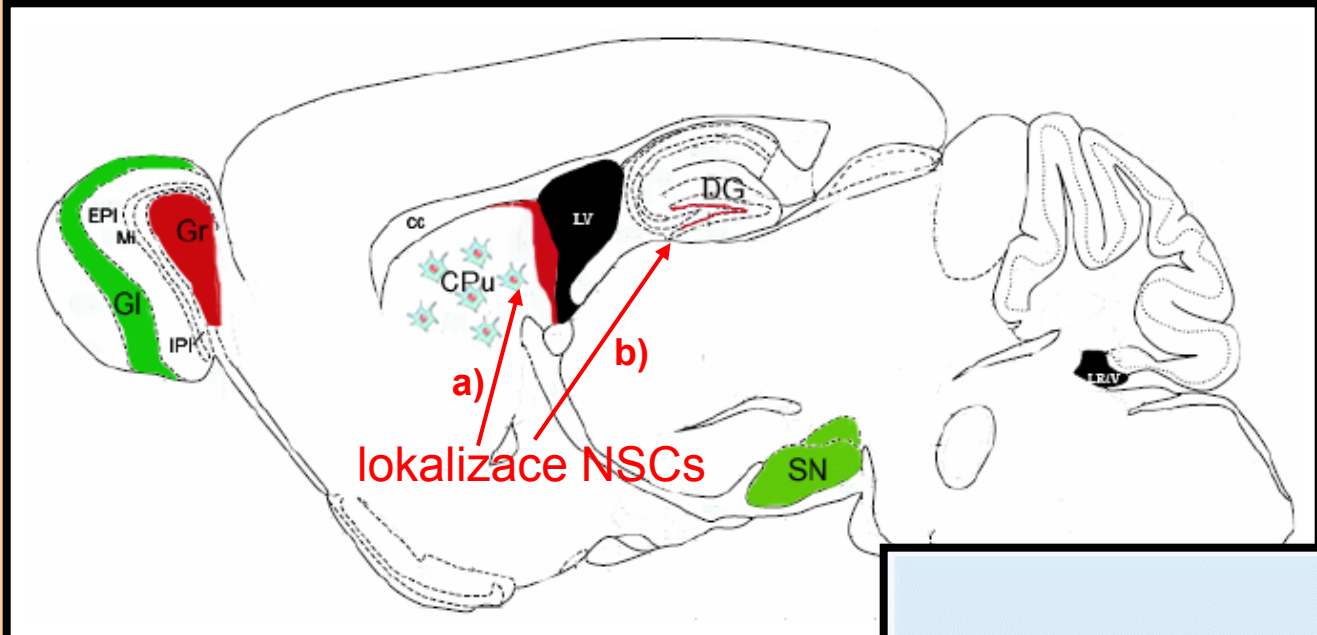
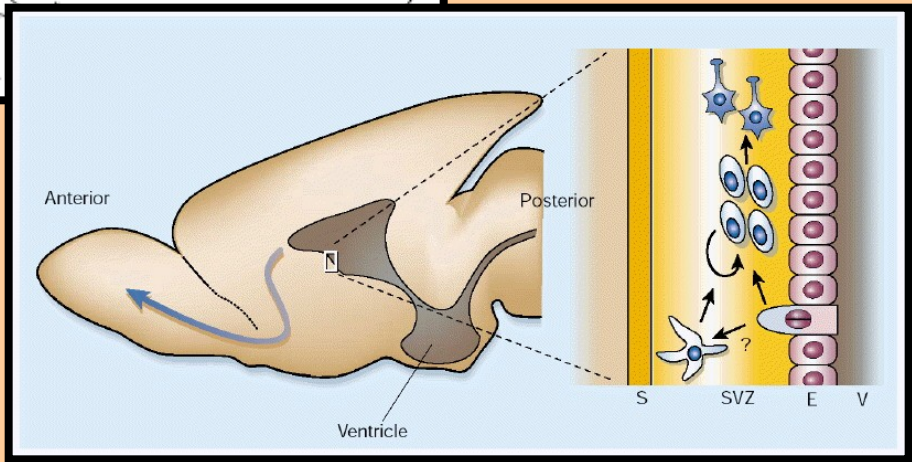


# Neurální kmenové buňky – NSCs (Neural stem cells)



- 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

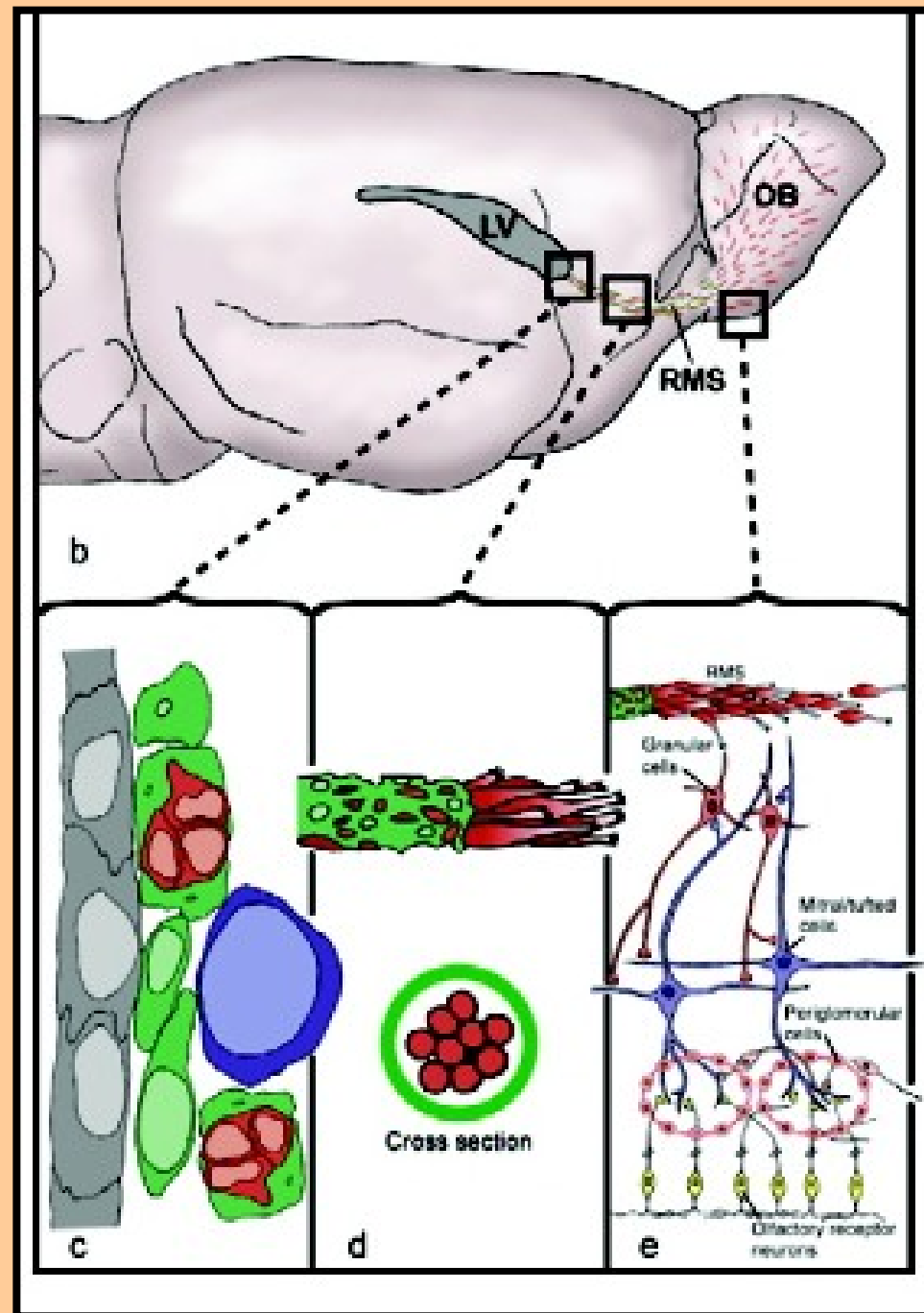
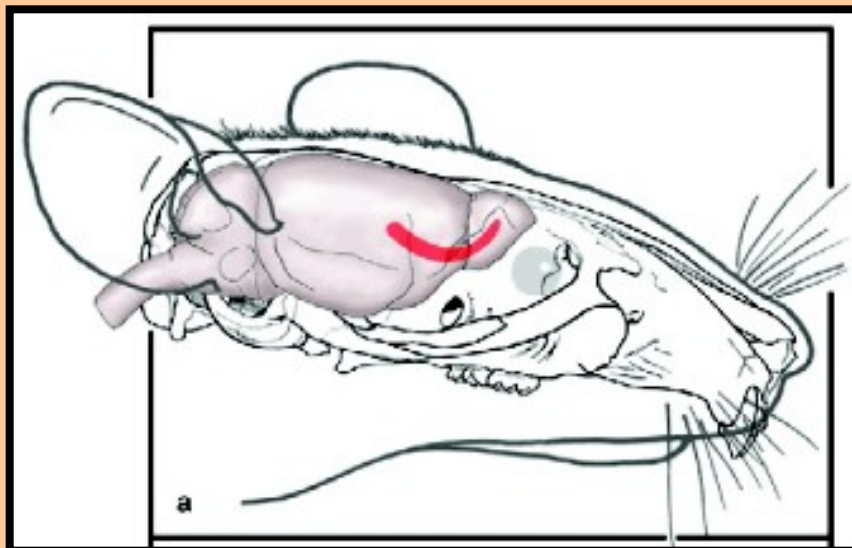


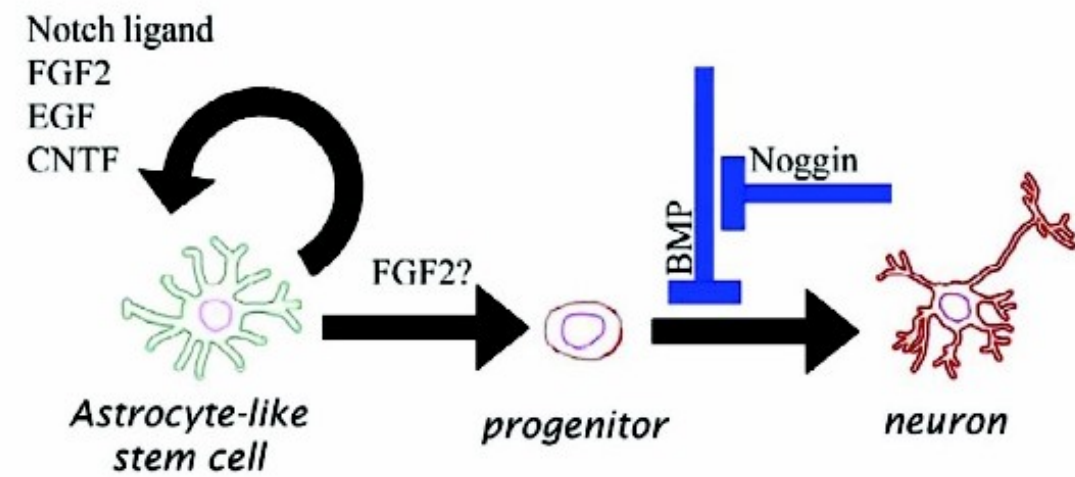
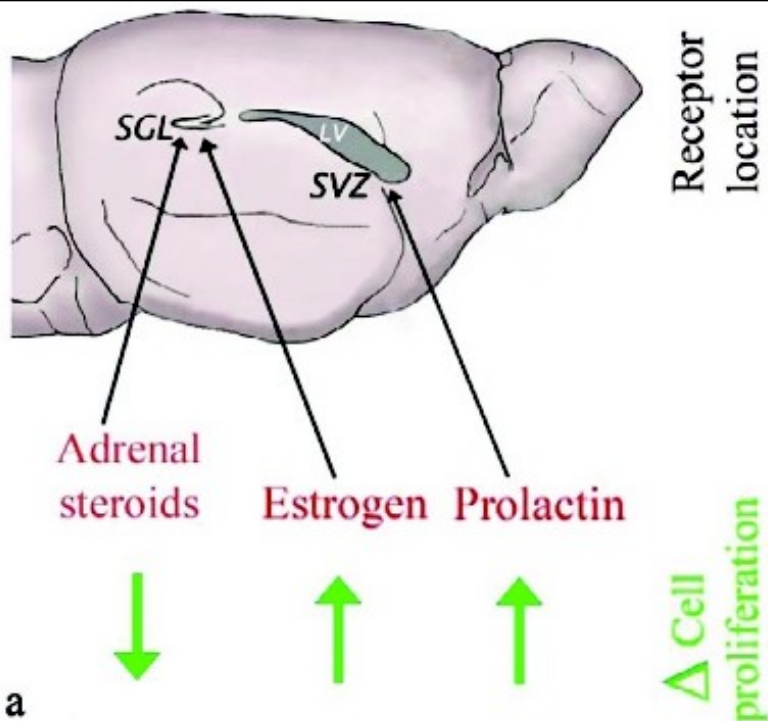
## Neurogeneze v dospělosti!

