

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Vliv kanonické Wnt signální dráhy na diferenciační
potenciál NG2 glií po ischemickém poškození mozku**

Hana Bernhardová

**Kraj Zlínský
Valašské Meziříčí 2019**

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Vliv kanonické Wnt signální dráhy na diferenciační
potenciál NG2 glií po ischemickém poškození mozku**

**The effect of the canonical Wnt signalling pathway
on the differentiation potential of NG2 glia after
ischemic injury**

Autoři: Hana Bernhardová

Škola: Gymnázium Františka Palackého Valašské Meziříčí,
Husova 146, 757 37

Kraj: Zlínský

Konzultant: Mgr. Ján Kriška

Valašské Meziříčí 2019

Výzkum byl proveden na Oddělení buněčné neurofyzologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky, v. v. i. pod záštitou projektu Otevřená věda Akademie věd České republiky – stáž č. 1.078 Diferenciační potenciál NG2 glií po ischemickém poškození mozku. Tato studie byla podpořena grantem Grantové agentury České republiky číslo P303/17-04034S.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Valašském Meziříčí dne 8. 2. 2019

Hana Bernhardová

Poděkování

Za seznámení s problematikou, možnost spolupráce, trávení dní se mnou v laboratoři a neustálou ochotu mi vždy pomoci a poradit velmi děkuji svému konzultantovi Mgr. Jánovi Kriškovi.

Dále taky velmi děkuji Mgr. Tomášovi Knotkovi za pomoc se zpracováním výsledků a statistikou.

Děkuji vedení školy Gymnázia Františka Palackého Valašské Meziříčí a třídnímu učiteli Ing. Pavlu Novosádovi za vstřícnost při omlouvání mé absence.

Děkuji projektu Otevřená věda a Akademii věd ČR za proplácení jízdného při cestování do laboratoře a zpět.

A v neposlední řadě také velmi děkuji své rodině za neustálou pomoc a podporu.

Anotace

NG2 glie představují spolu s astrocyty, oligodendrocyty a mikroglieci jeden z typů gliových buněk centrální nervové soustavy. Tyto buňky jsou známé svou schopností diferencovat a vykazují zvýšenou proliferaci při reakci na akutní ischemické poranění. Cílem této práce bylo analyzovat diferenciační potenciál NG2 glií a funkci kanonické Wnt signální dráhy v gliogenezi a neurogenezi, a to jak za fyziologických podmínek, tak v průběhu ischemického poškození tkáně a její následné regenerace. Experimenty byly prováděny *in vitro* na buňkách izolovaných z transgenních myších kmenů s tamoxifenem indukovanou rekombinací, která způsobila expresi červeného fluorescenčního proteinu specificky v NG2 gliích. Pracovali jsme s kontrolním myším kmenem (Cspg4-CreER^{T2}-Rosa26-tdTomato) a kmenem s inhibovanou Wnt signální dráhou (Cspg4-CreER^{T2}-Rosa26-tdTomato-Tcf712^{-/-}). Jako model lokální mozkové ischemie byla použita okluze střední mozkové tepny (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*). Tři anebo sedm dní po MCAO byla provedena izolace NG2 buněk z mozkové kůry myši. Pro měření elektrofyziologických vlastností buněk a určení jejich typu byla použita metoda terčíkového zámku (patch clamp). Výsledky experimentů naznačují, že NG2 glie se v reakci na mozkovou ischemii po 7 dnech od operace začínou diferencovat v neuronální prekurzory. Inhibice Wnt signální dráhy vede za fyziologických podmínek k diferenciaci v astrocyty a po mozkové ischemii vede k celkovému snížení diferenciace NG2 glií.

Klíčová slova

NG2 glie; diferenciace; CNS; mozková ischemie; Wnt signální dráha

Annotation

NG2 glia together with oligodendrocytes, astrocytes and microglia represent glial cells of the central nervous system. These cells are known for their differentiation potential and increased proliferation rate in response to acute ischemic injury. The aim of this thesis was to analyse the differentiation potential of NG2 glia and the role of the canonical Wnt signalling pathway in physiological conditions and in regeneration after ischemic injury. Experiments were performed *in vitro* on cortical cells isolated from transgenic mouse strains with tamoxifen-induced recombination that triggered the expression of red fluorescent protein specifically in NG2 glia. Two different mouse strains were used – the control mouse strain (Cspg4-CreER^{T2}-Rosa26-tdTomato) and the mouse strain with inhibited Wnt signalling pathway (Cspg4-CreER^{T2}-Rosa26-tdTomato-Tcf7l2^{-/-}). To induce ischemia, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was used. Cells were isolated from the cortex three or seven days after MCAO. Changes in the differentiation potential and electrophysiological properties of NG2 glia were measured using the patch clamp technique. The results indicate that NG2 glia differentiate to neuron-like cells after ischemia. The inhibition of the Wnt signalling pathway under physiological conditions leads to differentiation to astrocytes, and after ischemic injury it lowers the overall differentiation of NG2 glia.

Keywords

NG2 glia; differentiation; CNS; brain ischemia; Wnt signalling pathway

Obsah

1	Seznam zkratek.....	8
2	Úvod	12
2.1	Gliové buňky.....	12
2.1.1	Astrocyty	13
2.1.2	Oligodendrocyty	14
2.1.3	Mikroglie	15
2.1.4	NG2 glie	15
2.2	Diferenciační potenciál NG2 glií	17
2.2.1	Diferenciace v oligodendrocyty	18
2.2.2	Diferenciace v astrocyty	18
2.2.3	Diferenciace v neurony	19
2.3	Mozková ischemie	20
2.4	Role NG2 glií v regeneraci tkáně po mozkové ischemii.....	22
2.4.1	Diferenciační potenciál NG2 glií po poškození mozkové tkáně	23
2.5	Wnt signální dráha	23
2.5.1	Kanonická Wnt signální dráha.....	24
2.5.2	Wnt/PCP (<i>planar cell polarity</i>) dráha	25
2.5.3	Wnt/Ca ²⁺ dráha	26
2.5.4	Význam Wnt signální dráhy v CNS.....	27
3	Cíle práce	28
4	Metodika	29
4.1	Transgenní organismy	29
4.2	Okluze střední mozkové artérie	30
4.3	Izolace buněk a uchovávání buněčných kultur	31
4.4	Imunocytochemické barvení.....	32
4.5	Metoda terčíkového zámku – patch clamp	32
4.6	Analýza dat	34
5	Výsledky	35
5.1	Vliv mozkové ischemie na diferenciační potenciál NG2 glií	41
5.1.1	Incidence jednotlivých buněčných typů po MCAO	41
5.1.2	Změny v pasivních membránových vlastnostech po MCAO	42
5.1.3	Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů po MCAO	43

5.2	Vliv manipulace Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií za fyziologických podmínek	45
5.2.1	Incidence jednotlivých buněčných typů po manipulaci Wnt signální dráhy za fyziologických podmínek.....	45
5.2.2	Vliv inhibice Wnt signální dráhy na pasivní membránové vlastnosti.....	46
5.2.3	Vliv inhibice Wnt signální dráhy na amplitudy a hustoty draselných a sodných proudů	47
5.3	Vliv manipulace Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií po mozkové ischemii.....	49
5.3.1	Incidence jednotlivých buněčných typů po manipulaci Wnt signální dráhy a po mozkové ischemii.....	49
5.3.2	Vliv manipulace Wnt signální dráhy a mozkové ischemie na pasivní membránové vlastnosti	50
5.3.3	Vliv manipulace Wnt signální dráhy a mozkové ischemie na amplitudy a hustoty draselných a sodných proudů	51
6	Diskuze	54
6.1	NG2 glie po mozkové ischemii diferencují v neuronální prekurzory.....	54
6.2	Inhibice Wnt signální dráhy způsobila diferenciaci NG2 glií v astrocyty	55
6.3	Inhibice Wnt signální dráhy po MCAO vede ke snížení diferenciace NG2 glií	56
7	Závěr	57
8	Použitá literatura a zdroje	58
8.1	Literatura	58
8.2	Internetové zdroje.....	68
8.3	Zdroje převzatých obrázků	69

1 SEZNAM ZKRATEK

Aldh1L1 - *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1*

AMPA – *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina*

APC – *adenomatous polyposis coli*

ATP – adenosintrifosfát

Axin – *axis inhibition protein 1*

BBB – *blood-brain barrier*, hematoencefalická bariéra

β-cat – betakatenin

β-Trcp – *Beta-transducin repeats-containing proteins*

CaMKII – *calmodulin-dependent protein kinase II*, kalmodulin dependentní kináza II

CDC42 – *cell division control protein 42*

CK1 – *casein kinase 1*, kasein kináza 1

C_M – membránová kapacitance

CNS – centrální nervový systém

CO₂ – oxid uhličitý

Com – buňka s komplexním proudovým charakterem

CSPG4 – *chondroitin sulfate proteoglycan 4*, chondroitin sulfát proteoglykan 4

CT – buňky izolované z myši s nemanipulovanou Wnt signální dráhou

CTRL – buňky izolované z neoperovaných myší

D3 – buňky izolované z myši 3 dny po MCAO

D7 – buňky izolované z myši 7 dní po MCAO

DAAM1 – *dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*

DAG – diacylglycerol

DAPI - 4,6-diamidin-2-fenylindol

DCX – *doublecortin*

DISC1 – *disrupted in schizophrenia*

Dkk1 – *Dickkopf-related protein 1*

DMEM/F-12 - *Dulbecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F-12*,

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Dsh – *dishevelled*

EGFP – *enhanced green fluorescent protein*, vylepšená forma zeleného fluorescenčního proteinu

EGTA - *ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid*

EMX1 – *empty spiracles homeobox 1*

FBS – *fetal bovine serum*, fetální bovinní sérum

FCS – *fetal calf serum*, fetální telecí sérum

Fz – *Frizzled*

GABA – *Gamma-aminobutyric acid*, kyselina γ -aminomáselná

GFAP – *glial fibrillary acidic protein*, gliální fibrilární acidický protein

GSK-3 β – *glycogen synthase kinase 3 β*

GTP – guanosintrifosfát

HEPES – *2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*

IgG – imunoglobulin G

IP₃ – inositoltrifosfát

IR – *input resistance*, vstupní odpor

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

K_A – draselné kanály A typu

K_{Ca} – vápníkem aktivované draselné kanály/proudy

K_{DR} – ven usměrněné draselné kanály/proudy

K_{IR} – dovnitř usměrněné draselné kanály/proudy

LEF1 – *lymphoid enhancer-binding factor 1*

LRP – *low-density lipoprotein receptor-related protein*

LTP – *long term potentiation*, dlouhodobá potenciace

MAP2 – *microtubule-associated protein 2*, protein asociovaný s mikrotubuly

MCAO – *middle cerebral artery occlusion*, okluze střední mozkové artérie

MCT1 – *monocarboxylate transporter 1*, monokarboxylátový transportér 1

MMP – *matrix metalloproteinase*, matrix metaloproteináza

N – počet měřených subjektů

NeuN – *neuronal specific nuclear protein*

NFAT – *nuclear factor of activated T-cells*

NG2 – *nerve/glial antigen 2*

NLK – *nemo-like kinase*

NMDA – *N-methyl-D-aspartate*

NMDG-CL – *N-methyl-D-glucamine chloride*

NPB – neurální progenitorové buňky

Olig2 – *oligodendrocyte transcription factor 2*

OPC – *oligodendrocyte precursor cell*, prekursorová buňka pro oligodendrocyty

Out – buňka s ven usměrněným proudovým charakterem

Pas – buňka s pasivním proudovým charakterem

Pax6 – *paired box protein 6*

PB – *phosphate buffer*, fosfátový pufr

PBS – *phosphate buffered saline*

PCP – *planar cell polarity pathway*

PDGF α R – *α receptor of platelet-derived growth factor*, α receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček

PDGF β R – *β receptor of platelet-derived growth factor*, β receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček

PKC – proteinkináza C

PNS – periferní nervový systém

PPL – poly-L-lysin

PSA – penicilin-streptomycin-amphotericin B roztok

ROCK – *rho-associated protein kinase*

ROR2 – *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2*

ROS – *reactive oxygen species*, reaktivní kyslíkové radikály

Ryk – *receptor-like tyrosine kinase*

S.E.M. – *standard error of the mean*, standardní chyba průměru

sFRP3 – *secreted frizzled-related protein 3*

Tam – tamoxifen

TAK1 – *Transforming growth factor β activated kinase*

TCF – *T cell-specific transcription factor*

tdTOMATO – červený fluorescenční protein

TNF α – *tumour necrosis factor α*

V_M – klidový membránový potenciál

WHO – *World Health Organization*, Světová zdravotnická organizace

Wnt – *Wingless/Int*

2 Úvod

Cévní mozková příhoda patří mezi nejvýznamnější onemocnění v rozvinutých zemích. Každoročně postihne v České republice něco málo přes čtyřicet tisíc lidí, z toho přibližně dvanáct tisíc lidí této nemoci podlehnou a dalších dvanáct tisíc lidí si nese doživotní následky (CMP, 2015).

Mnoho vědeckých studií se dnes soustředí na mechanismy průběhu a léčby mozkové ischemie na molekulární a buněčné úrovni. Převážná většina těchto prací se ale zabývá buňkami neuronálního typu. V poslední době se začala intenzivněji zkoumat i role gliových buněk při mozkové ischemii, jelikož tyto buňky mají v centrální nervové soustavě (CNS) velmi důležitou úlohu, ať už za fyziologických či patofyziologických podmínek.

Cílem této práce bylo analyzovat diferenciační potenciál *Nerve/glial antigen 2* (NG2) glií a funkci kanonické *Wingless/Int* (Wnt) signální dráhy v gliogenezi a neurogenezi, a to jak za fyziologických podmínek, tak v průběhu ischemického poškození tkáně a její následné regenerace.

NG2 glie představují jeden ze čtyř základních typů gliových buněk CNS. Nacházejí se v šedé i bílé mozkové hmotě a mají charakteristickou rozvětvenou morfolonii. Tyto buňky jsou známé svou diferenciační aktivitou, kdy slouží jako prekursor pro oligodendrocyty, astrocyty nebo neurony. Také vykazují zvýšenou proliferaci při reakci na akutní ischemické poranění CNS nebo při demyelinizaci.

Wnt signální dráha je významnou dráhou v mezibuněčné komunikaci, která ovlivňuje mnoho procesů zejména během embryonálního vývoje. Svou úlohu má ale také i v dospělém mozku, a to zejména v proliferaci neuronálních prekursorů, tvorbě neurogenních oblastí a programované buněčné smrti (apoptóze). Bylo prokázáno, že NG2 glie jsou touto dráhou ovlivněny také, ale vliv této signální dráhy na jejich diferenciaci, ať už za fyziologických podmínek nebo po ischemickém poškození mozkové tkáně, není přesně znám.

2.1 Gliové buňky

Gliové buňky jsou neexcitovatelné buňky nervové soustavy. Poprvé byly objeveny v devatenáctém století skupinou neurobiologů zahrnující Rudolfa Virchowa, Santiaga Ramóna y Cajala a Pía del Río-Hortegu. V té době byly gliové buňky považovány za jakési „lepidlo“ mezi nervy. Podle tohoto označení dostaly také svůj název (z anglického výrazu *glue* pro lepidlo – *glial cells*) (Jäkel et Dimou, 2017).

Dnes už je známo, že gliové buňky hrají mnoho důležitých rolí. Například podporují a vyživují neurony, pomáhají udržet stabilní prostředí a zajišťují imunitní ochranu. Gliové buňky můžeme rozdělit na gliové buňky CNS a periferní nervové soustavy (PNS). V PNS jsou hlavním buněčným typem Schwannovy buňky. Gliové buňky CNS poté můžeme rozdělit podle původu na mikroglie, které jsou mezodermálního původu a mají funkci v imunitní obraně, a dále na makroglie, které jsou ektodermálního původu a mezi něž patří astrocyty, oligodendrocyty a NG2 glie (Nichols, 2013).

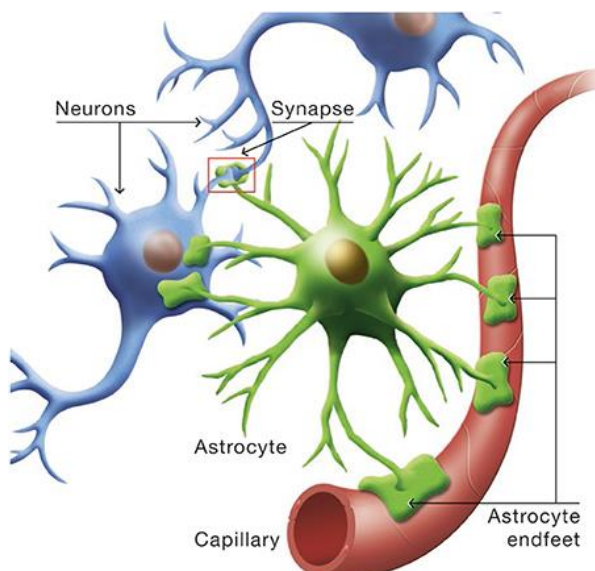
2.1.1 Astrocyty

Astrocyty jsou nejpočetnějším typem gliových buněk v CNS a svým počtem výrazně převyšují i počet neuronů. Na rozdíl od neuronů jsou astrocyty elektricky nevzrušivé.

Označení pro astrocyty pochází z latinských slov *astra* – hvězda a *cyte* – buňka. Astrocyty jsou ale morfologicky a funkčně velmi různorodou skupinou a jen některé z nich mají onen typický hvězdicovitý tvar (Şovrea *et* Boşca, 2013).

Historicky se astrocyty rozdělují do dvou hlavních skupin. Protoplazmatické astrocyty můžeme najít v šedé hmotě mozku. Tyto buňky mají mnoho krátkých (okolo 50 µm), hustě větvených výběžků orientovaných do všech směrů. Pomocí těchto výběžků je zprostředkován kontakt s neurony a synapsí. Výběžky protoplazmatických astrocytů také pronikají k mozkovým cévám a pokrývají téměř celou vaskulární soustavu CNS (obrázek 1) (Vasile *et al.*, 2017).

Druhým typem astrocytů jsou vláknité astrocyty, které mají výběžky delší (okolo 300 µm) a méně rozvětvené než protoplazmatické astrocyty. Vyskytují se převážně v bílé hmotě (Tabata, 2015).



Obrázek 1 – Interakce astrocytu s neurony, synapsí a krevní cévou (převzato z Demetrius *et al.*, 2014).

Astrocyty jsou typické expresí intermediálních filament v cytoplazmě, které tvoří gliální fibrilární acidický protein (GFAP – *glial fibrillary acidic protein*) a vimentin (Panickar *et* Norenberg, 2005). Gliální fibrilární acidický protein se používá jako specifický marker pro identifikaci astrocytů. Zároveň je to také jeden z nejvíce syntetizovaných proteinů v mozku. Tento protein je ale typický převážně pro vláknité astrocyty. Proto se pro identifikaci veškerých astrocytů v CNS používá protein kódovaný *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1* (*Aldh1L1*) genem, který exprimují všechny astrocyty a zároveň je pro ně specifický (Cahoy *et al.*, 2008).

Astrocyty zaujímají v mozku mnoho různorodých funkcí. Tou nejznámější je jejich funkce ve vyživování a ochraně neuronů. Výběžky astrocytů souvisle obalují cévy v CNS, z kterých čerpají živiny, odvádí pryč metabolity, řídí lokální průtok krve a zajišťují ochrannou bariéru mezi krevním řečištěm a prostředím mozku (hematoencefalická bariéra, BBB – *blood-brain-*

barrier). Astrocyty z krve přijímají glukózu, kterou následně ukládají ve formě glykogenu. Při zvýšené synaptické aktivitě neuronů pak astrocyty syntetizují laktát, který transportují do neuronů (Magistretti, 2009).

Astrocyty se dále významně podílejí na udržování stálého vnitřního prostředí (homeostázy) v CNS. Mezi jejich nejdůležitější úlohu patří vychytávání excitační aminokyseliny glutamátu ze synaptické štěrby, čímž brání excitotoxicitě. Glutamát je poté v astrocytech přeměněn na glutamin a transportován zpět do neuronů, kde se glutamin může přeměnit zpátky na glutamát nebo na γ -aminomáselnou kyselinu (γ -aminobutyric acid, GABA) (Shousboe *et al.*, 2014).

Astrocyty také kontrolují a ovlivňují pH extracelulární tekutiny CNS. Tyto buňky mají aktivní karbonickou anhydrázu (*carbonic anhydrase*), která katalyzuje přeměnu hydrogenuhličitanového aniontu na oxid uhličitý a vodu a její zpětnou reakci (Kimelberg *et al.*, 1982). Na udržování stálého pH se také dále podílejí i pro astrocyty specifické Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transportéry (Kaila *et al.*, 1998; Kimelberg *et al.*, 2010).

Další funkcí astrocytů je pufrování K^+ iontů z extracelulárního prostoru při depolarizaci neuronů. Astrocyty vychytávají pomocí dovnitř usměrněných draslíkových kanálů (K^+ inwardly rectifying, K_{IR}) nadbytečný draslík z extracelulárního prostoru, a poté ho pomocí vodivých spojů (*gap junctions*) transportují do okolních astrocytů, u kterých je v extracelulárním prostoru nižší koncentrace K^+ iontů (Bellot-Saez *et al.*, 2017).

Astrocyty také pomáhají odstraňovat kyslíkové radikály, které v CNS vznikají díky vysoké metabolické aktivitě. Tyto buňky obsahují velké množství glutathion peroxidázy a jiných antioxidačních enzymů, které se mimo jiné podílejí také na regeneraci mozkové tkáně po jejím poškození (Aschner, 2000).

2.1.2 Oligodendrocyty

Oligodendrocyty jsou dalším typem makroglíí v CNS. Tyto buňky mají drobné tělo a poměrně malý počet výběžků (proto oligodendrocyty). Jejich hlavní funkcí je tvorba myelinu kolem axonů v CNS – oligodendrocyty vysílají výběžky, které obalí axony v několika vrstvách. Jeden oligodendrocyt může svými výběžky myelinizovat velké množství axonů (Bradl *et al.*, 2010).

Myelinizace je klíčový proces pro rychlé vedení nervového vzruchu. Myelin vytváří na axonech tzv. myelinové pochvy, které jsou oddělené nemyelinizovanými segmenty nazývanými Ranvierovy zářezy. Akční potenciál je veden tzv. skokem mezi jednotlivými Ranvierovými zářezy a rychlost vedení vzruchu je tak až stonásobně zvýšena (Snaidero *et al.*, 2014).

Axony jsou v kontaktu s extracelulárními zdroji energie pouze v Ranvierových zářezech. Oligodendrocyty je proto metabolicky podporují a skrze monokarboxylátové transportéry 1 (*monocarboxylate transporter 1*, MCT1) do axonů transportují laktát, aby byly pokryté jejich vysoké energetické nároky. Bylo zjištěno, že dysfunkce těchto transportérů může vést k neurodegeneraci (Lee *et al.*, 2012).

2.1.3 Mikroglie

Mikroglie jsou známé především svou funkcí v imunitní obraně CNS. Tyto buňky mají mezodermální původ a vyvinuly se z améboidních mezenchymálních buněk, které osídlily mozek během embryonálního vývoje (Cuadros *et Navascués*, 1998).

