Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Kultivace neurálních kmenových buněk pro studium neurogeneze

Bc. Martina Peřinová

Diplomová práce

2019

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Cultivation of neural stem cells for the neurogenesis study

Bc. Martina Peřinová

Thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2018/2019**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Martina Peřinová**
Osobní číslo:	**C17449**
Studijní program:	**N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Bioanalytik**
Název tématu:	**Kultivace neurálních kmenových buněk pro studium neurogeneze**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

přehledné informace o neurogenezi, (imuno)fenotypizaci buněk, expresi charakteristických markerů, neurálních kmenových buňkách a jejich diferenciačním potenciálu, o pluripotentních buňkách, o řízené proneurogenní diferenciaci k žádanému buněčnému typu s využitím malých molekul, dále informace o metodách izolace a kultivace kmenových buněk a jejich charakteristice.

Experimentální část:

Imunofenotypizace neurálních buněk v tkáňových řezech. Izolace a kultivace neurálních kmenových buněk, kultivace a charakteristika pluripotentních buněk, jejich diferenciace in vitro, imunofenotypizace, izolace RNA a stanovení exprese vytipovaných markerů pomocí RT-PCR a histologické zpracování 3D struktur. Průkaz nervových a gliových buněk in vitro a ve tkáňových řezech.

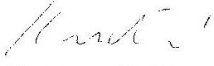
Rozsah grafických prací:	**dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:	**25 s.**
Forma zpracování diplomové práce:	**tištěná**
Seznam odborné literatury:	

Vedoucí diplomové práce:	**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce:	**Mgr. Jana Chvátalová** Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ostatní konzultanti:	**prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.** Lékařská fakulta v Hradci Králové

Datum zadání diplomové práce:	**21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce:	**10. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

.....

Bc. Martina Peřinová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala prof. MUDr. Jaroslavovi Mokrému, Ph.D. za cenné rady, připomínky a konzultace, Mgr. Janě Chvátalové za pomoc s prací v laboratoři, rady a celkovou podporu, Rishikaysh Pisal, M.Sc., Ph.D. za odborné rady a celému kolektivu Ústavu histologie a embryologie, Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Dále bych chtěla poděkovat panu doc. RNDr. Tomášovi Roušarovi, Ph.D. za vedení práce a věcné připomínky.

Konečné díky patří mým rodičům, rodině a příteli, kteří mne ve všech chvílích studia podporovali.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá kultivací neurálních kmenových buněk a embryonálních kmenových buněk a jejich diferenciací. Zahrnuje informace o neurálních kmenových buňkách a jejich možnosti kultivace a diferenciace. Věnuje se charakteristice niché neurálních kmenových buněk. Dále je pozornost věnována neurogenezi a neurogenním oblastem, jejich popisu a charakteristice. Experimentální část se zaměřuje na imunohistochemii vybraných neurálních markerů v tkáňových řezech, *in vitro* kultivaci neurálních a embryonálních kmenových buněk a neurální diferenciaci embryonálních kmenových buněk.

Klíčová slova

Neurální kmenové buňky, embryonální kmenové buňky, diferenciace, neurogeneze

Title

Cultivation of neural stem cells for the neurogenesis study

Annotation

This thesis deals with the cultivation of neural stem cells and embryonic stem cells and their differentiation. It includes information about neural stem cells and their possibilities of cultivation and differentiation. It also deals with the characteristics of neural stem cells niche. Besides, attention is paid to neurogenesis and neurogenic regions, their description and characteristics. The experimental part is focused on immunohistochemistry of selected neural markers in tissue sections, in vitro cultivation of neural and embryonic stem cells and guided differentiation of embryonic stem cells toward neurogenesis.