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

- ❖ neurogeneze v důsledku březosti
- ❖ neurogeneze v době vábení
- ❖ při rozvoji motorických fcí (SGZ)
- ❖ neurogeneze regulovaná hormony

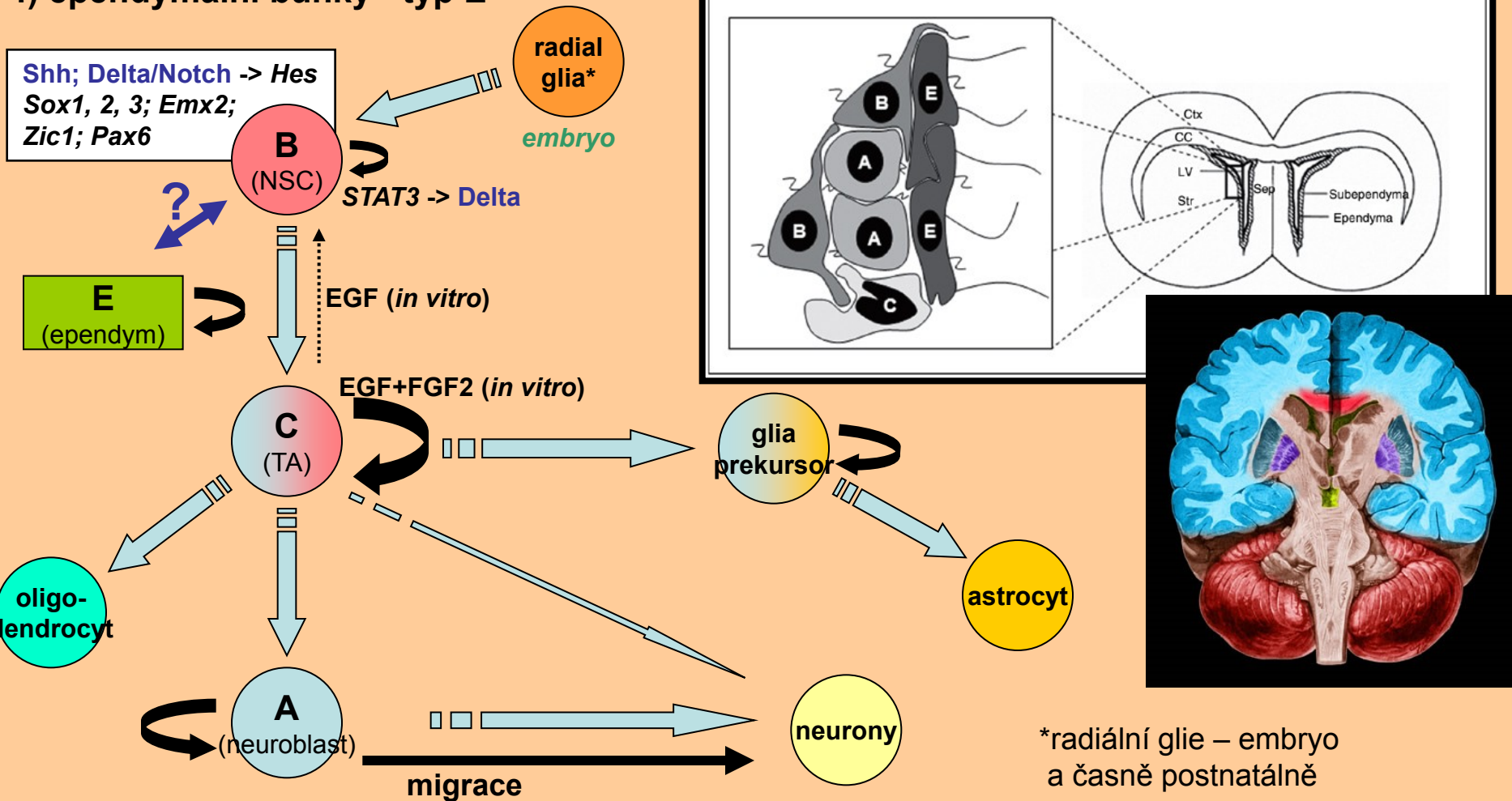
**RMS** – rostrální migrační tok  
(*rostral migratory stream*)  
(- u člověka neověřeno?!)



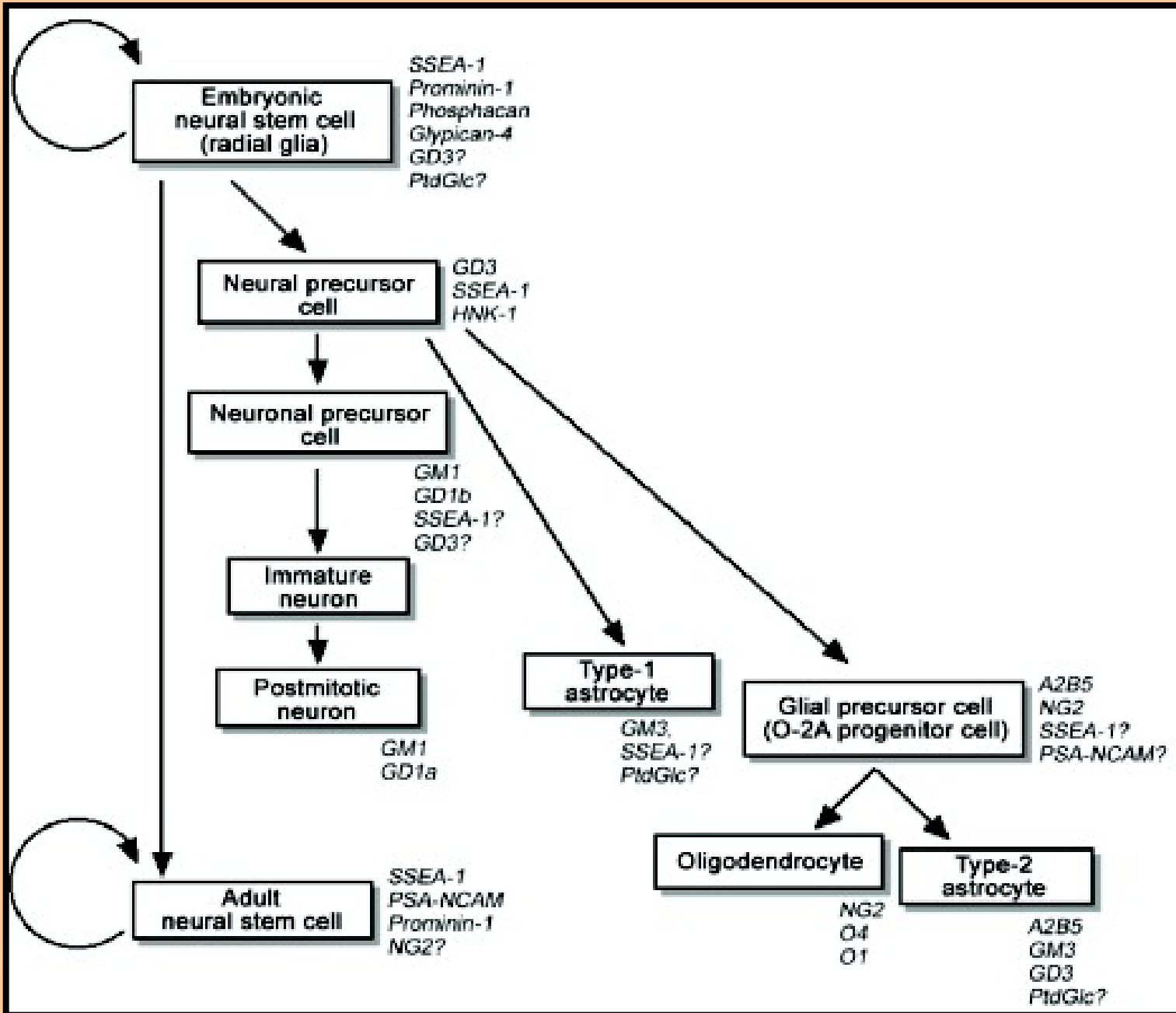


# Oblast s NSCs obsahuje čtyři typy buněk

- 1) pomalu proliferující, astrocytům podobné (GFAP<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>/SSEA1<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>) 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

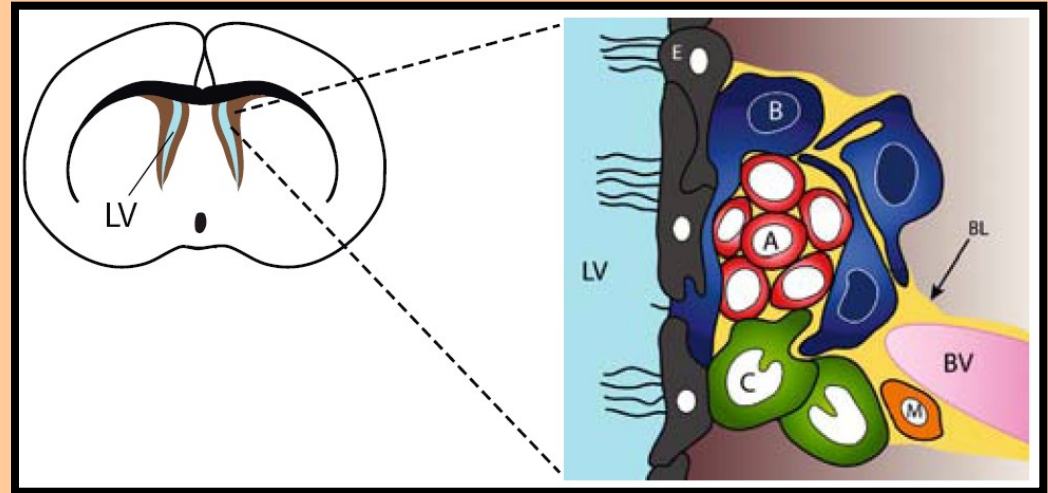


# Fenotyp neurálních kmenových buněk

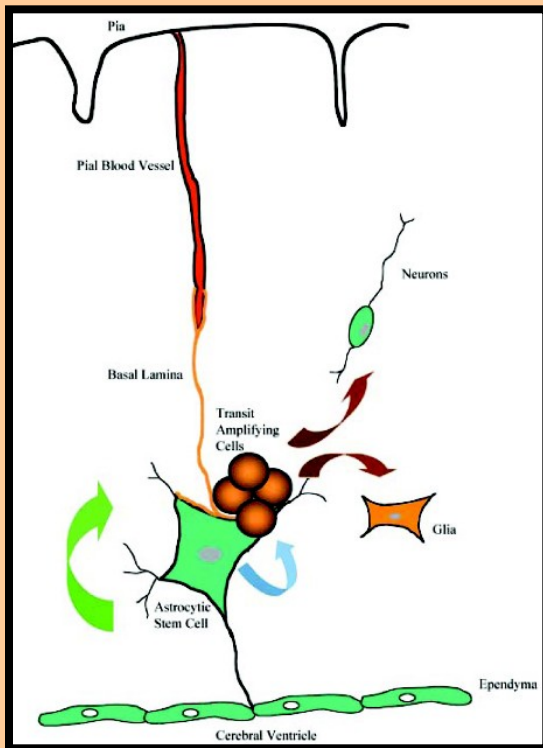
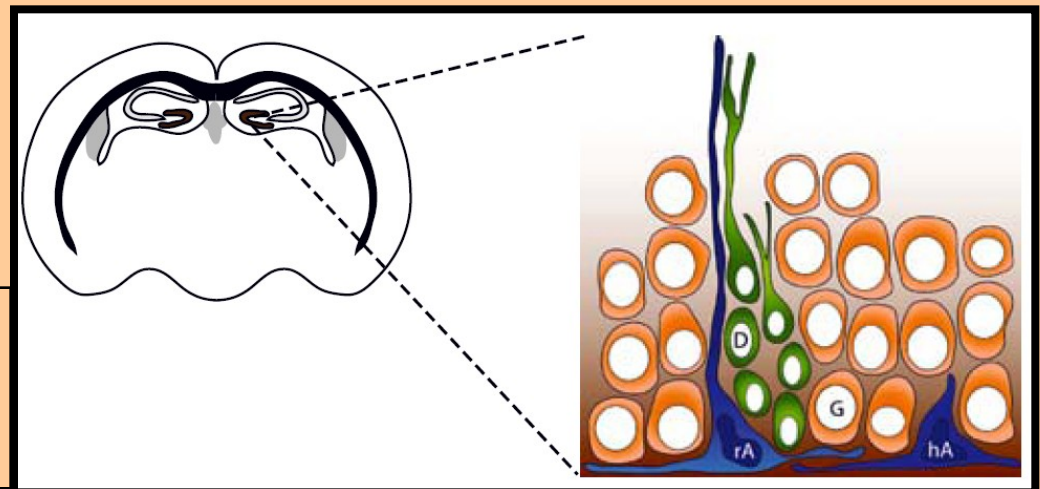


# „Niche“ neurálních kmenových buněk

## Architektura v subventrikulární zóně (SVZ)



## Architektura v subgranulární zóně (SGZ)



**NSC přisedají na krevní kapiláry**

- přísun živin, růstových faktorů?

