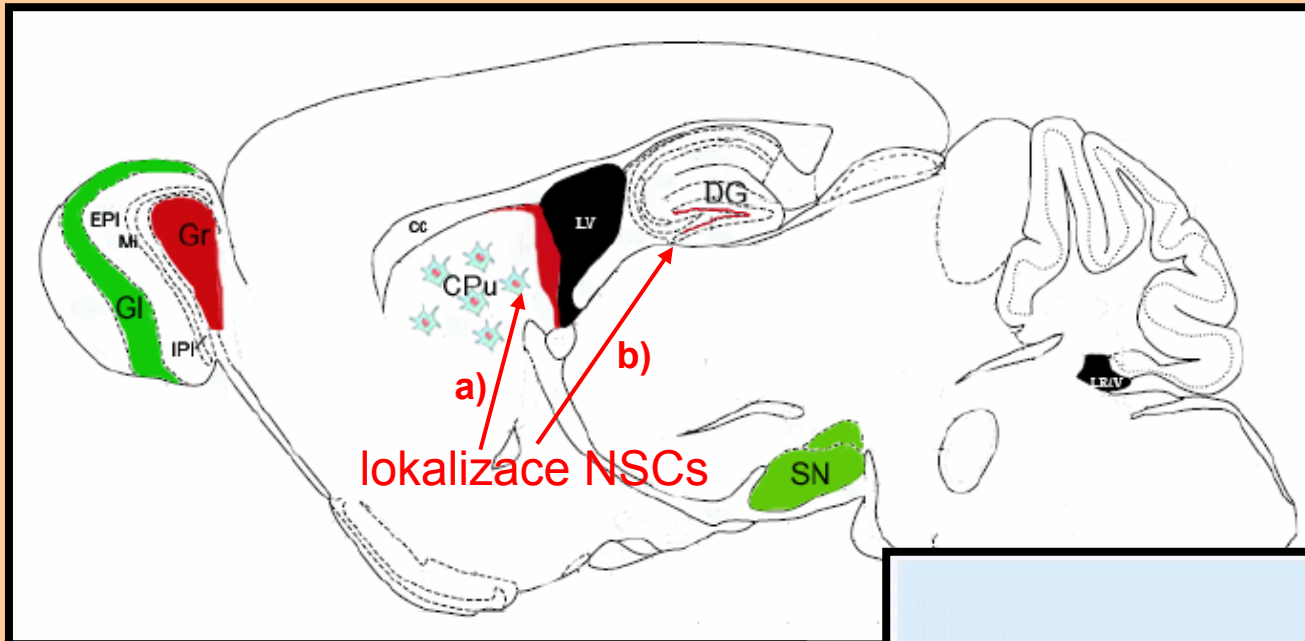
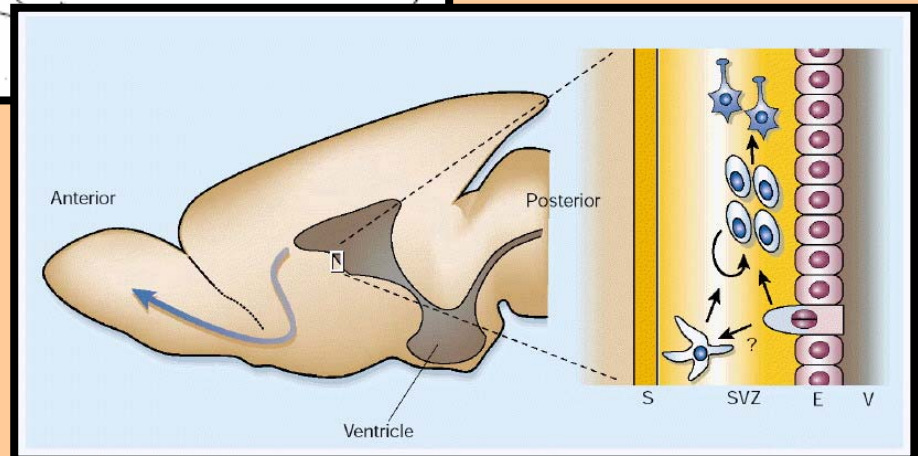


Neurální kmenové buňky – NSCs (Neural stem cells)



GI – glomerulární vrstva
 Gr – granulární vrstva
 EPI – vnější plexiformní vrstva
 Mi – vrstva mitral buněk
 IPL – vnitřní plexiformní vrstva
 cc - corpus callosum
 LV - lateral ventricle
 CPu - caudate putamen (striatum)
 DG - dentate gyrus
 SN - substantia nigra

a) subventrikulární zóna (SVZ), postranní komory
b) subgranulární zóna DG

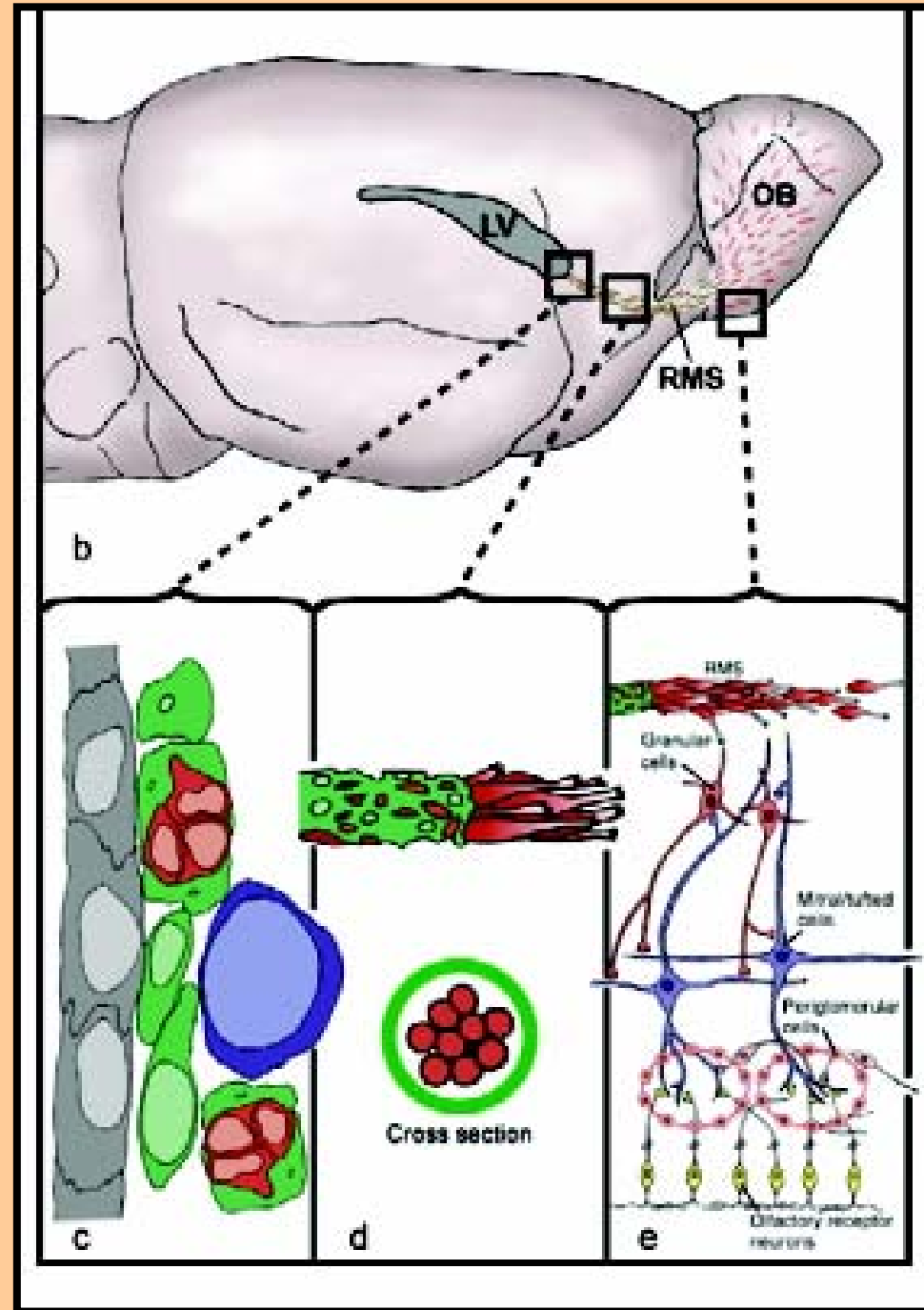
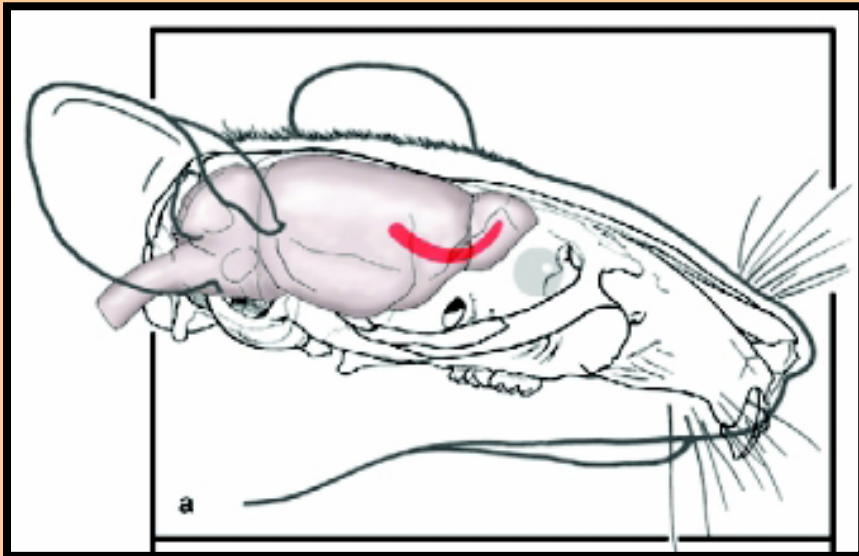