Keywords

Neural stem cells, embryonic stem cells, differentiation, neurogenesis

Obsah

Seznam obrázků 11

Seznam tabulek 12

Seznam grafů 12

Seznam zkratek 13

Úvod 16

1 Teoretická část 17

1.1 Kmenové buňky 17

1.2 Neurální kmenové buňky 19

1.2.1 Původ neurálních kmenových buněk 20

1.2.2 Primitivní a definitivní neurální kmenové buňky 20

1.2.3 Niché neurálních kmenových buněk 21

1.2.4 Faktory ovlivňující NKB 23

1.2.5 Markery neurálních kmenových buněk 25

1.3 Neurogeneze 28

1.4 Adultní neurogenní zóny 31

1.4.1 Subependymální zóna 31

1.4.2 Subgranulární zóna 34

1.4.3 Hypotalamus 35

1.5 Pluripotentní kmenové buňky 37

1.5.1 Embryonální kmenové buňky 37

1.5.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky 38

1.6 Kultivace a diferenciace NKB 39

1.7 Kultivace a diferenciace embryonálních kmenových buněk 41

1.8 Imunohistochemie 43

1.8.1 Rozdělení imunohistochemických metod 43

2 Cíle práce 46

3 Experimentální část 47
3.1 Použité přístroje a pomůcky 47
3.2 Chemické a biologické látky 49
3.2.1 Kmenové buňky 49
3.2.2 qRT-PCR 50
3.2.3 Imunohistochemie 50
3.3 Imunohistochemie na tkáňových řezech nervové tkáně 52
3.3.1 Průkaz NCAM trojstupňovou LSAB metodou 52
3.3.2 Průkaz GFAP trojstupňovou LSAB metodou 53
3.3.3 Průkaz nestinu dvojstupňovou metodou s fluorescenční detekcí 53
3.4 Neurální kmenové buňky 54
3.4.1 Příprava média pro NKB 54
3.4.2 Izolace NKB 55
3.4.3 Kultivace NKB formou neurosfér 56
3.4.4 Rozmražení NKB 56
3.4.5 Kryokonzervace NKB 57
3.4.6 Pasážování NKB 57
3.4.7 Počítání a nasazení buněk 57
3.5 Embryonální kmenové buňky 59
3.5.1 Kultivace myších embryonálních kmenových buněk 59
3.5.2 Pasážování myších embryonálních kmenových buněk 60
3.5.3 Rozmražení a kryokonzervace myších embryonálních kmenových buněk 60
3.5.4 Diferenciace embryonálních kmenových buněk 60
3.5.5 Diferenciace mEKB s následnou qRT-PCR analýzou 61
4 Výsledky a diskuze 66
4.1 Výsledky a diskuze imunohistochemických metod 66
4.1.1 Průkaz specifických markerů neurálních buněk v mozku potkana 66

4.2 Výsledky kultivace NKB a diskuze 71
4.3 Výsledky kultivace a diferenciace EKB a diskuze 75
4.3.1 Neurální diferenciace mEKB kyselinou retinovou 76
4.3.2 Diferenciace mEKB směrem k neuroektodermu 79
5 Závěr 82
6 Citovaná literatura 84

Seznam obrázků

Obr. 1 – Časová osa vzniku primitivních a definitivních NKB. 20
Obr. 2 – Markery NKB, prekurzorů a zralých buněk CNS. 26
Obr. 3 – Embryonální neurogeneze. 29
Obr. 4 – Neuronogeneze v savčím dospělém mozku. 30
Obr. 5 – Schéma buněčné organizace SEZ. 32
Obr. 6 – Migrace buněk ze SEZ rostrálním migračním proudem. 33
Obr. 7 – Organizace subgranulární zóny dospělých hlodavců. 35
Obr. 8 – Získání EKB a iPS buněk. 37
Obr. 9 – Přímá imunohistochemická metoda. 43
Obr. 10 – Nepřímá dvojstupňová imunohistochemická metoda. 44
Obr. 11 – Imunohistochemická metoda LSAB. 45
Obr. 12 – Schéma Bürkerovy komůrky. 58
Obr. 13 – Imunohistochemický průkaz GFAP v koronárním řezu mozkem potkana. 67
Obr. 14 – Imunohistochemický průkaz NCAM v koronárním řezu mozkem potkana 68
Obr. 15 – Imunohistochemický průkaz DCX v řezu mozkem dospělé myši. 69
Obr. 16 – Imunohistochemický průkaz PCNA v řezu mozkem dospělé myši. 70
Obr. 17 – Detail morfologie neurosfér. 71
Obr. 18 – Histologický řez kultivovanými neurosférami. 72
Obr. 19 – Kultivace NKB formou neurosfér. 74
Obr. 20 – Kultivace myších embryonálních kmenových buněk. 75
Obr. 21 – Tvorba sféroidů podobných embryoidním tělískům. 77
Obr. 22 – Diferenciace mEKB D3, ovlivněním 1mM kyselinou retinovou. 77
Obr. 23 – Imunocytochemický průkaz nestinu. 78