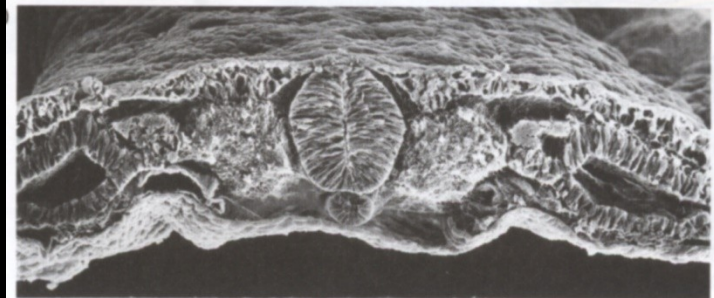
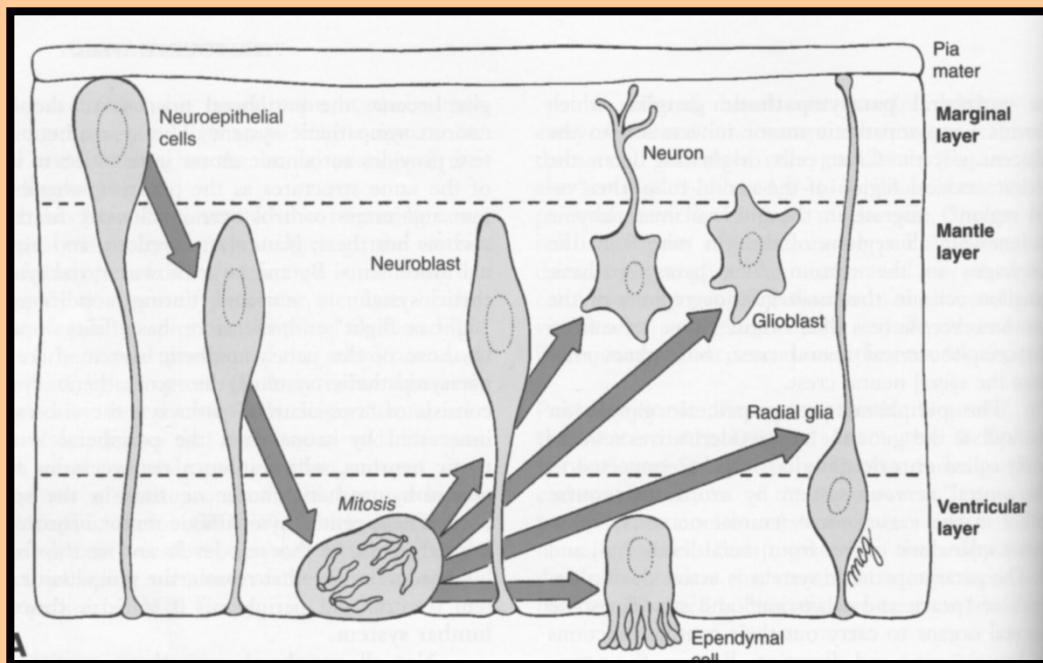
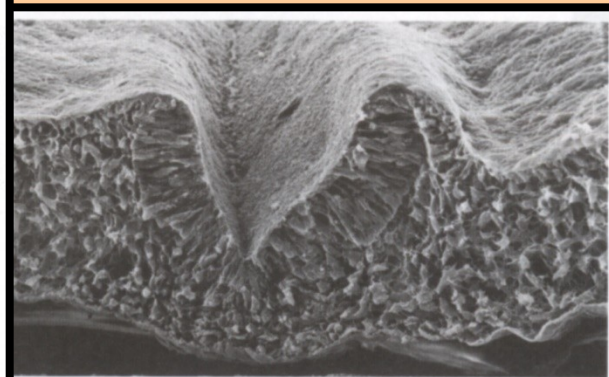
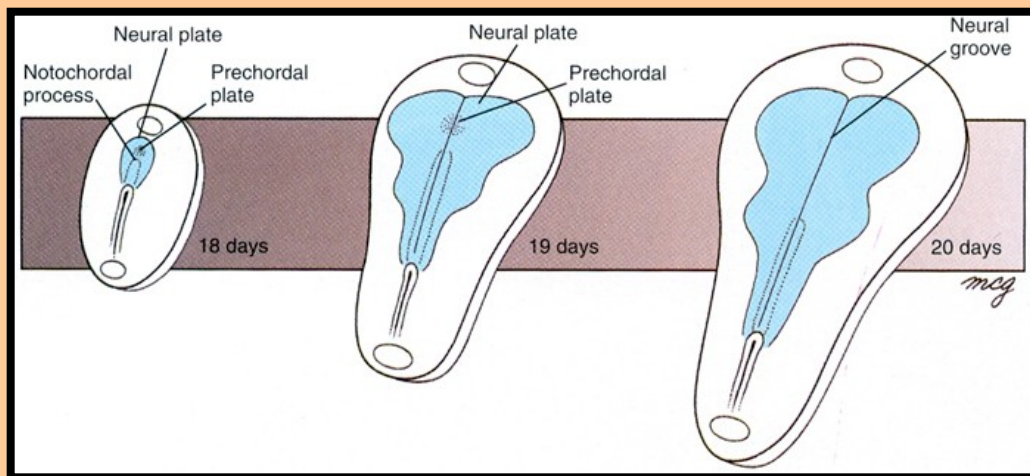
- NSC exprimují HIF.

(hypoxií indukovaný faktor)

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

# Původ NSC

- pozůstatek neurogenní populace z časné embryogeneze



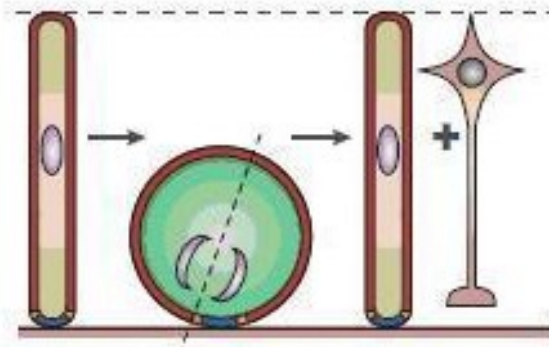
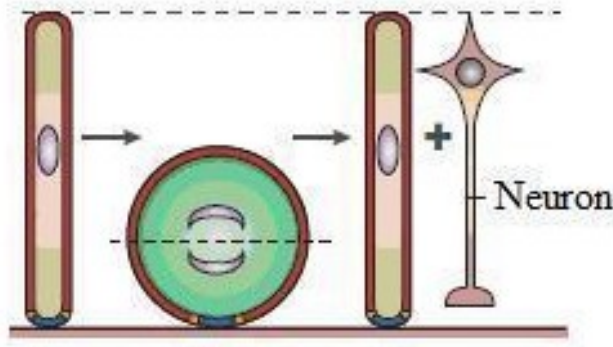
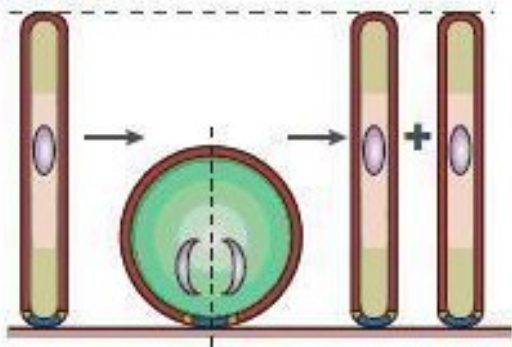
# Vertikální a horizontální dělení v neurogenním epitelu

