and Taylor 2009). Jejich efekt na buněčnou populaci je prozkoumaný zejména u NSC, kde jsou tyto mitogeny v nízkých koncentracích používány běžně, jelikož přispívají k buněčné proliferaci a udržují vysokou buněčnou hustotu, aniž by kompromitovaly vlastnosti kmenových buněk (Hu et al. 2013).

Abychom ověřili, že přidání těchto faktorů neovlivňuje pozorované změny exprese ostatních neurálních markerů, kultivovali jsme DAOY adherentní buňky po dobu 7 dnů se stejným množstvím těchto faktorů jako jsme přidávali k buňkám neurosfér. U těchto adherentních buněk s přidanými faktory jsme pozorovali zvýšenou expresi receptorů těchto faktorů EGFR a FGFR, nicméně tato exprese byla stále nižší, než exprese těchto

receptorů u neurosfér. Exprese proliferačního markeru CDK6 se u DAOY buněk s přidávanými faktory zvedla asi 1,5× ve srovnání s neurosférami, tam se exprese tohoto markeru zvedla více než 2×. Výrazné změny u jiných markerů jsme nepozorovali.

Heterogenitu populace u neurosfér jsme chtěli ověřit také na úrovni jednotlivých buněk pomocí imunocytochemie. Testovali jsme neurosféry pomocí protilátek proti proteinům KI67, DCX a TUBB3. U KI67 jsme pozorovali heterogenitu populace, ale výsledky však nebyly technicky dobré, a proto jsme je do práce neřadili. Plánujeme však otestovat neurosféry na markery kmenových a diferencovaných buněk, jejichž změnu jsme pozorovali pomocí qPCR, protilátky proti těmto proteinům ovšem v současné době nejsou v naší laboratoři dostupné.

Ve studii (Zanini et al. 2013), zabývající se tvorbou neurosfér ze 3 různých buněčných linií, pozorovali růst neurosfér u těchto linií a jednou z analyzovaných linií byla i linie DAOY. Neurosféry ukázaly počet sfér zvyšující se během prvních 4 dnů, ale pak během dalších pasáží jejich počet klesal. Z růstové křivky, kterou jsme na neurosférách provedli jsme tento efekt nepozorovali, počet buněk se zvyšoval až do 7. dne (výsledky neuvedeny). Nicméně v růstové křivce jsme sledovali počet buněk, ne počet neurosfér. Je tedy možné, že se neurosféry v průběhu času mění. Jedou z teorií je, že pokud se v neurosféře tvoří více diferencované buňky, po trypsinizaci tyto diferencované buňky nemusí utvořit znovu neurosféru, protože už nemají pluripotentní vlastnosti.

Porovnání neurosfér a adherentních buněk u buněčné linie DAOY již bylo provedeno v několika studiích, ale vždy byly zaměřeny především na prominin, případně na další kmenové markery (Zanini et al. 2013; Garg et al. 2017). Výsledky těchto autorů se částečně liší od našich výsledků. Skupina Zanini et al. sledovala expresi určitých markerů kmenovosti a našla rozdíly mezi adherentními a neurosférami. U neurosfér detekovali zvýšený prominin 15×, žádný rozdíl v expresi proteinu nanog, který ale našli exprimován (my jsme ho nedetekovali ani v minimálním množství). Dále pozorovali zvýšenou hladinu nestinu více než 9× u neurosfér (ten jsme také nedetekovali). Některé z těchto markerů ověřovali i pomocí průtokové cytometrie. Odlišné výsledky mohou být dány použitím odlišného metodického přístupu k analýze buněčných populací.

Při porovnání DAOY buněk, kultivovaných jako neurosféry a jako adherentní buňky, jsme viděli změnu hladiny exprese promininu. Prominin je považován za marker nádorových kmenových buněk (CSCs). Některé studie polemizují s rolí promininu v iniciaci nádoru, nicméně je jisté, že CD133 pozitivní buňky mají vysokou sebeobnovující kapacitu a pluripotenci (Garg et al. 2017). Pokud jsou CSCs izolovány přímo z nádoru, tvoří neurosféry při *in vitro* kultivaci a mohou se obnovovat. Kultivace buněčných linií v neurosférách se tedy přibližuje více přirozenému stavu. Na základě exprese CD133 byla vyslovena hypotéza, že tyto CSCs nesou vlastnosti jako je rezistence k apoptóze, rezistence k lékům a iradiaci (Blazek, Foutch, and Maki 2007).

U neurosfér byla pomocí promininu ukázaná heterogenita těchto populací. Buňky pozitivní na expresi toho povrchového markeru byly vyselektovány a následně zkoumány vlastnosti buněk pouze CD133 pozitivních a buněk pouze CD133 negativních. Zjistilo se, že po nějaké době se u buněk pozitivita na prominin vrátí k původním procentům (Blazek, Foutch, and Maki 2007). Další studie ukázala, že nádorová heterogenita je relevantním mechanismem pro metastatické šíření meduloblastomů agresivními klony, které ztratily markery prvotních nádorů (Wu et al. 2012).

V našich pokusech bylo ozařování provedeno na lineárním urychlovači Clinac 600C/D DBX, na kterém probíhá standardní ozařování pacientů. Dávky nebyly frakcionovány, což je standardní postup u pacientů. Pokud jsou buňky ozářeny pomocí frakcionace, dochází k vyššímu stupni přežití, protože buňky mají čas na opravu mezi jednotlivými frakcemi (Gregg, Yau, and Kim 1979). V prvním pokusu jsme buňky ozařovaly před vyšetím, pozorovali jsme ale u nich vysoké procento mrtvých buněk, asi způsobené tímto hned po sobě jdoucím stresem (ozáření a pak vysévání). Proto jsme změnili tento postup a další buňky byly vysety o určité koncentraci na misky a ozářeny po 24 hodinách, což zmírnilo stres, kterému byly buňky vystaveny.