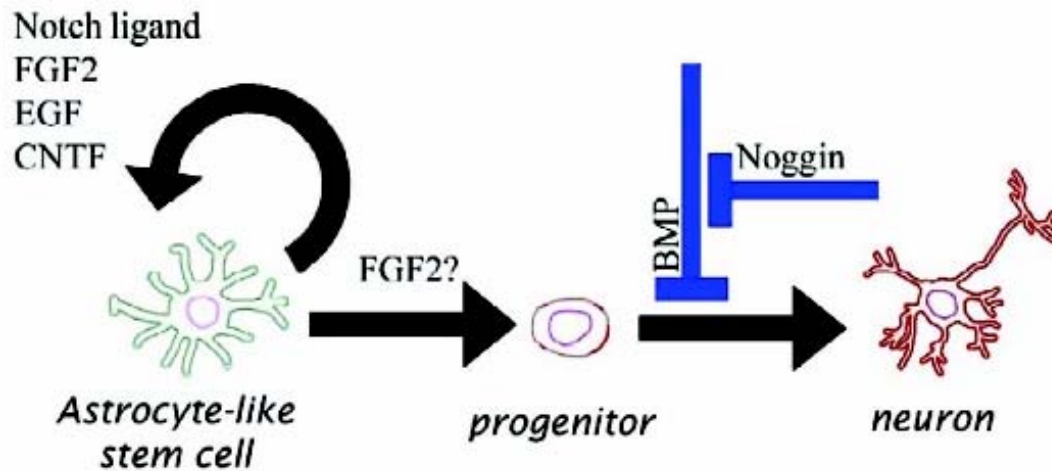
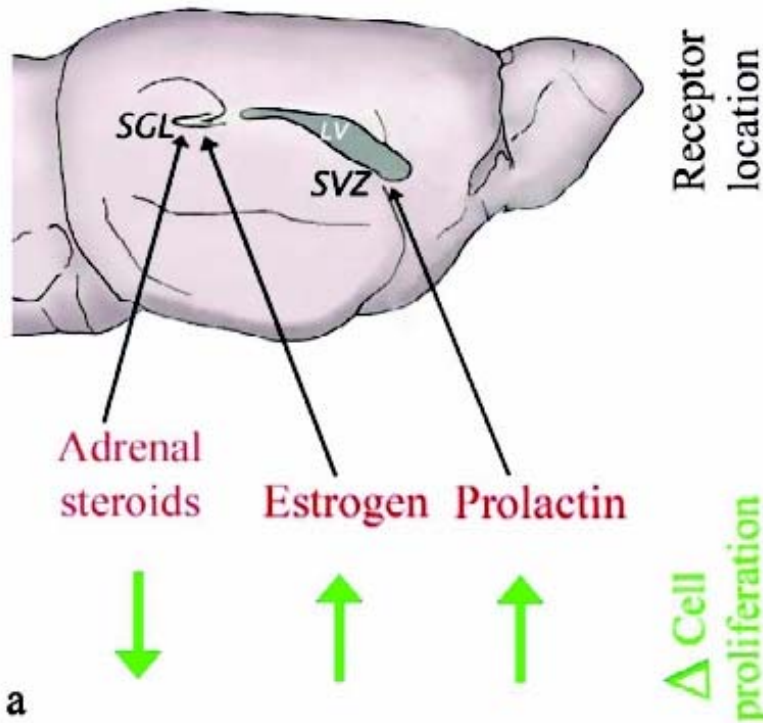
Neurogeneze v dospělosti!

(hlodavci (savci obecně??), zpěvní ptáci)

- ❖ neurogeneze v důsledku březosti ♀
- ❖ neurogeneze v době vábení ♂
- ❖ neurogeneze regulovaná hormony

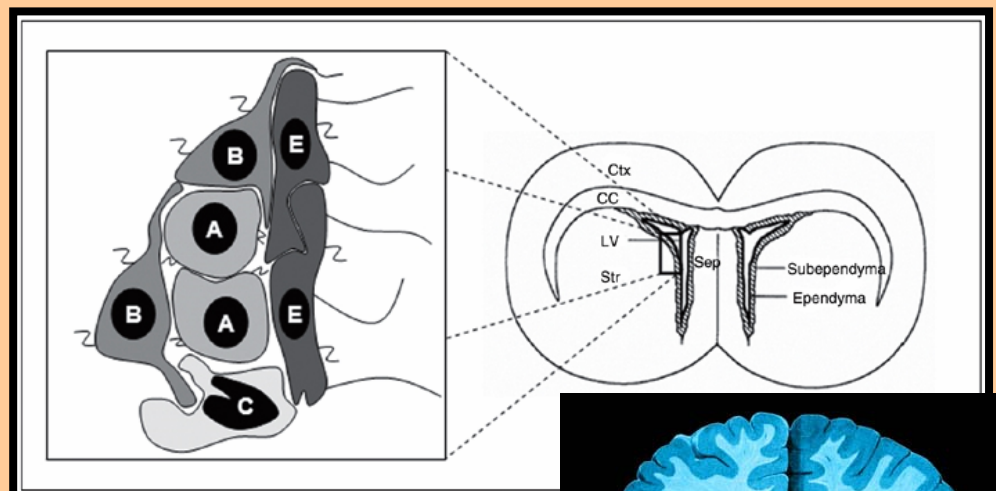
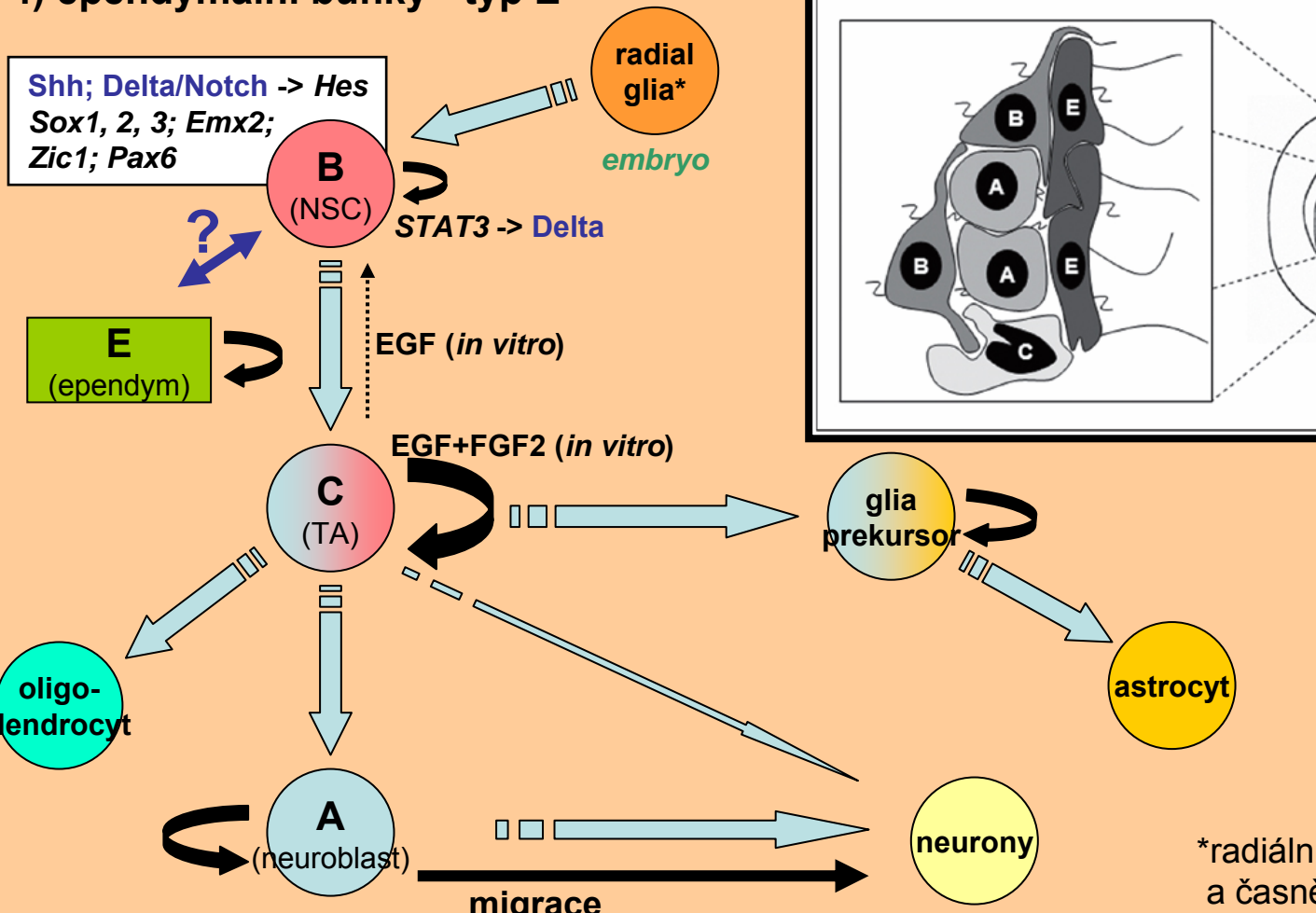
RMS – rostrální migrační tok
(rostral migratory stream)





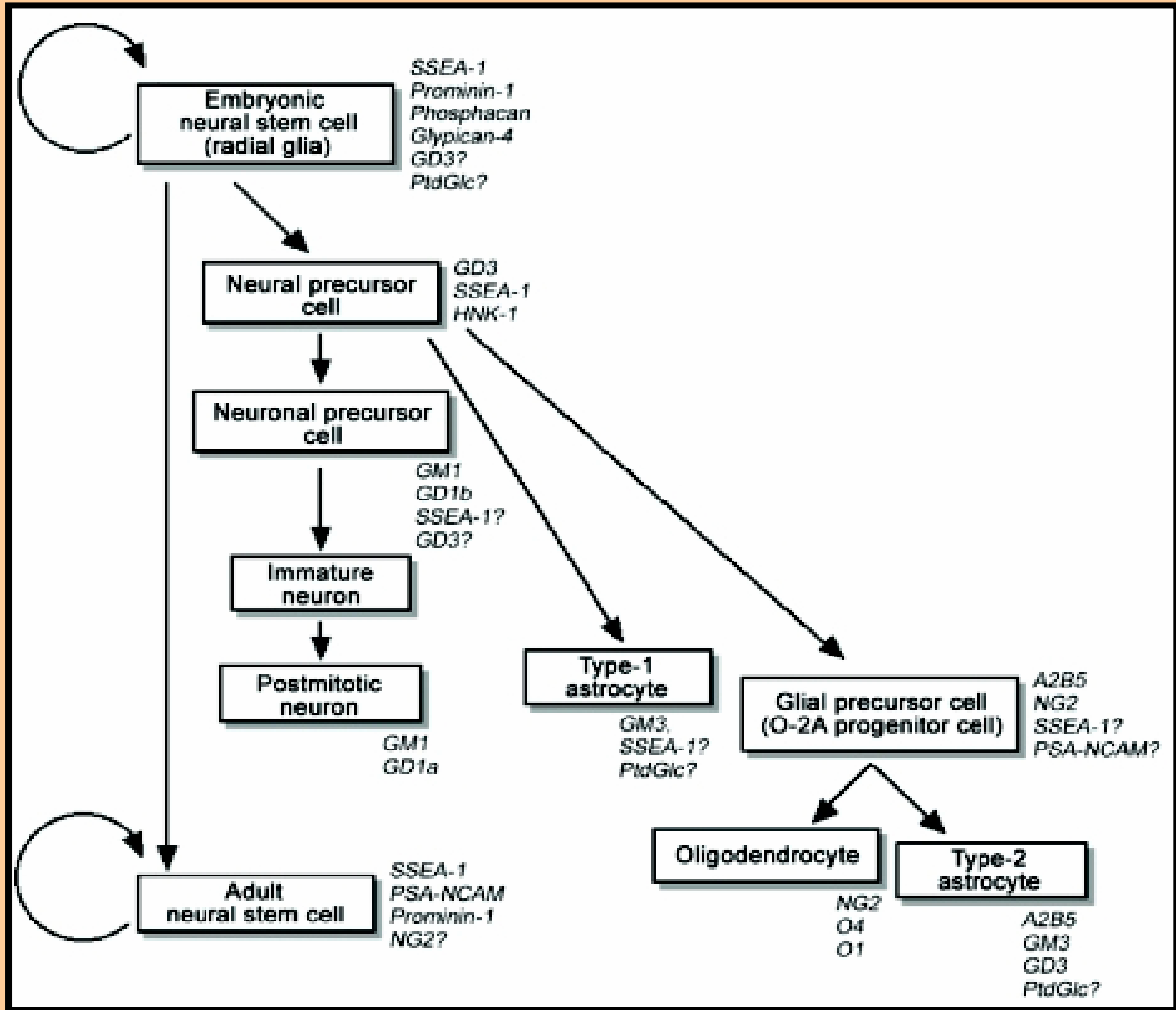
Oblast s NSCs obsahuje čtyři typy buněk

- 1) pomalu proliferující, astrocytům podobné (GFAP⁺/nestin⁺/SSEA1⁺/CD133⁺) buňky - typ B = NSCs (přesný fenotyp není dosud úplně objasněn - ±GFAP??, ± nestin ??)
- 2) spící, případě potřeby intenzivně proliferující buňky vzniklé z buněk B - typ C (TA progenitory, přechodně/transientně se dělící progenitory)
- 3) z buněk typu C vznikají buňky A = neuroblasty
- 4) ependymální buňky - typ E