**A**  
Symetrické, proliferativní dělení

**B**  
Asymetrické, neurogenní dělení

**C**  
Asymetrické, neurogenní dělení

Bazální strana



Apikální strana

Vertikální poloha dělení

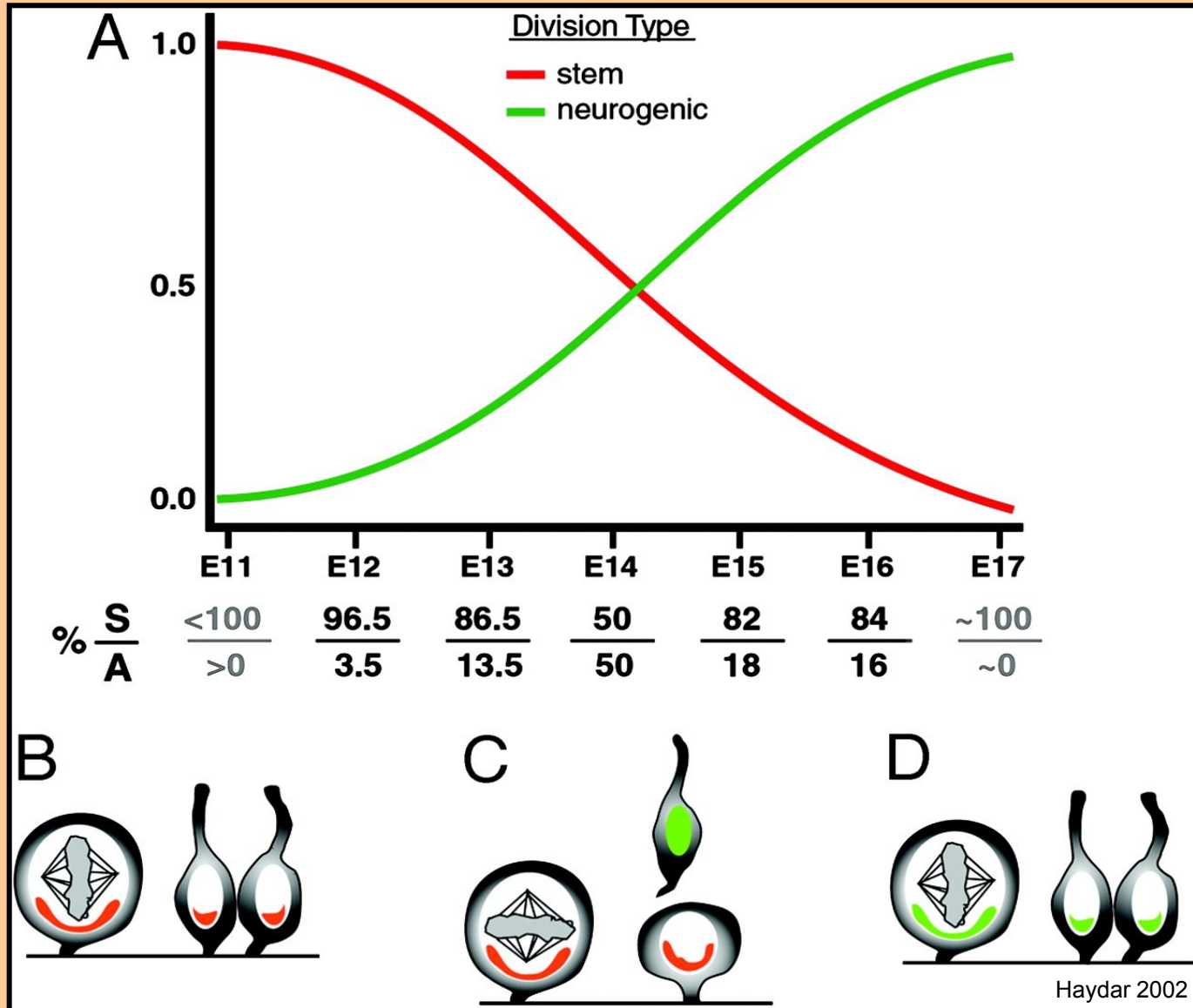
Horizontální poloha dělení

Vertikální poloha dělení

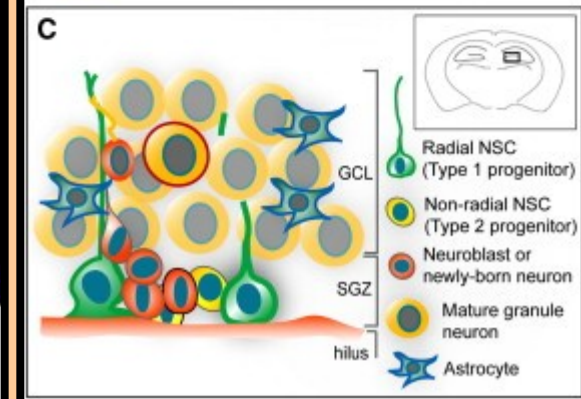
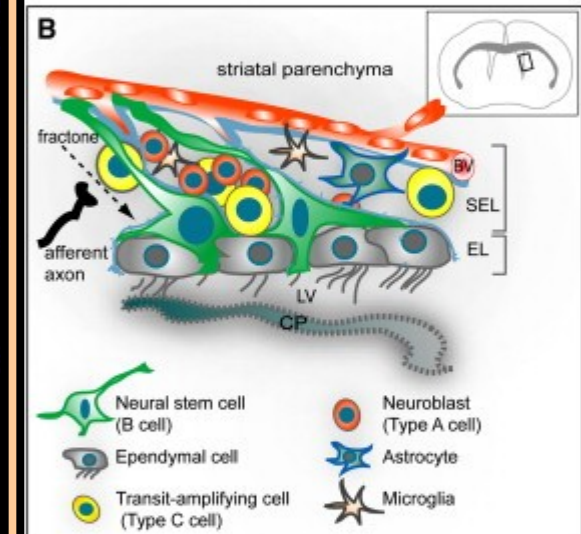
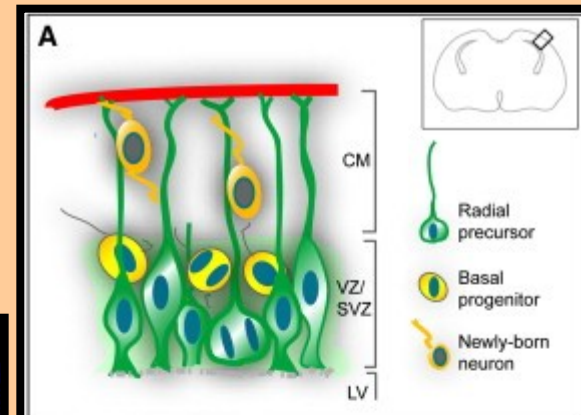
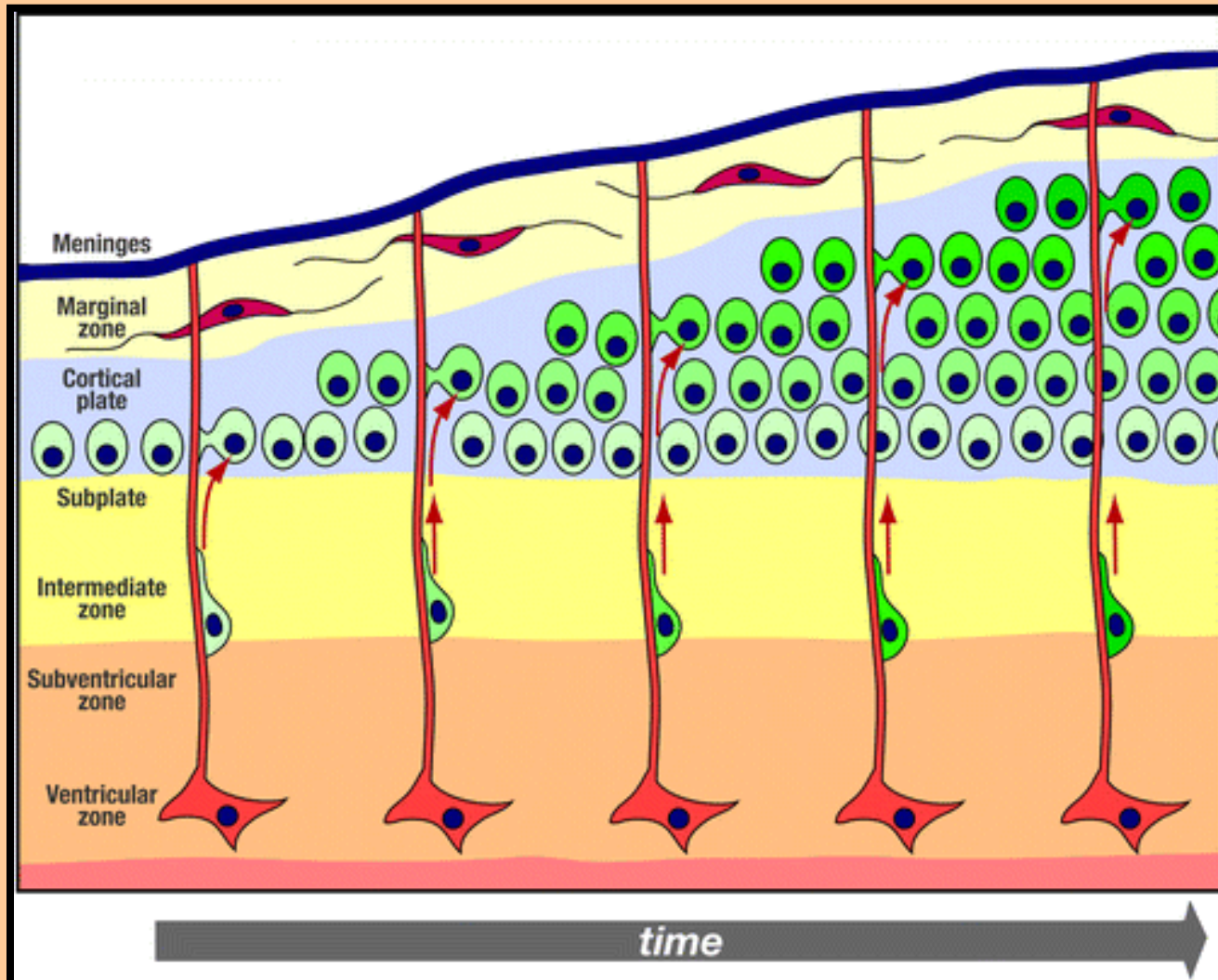
Jádru    
  Bazolaterální membrána    
  Přichycené spojení    
  Apikální membrána



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



# Vývoj CNS



# Radiální glie (RG) jako embryonální NSC

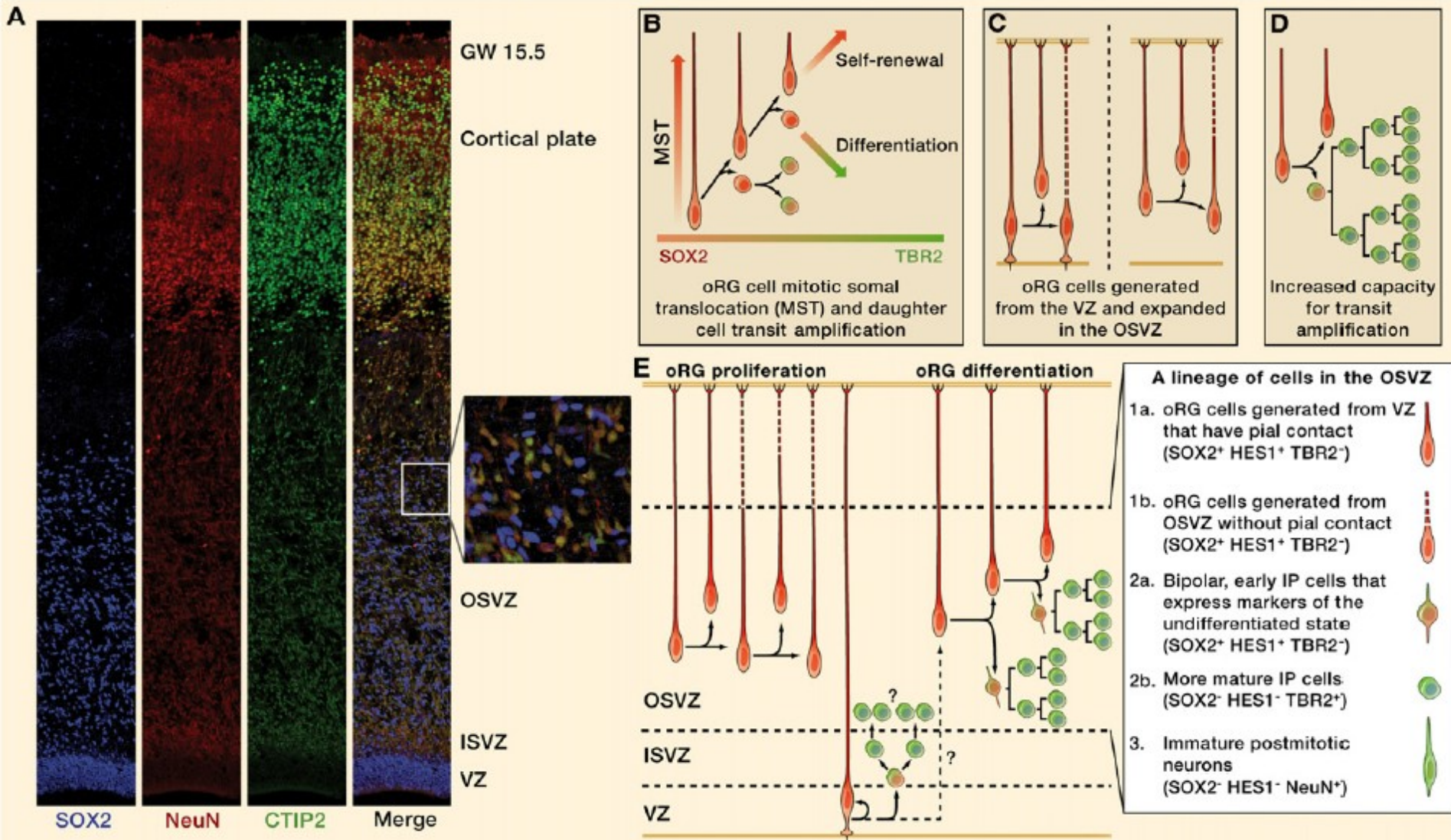
Nestin+, Vimentin+, GFAP+, Sox2+, Pax6+

vRG – bipolární RG, ventrikulární zóna

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

IP – přechodné progenitory

Lui et al., 2011

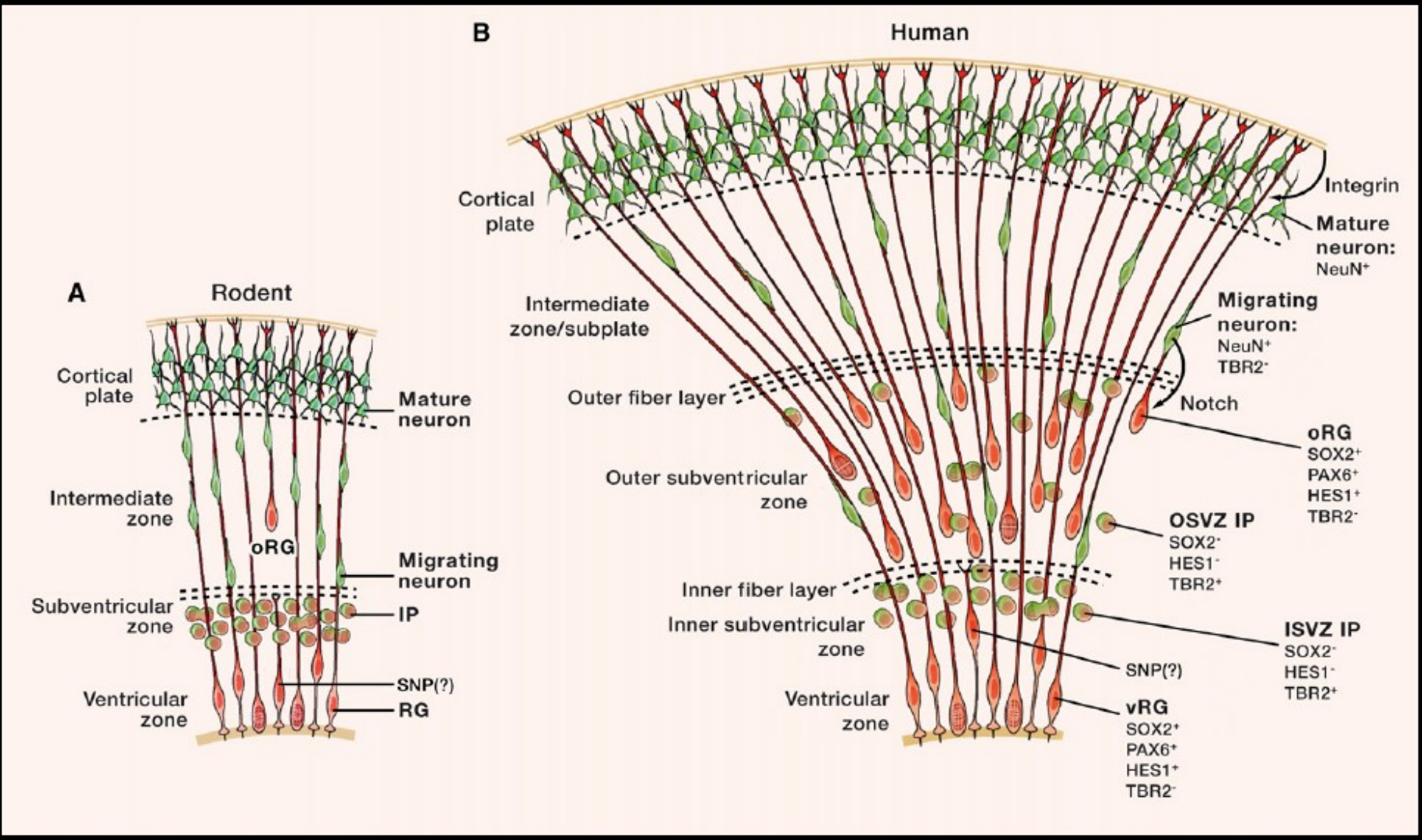


- A) Buňky exprimující znaky/markery charakteristické pro časné progenitory (Sox2) a neurony (NeuN a CTIP2) ve ventrikulární zóně neokortexu.
- B) Dělení oRG ve vnější vertikulární zóně
- C) RG/vRG dávají vznik jak vRG tak oRG, zda je vždy zachována délka radiál. fibril není známo
- D) oRG produkují přechodně/transiетně se dělicí 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), aPKC1, tj. součásti apikální membrány charakteristické pro apikálně-bazálně polarizovaných buněk.