Metastatický potenciál buněk jsme se rozhodli zkoumat pomocí testu buněčného přežití. Tento test v základě testuje schopnost každé buňky v populaci dát vzniknout kolonii, tudíž se „neomezeně dělit“ (Franken et al. 2006). Tento pokus jsme udělali na adherentních buňkách linie DAOY a viděli jsme signifikantní rozdíl mezi buňkami kontrolními a buňkami s vyšší expresí DISP3. Tyto buňky vytvořily větší počet kolonií. Rozdíl průměru

mezi kontrolními buňkami a buňkami se zvýšenou expresí DISP3 v jednotlivých ozařovacích dávkách byl přibližně 8 – 15 %. Tento pokus jsme udělali i s DAOY buňkami kultivovanými ve sférách, kdy kolonie jednotlivých sfér rostou v soft agaru. Nicméně kvůli technickým obtížím jsme tento pokus nedokončili a výsledky nebyly vyhodnocené. Tento pokus bychom chtěli zopakovat, abychom i tyto výsledky mohli porovnat s výsledky dosaženými u adherentních buněk.

V metastatickém potenciálu buňky nehraje roli pouze její schopnost dát vzniknout kolonii, rakovinné buňky musí také opustit primární místo nádoru, cirkulovat v krevním oběhu, vydržet tlak v cévách a aklimatizovat se do sekundárního prostředí a zároveň uniknout kontaktu s imunitními buňkami. Metastatický potenciál buněk bychom chtěli dále ještě ověřit pomocí jiných metod, a to pomocí migračního testu a xenotransplantace, kdy bychom chtěli injektovat buňky se změněnou hladinou DISP3 do imunodeficientních myšiček a pozorovat jejich schopnost vytvořit nádor.

Apoptózu jsme měřili pomocí MUSE přístroje, který rozděluje populace buněk podle jejich viability, velikosti a barvení kaspázy 3 a 7. Kaspázy 3 a 7 jsou efektorové kaspázy, které se aktivují až pozdních fázích apoptózy. Buňky byly analyzovány po 24, 48 a 72 hodinách, kdy nejlepší výsledky jsme viděli po 48 h. U adherentních buněk jsme po 24 a 48 hodinách viděli malou tendenci ukazující nižší procentuální zastoupení apoptotických buněk u linie s nadexprimovaným DISP3, nicméně výsledky nebyly signifikantní. U DAOY neurosfér jsme rozdíl mezi kontrolními buňkami DAOY a buňkami nadexprimujícími DISP3 nezjistili. Důvodů, proč nevyšly signifikantní rozdíly u měření apoptózy pomocí kaspázy 3 a 7 může být hned několik. Tato linie jednak nemusí reagovat na nadexpresi DISP3, případně podmínky *in vitro* nemusí být vhodné nebo stanovení kaspázy 3 a 7 nemusí být vhodná metoda. Také bychom mohli ověřit apoptózu na úrovni qPCR na stanovení hladiny exprese apoptotických genů.

V budoucích navazujících experimentech bychom se chtěli zabývat i jinými meduloblastomovými liniemi. Stejně pokusy bychom chtěli udělat na meduloblastomové linii ONS-76, ta patří také do skupiny SHH a má nízkou expresi DISP3. Zaměříme se také na některou z linií s vysokou expresí *DISP3*, u té bychom mohli expresi ještě zvýšit, a také naopak snížit pomocí CRISPER/Cas9 a u těchto buněk sledovat schopnost apoptózy a tvorby bu-

něčných kolonií. Vhodná je linie CHLA-01-MED (skupina 4), u které jsme již začali pracovat na zvýšení exprese. Tyto buňky zatím nebyly úspěšně transfekovány. Test buněčného přežití se u suspenzních buněk dělá v soft agaru, tuto metodu jsme nedávno optimalizovali na DAOY neurosférách. Také by bylo zajímavé snížení exprese DISP3 u DAOY buněk, neboť efekt na přežívání buněk může mít i nízká exprese DISP3. Případně porovnávat expresi u linií D425 a D458, což jsou linie derivované ze stejného pacienta, z nichž jedna je odvozena z primárního nádoru a druhá z metastáz. Dále bychom chtěli ověřit metastatický potenciál buněk i jinak než jen v testu buněčného přežití, a to pomocí migračního testu nebo xenotransplantace. Také bychom chtěli použít protilátky na ověření heterogenity u buněk DAOY pěstovaných jako neurosféry, a tím se podívat na exprese jednotlivých markerů v buněčné kolonii.

DISP3 zůstává genem, který může ovlivňovat metastatický potenciál buněk. Jeho exprese byla nalezena u metastatických osteosarkomů a teď jsme potvrdili, že pokud je jeho exprese zvýšená u buněčné linie DAOY, tak jsou tyto buňky schopny vytvořit více kolonií. Zůstává však důležité ověřit tento gen i v jiných liniích jinými metodami pro zjištění jeho přesné role v buněčném fungování a případném efektu jeho nadexprese na meduloblastomy.

10. Závěr

Cíly této diplomové práce bylo:

1. Porovnat expresi *DISP3* v různých meduloblastomových liniích
2. Kultivovat vybranou meduloblastomovou linii v různých podmínkách (adherentní buňky a neurosféry) a porovnat expresní profil vybraných markerů
3. Sledovat reakci buněk vybrané meduloblastomové linie se zvýšenou expresí *DISP3* na ozáření

Tyto cíle byly splněny následovně:

1. Expres *DISP3* se liší v různých meduloblastomových liniích, exprese je relativně nízká u linie DAOY a ONS-76, stejná u linie D425 a vysoká u linie D283, D341 a CHLA-01-MED v porovnání s kontrolními buňkami HEK
2. Meduloblastomová buněčná linie DAOY byla kultivována v podmínkách, kdy tvořila adherentní buňky a v podmínkách, kdy tvořila neurosféry. Byl porovnán expresní profil vybraných markerů v těchto dvou rozdílných kultivačních podmínkách a ukázalo se, že neurosféry jsou více heterogenní. Tvoří je populace více i méně diferencovaných buněk (buňky exprimovaly vyšší hladinu markerů jak kmenovosti SOX2, PROM1, tak i markerů více diferencovaných buněk MAP2, CSPG4, DLX2).
3. Byla zvýšena exprese *DISP3* genu v buněčné linii DAOY, která byla následně ozářena v rozdílných dávkách a byla pozorována apoptóza těchto buněk a schopnost tvořit kolonie. Množství apoptotických buněk se mezi kontrolními buňkami a buňkami nadexprimující *DISP3* příliš nelišilo, nicméně buňky s vyšší expresí *DISP3* vytvořily jak po ozáření, tak i bez něj více kolonií než buňky kontrolní.