V závislosti na morfologických vlastnostech a aktivitě rozlišujeme několik typů mikroglíí – mladé améboidní mikroglie se širokými pseudopodiemi, klidové mikroglie s dlouhými bohatě větvenými výběžky, aktivované mikroglie s krátkými výběžky a pleomorfní reaktivní mikroglie funkčně shodné s makrofágy (Davis *et al.*, 1994).

Po aktivaci mikroglíí infekcí nebo poraněním tyto buňky proliferují, migrují mozkovým parenchymem a fagocytují poškozenou tkáň. Mikroglie také produkují mnoho různých cytokinů a chemokinů a mají tak regulační funkci (Wake *et Fields*, 2011).

Tyto buňky hrají důležitou roli během vývoje, kdy jsou zodpovědné za programovanou buněčnou smrt neuronů. Je totiž důležité odstranit některé buňky, aby mohlo dojít k vytvoření těch správných neuronálních spojení (Marín-Teva *et al.*, 2011). Navíc také vytvářejí různé neurotrofické faktory, které mohou podporovat růst nebo diferenciaci neuronů (Ferrini *et De Koninck*, 2013).

Mikroglie mohou být také v kontaktu se synapsemi a hrají důležitou roli v procesu eliminace některých nepotřebných synapsí u mladého organismu – tzv. synaptickém prořezávání, které umožňuje v mladém věku velkou mozkovou plasticitu (Paolliceli *et al.*, 2011).

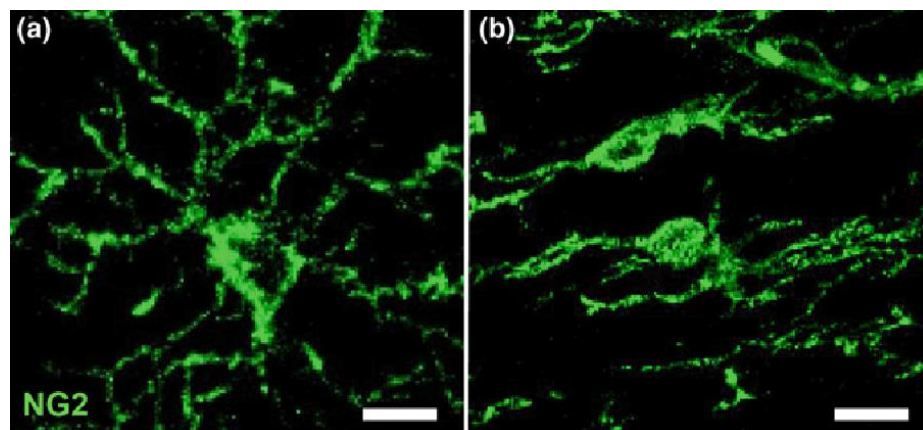
2.1.4 NG2 glie

NG2 glie jsou nově objeveným typem gliových buněk CNS, které se nacházejí v šedé i bílé mozkové hmotě a tvoří dohromady 5-10 % buněk mozku. Jsou typické expresí specifického NG2 antigenu – chondroitin sulfát proteoglykanu 4 (CSPG4) a slouží jako prekursor pro jiné buněčné typy CNS (Nishiyama *et al.*, 2009).

První zmínka o NG2 gliích pochází z roku 1981 (Stallcup), kdy byly na myším modelu identifikovány buňky, které postrádaly specifický marker jak pro astrocyty, tak pro oligodendrocyty. Na základě jejich různorodé morfologie jsou NG2 glie někdy nazývány polydendrocyty a na základě jejich schopnosti diferencovat se v oligodendrocyty pak OPC (*oligodendrocyte precursor cells*).

NG2 glie mají odlišnou morfologii v bílé a šedé hmotě mozkové. V bílé hmotě mají podlouhlá těla a dendrity souběžné s axony a v šedé hmotě mají mnoho dlouhých dendritů rozpínajících se do všech stran (obrázek 2) (Dimou *et Gallo*, 2015).

Tyto buňky také mění svou morfologii při poškození mozkové tkáně. Nejprve se jejich tělo zvětší a výběžky zbytní, a poté, po přibližně sedmi dnech, jsou jejich výběžky velmi krátké a buňky vytvoří tzv. gliovou jizvu. Původní morfologie se jim obnovuje až necelé dva měsíce po poškození (Levine, 1994).



Obrázek 2 – Odlišná morfologie NG2 glií v šedé hmotě (a) a v bílé hmotě (b). Délka měřítka je 10 μm (převzato z Eugenín-von Bernardi et Dimou, 2016).

Během embryonálního vývoje mozku se NG2 glie objevují v několika vlnách. První NG2 glie sloužící jako prekurzory pro oligodendrocyty se objevují v mozkové kůře myši šestnáctý embryonální den. Tyto buňky pochází z mediální gangliové eminence ventrální oblasti mozku. První populační vlna během embryogeneze poté vymizí. Druhá vlna NG2 glií vzniká v laterální a kaudální gangliové eminenci. Poté, po osmnáctém embryonálním dni přichází třetí vlna NG2 buněk vznikající v samotném kortexu z EMX1 (*empty spiracles homeobox 1*, protein, který slouží jako důležitý transkripční faktor při vývoji mozku, řídí pozici, diferenciaci a proliferaci buněk) pozitivních buněk (Kessaris et al., 2006).

V postnatálním stavu NG2 glie vznikají převážně v subventrikulární zóně (Menn et al., 2006).

Pro identifikaci NG2 glií můžeme použít NG2 proteoglykan, který má mnoho různých funkcí. Hraje roli v buněčné proliferaci, migraci, reorganizaci cytoskeletu a komunikaci s neurony (Yadavilli et al., 2016). Tento protein se ale vyskytuje i v kardiomyocytech, hladké svalovině cév a v pericytech (Ozerdem et al., 2001).

Další možností identifikace NG2 glií je použití α receptoru růstového faktoru odvozeného od krevních destiček (α receptor of platelet-derived growth factor, PDGF α R). Tímto způsobem identifikace můžeme NG2 glie odlišit od pericytů, které exprimují pouze β receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček (β receptor of platelet-derived growth factor, PDGF β R) (Hart et al., 1989).

NG2 glie mají na svém povrchu mnoho různých iontových kanálů a receptorů pro neurotransmitery, jejichž aktivace ovlivňuje aktivitu buňky.

Klidový membránový potenciál (V_M) NG2 glií se liší v bílé a šedé hmotě mozkové. V bílé hmotě se pohybuje kolem -70 mV (Chittajallu et al., 2004), zatímco v šedé hmotě je mezi -70 a -90 mV (Gallo et al., 2008; Clarke et al., 2012). Membránový potenciál je ale ovlivněný sodnými a dovnitř usměrněnými draslíkovými kanály, není tak vždy stejný (Djukic et al., 2007; Xie et al., 2007).

Membránová kapacitance (C_M) se pohybuje v rozmezí přibližně od 20 do 40 pF. Vstupní odpor NG2 glií se pohybuje v rozmezí přibližně od 190 do 870 M Ω (Dimou et Gallo, 2015).

NG2 glie mají tzv. napětově ovládané sodné, draselné a vápanté kanály, které způsobují dynamický charakter jejich elektrických vlastností. Kvůli těmto kanálům jsou schopné vytvářet akční potenciál ve zrakové kůře (Ge et al., 2009). V mozku v oblasti *corpus callosum* v rané

fázi vývoje se u některých NG2 glií také prokázala schopnost vytvářet akční potenciály, ale vysoká prahová hodnota (-22 mV) a nízká amplituda (menší než 0 mV) neodpovídá definici akčního potenciálu (De Biase *et al.*, 2010).

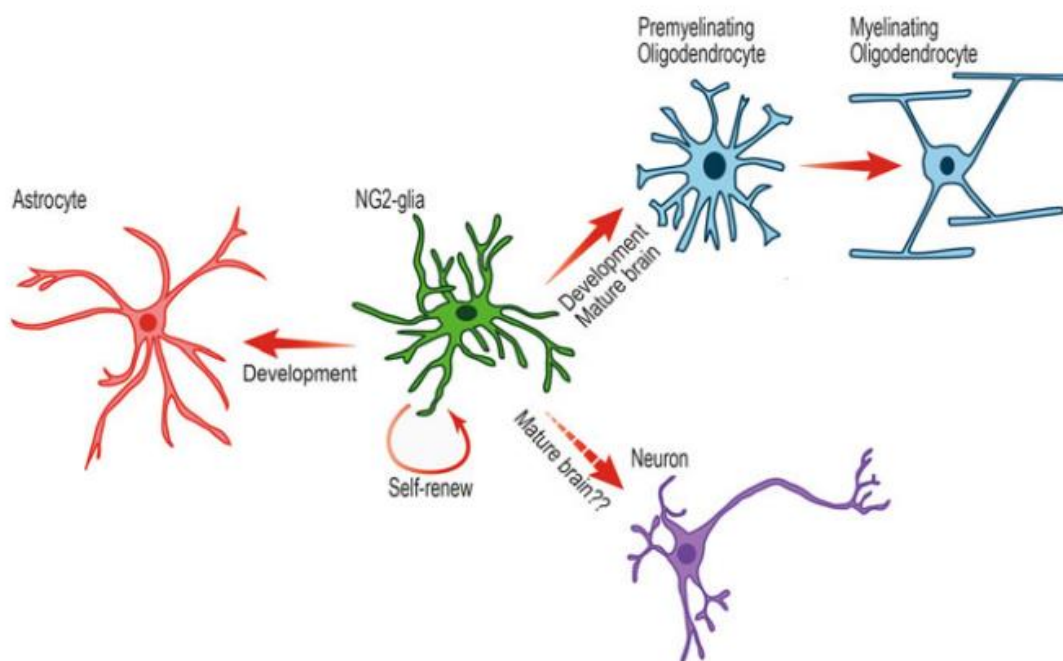
V membráně těchto buněk se také nachází mnoho různých typů K^+ kanálů, jako například ven usměrněné draselné kanály (K_{DR}), K_{IR} , draselné kanály typu A (K_A) a vápníkem aktivované draselné kanály (K_{Ca}). Dále mají NG2 glie různé druhy vápníkových kanálů, jako např. vápníkový kanál L typu, který ovlivňuje migraci a diferenciaci směrem k oligodendrocytům (Zhang *et al.*, 2014).

NG2 glie vytvářejí synapse s neurony, které mohou být jak excitační, tak inhibiční. Jako neurotransmitter nejčastěji slouží buď glutamát nebo GABA. NG2 glie také mají receptory pro jiné neurotransmitery, jako například acetylcholin nebo puriny. Stimulace NG2 glií tímto způsobem má mnoho různých důsledků. Reguluje jejich proliferaci, migraci, diferenciaci a reakce při poranění mozkové tkáně (Dimou *et al.*, 2015).

2.2 Diferenční potenciál NG2 glií

NG2 glie jsou známy především svou diferenciací aktivitou. Představují až 75 % všech proliferujících buněk v mozkové kůře, hipokampu a *corpus callosum* (Dawson *et al.*, 2003).

NG2 glie jsou schopné samy sebe obnovovat a dále je známa jejich diferenciací aktivita směrem k oligodendrocytům, astrocytům a neuronům (obrázek 3).



Obrázek 3 – Diferenční potenciál NG2 glií. NG2 glie jsou buňky centrální nervové soustavy známé svojí diferenciací aktivitou. Jsou schopné samoobnovy a dále slouží jako prekurzory pro oligodendrocyty během vývoje i v dospělém mozku, pro astrocyty pouze během vývoje a některé studie ukazují také jejich možnou diferenciaci v neurony (převzato z Eugenín-von Bernhardt *et al.*, 2016).

2.2.1 Diferenciace v oligodendrocyty

NG2 glie jsou už od svého objevu spojovány s diferenciací v oligodendrocyty. První práce, která toto prokázala, byla práce Raffa, Nobla a Millera (1983). Bylo zjištěno, že pokud jsou NG2 glie kultivovány ve fetálním telecím séru (*fetal calf serum*, FCS), dávají vznik astrocytům druhého typu. V nepřítomnosti séra se ale buňky diferencovaly v oligodendrocyty.

Dalším důkazem pro to, že NG2 glie mohou vytvářet oligodendrocyty, byl objev, že PDGF α R receptory kolokalizují s markery nezralých oligodendrocytů O4 a G_{D3} (Ellison *et al.*, 1994). Také bylo následně prokázáno, že po izolaci PDGF α R pozitivních buněk a jejich *in vitro* kultivaci tyto buňky diferencují právě v oligodendrocyty (Hall *et al.*, 1996).

NG2 glie také exprimují Olig2 transkripční faktor, který je nezbytný pro vývoj oligodendrocytového prekursoru ve zralý oligodendrocyt (Ligon *et al.*, 2006).

Schopnost NG2 glií vytvářet oligodendrocyty byla také prokázána *in vivo* tzv. *fate-mapping* experimenty (sledující osud jednotlivých buněk), kdy byly použity dvojité mutantní myši, které měly vložený gen pro Cre rekombinázu pod kontrolou promotoru pro NG2 proteoglykan, a po působení Cre rekombinázy u těchto myši docházelo k expresi vylepšené formy zeleného fluorescenčního proteinu (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP). Tento fluorescenční protein pak byl přítomný jak v NG2 gliích, tak v buňkách s typickou oligodendrocytovou morfologií, které byly zároveň pozitivní na oligodendrocytový marker APC (*adenomatous polyposis coli*) (Zhu *et al.*, 2008).

Schopnost NG2 glií vytvářet oligodendrocyty se projevuje během embryonálního vývoje i v dospělosti, ale je prokázáno, že s věkem tato schopnost klesá (Lasiene *et al.*, 2009; Psachoulia *et al.*, 2009).

NG2 glie vytvářejí oligodendrocyty také v reakci na demyelinizaci. Je možné pozorovat velký nárůst počtu těchto buněk a zvýšení jejich proliferace v místě poškození. Po dvou týdnech se počet NG2 glií sníží, což značí, že se tyto buňky diferencují v oligodendrocyty a podílejí se tak na obnově myelinizace (Keirstead *et al.*, 1998).

Na vzniku oligodendrocytů se ale nepodílí jen NG2 glie. Oligodendrocyty můžou vznikat také z tzv. neurálních progenitorových buněk (NPB). Myelinové pochvy, které vytvářejí tyto buňky, jsou silnější než pochvy oligodendrocytů odvozených od NG2 glií. Tyto buňky se liší převážně v zastoupení na různých místech CNS. Vznik oligodendrocytů z NPB převažuje v oblasti *corpus callosum*, v ostatních oblastech vznikají oligodendrocyty převážně z NG2 glií (Xing *et al.*, 2014).

2.2.2 Diferenciace v astrocyty

NG2 glie během vývoje nemusí striktně diferencovat v oligodendrocyty. Tyto buňky mohou vytvářet také astrocyty. V experimentech prováděných *in vitro* při kultivaci buněk v FCS dávaly vznik astrocytům druhého typu (Raff *et al.*, 1983).

Během embryonálního vývoje mozku bylo prokázáno, že až 40 % protoplazmatických astrocytů v šedé hmotě ventrální části předního mozku pochází z NG2 glií (Zhu *et al.*, 2008).

Studie, které se ale zaměřily na zjištění zastoupení astrocytů vzniklých z NG2 glií v dospělosti (Olig2-CreER a Pdgfra-CreER *fate mapping*), pozorovaly extrémně malý počet (cca 1-5 %) astrocytů vzniklých z NG2 glií, což značí, že NG2 glie diferencují v astrocyty

převážně během prenatálního vývoje a v prvním týdnu po narození (Dimou *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014).

Důvodem, proč NG2 glie po narození ztrácejí schopnost vytvářet astrocyty, může být kontaktní inhibice – mechanismus způsobující snížení produkce astrocytů při jejich zvýšené hustotě (Nakatsuji *et al.*, 2001).

Během embryonálního vývoje NG2 glie exprimují Olig2 transkripční faktor, který vede k diferenciaci v oligodendrocyty. Inhibice tohoto genu vedla během embryonálního vývoje a během prvních pár dní po narození k diferenciaci NG2 glií v astrocyty v mozkové kůře, ale ne ve ventrální části předního mozku a v prodloužené míše. Dále také způsobila úbytek oligodendrocytů a vážnou hypomyelinizaci (Zhu *et al.*, 2012).

2.2.3 Diferenciace v neurony

V současnosti velmi diskutovaným tématem je, zda jsou NG2 glie schopné diferencovat v neurony. Bylo totiž prokázáno, že tyto buňky vytváří synapse s neurony a dokáží tvořit také slabé akční potenciály (De Biase *et al.*, 2010).

In vitro experimenty většinou diferenciaci NG2 glií v neurony potvrdily. Po izolaci těchto buněk ze subkortikální bílé hmoty lidského mozku byla pozorována jejich diferenciaci v neurony (Nunes *et al.*, 2003). Jiná práce prokázala, že NG2 glie *in vitro* mohou diferencovat v NeuN (*neuronal specific nuclear protein*) pozitivní neurony schopné vytvářet regulérní akční potenciály (Belachew *et al.*, 2003). Na druhou stranu v některých studiích NG2 glie nediferencovaly v neurony ani v médiu podporujícím neurogenezi (Zhu *et al.*, 2008).

In vivo experimenty ukázaly ještě daleko rozporuplnější výsledky. Při výzkumu výskytu NG2 glií v subventrikulární zóně, která je známá neurogenezí, se ukázalo, že NG2 glie jsou v této oblasti zastoupeny jen málo, liší se od tamních neurogenních buněk a skoro vůbec neproliferují (Komitova *et al.*, 2009).

Výsledky *fate-mapping* experimentů s využitím transgenních myší se také velmi liší. V mnoha studiích se žádná spojitost mezi NG2 gliemi a neurony nenašla (Kang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011) a ani studie, kde byl myším podán analog tymidinu bromodeoxyuridin značící proliferující buňky, neukázala výskyt této látky v neuronech, což značí, že se NG2 glie v neurony nediferencovaly (Simon *et al.*, 2011).

Na druhou stranu v jiné studii používající dvojitého myšího mutantu PDGF α R-CreERT2/Rosa26-YFP, kdy po tamoxifenem indukované expresi Cre rekombinázy v buňkách pozitivních na PDGF α R dojde k expresi žlutého fluorescenčního proteinu (*yellow fluorescent protein*, YFP), byla ukázána shoda mezi YFP a NeuN pozitivními buňkami v dospělém předním mozku (Rivers *et al.*, 2008). Další studie využívající Cre rekombinázu pod NG2 promotorem prokázala, že NG2 glie v hypothalamu diferencují v NeuN pozitivní nezralé neurony (Robins *et al.*, 2013).

Dále se také objevily studie, které prokázaly přítomnost buněk pozitivních na DCX (*doublecortin*) a NG2 proteoglykan v mozkové kůře. Tyto buňky také exprimovaly Pax6 transkripční faktor, který je typický pro neuronální progenitorové buňky. Po použití transgenních organismů ke genetickému *fate-mapping* se ukázalo, že NG2 glie dávaly vznik pyramidovým neuronům a jejich počet koreloval v čase s úbytkem NG2 glií v mozkové kůře (Guo *et al.*, 2010).

2.3 Mozková ischemie

Mozková ischemie (též cévní mozková příhoda anebo mozková mrtvice) je definovaná jako náhle vzniklá a rychle se rozvíjející ložisková mozková porucha trvající déle než 24 hodin nebo končící smrtí postiženého, a to vše bez přítomnosti jiné zjevné příčiny než poruchy cirkulace krevního oběhu v mozku (Ambler *et al.*, 2010).

Ischemie je vyvolána přerušением nebo snížením toku krve do postižené oblasti, nejčastěji dochází k ucpání cévy lokální trombózou nebo embolií (Nichols, 2013).

Mozková ischemie je podle WHO (*World Health Organization* – Světová zdravotnická organizace) druhou nejčastější příčinou úmrtí v rozvinutých zemích a každoročně příčinou úmrtí až šesti milionů lidí (WHO, 2016).

Mozek je velmi citlivý na ischemické poškození. Po kompletním přerušení toku krve trvá neuronům pouze 5 minut, než začnou odumírat. Pro srovnání, ledvinové buňky nebo kardiomyocyty začínají odumírat až po 20-40 minutách ischemie. Důvod, proč tomu tak je, je velká rychlost metabolismu mozku. Mozek sice představuje pouze 2,5 % hmotnosti lidského těla, ale spotřebuje až 25 % bazálního metabolismu (Mink *et al.*, 1981).

Také se ukázalo, že jindy tak užitečné a složité mezibuněčné interakce normálně odpovědné za přenos informace mezi jednotlivými buňkami CNS, mohou po mozkové ischemii podporovat mechanismy vedoucí k poškození, jako například produkci volných radikálů, aktivaci katabolických enzymů, apoptózu a vznik zánětu (Lee *et al.*, 2000).

Ischemická mozková příhoda tvoří zhruba 80 % akutních cévních mozkových příhod. Zbýlých 20 % tvoří hemoragické cévní mozkové příhody (Kalita, 2006).

Mozková ischemie může být buď dočasná nebo trvalá. Postižena může být buď jen část mozku (při přerušení toku v některé artérii nebo véně) nebo může dojít k ischemii celého mozku (například během srdeční zástavy). Mozková ischemie taky může vzniknout sekundárně jako reakce na krvácení do mozku nebo jiné trauma (Lee *et al.*, 2000).

Nedostatečný průtok krve vede k snížení množství glukózy a kyslíku, které se dostane k mozkovým buňkám. To vede k zastavení oxidativní fosforylace a tvorby adenosintrifosfátu (ATP), a buňky se tak nacházejí v energetickém deficitu a nemají tak potřebnou energii na udržení iontové rovnováhy (Doyle *et al.*, 2008).

Normálně je Na^+/K^+ ATPázou zajišťována velmi vysoká koncentrace K^+ iontů uvnitř buňky a vysoká koncentrace Na^+ iontů mimo ni. Toto rozvržení je nutné pro vytváření akčních potenciálů. Nedostatek ATP pro udržení iontové rovnováhy proto po mozkové ischemii vede k masivní depolarizaci membrány, vniku sodných iontů do buňky a úniku draselných iontů do mezibuněčného prostoru (Caplan *et al.*, 2009).

Buňka také přestane udržovat nízkou koncentraci Ca^{2+} iontů uvnitř sebe sama a jelikož vápenaté ionty slouží často jako druhý posel v mnoha signálních drahách, jejich přítomnost spouští v buňce mnoho různých dějů, při kterých se aktivují různé proteázy, lipázy a nukleázy, které buňku následně začnou poškozovat (Lee *et al.*, 2000).

Vysoká koncentrace vápenatých iontů také vede k aktivaci fosfolipázy A_2 a cyklooxygenázy, které začnou vytvářet kyslíkové radikály ROS (*reactive oxygen species*). Tyto molekuly se pak váží a reagují s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), proteiny a lipidy, což vede k jejich významnému poškození. Bylo prokázáno, že podání antioxidantů může být účinné při léčbě mozkové ischemie (Folbergrova *et al.*, 1995).

Kyslíkové radikály také významně ovlivňují činnost mitochondrií, které jsou na ně velmi citlivé – poškodí membránu mitochondrie a zastaví činnost elektron transportního řetězce a tím i produkci ATP. Mitochondrie na toto poškození reagují vypuštěním cytochromu c, který následně vede k apoptóze buňky (Lee *et al.*, 2000).