# Schéma kortexu hlodavců (A) a člověka (B)

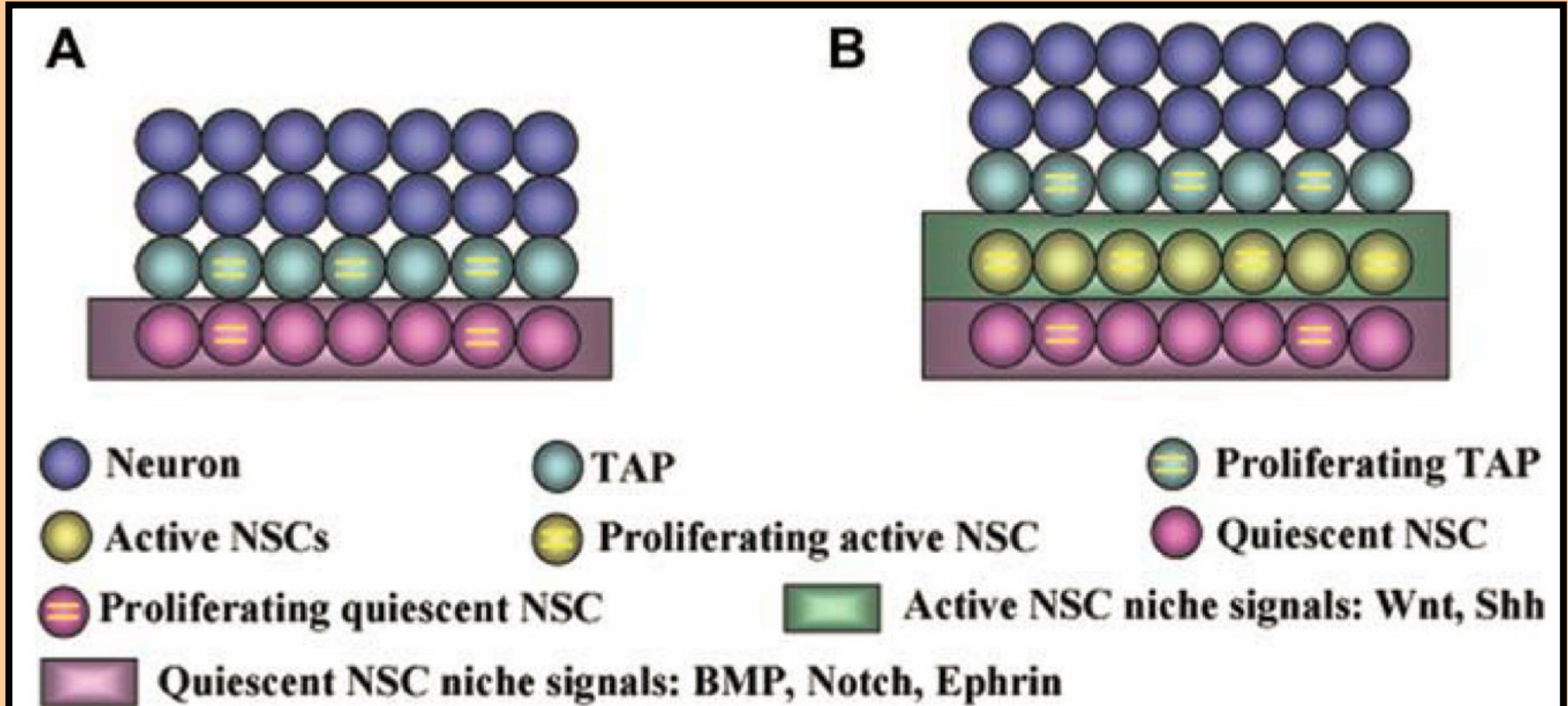
Lui et al., 2011



# Stratifikace buněk v germinální zóně neurogeneze

Quiescentní NSC<sup>1</sup> neexprimují nestin na rozdíl od aktivních NSC<sup>2</sup>

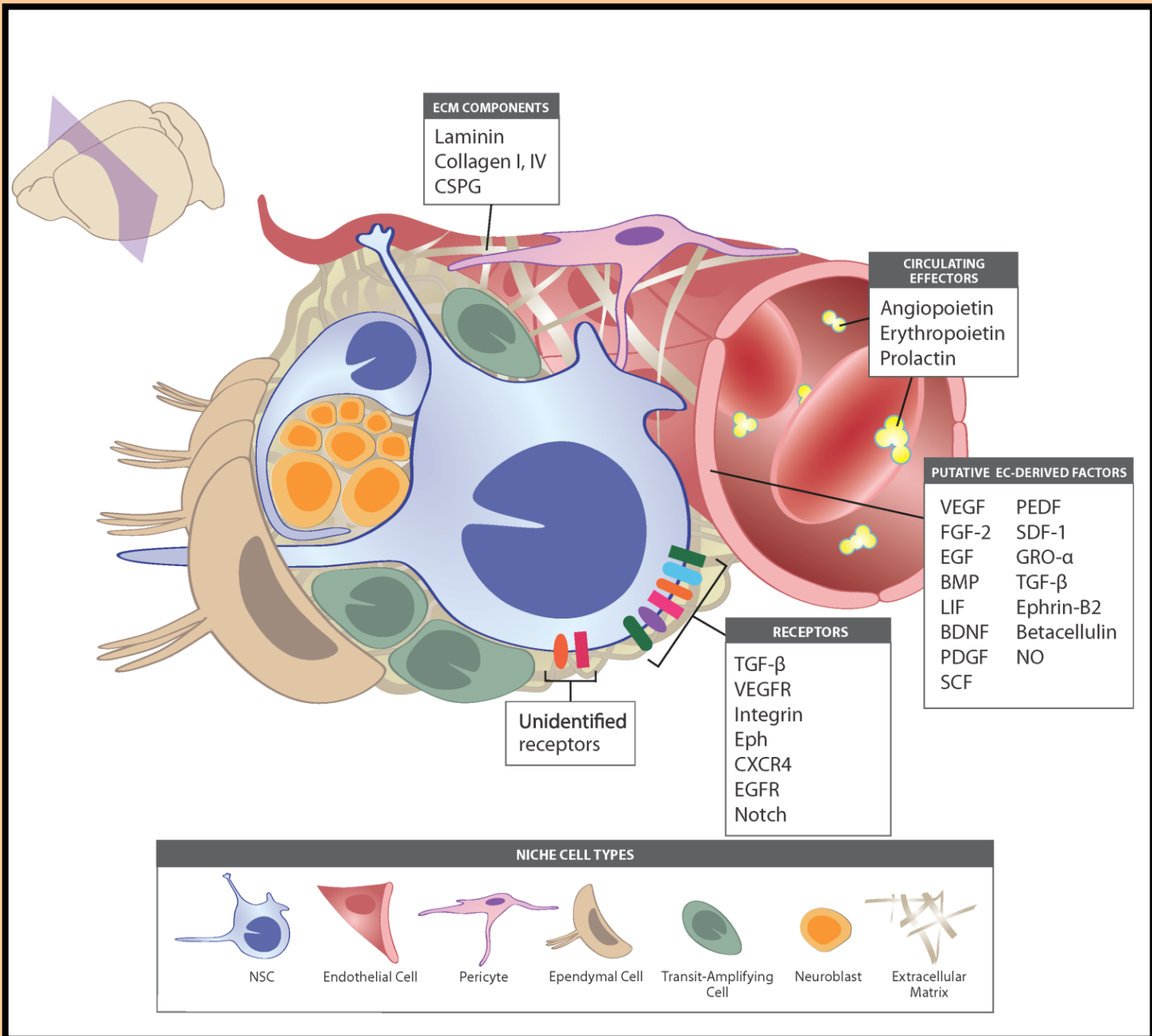
(<sup>1</sup> aktuální SC; <sup>2</sup> potencionální SC)

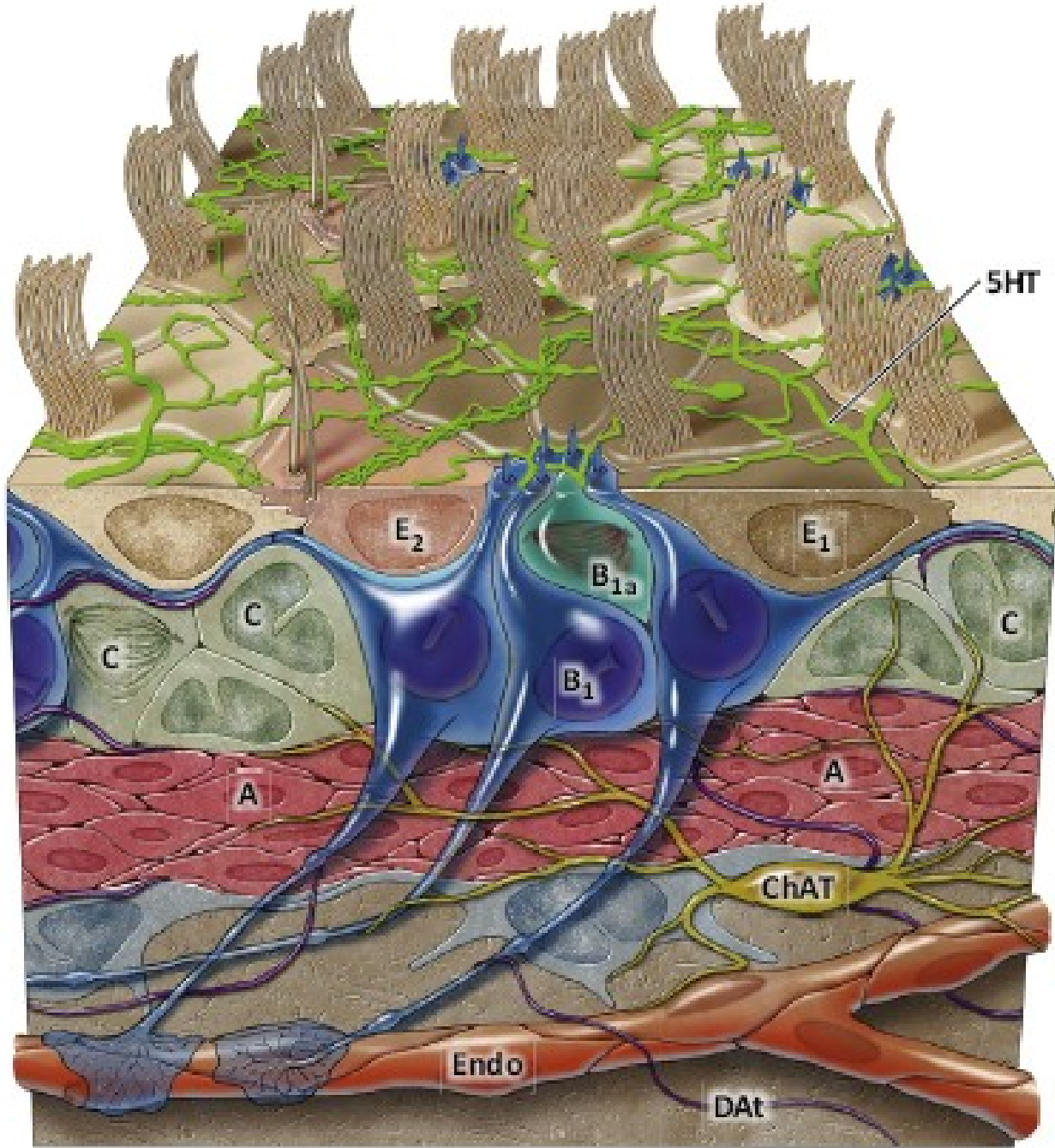


**Figure 1.**

A simplified model of adult neural stem cells (aNSCs) lineages. **(A):** In the traditional model, aNSCs are viewed as quiescent and directly give rise to transit amplifying progenitors (TAPs). **(B):** In the newly proposed coexistence model, active NSCs act as an intermediate between quiescent NSCs and TAPs. Active and quiescent NSCs are maintained by distinct niche signals. Abbreviations: BMP, bone morphogenetic protein; NSCs, neural stem cells; Shh, Sonic hedgehog; TAP, transit amplifying progenitors.