11. Seznam použité literatury

- Basak, O., and V. Taylor. 2009. 'Stem cells of the adult mammalian brain and their niche', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66: 1057-72.
- Bjorkhem, I., and S. Meaney. 2004. 'Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier', *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 24: 806-15.
- Blazek, Ed R., Jennifer L. Foutch, and Guitta Maki. 2007. 'Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133⁻ cells, and the CD133⁺ sector is enlarged by hypoxia', *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 67: 1-5.
- Borowska, A., and J. Joozwiak. 2016. 'Medulloblastoma: molecular pathways and histopathological classification', *Archives of Medical Science*, 12: 659-66.
- Bretscher, Anthony, Kevin Edwards, and Richard G. Fehon. 2002. 'ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 586-99.
- Bucher, N., and C. D. Britten. 2008. 'G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer', *British Journal of Cancer*, 98: 523-28.
- Burke, Richard, Denise Nellen, Manolo Bellotto, Ernst Hafen, Kirsten-André Senti, Barry J. Dickson, and Konrad Basler. 1999. 'Dispatched, a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells', *Cell*, 99: 803-15.
- Cavalli, Florence M. G., Marc Remke, Ladislav Rampasek, John Peacock, David J. H. Shih, Betty Luu, Livia Garzia, Jonathon Torchia, Carolina Nor, A. Sorana Morrissy, Sameer Agnihotri, Yuan Yao Thompson, Claudia M. Kuzan-Fischer, Hamza Farooq, Keren Isaev, Craig Daniels, Byung-Kyu Cho, Seung-Ki Kim, Kyu-Chang Wang, Ji Yeoun Lee, Wieslawa A. Grajkowska, Marta Perek-Polnik, Alexandre Vasiljevic, Cecile Faure-Conter, Anne Jouvét, Caterina Giannini, Amulya A. Nageswara Rao, Kay Ka Wai Li, Ho-Keung Ng, Charles G. Eberhart, Ian F. Pollack, Ronald L. Hamilton, G. Yancey Gillespie, James M. Olson, Sarah Leary, William A. Weiss, Boleslaw Lach, Lola B. Chambless, Reid C. Thompson, Michael K. Cooper, Rajeev Vibhakar, Peter Hauser, Marie-Lise C. Van Veelen, Johan M. Kros, Pim J. French, Young Shin Ra, Toshihiro Kumabe, Enrique López-Aguilar, Karel Zitterbart, Jaroslav Sterba, Gaetano Finocchiaro, Maura Massimino, Erwin G. Van Meir, Satoru Osuka, Tomoko Shofuda, Almos Klekner, Massimo Zollo, Jeffrey R. Leonard, Joshua B. Rubin, Nada Jabado, Steffen Albrecht, Jaume Mora, Timothy E. Van Meter, Shin Jung, Andrew S. Moore, Andrew R. Hallahan, Jennifer A. Chan, Daniela P. C. Tirapelli, Carlos G. Carlotti, Maryam Fouladi, José Pimentel, Claudia C. Faria, Ali G. Saad, Luca Massimi, Linda M. Liao, Helen Wheeler, Hideo Nakamura, Samer K. Elbabaa, Mario Perezpeña-Diazconti, Fernando Chico Ponce De León, Shenandoah Robinson, Michal Zapotocky, Alvaro Lassaletta, Annie Huang, Cynthia E. Hawkins, Uri Tabori, Eric Bouffet, Ute Bartels, Peter B. Dirks, James T. Rutka, Gary D. Bader, Jüri Reimand, Anna Goldenberg, Vijay Ramaswamy, and Michael D. Taylor. 2017. 'Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups', *Cancer Cell*, 31: 737-54.e6.
- Ding, X., W. H. Zhang, S. Li, and H. Yang. 2019. 'The role of cholesterol metabolism in cancer', *American Journal of Cancer Research*, 9: 219-27.
- Dufour, Christelle, Annick Beaugrand, Barry Pizer, Julie Micheli, Marie-Stephanie Aubelle, Aurelie Fourcade, Dominique Couanet, Agnes Laplanche, Chantal Kalifa, and Jacques Grill. 2012. 'Metastatic Medulloblastoma in Childhood: Chang's Classification Revisited', *International Journal of Surgical Oncology*, 2012: 245385.

- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree. 2006. 'Clonogenic assay of cells in vitro', *Nature Protocol*, 1: 2315-9.
- Fults, D. W., M. D. Taylor, and L. Garzia. 2019. 'Leptomeningeal dissemination: a sinister pattern of medulloblastoma growth', *J Neurosurg Pediatr*: 1-9.
- Garg, N., D. Bakhshinyan, C. Venugopal, S. Mahendram, D. A. Rosa, T. Vijayakumar, B. Manoranjan, R. Hallett, N. McFarlane, K. H. Delaney, J. M. Kwiecien, C. C. Arpin, P. S. Lai, R. F. Gómez-Biagi, A. M. Ali, E. D. De Araujo, O. A. Ajani, J. A. Hassell, P. T. Gunning, and S. K. Singh. 2017. 'CD133+ brain tumor-initiating cells are dependent on STAT3 signaling to drive medulloblastoma recurrence', *Oncogene*, 36: 606-17.
- Garzia, Livia, Noriyuki Kijima, A. Sorana Morrissy, Pasqualino De Antonellis, Ana Guerreiro-Stucklin, Borja L. Holgado, Xiaochong Wu, Xin Wang, Michael Parsons, Kory Zayne, Alex Manno, Claudia Kuzan-Fischer, Carolina Nor, Laura K. Donovan, Jessica Liu, Lei Qin, Alexandra Garancher, Kun-Wei Liu, Sheila Mansouri, Betty Luu, Yuan Yao Thompson, Vijay Ramaswamy, John Peacock, Hamza Farooq, Patryk Skowron, David J. H. Shih, Angela Li, Sherine Ensan, Clinton S. Robbins, Myron Cybulsky, Siddhartha Mitra, Yussanne Ma, Richard Moore, Andy Mungall, Yoon-Jae Cho, William A. Weiss, Jennifer A. Chan, Cynthia E. Hawkins, Maura Massimino, Nada Jabado, Michal Zapotocky, David Sumerauer, Eric Bouffet, Peter Dirks, Uri Tabori, Poul H. B. Sorensen, Priscilla K. Brastianos, Kenneth Aldape, Steven J. M. Jones, Marco A. Marra, James R. Woodgett, Robert J. Wechsler-Reya, Daniel W. Fults, and Michael D. Taylor. 2018. 'A Hematogenous Route for Medulloblastoma Leptomeningeal Metastases', *Cell*, 172: 1050-62.e14.
- Glinsky, Gennadi V., and Vladislav V. Glinsky. 1996. 'Apoptosis and metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death', *Cancer Letters*, 101: 43-51.
- Goldowitz, D., and K. Hamre. 1998. 'The cells and molecules that make a cerebellum', *Trends Neurosci*, 21: 375-82.
- Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd, and M. S. Brown. 2006. 'Protein sensors for membrane sterols', *Cell*, 124: 35-46.
- Goto, Kaoru, and Hisatake Kondo. 1996. 'Heterogeneity of diacylglycerol kinase in terms of molecular structure, biochemical characteristics and gene expression localization in the brain', 14: 251-57.
- Gregg, E. C., T. M. Yau, and S. C. Kim. 1979. 'Effect of low dose rate radiation on cell growth kinetics', 28: 81-91.
- Griesinger, A. M., R. J. Josephson, A. M. Donson, J. M. Mulcahy Levy, V. Amani, D. K. Birks, L. M. Hoffman, S. L. Furtek, P. Reigan, M. H. Handler, R. Vibhakar, and N. K. Foreman. 2015. 'Interleukin-6/STAT3 Pathway Signaling Drives an Inflammatory Phenotype in Group A Ependymoma', 3: 1165-74.
- Hooper, C. M., S. M. Hawes, U. R. Kees, N. G. Gottardo, and P. B. Dallas. 2014a. 'Gene Expression Analyses of the Spatio-Temporal Relationships of Human Medulloblastoma Subgroups during Early Human Neurogenesis', *Plos One*, 9.
- Hooper, Cornelia M., Susan M. Hawes, Ursula R. Kees, Nicholas G. Gottardo, and Peter B. Dallas. 2014b. 'Gene Expression Analyses of the Spatio-Temporal Relationships of Human Medulloblastoma Subgroups during Early Human Neurogenesis', *Plos One*, 9: e112909.
- Hu, Feihu, Xiu Wang, Gaofeng Liang, Lanxin Lv, Yanliang Zhu, Bo Sun, and Zhongdang Xiao. 2013. 'Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells', *Cellular reprogramming*, 15: 224-32.
- Huang, P. X., D. Nedelcu, M. Watanabe, C. Jao, Y. Kim, J. Liu, and A. Salic. 2016. 'Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling', *Cell*, 166: 1176-+.

- Chang, C. H., E. M. Housepian, and C. Herbert, Jr. 1969. 'An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas', *Radiology*, 93: 1351-9.
- Chaudhry, A., A. Noor, B. Degagne, K. Baker, L. A. Bok, A. F. Brady, D. Chitayat, B. H. Chung, C. Cytrynbaum, D. Dymont, I. Filges, B. Helm, H. T. Hutchison, L. J. B. Jeng, F. Laumonier, C. R. Marshall, M. Menzel, S. Parkash, M. J. Parker, L. F. Raymond, A. L. Rideout, W. Roberts, R. Rupps, I. Schanze, C. T. R. M. Schrandt-Stumpel, M. D. Speevak, D. J. Stavropoulos, S. J. C. Stevens, E. R. A. Thomas, A. Toutain, S. Vergano, R. Weksberg, S. W. Scherer, J. B. Vincent, and M. T. Carter. 2015. 'Phenotypic spectrum associated with PTCHD1 deletions and truncating mutations includes intellectual disability and autism spectrum disorder', *Clinical Genetics*, 88: 224-33.
- Ingham, P. W. 2001. 'Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles', *Genes & Development*, 15: 3059-87.
- Ivanov, Delyan P., Beth Coyle, David A. Walker, and Anna M. Grabowska. 2016. 'In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job', *Journal of Biotechnology*, 236: 10-25.
- Jaillard, C. 2005. 'Edg8/S1P5: An Oligodendroglial Receptor with Dual Function on Process Retraction and Cell Survival', 25: 1459-69.
- Katoh, Y., and M. Katoh. 2005. 'Identification and characterization of DISP3 gene in silico', *Int J Oncol*, 26: 551-6.
- Kim, J., F. Yao, Z. Xiao, Y. Sun, and L. Ma. 2018. 'MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles', *Cancer Metastasis Rev*, 37: 5-15.
- Konířová, J., J. Oltová, A. Corlett, J. Kopycińska, M. Kolář, P. Bartůněk, and M. Zíková. 2017. 'Modulated DISP3/PTCHD2 expression influences neural stem cell fate decisions', *Sci Rep*, 7: 41597.
- Kool, Marcel, Andrey Korshunov, Marc Remke, David T. W. Jones, Maria Schlanstein, Paul A. Northcott, Yoon-Jae Cho, Jan Koster, Antoinette Schouten-Van Meeteren, Dannis Van Vuurden, Steven C. Clifford, Torsten Pietsch, Andre O. Von Bueren, Stefan Rutkowski, Martin McCabe, V. Peter Collins, Magnus L. Bäcklund, Christine Haberler, Franck Bourdeaut, Olivier Delattre, Francois Doz, David W. Ellison, Richard J. Gilbertson, Scott L. Pomeroy, Michael D. Taylor, Peter Lichter, and Stefan M. Pfister. 2012. 'Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas', *Acta Neuropathologica*, 123: 473-84.
- Kuwabara, Patricia E., and Michel Labouesse. 2002. 'The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role?', *Trends in Genetics*, 18: 193-201.
- Lannering, Birgitta, Stefan Rutkowski, Francois Doz, Barry Pizer, Göran Gustafsson, Aurora Navajas, Maura Massimino, Roel Reddingius, Martin Benesch, Christian Carrie, Roger Taylor, Lorenza Gandola, Thomas Björk-Eriksson, Jordi Giralt, Foppe Oldenburger, Torsten Pietsch, Dominique Figarella-Branger, Keith Robson, Marco Forni, Steven C. Clifford, Monica Warmuth-Metz, Katja Von Hoff, Andreas Faldum, Véronique Mosseri, and Rolf Kortmann. 2012. 'Hyperfractionated Versus Conventional Radiotherapy Followed by Chemotherapy in Standard-Risk Medulloblastoma: Results From the Randomized Multicenter HIT-SIOP PNET 4 Trial', *Journal of Clinical Oncology*, 30: 3187-93.
- Leprivier, Gabriel, Barak Rotblat, Debjit Khan, Eric Jan, and Poul H. Sorensen. 2015. 'Stress-mediated translational control in cancer cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849: 845-60.
- Lewanski, C. R., and W. J. Gullick. 2001. 'Radiotherapy and cellular signalling', *Lancet Oncol*, 2: 366-70.
- Michaelidesová, Anna, Jana Konířová, Petr Bartůněk, and Martina Zíková. 2019. 'Effects of Radiation Therapy on Neural Stem Cells', *Genes*, 10: 640.