Seznam tabulek

Tab. 1 – Klasifikace typů buněk SEZ. 31
Tab. 2 – Základní médium pro kultivaci NKB z 13,5denního embrya. 54
Tab. 3 – Složky přidávané do základních kultivačních médií pro NKB. 55
Tab. 4 – Přehled složek kompletních kultivačních médií pro NKB. 55
Tab. 5 – Složení sérum free ES média. 60
Tab. 6 – Složení kompletního 2i média. 60
Tab. 7 – Složení diferenciačního média se sérem. 61
Tab. 8 – Složení N2B27 média. 61
Tab. 9 – Složení kultivačního BMP4 média. 62
Tab. 10 – Složení diferenciačního média s LIF. 62
Tab. 11 – Složení diferenciačního média bez LIF. 63
Tab. 12 – Reagencie pro syntézu cDNA. 64
Tab. 13 – Jednotlivé kroky syntézy cDNA. 64
Tab. 14 – Pipetovací schéma. 65
Tab. 15 – Program qRT-PCR. 65
Tab. 16 – Ověření čistoty vzorků a stanovení koncentrace izolované RNA. 80

Seznam grafů

Graf 1 – Relativní normalizovaná exprese sledovaných genů. 81

Seznam zkratek

ABC	metoda avidin-biotin komplex, z angl. avidin-biotin complex
ATB	antibiotika
BDNF	mozkový neurotrofický faktor, z angl. brain-derived neurotrophic factor
BMPs	kostní morfogenetické proteiny, z angl. bone morphogenetic proteins
BrdU	bromodeoxyuridin
BV	krevní céva, z angl. blood vessel
CC	kalózní těleso, z lat. corpus callosum
cDNA	komplementární DNA, z angl. complementary DNA
CGE	kaudální gangliová eminence, z angl. caudal ganglionic eminence
CNS	centrální nervový systém
CTX	neokortex, kůra mozková
Cy3	cyanin 3
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DCX	doublecortin
DG	z lat. gyrus dentatus
DMEM	z angl. dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMEM/F12	z angl. dulbecco´s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNKB	definitivní neurální kmenové buňky
dNTP	deoxynukleotidy, z angl. deoxynucleoside triphosphate
DPBS	z angl. dulbecco´s phosphate buffered saline
E12,5	2,5 den myšího embryonálního vývoje
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor, z angl. epidermal growth factor
EKB	embryonální kmenové buňky
EphB	Ephrin-B
EpiKB	epiblastové kmenové buňky
FGF2	fibroblastový růstový faktor typu 2, z angl. fibroblast growth factor 2
FITC	fluorescein isothiokyanát
GABA	kyselina γ-aminomáselná, z angl. gamma-aminobutyric acid
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein, z angl. glial fibrillary acidic protein