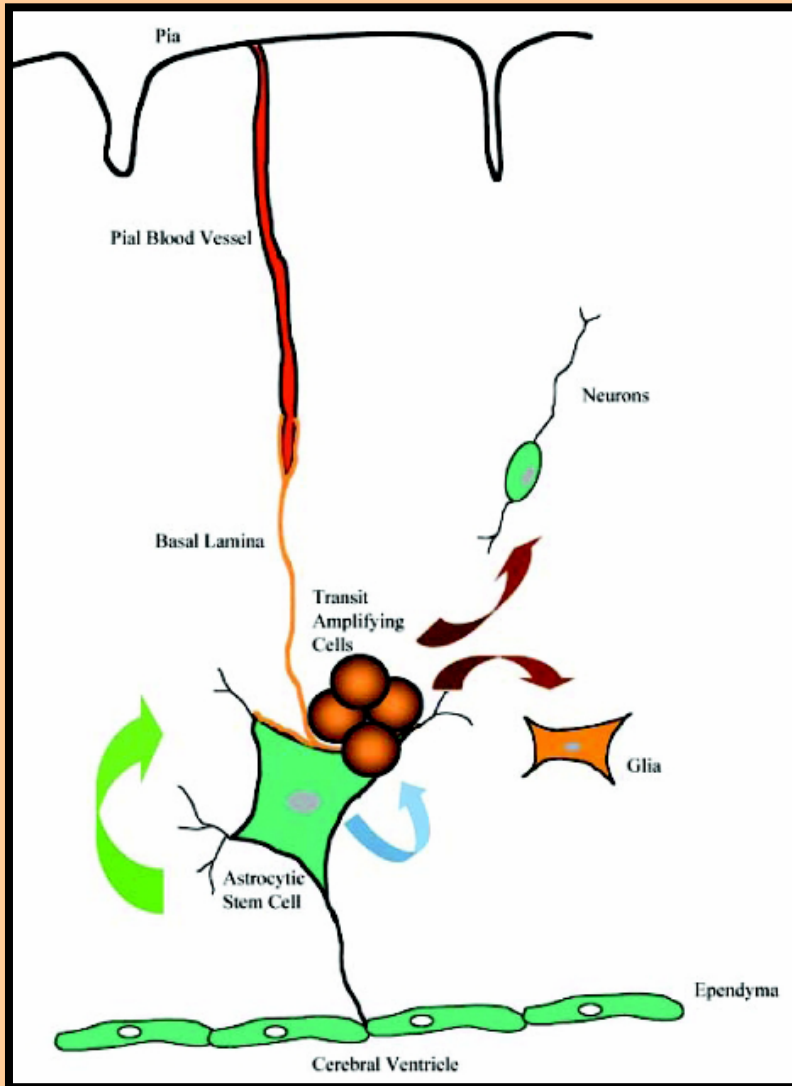


*radiální glie – embryo a časně postnatálně

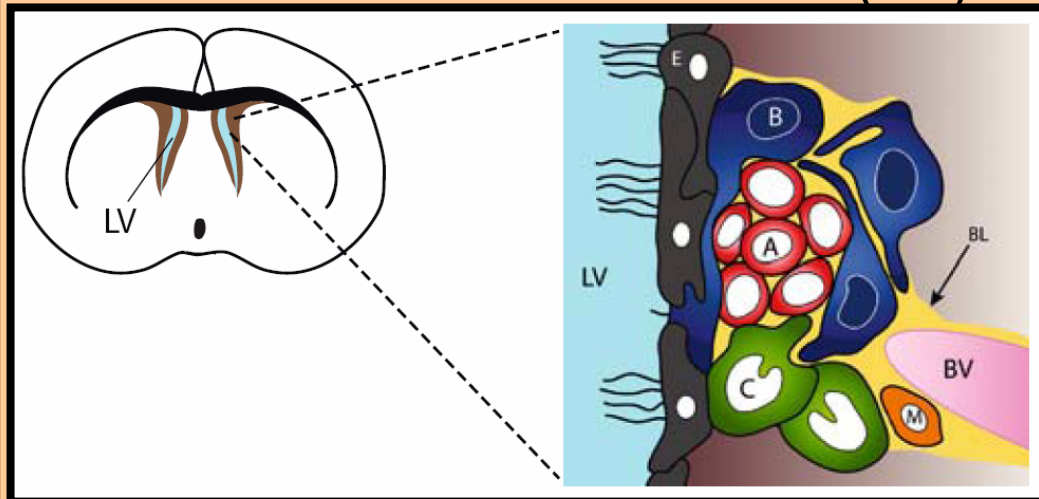
Fenotyp neurálních kmenových buněk



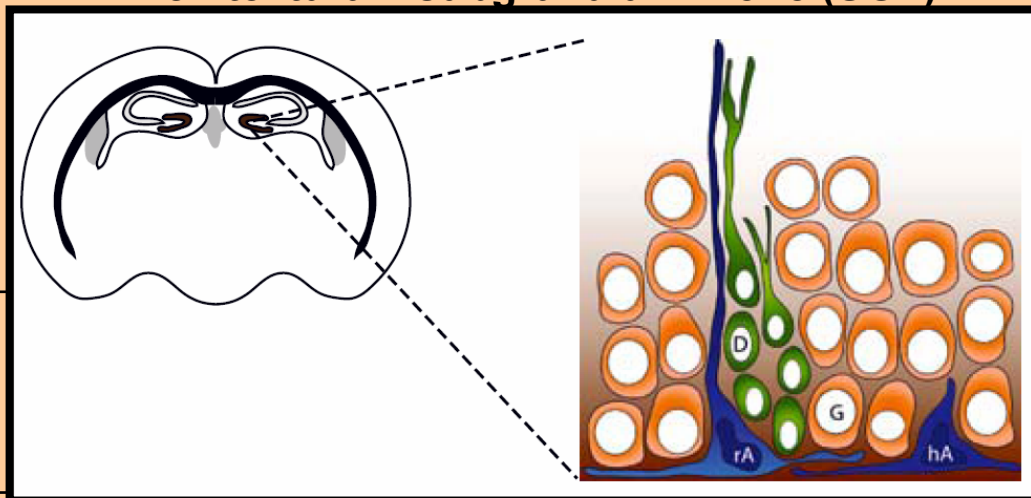
„Niche“ neurálních kmenových buněk



Architektura v subventrikulární zóně (SVZ)



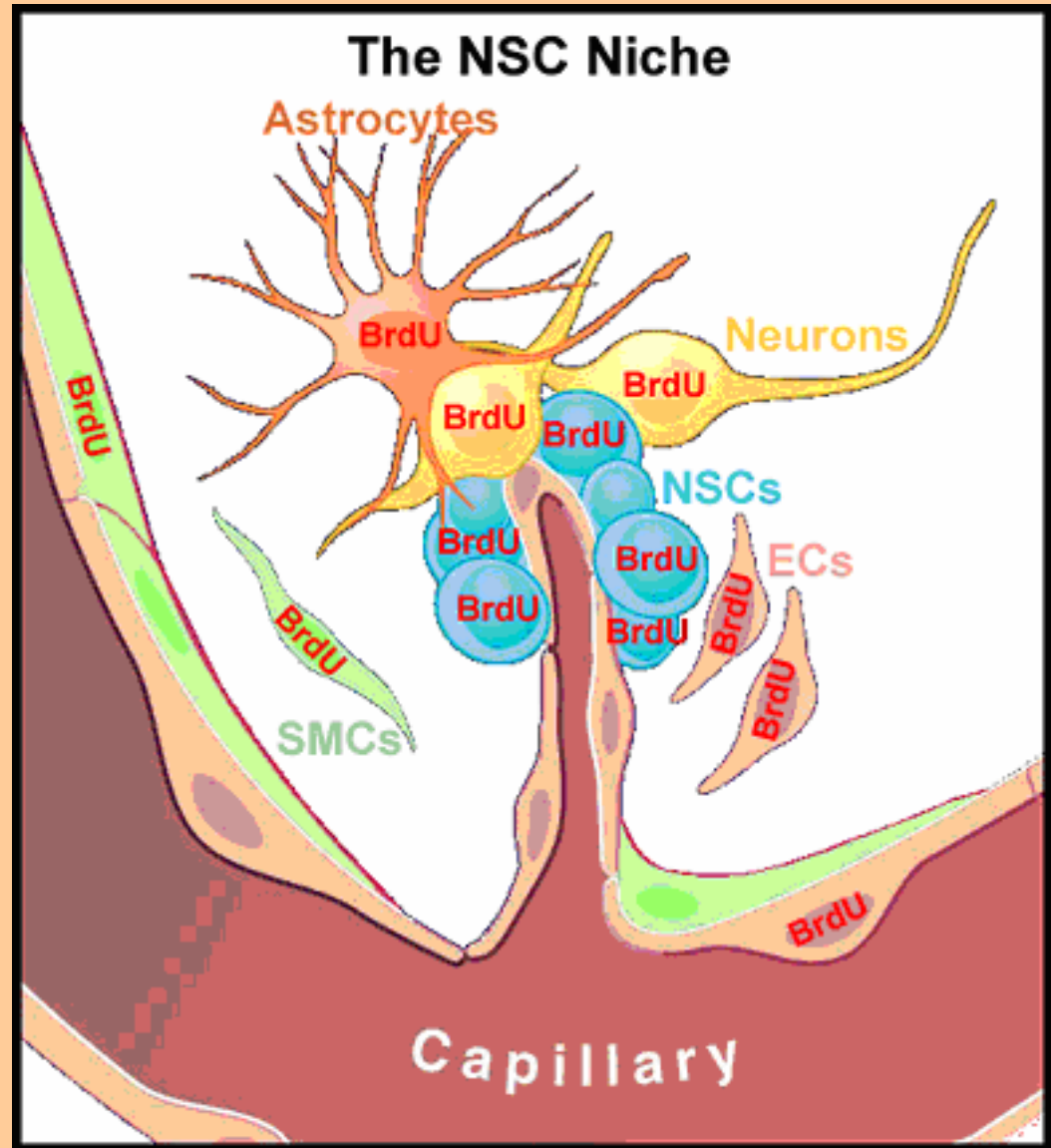
Architektura v subgranulární zóně (SGZ)



rA – radiální astrocyty
hA – horizontální astrocyty
D – nezralá granulární buňka
G – nová granulární buňka

