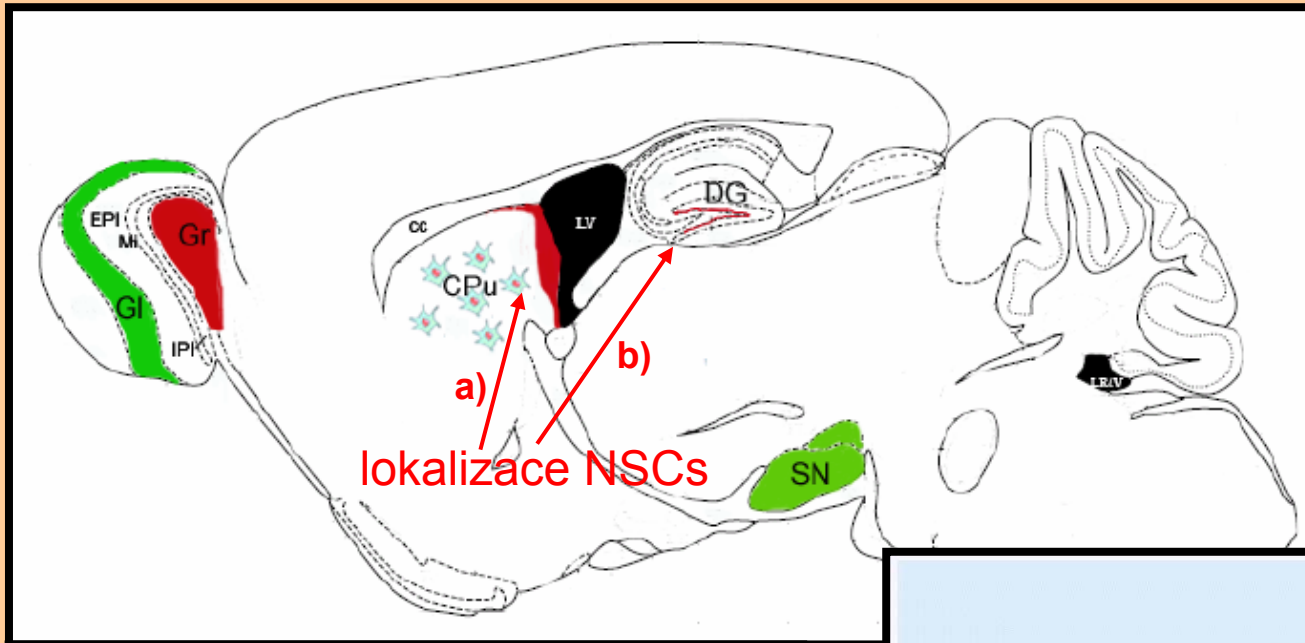
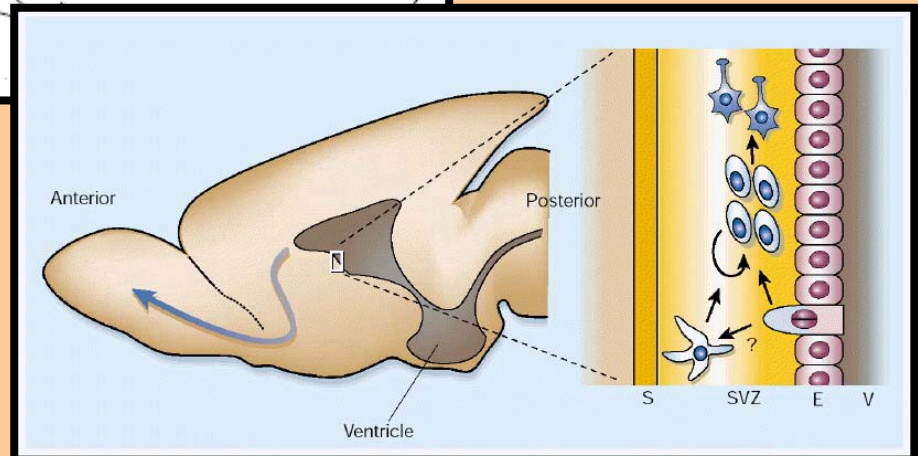


# Neurální kmenové buňky – NSCs (Neural stem cells)



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**

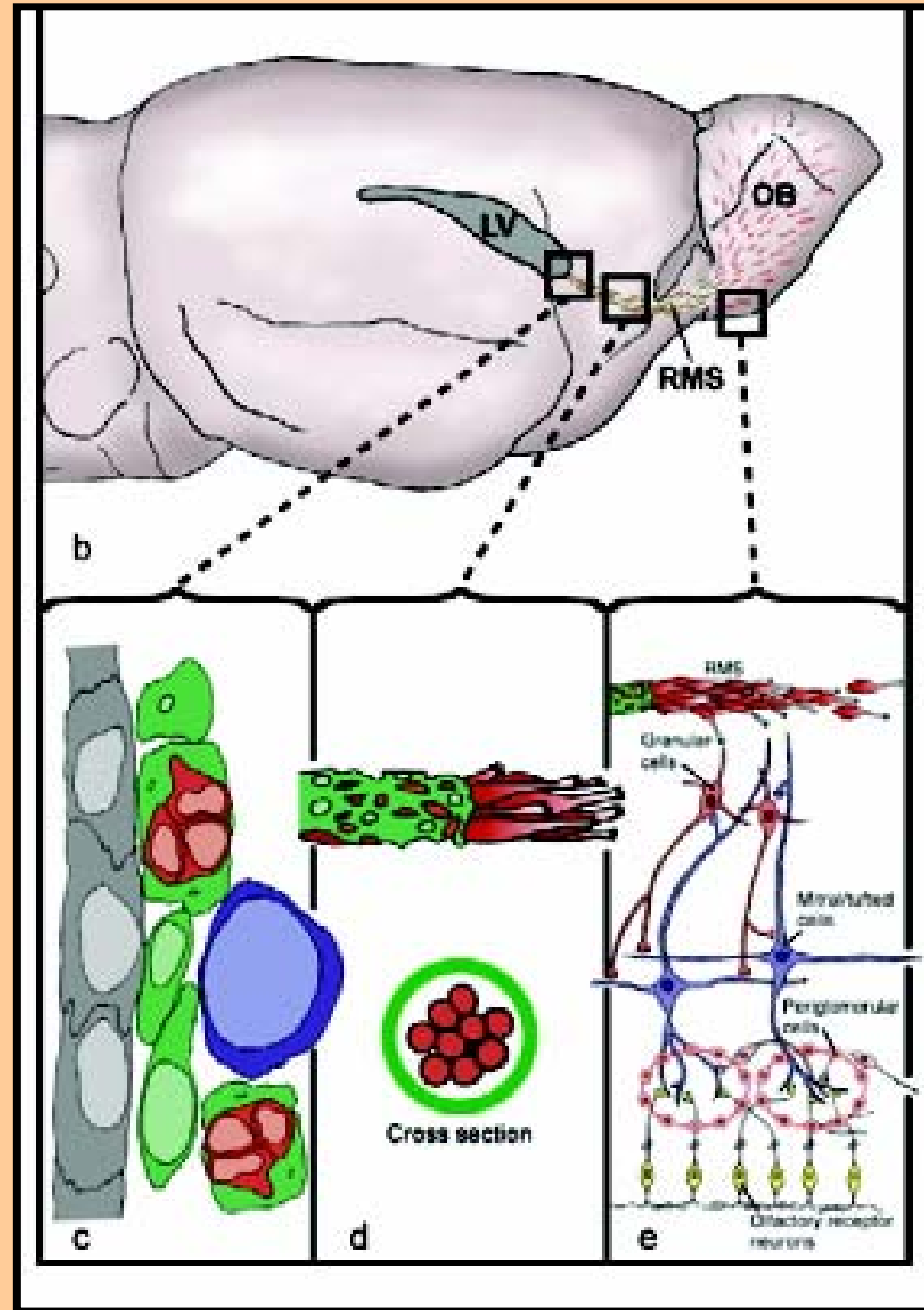
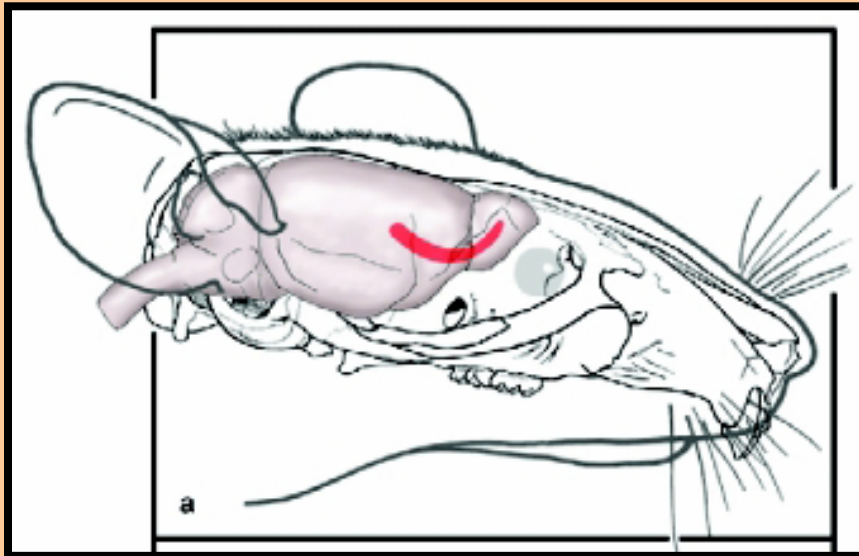