GFP	zelený fluorescenční protein, z angl. green fluorescent protein
HRP	křenová peroxidáza, z angl. horseradish peroxidase
HY	hypotalamus
IGF1	insulinu podobný růstový faktor, z angl. insulin like growth factor 1
iPS buňky	indukované pluripotentní buňky
ITS	insulin transferin selenium
KB	kmenové buňky
LGE	laterální gangliová eminence, z angl. lateral ganglionic eminence
LIF	leukemický inhibiční faktor, z angl. leukemia inhibitory factor
LSAB	z angl. labbeled streptavidin-biotin
LV	postranní mozková komora, z angl. lateral ventricle
mEKB	myší embryonální kmenové buňky
MGE	mediální gangliová eminence, z angl. medial ganglionic eminence
NB	neuroblasty
NCAM	adhezní molekula neurálních buněk, z angl. neural cell adhesion molecule
NeuN	neuronální jaderný antigen, z angl. neuronal nuclear antigen
NF voda	z angl. nuclease free water
NGF	nervový růstový faktor, z angl. nerve grow factor
NKB	neurální kmenové buňky
NP	neurální progenitorové buňky
NSE	neuron specifická enoláza
OB	čichový bulbus, z lat. bulbus olfactorius
PAP	metoda peroxidáza-antiperoxidázového komplexu
PBS	fosfátový pufr
PBS-T	fosfátový pufr s Tritonem X-100
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk, z angl. proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerázová řetězová reakce
pNKB	primitivní neurální kmenové buňky
PSA-NCAM	z angl. polysialic acid neural cell adhesion molecule
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RA	kyselina retinová, z angl. retinoic acid
RNA	ribonukleová kyselina
RMS	rostrální migrační proud, z angl. rostral migratory stream
rpm	otáčky za minutu, z angl. revolutions per minute

RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RT pufr	z angl. reverse transcriptase buffer
SEZ	subependymální zóna
SFES	z angl. serum free ES medium
SGZ	subgranulární zóna
SHH	z angl. sonic hedgehog protein
STR	striatum
SVZ	subventrikulární zóna
VZ	ventrikulární zóna

Úvod

Neurální kmenové buňky jsou multipotentní nediferencované buňky se schopností sebeobnovy a proliferace, jež lze izolovat z mozkové tkáně. *In vitro* a *in vivo* tvoří neurony, astroglie a oligodendroglie, a proto se označují jako tripotentní. Ani v této tkáni se však nevyskytuje jen jediná a homogenní populace neurálních kmenových buněk. V časném embryonálního vývoji můžeme izolovat primitivní neurální kmenové buňky s širším diferenciačním potenciálem, zatímco v pozdější době embryonálního vývoje nacházíme definitivní neurální kmenové buňky se zaměřením na určitý typ buněk, např. specifické neurony. V dospělém mozku se vyskytují speciální oblasti, ve kterých po celou dobu života probíhá neurogeneze. Patří sem subependymální zóna lemující postranní mozkové komory, subgranulární zóna hipokampu a hypotalamus. Tyto zóny obsahují mikroprostředí zvané niché, v němž se vyskytují nejen kmenové buňky, ale i podpůrné buňky, progenitory a molekuly extracelulární matrix. V niché se dále nachází a uvolňuje nepřeberné množství faktorů, malých molekul nebo molekul signálních drah, které ovlivňují růst, proliferaci i diferenciaci buněk. Při kultivaci neurálních kmenových buněk *in vitro* je podle přidaných molekul možnost vydiferencovat specializované typy neuronů. Obdobným způsobem lze neurální buňky vydiferencovat také z embryonálních kmenových buněk a indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Tyto a další postupy se využívají při studiu neurodegenerativních onemocnění a otevírají možnosti pro jejich léčbu transplantací kmenových buněk.

1 Teoretická část

1.1 Kmenové buňky

Termín „kmenová buňka“ („stammzelle“) poprvé použil německý biolog Ernst Haeckel v roce 1868, ve spisu Přirozené dějiny stvoření. Ačkoli se od té doby tento pojem velice rozšířil a je často používán, není zcela přesně definován [1]. Dle aktuálního stavu organismu je totiž míra vlastností kmenových buněk velmi variabilní [2].

Kmenovými buňkami rozumíme nezralé, nediferencované buňky s primitivní morfologií mající schopnost sebeobnovy, diferenciace ve specializované buňky a schopnost téměř neomezeného počtu buněčných dělení. Další vlastností kmenových buněk je jejich velmi dobrý proliferační potenciál, což se uplatňuje ve tkáních, které obsahují buňky s krátkým životním cyklem [2].