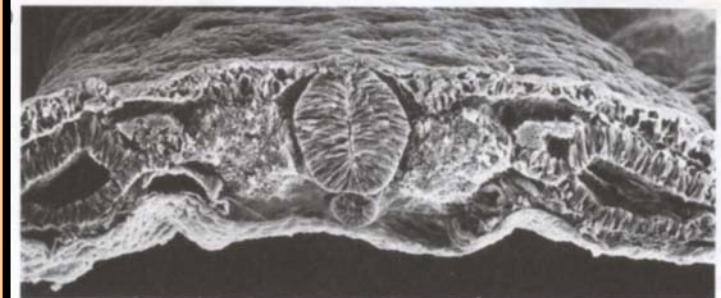
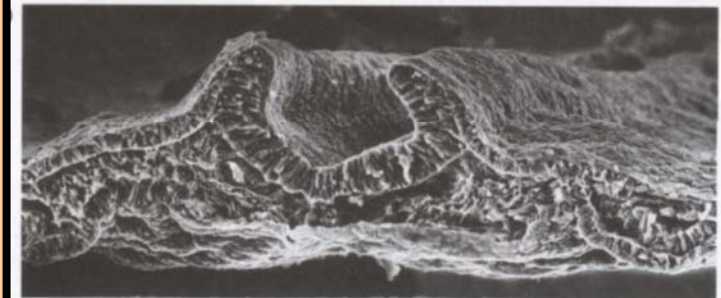
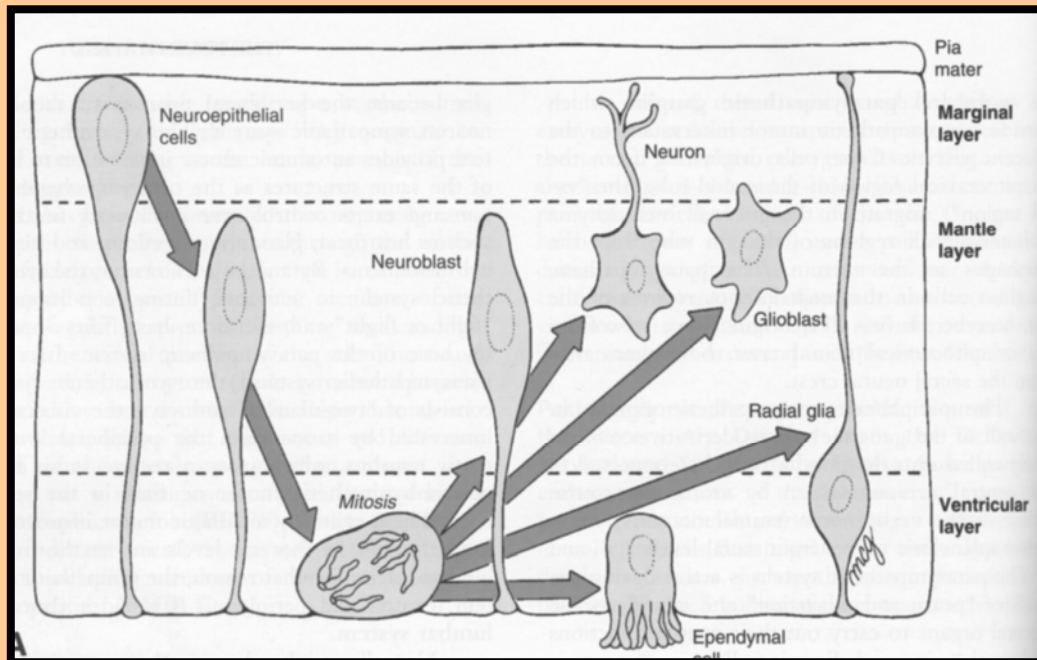
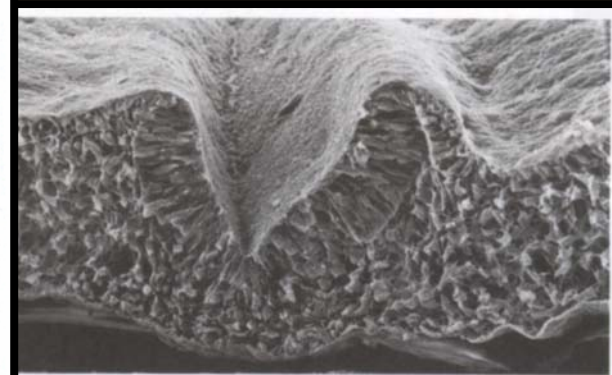
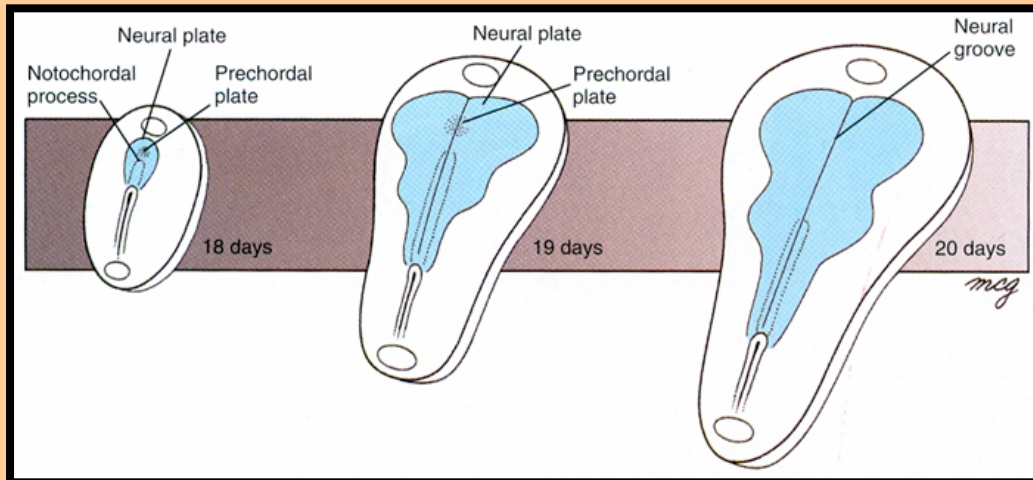
NSC přisedají na krevní kapiláry

- přísun živin ?
- NSC exprimují HIF !?!
(hypoxií indukovaný faktor)