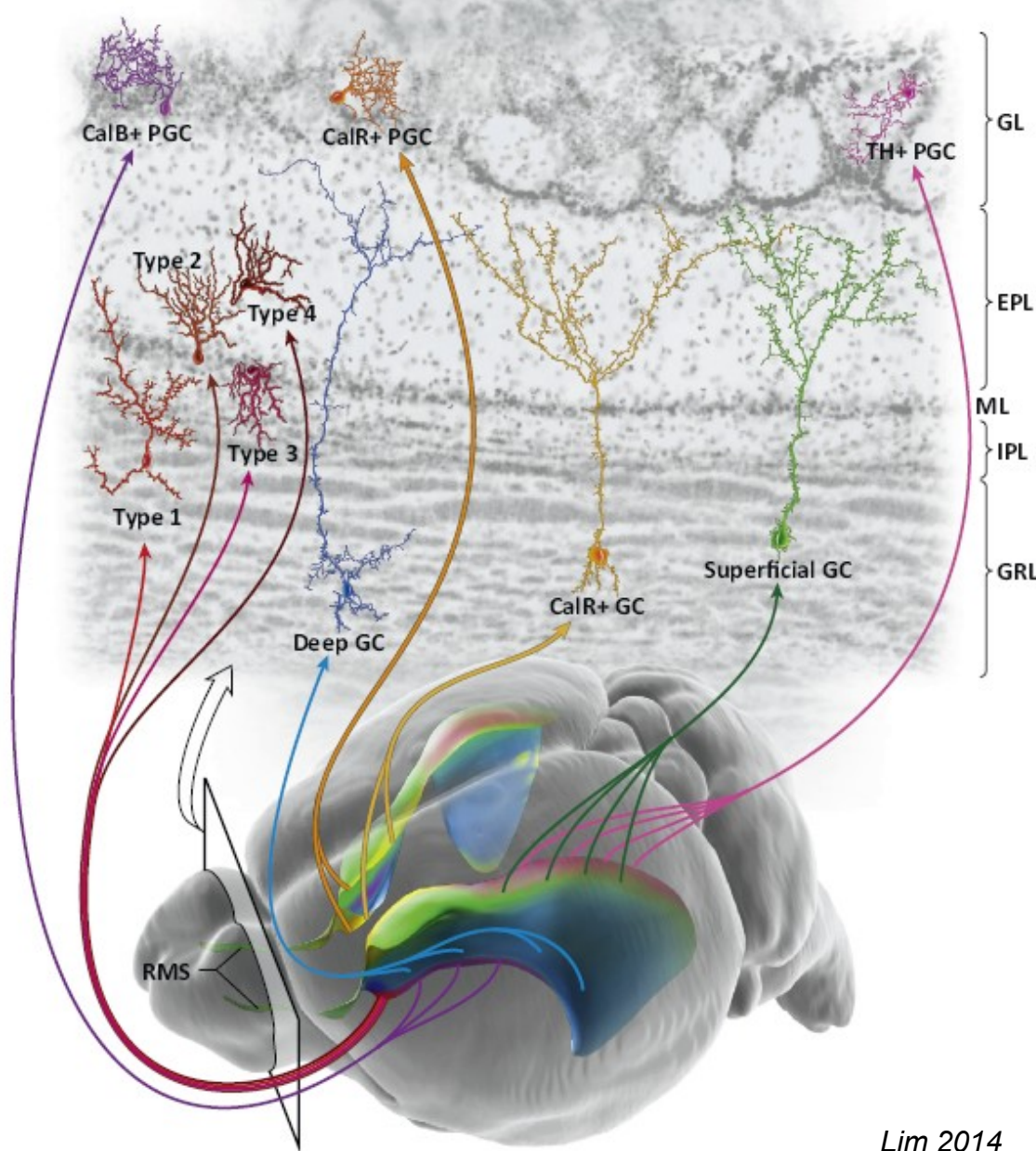
# Regulate NSC





V-SVZ NSCs (dark blue), give rise to activated B1 cells (B1a, light blue) that actively divide. Activated B1 cells generate the transit-amplifying C cells (green) which, after three rounds of divisions, give rise to A cells, the migrating neuroblasts. Note that B1 cells contact the ventricle with an apical process. This adult VZ is also populated by ependymal cells E1, multiciliated cells that together with the apical endings of B1 cells from pinwheel structures on the surface. Coursing along this ventricular surface is a rich network of serotonergic axons (5HT, bright green). The basal processes of B1 cells have endings on blood vessels. Choline acetyltransferase (ChAT)-positive neurons (olive brown) found in the region have endings in the SVZ. Dopaminergic terminals (DAT, purple) are also observed in this region.





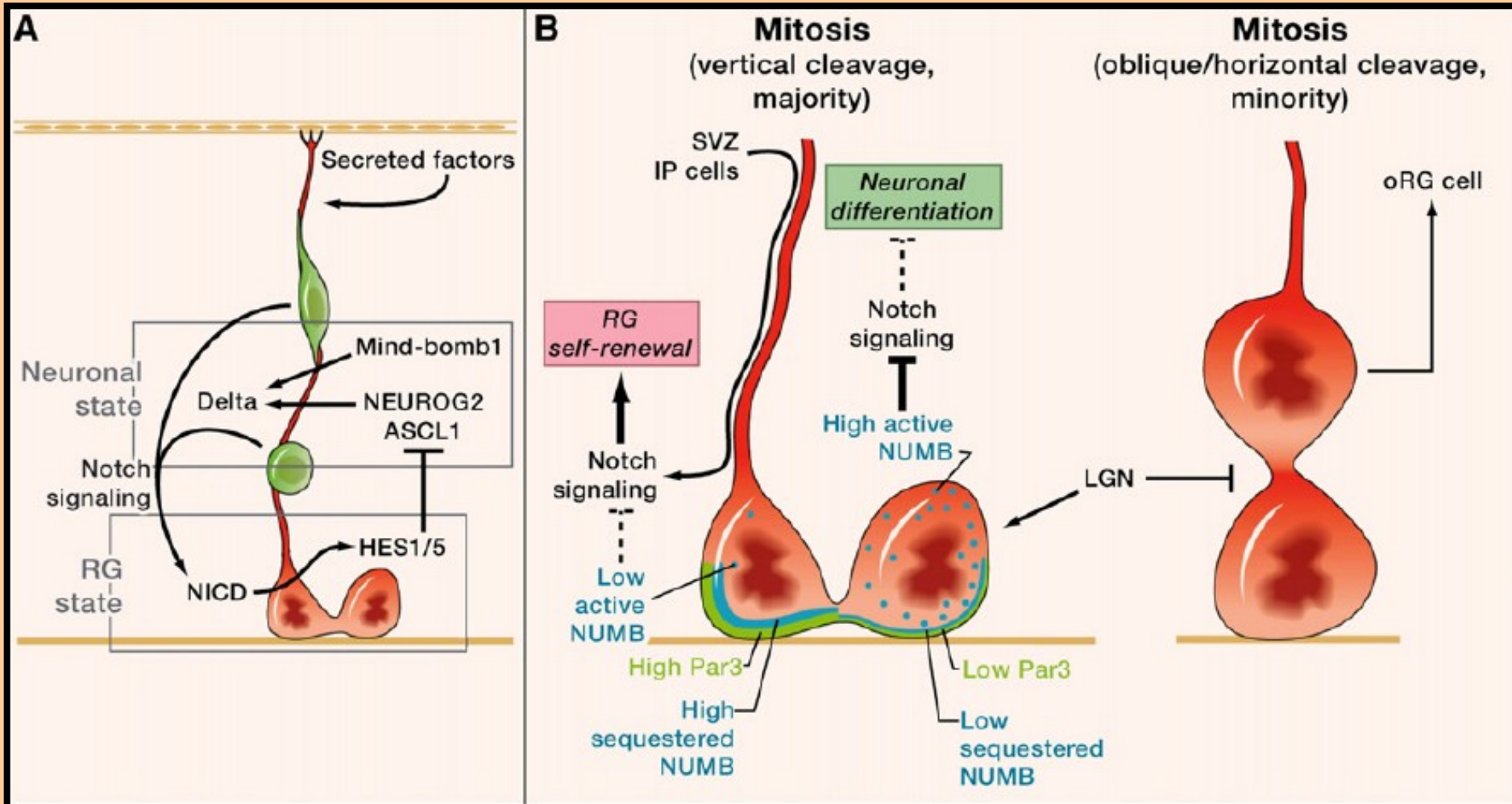
Cells born in different subregions of the adult V-SVZ migrate along the rostral migratory stream (RMS) into the olfactory bulb to give rise to unique types of interneurons. Examples of three types of granular cells (GC) [green: superficial; yellow: calretinin (CalR)superficial; blue: deep], three subtypes of periglomerular cells [pink: tyrosine hydroxylase (TH); orange: calretinin (CalR); purple: calbindin (CalB)] and four novel subtypes (type 1-4) of interneurons derived from the most anterior V-SVZ [27] are indicated in the top section of the olfactory bulb. Abbreviations: CalB, calbindin; CalR, calretinin; TH, tyrosine hydroxylase; PGC, periglomerular cell; GC, granule cell; GL, glomerular layer; EPL, external plexiform layer; ML, mitral cell layer; IPL, internal plexiform layer; GRL, granular layer.

Lim 2014

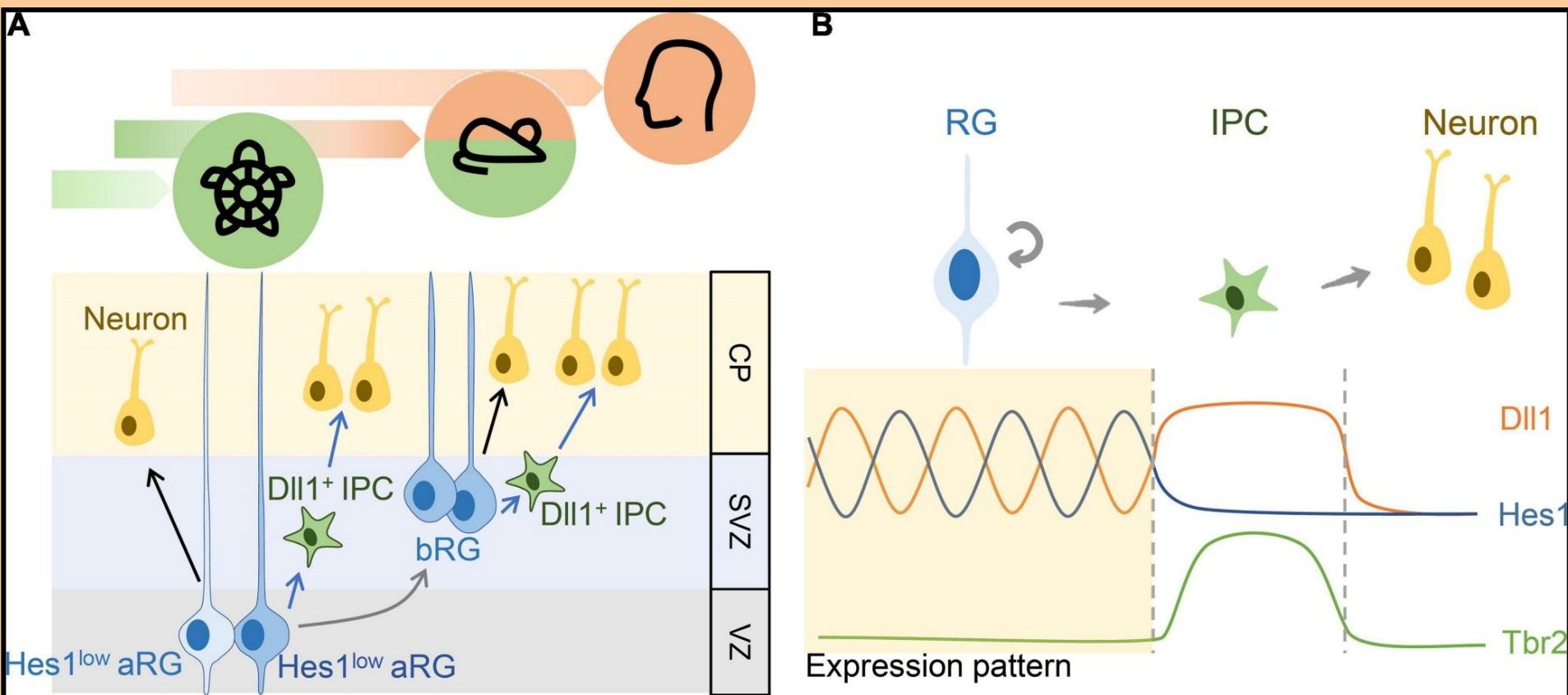
# Mechanismus regulace RG buněk – Notch dráha