První buňkou těla je totipotentní zygota. Dále se vyvíjí blastomery, které jsou základem pro všechny buňky těla a buňkám extraembryonálních tkání. Zygotu mezi kmenové buňky neřadíme, a to z důvodu neschopnosti sebeobnovy. Proto jsou prvními kmenovými buňkami (KB) blastomery, buňky tvořící morulu, také s totipotentním diferenciačním potenciálem. Blastocysta obsahuje již buňky pluripotentní, schopné diferenciace do všech tří zárodečných listů; ektodermu, mezodermu a endodermu. Tyto první pluripotentní buňky byly pojmenovány jako embryonální kmenové buňky (EKB) a jsou základem tkání, ve kterých se dále diferencují buňky multipotentní, generující úzký profil buněk dané tkáně. KB zůstávají v základech tkání, v relativně konstantním množství, po celý život jedince. Během embryonálního vývoje tak vzniká množství hierarchicky uspořádaných KB [2, 3].

Základním mechanismem schopnosti sebeobnovy kmenových buněk je jejich způsob dělení. Vysoká aktivita telomerázy bránící postupnému zkracování DNA umožňuje neomezený počet dělení KB [4].

Typickým dělením KB je asymetrická mitóza, kdy z mateřské buňky vzniká jedna buňka se stejnými schopnostmi jako mateřská a druhá buňka je více diferencovaná. Proto v tkáních zůstává počet KB relativně stálý. V závislosti na potřebě se však kmenové buňky mohou dělit také symetricky. Dělením pak vznikají dvě stejné kmenové buňky jako je mateřská nebo dvě buňky progenitorové [4].

Jak se bude KB dělit, určuje mnoho faktorů, např. mikroprostředí kmenových buněk (niché). Jakým dělením bude KB procházet může ovlivnit také poloha mitotického vřeténka během metafáze. Nejběžnější polohou dělícího vřeténka je pozice rovnoběžná se stěnou mozkové

komory (chromozomy jsou k ní kolmo). V tomto případě je osa dělení vertikální a dojde k tvorbě dvou shodných buněk, symetrickému dělení. Při opačné poloze vřeténka, kolmé k mozkové komoře, je osa dělení horizontální a dělení probíhá asymetricky [2, 5].

1.2 Neurální kmenové buňky

Zatímco většina neuronů je tvořena v prenatálním vývoji, i v mozku dospělého jedince probíhá neuronogeneze. Prvním záznamem existence neurálních kmenových buněk byla studie Goldmana a Nottebohma z roku 1983 [6]. Do té doby byl mozek považován za tkáň s konečným množstvím neuronů bez schopnosti regenerace [7, 8].

Neurální kmenové buňky (NKB) jsou nediferencované buňky, které definujeme na základě jejich schopnosti diferencovat se na různé typy nervových a gliových buněk centrálního nervového systému (CNS) a jejich schopnosti dlouhodobé sebeobnovy. Ačkoli vysoká proliferační kapacita je jejich charakteristickým znakem, jedinečnou vlastností KB ve srovnání s jinými somatickými buňkami je jejich schopnost zůstat spící (v klidovém stavu) ve velmi dlouhých časových intervalech [8].

V rámci této definice je však rozmanitost toho, co nazýváme neurálními kmenovými buňkami, poměrně veliká [9]. Z hlediska embryologie se termín NKB obvykle vztahuje k časné populaci dělících buněk, tradičně nazývaných neuroepitelové buňky, které jsou ve ventrikulární zóně a mají potenciál generovat neurony i gliové buňky. Dále se takto někdy popisují buňky subventrikulární zóny (SVZ), které se také nazývají progenitory (z angl. *intermediate neuronal progenitors*) [1]. Jako NKB se také popisují vysoce specializované astrocyty [10]. Existuje tak široké spektrum NKB s různým stupněm diferenciačního potenciálu, z nichž každý typ má jedinečnou charakteristiku. To je předpokladem pro tvorbu velkého počtu zralých buněčných typů v CNS [9].