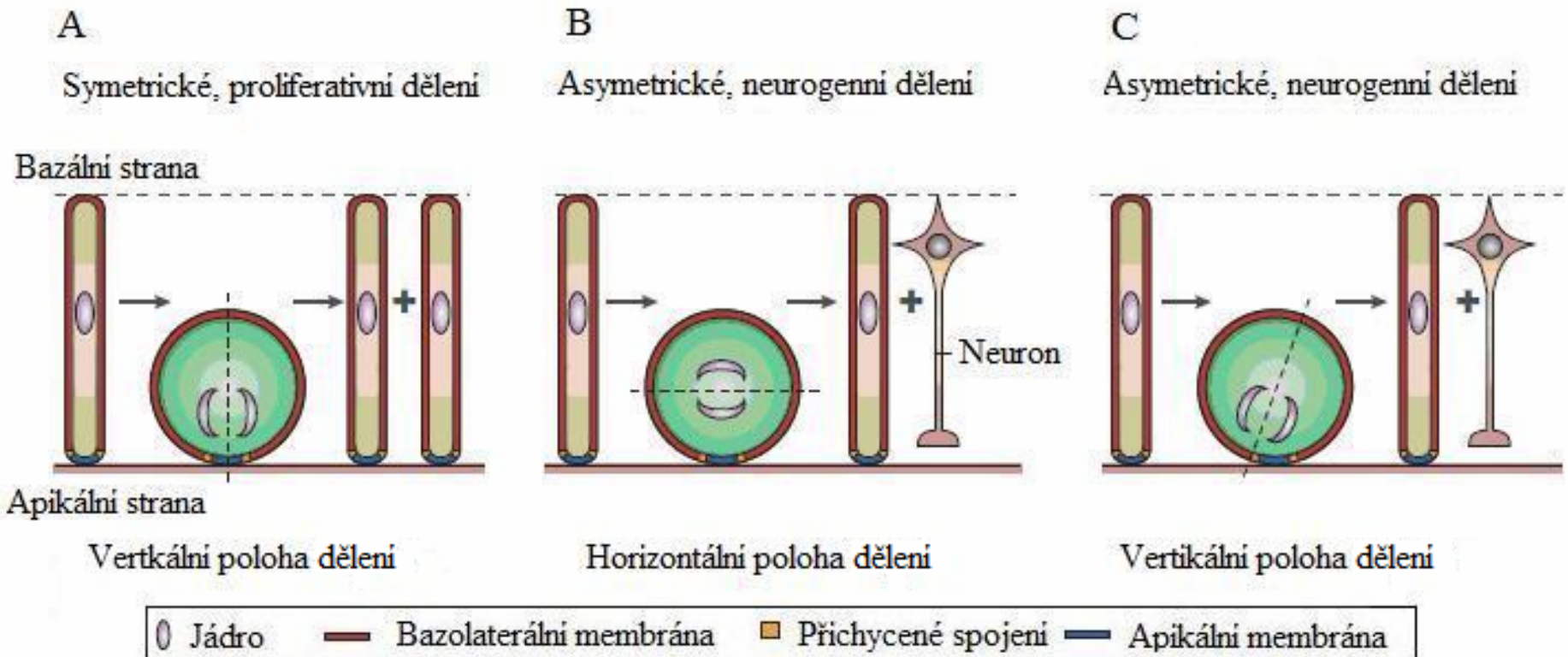


Původ NSC

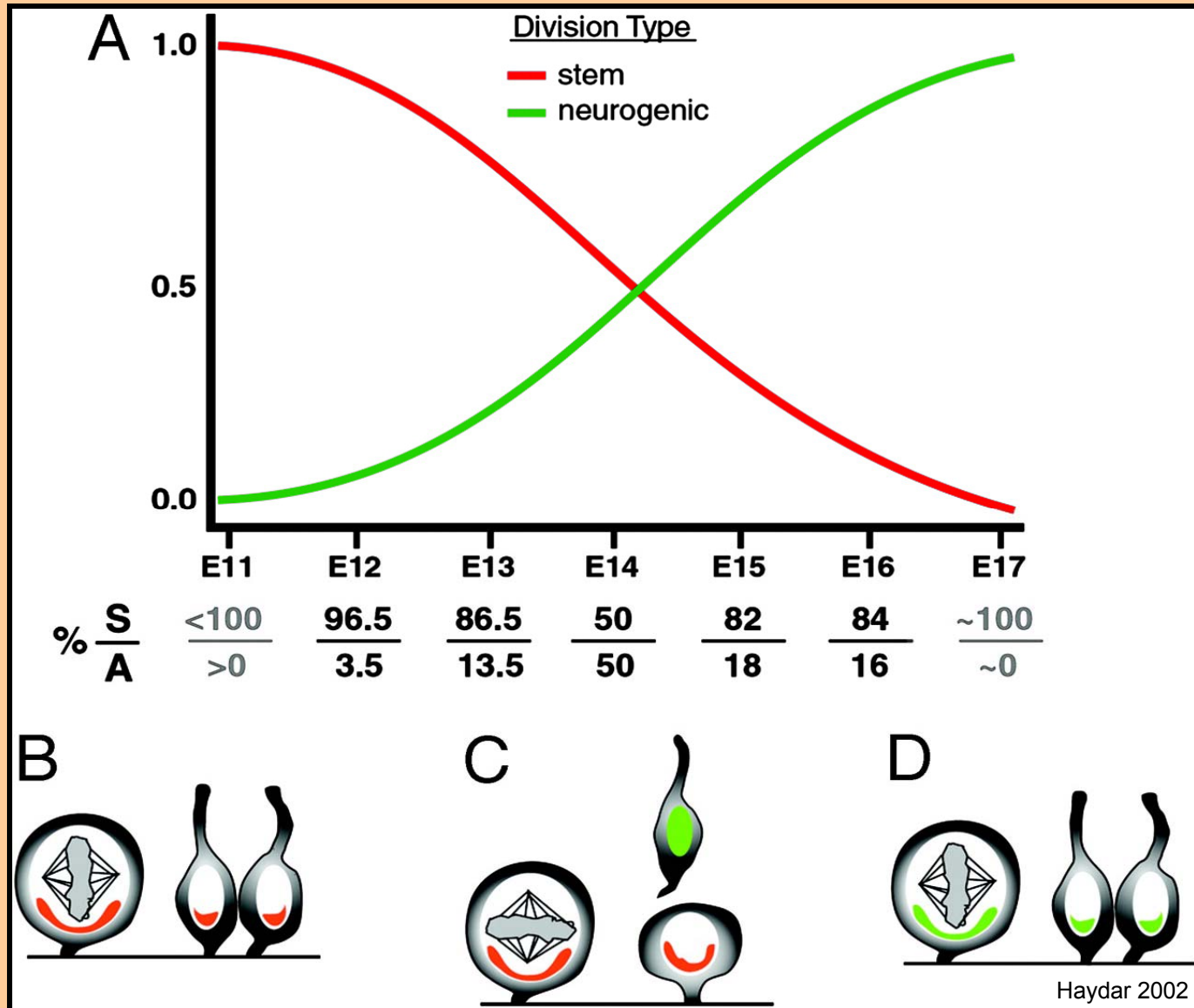
- pozůstatek neurogenní populace z časně embryogeneze



Vertikální a horizontální dělení v neurogenním epitelu



Proporční změny v symetrii buněčného dělení mezi neurálními kmenovými buňkami (**stem**) a neurálními progenitory (**neurogenic**, transientně se dělicími buňkami – TA) v průběhu neurogenese u myši



Radiální glie (RG) jako embryonální NSC

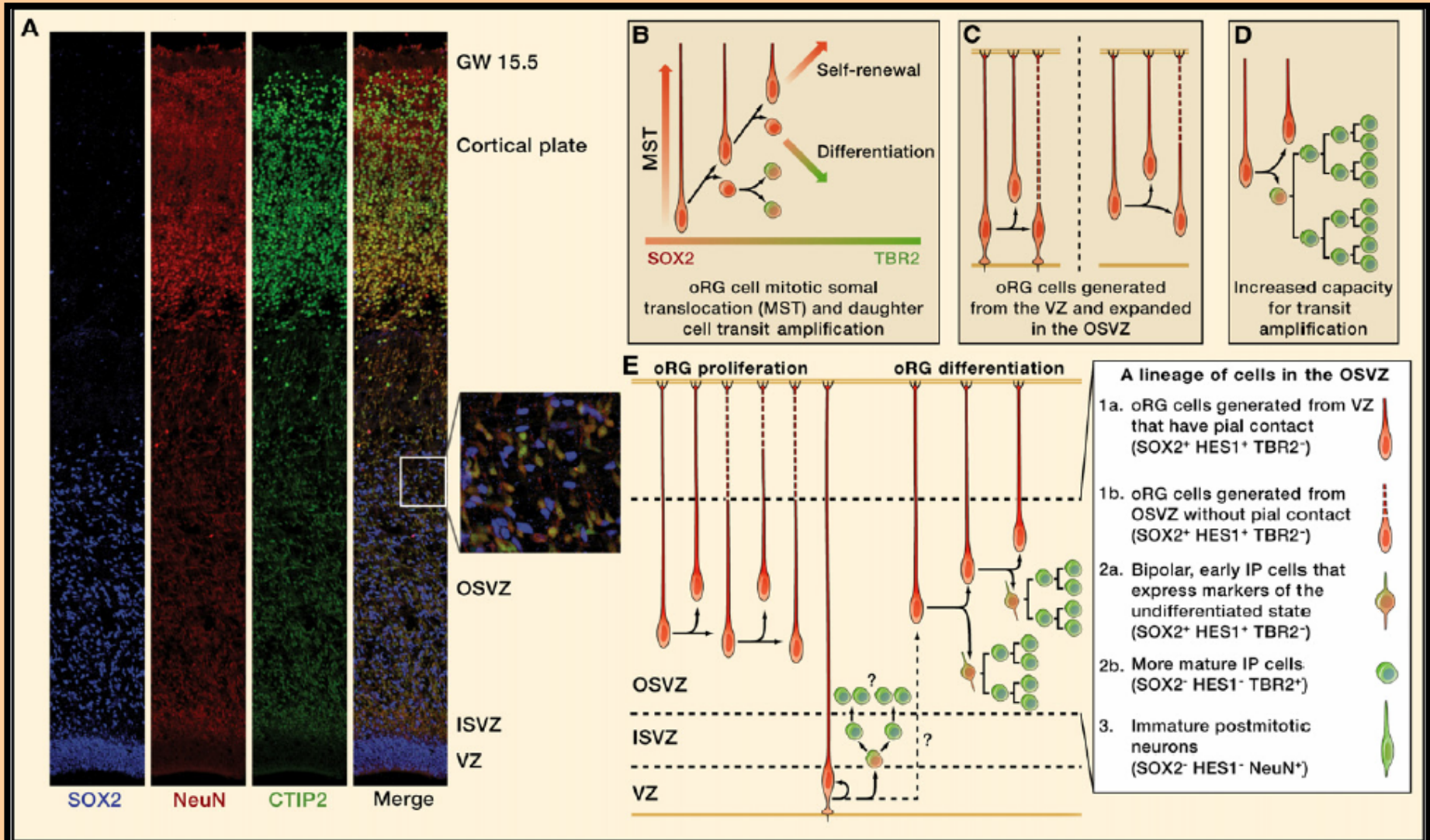
Nestin+, Vimentin+, GFAP+, Sox2+, Pax6+

vRG – bipolární RG, ventrikulární zóna

oRG – unipolární radial glia-like cells, vnější ventrikulární zóna

IP – přechodné progenitory

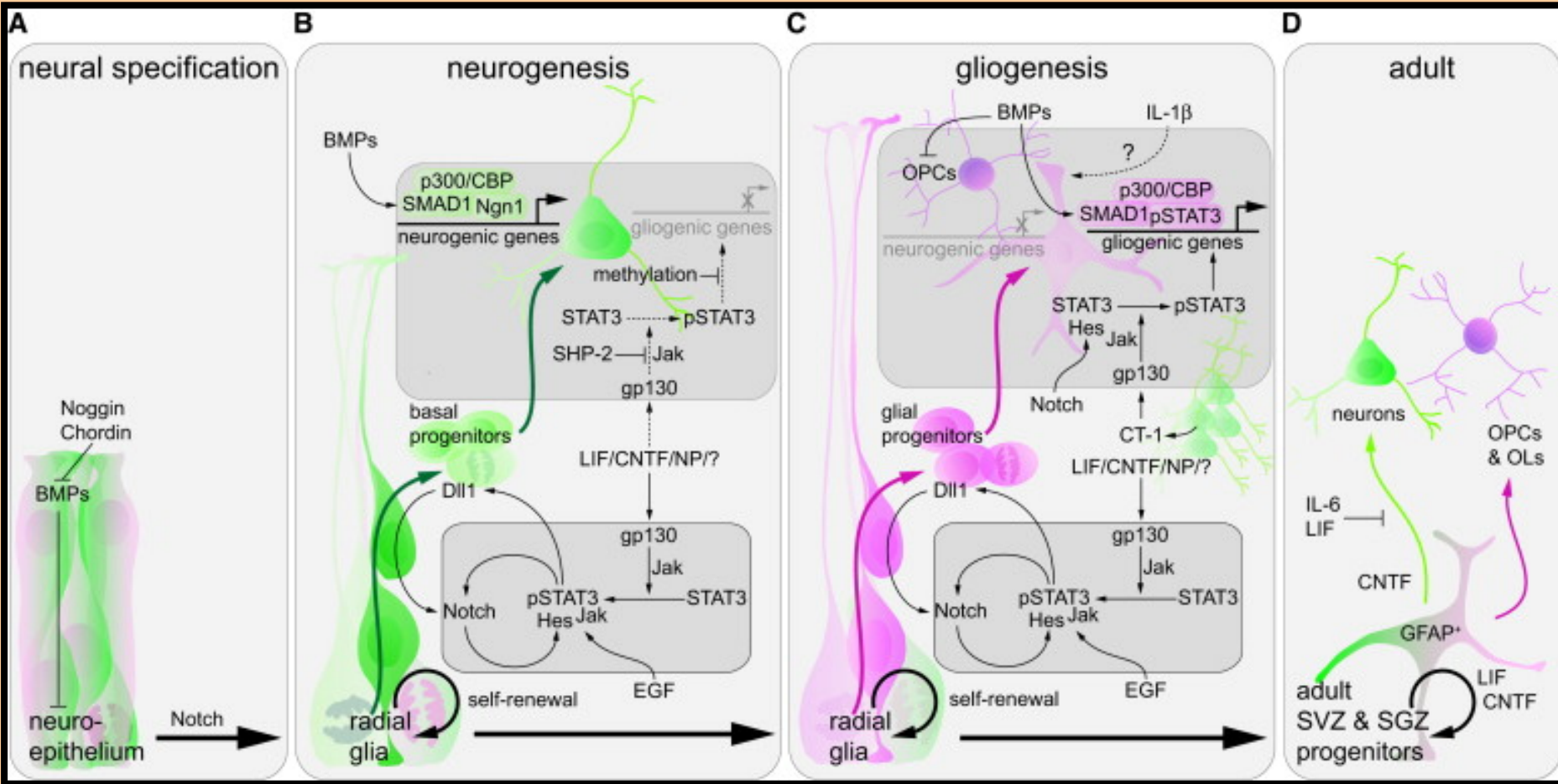
Lui et al., 2011



- A) Buňky exprimující znaky/markery charakteristické pro časné progenitory (Sox2) a neurony (NeuN a CTIP2) ve ventrikulární zóně neokortexu.
- B) Dělení oRG ve vnější vertikulární zóně
- C) RG/vRG dávají vznik jak vRG tak oRG, zda je vždy zachována délka radiál. fibril není známo
- D) oRG produkují přechodně/transienně se dělící buňky schopné dále diferencovat
- E) Diferenciace potomků oRG, ztráta exprese Sox2 a snížení aktivity Notch (snížení HES1), zvýšení exprese TBR2

oRG na rozdíl od **vRG** neexprimují CD133 (Prominin), Par3 (PARD3), aPKC λ , tj. součásti apikální membrány charakteristické pro apikálně-bazálně polarizovaných buněk.