Vápenaté ionty jsou dále zodpovědné za aktivaci neuronální syntázy oxidu dusnatého (nNOS), která produkuje oxid dusnatý (NO) z L-argininu. Oxid dusnatý pak reaguje se superoxidy za vzniku peroxynitridu, který patří do ROS a způsobuje další poškození. Na druhou stranu NO vede k vazodilataci a v raných fázích mrtvice může zlepšit průtok krve poškozenou tkání (Iadecola, 1997).

Depolarizace membrány také vede k uvolnění neurotransmiterů ven z buněk. Obzvláště významnou roli hraje glutamát. U glutamátu je udržován extrémní koncentrační gradient. V buňce je jeho koncentrace přibližně 10mM, kdežto mimo buňku je jeho koncentrace pouze v řádech mikromolů. Po uvolnění glutamátu se aktivují NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) a AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) receptory. Aktivace těchto receptorů pak způsobuje vnikání dalších vápenatých iontů do buňky a přispívá tak k buněčné smrti (Olney, 1969; Liu *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2006). Také bylo potvrzeno, že zablokování těchto receptorů vede k výraznému snížení poškození mozkové tkáně (Hsu, 1998).

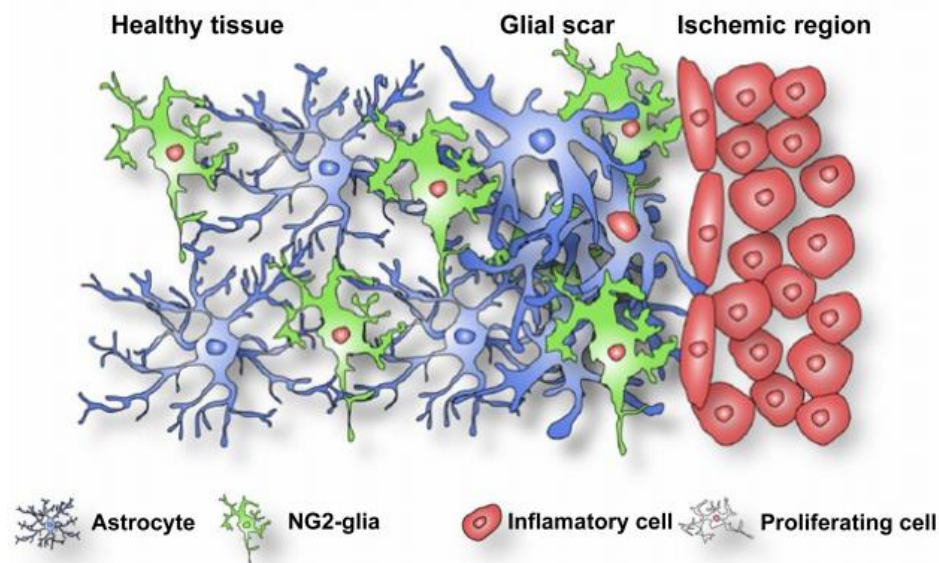
Zvýšená aktivace glutamátových receptorů dále vede také k vtékání sodných a chloridových iontů do buňky, které jsou následovány vodou a vedou k vytvoření edému (Dirnagl *et al.*, 1999).

Procesy, které se dějí při mozkové ischemii, indukují také syntézu různých prozánětlivých faktorů jako například TNF α (*tumour necrosis factor α*) a interleukin 1 β (Rothwell *et al.*, 1995). Při tomto ději mají důležitou úlohu gliové buňky (převážně mikroglie), které produkují 29 různých prozánětlivých cytokinů, různé neuroprotektivní faktory, ale také různé toxické metabolity a enzymy (Del Zoppo *et al.*, 2007).

Syntéza různých cytokinů a chemokinů vede k chemotaxi imunitních buněk do místa poškození. Zde tyto buňky produkují další chemické látky, jako například NO, MMP (metaloproteinázy mezibuněčné matrix), ale zároveň jsou také zdrojem dalších ROS. Tyto molekuly dále zhoršují poškození, ničí extracelulární matrix buněk a také hematoencefalickou bariéru. Porušení této bariéry pak způsobí příliv krve a dalších potenciálně neurotoxických substancí v ní do mozku, což vede ke vzniku edému (Kawabori *et al.*, 2015).

Ischemie také může aktivovat sympatický nervový systém a osu hypothalamus-hypofýza-nadledviny, což vede k snížení počtu leukocytů vstupujících do mozku a ke zvýšení rizika infekce (Prass *et al.*, 2003).

Gliové buňky také vytvářejí tzv. gliovou jizvu. Tento útvar je velmi proměnlivý a na jeho tvorbě se podílí mnoho různých buněk. Nejdříve (do několika hodin) se objeví aktivované mikroglie, které fagocytují poškozenou tkáň. Po dvou dnech se objevují NG2 glie a po sedmi dnech je gliová jizva tvořena převážně astrocyty (obrázek 4) (Wang *et al.*, 2018).



Obrázek 4 – Schéma buněčných typů při vzniku gliové jizvy. Na vzniku gliové jizvy se podílejí různé typy buněk. Nejprve se objevují NG2 glie (zelené buňky), které jsou následně nahrazeny astrocyty (modré buňky). Gliová jizva vytváří bariéru proti prozánětlivým buňkám (červené buňky) v postižené oblasti. Červené jádro značí proliferující buňky (převzato z Honsa, 2015).

2.4 Role NG2 glií v regeneraci tkáně po mozkové ischemii

NG2 glie reagují na akutní poškození mozkové tkáně při mozkové ischemii velmi rychle (Zhang *et al.*, 2013). Při této reakci NG2 glie mění svou morfologii – mají větší těla, kratší a tlustší výběžky a vysokou produkci NG2 proteoglykanu (Levine, 1994). NG2 glie dále zvyšují svou proliferaci. Nárůst jejich počtu je znatelný již po třech dnech od poškození a dále přibližně další čtyři dny stoupá. Poté zůstává počet buněk již konstantní a po 14 dnech od vzniku poškození začne počet proliferujících NG2 glií klesat a po 28 dnech je už jejich počet na původní fyziologické hodnotě (Simon *et al.*, 2011).

NG2 glie jsou velmi dynamická skupina buněk a po poranění jsou schopné migrovat na místo poškození, kde se podílejí na vzniku gliové jizvy (Hughes *et al.*, 2013).

Role NG2 glií v tvorbě gliové jizvy stále ještě není vyřešena. NG2 glie společně s mikrogliemi osídlují postižené místo jako první a poté začnou převládat astrocyty. V nedávné době bylo dokázáno, že jen velmi málo astrocytů se objevuje v místě poškození v prvních 5-7 dnech po vzniku poškození, což značí že NG2 glie by mohly být zodpovědné za uzavření rány a vzniku jizvy spíše než astrocyty (Bardehle *et al.*, 2013).

Také původ astrocytů v gliové jizvě je stále ještě nevyřešená záležitost. Některé studie ukazují, že nově vznikající astrocyty vznikají z původní astrocytové populace v okolí poškození (Komitova *et al.*, 2011), ale jiné studie ukazují možnost vzniku aspoň části astrocytů z NG2 glií (Anderova *et al.*, 2011; Honsa *et al.*, 2012).

Dále je velmi diskutovaná role NG2 glií v regeneraci a růstu neuronálních axonů. Objevily se studie, které ukazovaly negativní efekt akumulace proteoglykanu NG2 na růst axonů a blokace proliferace NG2 glií vedla k jejich vyšší regeneraci (Chen *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005; Rhodes *et al.*, 2003). Na druhou stranu se objevují i studie, které ukazují přesně opačnou věc.

Tedy, že NG2 glie vytvářejí adhezní substrát pro růst axonů a ten je tak podporován i v případě vyšší koncentrace NG2 proteoglykanu (Yang *et al.*, 2006).

2.4.1 Diferenciační potenciál NG2 glií po poškození mozkové tkáně

Jak již bylo zmíněno, NG2 glie disponují vysokým diferenciačním potenciálem. Tento potenciál se samozřejmě projevuje i při poškození mozkové tkáně.

V několika nezávislých studiích bylo prokázáno, že NG2 glie se po poškození diferencují převážně v oligodendrocyty (Komitova *et al.*, 2011; Barnabe-Heider *et al.*, 2010; Dimou *et al.*, 2008).

Diferenciace v jiné buněčné typy je ale opět sporná. Některé studie ukázaly nízkou míru vzniku astrocytů z NG2 glií (Komitova *et al.*, 2011, Zawadska *et al.*, 2010; Honsa *et al.*, 2012), ale spousta dalších studií jakýkoli vznik astrocytů z NG2 glií vyvrátila (Dimou *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2011).

Ani diferenciace NG2 glií v neurony není potvrzená. Objevily se studie, které ukazovaly malou míru neurogeneze po zablokování transkripčního faktoru Olig2 (Buffo *et al.*, 2005) nebo při zvýšené expresi neurogenických látek jako Pax6 nebo Neurogenin-2 (Buffo *et al.*, 2005; Ohori *et al.*, 2006). V jiné studii se ukázala malá míra neurogeneze i bez manipulace s genovou expresí, a to 7 dní po MCAO (Honsa *et al.*, 2012). Další studie ukázala, že aktivace exprese Sox2 transkripčního faktoru po poranění vede k diferenciaci NG2 glií v plně funkční neurony (Heinrich *et al.*, 2014).

2.5 Wnt signální dráha

Wnt signální dráha je stará a evolučně konzervovaná signální dráha živočichů, která reguluje důležité mechanismy převážně během embryonálního vývoje. Mutace v této signální dráze vedou k velmi závažným onemocněním a poruchám (Clevers, 2006).

Tato dráha se podílí na procesech jako je diferenciace, migrace, polarita a apoptóza buněk. Dále se podílí na určení předozadní osy těla, vzniku konvergentní extenze, dává vzniku vlasovým folikulům a ovlivňuje proliferaci mnoha typů kmenových buněk (Komiya *et al.*, 2008).

Název Wnt signální dráha vznikl spojením názvů dvou homologických genů – *wg* (*Wingless*) genu *Drosophila melanogaster* a *int-1* (*Integration 1*) genu myši (Rijsewijk *et al.*, 1987).

Signály jsou přenášeny ligandy z rodiny Wnt, což jsou na cystein bohaté glykoproteiny dlouhé přibližně 350-400 aminokyselin. U savců rozeznáváme 19 různých Wnt ligandů (Komiya *et al.*, 2008).

Wnt ligandy se váží na N-koncovou extracelulární na cystein bohatou doménu tzv. *Frizzled* (Fz) receptorů. Tyto receptory jsou homologické s receptory spojenými s G-proteiny a mají 7 transmembránových domén. Lidé mají 10 různých Fz receptorů (He *et al.*, 2004; Schulte *et al.*, 2007). Pro vazbu mezi Wnt ligandem a Fz receptorem jsou často potřeba různé koreceptory.

Wnt signální dráhy se dělí na dvě skupiny, a to na kanonickou Wnt signální dráhu, ve které se přenos signálu děje prostřednictvím molekuly β -kateninu, a na nekanonickou Wnt signální

dráhu, která β -katenin nevyužívá. U některých nekanonických drah není přesný mechanismus dosud objasněn. Nejlépe popsané nekanonické dráhy jsou Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity pathway*) a Wnt/ Ca^{2+} dráhy (Komiya *et Habas*, 2008).

2.5.1 Kanonická Wnt signální dráha

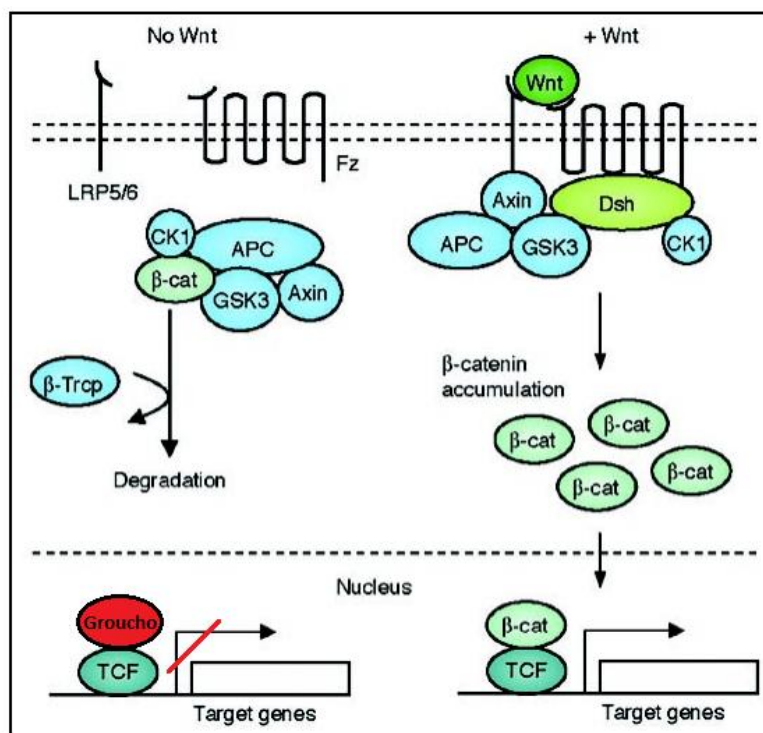
Kanonická Wnt signální dráha je nejlépe prozkoumaná Wnt signální dráha, která k přenosu signálu používá molekulu β -kateninu. Beta-katenin se v buňce podílí na tvorbě adherentních spojů, ukotvuje aktinová vlákna cytoskeletu a slouží jako signální molekula Wnt signální dráhy (Valenta *et al.*, 2012).

Pokud tato dráha není aktivovaná (nedojde k navázání ligandu na receptor), v cytoplazmě se vytvoří komplex proteinů, který fosforyluje, a poté degraduje β -katenin (Zeng *et al.*, 1997).

Proteinový komplex, který je za tuto degradaci zodpovědný, tvoří několik různých komponentů. Základní strukturu tvoří protein Axin (*axis inhibition protein 1*). Na něj se pak vážou další části komplexu – APC, GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) a CK1 (*casein kinase 1*). GSK-3 β poté fosforyluje β -katenin, což způsobí to, že je následně ubiquitinován a degradován v proteazomu (Yost *et al.*, 1996).

K aktivaci této dráhy dochází po navázání Wnt ligandu na Fz receptor a na koreceptor LRP5 nebo LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*). Poté dojde k vazbě proteinu Dsh (*Dishevelled*) na Fz receptor. Tato vazba je nezbytná pro následnou fosforylaci koreceptoru LRP5/6, prostřednictvím které se může poté na tento koreceptor navázat Axin. Axin se následně váže i na Dsh protein a touto vazbou je zablokován destrukční komplex, kvůli čemuž pak nedochází k degradaci β -kateninu proteazomem.

Dochází tak k hromadění β -kateninu v cytoplazmě a po dosažení určité koncentrace se β -katenin přesouvá do jádra, kde interaguje s transkripčními faktory TCF/LEF1 (*T cell-specific transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor 1*). β -katenin se naváže na TCF faktor, a tím uvolní represor Groucho, který až dosud blokoval transkripci. TCF/LEF1 transkripční faktory pak řídí expresi cílových genů (MacDonald *et al.*, 2009; Komiya *et Habas*, 2008) (obrázek 5).



Obrázek 5 – Schéma kanonické Wnt signální dráhy (převzato z Komiya *et* Habas, 2008, upraveno). (APC – *Adenomatous polyposis coli*, β-cat – betakatenin, β-Trcp – *Beta-transducin repeats-containing proteins*, CK1 – *Casein kinase 1*, Dsh – *Dishevelled*, Fz – *Frizzled*, GSK3 – *Glycogen synthase kinase 3β*, LRP5/6 – *Low-density lipoprotein receptor-related protein*, TCF – *T cell-specific transcription factor*, Wnt – *Wingless/Int*)

2.5.2 Wnt/PCP (*planar cell polarity*) dráha

Wnt/PCP dráha byla objevena při genetických studiích prováděných na modelovém organismu *Drosophila melanogaster*, kdy mutace v této dráze způsobily náhodnou orientaci různých epiteliálních struktur jako jsou například chloupky na křídlech. Dále může u hmyzu ovlivňovat senzorické chloupky nebo uspořádání ommatidií složených očí (Mlodzik, 2002; Seifert *et* Mlodzik, 2007).

U savců tato dráha hraje roli v organizaci a orientaci senzorických cílů ve vnitřním uchu, organizaci vlasových folikulů a morfologii a migraci dorzálních mezenchymálních buněk při gastrulaci (Wang *et* Nathans, 2007). Nejvýznamější funkcí této dráhy je ale regulace aktinového cytoskeletu polarizovaných struktur a řízení migrace. Tato dráha také funguje nezávisle na transkripci.

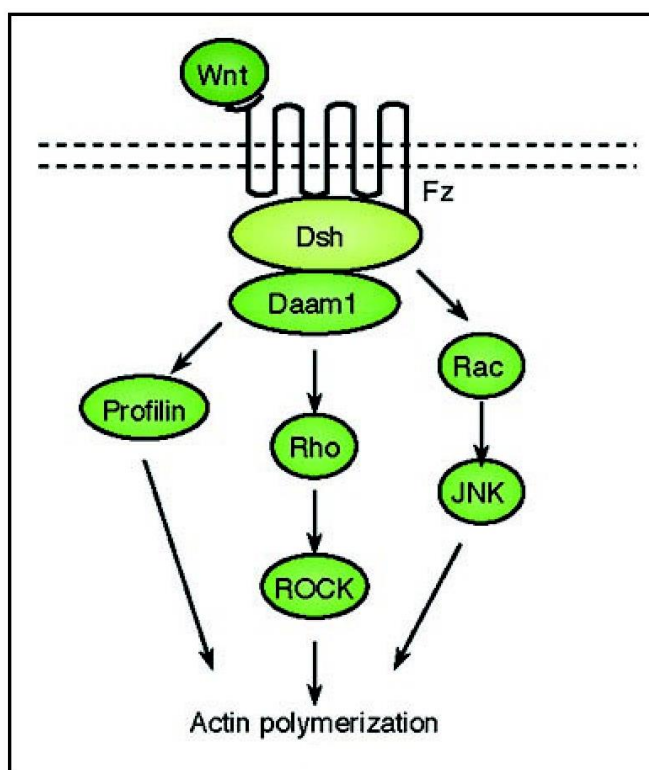
Tato dráha se aktivuje vazbou Wnt ligandu na Fz receptor. Koreceptor, který hraje roli v této dráze ještě není přesně definován. Dráha se někdy rozděluje na více jednotlivých drah, podle použitého koreceptoru. Koreceptorem může být například Ryk (*Receptor-like tyrosine kinase*), proteinová tyrozin kináza nebo ROR2 (*Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2*).

Po vazbě s receptorem je signál přenesen na protein Dsh, který pak aktivuje tři nezávislé dráhy, ve kterých hrají roli GTPázy (enzymy hydrolyzující guanosintrifosfát – GTP) Rho a Rac a na aktin se vážící protein Profilin.

V první dráze se vyskytuje protein DAAM1 (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*), který tvoří komplex s Dsh a stimuluje pak Rho GTPázu. Ta poté působí na ROCK (*Rho-associated protein kinase*), která způsobuje přestavbu cytoskeletu.

V druhé dráze protein Dsh přímo stimuluje GTPázu Rac, která dále aktivuje JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), která se podílí na přestavbě cytoskeletu a aktivuje transkripci.

Protein Dsh také může ovlivnit stavbu cytoskeletu skrze protein Profilin, který se přímo váže na aktin (obrázek 6) (Komiya *et* Habas, 2008; Sugimura *et* Li, 2010).



Obrázek 6 – Schéma nekanonické Wnt/PCP signální dráhy (převzato z Komiya *et* Habas, 2008, upraveno). (Daam1 – *Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*, Dsh – *Dishevelled*, Fz – *Frizzled*, JNK – *c-Jun N-terminal kinase*, ROCK – *Rho-associated protein kinase*, Wnt – *Wingless/Int*)

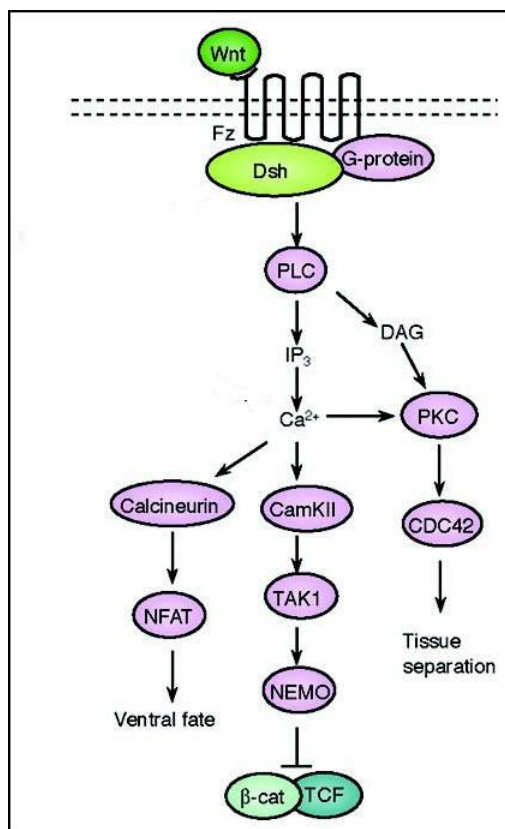
2.5.3 Wnt/Ca²⁺ dráha

Wnt/Ca²⁺ dráha je druhým typem nekanonické Wnt signální dráhy. Tato dráha se podílí na vytvoření dorzoventrální osy embrya, reguluje diferenciaci jednotlivých tkání a konvergentní extenzi během gastrulace a později při tvorbě srdce (Kohn *et* Moon, 2005).

Aktivace dráhy opět začíná navázáním ligandu z rodiny Wnt na receptor Fz. Tento komplex Wnt/Fz pak aktivuje protein Dsh a na něj připojený G protein, který následně aktivuje fosfolipázu C (PLC). Ta poté vytváří inositoltrifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). Následně dojde k uvolnění vápenatých iontů z endoplazmatického retikula do cytoplazmy. Tím se aktivuje kalmodulin dependentní kináza II (CaMKII), která poté aktivuje TAK1 (*Transforming growth factor β activated kinase*) a NLK (*Nemo like kinase*). Tyto kinázy pak působí jako antagonisté pro kanonickou Wnt signální dráhu (viz výše).

Vápenaté ionty také aktivují proteinkinázu C (PKC), která pak reguluje diferenciaci tkání pomocí CD42 GTPázy (*Cell division control protein 42*).

Dalším proteinem, který je aktivován vápenatými ionty, je fosfatáza Calcineurin, která poté aktivuje NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) transkripční faktory, které následně regulují osud a diferenciaci buněk ventrální části embrya (Komiya *et al.* Habas, 2008; De, 2011) (obrázek 7).