- 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



# Neurogeneze – Notch dráha



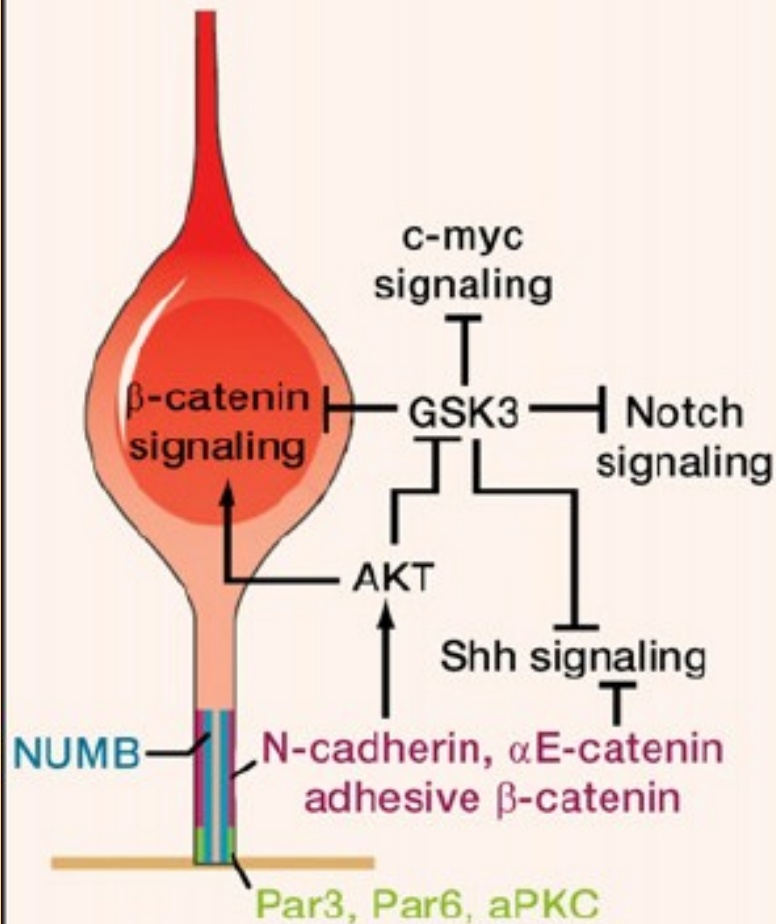
**DLL1 – Delta-like 1 / ligand Notch**

**Hes1 – Notch target /TF**

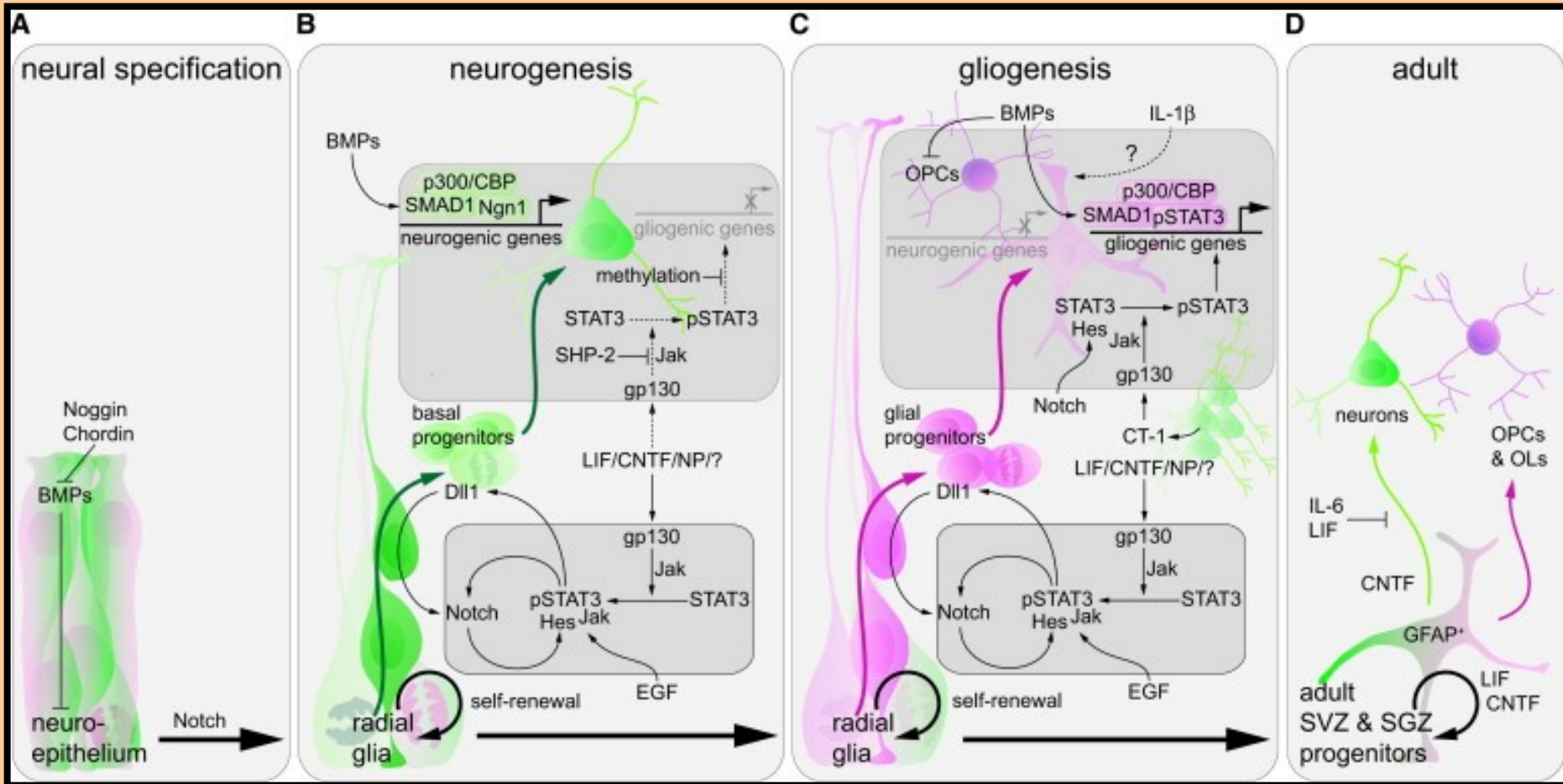
**Tbr2 – Eomesodermin (EOMES) / T-box brain protein 2**

**C**

## Interphase



Regulace klíčových signálních drah komponentami asociovanými s vazbou na bazální membránu + (Wnt) GSK3 signalizace

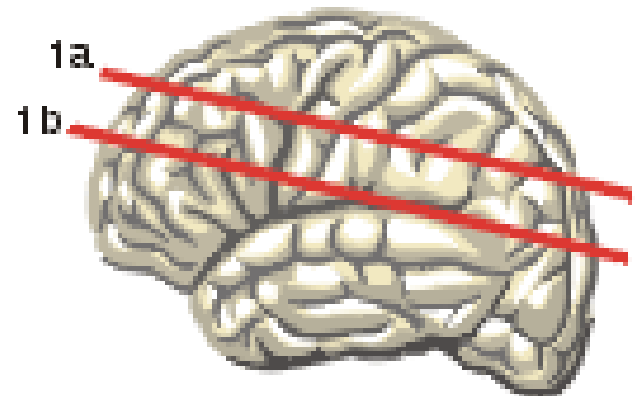
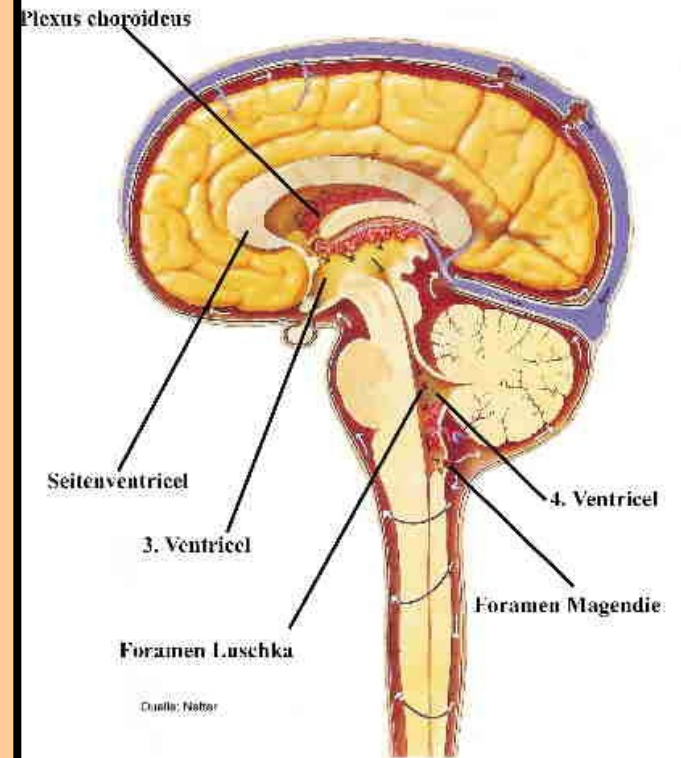
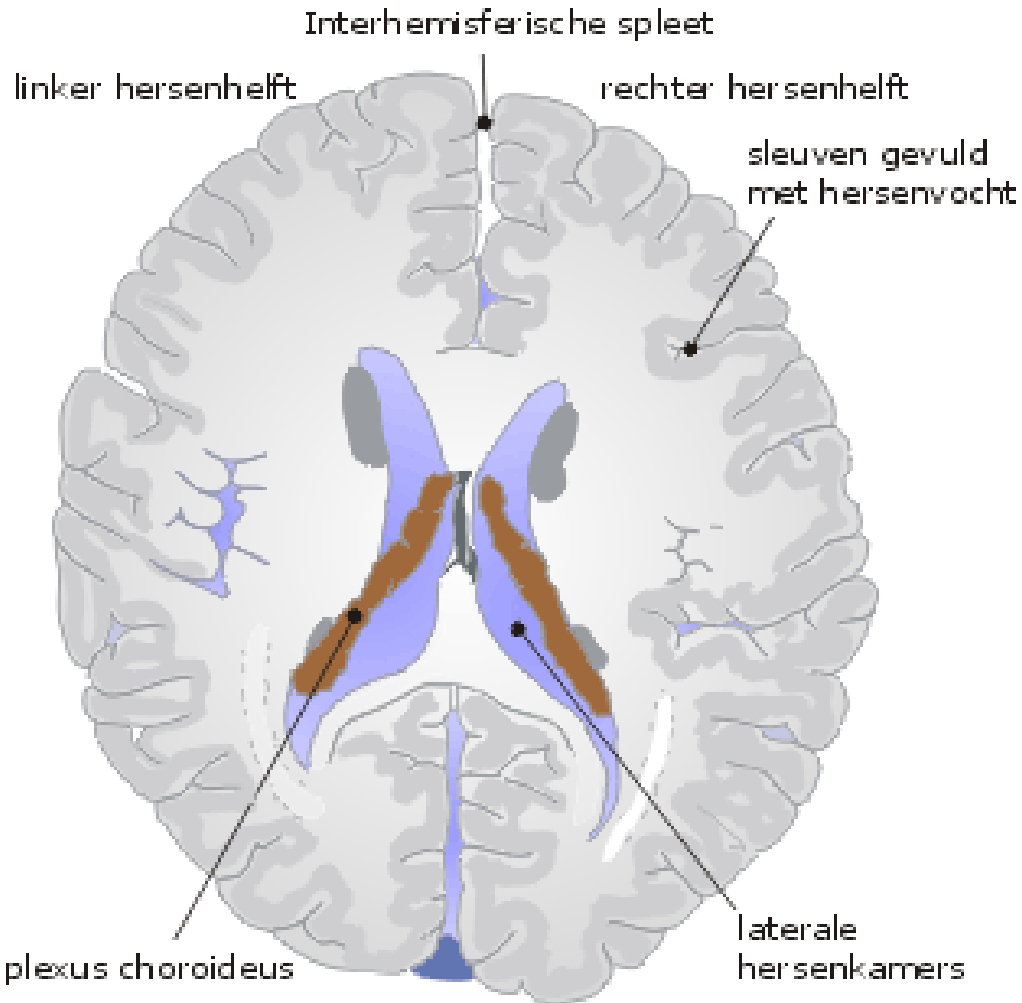


## Dvojitá úloha Notch a gp130/STAT3 signalizace v neurogenezi

- 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

- 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 drahou/signalizací.
- LIF/gp130 signalizace působí pleiotropně, u zralejších progenitorů indukuje diferenciaci do glií, zejména astrocyty (důležitá demethylace gliálních genů), a celkově podporuje maturaci neuronů, zejména motoneuronů.