- V průběhu ontogeneze intenzivní proliferace NSC (radiální glie) a TA progenitorů, stimulováno LIF a CNTF v mozkomíšním moku, produkovaných zejména z *plexus choroideus*, důležitá a dosud neobjasněná interakce s Notch dráhou/signalizací.
- LIF/gp130 signalizace působí pleiotropně, u zralejších progenitorů indukuje diferenciaci do glií, zejména astrocyty, a celkově podporuje maturaci neuronů, zejména motoneuronů.



Dvojitá úloha Notch a gp130/STAT3 signalizace v neurogenезi

- Notch a STAT3 aktivita se vzájemně podporují
(STAT3 reguluje expresi ligandů Notch, Hes aktivuje STAT3)
- oba v závislosti na dalších faktorech a statusu buněk podporují sebeobnovu NSC a indukci gliogeneze

Plexus choroideus

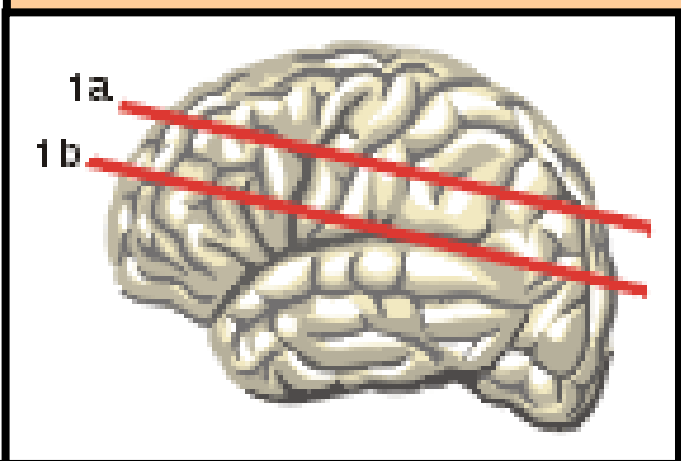
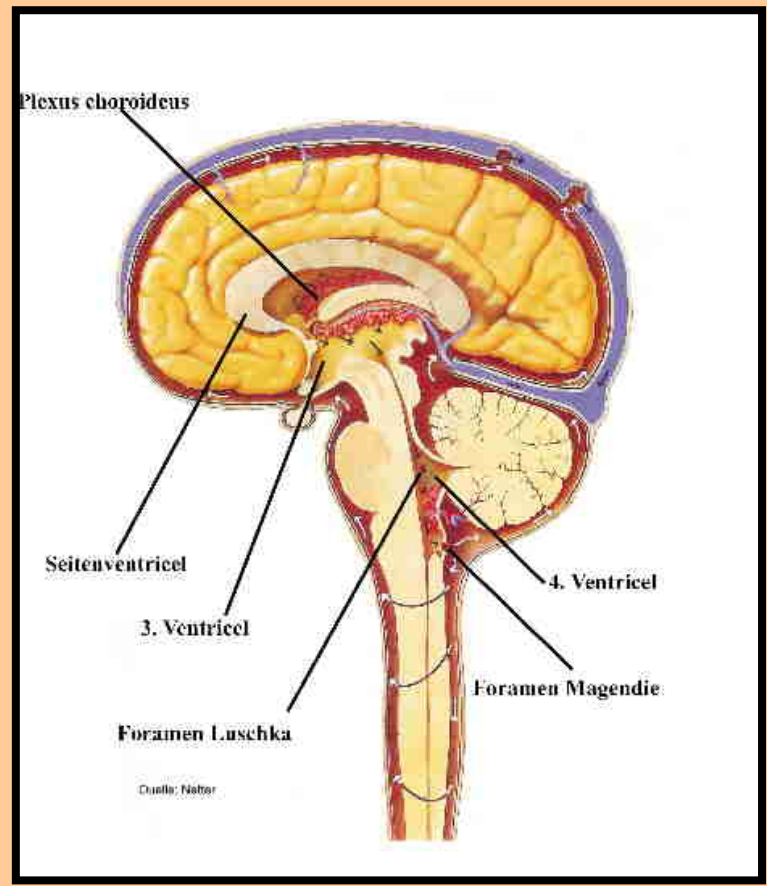
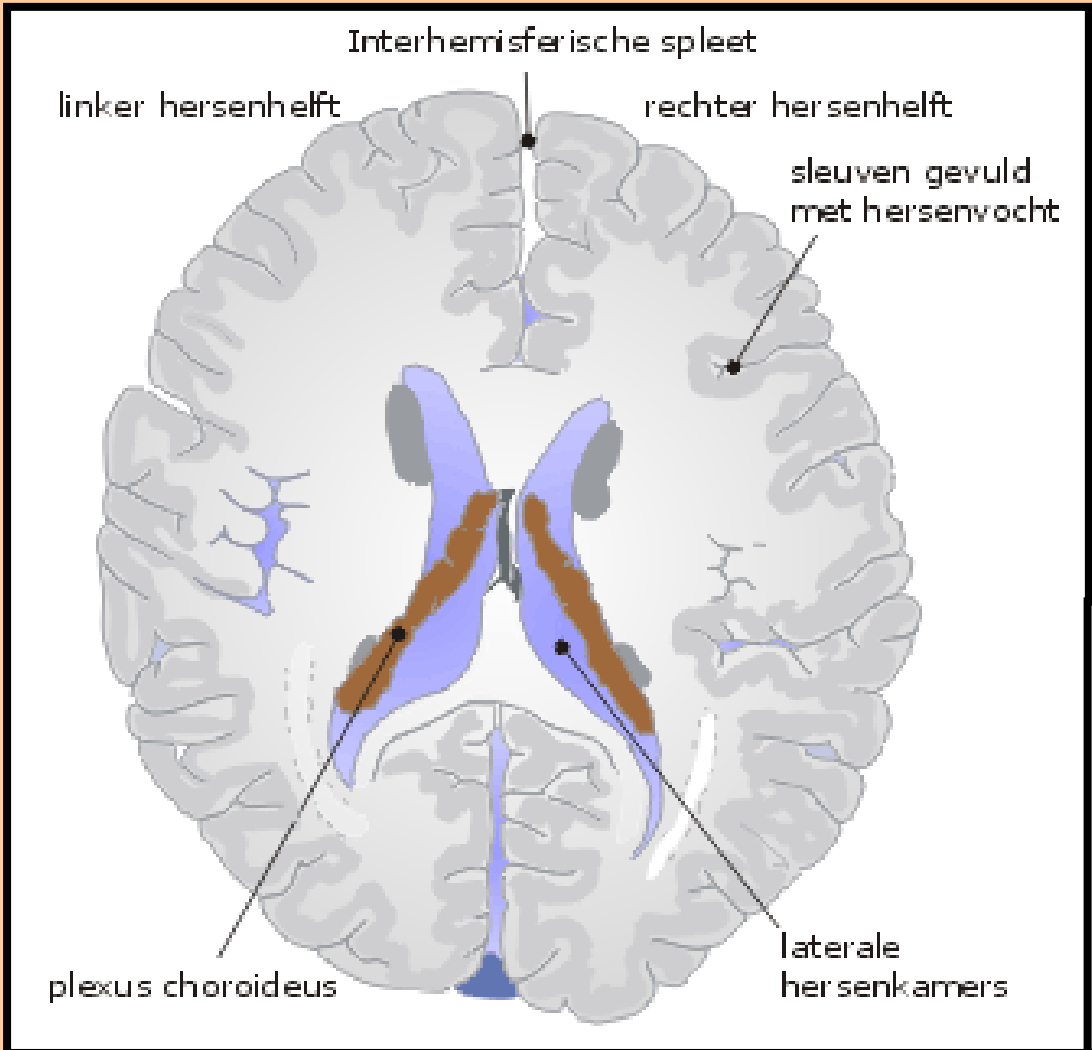
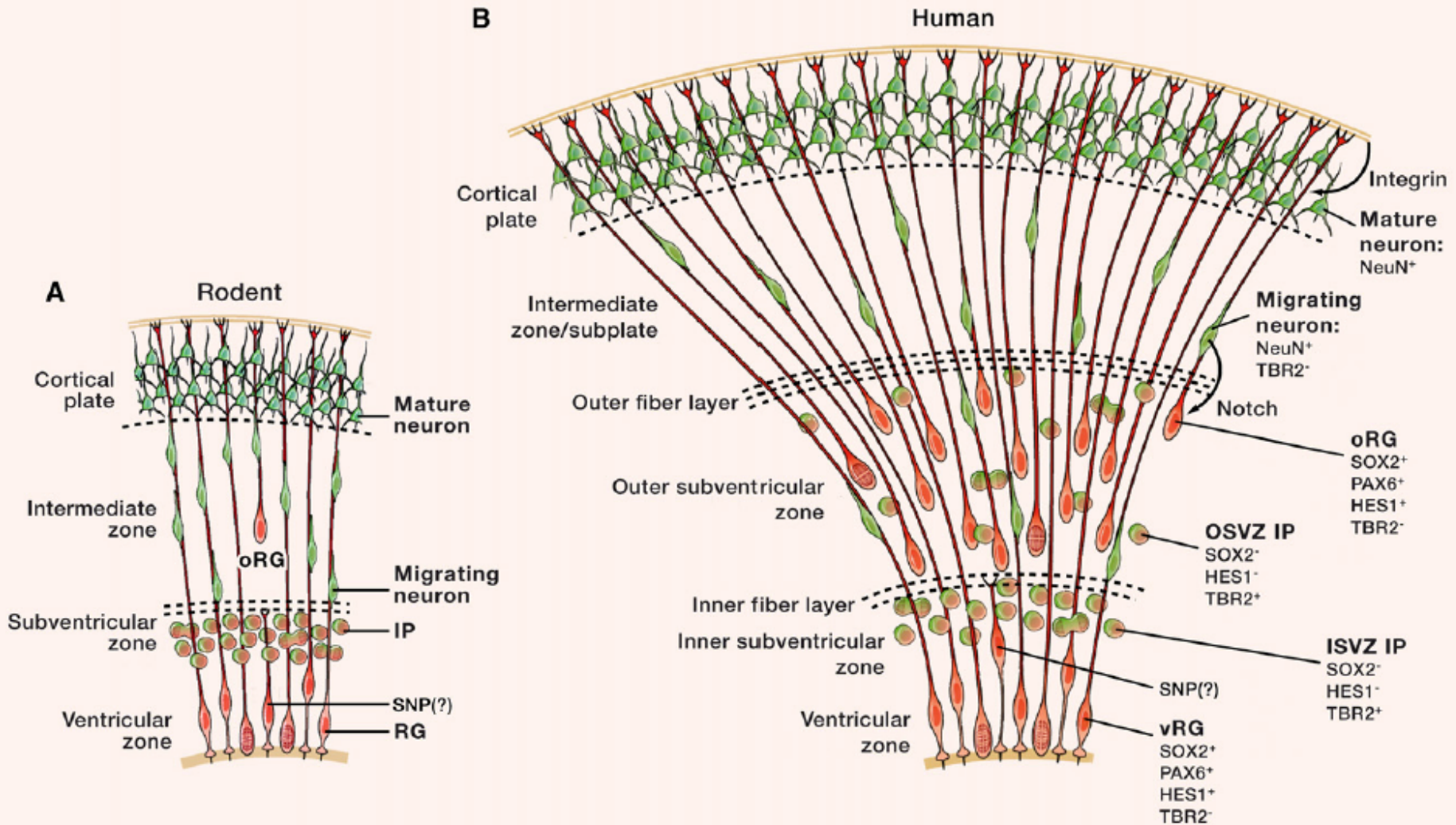