Obrázek 7 – Schéma nekanonické Wnt/Ca²⁺ dráhy (převzato z Komiya *et al.* Habas, 2008, upraveno). (β-cat – betakatenin, CamKII – Kalmodulin dependentní kináza II, CDC42 – *Cell division control protein 42*, DAG – diacylglycerol, Dsh – *Dishevelled*, Fz – *Frizzled*, IP₃ – inositoltrifosfát, NFAT – *Nuclear factor of activated T-cells*, NEMO – *Nemo like kinase*, PKC – proteinkináza C, PLC – fosfolipáza C, TAK1 – *Transforming growth factor β activated kinase*, TCF – *T cell-specific transcription factor*, Wnt – *Wingless/Int*)

2.5.4 Význam Wnt signální dráhy v CNS

Přestože Wnt signální dráha má svou hlavní úlohu během embryogeneze, ovlivňuje také spoustu různých procesů v dospělém CNS.

Wnt signální dráha kontroluje neuronální polaritu, reguluje růst axonů směrem k jejich synaptickému cíli a také reguluje axonové větvení (Sanchez-Camacho *et al.* Bovolenta, 2009).

Wnt signální dráha také ovlivňuje tvorbu synapsí. Bylo prokázáno, že Wnt7a indukuje růst a rozvětřování axonů, což vede k akumulaci synaptických proteinů, převážně synapsinu I, který se pak podílí na tvorbě synapse a její správné funkci (Hall *et al.*, 2000). Jiný Wnt ligand – Wnt5a se v oblasti hipokampu podílí na modulaci inhibičních synapsí zvýšením míry recyklace GABA_A receptorů (Cuitino *et al.*, 2010).

Wnt dráha také ovlivňuje genovou expresi různých druhů buněk CNS. Bylo objeveno, že u neuronů thalamu ovlivňuje geny pro GABA receptory, calretinin a dva iontové kanály. Jelikož

tyto proteiny hrají zásadní roli v excitabilitě neuronu, Wnt dráha pravděpodobně ovlivňuje thalamo-kortikální spoje (Wisniewska *et al.*, 2012).

Změny v elektrofyziologických vlastnostech se ukázaly i u neuronů hipokampu, kde po aktivaci Wnt signální dráhy došlo k zvýšení excitačního postsynaptického potenciálu (Varela-Nallar *et al.*, 2010). Dále bylo zjištěno, že po zablokování exprese inhibitoru Wnt signální dráhy sFRP3 (*secreted frizzled-related protein 3*) proteinu v oblasti hipokampu došlo k aktivaci radiálních neuronálních kmenových buněk, zvýšené neurogenezi a prodlužování délky dendritů (Jang *et al.*, 2013). Nekanonická Ca^{2+} Wnt signální dráha také v hipokampu ovlivňuje aktivitu NMDA receptorů a iontových kanálů, což vede k zvýšení účinnosti LTP (*long term potentiation*), procesu nezbytného pro učení a paměť (Cerpa *et al.*, 2011).

Poruchy v Wnt signální dráze mohou vést také k mnoha závažným onemocněním CNS. Mutace v genu DISC1 (*disrupted in schizophrenia*) může způsobit vyšší pravděpodobnost deprese, schizofrenie nebo bipolární poruchy. V nedávné době bylo prokázáno, že tento gen moduluje kanonickou Wnt signální dráhu a zvyšuje míru signalizace β -kateninu (Mao *et al.*, 2009).

Deficience v kanonické Wnt signální dráze za přítomnosti Fz receptoru a koreceptoru LRP6 je také spjata s možností vývoje Alzheimerovy choroby ve stárnoucím mozku (De Ferrari *et al.*, 2007).

Wnt signální dráha ovlivňuje také NG2 glie. Bylo prokázáno, že inhibice kanonické Wnt signální dráhy snížila proliferaci těchto buněk, a naopak aktivace této dráhy jejich proliferaci zvýšila (Rodriguez *et al.*, 2014).

Lék Aspirin inhibuje Wnt signální dráhu díky zvýšení míry fosforylace β -kateninu. Aplikace Aspirinu pak způsobila zvýšení počtu oligodendrocytů pozorovaných *in vitro* i *in vivo* (Huang *et al.*, 2016).

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo analyzovat vliv jaderné inhibice kanonické Wnt signální dráhy v gliogenezi a neurogenezi, a to jak za fyziologických podmínek, tak po ischemickém poškození mozkové tkáně. A dále také analyzovat vliv mozkové ischemie na diferenciační potenciál NG2 glíí bez manipulace Wnt signální dráhy.

4 METODIKA

4.1 Transgenní organismy

Všechny části experimentů, které zahrnovaly použití laboratorních myší, byly provedeny v souladu se Směrnicí Rady Evropského hospodářského společenství 86/609/EHS ze dne 24. listopadu 1986 o sbližování právních a správních předpisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a Směrnicí pro péči o zvířata schválené Ústavem experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. (Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat; projekty pokusů č. 146/2013, 91/2016 a 62/2017).

Pro experimenty jsme použili transgenní myší linie, které nám umožnily vizualizovat NG2 glie a buňky, které z nich vznikají a zároveň manipulovat Wnt signální dráhu.

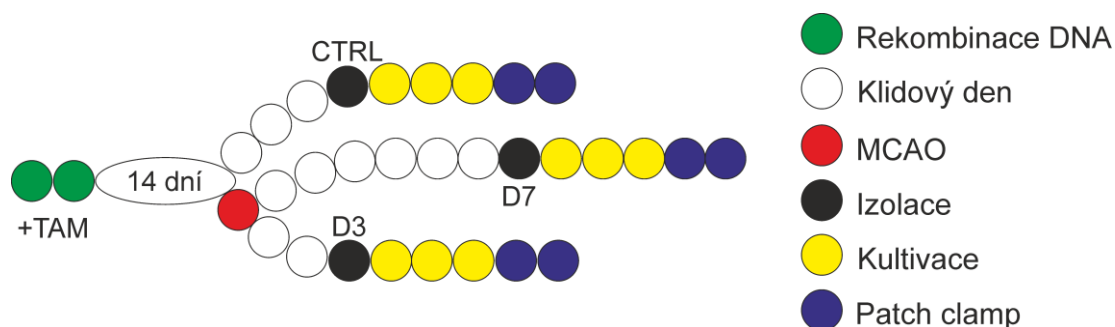
Pro získání takových myší jsme křížili myší kmen *Cspg4-CreER^{T2}* s kmenem *Rosa26-tdTomato*. Potomek myší těchto dvou kmenů (*Cspg4-CreER^{T2}-Rosa26-tdTomato* – dále označovaný jako CT) má v lokusu *Rosa26*, který se vyskytuje u všech buněčných typů, vložený gen pro *tdTomato* červený fluorescenční protein. Ten se ale díky přítomnosti transkripčního bloku neexprimuje. Zároveň má ale za promotorem *Cspg4*, který je typický pro NG2 buňky, vložený gen pro fúzní protein Cre rekombinázy a estrogenového receptoru typu 2. Cre rekombináza působí typicky v oblasti transkripčního bloku *tdTomato*, ale díky své konformaci nemůže samotná vstoupit do jádra. To je umožněno až po přidání tamoxifenu, který se naváže na estrogenový receptor a celý komplex se pak přesune do jádra, kde Cre rekombináza začne působit.

Po přidání tamoxifenu tedy Cre rekombináza odstraní transkripční blok před *tdTomato* fluorescenčním proteinem a NG2 glie a všechny buňky od nich odvozené budou tento protein exprimovat a jsou tak dobře detekovatelné.

Dále byl v experimentech použitý inhibiční kmen *Cspg4-CreER^{T2}(+)-Rosa26-tdTomato(+/-)-Tcf7l2(-/-)* – dále označovaný jako *Tcf7l2*, který vznikl křížením *Cspg4-CreER^{T2}(+)-Rosa26-tdTomato(-/-)-Tcf7l2(-/-)* s *Cspg4-CreER^{T2}(-)-Rosa26-tdTomato(+/-)-Tcf7l2(-/-)*. Tyto myši tedy mají Cre rekombinázu a zároveň jsou heterozygotní pro červený fluorescenční protein. Zároveň však tyto myši mají zablokovanou expresi genu *Tcf7l2* pro protein TCF4. DNA tohoto genu je totiž označena sekvencí rozpoznávanou Cre rekombinázou, která jej po přidání tamoxifenu vystřihne. Díky nepřítomnosti proteinu TCF4 se pak β -katenin v jádře nemá s čím spojit a signalizace Wnt dráhy je inhibována.

Pro indukování rekombinace jsme použili tamoxifen rozpuštěný v kukuřičném oleji, který byl intraperitoneálně podán ve dvou dávkách po 200 mg na kilogram živé hmotnosti myši. První dávka byla podána mezi 59. a 69. dnem po narození a druhá dávka následovala po 24 hodinách.

Průběh experimentu shrnuje obrázek č. 8



Obrázek 8 – Průběh experimentu. Tamoxifen byl myším podán ve dvou následujících dnech. Patnáctý den poté byla provedena MCAO (pouze u operovaných myší), izolace buněk pak následovala tři nebo sedm dní po MCAO, případně po 18 dnech od přidání tamoxifenu u neoperovaných myší. Měření metodou patch clamp proběhlo ve dvou následujících dnech počínajíc čtvrtým dnem po izolaci, po třídní diferenciaci buněk v diferenciačním médiu. (CTRL – buňky izolované z neoperovaných myší, D3 – buňky izolované tři dny po operaci, D7 – buňky izolované sedm dní po operaci, MCAO – okluze střední mozkové artérie, Tam – tamoxifen)

4.2 Okluze střední mozkové artérie

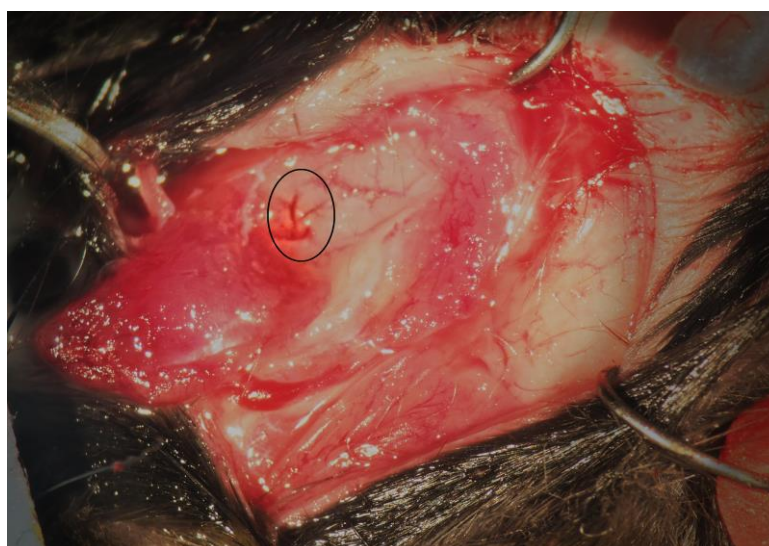
Mozková ischemie byla provedena 75.-85. den po narození myši okluzí střední mozkové artérie.

Myši byly anestetizovány 1,5% isofluranem (Abbot, IL, USA) a poté ponechány v anestezii při 1% isofluranu použitím vaporizéru (Tec-3, Cyprane Ltd., UK). Kůže byla nastříhnutá mezi očníci a zevním zvukovodem. Po odklopení svalu se obnažila čelní kost. Do ní byla poté vyvrtána díra s průměrem přibližně 1-2 mm.

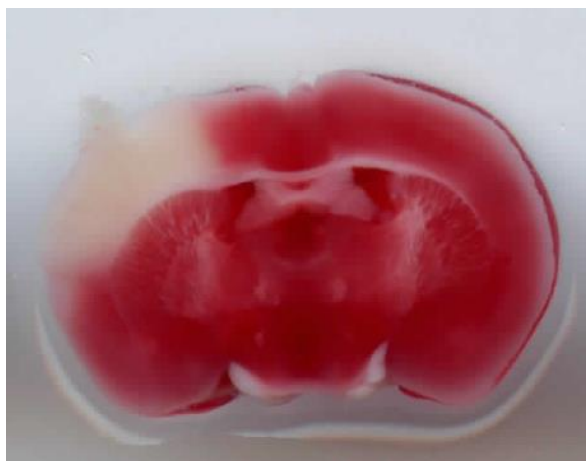
MCAO byla provedena elektrokoagulací pomocí bipolární pinzety (SMT, Česká republika) na střední mozkové artérii. Pro ujištění, že okluze proběhla správně, byla provedena transekce cévy (obrázek 9).

Pro zachování tělesné teploty na 37 ± 1 °C byla použita vyhřívaná podložka. Po operaci byly myším podány analgetika a antibiotika.

Pro vizualizaci ischemické tkáně mozku byl použit 2% 2,3,5-trifenylnetetrazolium chlorid. Mozkové řezy do něj byly ponořeny na 20 minut při teplotě 37 °C (obrázek 10).



Obrázek 9 – Střední mozková tepna (označena elipsou) v průběhu operace (vlastní fotografie).



Obrázek 10 – Vizualizace ischemické tkáně na řezu mozkem s použitím 2% 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu. Bílá barva značí ischemicky poškozenou tkáň (vlastní fotografie).

4.3 Izolace buněk a uchovávání buněčných kultur

Po operaci byly izolovány buňky z mozkové kůry kontrolních neoperovaných i operovaných myší.

Myši byly anestetizovány pomocí pentobarbitalu (PTB, 100 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a poté byla provedena transkardiální perfuze umělým 4 °C mozkomíšním mokem (110 mM NMDG-CL (*N-methyl-D-glucamine chloride*), 2,5 mM KCl, 24,5 mM NaHCO₃, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂ s 20 mM glukózy, osmolalita 290 ± 3 Osmol/kg).

Následně byl izolován mozek, který byl poté nařezán na tenké 500 µm řezy. Poté byla izolována mozková kůra celého mozku v případě kontrolní neoperované myši, nebo mozková kůra hemisféry s ischemickým poškozením v případě myši operované. Tkáň byla poté mechanicky narušena použitím žiletky a následně disociována enzymaticky použitím 1 ml papainu (20U/ml) a 50 µl DNázy (Worthington, Lakewood, NJ) po dobu 45 minut při 37 °C, roztok byl po celou dobu probubláván CO₂ (oxid uhličitý). Následně byl papain inhibován použitím 1 ml trypsin inhibitoru (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Buňky byly centrifugovány 3 minuty na 1020×g, zatímco 100 µl buněčné suspenze bylo použito pro zjištění počtu buněk v Bürkerově komůrce.

Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelet byl rozpuštěn v 1 ml izolačního média skládající se z DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) doplněného o Penicilin-Streptomycin-Amphotericin B roztok (PSA) (10 µl/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), FBS (*fetal bovine serum*) (150 µl/ml; HyClone, GE Healthcare Life Sciences, UK), glutamin (5 µl/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a PDGFα (0.2 µl/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA).

Roztok s buňkami byl poté doředen médiem na hustotu 60 000 buněk na jednu jamku destičky a rozmístěn do 24 jamkové destičky na sklíčka pokrytá poly-L-lysinem (PPL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Buňky byly poté inkubovány při 37 °C a 5% CO₂.

Po jednom dni kultivace bylo izolační médium vyměněno za diferenciační médium skládající se z DMEM/F-12 doplněného o PSA (10 µl/ml), B27 (20 µl/ml; Life Technologies, Waltham, MA, USA), glutamin (5 µl/ml) a PDGFα (0.2 µl/ml).

Po dvou dalších dnech bylo médium vyměněno za čerstvé a následující dva dny probíhalo měření metodou patch clamp.

4.4 Imunocytochemické barvení

Sklička s buňkami byla fixována v 4% paraformaldehydovém roztoku v 0,2 M fosfátovém pufru (*phosphate buffer*, PB) (pH 7,4) na 9 minut a následně uchována v 10 mM PBS (*phosphate-buffered saline*) v lednici při 4 °C.

Poté byla sklička inkubována v roztoku obsahujícím 5% Chemiblocker (Millipore, Billerica, MA, USA) a 0,5% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v 10 mM PBS při 4°C 2 hodiny. Následně byla inkubována přes noc při 4 °C v PBS s primárními protilátkami a s 0.2% Triton-X-100. Po této inkubaci byla sklička třikrát promyta po 10 minutách v PBS a inkubována v roztoku se sekundárními protilátkami po dobu 2 hodin při 4 °C.

Jako primární protilátky byly použity: GFAP (1:800, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DCX (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), *microtubule-associated protein 2* (MAP2) (1:800; Merck Millipore, Billerica, MA, USA), NG2 (1:400; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) a PDGF α R (1:200; Santa Cruz, Dallas, TX, USA).

Jako sekundární protilátka byl použit *goat antimouse/rabbit* IgG (imunoglobulin G) konjugovaný s Alexa Fluor 488/594/660 (1:200; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA).

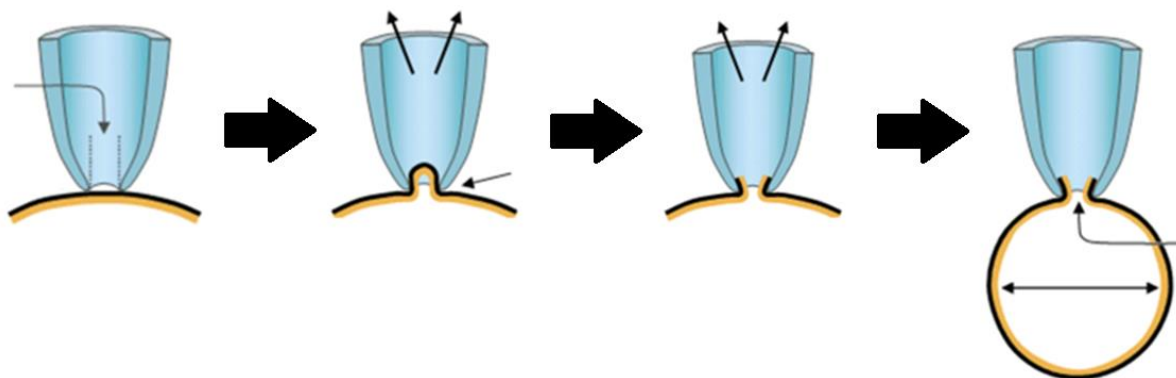
Sklička byla třikrát promyta po 10 minutách v PBS a dále byla inkubována v PBS s 300 nM 4,6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) na 5 minut při pokojové teplotě pro vizualizaci jader buněk.

Na závěr byla sklička s buňkami namontována na podložní sklička pomocí Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc., Eppelheim, Germany).

Imunocytochemická analýza byla provedena na LSM 5 DUO spektrálním konfokálním mikroskopu (Zeiss, Gottingen, Německo) vybaveném Arg/HeNe laserem.

4.5 Metoda terčíkového zámku – patch clamp

Elektrofyzilogické vlastnosti buněk byly měřeny po 3-4 dnech v diferenciačním médiu metodou terčíkového zámku (patch clamp). Tato metoda spočívá v přiblížení skleněné mikropipety s elektrolytem a elektrodou k membráně buňky. Následuje nasátí kousku membrány do pipety a pod tlakem dojde k jejímu protržení (tzv. *whole-cell patch clamp*). Druhá, referenční elektroda je umístěna v roztoku, kde se buňky nacházejí. Díky tomu je možné měřit napětí a proud mezi jednotlivými elektrodami a zjišťovat elektrofyziologické vlastnosti dané buňky (obrázek 11).



Obrázek 11 – Metoda terčíkového zámku v konfiguraci celé buňky. Skleněná pipeta s elektrodou se přiblíží k membráně buňky a ta se následně pod tlakem nasaje dovnitř a dojde k jejímu protržení. Poté můžeme měřit elektrofyziologické vlastnosti buňky vůči druhé referenční elektrodě (převzato z Hamill *et al.*, 1981).

Pro měření byly použity mikropipety s rezistencí mezi 8-12 M Ω , které byly vyrobeny z borosilikátových kapilár (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) s použitím P-97 Brown-Flaming tahače mikropipet (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Pipety byly naplněny intracelulárním roztokem obsahujícím 130 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 mM EGTA (*Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) a 10 mM HEPES (*2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*), pH roztoku bylo 7,2.

Všechna měření byla provedena v umělém mozkomíšním moku obsahujícím 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,3 mM MgCl₂ a 1,25 mM Na₂HPO₄, 28 mM NaHCO₃ a 10 mM D-glukózy, osmolalita roztoku 300 ± 5 mmol/kg. Roztok byl průběžně probubláván CO₂ pro udržení pH na 7,4.

Měření buněk probíhalo na sklíčkách ponořených do umělého mozkomíšního moku za pokojové teploty (obrázek 12). Měření probíhalo s 10kHz vzorkovací frekvencí použitím EPC9 zesilovače. Data byla zpracovávána v PatchMaster a FitMaster softwarech (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Německo).

Měření probíhalo v měřící komůrce Axioskop mikroskopu (Zeiss, Gottingen, Německo) vybaveného elektrickými mikromanipulátory (Luigs & Neumann, Ratingen, Německo) a AxioCam HR digitální kamerou s vysokým rozlišením (Zeiss, Gottingen, Německo).

Membránový potenciál (V_M) byl měřen *current clamp* („zamkne“ elektrický proud na nulové hodnotě) módem zesilovače.

Membránový vstupní odpor (*input resistance*, I_R) byl vypočítán z okamžité hodnoty proudu 40 ms po depolarizujícím 10 mV pulzu z původního udržovaného napětí -70 na -60 mV.

Membránová kapacitance (C_M) byla odečtena z Lock-in protokolu PatchMaster softwaru.

Proudové charaktery pro jednotlivé buňky byly získány depolarizací a hyperpolarizací membrány buňky z původního napětí -70 mV na hodnoty od -160 mV do +40 mV v 10mV intervalech. Doba trvání jednoho pulsu byla 50 ms.

Pro odečtení časově a napěťově nezávislých proudů od K_{DR} se použily hodnoty proudu při napětí od -60 do -70 mV, které se odečetly pomocí FitMasteru. K_{DR} proud byl poté měřen při napětí -50 mV a jeho amplituda byla odečtena při 40 mV na konci pulsu.

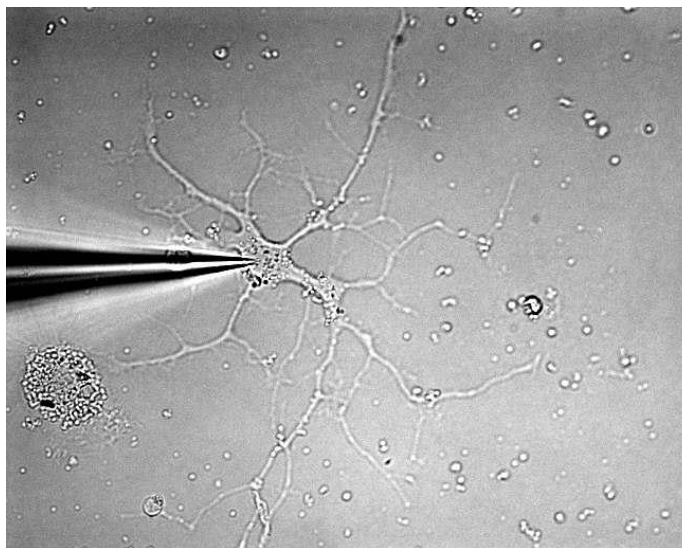
Dovnitř usměrněné draselné proudy (K_{IR}) byly identifikovány při -160 mV na konci pulsu (40ms).

A typ draselných proudů (K_A) byl izolován odečtením hodnoty proudu při -110 mV, při které není aktivovaný, od hodnoty při -50 mV, kde je aktivovaný, a jeho amplituda byla stanovena v nejvyšším bodě.