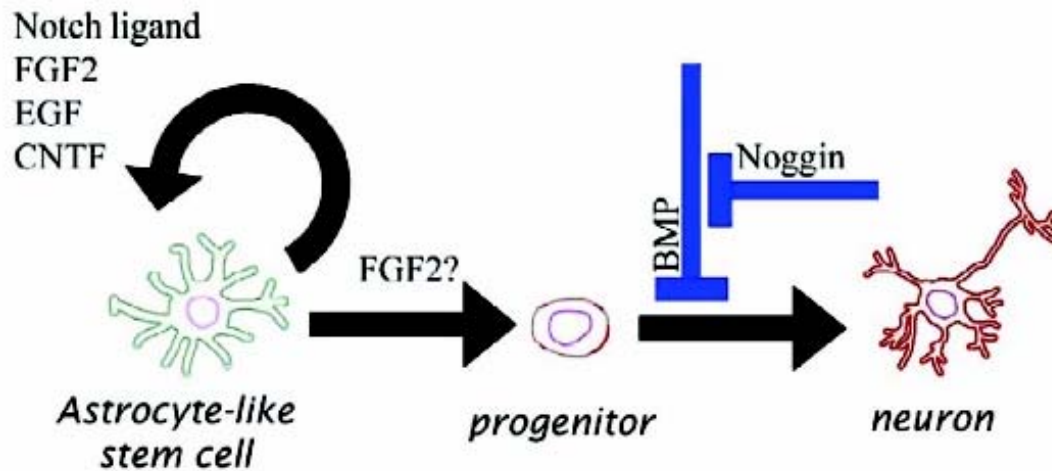
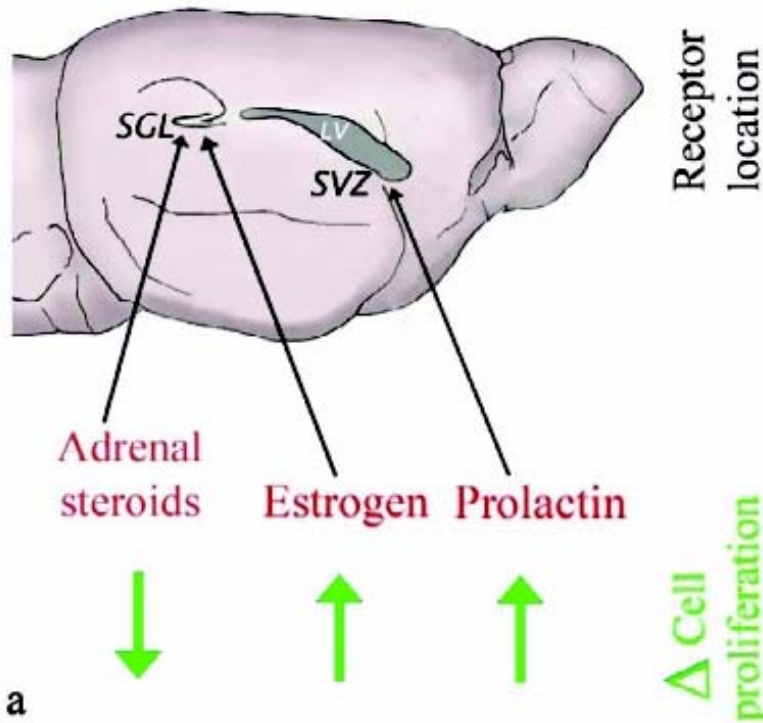
## Neurogeneze v dospělosti!

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

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

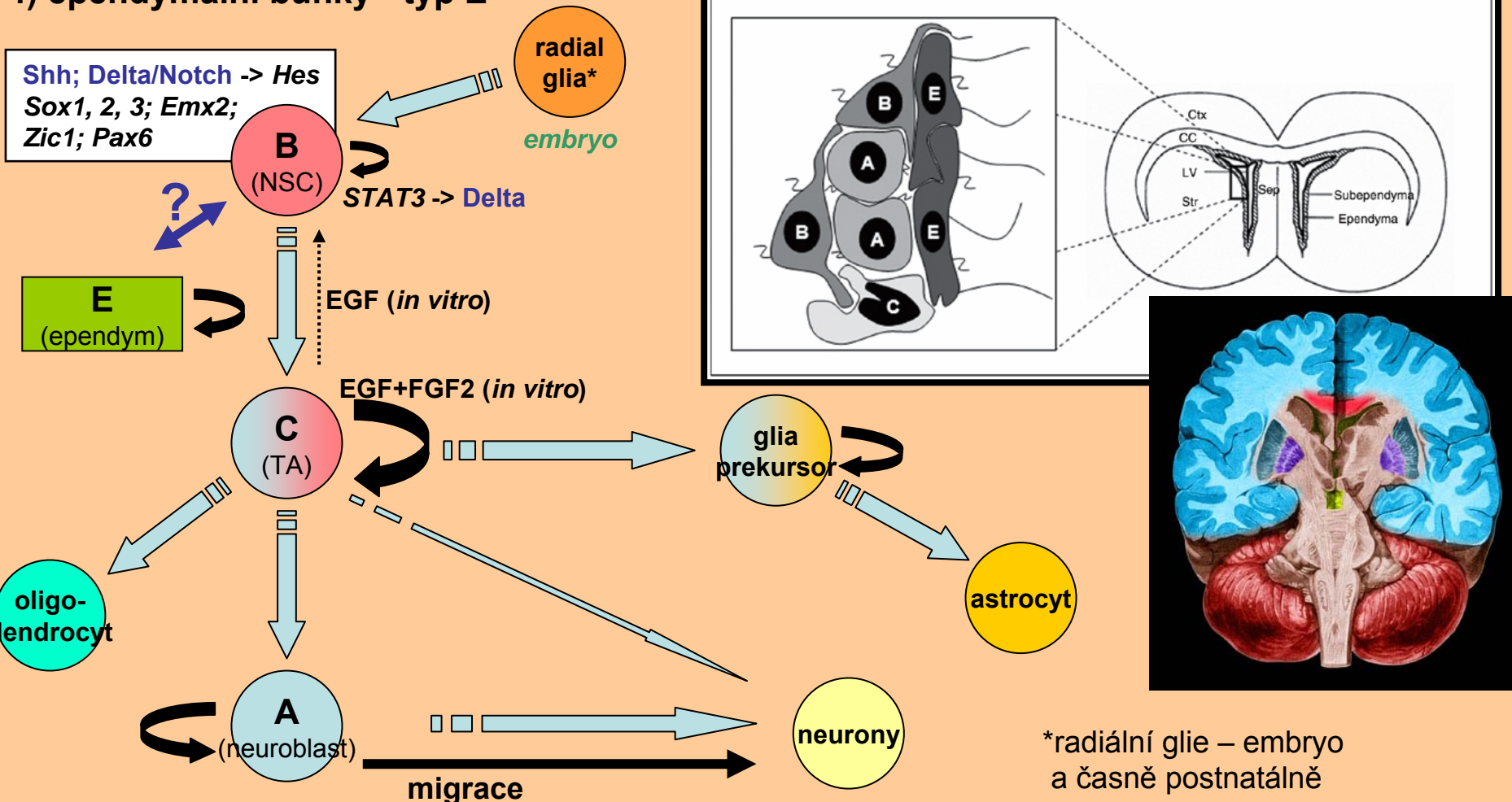
**RMS** – rostrální migrační tok  
(rostral migratory stream)