Schéma kortexu hlodavců (A) a člověka (B)

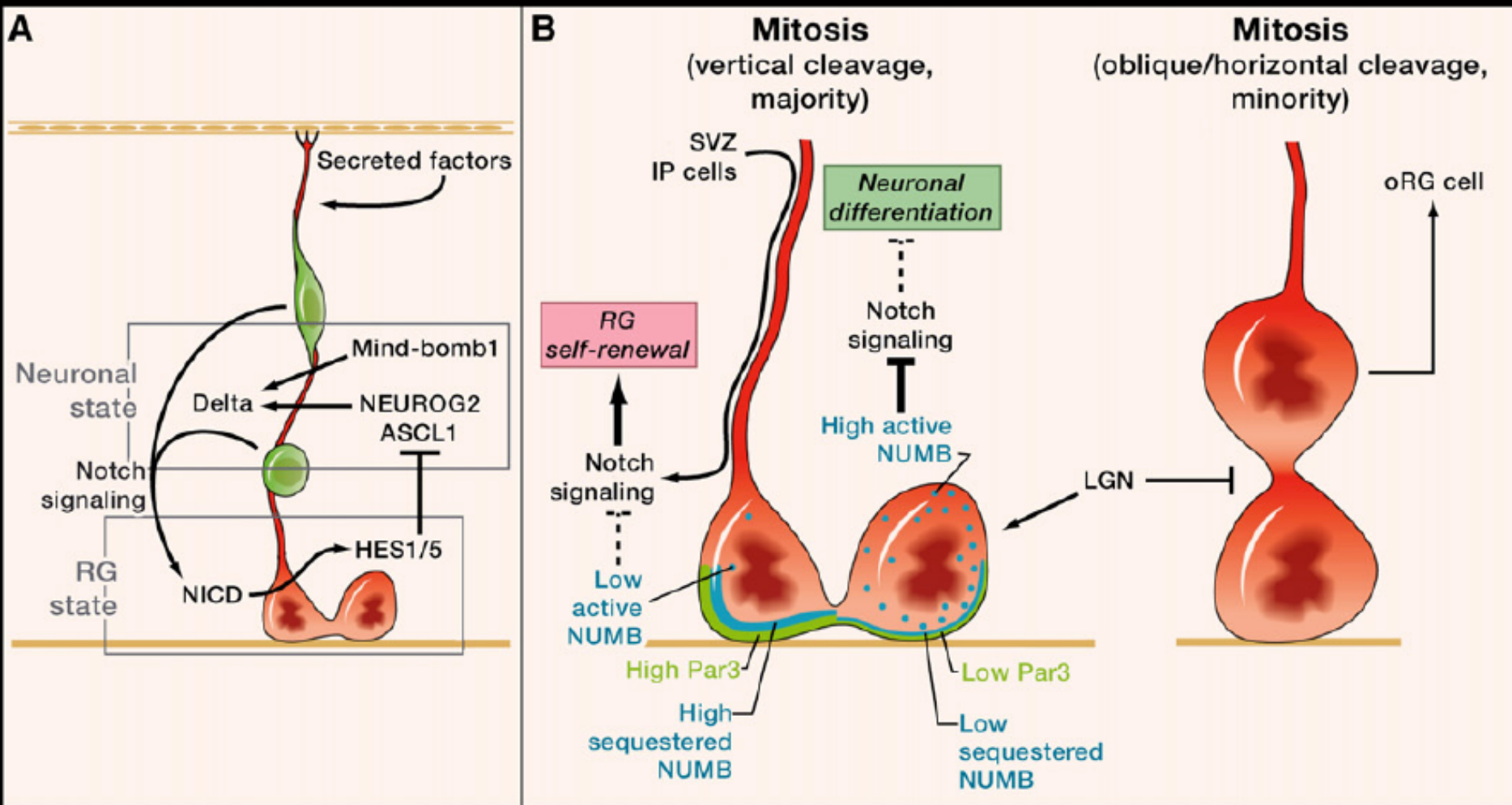
Lui et al., 2011



Mechanismus regulace RG buněk

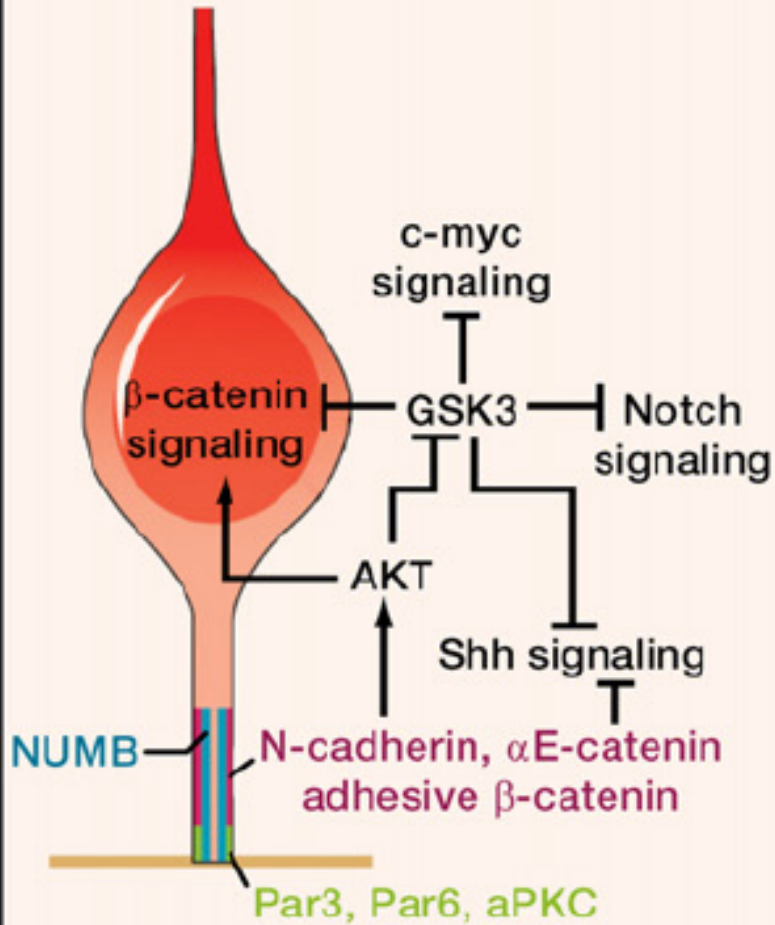
- neurální progenitory/IP aktivují Notch dráhu u RG buněk a tím blokují jejich diferenciaci
- Notch je dále regulován hladinou volného a s Par3 vázaného NUMB (úloha bazální membrány)

Lui et al., 2011



C Interphase

Regulace klíčových signálních drah komponentami asociovanými s vazbou na bazální membránu



V průběhu embryogeneze jsou NSC tzv. radiální glie ventrikulární zóny
(vRG + oRG)

Adultní NSC jsou:

- 1) radiálním gliím podobné buňky, jako v průběhu embryogeneze(?)
- 2) adaptované/pozměněné časně přechodné progenitory (IP)?
- 3) v dospělém mozku nejsou kmenové buňky s neomezenou schopností sebeobnovy, existují pouze IP schopné několika cyklů dělení

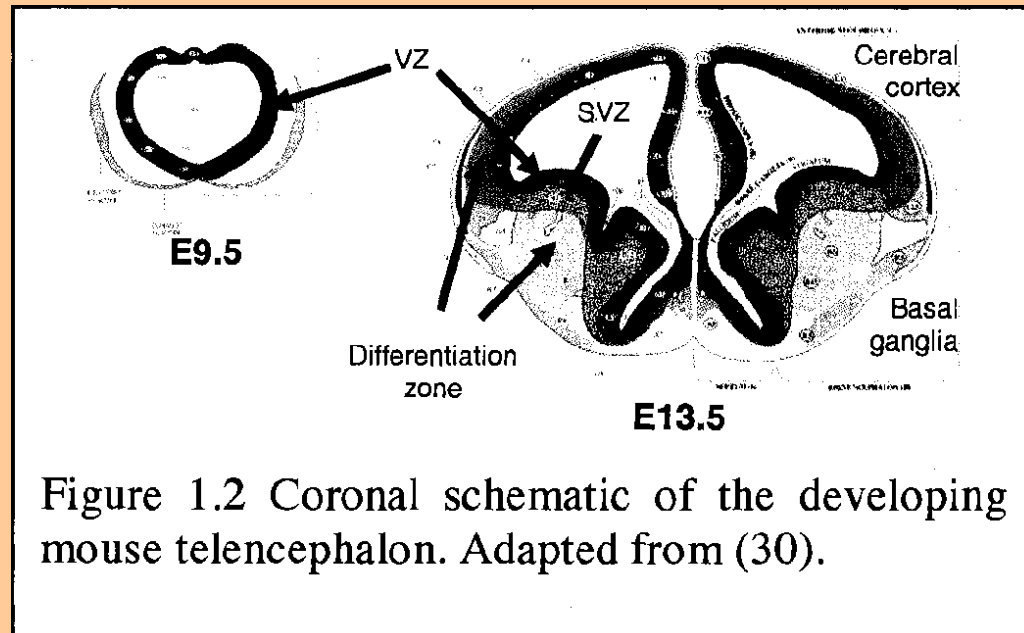
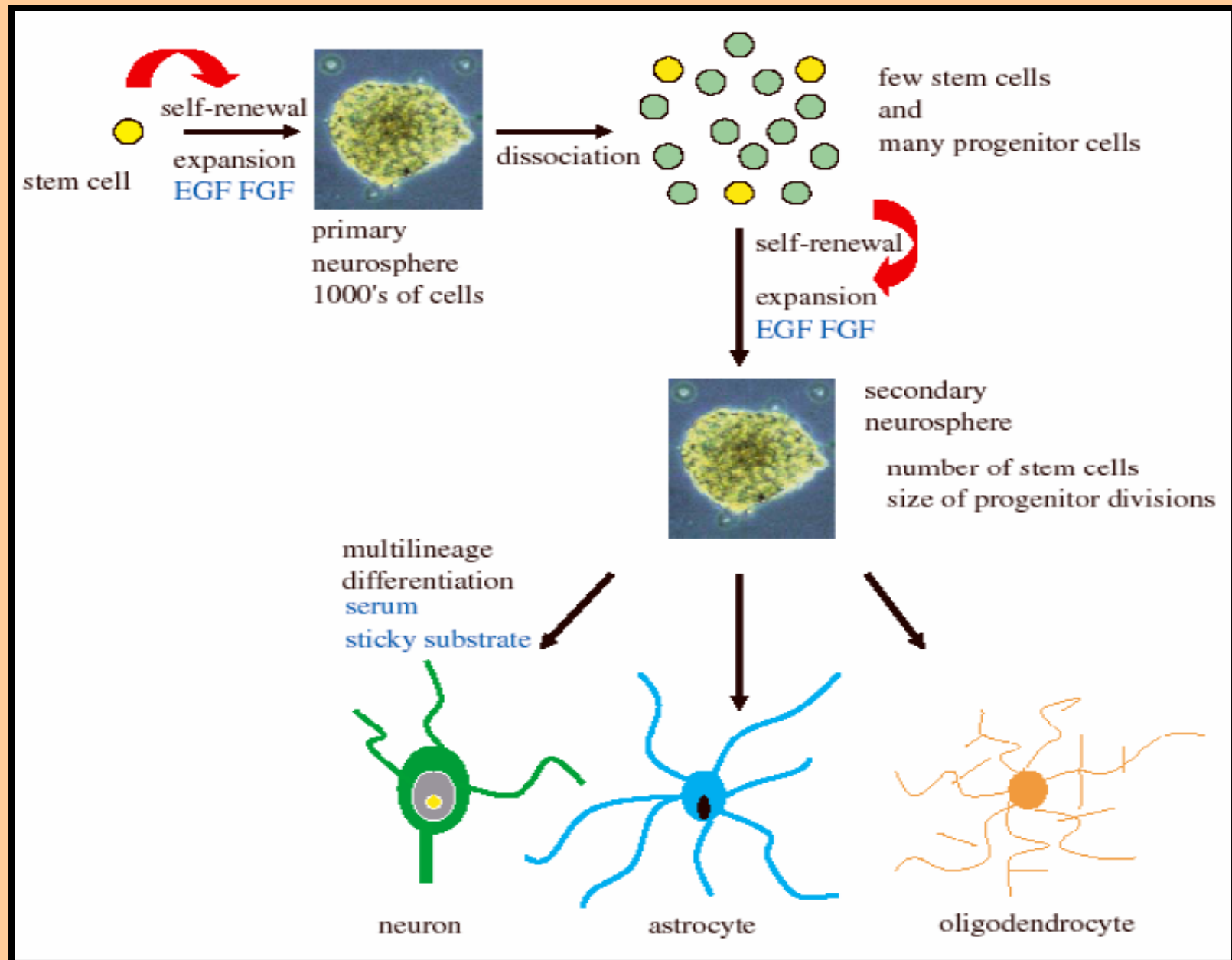