Hustoty jednotlivých proudů byly vypočítány podílem amplitudy daného proudu a velikostí dané buňky. Velikost buňky je přímo úměrná hodnotě C_M .

Amplitudy sodných proudů vznikajících při membránové depolarizaci byly odečteny v nejnižším bodě.

Po měření byla skříčka fixována v PB (0,2 M; pH 7,2) s 4% paraformaldehydem po dobu 9 minut a následně přesunuta do PBS (10 mM; pH 7,2) pro imunocytochemickou analýzu.



Obrázek 12 – Měření metodou patch clamp (vlastní fotografie).

4.6 Analýza dat

Pro každou variantu experimentu byly použity čtyři myši, z kterých byly následně izolovány NG2 glie. Pro data byla následně vypočítána směrodatná odchylka (*standard error of the mean*, S.E.M.) pro daný počet buněk nebo pokusných zvířat. Pro stanovení signifikance změn v incidencích jednotlivých buněčných typů byla použita parametrická ANOVA s Dunnetovým post-testem v případě porovnávání tří pokusných skupin a parametrický t-test v případě porovnávání dvou pokusných skupin. Pro stanovení signifikance změn v elektrofyziologických vlastnostech NG2 glií byla použita neparametrická ANOVA (Kruskal-Wallis) s Dunnovým post-testem v případě porovnávání tří pokusných skupin a neparametrická verze t-testu (Mann-Whitney) v případě porovnávání dvou pokusných skupin. Veškerá statistika byla dělána v programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, USA).

5 VÝSLEDKY

Pro zjištění vlivu mozkové ischemie a kanonické Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií byly charakterizovány elektrofyzilogické vlastnosti buněk izolovaných z mozkové kůry dospělých myší.

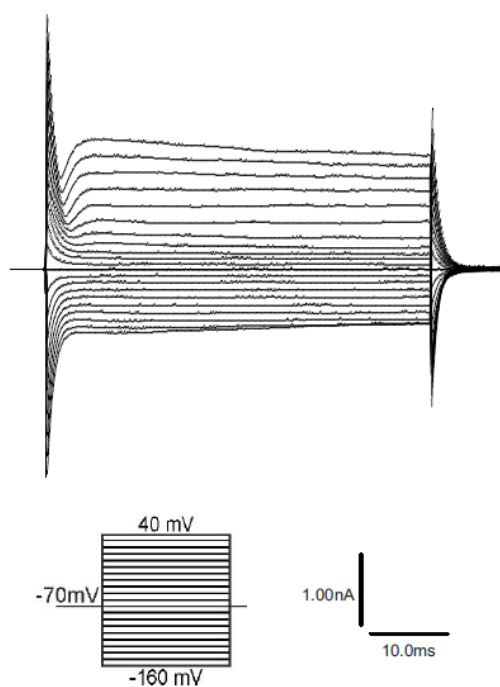
Celkově bylo analyzováno 564 buněk, které byly rozděleny do 18 skupin na základě toho, jestli byla provedena MCAO (buňky izolované z kontrolních neoperovaných myší – CTRL, buňky izolované z operovaných myší po 3 dnech od operace – D3 a buňky izolované z operovaných myší po 7 dnech od operace – D7), dále na základě transgenního myšího kmene (kontrolní – CT a transgenní kmen s inhibovanou Wnt signální dráhou – Tcf712) a na základě proudových charakterů (komplexní – Com, pasivní – Pas a ven usměrněný – Out).

Proudové charaktery byly získány metodou terčíkového zámku v konfiguraci celé buňky. Celkem byly u NG2 glií a buněk, ve které se diferencovaly, rozeznány tři typy proudových charakterů – komplexní proudový charakter s dovnitř a ven usměrněnými draselnými proudy (K_{IR} , K_A , K_{DR}) (obrázek 13). Dále pasivní proudový charakter se symetrickými na čas a napětí nezávislými K^+ proudy (obrázek 14). Posledním typem byl ven usměrněný proudový charakter typický ven usměrněnými draselnými proudy a dovnitř usměrněnými sodnými proudy (K_A , K_{DR} a Na^+) (obrázek 15).

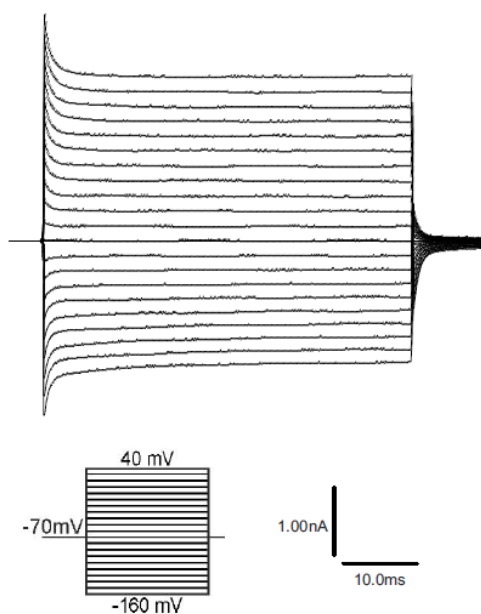
Buňky s daným typem proudového charakteru sdílejí společné elektrofyzilogické vlastnosti. Buňky s komplexním proudovým charakterem měly vysoce negativní V_M (přibližně -85 mV), hodnoty IR mezi 100-400 M Ω . Buňky s pasivním proudovým charakterem měly také velmi negativní V_M (přibližně -80 mV), velmi nízké hodnoty IR , nízké amplitudy K_{IR} a K_{DR} a úplně postrádaly K_A . Buňky s ven usměrněným proudovým charakterem měly méně negativní hodnotu V_M (přibližně -65 mV), vysoké hodnoty IR (přes 400 M Ω) a vysoké amplitudy K_{IR} a K_A .

Proudové charaktery byly asociovány s buněčným typem v několika studiích (Prajerova *et al.*, 2010; Honsa *et al.*, 2012, 2016; Kriska *et al.*, 2016). Buňky s komplexním proudovým charakterem byly pozitivní na markery nediferencovaných NG2 glií (obrázek 16), buňky s pasivním proudovým charakterem na markery astrocytů (obrázek 17) a buňky s ven usměrněným proudovým charakterem byly pozitivní na markery neuronů (obrázek 18).

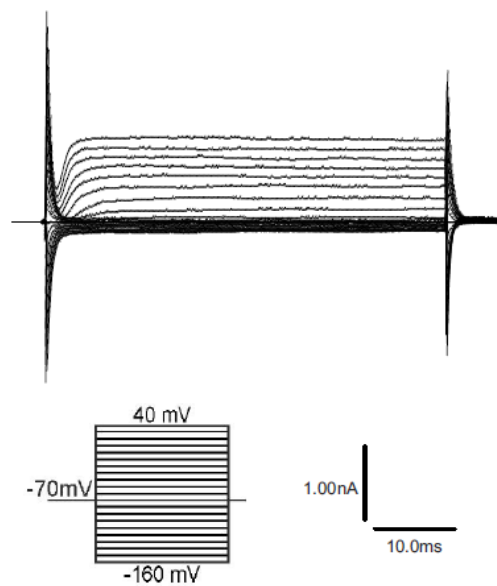
Výsledky imunocytochemické analýzy nebyly v této práci kvantifikovány.



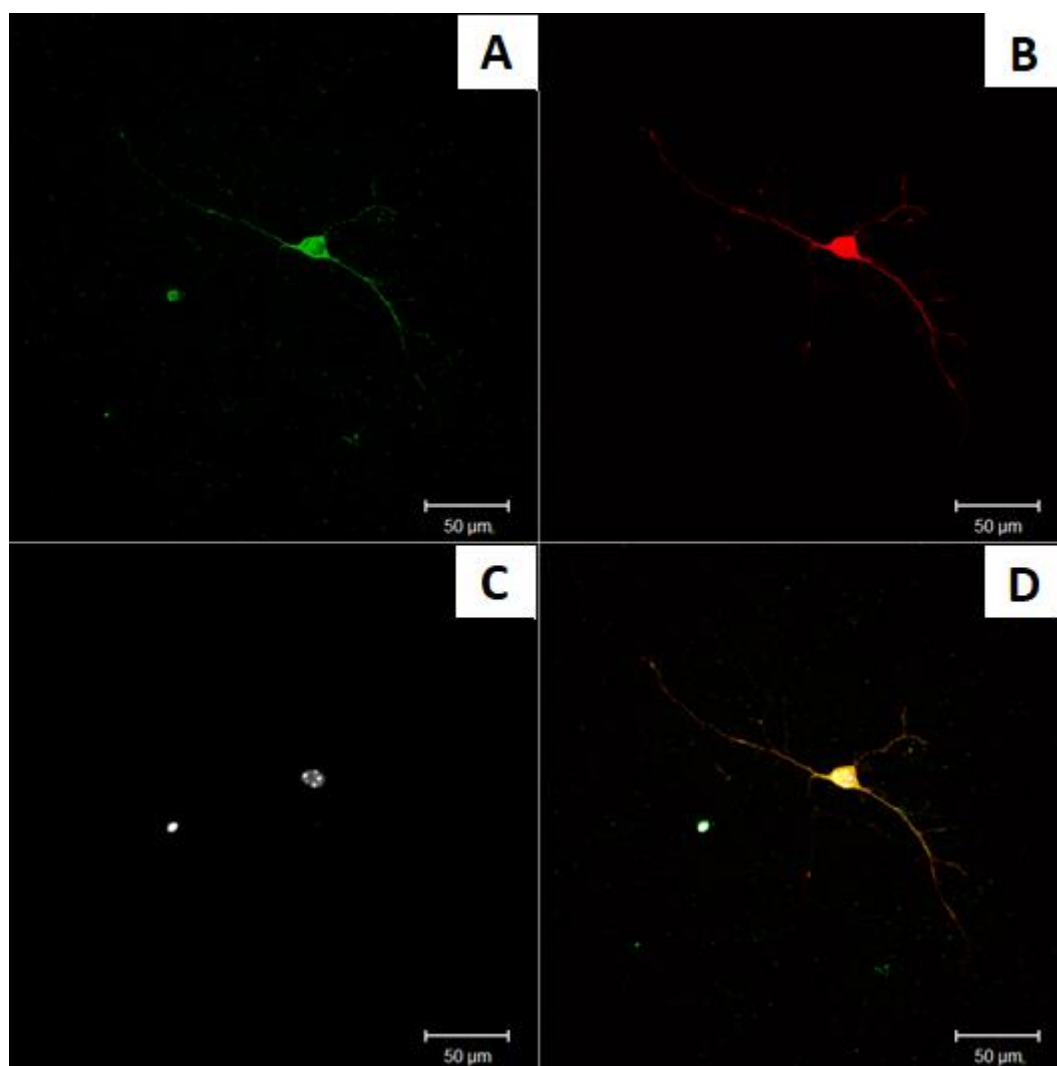
Obrázek 13 – Typický komplexní proudový charakter s dovnitř a ven usměrněnými K^+ proudy, získaný depolarizací a hyperpolarizací membrány z původního napětí -70 mV na hodnoty od -160 mV do +40 mV v 10 mV intervalech. Doba jednoho pulzu byla 50ms. Tento proudový charakter je typický pro ještě nediferencované NG2 glie.



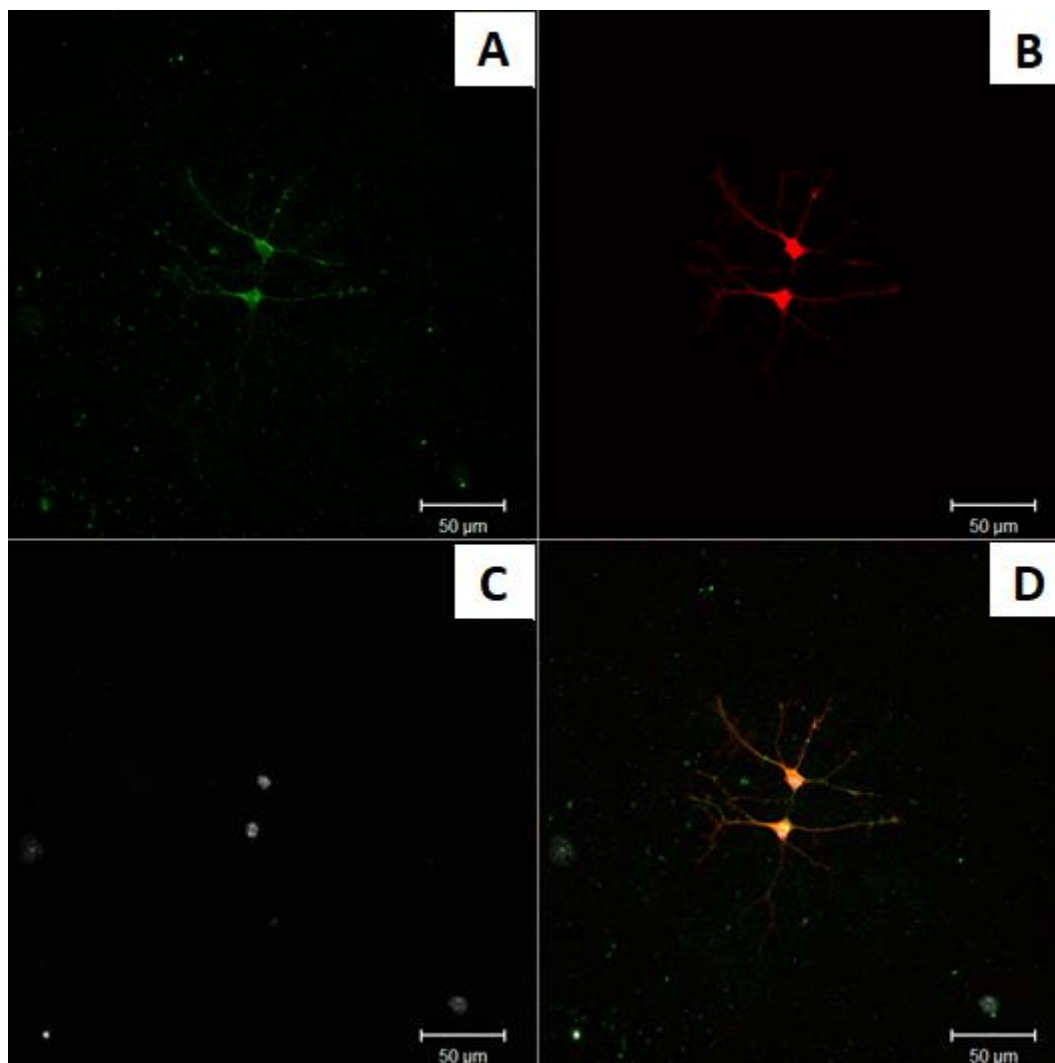
Obrázek 14 – Typický pasivní proudový charakter se symetrickými časově a napětově nezávislými K^+ proudy, získaný depolarizací a hyperpolarizací membrány z původního napětí -70 mV na hodnoty od -160 mV do +40 mV v 10 mV intervalech. Doba jednoho pulzu byla 50ms. Tento proudový charakter je typický pro astrocyty.



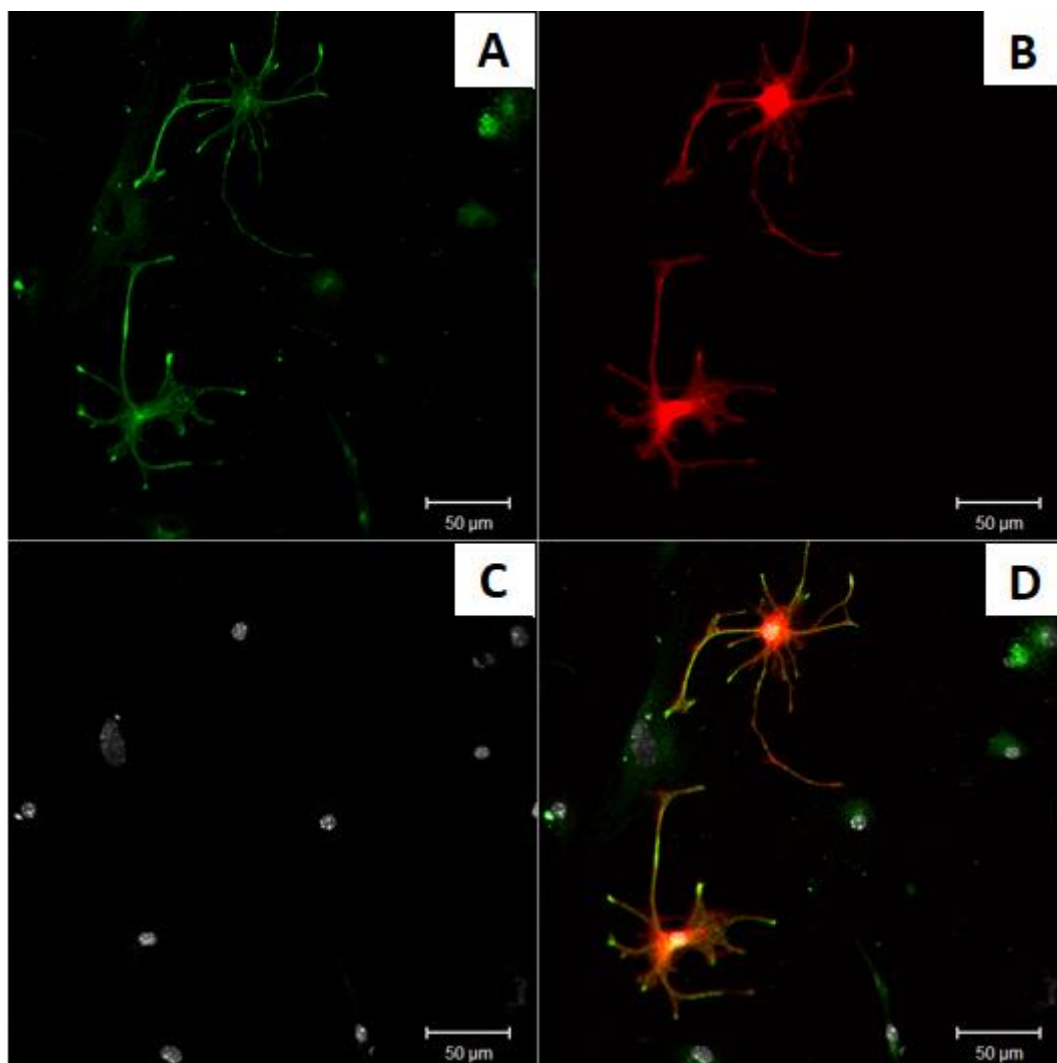
Obrázek 15 – Typický ven usměrněný proudový charakter s ven usměrněnými K^+ proudy, získaný depolarizací a hyperpolarizací membrány z původního napětí -70 mV na hodnoty od -160 mV do +40 mV v 10 mV intervalech. Doba jednoho pulzu byla 50 ms. Tento proudový charakter je typický pro neurony.



Obrázek 16 – tdTomato pozitivní buňky pozitivní také na PDGF α R. A – buňka pozitivní na PDGF α R, typický marker NG2 glií (zeleně). B – buňka exprimující tdTomato fluorescenční protein kontrolovaný *Cspg4* promotorem (červeně). C – výsledek barvení nukleových kyselin DAPI (bíle). D – Překryv jednotlivých fotografií (vlastní fotografie). (*Cspg4* – chondroitin sulfát proteoglykan 4, DAPI – 4,6-diamidin-2-fenylindol, PDGF α R – α receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček, tdTomato – červený fluorescenční protein)



Obrázek 17 – tdTomato pozitivní buňky pozitivní také na GFAP. A – buňka pozitivní na GFAP (zeleně), typický marker astrocytů. B – buňka exprimující tdTomato fluorescenční protein (červeně) kontrolovaný *Cspg4* promotorem. C – výsledek barvení nukleových kyselin DAPI (bíle). D – Překryv jednotlivých fotografií (vlastní fotografie). (*Cspg4* – chondroitin sulfát proteoglykan 4 , DAPI – 4,6-diamidin-2-fenylindol, GFAP – gliální fibrilární acidický protein, tdTomato – červený fluorescenční protein)



Obrázek 18 – tdTomato pozitivní buňky pozitivní také na MAP2. A – buňka pozitivní na MAP2, typický marker neuronů (zeleně). B – buňka exprimující tdTomato fluorescenční protein kontrolovaný *Cspg4* promotorem (červeně). C – výsledek barvení nukleových kyselin DAPI (bíle). D – Překryv jednotlivých fotografií (vlastní fotografie). (*Cspg4* – chondroitin sulfát proteoglykan 4 , DAPI – 4,6-diamidin-2-fenylindol, MAP2 – *microtubule-associated protein 2*, tdTomato – červený fluorescenční protein)

5.1 Vliv mozkové ischemie na diferenciační potenciál NG2 glií

Pro zjištění vlivu mozkové ischemie na diferenciační potenciál NG2 glií a jejich elektrofyziologické vlastnosti jsme pracovali s kmenem CT. NG2 glie tohoto kmene po indukci tamoxifenem exprimují tdTomato červený fluorescenční protein.

Porovnávali jsme diferenciační potenciál NG2 glií a jejich elektrofyziologické vlastnosti u myší, které nebyly operované (CT-CTRL) a u operovaných myší, u kterých proběhla izolace buněk 3 nebo 7 dní po MCAO (CT-D3 nebo CT-D7).

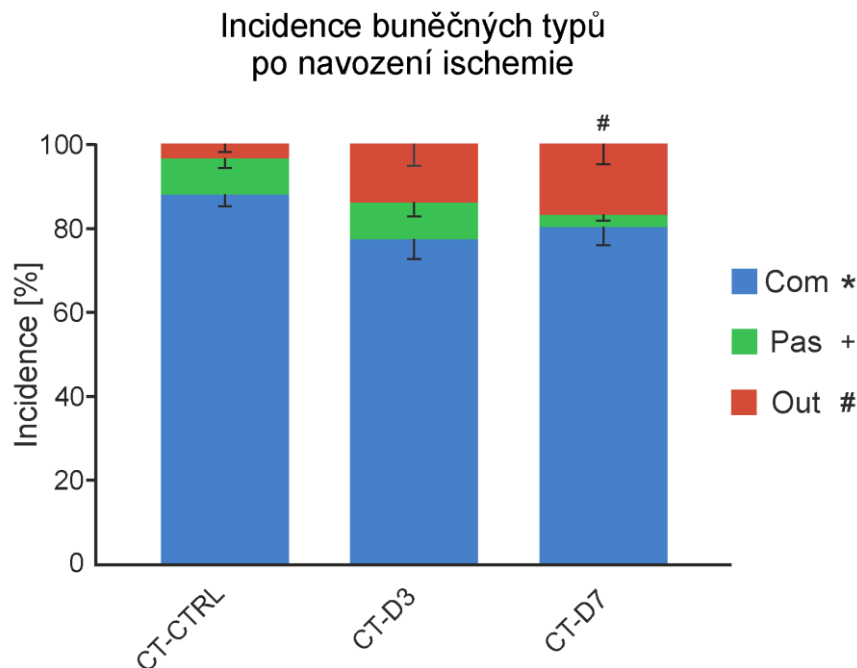
5.1.1 Incidence jednotlivých buněčných typů po MCAO

Srovnávali jsme incidence jednotlivých buněčných typů u CT-CTRL, CT-D3 a CT-D7 myší.