První identifikované NKB byly *in vitro* izolovány z embryonálního předního mozku potkana [11] a myšího dospělého mozku [7]. Od roku 1992 pak byly NKB úspěšně izolovány z různých oblastí centrálního nervového systému, včetně hipokampu, SVZ a striata [7, 12].

NKB mohou být udržovány a expandovány *in vitro* pomocí metody kultivace neurosfér (z angl. *neurosphere assay*) [2]. Tato metoda byla navržena Reynoldsem a Weissem v roce 1992 [7]. Neurosféry však mohou vytvořit i neurální progenitorové buňky (NP). Tvorba neurosfér tedy není přímým důkazem přítomnosti NKB. Kromě toho samotné neurosféry nejsou čistou populací NKB; obsahují heterogenní směs buněk, které zahrnují NP [13].

NKB jsou prostředkem pro studium neurogeneze, neurodegenerace, patologie neurologických onemocnění a jsou významným zdrojem pro náhradu buněk poškozeného CNS [9].

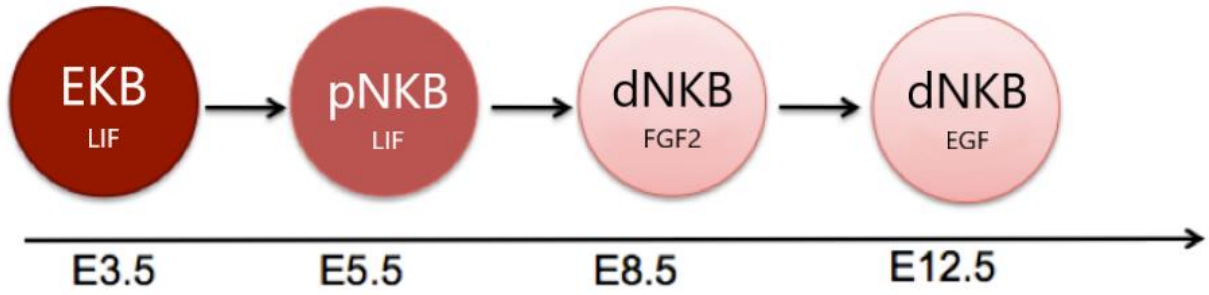
1.2.1 Původ neurálních kmenových buněk

Prvními buňkami CNS jsou neuroepitelové buňky, časné kmenové buňky, z nichž se vyvíjí tzv. radiální gliové buňky. Na počátku neurogeneze neuroepitelové buňky postupně ztrácí epitelové znaky a upřednostňují astrogliální charakteristiku, jako je exprese: glutamátových transportérů specifických pro astrocyty, gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP), vimentinu a BLBP (*z angl. brain lipid-binding protein*). Po počátečních symetrických děleních se začínají radiální gliové buňky asymetricky dělit a vytvářejí progenitorové buňky. Ty opouštějí ventrikulární zónu a migrují do intermediární zóny, kde podstupují symetrické neurogenní dělení [10].

V adultních niché si NKB zachovávají svou charakteristickou radiální morfologii a vlastnosti astrocytů. Na rozdíl od embryonálních NKB, které jsou velice mitoticky aktivní, jsou adultní NKB většinou klidové. Při aktivaci se mohou symetricky dělit, aby se zvýšil počet NKB, nebo asymetricky, což vede k podílu progenitorových buněk. Tyto progenitory vytvářejí neuroblasty (NB), které nakonec opouštějí buněčný cyklus a vstupují do fáze dozrávání [10].