- Morrow, J. J., A. Mendoza, A. Koyen, M. M. Lizardo, L. Ren, T. J. Waybright, R. J. Hansen, D. L. Gustafson, M. Zhou, T. M. Fan, P. C. Scacheri, and C. Khanna. 2016. 'mTOR Inhibition Mitigates Enhanced mRNA Translation Associated with the Metastatic Phenotype of Osteosarcoma Cells In Vivo', *Clinical Cancer Research*, 22: 6129-41.
- Mulhern, Raymond K., Shawna L. Palmer, Thomas E. Merchant, Dana Wallace, Mehmet Kocak, Pim Brouwers, Kevin Krull, Murali Chintagumpala, Robyn Stargatt, David M. Ashley, Vida L. Tyc, Larry Kun, James Boyett, and Amar Gajjar. 2005. 'Neurocognitive Consequences of Risk-Adapted Therapy for Childhood Medulloblastoma', *Journal of Clinical Oncology*, 23: 5511-19.
- Mullur, R., Y. Y. Liu, and G. A. Brent. 2014. 'THYROID HORMONE REGULATION OF METABOLISM', *Physiological Reviews*, 94: 355-82.
- Nohturfft, A., M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 1998. 'Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain', *Journal of Biological Chemistry*, 273: 17243-50.
- Noor, A., A. Whibley, C. R. Marshall, P. J. Gianakopoulos, A. Piton, A. R. Carson, M. Orlic-Milacic, A. C. Lionel, D. Sato, D. Pinto, I. Drmic, C. Noakes, L. Senman, X. Y. Zhang, R. Mo, J. Gauthier, J. Crosbie, A. T. Pagnamenta, J. Munson, A. M. Estes, A. Fiebig, A. Franke, S. Schreiber, A. F. R. Stewart, R. Roberts, R. McPherson, S. J. Guter, E. H. Cook, G. Dawson, G. D. Schellenberg, A. Battaglia, E. Maestrini, L. Jeng, T. Hutchison, E. Rajcan-Separovic, A. E. Chudley, S. M. E. Lewis, X. D. Liu, J. J. Holden, B. Fernandez, L. Zwaigenbaum, S. E. Bryson, W. Roberts, P. Szatmari, L. Gallagher, M. R. Stratton, J. Gecz, A. F. Brady, C. E. Schwartz, R. J. Schachar, A. P. Monaco, G. A. Rouleau, C. C. Hui, F. L. Raymond, S. W. Scherer, J. B. Vincent, and Consortium Autism Genome Project. 2010. 'Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability', *Science Translational Medicine*, 2: 9.
- Northcott, P. A., G. W. Robinson, C. P. Kratz, D. J. Mabbott, S. L. Pomeroy, S. C. Clifford, S. Rutkowski, D. W. Ellison, D. Malkin, M. D. Taylor, A. Gajjar, and S. M. Pfister. 2019a. 'Medulloblastoma', *Nature Reviews Disease Primers*, 5.
- . 2019b. 'Medulloblastoma', *Nature Reviews Disease Primers*, 5: 20.
- Northcott, Paul A., Ivo Buchhalter, A. Sorana Morrissy, Volker Hovestadt, Joachim Weischenfeldt, Tobias Ehrenberger, Susanne Gröbner, Maia Segura-Wang, Thomas Zichner, Vasilisa A. Rudneva, Hans-Jörg Warnatz, Nikos Sidiropoulos, Aaron H. Phillips, Steven Schumacher, Kortine Kleinheinz, Sebastian M. Waszak, Serap Erkek, David T. W. Jones, Barbara C. Worst, Marcel Kool, Marc Zapatka, Natalie Jäger, Lukas Chavez, Barbara Hutter, Matthias Bieg, Nagarajan Paramasivam, Michael Heinold, Zuguang Gu, Naveed Ishaque, Christina Jäger-Schmidt, Charles D. Imbusch, Alke Jugold, Daniel Hübschmann, Thomas Risch, Vyacheslav Amstislavskiy, Francisco German Rodriguez Gonzalez, Ursula D. Weber, Stephan Wolf, Giles W. Robinson, Xin Zhou, Gang Wu, David Finkelstein, Yanling Liu, Florence M. G. Cavalli, Betty Luu, Vijay Ramaswamy, Xiaochong Wu, Jan Koster, Marina Ryzhova, Yoon-Jae Cho, Scott L. Pomeroy, Christel Herold-Mende, Martin Schuhmann, Martin Ebinger, Linda M. Liao, Jaime Mora, Roger E. McLendon, Nada Jabado, Toshihiro Kumabe, Eric Chuah, Yussanne Ma, Richard A. Moore, Andrew J. Mungall, Karen L. Mungall, Nina Thiessen, Kane Tse, Tina Wong, Steven J. M. Jones, Olaf Witt, Till Milde, Andreas Von Deimling, David Capper, Andrey Korshunov, Marie-Laure Yaspo, Richard Kriwacki, Amar Gajjar, Jinghui Zhang, Rameen Beroukhim, Ernest Fraenkel, Jan O. Korbel, Benedikt Brors, Matthias Schlesner, Roland Eils, Marco A. Marra, Stefan M. Pfister, Michael D. Taylor, and Peter Lichter. 2017. 'The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes', *Nature*, 547: 311-17.
- Northcott, Paul A., Andrey Korshunov, Hendrik Witt, Thomas Hielscher, Charles G. Eberhart, Stephen Mack, Eric Bouffet, Steven C. Clifford, Cynthia E. Hawkins,