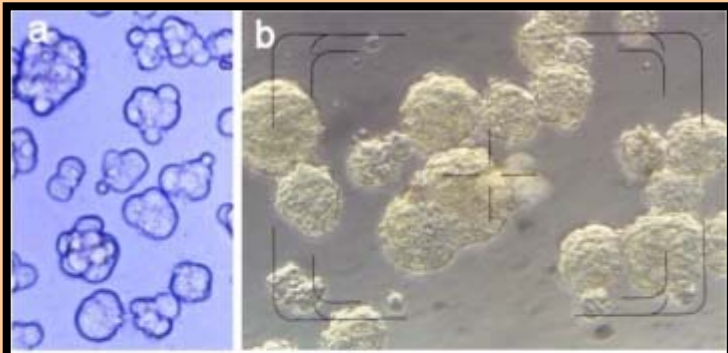
Figure 1.2 Coronal schematic of the developing mouse telencephalon. Adapted from (30).

Vlatnosti NSCs

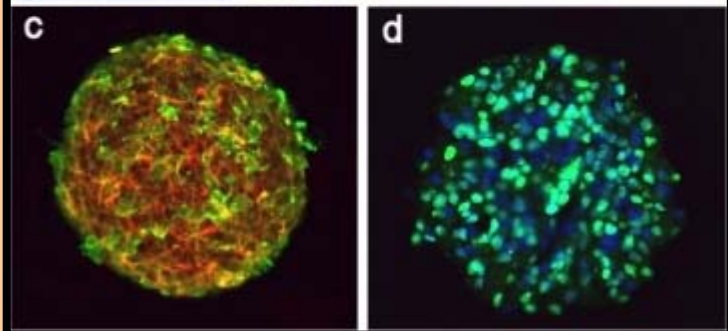
- ❖ NSCs jsou široce multipotentní a experimenty s chimérami ukázaly, že NSCs dávají vznik buňkám všech tří zárodečných listů (netvoří pohlavní buňky, nebylo prokázáno)
- ❖ u chimér se také NSCs nepodílí na hematopoéze i přesto, že v případě likvidace hematopoézy zářením, injikované NSCs ji obnoví (obojí děláno s myši ROSA26)
- ❖ na druhou stranu není jasné, zda NSCs tvoří všechny typy nervů a glií (SC x TA)
- ❖ neurální multipotentní progenitory byly izolovány i z retiny, optického nervu, hypothalamu, čichových laloků, čichového epitelu, a míchy
- ❖ tyto směsné populace nejsou schopné dlouhodobé proliferace *in vitro* tak jako NSCs a také si zachovávají některé epigenetické znaky podle místa původu
- ❖ po poškození mozku je možno neurogenezi detekovat i v striatu, neokortexu nebo v místech kortiko-spinálních motoneuronů
- ❖ NSCs s věkem ubývá, podobně jako ostatní adultní SSCs, každopádně je lze izolovat z mozkové tkáně i několik hodin (4-6h) po diagnóze klinické smrti
- ❖ *in vitro* se NSCs kultivují v podobě tzv. „neurosfér“ ve speciálních médiích určených pro expanzi neurálních progenitorů, bez séra, ale s nadbytkem FGF2 a EGF
- ❖ LIF-gp130 / Notch blokuje diferenciaci NSC, a podporují jejich proliferaci
- ❖ „neurosféry“ jsou plovoucí útvary s navýšeným množstvím neurálních progenitorů a NSCs, lze v nich detekovat již i množství zralejších typů nervů i glií
- ❖ i neurální progenitory (TA) lze dlouhodobě kultivovat

Příprava neurosfér, primární a sekundární neurosféry (Dirks, 2008)

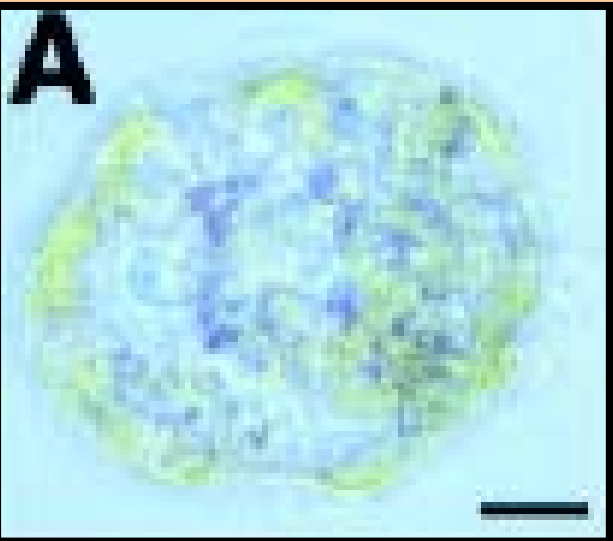




In vitro kultivace NSC – neurosféry
c) **EGFR** + **nestin**; d) **BrdU** + **buněčná jádra**

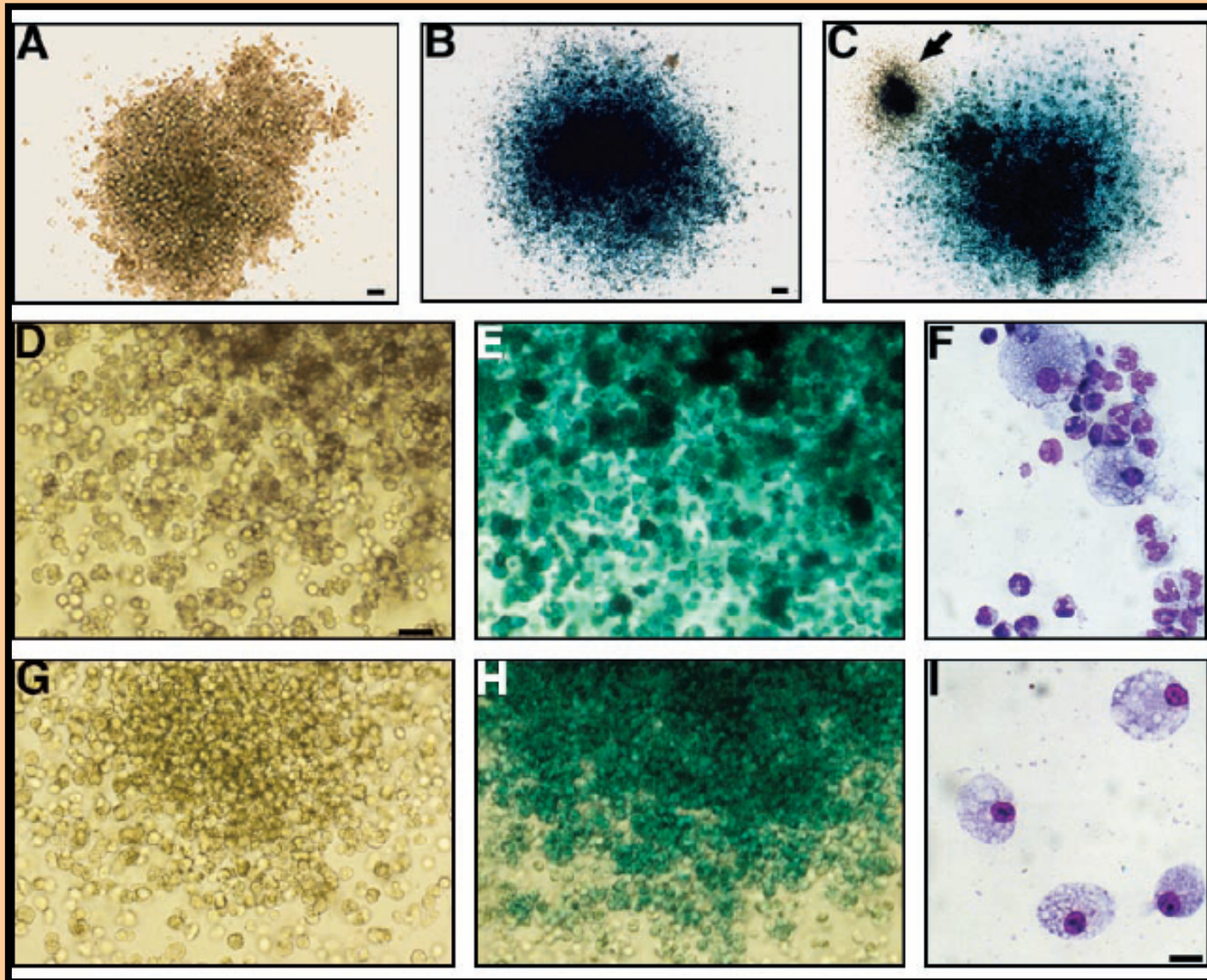


Clarke 2000



← **Chimerická blastocysta**
vytvořená po smíchání blastomer normální
a ROSA26 myši a myši embrya (11 dpc)
normální a s ROSA26 chimerické myši. ↑

NSC jsou také schopny rekonstruovat hematopoézu (Bjornson 1999)



A – kolonie ze zdravé kostní dřeně; **B,C** kolonie z kostní dřeně NSCs (ROSA) transplantovaných myší po ozáření;
D,E – GM-CFU z transplantovaných NSCs (ROSA); **G,H** - M-CFU z transplantovaných NSCs (ROSA);
D,G a **E,H** – bez a s X-Gal; **F** – granulocyty + makrofágy & **I** – makrofágy, stanovení May-Grunwald-Giemsa