1.2.2 Primitivní a definitivní neurální kmenové buňky

Ve vývoji CNS lze rozlišit dvě odlišné populace NKB (Obr. 1). Už během pátého dne myšího embryonálního vývoje může být izolována populace exprimující Oct4 s receptorem pro LIF (leukemický inhibiční faktor). Tyto buňky označujeme jako primitivní neurální kmenové buňky (pNKB) a generují všechny buňky neurální linie. Během osmého dne embryonálního vývoje může být izolována druhá populace NKB, která je závislá na FGF2 (fibroblastový růstový faktor typu 2) a později (E12,5) na EGF (epidermální růstový faktor). Tyto bFGF a EGF responzivní buňky označujeme jako definitivní neurální kmenové buňky (dNKB) [14].



Obr. 1 – Časová osa vzniku primitivních a definitivních NKB.
Během vývoje myšího embrya se z EKB vyvíjejí pNKB závislé na LIF zhruba v průběhu pátého dne embryonálního vývoje, dNKB závislé na FGF2 vznikají u 8,5denního myšího embrya a dNKB závislé na EGF se objevují ve vývoji kolem dvanáctého dne myšího embryonálního vývoje. Převzato a upraveno z [15].

In vitro malé procento pluripotentních buněk kultivovaných bez séra a s nízkou buněčnou hustotou proliferuje v přítomnosti LIF za vzniku plovoucích pNKB, a následně podíl buněk primitivních neurosfér může generovat neurosféry tvořené definitivními NKB za přítomnosti bFGF nezávisle na LIF. Neurosféry tvořené dNKB jsou větší oproti neurosférám z pNKB a mohou být pasážovány po neurčitě dlouhou dobu [14, 16].

Definitivní NKB se *in vitro* diferencují primárně do astrocytů. Po transplantaci do jiné neurogenní oblasti *in vivo* si dNKB udržují svou regionální identitu a nadále produkují stejné potomstvo jako v původním prostředí [14, 17].

Primitivní NKB mají ale diferenciační profil širší. Diferenciace pNKB odhalila stejné podíly astrocytů, oligodendrocytů a neuronů [14]. Dále byly pNKB podrobeny přímé diferenciaci do neuronů specifických pro danou oblast mozku. pNKB můžeme diferencovat do subtypů neuronů pomocí kombinace specifických růstových faktorů, jako je aktivin a FGF2 pro GABAergní neurony, SHH (z angl. *sonic hedgehog*) a FGF8 pro dopaminergní neurony, a kyselina retinová s SHH pro motorické neurony [18].

Problémem při kultivaci pNKB je velká úmrtnost buněk. Potenciální metodou zmírnění buněčné smrti u NKB odvozených od EKB je zavedení kultivačních podmínek s nízkým obsahem kyslíku (4 %), protože prostředí s nízkým obsahem kyslíku má pozitivní vliv na přežití a proliferaci KB. Takové podmínky se více podobají prostředí *in vivo*, zejména protože pNKB i dNKB vznikají v embryu před vývojem funkčního oběhového systému. Se snížením hladiny kyslíku v kultivačních podmínkách pNKB se počet buněk zvýšil přibližně desetkrát oproti buňkám při běžných kultivačních podmínkách [19].

1.2.3 Niché neurálních kmenových buněk

Každá kmenová buňka téměř ve všech tkáních a orgánech je umístěna ve specifickém mikroprostředí nazývaném niché, které udržuje a reguluje funkci kmenových buněk [10]. Niché poskytuje podmínky pro udržování skupiny KB v klidovém stavu, stejně jako signály pro aktivaci a diferenciaci. NKB a její niché tvoří funkční i fyzickou jednotku, která má specifické molekulární vlastnosti. Niché je tvořeno sadami buněk včetně KB, jejichž stav je určen kombinací buněčných specifických vlastností a signálů, které se nacházejí v daném niché. Endogenní signály se týkají hlavně epigenetického stavu kmenových buněk (metylace DNA) a jejich molekulárního repertoáru potřebného k využití komplexní sítě exogenních signálů působících v niché. Externí faktory zahrnují extracelulární signalizace, jako jsou růstové faktory, interakce buněk s buňkami a interakce buněk s extracelulární matrix (ECM)

a další [20]. Dysregulace těchto mechanismů mikroprostředí může způsobit dysfunkci a vede např. k neurodegenerativním onemocněním [8, 21].