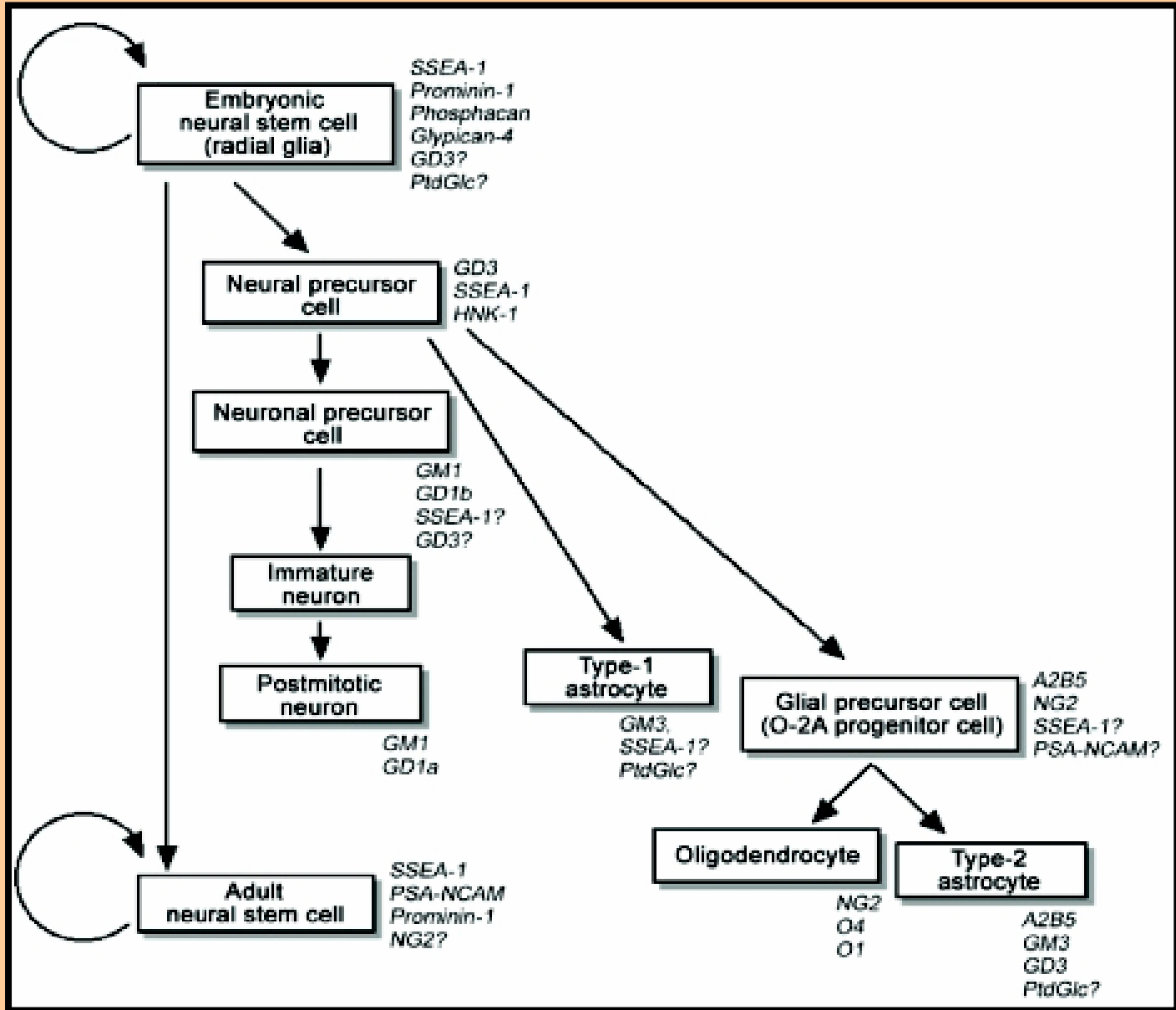


# Oblast s NSCs obsahuje čtyři typy buněk

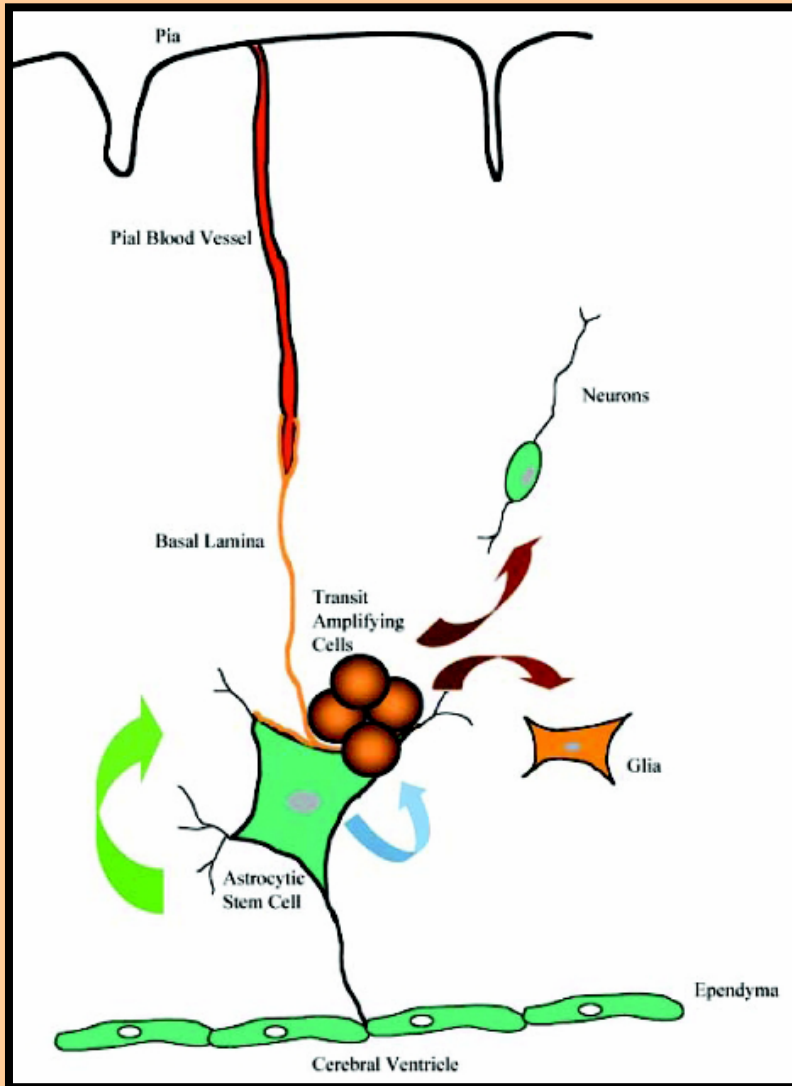
- 1) pomalu proliferující, astrocytům podobné (GFAP<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>/SSEA1<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>) buňky - typ B = NSCs (přesný fenotyp není dosud úplně objasněn - ±GFAP??, ± nestin ??)
- 2) spící, případě potřeby intenzivně proliferující buňky vzniklé z buněk B - typ C (TA progenitory,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



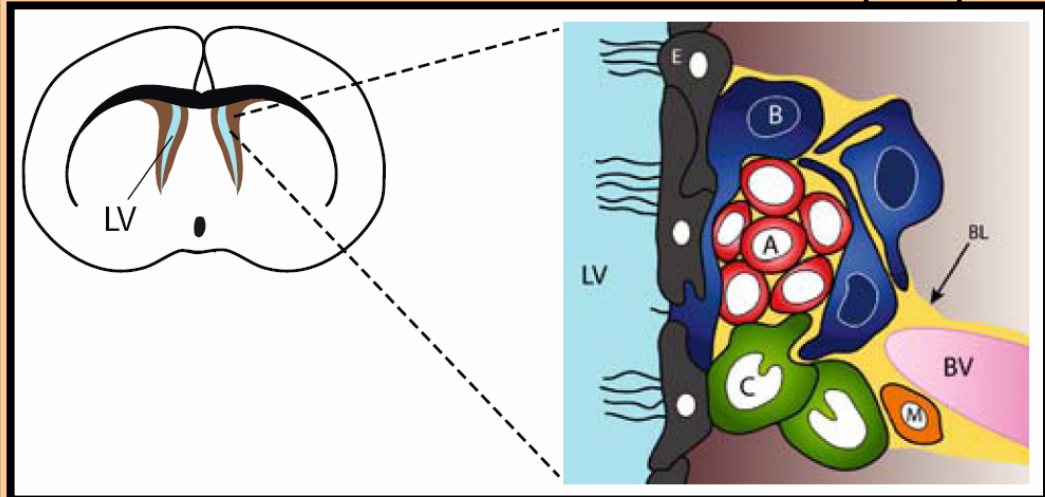
# Fenotyp neurálních kmenových buněk



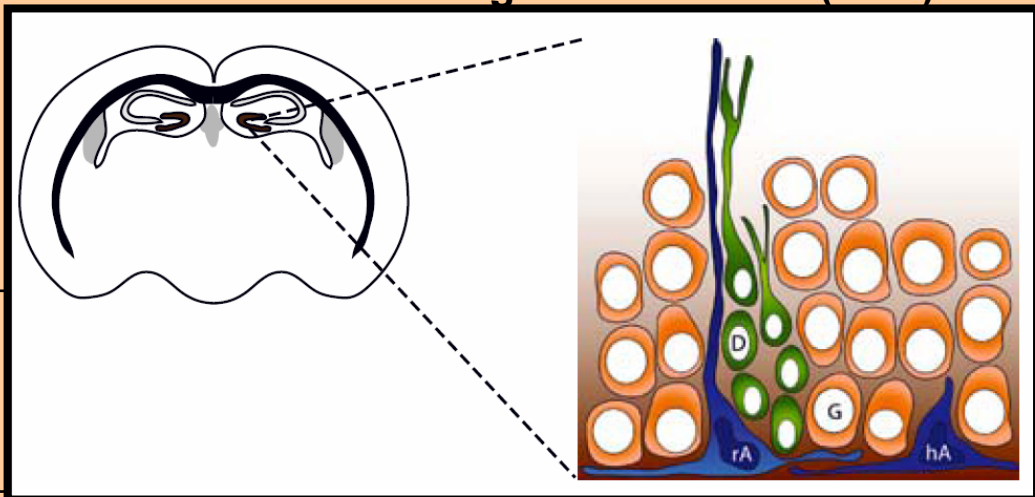
# „Niche“ neurálních kmenových buněk



## Architektura v subventrikulární zóně (SVZ)



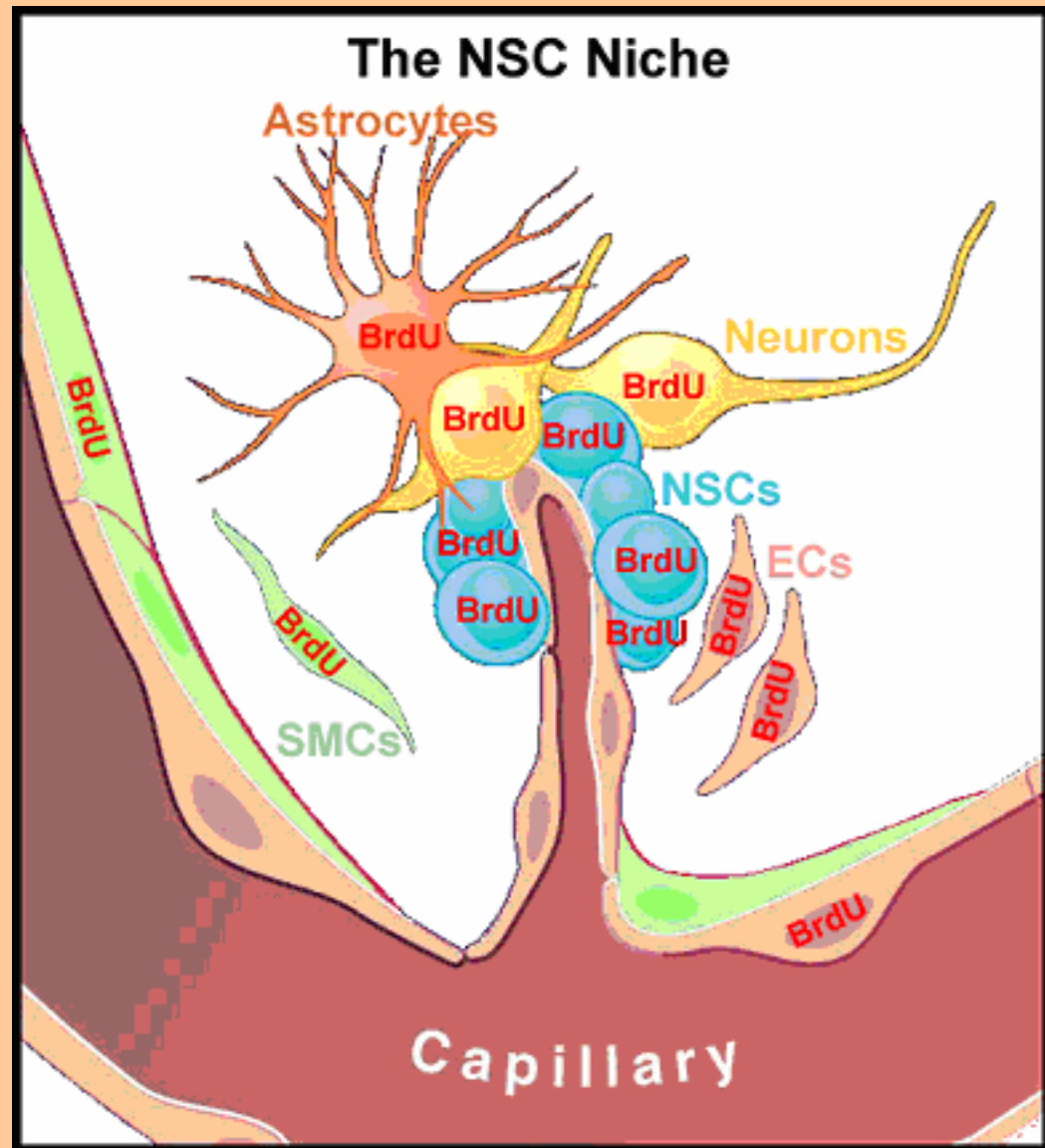
## Architektura v subgranulární zóně (SGZ)