NG2 glie izolované z CT-CTRL myší měly převážně komplexní proudový charakter ($88 \pm 2,52$ %). Pouze velmi málo buněk vykazovalo pasivní proudový charakter ($8,73 \pm 2,5$ %) nebo ven usměrněný proudový charakter ($3,27 \pm 1,72$ %).

Většina buněk izolovaných z CT-D3 myší také disponovala komplexním proudovým charakterem ($77,41 \pm 4,52$ %). Buňky s pasivním proudovým charakterem byly zastoupeny jen velmi málo ($8,41 \pm 3,2$ %) a buňky s ven usměrněným proudem představovaly $14,17 \pm 4,85$ % všech buněk.

U buněk izolovaných z CT-D7 myší opět převažoval komplexní proudový charakter ($80,34 \pm 4,17$ %) a buňky s pasivním proudovým charakterem byly zastoupeny opět minoritně ($3,01 \pm 1,63$ %). Oproti kontrolnímu kmenu CT-CTRL ale došlo k signifikantnímu navýšení počtu buněk s ven usměrněným proudovým charakterem, které představovaly $16,64 \pm 4,52$ % všech buněk (obrázek 19).



Obrázek 19 – Incidence tří buněčných typů a jejich změna po MCAO v myších bez manipulace Wnt signální dráhy. U všech skupin převažovaly buňky s Com proudovým charakterem. U CT-D7 došlo k signifikantnímu nárůstu incidence buněk s Out proudovým charakterem. (Com – buňky s komplexním proudovým charakterem,

CT – buňky izolované z myši s nemanipulovanou Wnt signální dráhou, CTRL – buňky izolované z neoperovaných myši, D3 – buňky izolované 3 dny po operaci, D7 – buňky izolované 7 dní po operaci, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, * – signifikantní změna u buněk s komplexním proudovým charakterem, + – signifikantní změna u buněk s pasivním proudovým charakterem, # – signifikantní změna u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem, $p < 0,05$)

5.1.2 Změny v pasivních membránových vlastnostech po MCAO

Kromě incidence jednotlivých buněčných typů jsme sledovali vliv mozkové ischemie na pasivní membránové vlastnosti – tedy V_M , IR a C_M . Jelikož některé tyto vlastnosti vedly k upřesnění určení buněčného typu, porovnávali jsme pouze změny mezi jednotlivými buněčnými typy.

U žádného buněčného typu nebyly nalezeny signifikantní změny u V_M a IR. Bylo ale pozorováno signifikantní zvýšení hodnoty C_M u buněk s komplexním proudovým charakterem, a to jak tři dny po operaci (z $20,50 \pm 0,96$ na $32,97 \pm 2,20$ pF), tak sedm dní po MCAO (z $20,50 \pm 0,96$ na $25,58 \pm 1,21$ pF). U buněk s pasivním proudovým charakterem a s ven usměrněným proudovým charakterem nebyly pozorovány žádné signifikantní změny (Tabulka 1).

Tabulka 1 – Změny v pasivních membránových vlastnostech indukované MCAO.

		CT			N		
		CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
Com	V _M [mV]	-85,46 ± 0,66	-84,77 ± 0,65	-86,50 ± 0,57	84	77	86
	IR [MΩ]	173,30 ± 33,00	128,30 ± 8,78	145,00 ± 8,36	84	79	86
	C _M [pF]	20,50 ± 0,96	32,97 ± 2,20	25,58 ± 1,21	84	79	86
Pas	V _M [mV]	-80,78 ± 2,65	-83,50 ± 1,74	-82,00 ± 4,38	9	8	4
	IR [MΩ]	48,54 ± 5,07	70,68 ± 11,16	40,93 ± 8,23	9	8	4
	C _M [pF]	32,66 ± 1,20	27,61 ± 4,27	44,60 ± 7,42	9	8	4
Out	V _M [mV]	-65,67 ± 6,12	-80,23 ± 2,49	-79,33 ± 2,30	3	13	18
	IR [MΩ]	538,20 ± 71,51	585,60 ± 128,90	476,00 ± 83,02	3	13	18
	C _M [pF]	22,50 ± 4,68	24,17 ± 3,28	24,62 ± 2,78	3	13	18

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. (C_M – membránová kapacitance, Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CT – myši kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, IR – membránový vstupní odpor, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, V_M – klidový membránový potenciál, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

5.1.3 Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů po MCAO

Dále jsme analyzovali vliv mozkové ischemie na amplitudy a hustoty K_{IR}, K_{DR}, K_A a Na⁺ proudů. Hustota proudu byla vypočítána jako podíl amplitudy daného proudu a velikosti membránové kapacitance měřené buňky.

Nebyla pozorována žádná signifikantní změna amplitudy K_{IR} u ani jednoho z buněčných typů. Na druhou stranu u buněk s komplexním proudovým charakterem bylo pozorováno signifikantní snížení hustoty K_{IR}, a to jak tři dny po MCAO (z 11,95 ± 1,05 na 7,62 ± 0,53 pA/pF), tak sedm dní po MCAO (z 11,95 ± 1,05 na 8,08 ± 0,43 pA/pF). Žádná změna hustoty K_{IR} nebyla pozorována u buněk s pasivním a ven usměrněným proudovým charakterem.

U buněk s komplexním proudovým charakterem dále došlo k signifikantnímu zvýšení amplitudy K_{DR} po sedmi dnech od MCAO (z 794,80 ± 50,06 na 1131 ± 67,79 pA). Buňky s pasivním a ven usměrněným proudovým charakterem nevykazovaly žádné signifikantní změny. Hustota K_{DR} se signifikantně zvýšila tři dny po MCAO, po sedmi dnech byla srovnatelná s hustotou u neoperovaných myši. U buněk s pasivním a ven usměrněným proudovým charakterem nebyla pozorována žádná signifikantní změna.

Mozková ischemie nezpůsobila žádné signifikantní změny v amplitudě a hustotě K_A u buněk s komplexním a ven usměrněným proudovým charakterem.

Nebyla pozorována ani žádná signifikantní změna amplitudy Na⁺ proudu. U buněk s komplexním proudovým charakterem ale došlo k signifikantnímu snížení hustoty tohoto

proudu tři dny po MCAO, po sedmi dnech od MCAO byla hustota srovnatelná s hodnotou u neoperovaných myší.

Naměřené výsledky shrnují Tabulky 2, 3 a 4.

Tabulka 2 – Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů u buněk s komplexním proudovým charakterem indukované MCAO.

Com	CT			N		
	CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
K_{IR} [pA]	215,70 ± 15,51	208,60 ± 10,33	185,20 ± 8,55	84	76	86
K_{IR}/C_M [pA/pF]	11,95 ± 1,05	7,62 ± 0,53	8,08 ± 0,43	84	76	86
K_{DR} [pA]	794,80 ± 50,06	850,40 ± 57,42	1131 ± 67,79	83	79	86
K_{DR}/C_M [pA/pF]	43,90 ± 3,11	30,32 ± 2,21	48,80 ± 3,23	83	79	86
K_A [pA]	585,80 ± 48,45	578,30 ± 61,69	824,80 ± 79,53	66	51	64
K_A/C_M [pA/pF]	34,39 ± 3,89	23,77 ± 3,09	37,09 ± 3,84	66	51	64
Na^+ [pA]	324,30 ± 21,58	369,10 ± 64,84	363,20 ± 55,77	20	8	13
Na^+/C_M [pA/pF]	22,36 ± 2,92	10,61 ± 1,70	16,50 ± 2,39	20	8	13

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. (C_M – membránová kapacitance, Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CT – myši kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, K_{IR} – dovnitř usměrněný draselný proud, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Na^+ – sodný proud, S.E.M. – směrodatná odchylka, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

Tabulka 3 – Změny v amplitudách a hustotách draselných proudů u buněk s pasivním proudovým charakterem

Pas	CT			N		
	CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
K_{IR} [pA]	199,50 ± 45,06	123,30 ± 22,95	272,20	8	7	1
K_{IR}/C_M [pA/pF]	6,00 ± 1,36	5,47 ± 1,84	9,20	8	7	1
K_{DR} [pA]	434,00	155,80 ± 107,30	144,00	1	2	1
K_{DR}/C_M [pA/pF]	14,00	5,85 ± 4,55	2,20	1	2	1

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. (C_M – membránová kapacitance, CT – myši kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, K_{IR} – dovnitř usměrněný draselný proud, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

Tabulka 4 – Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem indukované MCAO.

Out	CT			N		
	CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
K_{DR} [pA]	1409,00 ± 440,70	1593,00 ± 139,90	1745,00 ± 132,60	3	13	18
K_{DR}/C_M [pA/pF]	71,63 ± 26,37	75,80 ± 7,70	79,74 ± 6,24	3	13	18
K_A [pA]	862,80 ± 146,30	953,20 ± 175,20	1130,00 ± 223,40	2	13	18
K_A/C_M [pA/pF]	51,75 ± 24,45	47,66 ± 8,33	59,89 ± 13,65	2	13	18
Na^+ [pA]	200,40	240,70 ± 28,98	313,20 ± 29,51	1	5	4
Na^+/C_M [pA/pF]	15,10	12,12 ± 2,10	13,10 ± 2,33	1	5	4

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. (C_M – membránová kapacitance, CT – myší kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Na^+ – sodný proud, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

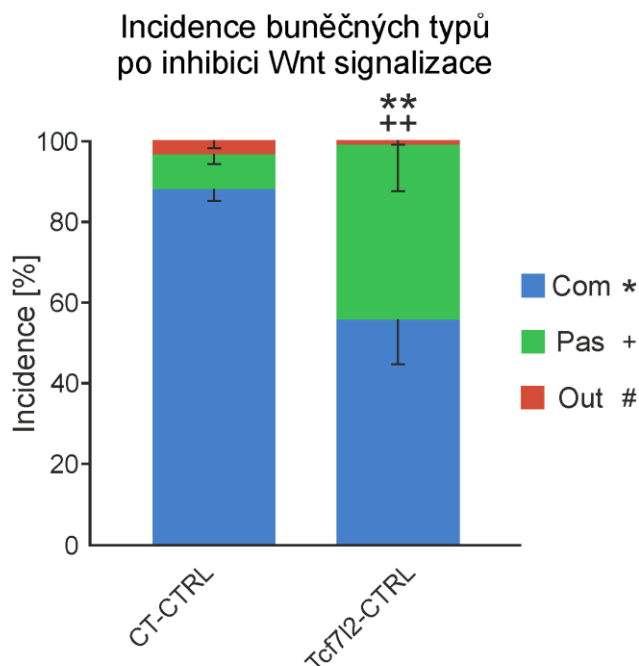
5.2 Vliv manipulace Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií za fyziologických podmínek

Pro zjištění vlivu Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál a elektrofyziologické vlastnosti NG2 glií za fyziologických podmínek jsme pracovali s buňkami z CT-CTRL myši a transgenního kmene, který měl inhibovanou Wnt signální dráhu (CT-Tcf7l2).

5.2.1 Incidence jednotlivých buněčných typů po manipulaci Wnt signální dráhy za fyziologických podmínek

U kmene CT-CTRL vykazovaly buňky převážně komplexní proudový charakter (88 ± 2,52 %). Pouze velmi málo buněk mělo pasivní proudový charakter (8,73 ± 2,5 %) nebo ven usměrněný proudový charakter (3,27 ± 1,72 %).

U kmene Tcf7l2 došlo k signifikantnímu nárůstu počtu buněk s pasivním proudovým charakterem (43,3 ± 11,18 %), stejně jako došlo k signifikantnímu poklesu buněk s komplexním proudovým charakterem (55,77 ± 10,89 %). Zastoupení buněk s ven usměrněným proudovým charakterem bylo velmi nízké (0,92 ± 0,92 %) (obrázek 20).



Obrázek 20 – Incidence tří buněčných typů a jejich změna po manipulaci Wnt signální dráhy. U kontrolního kmene CT-CTRL převažovaly buňky s Com proudovým charakterem. U kmene Tcf712 s inhibovanou Wnt signální dráhou došlo k signifikantnímu nárůstu počtu buněk s Pas proudovým charakterem a k signifikantnímu poklesu počtu buněk s Com proudovým charakterem. (Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CT – buňky izolované z myši s nemanipulovanou Wnt signální dráhou, CTRL – buňky izolované z neoperovaných myši, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, Tcf712 – buňky izolované z myši s inhibovanou Wnt signální dráhou, * – signifikantní změna u buněk s komplexním proudovým charakterem, + – signifikantní změna u buněk s pasivním proudovým charakterem, # – signifikantní změna u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem, **, ++ – $p < 0,01$)

5.2.2 Vliv inhibice Wnt signální dráhy na pasivní membránové vlastnosti

U buněk s komplexním proudovým charakterem došlo k signifikantnímu zvýšení V_M (z $-85,46 \pm 0,66$ na $-88,96 \pm 0,60$ mV), k signifikantnímu snížení IR (z $173,30 \pm 33$ na $62,85 \pm 3,22$ M Ω) a signifikantnímu zvýšení C_M (z $20,50 \pm 0,96$ na $26,83 \pm 1,53$ pF).

U buněk s pasivním proudovým charakterem bylo pozorováno signifikantní zvýšení V_M (z $-80,78 \pm 2,65$ na $-89,83 \pm 0,97$ mV), signifikantní snížení IR (z $48,54 \pm 5,08$ na $31,74 \pm 1,81$ M Ω) a signifikantní zvýšení C_M (z $32,66 \pm 1,2$ na $50,75 \pm 2,85$ pF).

Vzhledem k tomu, že byla nalezena pouze jedna buňka s inhibovanou Wnt signální dráhou a ven usměrněným proudovým charakterem, analýza signifikance nebyla provedena.

Naměřené výsledky shrnuje Tabulka 5.

Tabulka 5 – Změny v pasivních membránových vlastnostech indukované manipulací Wnt signální dráhy

		CTRL		N	
		CT	Tcf712	CT	Tcf712
Com	V _M [mV]	-85,46 ± 0,66	-88,96 ± 0,60	84	47
	IR [MΩ]	173,30 ± 33,00	62,58 ± 3,22	84	47
	C _M [pF]	20,50 ± 0,96	26,83 ± 1,53	84	47
Pas	V _M [mV]	-80,78 ± 2,65	-89,83 ± 0,97	9	24
	IR [MΩ]	48,54 ± 5,07	31,74 ± 1,81	9	24
	C _M [pF]	32,66 ± 1,20	50,75 ± 2,85	9	24
Out	V _M [mV]	-65,67 ± 6,12	/	3	0
	IR [MΩ]	538,20 ± 71,51	/	3	0
	C _M [pF]	22,50 ± 4,68	/	3	0
		p<0,05	p<0,01	p<0,001	

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. (C_M – membránová kapacitance, Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CT – myši kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, IR – membránový vstupní odpor, N – počet naměřených buněk, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf712 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, V_M – klidový membránový potenciál, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

5.2.3 Vliv inhibice Wnt signální dráhy na amplitudy a hustoty draselných a sodných proudů

Nebyla pozorována žádná signifikantní změna amplitudy K_{IR} ani u jednoho z buněčných typů. Na druhou stranu u buněk s komplexním proudovým charakterem a inhibovanou Wnt signální drahou bylo pozorováno signifikantní snížení hustoty K_{IR} (z 11,95 ± 1,05 na 8,17 ± 0,90 pA/pF). Stejný trend se projevil i u buněk s pasivním proudovým charakterem, kdy došlo k signifikantnímu snížení hustoty K_{IR} z 6 ± 1,36 na 3,01 ± 0,48 pA/pF. U buněk s ven usměrněným proudovým charakterem nebyla pozorována žádná signifikantní změna v hustotě K_{IR}, jelikož mezi buňkami s inhibovanou Wnt signální drahou nebyly nalezeny žádné buňky s ven usměrněným proudovým charakterem.

U buněk s komplexním proudovým charakterem dále došlo k signifikantnímu snížení amplitudy K_{DR} (z 794,80 ± 50,06 na 618,70 ± 72,47 pA), snížení hustoty K_{DR} (z 43,90 ± 3,11 na 29,69 ± 5,64 pA/pF) a zvýšení amplitudy Na⁺ proudu (z 324,30 ± 21,58 na 530,60 ± 74,81 pA).

Tyto ani žádné další signifikantní změny nebyly pozorovány u buněk s pasivním a ven usměrněným proudovým charakterem.

Všechny naměřené výsledky shrnují tabulky 6, 7 a 8.

Tabulka 6 – Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů u buněk s komplexním proudovým charakterem vyvolaný manipulací s Wnt signální drahou.

Com	CTRL		N	
	CT	Tcf7l2	CT	Tcf7l2
K_{IR} [pA]	215,70 ± 15,51	188,80 ± 15,35	84	44
K_{IR}/C_M [pA/pF]	11,95 ± 1,05	8,17 ± 0,90	84	44
K_{DR} [pA]	794,80 ± 50,06	618,70 ± 72,47	83	47
K_{DR}/C_M [pA/pF]	43,90 ± 3,11	29,69 ± 5,642	83	47
K_A [pA]	585,80 ± 48,45	590,50 ± 107,20	66	23
K_A/C_M [pA/pF]	34,39 ± 3,85	32,50 ± 8,27	66	23
Na^+ [pA]	324,30 ± 21,58	530,60 ± 74,81	20	10
Na^+/C_M [pA/pF]	22,36 ± 2,92	25,21 ± 5,84	20	10

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. (C_M – membránová kapacitance, Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CT – myší kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, K_{IR} – dovnitř usměrněný draselný proud, N – počet naměřených buněk, Na^+ – sodný proud, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

Tabulka 7 – Změny v amplitudách a hustotách draselných proudů u buněk s pasivním proudovým charakterem vyvolaný manipulací s Wnt signální drahou.

Pas	CTRL		N	
	CT	Tcf7l2	CT	Tcf7l2
K_{IR} [pA]	199,50 ± 45,06	135,10 ± 18,83	8	20
K_{IR}/C_M [pA/pF]	6,00 ± 1,36	3,01 ± 0,48	8	20
K_{DR} [pA]	434,00	140,80 ± 36,57	1	11
K_{DR}/C_M [pA/pF]	14,00	2,66 ± 0,63	1	11

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. (C_M – membránová kapacitance, CT – myší kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, K_{IR} – dovnitř usměrněný draselný proud, N – počet naměřených buněk, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

Tabulka 8 – Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem vyvolaný manipulací s Wnt signální drahou.

Out	CTRL		N	
	CT	Tcf7l2	CT	Tcf7l2
K _{DR} [pA]	1409, 00 ± 440,70	/	3	0
K _{DR} /C _M [pA/pF]	71,63 ± 26,37	/	3	0
K _A [pA]	862,80 ± 146,30	/	2	0
K _A /C _M [pA/pF]	51,75 ± 24,45	/	2	0
Na ⁺ [pA]	200,40	/	1	0
Na ⁺ /C _M [pA/pF]	15,10	/	1	0

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. (C_M – membránová kapacitance, CT – myši kmen bez manipulace Wnt signální dráhy, CTRL – neoperované myši, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, N – počet naměřených buněk, Na⁺ – sodný proud, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

5.3 Vliv manipulace Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií po mozkové ischemii

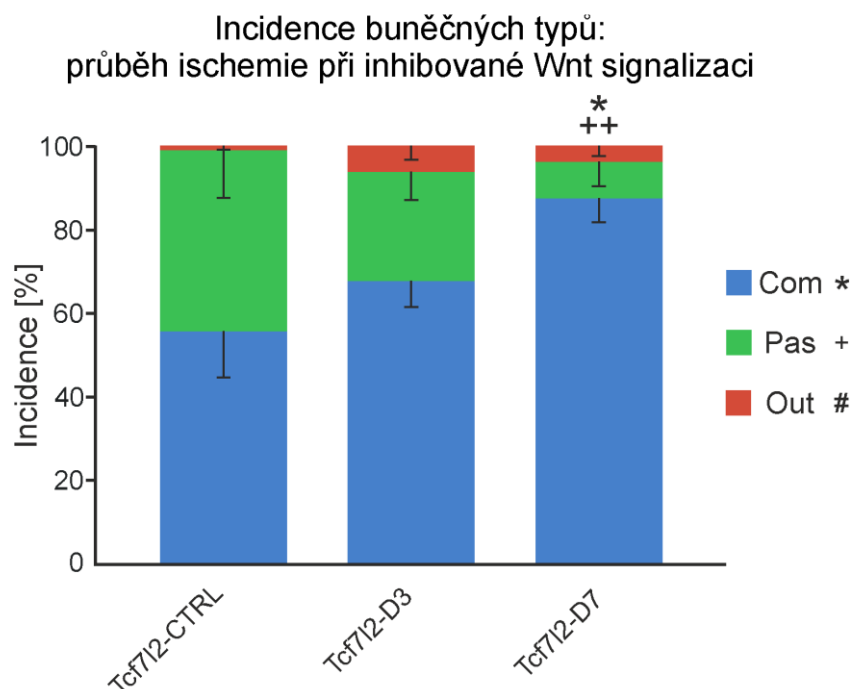
5.3.1 Incidence jednotlivých buněčných typů po manipulaci Wnt signální dráhy a po mozkové ischemii

Pro zjištění vlivu manipulace Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál a elektrofyziologické vlastnosti NG2 glií po mozkové ischemii jsme pracovali s myším kmenem Tcf7l2. Tyto myši buď nebyly operované (Tcf7l2-CTRL) nebo u nich byla provedena MCAO a buňky byly následně izolovány 3 nebo 7 dní po operaci (Tcf7l2-D3 a Tcf7l2-D7).

U kontrolního kmene Tcf7l2-CTRL s inhibovanou Wnt signální drahou měly velký podíl buňky s pasivním proudovým charakterem (43,3 ± 11,18 %) a buňky s komplexním proudovým charakterem (55,77 ± 10,89 %). Zastoupení buněk s ven usměrněným proudovým charakterem bylo velmi nízké (0,92 ± 0,92 %).

U kmene Tcf7l2-D3 stále převažovaly buňky s komplexním proudovým charakterem (67,8 ± 5,89 %), ale i buňky s pasivním proudovým charakterem byly stále zastoupeny ve velkém počtu (25,79 ± 6,66 %). Zastoupení buněk s ven usměrněným proudovým charakterem podobně jako u kontrolního kmene bylo velmi nízké (6,39 ± 2,98 %).

U buněk izolovaných z Tcf7l2-D7 kmene došlo k signifikantnímu nárůstu poměru buněk s komplexním proudovým charakterem (87,59 ± 5,52 %) a k signifikantnímu poklesu poměru buněk s pasivním proudovým charakterem (8,33 ± 5,62 %) oproti kontrolnímu kmeni Tcf7l2-CTRL. Podíl buněk s ven usměrněným proudovým charakterem zůstal velmi malý (4,07 ± 2,26 %) (obrázek 21).



Obrázek 21 – Incidence tří buněčných typů u kmene s manipulovanou Wnt signální dráhou po MCAO. Kontrolní kmen Tcf712-CTRL s inhibovanou Wnt signální dráhou vykazoval vysoký poměr buněk s Pas a Com proudovým charakterem. U kmene Tcf712-D7 došlo k signifikantnímu poklesu poměru buněk s Pas proudovým charakterem a k signifikantnímu nárůstu poměru buněk s Com proudovým charakterem. (Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CT – buňky izolované z myši s nemanipulovanou Wnt signální dráhou, CTRL – buňky izolované z neoperovaných myši, D3 – buňky izolované 3 dny po operaci, D7 – buňky izolované 7 dní po operaci, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, Tcf712 – buňky izolované z myši s inhibovanou Wnt signální dráhou, * – signifikantní změna u buněk s komplexním proudovým charakterem, + – signifikantní změna u buněk s pasivním proudovým charakterem, # – signifikantní změna u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem, * – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$).