- Pim French, James T. Rutka, Stefan Pfister, and Michael D. Taylor. 2011. 'Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants', *Journal of Clinical Oncology*, 29: 1408-14.
- Northcott, Paul A., Catherine Lee, Thomas Zichner, Adrian M. Stütz, Serap Erkek, Daisuke Kawauchi, David J. H. Shih, Volker Hovestadt, Marc Zapatka, Dominik Sturm, David T. W. Jones, Marcel Kool, Marc Remke, Florence M. G. Cavalli, Scott Zuyderduyn, Gary D. Bader, Scott Vandenberg, Lourdes Adriana Esparza, Marina Ryzhova, Wei Wang, Andrea Wittmann, Sebastian Stark, Laura Sieber, Huriye Seker-Cin, Linda Linke, Fabian Kratochwil, Natalie Jäger, Ivo Buchhalter, Charles D. Imbusch, Gideon Zipprich, Benjamin Raeder, Sabine Schmidt, Nicolle Diessl, Stephan Wolf, Stefan Wiemann, Benedikt Brors, Chris Lawerenz, Jürgen Eils, Hans-Jörg Warnatz, Thomas Risch, Marie-Laure Yaspo, Ursula D. Weber, Cynthia C. Bartholomae, Christof Von Kalle, Eszter Turányi, Peter Hauser, Emma Sanden, Anna Darabi, Peter Siesjö, Jaroslav Sterba, Karel Zitterbart, David Sumerauer, Peter Van Sluis, Rogier Versteeg, Richard Volckmann, Jan Koster, Martin U. Schuhmann, Martin Ebinger, H. Leighton Grimes, Giles W. Robinson, Amar Gajjar, Martin Mynarek, Katja Von Hoff, Stefan Rutkowski, Torsten Pietsch, Wolfram Scheurlen, Jörg Felsberg, Guido Reifenberger, Andreas E. Kulozik, Andreas Von Deimling, Olaf Witt, Roland Eils, Richard J. Gilbertson, Andrey Korshunov, Michael D. Taylor, Peter Lichter, Jan O. Korbel, Robert J. Wechsler-Reya, and Stefan M. Pfister. 2014. 'Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma', *Nature*, 511: 428-34.
- Phoenix, Timothy N., Deanna M. Patmore, Scott Boop, Nidal Boulous, Megan O. Jacus, Yogesh T. Patel, Martine F. Roussel, David Finkelstein, Liliana Goumnerova, Sebastien Perreault, Elizabeth Wadhwa, Yoon-Jae Cho, Clinton F. Stewart, and Richard J. Gilbertson. 2016. 'Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype', *Cancer Cell*, 29: 508-22.
- Pomeroy, Scott L., Pablo Tamayo, Michelle Gaasenbeek, Lisa M. Sturla, Michael Angelo, Margaret E. McLaughlin, John Y. H. Kim, Liliana C. Goumnerova, Peter M. Black, Ching Lau, Jeffrey C. Allen, David Zagzag, James M. Olson, Tom Curran, Cynthia Wetmore, Jaclyn A. Biegel, Tomaso Poggio, Shayan Mukherjee, Ryan Rifkin, Andrea Califano, Gustavo Stolovitzky, David N. Louis, Jill P. Mesirov, Eric S. Lander, and Todd R. Golub. 2002. 'Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression', 415: 436-42.
- Raffel, Corey. 2004. 'Medulloblastoma: Molecular Genetics and Animal Models', *Neoplasia*, 6: 310-22.
- Ramaswamy, Vijay, Marc Remke, Eric Bouffet, Simon Bailey, Steven C. Clifford, Francois Doz, Marcel Kool, Christelle Dufour, Gilles Vassal, Till Milde, Olaf Witt, Katja Von Hoff, Torsten Pietsch, Paul A. Northcott, Amar Gajjar, Giles W. Robinson, Laetitia Padovani, Nicolas André, Maura Massimino, Barry Pizer, Roger Packer, Stefan Rutkowski, Stefan M. Pfister, Michael D. Taylor, and Scott L. Pomeroy. 2016. 'Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus', *Acta Neuropathologica*, 131: 821-31.
- Robertson, P. L., K. M. Muraszko, E. J. Holmes, R. Spoto, R. J. Packer, A. Gajjar, M. S. Dias, and J. C. Allen. 2006. 'Incidence and severity of postoperative cerebellar mutism syndrome in children with medulloblastoma: a prospective study by the Children's Oncology Group', *J Neurosurg*, 105: 444-51.
- Rodríguez-Asiain, Arantza, Gerard Ruiz-Babot, Walter Romero, Roger Cubí, Tatiana Erazo, Ricardo M. Biondi, Jose R. Bayascas, Jose Aguilera, Nestor Gómez, Carles Gil, Enrique Claro, and Jose M. Lizcano. 2011. 'Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811: 1124-35.
- Roussel, M. F., and M. E. Hatten. 2011. 'Cerebellum development and medulloblastoma', *Curr Top Dev Biol*, 94: 235-82.