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

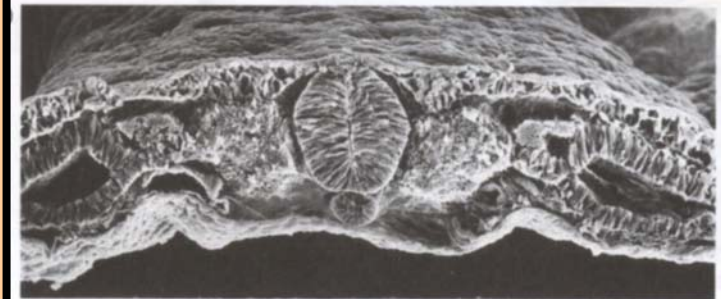
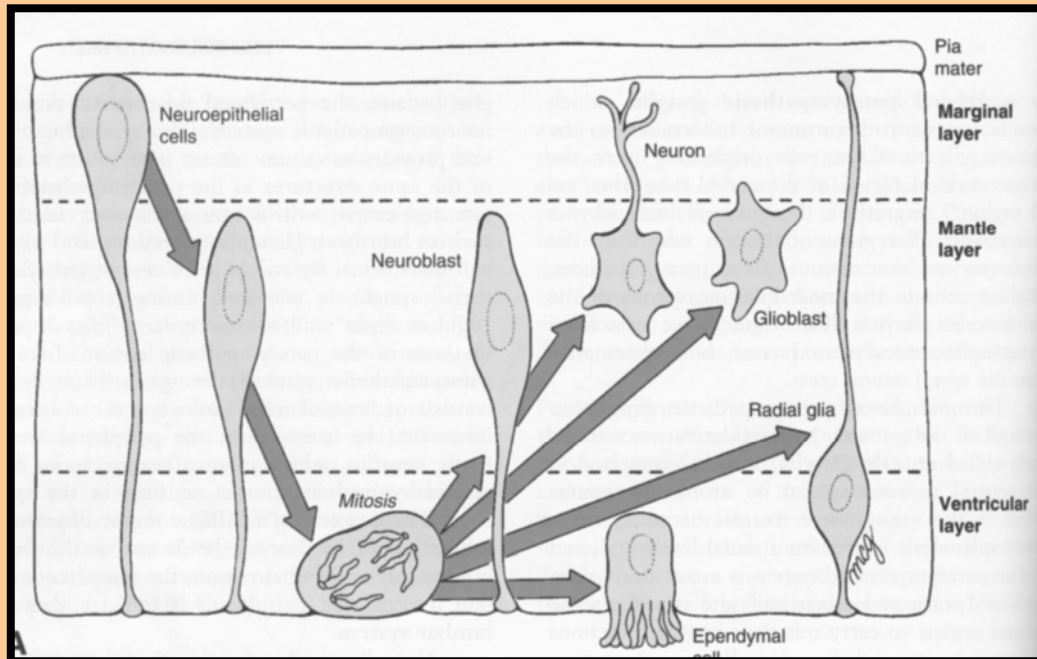
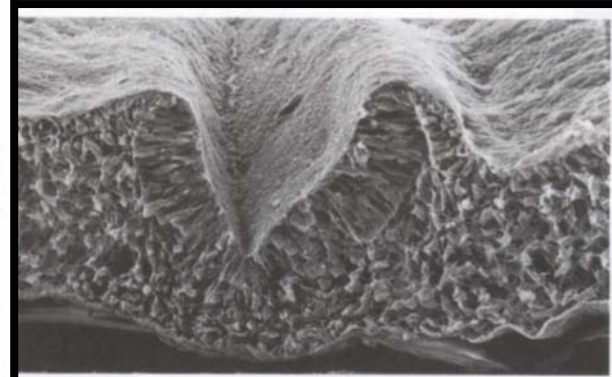
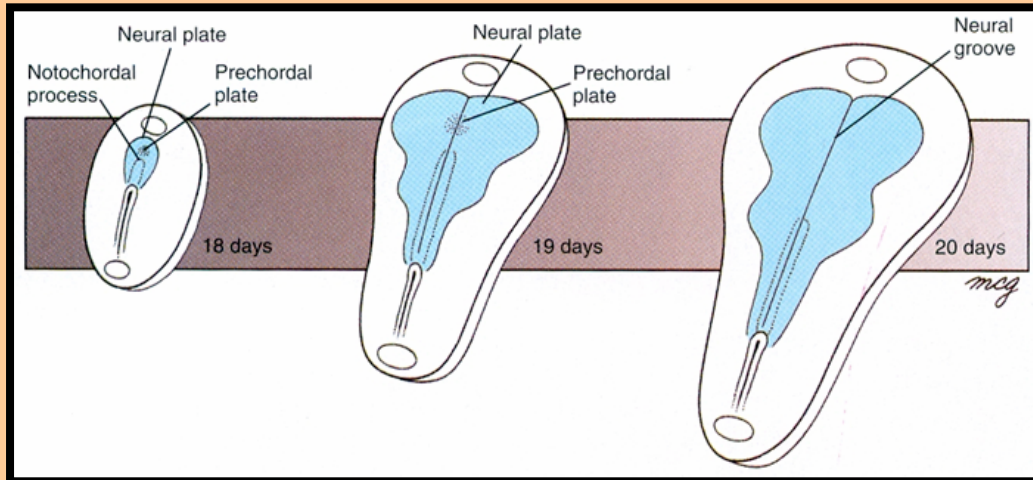
## NSC přisedají na krevní kapiláry