5.3.2 Vliv manipulace Wnt signální dráhy a mozkové ischemie na pasivní membránové vlastnosti

U buněk s komplexním proudovým charakterem došlo k signifikantnímu snížení V_M jak tři dny po MCAO ($z -88,96 \pm 0,60$ na $-83,93 \pm 0,89$ mV), tak sedm dní po MCAO (na $-84,15 \pm 0,67$ mV). Dále došlo k signifikantnímu zvýšení IR opět jak tři dny ($z 62,58 \pm 3,22$ na $154,60 \pm 18,74$ M Ω), tak sedm dní po operaci (na $115,30 \pm 11,76$ M Ω). Bylo pozorováno také signifikantní zvýšení C_M tři dny po MCAO ($z 26,83 \pm 1,53$ na $31,97 \pm 1,54$ pF), sedm dní po MCAO byla hodnota C_M srovnatelná s hodnotou u neoperovaných myši.

U buněk s pasivním proudovým charakterem došlo stejně jako u buněk s komplexním proudovým charakterem k signifikantnímu snížení V_M tři dny ($z -89,83 \pm 0,97$ na $-85,16 \pm 1,22$ mV) i sedm dní po MCAO (na $-87 \pm 0,72$ mV). Došlo také ke signifikantnímu zvýšení IR opět po třech ($z 31,74 \pm 1,81$ na $72,19 \pm 7,98$ M Ω) i sedmi dnech od operace (na $54,01 \pm 8,63$ M Ω). Na rozdíl od buněk s komplexním proudovým charakterem ale došlo k signifikantnímu snížení C_M tři dny po MCAO ($z 50,75 \pm 2,85$ na $28,93 \pm 2,93$ pF). Sedm dní po operaci byla ale hodnota C_M opět srovnatelná s hodnotou u neoperované myši.

U buněk s ven usměrněným proudovým charakterem nebyly pozorovány žádné signifikantní změny.

Naměřené výsledky shrnuje Tabulka 9.

Tabulka 9 – Změny v pasivních membránových vlastnostech u buněk s manipulovanou Wnt signální dráhou indukované MCAO.

		Tcf7l2			N		
		CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
Com	V _M [mV]	-88,96 ± 0,60	-83,93 ± 0,89	-84,15 ± 0,67	47	57	94
	IR [MΩ]	62,58 ± 3,22	154,60 ± 18,74	115,30 ± 11,76	47	57	94
	C _M [pF]	26,83 ± 1,53	31,97 ± 1,58	27,10 ± 1,20	47	57	94
Pas	V _M [mV]	-89,83 ± 0,97	-85,16 ± 1,22	-87 ± 0,72	24	19	7
	IR [MΩ]	31,74 ± 1,81	72,19 ± 7,98	54,01 ± 8,63	24	19	7
	C _M [pF]	50,75 ± 2,85	28,93 ± 2,93	41,53 ± 6,64	24	19	7
Out	V _M [mV]	-88	-74,71 ± 4,59	-83 ± 3,63	1	7	4
	IR [MΩ]	414,60	393,20 ± 74,11	417,20 ± 113,40	1	7	4
	C _M [pF]	25,20	34,37 ± 4,23	16,35 ± 2,24	1	7	4

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. (C_M – membránová kapacitance, Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, IR – membránový vstupní odpor, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální dráhou, V_M – klidový membránový potenciál, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

5.3.3 Vliv manipulace Wnt signální dráhy a mozkové ischemie na amplitudy a hustoty draselných a sodných proudů

Tři dny po MCAO bylo u myši s manipulovanou Wnt signální dráhou a komplexním proudovým charakterem detekováno signifikantní snížení amplitudy Na⁺ proudu (z 530,60 ± 74,81 na 311,30 ± 29,99 pA) i hustoty tohoto proudu (z 25,21 ± 5,84 na 10,98 ± 1,51 pA/pF).

Sedm dní po MCAO bylo pozorováno signifikantní zvýšení amplitudy K_{IR} (z 188,80 ± 15,35 na 249,50 ± 13,58 pA) a K_{DR} (z 618,70 ± 72,47 na 962 ± 65,23 pA) a signifikantní zvýšení hustoty K_{IR} (z 8,17 ± 0,90 na 10,17 ± 0,56 pA/pF) i K_{DR} (z 29,69 ± 5,42 na 40,33 ± 1,88).

U buněk s pasivním proudovým charakterem nebyly pozorovány žádné signifikantní změny.

Jedinou signifikantní změnou u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem bylo zvýšení hustoty K_{DR} mezi D3 a D7 (z 30,90 ± 2,57 na 74,80 ± 4,44 pA/pF).

Naměřené výsledky shrnují Tabulky 10, 11 a 12.

Tabulka 10 – Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů u buněk s komplexním proudovým charakterem a manipulovanou Wnt signální drahou indukované MCAO.

Com	Tcf7l2			N		
	CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
K_{IR} [pA]	188,80 ± 15,35	193 ± 11,63	249,50 ± 13,58	44	56	93
K_{IR}/C_M [pA/pF]	8,17 ± 0,90	6,41 ± 0,39	10,17 ± 0,56	44	56	93
K_{DR} [pA]	618,70 ± 72,47	573,40 ± 52,80	962 ± 65,23	47	55	94
K_{DR}/C_M [pA/pF]	29,69 ± 5,64	20,49 ± 2,68	40,33 ± 2,88	47	55	94
K_A [pA]	590,50 ± 107,20	495,70 ± 74,56	814,50 ± 64,21	23	47	75
K_A/C_M [pA/pF]	32,50 ± 8,27	17,42 ± 2,47	39,22 ± 4,20	23	47	75
Na^+ [pA]	530,60 ± 74,81	311,30 ± 29,99	439,60 ± 68,11	10	18	8
Na^+/C_M [pA/pF]	25,21 ± 5,84	10,98 ± 1,51	12,81 ± 1,58	10	18	8

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. (C_M – membránová kapacitance, Com – buňky s komplexním proudovým charakterem, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, K_{IR} – dovnitř usměrněný draselný proud, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Na^+ – sodný proud, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

Tabulka 11 – Změny v amplitudách a hustotách draselných proudů u buněk s pasivním proudovým charakterem a manipulovanou Wnt signální drahou indukované MCAO.

Pas	Tcf7l2			N		
	CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
K_{IR} [pA]	135,10 ± 18,83	113,70 ± 14,28	99,57 ± 17,07	20	15	6
K_{IR}/C_M [pA/pF]	3,01 ± 0,48	6,30 ± 1,94	3,25 ± 0,97	20	15	6
K_{DR} [pA]	140,80 ± 36,57	49,46 ± 21,63	120 ± 31,98	11	7	3
K_{DR}/C_M [pA/pF]	2,66 ± 0,63	2,39 ± 0,89	2,57 ± 0,83	11	7	3

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. (C_M – membránová kapacitance, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, K_{IR} – dovnitř usměrněný draselný proud, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Pas – buňky s pasivním proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

Tabulka 12 – Změny v amplitudách a hustotách draselných a sodných proudů u buněk s ven usměrněným proudovým charakterem a manipulovanou Wnt signální drahou indukované MCAO.

Out	Tcf7l2			N		
	CTRL	D3	D7	CTRL	D3	D7
K _{DR} [pA]	1307	1095 ± 207,10	1202 ± 135,20	1	7	4
K _{DR} /C _M [pA/pF]	51,80	30,90 ± 2,57	74,80 ± 4,44	1	7	4
K _A [pA]	1354	1149 ± 134,50	1262 ± 339,90	1	7	4
K _A /C _M [pA/pF]	53,70	34,91 ± 4,81	82,13 ± 21,05	1	7	4
Na ⁺ [pA]	/	208,50 ± 56,39	69	0	5	1
Na ⁺ /C _M [pA/pF]	/	6,56 ± 2,02	6,80	0	5	1

p<0,05

p<0,01

p<0,001

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. (C_M – membránová kapacitance, CTRL – neoperované myši, D3 – buňky byly izolovány 3 dny po MCAO, D7 – buňky byly izolovány 7 dní po MCAO, K_A – draselný proud A typu, K_{DR} – ven usměrněný draselný proud, MCAO – okluze střední mozkové artérie, N – počet naměřených buněk, Na⁺ – sodný proud, Out – buňky s ven usměrněným proudovým charakterem, S.E.M. – směrodatná odchylka, Tcf7l2 – myši s inhibovanou Wnt signální drahou, Wnt – *Wingless/Int* signální dráha)

6 DISKUZE

NG2 glie jsou známy svým vysokým diferenciačním potenciálem a již dlouhou dobu je záhadou, jak a jestli se tento diferenciační potenciál uplatňuje v regeneraci po poškození mozkové tkáně.

Cílem této práce bylo analyzovat vliv kanonické Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií za fyziologických podmínek a po mozkové ischemii. Výsledky experimentů ukázaly, že diferenciační potenciál NG2 glií je ovlivněn jak mozkovou ischemií, tak inhibicí Wnt signální dráhy.

6.1 NG2 glie po mozkové ischemii diferencují v neuronální prekursor

V několika pracích bylo prokázáno, že NG2 glie jsou po poškození mozkové tkáně schopné diferencovat v oligodendrocyty (Komitova *et al.*, 2011; Barnabe-Heider *et al.*, 2010; Dimou *et al.*, 2008), byla ale také naznačena možnost, že NG2 glie mohou po poškození mozkové tkáně diferencovat v astrocyty nebo neurony (Honsa *et al.*, 2012; Komitova *et al.*, 2011; Honsa *et al.*, 2016). Mnoho dalších studií ale tuto možnost vyvrátilo (Dimou *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2010).

Abychom zjistili vliv mozkové ischemie na diferenciační potenciál NG2 glií, vypočítali jsme incidenci jednotlivých buněčných typů u CT-CTRL, CT-D3 a CT-D7 myši. Výsledkem bylo signifikantní zvýšení poměru neuronů sedm dní po operaci, což značí, že NG2 glie v reakci na poškození mozku ischemií diferencují právě v neuronální prekursor.

V této práci nebyla po mozkové ischemii zaznamenána zvýšená míra diferenciace v astrocyty, což mohlo být způsobeno kratší dobou ponechání buněk v diferenciačním médiu před samotnou analýzou. V našem experimentu byly totiž buňky kultivovány pouze 3 až 4 dny, kdežto v experimentech Honsa *et al.*, 2016, kde byla pozorována diferenciace NG2 glií v astrocyty, byly NG2 glie kultivovány v diferenciačním médiu po dobu 7 dní.

Ani diferenciace v oligodendrocyty nebyla v této práci pozorována, což je v rozporu s několika jinými studiemi (Komitova *et al.*, 2011; Barnabe-Heider *et al.*, 2010; Dimou *et al.*, 2008). Důvodem, proč tomu tak bylo, byla pravděpodobně přítomnost PDGF α faktoru v kultivačním médiu, jelikož bylo prokázáno, že PDGF α zpomaluje zrání oligodendrocytů jak *in vitro*, tak *in vivo* (Bögler *et al.*, 1990; Butt *et al.*, 1997). Jiným důvodem, proč se NG2 glie nediferencovaly v oligodendrocyty, by mohlo být poměrně nedávné zjištění, že oligodendrocyty se v mozkové kůře po poranění mozku obnovují velmi pomalu (Zhu *et al.*, 2011).

Dále jsme pozorovali změny v elektrofyziologických vlastnostech jednotlivých buněčných typů. Poškození mozkové tkáně ischemií nezpůsobilo žádné signifikantní změny v elektrofyziologických vlastnostech buněk s pasivním a ven usměrněným proudovým charakterem. U buněk s komplexním proudovým charakterem došlo ke zvýšení C_M jak tři dny, tak sedm dní po operaci. Dále došlo u těchto buněk k snížení hustoty K_{IR} , jak tři dny, tak sedm dní po operaci, což může vyjadřovat zvýšenou proliferaci těchto buněk. Podobné snížení hustoty K_{IR} bylo pozorováno i při jiných typech zranění mozku, jako například bodná rána nebo globální mozková ischemie (Anderova *et al.*, 2004; Pivonkova *et al.*, 2010). Po třech dnech od

operace jsme dále pozorovali také snížení hustoty K_{DR} a Na^+ proudů. Vysoká hodnota C_M a velmi nízké amplitudy K_{DR} a Na^+ jsou typické pro buňky s pasivním proudovým charakterem, což značí, že nediferencované NG2 glie svými vlastnostmi směřují k těmto buňkám, přestože incidence jednotlivých buněčných typů signifikantní nárůst poměru astrocytů neukázala. Po sedmi dnech od operace jsme zaznamenali také zvýšení amplitudy K_{DR} , což podporuje naši hypotézu, že po sedmi dnech od operace NG2 glie diferencují v neuronální prekursorů.

6.2 Inhibice Wnt signální dráhy způsobila diferenciaci NG2 glií v astrocyty

Wnt signální dráha je naprosto zásadní signální drahou během embryonálního vývoje, ale i během dospělosti ovlivňuje mnoho procesů v CNS. Bylo zjištěno, že tato dráha ovlivňuje také NG2 glie (Rodriguez *et al.*, 2014), přesný mechanismus však doposud není znám.

V našich experimentech jsme pracovali s inhibičním kmenem Tcf712, jenž má zablokovanou expresi proteinu TCF4, který je důležitým transkripčním faktorem pro geny ovlivněné Wnt signální dráhou, jelikož aktivace těchto genů je spuštěna spojením tohoto proteinu v jádře buňky s β -kateninem.

Výsledkem naší práce je, že NG2 glie reagují na inhibici Wnt signální dráhy zvýšenou mírou diferenciaci v astrocyty. Tento závěr je poněkud překvapující, jelikož v jiné studii bylo zjištěno, že inhibice Wnt signální dráhy nemá na NG2 glie ve zdravém mozku žádný vliv a naopak, že aktivace této dráhy způsobuje diferenciaci NG2 glií v astrocyty (Knotek, 2018). Ve zmiňované práci byl ale použit inhibiční kmen CSPG4-CreER^{T2}/Rosa²⁶-tdTomato-Dkk1, u kterého dochází k syntéze proteinu Dickkopf 1 (Dkk1), který následně zablokuje LRP koreceptor pro Fz receptor pro navázání Wnt ligandu. Tento fakt značí, že existuje rozdíl mezi jadernou a nejadernou inhibicí Wnt signální dráhy a celý tento mechanismus bude pravděpodobněji mnohem složitější.

Dále je známo, že inhibice Wnt signální dráhy Aspirinem způsobila diferenciaci NG2 glií v oligodendrocyty jak *in vitro*, tak *in vivo* (Huang *et al.*, 2016). Jak již ale bylo zmíněno výše, v této práci jsme žádnou diferenciaci NG2 glií v oligodendrocyty nepozorovali.

Co se změn elektrofyziologických vlastností týče, jaderná inhibice Wnt signální dráhy způsobila u buněk s komplexním i pasivním proudovým charakterem posun V_M směrem k více záporným hodnotám a snížení I_R , což značí, že inhibice Wnt signální dráhy pravděpodobně ovlivňuje expresi iontových kanálů, které slouží k zachování membránového potenciálu (převážně K_{IR} – viz níže).

Inhibice Wnt signální dráhy také způsobila u buněk s komplexním proudovým charakterem snížení hustoty K_{IR} a K_{DR} a snížení amplitudy K_{DR} proudů, což značí, že i nediferencované NG2 glie mají vlastnosti podobné astrocytům a pravděpodobně bude následovat diferenciaci jejich směrem.

U buněk s pasivním proudovým charakterem inhibice Wnt signální dráhy způsobila pouze snížení hustoty K_{IR} , počet naměřených buněk byl ale velmi malý, a proto není možné dělat z těchto výsledků žádné závěry.

V experimentech na myších s inhibovanou Wnt signální dráhou jsme identifikovali pouze jednu buňku s ven usměrněným proudovým charakterem, proto nebylo možné výsledky dále analyzovat.

6.3 Inhibice Wnt signální dráhy po MCAO vede ke snížení diferenciace NG2 glií

Cílem této práce bylo také zjistit, jak Wnt signální dráha ovlivňuje diferenciaci NG2 glií při regeneraci po poškození mozkové tkáně ischemií. Výsledky ukázaly, že inhibice Wnt signální dráhy sedm dní po operaci vede k signifikantnímu snížení diferenciace NG2 glií v astrocyty a NG2 glie zůstávají převážně ve své nediferencované podobě.

Nebyla pozorována ani diferenciace NG2 glií v neurony, jako tomu bylo u operované kontrolní myši bez manipulace Wnt signální dráhy, což značí, že aktivace této dráhy hraje důležitou roli při diferenciaci NG2 glií v neurony po poškození mozkové tkáně. Tento výsledek podporuje také studie vlivu aktivace Wnt signální dráhy na regeneraci po mozkové ischemii, kde bylo prokázáno, že aktivace Wnt signální dráhy vede po třech dnech od MCAO v diferenciaci v neurony a po sedmi dnech od MCAO v astrocyty (Knotek, 2018) nebo studie, kde bylo prokázáno, že po aktivaci Wnt signální dráhy po mozkové ischemii dochází v subventrikulární zóně a striatu k neurogenezi (Shruster *et al.*, 2012).

U buněk s komplexním a pasivním proudovým charakterem došlo jak tři dny, tak sedm dní po MCAO k snížení V_M a zvýšení IR. Tato změna byla pravděpodobně způsobena zvýšením hustoty a amplitudy K_{IR} (viz níže), které jsou u NG2 glií a astrocytů nejdůležitějším typem proudu ovlivňující membránový potenciál a jejich velikost je ovlivněna MCAO (Song *et al.*, 2018).

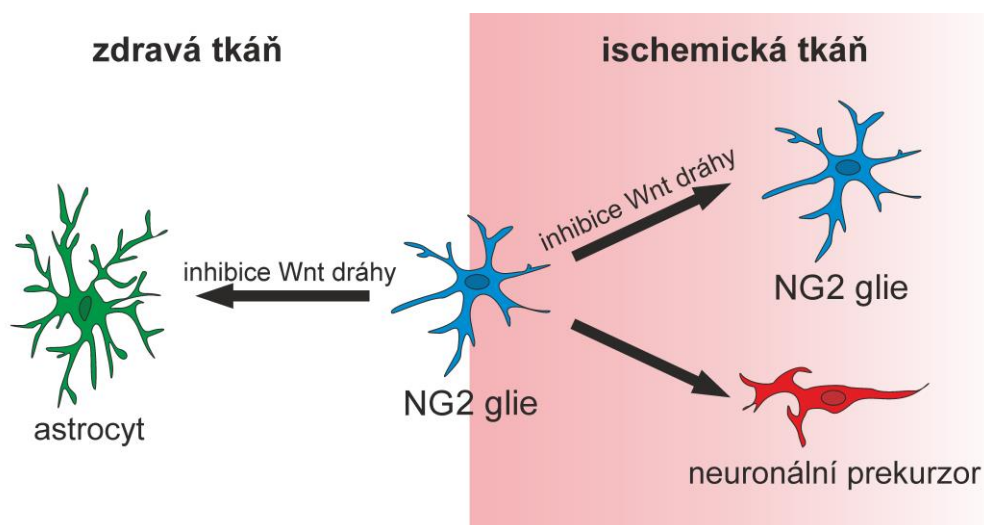
Tři dny po MCAO došlo vlivem inhibice Wnt signální dráhy u buněk s komplexním proudovým charakterem ke snížení amplitudy a hustoty Na^+ proudu. Bylo prokázáno, že zvýšení amplitudy a hustoty Na^+ proudů u NG2 glií vede k posunu V_M směrem k více kladným hodnotám a snížení proliferace těchto buněk (Knutson *et al.*, 1997). Snížení amplitudy a hustoty těchto proudů by tedy mělo vést ke zvýšení V_M , což jsme v této práci nepozorovali. Tento fakt ale mohl být způsoben tím, že existují dvě skupiny NG2 glií – ty, u kterých můžeme detekovat sodné proudy a ty, u kterých ne (Xie *et al.*, 2007). A právě tato druhá skupina buněk mohla převažovat a celkově snížit membránový potenciál NG2 glií, což následně mohlo způsobit to, že byla potlačena diferenciace buněk na úkor proliferace a nepozorovali jsme tak diferenciaci v astrocyty nebo neurony.

Sedm dní po MCAO došlo u buněk s komplexním proudovým charakterem také ke zvýšení hustoty a amplitudy K_{IR} a K_{DR} . Zvýšení těchto hodnot je poněkud protichůdné a značí to vysokou komplexitu vlivu MCAO na NG2 glie. Zároveň je ale toto zjištění v souladu s tím, že jsme pozorovali vysoký poměr nediferencovaných NG2 glií, které mohly mít různé vlastnosti.

U buněk s ven usměrněným proudovým charakterem došlo ke zvýšení hustoty K_{DR} sedm dní po MCAO. V experimentech bylo ale naměřeno jen velmi málo buněk s pasivním a ven usměrněným proudovým charakterem, a proto není možné prokázat, zda má MCAO a inhibice Wnt signální dráhy na elektrofyziologické vlastnosti těchto buněk nějaký vliv.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit vliv manipulace Wnt signální dráhy na diferenciační potenciál NG2 glií a jejich elektrofyziologické vlastnosti za fyziologických podmínek a po mozkové ischemii. Výsledky práce ukázaly, že NG2 glie v reakci na mozkovou ischemii diferencovaly převážně v neuronální prekurzory. Naopak jaderná inhibice Wnt signální dráhy vedla za fyziologických podmínek k diferenciaci NG2 glií v astrocyty. Tato inhibice Wnt signální dráhy po mozkové ischemii vedla k snížení diferenciaci NG2 glií, které zůstaly převážně ve své nediferencované podobě. Inhibice Wnt signální dráhy a mozková ischemie taky prokázaly významný vliv na různé elektrofyziologické vlastnosti NG2 glií (Obrázek 22).



Obrázek 22 – NG2 glie se po ischemickém poškození mozku diferencují v neurony, po inhibici Wnt signální dráhy ve zdravém mozku v astrocyty. Kombinace mozkové ischemie a inhibice Wnt signální dráhy vedla k celkovému snížení diferenciaci NG2 glií.

8 POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

8.1 Literatura

ASCHNER M. (2000) Neuron–astrocyte interactions: implications for cellular energetics and antioxidant levels. *Neurotoxicology* 21, 1101–1107

AMBLER Z, BEDNAŘÍK E, RŮŽIČKA E. (2010) *Klinická neurologie*. Praha: Triton.