- Sharda, Navneet, Chin-Rang Yang, Timothy Kinsella, and David Boothman. 2002. 'Radiation Resistance.' in Joseph R. Bertino (ed.), *Encyclopedia of Cancer (Second Edition)* (Academic Press: New York).
- Schwalbe, Edward C., Janet C. Lindsey, Sirintra Nakjang, Stephen Crosier, Amanda J. Smith, Debbie Hicks, Gholamreza Rafiee, Rebecca M. Hill, Alice Iliasova, Thomas Stone, Barry Pizer, Antony Michalski, Abhijit Joshi, Stephen B. Wharton, Thomas S. Jacques, Simon Bailey, Daniel Williamson, and Steven C. Clifford. 2017. 'Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study', *The Lancet Oncology*, 18: 958-71.
- Smith, Christopher G., Marc Naven, Rebecca Harris, James Colley, Hannah West, Ning Li, Yuan Liu, Richard Adams, Timothy S. Maughan, Laura Nichols, Richard Kaplan, Michael J. Wagner, Howard L. McLeod, and Jeremy P. Cheadle. 2013. 'Exome Resequencing Identifies Potential Tumor-Suppressor Genes that Predispose to Colorectal Cancer', *Human Mutation*, 34: 1026-34.
- Soreze, Yohan, Audrey Boutron, Florence Habarou, Christine Barnerias, Luc Nonnenmacher, Hélène Delpech, Asmaa Mamoune, Dominique Chrétien, Laurence Hubert, Christine Bole-Feysot, Patrick Nitschke, Isabelle Correia, Claude Sardet, Nathalie Boddaert, Yamina Hamel, Agnès Delahodde, Chris Ottolenghi, and Pascale De Lonlay. 2013. 'Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase', 8: 192.
- Staal, Jerome A., Ling San Lau, Huizhen Zhang, Wendy J. Ingram, Andrew R. Hallahan, Paul A. Northcott, Stefan M. Pfister, Robert J. Wechsler-Reya, Jessica M. Ruser, Michael D. Taylor, Yoon-Jae Cho, Roger J. Packer, Kristy J. Brown, and Brian R. Rood. 2015. 'Proteomic profiling of high risk medulloblastoma reveals functional biology', *Oncotarget*, 6: 14584-95.
- Tang, Le, Fang Wei, Yingfen Wu, Yi He, Lei Shi, Fang Xiong, Zhaojian Gong, Can Guo, Xiayu Li, Hao Deng, Ke Cao, Ming Zhou, Bo Xiang, Xiaoling Li, Yong Li, Guiyuan Li, Wei Xiong, and Zhaoyang Zeng. 2018. 'Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37.
- Taylor, M. D., P. A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y. J. Cho, S. C. Clifford, C. G. Eberhart, D. W. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D. W. Ellison, P. Lichter, R. J. Gilbertson, S. L. Pomeroy, M. Kool, and S. M. Pfister. 2012. 'Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus', *Acta Neuropathologica*, 123: 465-72.
- Theesfeld, C. L., D. Pourmand, T. Davis, R. M. Garza, and R. Y. Hampton. 2011. 'The Sterol-sensing Domain (SSD) Directly Mediates Signal-regulated Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA Reductase Isozyme Hmg2', *Journal of Biological Chemistry*, 286: 26298-307.
- Thomas, Alice, and Georges Noël. 2019. '<p>Medulloblastoma: optimizing care with a multidisciplinary approach</p>', *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, Volume 12: 335-47.
- Thompson, Margaret C., Christine Fuller, Twala L. Hogg, James Dalton, David Finkelstein, Ching C. Lau, Murali Chintagumpala, Adekunle Adesina, David M. Ashley, Stewart J. Kellie, Michael D. Taylor, Tom Curran, Amar Gajjar, and Richard J. Gilbertson. 2006. 'Genomics Identifies Medulloblastoma Subgroups That Are Enriched for Specific Genetic Alterations', *Journal of Clinical Oncology*, 24: 1924-31.
- Ung, D. C., G. Iacono, H. Meziane, E. Blanchard, M. A. Papon, M. Selten, J. R. van Rhijn, R. Montjean, J. Rucci, S. Martin, A. Fleet, M. C. Birling, S. Marouillat, R. Roepman, M. Selloum, A. Lux, R. A. Thepault, P. Hamel, K. Mittal, J. B. Vincent, O. Dorseuil, H. G. Stunnenberg, P. Billuart, N. N. Kasri, Y. Herault, and F.