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



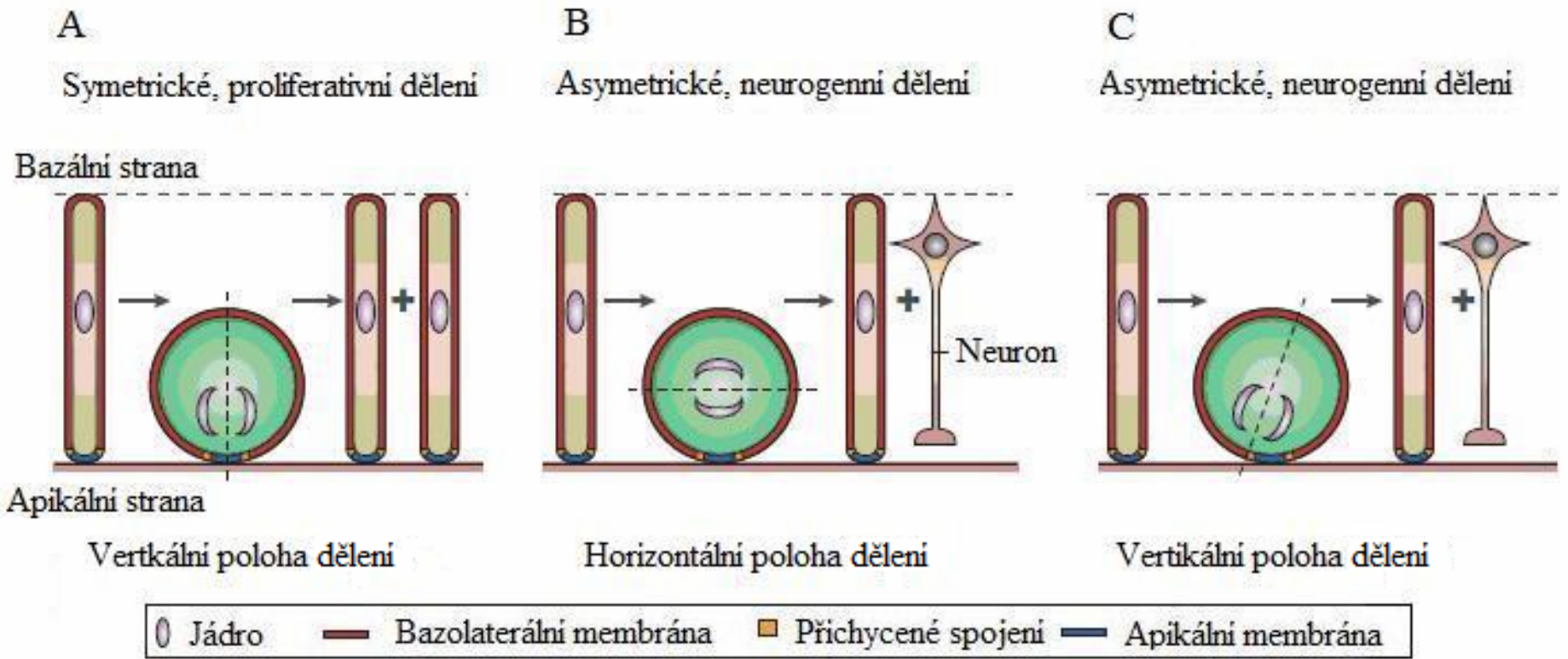
# Původ NSC

- pozůstatek neurogení populace z časně embryogeneze

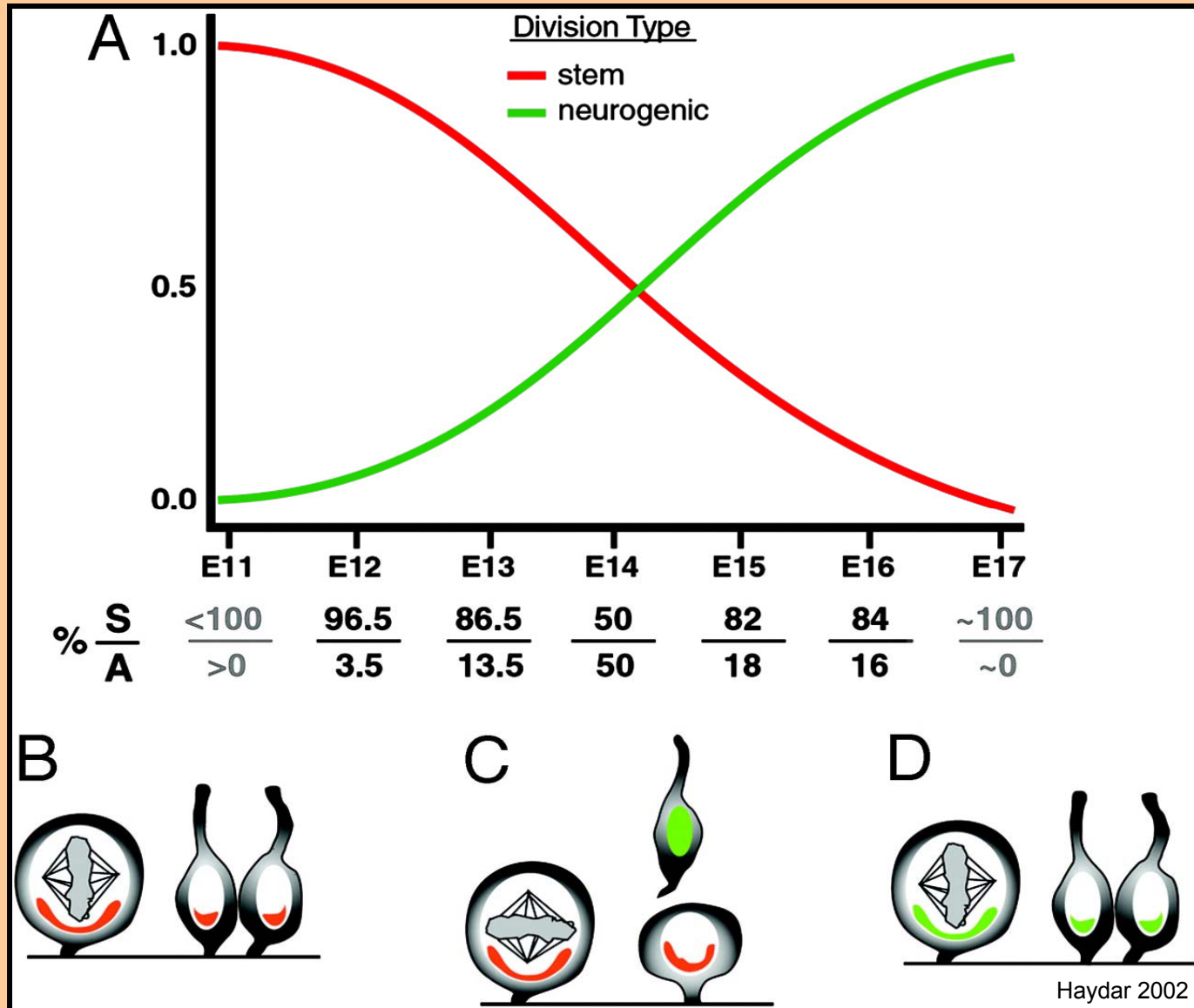




## Vertikální a horizontální dělení v neurogenním epitelu



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

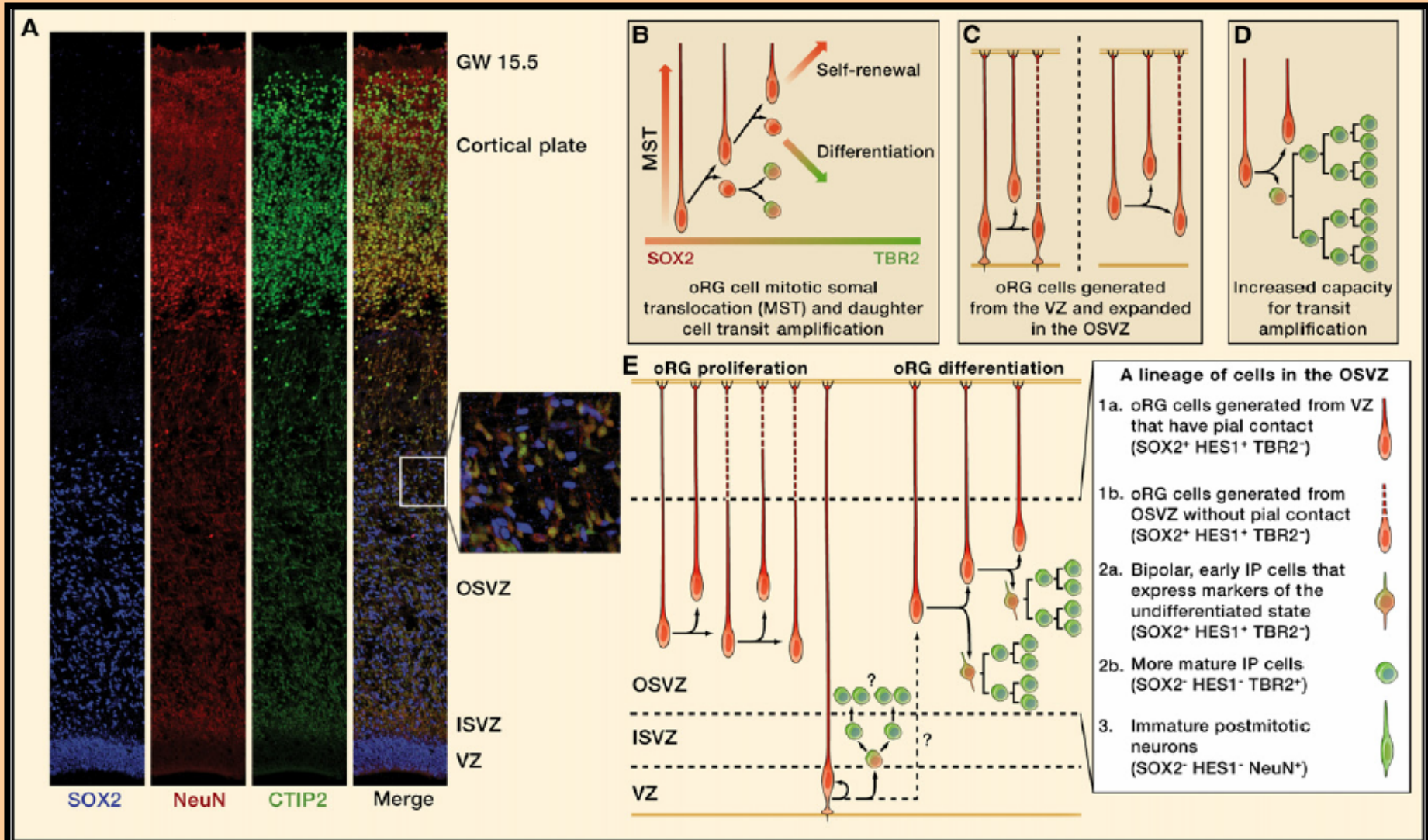
Nestin+, Vimentin+, GFAP+, Sox2+, Pax6+

vRG – bipolární RG, ventrikulární zóna

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

IP – přechodné progenitory

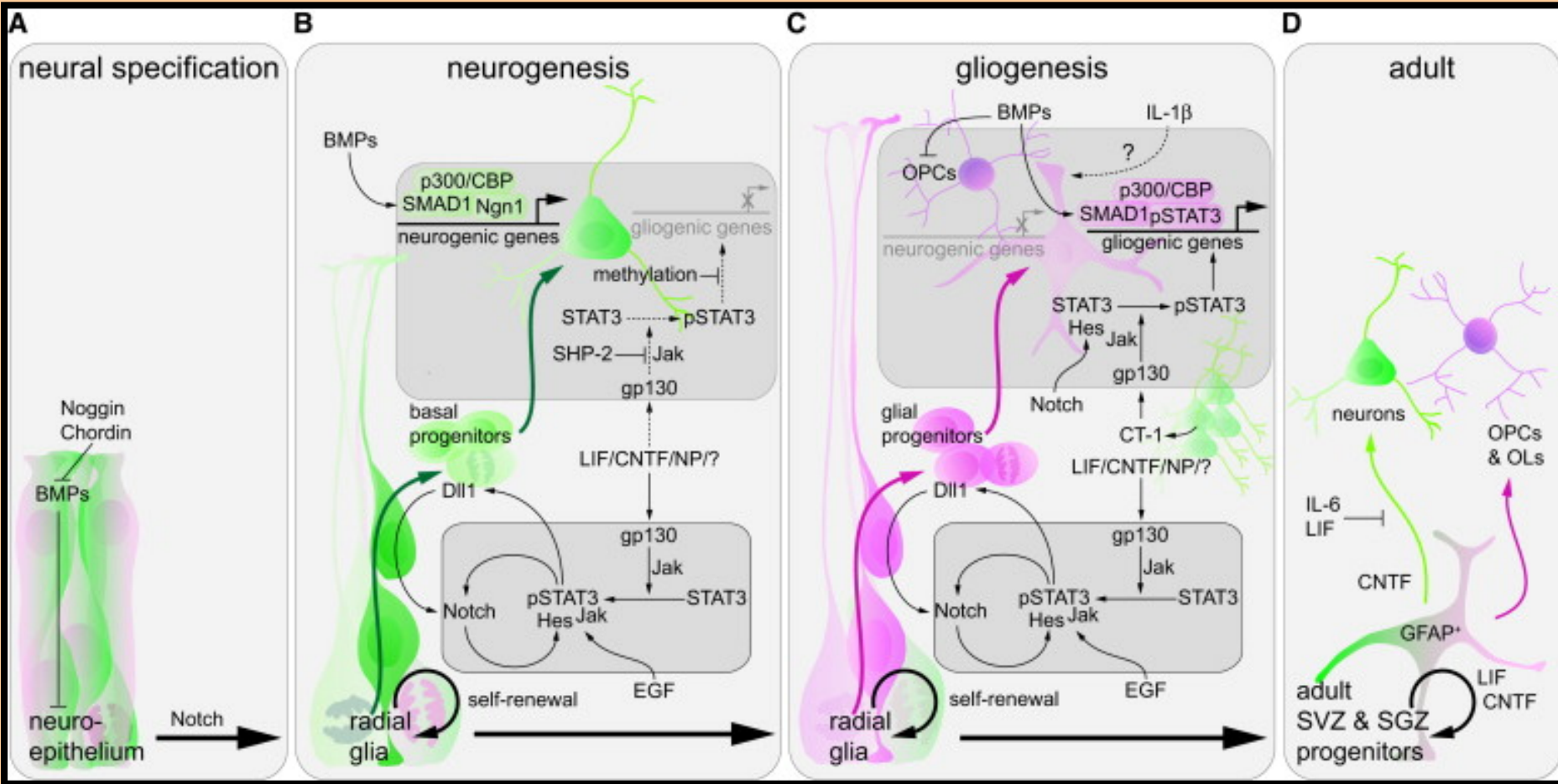
Lui et al., 2011



- 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 $\lambda$ , tj. součásti apikální membrány charakteristické pro apikálně-bazálně polarizovaných buněk.