ANDĚROVÁ M, ANTONOVA T, PETŘÍK, NEPRAŠOVÁ H, CHVÁTAL A, SYKOVÁ E. (2004). Voltage-dependent potassium currents in hypertrophied rat astrocytes after a cortical stab wound. *Glia* 48(4), 311-326

ANDEROVA M, VORISEK I, PIVONKOVA H, BENESOVA J, VARGOVA L, CICANIC M, CHVATAL A, SYKOVA E. (2011) Cell Death/Proliferation and Alterations in Glial Morphology Contribute to Changes in Diffusivity in the Rat Hippocampus after Hypoxia—Ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 31(3), 894-907

BARDEHLE S, KRÜGER M, BUGGENTHIN F *et al.* (2013) Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience* 16(5), 580-586

BARNABÉ-HEIDER F, GÖRITZ C, SABELSTRÖM H, TAKEBAYASHI H, PFRIEGER FW, MELETIS K, FRISÉN J. (2010) Origin of New Glial Cells in Intact and Injured Adult Spinal Cord. *Cell Stem Cell* 7(4), 470-482

BELACHEW S, CHITTAJALLU R, AGUIRRE AA, YUAN X, KIRBY M, ANDERSON S, GALLO V. (2003) Postnatal NG2 proteoglycan–expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *The Journal of Cell Biology* 161(1), 169-186

BELLOT-SAEZ A, KÉKESI O, MORLEY JW, BUSKILA Y. (2017) Astrocytic modulation of neuronal excitability through K spatial buffering. *Neuroscience and behavioral reviews* 77, 87-97

BOGLER O, WREN D, BARNETT SC, LAND H, NOBLE M. (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(16), 6368-6372

BRADL M, LASSMANN H. (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119(1), 37-53

BUFFO A, VOSKO MR, ERTURK D, HAMANN GF, JUCKER M, ROWITCH D, GOTZ M. (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(50), 18183-18188

- BUTT AM, IBRAHIM M, BERRY M. (1997) The relationship between developing oligodendrocyte units and maturing axons during myelinogenesis in the anterior medullary velum of neonatal rats. *Journal of Neurocytology* 26(5), 327–338
- CAHOY JD, EMERY B, KAUSHAL A *et al.* (2008) A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *Journal of Neuroscience* 28(1), 264-278
- CAPLAN LR. (2009) Caplan's stroke: a clinical approach. 4th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders
- CLARKE LE, YOUNG KM, HAMILTON NB, LI H, RICHARDSON WD, ATTWELL D. (2012) Properties and Fate of Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Corpus Callosum, Motor Cortex, and Piriform Cortex of the Mouse. *Journal of Neuroscience* 32(24), 8173-8185
- CERPA W, GAMBRILL A, INESTROSA NC, *et al.* (2011) Regulation of NMDA-Receptor Synaptic Transmission by Wnt Signaling: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Journal of Neuroscience* 31(26), 9466-9471
- CLEVERS H. (2006) Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127(3), 469-480
- CUADROS MA, NAVASCUÉS J. (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Progress in Neurobiology* 56(2), 173-189
- CUITINO L., GODOY JA, FARIAS GG, COUVE A, BONANSKO C, FUENZALIDA M, INESTROSA NC. (2010) Wnt-5a Modulates Recycling of Functional GABAA Receptors on Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience* 30(25), 8411-8420
- DAVIS EJ, FOSTER TD, THOMAS WE. (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Research Bulletin* 34(1), 73-78
- DAWSON M. (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24(2), 476-488
- DE A. (2011) Wnt/Ca² signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43(10), 745-756
- DE BIASE LM, NISHIYAMA A, BERGLES DE. (2010) Excitability and Synaptic Communication within the Oligodendrocyte Lineage. *Journal of Neuroscience* 30(10), 3600-3611
- DE FERRARI GV, PAPASSOTIROPOULOS A, BIECHELE T, *et al.* (2007) Common genetic variation within the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(22), 9434-9439

- DEL ZOPPO GJ, MILNER R, MABUCHI T, HUNG S, WANG X, BERG GI, KOZIOL JA. (2007) Microglial Activation and Matrix Protease Generation During Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 38(2), 646-651
- DEMETRIUS LA, MAGISTRETTI PJ, PELLERIN L. (2014) Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Frontiers in Physiology* 5(522)
- DIMOU L, GALLO V. (2015) NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 63(8), 1429-1451
- DIMOU L, SIMON C, KIRCHHOFF F, TAKEBAYASHI H, GOTZ M. (2008) Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* 28(41), 10434-10442
- DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ MA. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22(9), 391-397
- DJUKIC B, CASPER KB, PHILPOT BD, CHIN LS, MCCARTHY KD. (2007) Conditional Knock-Out of Kir4.1 Leads to Glial Membrane Depolarization, Inhibition of Potassium and Glutamate Uptake, and Enhanced Short-Term Synaptic Potentiation. *Journal of Neuroscience* 27(42), 11354-11365
- DOYLE KP, SIMON RP, STENZEL-POORE MP. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55(3), 310-318
- ELLISON JA, DE VELLIS J. (1994) Platelet-derived growth factor receptor is expressed by cells in the early oligodendrocyte lineage. *Journal of Neuroscience Research* 37(1), 116-128
- EUGENIN-VON BERNHARDI J, DIMOU L. (2016) NG2-glia, More Than Progenitor Cells. *Glial Cells in Health and Disease of the CNS* 27-45
- FERRINI F, DE KONINCK Y. (2013) Microglia Control Neuronal Network Excitability via BDNF Signalling. *Neural Plasticity* (4), 1-11
- FOLBERGROVA J, ZHAO Q, KATSURA K, SIESJO BK. (1995) N-tert-butyl-alpha-phenylnitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(11), 5057-5061
- GALLO V, MANGIN JM, KUKLEY M, DIETRICH D. (2008) Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions? *The Journal of Physiology*. 586(16), 3767-3781
- GE WP, ZHOU W, LUO Q, JAN LY, JAN YN. (2009) Dividing glial cells maintain differentiated properties including complex morphology and functional synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(1), 328-333

- GUO F, MAEDA Y, MA J, XU J, HORIUCHI M, MIERS L, VACCARINO F, PLEASURE D. (2010) Pyramidal Neurons Are Generated from Oligodendroglial Progenitor Cells in Adult Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience* 30(36), 12036-12049
- HALL A, GIESE NA, RICHARDSON WD. (1996) Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* (122), 4085-4094
- HALL AC, LUCAS FR, SALINAS PC. (2000) Axonal Remodeling and Synaptic Differentiation in the Cerebellum Is Regulated by WNT-7a Signaling. *Cell* 100(5), 525-535
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 391(2), 85–100
- HART IK, RICHARDSON WD, HELDIN CH, WESTERMARK B, RAFT MC. (1989) PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Developmental Biology* 105(3), 595-603
- HEINRICH C, BERGAMI M, GASCÓN S, *et al.* (2014) Sox2-Mediated Conversion of NG2 Glia into Induced Neurons in the Injured Adult Cerebral Cortex. *Stem Cell Reports*. 2014, 3(6), 1000-1014
- HE X. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 131(8), 1663-1677
- HONSA P, PIVONKOVA H, DZAMBA D, FILIPOVA M, ANDEROVA M, STRACK S. (2012) Polydendrocytes Display Large Lineage Plasticity following Focal Cerebral Ischemia. *PLoS ONE*. 7(5), 894–907
- HONSA P, VALNY M, KRISKA J, *et al.* (2016) Generation of reactive astrocytes from NG2 cells is regulated by sonic hedgehog. *Glia* 64(9), 1518-1531
- HOPKINS SJ, ROTHWELL NJ. (1995) Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in Neurosciences* 18(2), 83-88
- HSU CY. (1998) Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development. St. Louis
- HUANG N, CHEN D, WU X, CHEN X, ZHANG X, NIU J, SHEN HY, XIAO L. (2016) Aspirin Promotes Oligodendroglial Differentiation Through Inhibition of Wnt Signaling Pathway. *Molecular Neurobiology* 53(5), 3258-3266
- HUANG W, ZHAO N, BAI X, KARRAM K, TROTTER J, GOEBBELS S, SCHELLER A, KIRCHHOFF F. (2014) Novel NG2-CreERT2 knock-in mice demonstrate heterogeneous differentiation potential of NG2 glia during development. *Glia* 62(6), 896-913

- HUGHES EG, KANG SH, FUKAYA M, BERGLES DE. (2013) Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Neuroscience* 16(6), 668-676
- CHEN ZJ, NEGRA M, LEVINE A, UGHRIN Y, LEVINE JM. (2002) Oligodendrocyte precursor cells: Reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *Journal of neurocytology* 31(6-7), 481-495
- CHITTAJALLU R., AGUIRRE A, GALLO V. (2004) NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *The Journal of Physiology* 561(1), 109-122
- IADECOLA C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in Neurosciences*. 20(3), 132-139
- JANG MH, BONAGUIDI MA, KITABATAKE Y, *et al.* Portrait of glial scar in neurological diseases: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Cell Stem Cell*. 2013, 12(2), 869-881
- JÄKEL S, DIMOU L. (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11(24)
- KAGER S. (1997) Ischemic Stroke: From Basic Mechanism to New Drug Development. *Frontiers of Neurology and Neuroscience* 16
- KAILA K, RANSOM BR. (1998) *PH and brain function*. New York: Wiley-Liss
- KALITA Z. (2006). Akutní cévní mozkové příhody: diagnostika, patofyziologie, management. Praha: Maxdorf. Jessenius.
- KANG SH, FUKAYA M, YANG JK, ROTHSTEIN JD, BERGLES DE. (2010) NG2 CNS Glial Progenitors Remain Committed to the Oligodendrocyte Lineage in Postnatal Life and following Neurodegeneration. *Neuron* 68(4), 668-681
- KAWABORI M, YENARI M. (2015) Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Current Medicinal Chemistry* 22(10), 1258-1277
- KEIRSTEAD HS, BLAKEMORE W, LEVINE JM. (1998) Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (Defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia* 22(2), 1601-170
- KESSARIS N, FOGARTY M, IANNARELLI P, GRIST M, WEGNER M, RICHARDSON WD. (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience* 9(2), 173-179
- KIMELBERG HK, STIEG PE, MAZURKIEWICZ JE, WAAGEPETERSEN HS, MCKENNA MC. (1982) Immunocytochemical and Biochemical Analysis of Carbonic

- Anhydrase in Primary Astrocyte Cultures from Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 39(3), 734-742
- KIMELBERG HK, NEDERGAARD M. (2010) Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7(4), 338-353
- KNOTEK T. (2018) The effect of the canonical Wnt signalling pathway on the differentiation of polydendrocytes after ischemic injury, diplomová práce
- KNUTSON P, GHIANI CA, ZHOU JM, GALLO V, MCBAIN CJ. (1997) K Channel Expression and Cell Proliferation Are Regulated by Intracellular Sodium and Membrane Depolarization in Oligodendrocyte Progenitor Cells. *The Journal of Neuroscience* 17(8), 2669-2682
- KOHN AD, MOON RT. (2005) Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38(3-4), 439-446
- KOMITOVA M, SERWANSKI DR, LU QR, NISHIYAMA A. (2011) NG2 cells are not a major source of reactive astrocytes after neocortical stab wound injury. *Glia* 59(5), 800-809
- KOMITOVA M, ZHU X, SERWANSKI DR, NISHIYAMA A. (2009) NG2 cells are distinct from neurogenic cells in the postnatal mouse subventricular zone. *The Journal of Comparative Neurology* 512(5), 702-716
- KOMIYA Y, HABAS R. (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4(2), 68-75
- KRISKA J, HONSA P, DZAMBA D, *et al.* (2016) Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Brain Research* 1651(2), 83-88
- LASIENE J, MATSUI A, SAWA Y, WONG F, HORNER PJ. (2009) Age-related myelin dynamics revealed by increased oligodendrogenesis and short internodes. *Aging Cell* 8(2), 201-213
- LEE JM, GRABB MC, ZIPFEL GJ, CHOI DW. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *Journal of Clinical Investigation* 106(6), 723-731
- LEE Y, MORRISON BM, LI Y, *et al.* (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487(7408), 443-448
- LEVINE JM. (1994) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *The Journal of Neuroscience* 14(8), 4716-4730
- LIGON KL, KESARI S, KITADA M, *et al.* (2006) Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(20), 7853-7858

- LIU B. (2006) Ischemic Insults Direct Glutamate Receptor Subunit 2-Lacking AMPA Receptors to Synaptic Sites. *Journal of Neuroscience* 26(20), 5309-5319
- MACDONALD BT, TAMAI K, HE X. (2009) Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 17(1), 9-26.
- MAGISTRETTI PJ. (2009) Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90(3), 875S-880S
- MAO Y, GE X, FRANK CL, *et al.* (2009) Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3 β / β -Catenin Signaling. *Cell* 136(6), 1017-1031
- MARÍN-TEVA JL, CUADROS MA, MARTÍN-OLIVA D, NAVASCUÉS J. (2011) Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biology* 7(01), 25-40
- MENN B, GARCIA-VERDUGO JM, YASCHINE C, GONZALEZ-PEREZ O, ROWITCH D, ALVAREZ-BUYLLA A. (2006) Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *Journal of Neuroscience* 26(30), 7907-7918
- MINK JW, BLUMENSCHINE RJ, ADAMS DB. (1981) Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 241(3), R203-R212
- MLODZIK M. (2002) Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation?. *Trends in Genetics* 18(11), 564-571
- NAKATSUJI Y, MILLER RH. (2001) Density dependent modulation of cell cycle protein expression in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 66(3), 487-496
- NICHOLLS JG. (2013) Od neuronu k mozku. Praha: Academia
- NISHIYAMA A, KOMITOVA M, SUZUKI R, ZHU X. (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 10(1), 9-22
- NUNES MC, ROY NS, KEYOUNG HM, *et al.* (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nature Medicine* 9(4), 439-447
- OHORI Y, YAMAMOTO S, NAGAO M, SUGIMORI M, YAMAMOTO N, NAKAMURA K, NAKAFUKU M. (2006) Growth Factor Treatment and Genetic Manipulation Stimulate Neurogenesis and Oligodendrogenesis by Endogenous Neural Progenitors in the Injured Adult Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* 26(46), 11948-11960
- OLNEY JW. (1969) Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science* 164(3880), 719-721

- OZERDEM U, GRAKO KA, DAHLIN-HUPPE K, MONOSOV E, STALLCUP WB. (2001) NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics* 222(2), 218-227
- PANICKAR KS, NOREMBERG MD. (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. *Glia* 50(4), 287-298
- PAOLICELLI RC, BOLASCO G, PAGANI F, *et al.* (2011) Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333(6048), 1456-1458
- PENG PL, ZHONG X, TU W, *et al.* (2006) ADAR2-Dependent RNA Editing of AMPA Receptor Subunit GluR2 Determines Vulnerability of Neurons in Forebrain Ischemia. *Neuron*. 2006, 49(5), 719-733
- PIVONKOVA H, BENESOVA J, BUTENKO O, CHVATAL A, ANDEROVA M. (2010) Impact of global cerebral ischemia on K channel expression and membrane properties of glial cells in the rat hippocampus. *Neurochemistry International* 57(7), 783-794
- PRAJEROVA I, HONSA P, CHVATAL A, ANDEROVA M. (2010) Distinct effects of Sonic hedgehog and Wnt-7a on differentiation of neonatal neural stem/progenitor cells in vitro. *Neuroscience* 171(3), 693-711
- PRASS K, MEISEL C, HÖFLICH C, *et al.* (2003) Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1-like Immunostimulation. *The Journal of Experimental Medicine* 198(5), 725-736
- PSACHOULIA K, JAMEN F, YOUNG KM, RICHARDSON WD. (2009) Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biology* 5(3-4), 57-67
- RAFF MC, MILLER RH, NOBLE M. (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303(5916), 390-396
- REGAN MR, HUANG YH, KIM YS, DYKES-HOBERG MI, JIN L, WATKINS AM, BERGLES DE, ROTHSTEIN JD. (2007) Variations in Promoter Activity Reveal a Differential Expression and Physiology of Glutamate Transporters by Glia in the Developing and Mature CNS. *Journal of Neuroscience* 27(25), 6607-6619
- RHODES KE, MOON LDF, FAWCETT JW. (2003) Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience* 120(1), 41-56
- RIJSEWIJK F, SCHUERMANN M, WAGENAAR E, PARREN P, WEIGEL D, NUSSE R. (1987) The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*. 50(4), 649-657

- RIVERS LE, YOUNG KM, RIZZI M, JAMEN F, PSACHOULIA K, WADE A, KESSARIS N, RICHARDSON WD. (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nature Neuroscience* 11(12), 1392-1401
- ROBINS SC, TRUDEL E, ROTONDI O, *et al.* (2013) Evidence for NG2-glia Derived, Adult-Born Functional Neurons in the Hypothalamus. *PLoS ONE* 8(10).
- RODRIGUEZ JP, COULTER M, MIOTKE J, MEYER RL, TAKEMARU KI, LEVINE LM. (2014) Abrogation of – Catenin Signaling in Oligodendrocyte Precursor Cells Reduces Glial Scarring and Promotes Axon Regeneration after CNS Injury. *Journal of Neuroscience* 34(31), 10285-10297
- SÁNCHEZ-CAMACHO C, BOVOLENTA P. (2009) Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *BioEssays* 31(10), 1013-1025
- SCHOUSBOE A, SCAFIDI S, BAK LK, WAAGEPETERSEN HS, MCKENNA MC. (2014) Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain* 11, 13-30
- SEIFERT JRK, MLODZIK M. (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature Reviews Genetics* 8(2), 126-138
- SHRUSTER A, BEN-ZUR T, MELAMED E, OFFEN D, ARAI K. (2012) Wnt Signaling Enhances Neurogenesis and Improves Neurological Function after Focal Ischemic Injury. *PLoS ONE* 7(7)
- SCHULTE G, BRYJA V. (2007) The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 28(10), 518-525
- SIMON C, GÖTZ M, DIMOU L. (2011) Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59(6), 869-881
- SIMONS M, TRAJKOVIC K. (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science* 119(21), 4381-4389
- SNAIDERO N, SIMONS M. (2014) Myelination at a glance. *Journal of Cell Science* 127(14), 2999-3004
- SONG F, HONG X, CAO J, *et al.* (2018) Kir4.1 channels in NG2-glia play a role in development, potassium signaling, and ischemia-related myelin loss. *Communications Biology* 1(1)
- ŞOVREA A, BOŞCA A. (2013) Astrocytes reassessment – an evolving concept part one: embryology, biology, morphology and reactivity. *Journal of Molecular Psychiatry* 1(1)
- STALLCUP WB. (1981) The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Developmental Biology* 83(1), 154-65

- SUGIMURA R, LI L. (2010) Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 90(4), 243-256
- TABATA H. (2015) Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in Neuroscience* 9(114)
- TAN AM, ZHANG W, LEVINE JM. (2005) NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *Journal of Anatomy* 207(6), 717-725
- TRIPATHI RB, RIVERS LE, YOUNG KM, JAMEN F, RICHARDSON WD. (2010) NG2 Glia Generate New Oligodendrocytes But Few Astrocytes in a Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Demyelinating Disease. *Journal of Neuroscience* 30(48)
- VALENTA T, HAUSMANN G, BASLER K. (2012) The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal* 31(12), 2714-2736
- VARELA-NALLAR L, ALFARO IE, SERRANO FG, PARODI J, INESTROSA NC, INESTROSA NC. (2010) Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(49), 21164-21169
- VASILE F, DOSSI E, ROUACH N. (2017) Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function* 222(5), 2017-2029
- WAKE H, FIELDS RD. (2011) Physiological function of microglia. *Neuron Glia Biology* 7(01), 1-3
- WANG H, SONG G, CHUANG H, *et al.* (2018) Portrait of glial scar in neurological diseases: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 31(6), 869-881
- WANG Y, NATHANS J. (2007) Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134(4), 647-658
- WISNIEWSKA MB, NAGALSKI A, DABROWSKI M, MISZTAL K, KUZNICKI J. (2012) Novel β -catenin target genes identified in thalamic neurons encode modulators of neuronal excitability. *BMC Genomics* 13(1), 635
- XIE M, LYNCH DT, SCHOOLS GP, FEUSTEL PJ, KIMELBERG HK, ZHOU M. (2007) Sodium channel currents in rat hippocampal NG2 glia: Characterization and contribution to resting membrane potential. *Neuroscience* 150(4), 853-862
- XING YL, ROTH PT, STRATTON JAS, *et al.* (2014) Adult Neural Precursor Cells from the Subventricular Zone Contribute Significantly to Oligodendrocyte Regeneration and Remyelination. *Journal of Neuroscience* 34(42), 14128-14146

- YADAVILLI S, HWANG EI, PACKER RJ, NAZARIAN J. (2016) The Role of NG2 Proteoglycan in Glioma. *Translational Oncology* 9(1), 57-63
- YANG Z. (2006) NG2 Glial Cells Provide a Favorable Substrate for Growing Axons. *Journal of Neuroscience* 26(14), 3829-3839
- YI H, HU J, QIAN J, HACKAM AS. (2012) Expression of brain-derived neurotrophic factor is regulated by the Wnt signaling pathway. *NeuroReport* 23(3), 189-194
- YOST C, TORRES M, MILLER JR, HUANG E, KIMELMAN D, MOON RT. (1996) *The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3.* 10(12), 1443-1454
- ZAWADZKA M, RIVERS LE, FANCY SPJ, *et al.* (2010) CNS-Resident Glial Progenitor/Stem Cells Produce Schwann Cells as well as Oligodendrocytes during Repair of CNS Demyelination. *Cell Stem Cell* 6(6), 578-590
- ZENG L, FAGOTTO F, ZHANG T, *et al.* (1997) The Mouse Fused Locus Encodes Axin, an Inhibitor of the Wnt Signaling Pathway That Regulates Embryonic Axis Formation. *Cell* 90(1), 181-192
- ZHANG R, CHOPP M, ZHANG ZG. (2013) Oligodendrogenesis after cerebral ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(201)
- ZHANG Y, CHEN K, SLOAN SA, *et al.* (2014) An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* 34(36), 11929-11947
- ZHU X, BERGLES DE, NISHIYAMA A. (2008) NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135(1), 145-157
- ZHU X, HILL RA, DIETRICH D, KOMITOVA M, SUZUKI R, NISHIYAMA A. (2011) Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development* 138(4), 745-753
- ZHU X, ZUO H, MAHER BJ, SERWANSKI DR, LOTURCO JJ, LU QR, NISHIYAMA A. (2012) Olig2-dependent developmental fate switch of NG2 cells. *Development* 139(13), 2299-2307

8.2 Internetové zdroje

- WHO. (2016) The Atlas of Heart Disease and Stroke. *World Health Organization*. Dostupné z: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/ (12. 2. 2019)
- CMP. (2015) Cévní mozková příhoda. *Sdružení CMP*. Dostupné z <http://www.sdruzenicmp.cz/novinky/cevni-mozkova-prihoda> (12. 2. 2019)

8.3 Zdroje převzatých obrázků

Obrázek 1 - DEMETRIUS LA, MAGISTRETTI PJ, PELLERIN L. (2014) Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Frontiers in Physiology* 5(522)

Obrázek 2 a 3 - EUGENIN-VON BERNHARDI J, DIMOU L. (2016) NG2-glia, More Than Progenitor Cells. *Glial Cells in Health and Disease of the CNS* 27-45.

Obrázek 4 – HONSA P (2015). Adult neurogenesis and gliogenesis after ischemic brain injury

Obrázek 5, 6 a 7 - KOMIYA Y, HABAS R. (2014) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4(2), 68-75

Obrázek 11 - HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 391(2), 85–100

Všechny ostatní obrázky v práci jsou vlastní tvorbou autorky.