- Laumonnier. 2018. 'Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse', *Molecular Psychiatry*, 23: 1356-67.
- Van Ommeren, Randy, Livia Garzia, Borja L. Holgado, Vijay Ramaswamy, and Michael D. Taylor. 2020. 'The molecular biology of medulloblastoma metastasis', *Brain Pathology*, 30: 691-702.
- Vanier, Marie T. 2010. 'Niemann-Pick disease type C', *Orphanet journal of rare diseases*, 5: 16-16.
- Ward, J. F. 1988. 'DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 35: 95-125.
- Waszak, Sebastian M., Paul A. Northcott, Ivo Buchhalter, Giles W. Robinson, Christian Sutter, Susanne Groebner, Kerstin B. Grund, Laurence Brugières, David T. W. Jones, Kristian W. Pajtler, A. Sorana Morrissy, Marcel Kool, Dominik Sturm, Lukas Chavez, Aurelie Ernst, Sebastian Brabetz, Michael Hain, Thomas Zichner, Maia Segura-Wang, Joachim Weischenfeldt, Tobias Rausch, Balca R. Mardin, Xin Zhou, Cristina Baciú, Christian Lawerenz, Jennifer A. Chan, Pascale Varlet, Lea Guerrini-Rousseau, Daniel W. Fults, Wiesława Grajkowska, Peter Hauser, Nada Jabado, Young-Shin Ra, Karel Zitterbart, Suyash S. Shringarpure, Francisco M. De La Vega, Carlos D. Bustamante, Ho-Keung Ng, Arie Perry, Tobey J. Macdonald, Pablo Hernáiz Driever, Anne E. Bendel, Daniel C. Bowers, Geoffrey McCowage, Murali M. Chintagumpala, Richard Cohn, Timothy Hassall, Gudrun Fleischhack, Tone Eggen, Finn Wesenberg, Maria Feychting, Birgitta Lannering, Joachim Schüz, Christoffer Johansen, Tina V. Andersen, Martin Rösli, Claudia E. Kuehni, Michael Grotzer, Kristina Kjaerheim, Camelia M. Monoranu, Tenley C. Archer, Elizabeth Duke, Scott L. Pomeroy, Redmond Shelagh, Stephan Frank, David Sumerauer, Wolfram Scheurlen, Marina V. Ryzhova, Till Milde, Christian P. Kratz, David Samuel, Jinghui Zhang, David A. Solomon, Marco Marra, Roland Eils, Claus R. Bartram, Katja Von Hoff, Stefan Rutkowski, Vijay Ramaswamy, Richard J. Gilbertson, Andrey Korshunov, Michael D. Taylor, Peter Lichter, David Malkin, Amar Gajjar, Jan O. Korbel, and Stefan M. Pfister. 2018. 'Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort', *The Lancet Oncology*, 19: 785-98.
- Wong, S. Y., H. Haack, J. L. Kissil, M. Barry, R. T. Bronson, S. S. Shent, C. A. Whittaker, D. Crowley, and R. O. Hynes. 2007. 'Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 12784-89.
- Wu, Xiaochong, Paul A. Northcott, Adrian Dubuc, Adam J. Dupuy, David J. H. Shih, Hendrik Witt, Sidney Croul, Eric Bouffet, Daniel W. Fults, Charles G. Eberhart, Livia Garzia, Timothy Van Meter, David Zagzag, Nada Jabado, Jeremy Schwartzentruber, Jacek Majewski, Todd E. Scheetz, Stefan M. Pfister, Andrey Korshunov, Xiao-Nan Li, Stephen W. Scherer, Yoon-Jae Cho, Keiko Akagi, Tobey J. Macdonald, Jan Koster, Martin G. McCabe, Aaron L. Sarver, V. Peter Collins, William A. Weiss, David A. Largaespada, Lara S. Collier, and Michael D. Taylor. 2012. 'Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma', *Nature*, 482: 529-33.
- Zanini, Cristina, Elisabetta Ercole, Giorgia Mandili, Roberta Salaroli, Alice Poli, Cristiano Renna, Valentina Papa, Giovanna Cenacchi, and Marco Forni. 2013. 'Medullospheres from DAOY, UW228 and ONS-76 Cells: Increased Stem Cell Population and Proteomic Modifications', *Plos One*, 8: e63748.
- Zapotocky, Michal, Daddy Mata-Mbemba, David Sumerauer, Petr Liby, Alvaro Lassaletta, Josef Zamecnik, Lenka Krskova, Martin Kyncl, Jan Stary, Suzanne Laughlin, Anthony Arnoldo, Cynthia Hawkins, Uri Tabori, Michael D. Taylor, Eric Bouffet, Charles Raybaud, and Vijay Ramaswamy. 2018. 'Differential patterns of

- metastatic dissemination across medulloblastoma subgroups', *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 21: 145-52.
- Zhang, L., R. Lian, J. J. Zhao, X. M. Feng, R. Y. Ye, L. X. Pan, J. H. Wu, M. F. Li, Y. B. Huan, and J. C. Cai. 2019. 'IGFBP7 inhibits cell proliferation by suppressing AKT activity and cell cycle progression in thyroid carcinoma', *Cell and Bioscience*, 9.
- Zhukova, Nataliya, Vijay Ramaswamy, Marc Remke, Elke Pfaff, David J. H. Shih, Dianna C. Martin, Pedro Castelo-Branco, Berivan Baskin, Peter N. Ray, Eric Bouffet, André O. Von Bueren, David T. W. Jones, Paul A. Northcott, Marcel Kool, Dominik Sturm, Trevor J. Pugh, Scott L. Pomeroy, Yoon-Jae Cho, Torsten Pietsch, Marco Gessi, Stefan Rutkowski, Laszlo Bognar, Almos Klekner, Byung-Kyu Cho, Seung-Ki Kim, Kyu-Chang Wang, Charles G. Eberhart, Michelle Fevre-Montange, Maryam Fouladi, Pim J. French, Max Kros, Wieslawa A. Grajkowska, Nalin Gupta, William A. Weiss, Peter Hauser, Nada Jabado, Anne Jouvett, Shin Jung, Toshihiro Kumabe, Boleslaw Lach, Jeffrey R. Leonard, Joshua B. Rubin, Linda M. Liau, Luca Massimi, Ian F. Pollack, Young Shin Ra, Erwin G. Van Meir, Karel Zitterbart, Ulrich Schüller, Rebecca M. Hill, Janet C. Lindsey, Ed C. Schwalbe, Simon Bailey, David W. Ellison, Cynthia Hawkins, David Malkin, Steven C. Clifford, Andrey Korshunov, Stefan Pfister, Michael D. Taylor, and Uri Tabori. 2013. 'Subgroup-Specific Prognostic Implications of TP53 Mutation in Medulloblastoma', *Journal of Clinical Oncology*, 31: 2927-35.
- Zikova, M., A. Corlett, Z. Bendova, P. Pajer, and P. Bartunek. 2009. 'DISP3, a sterol-sensing domain-containing protein that links thyroid hormone action and cholesterol metabolism', *Mol Endocrinol*, 23: 520-8.
- Zíková, M., J. Konířová, K. Dítřichová, A. Corlett, M. Kolář, and P. Bartůněk. 2014. 'DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells', *FEBS Lett*, 588: 4071-7.
- Zitterbart, K., Z. Pavelka, and J. Zitterbartová. 2010. 'Medulloblastom:nejčastější zhoubný nádor mozku u dětí', *Onkologie*, 4: 256-59.