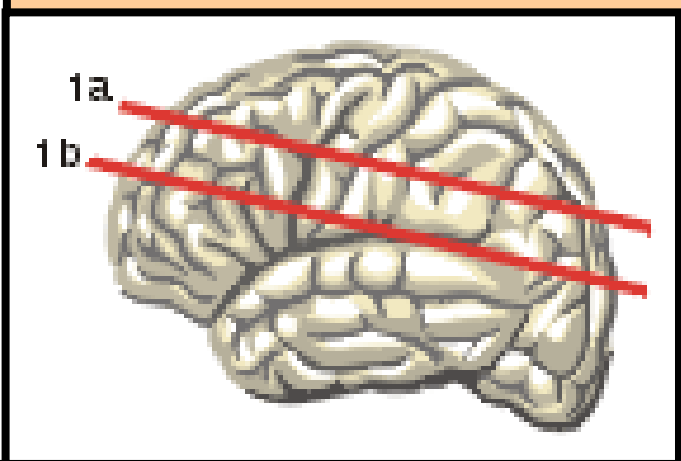
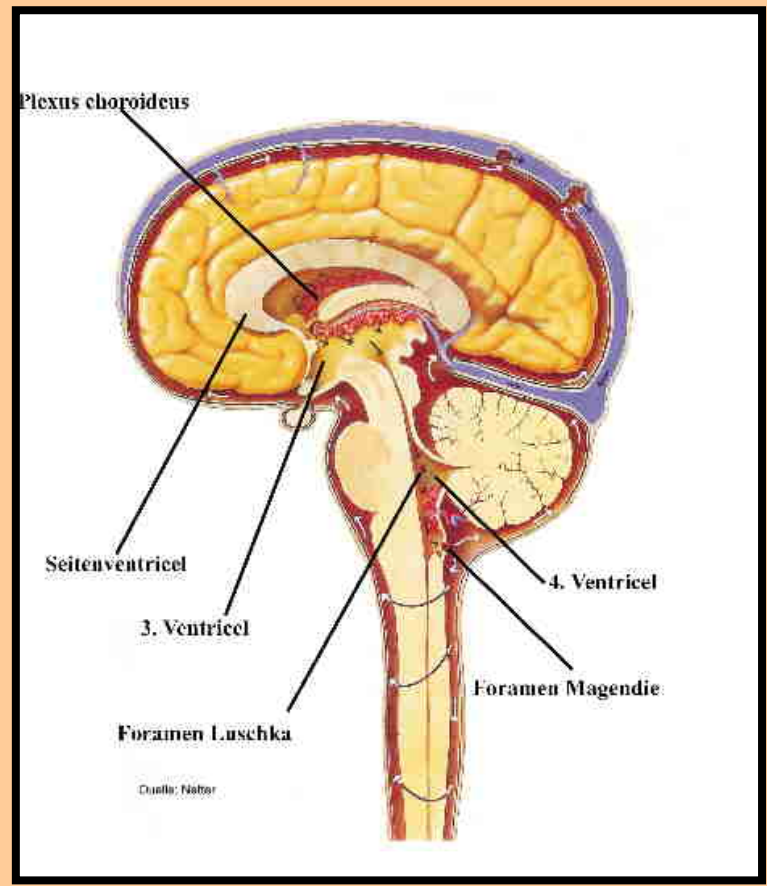
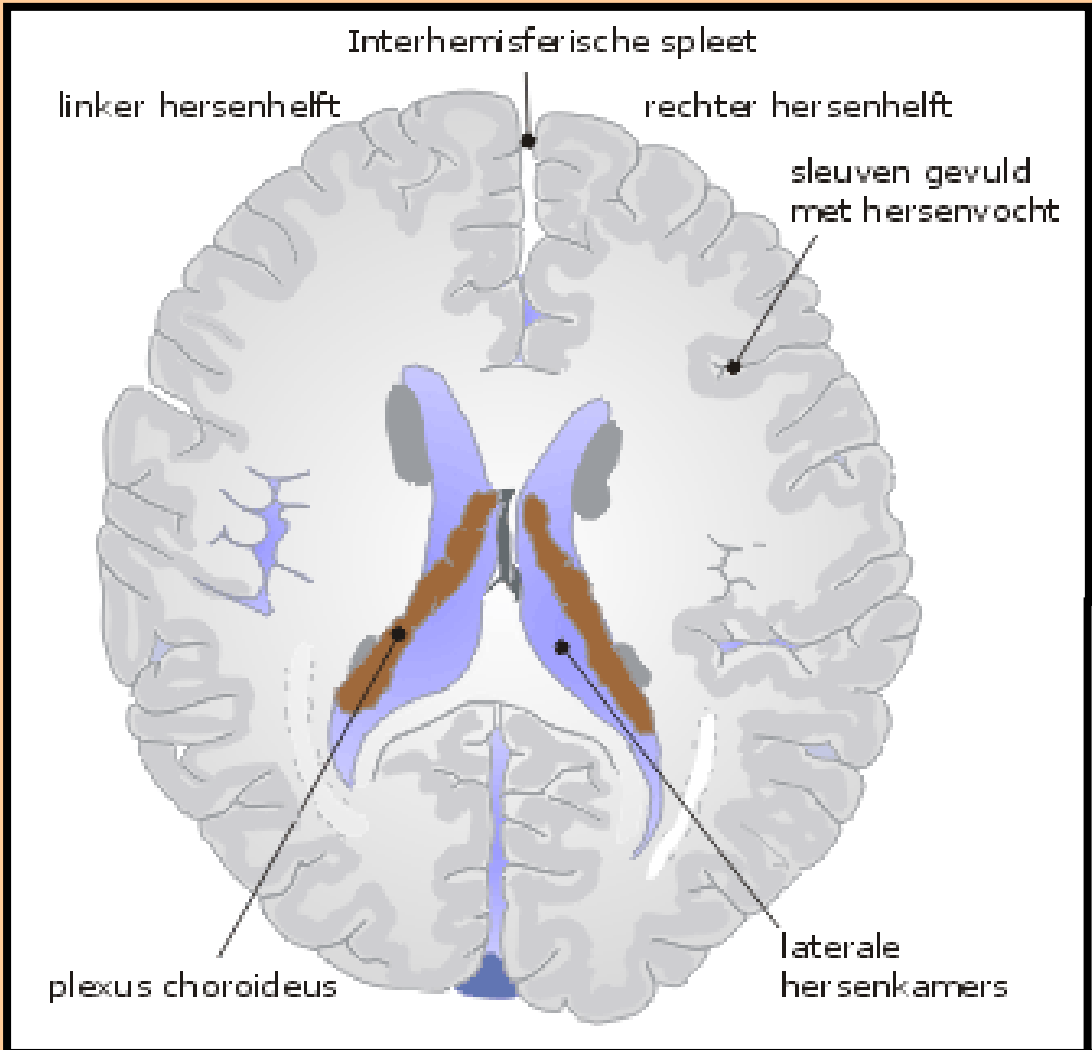
- V průběhu ontogeneze intenzivní proliferace NSC (radiální glie) a TA progenitorů, stimulováno LIF a CNTF v mozkomíšním moku, produkovaných zejména z *plexus choroideus*, důležitá a dosud neobjasněná interakce s Notch dráhou/signalizací.
- LIF/gp130 signalizace působí pleiotropně, u zralejších progenitorů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



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

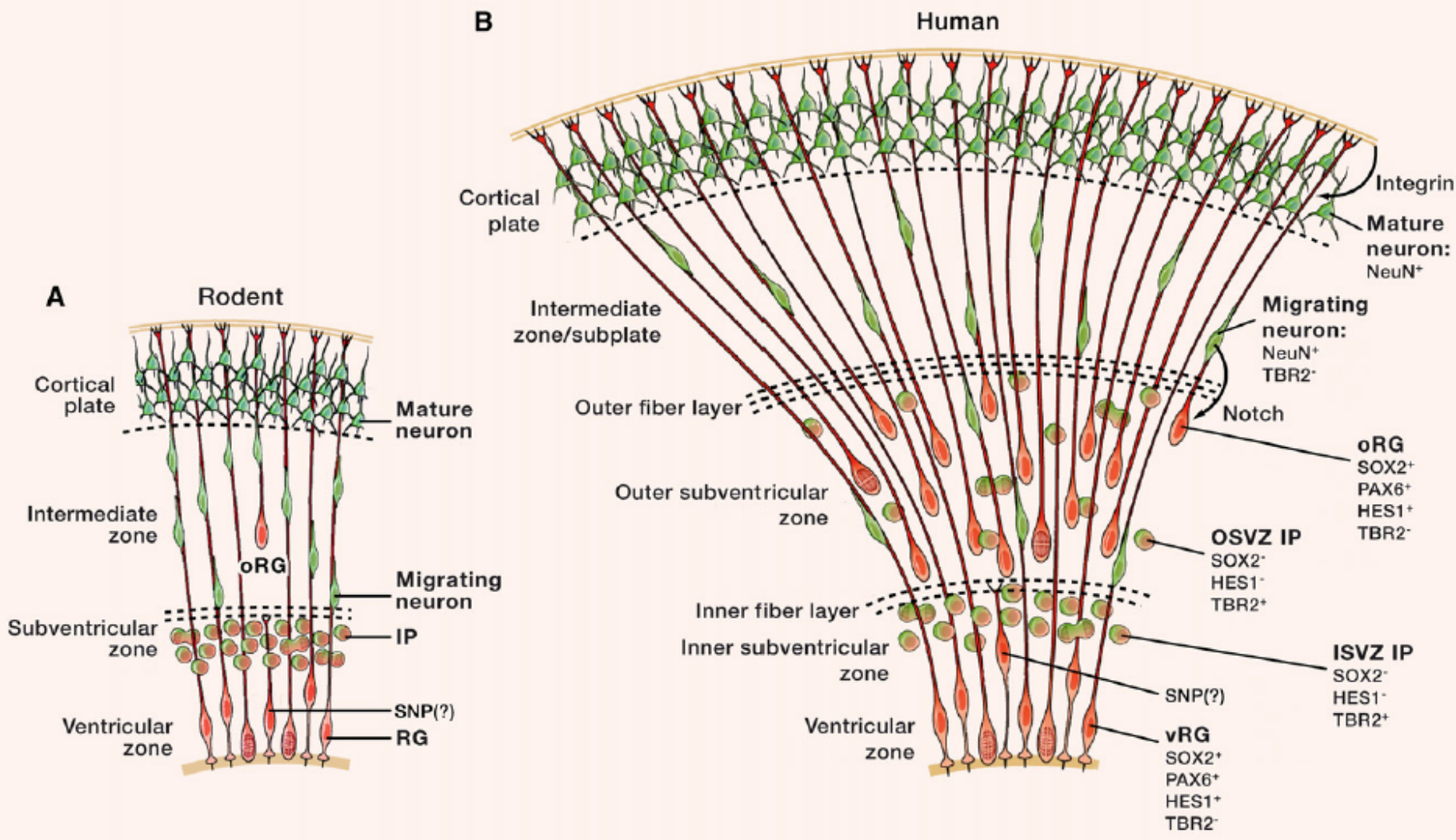
- Notch a STAT3 aktivita se vzájemně podporují  
(STAT3 reguluje expresi ligandů Notch, Hes aktivuje STAT3)
- oba v závislosti na dalších faktorech a statusu buněk podporují sebeobnovu NSC a indukci gliogeneze