# *Plexus choroideus*



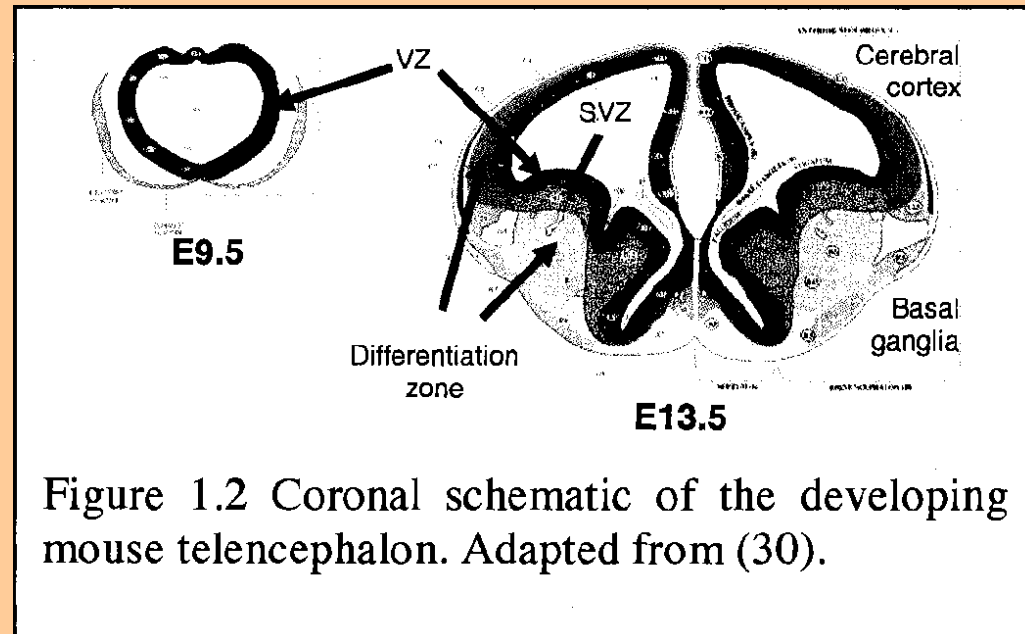
V průběhu embryogeneze jsou NSC tzv. radiální glie ventrikulární zóny  
(vRG + oRG)

Adultní NSC jsou:

1) radiálním gliím podobné buňky, jako v průběhu embryogeneze

2) adaptované/pozměněné časné přechodné progenitory (IP)?

3) v dospělém mozku nejsou  
kmenové buňky s neomezenou  
schopností sebeobnovy,  
existují pouze IP schopné  
několika cyklů dělení

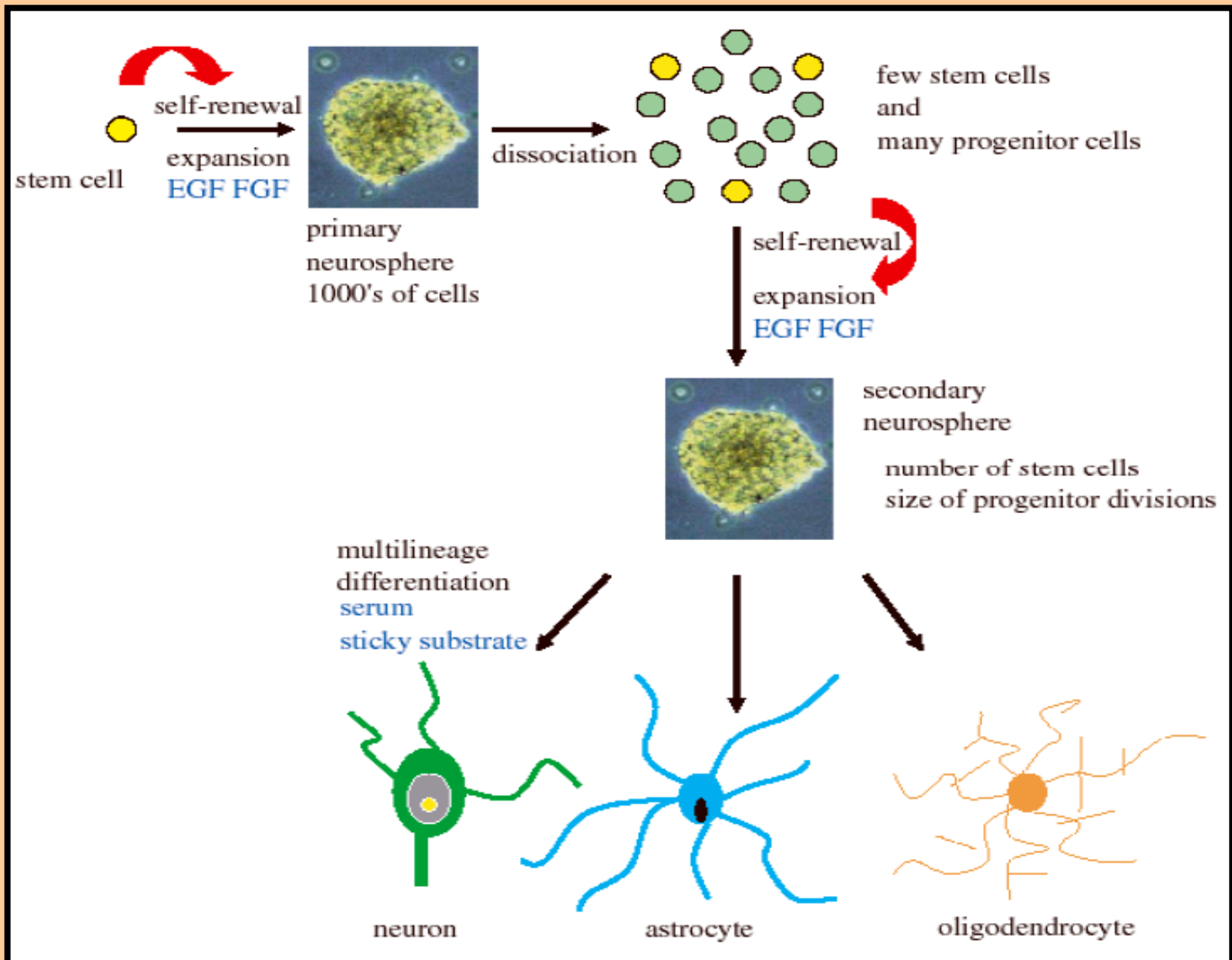


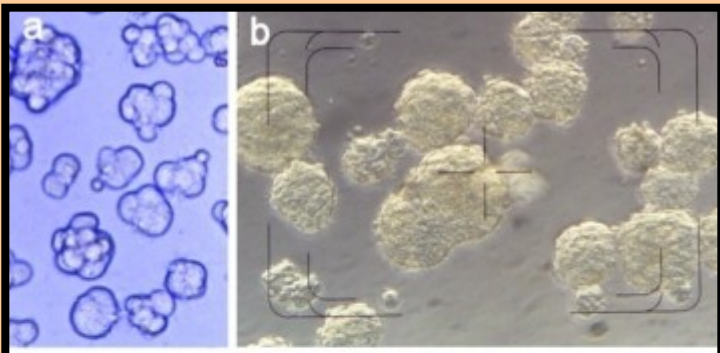


## Zobecněné vlastnosti NSCs

- ❖ 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 neuronů 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

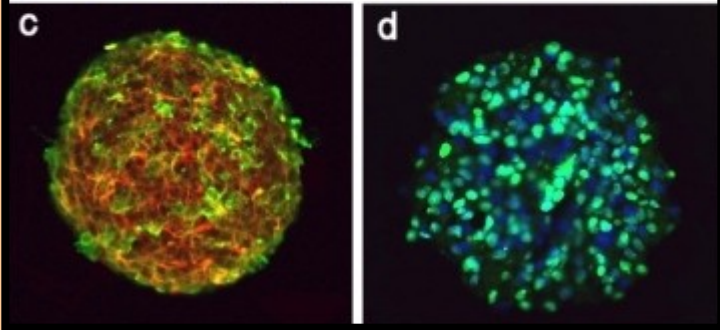
# Příprava neurosfér, primární a sekundární neurosféry (Dirks, 2008)



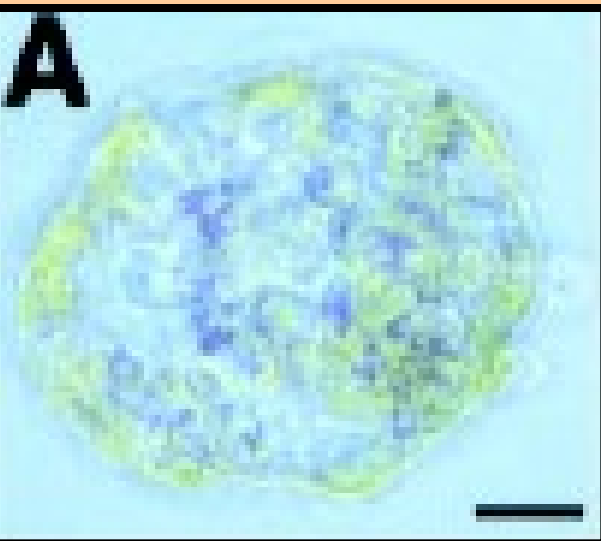


## In vitro kultivace NSC – neurosféry

c) EGFR + nestin; d) BrdU + buněčná jádra

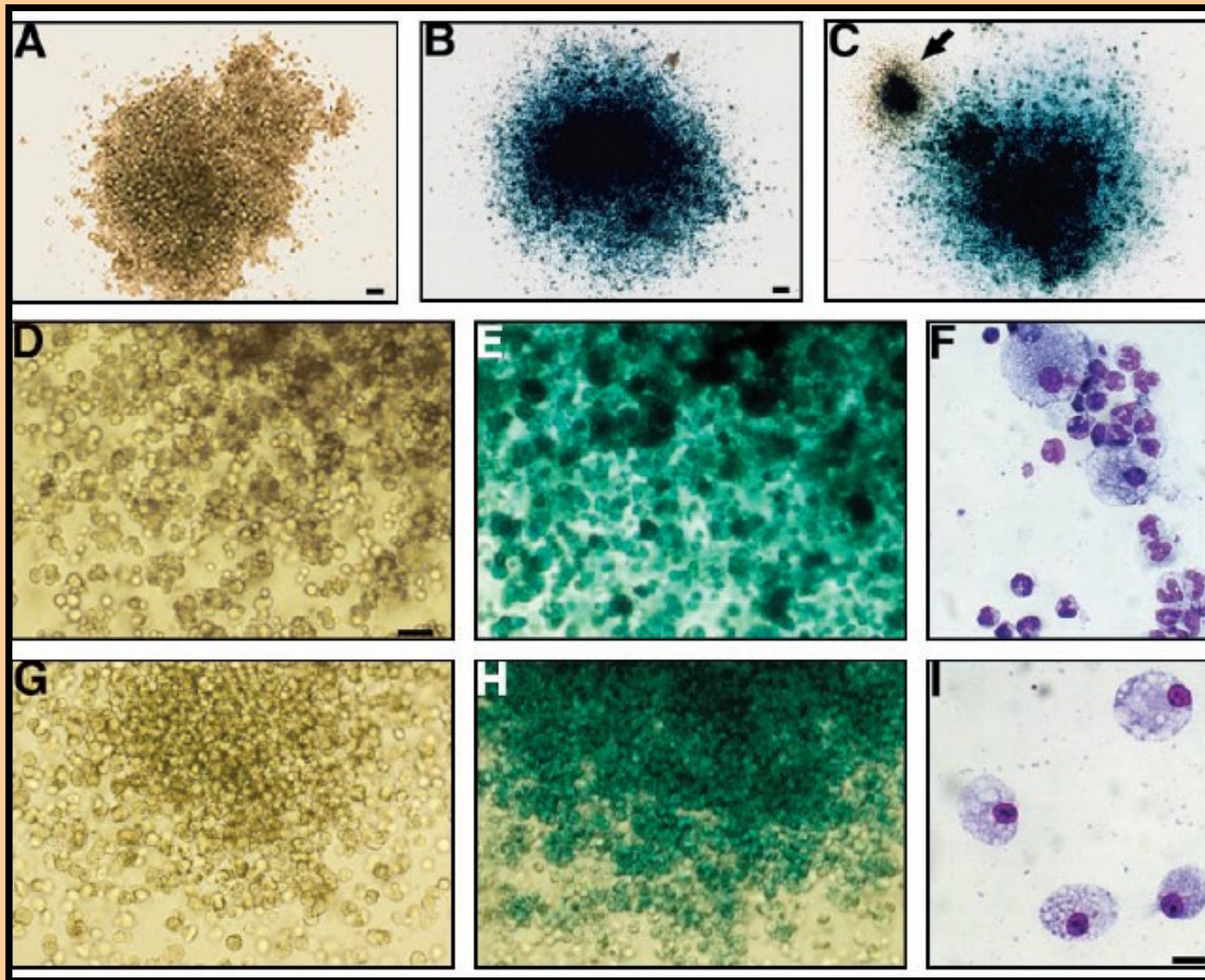


Clarke 2000



← 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

Muller glia regenerate neurons in retina, no in adult, base in Ascl1 expression