# *Plexus choroideus*



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

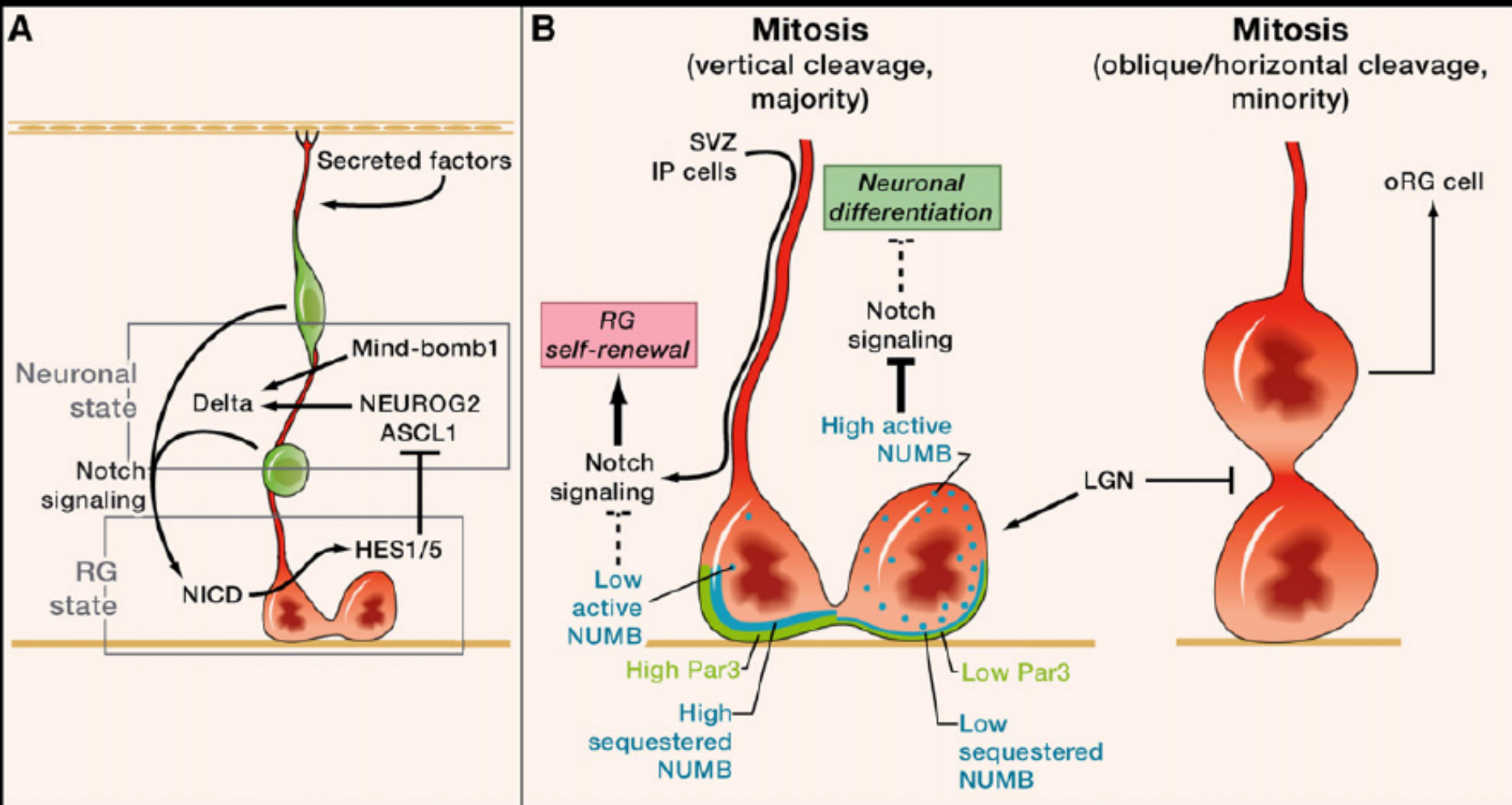
Lui et al., 2011



# 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)

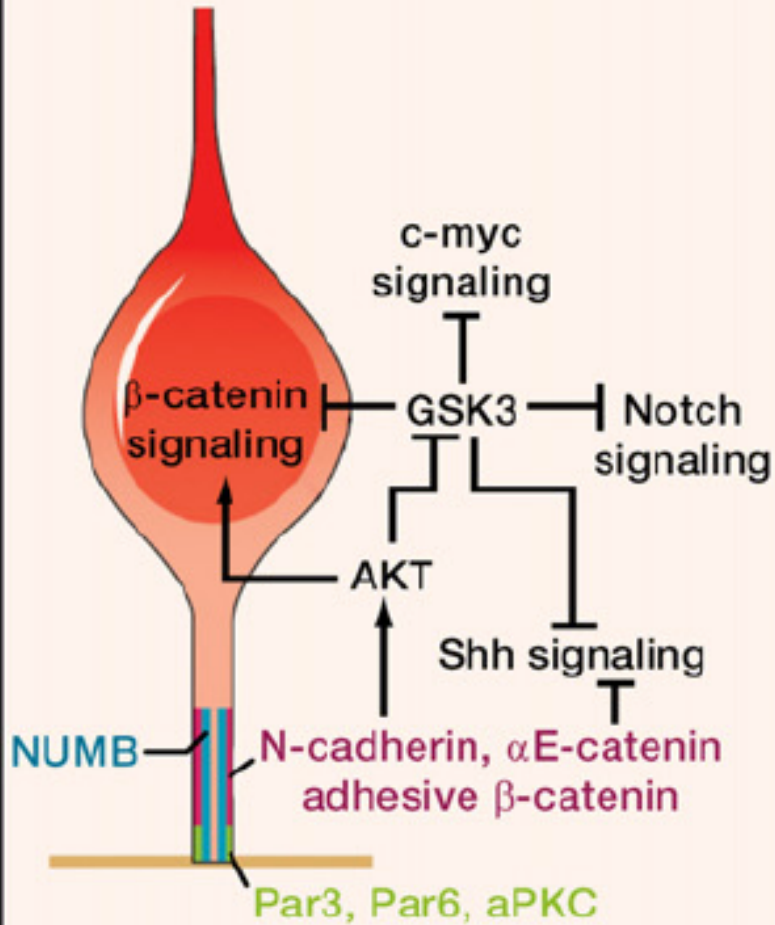
Lui et al., 2011





# C Interphase

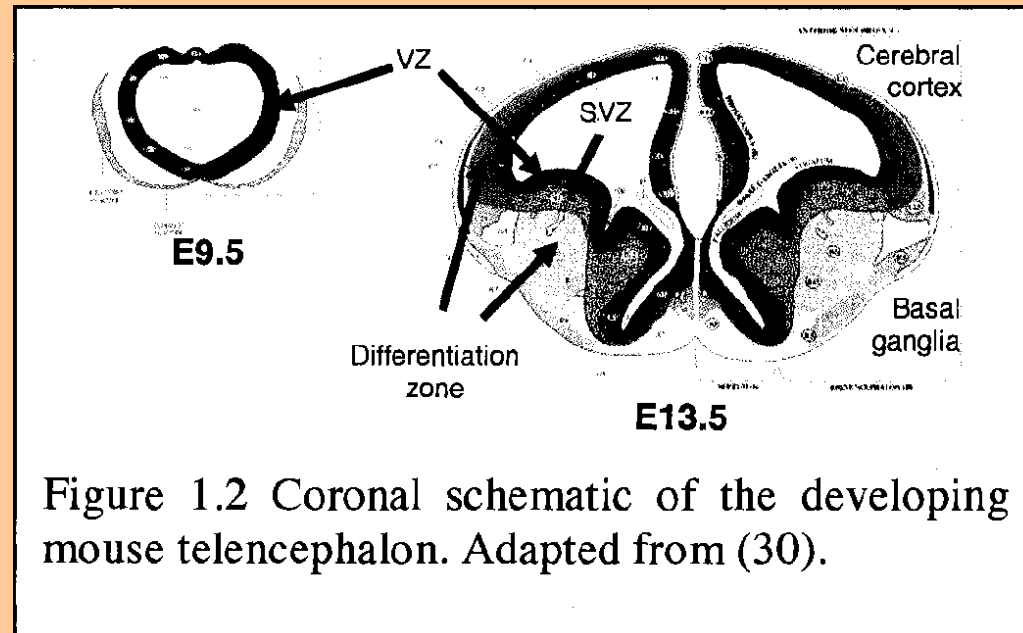
Regulace klíčových signálních drah komponentami asociovanými s vazbou na bazální membránu



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

Adultní NSC jsou:

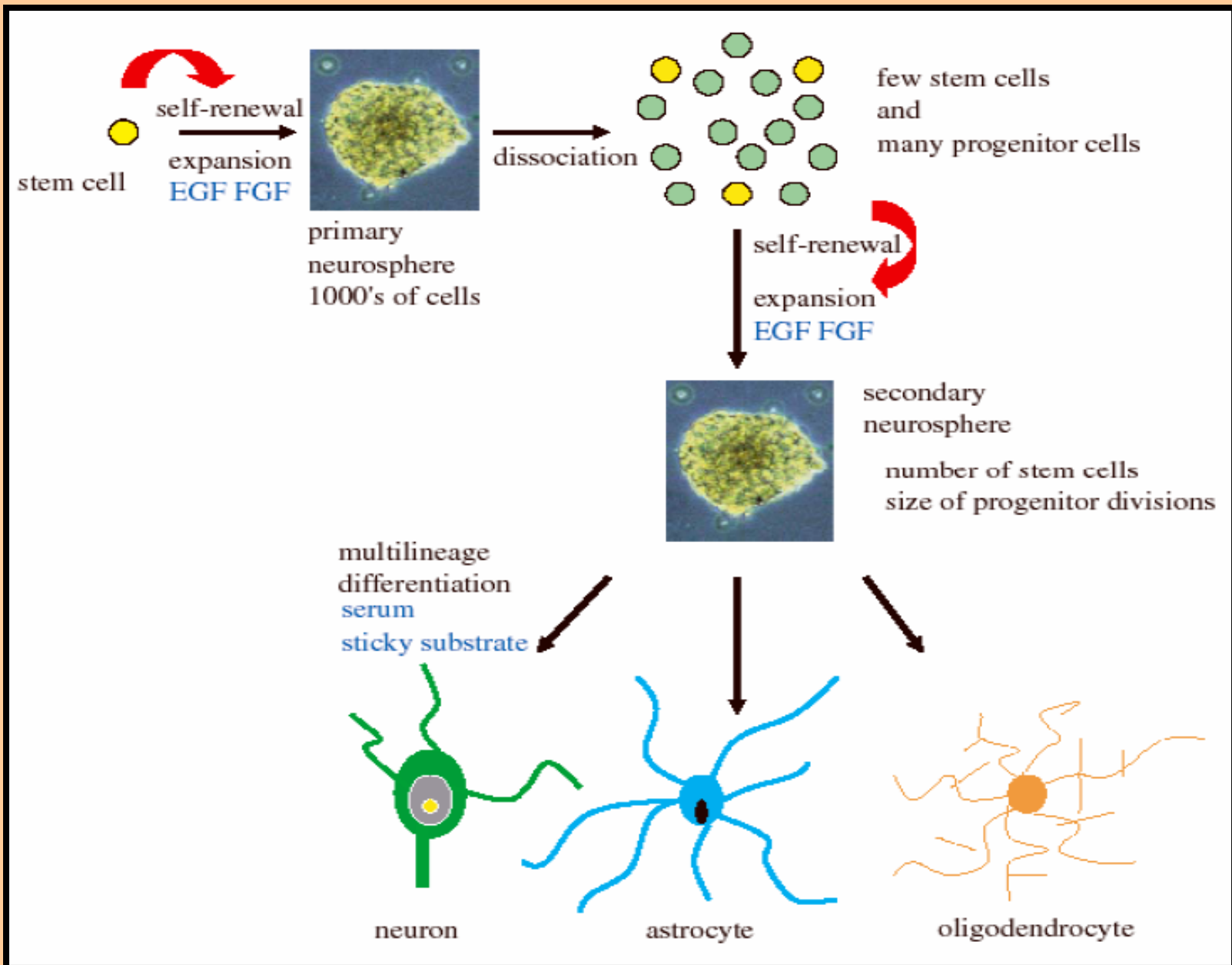
- 1) radiální glie jako v průběhu embryogeneze?
- 2) adaptované/pozměněné časné přechodné progenitory (IP)?
- 3) v dospělém mozku nejsou kmenové buňky s neomezenou schopností sebeobnovy, existují pouze IP schopné několika cyklů dělení

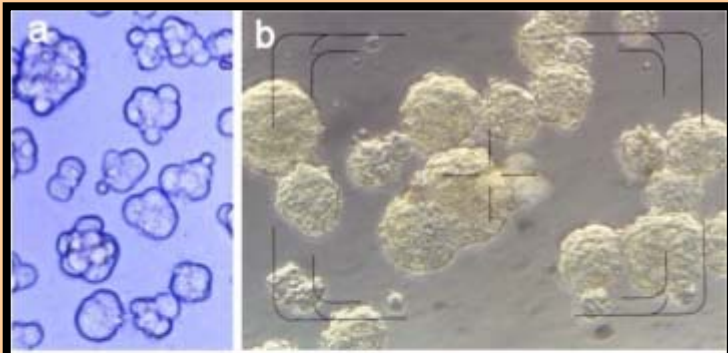


## Vlatnosti NSCs

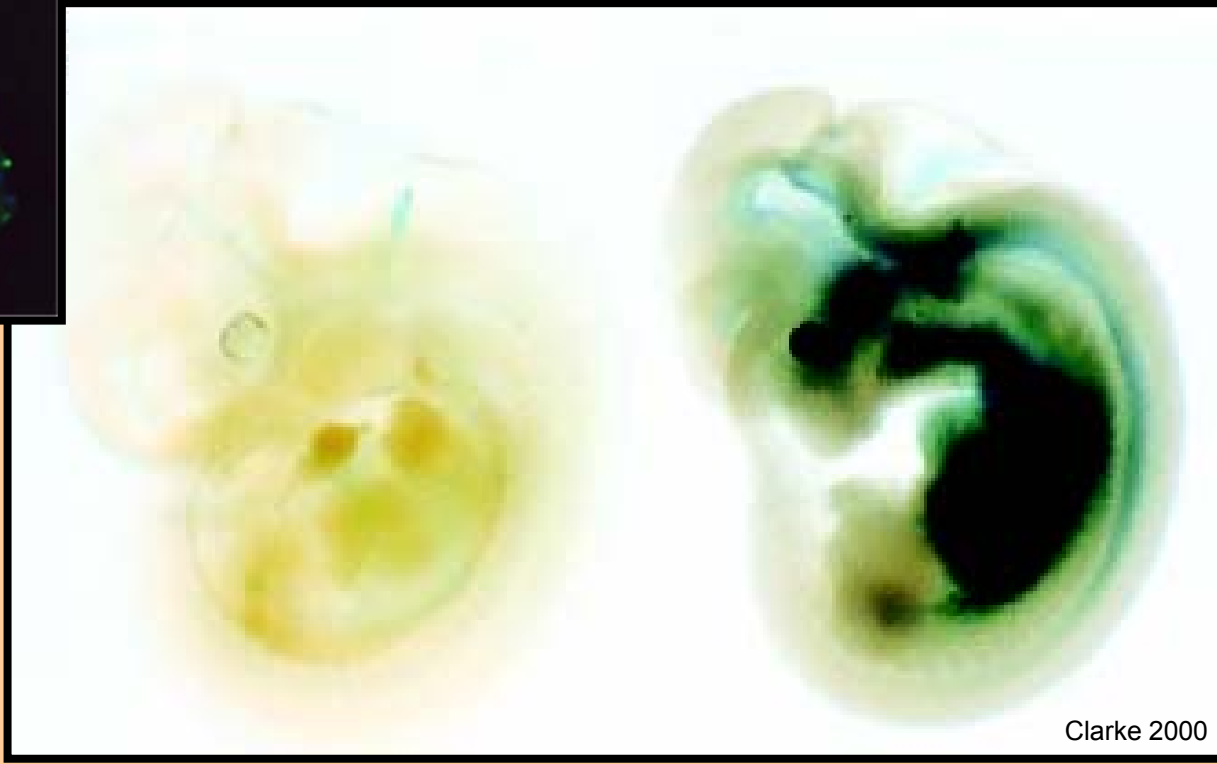
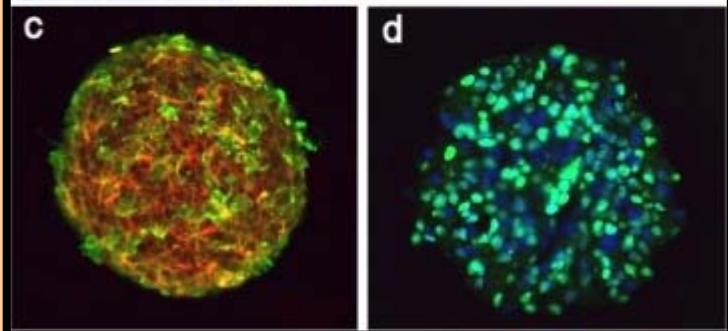
- ❖ NSCs jsou široce multipotentní a experimenty s chimérami ukázaly, že NSCs dávají vznik buňkám všech tří zárodečných listů (netvoří pohlavní buňky, nebylo prokázáno)
- ❖ u chimér se také NSCs nepodílí na hematopoéze i přesto, že v případě likvidace hematopoézy zářením, injikované NSCs ji obnoví (obojí 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)

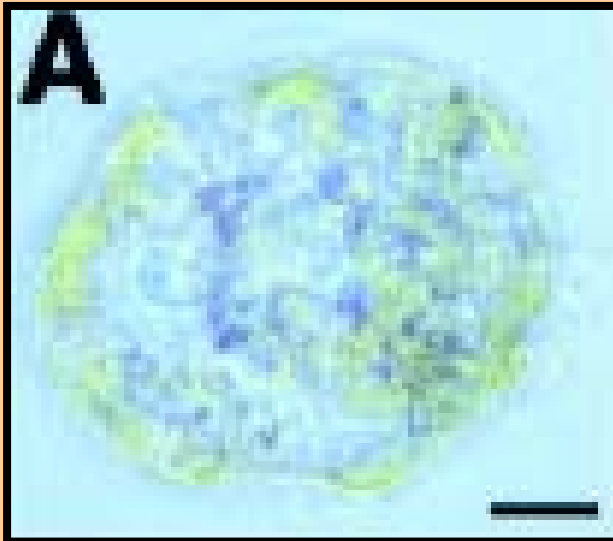




**In vitro kultivace NSC – neurosféry**  
c) **EGFR** + **nestin**; d) **BrdU** + **buněčná jádra**

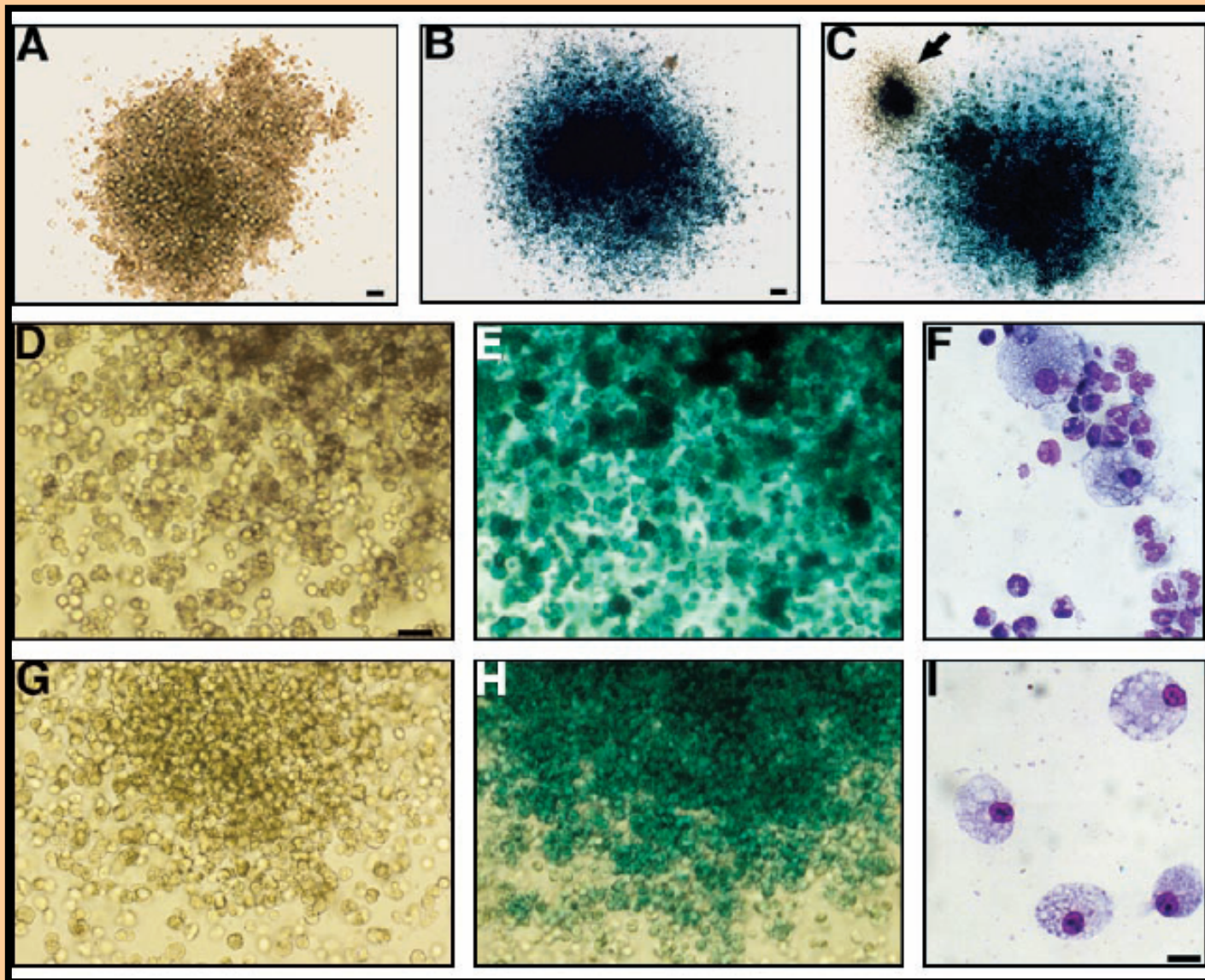


Clarke 2000



← **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