Četné signální molekuly identifikované v neurogenním niché regulující chování NKB jsou odvozeny z různých buněčných složek niché [22]. Buňky niché jsou proto nezbytné pro kmenové buňky, protože poskytují strukturální i nutriční podporu a kontrolují základní rozhodnutí o osudu KB. Důležité buňky regulující neurogenezi mají charakter astrocytů. Kontrolují proliferaci a diferenciaci potomstva [10].

Zvláštní úloha při homeostáze a funkci NKB je věnována cévním kapilárám a mozkomíšnímu moku. Byla popsána specializovaná neurovaskulární rozhraní, která podporují funkce NKB [21]. Zdá se, že krevní cévy subependymální zóny (SEZ) postrádají perivaskulární výběžky astrocytů (tzv. *endfeet*) a pokrytí pericyty, a proto mohou poskytnout lepší přístup k různým cévním komponentám niché (možná místa difúze cirkulačních faktorů). Ukázalo se také, že faktory odvozené od endotelových buněk stimulují proliferaci a diferenciaci NKB během vývoje i v dospělosti. Dále extracelulární matrix cév vykazuje trofický vliv na NKB. Vzdálené signály mohou difundovat do niché pomocí cerebrospinální tekutiny, aby modulovaly funkci NKB a jejich proliferaci. Takovéto změny jsou detekovány sodíkovými kanály přítomnými v NKB, a mohou ovlivnit jejich proliferaci a diferenciaci [8, 23].

Klidový stav, proliferace i buněčný osud mohou být ovlivněny hladinou kyslíku v embryonálních, hematopoetických, mezenchymálních a neurálních kmenových buňkách. Obsah kyslíku v plicích (pO_2 = 21 %) postupně klesá až na 2 – 9 % v periferních tkáních. V lidském mozku se pO_2 pohybuje od přibližně 3 do 4 %. Při nízké hladině kyslíku (hypoxie, v rozmezí 1 až 9 %) je snížená tvorba reaktivních forem kyslíku a dochází tak méně k oxidačnímu stresu. Hypoxie reguluje signalizaci Oct4 a Notch. Obsah kyslíku v niché ovlivňuje NKB i změny intracelulárních cest, včetně p53 a signalizace Notch. Hypoxie také zvyšuje *in vitro* proliferaci NKB aktivací signalizace JNK [8, 20].

Vysoce organizovaná bazální lamina poskytuje strukturální podporu při orientaci buněk a je důležitá pro buněčnou homeostázu. Složkami bazální laminy jsou kolagen IV, nidogen, perlekan, agrin a laminin. Receptory pro tyto složky jsou přítomny na povrchu kmenových buněk, zvyšují schopnost niché spojovat NKB do funkční sítě a mohou přímo ovlivňovat jejich proliferaci. Komponenty bazální laminy váží na svůj povrch důležité molekuly např. FGF2, čímž se tento růstový faktor koncentruje do niché NKB [8, 24].

V neurogenním niché NKB a ostatní buňky sdílejí úzké anatomické vztahy umožňující mnoho buněčných interakcí a parakrinních stimulací [8].

V subgranulární zóně (SGZ) a dospělém hipokampu protoplazmatické astrocyty uvolňují FGF2, který stimuluje proliferaci NKB. Astrocyty také produkují další faktory, které stimulují nervovou diferenciaci NKB, včetně NGF (nervový růstový faktor) a BDNF (mozkový neurotrofický faktor) [25].

Mikroglie jsou v niché v těsném kontaktu s NKB a důkazy *in vivo* naznačují, že regulují neurogenezi. *In vitro* experimenty potvrzují, že tyto buňky poskytují faktory specifické pro neurogenezi, nikoliv však pro udržování NKB [20].

Neuronální aktivita moduluje neurogenezi na různých úrovních, od proliferace dospělých neuroblastů až po diferenciaci, zrání, integraci a přežití nových neuronů v dospělém mozku. Účinky jsou částečně závislé na uvolnění klasického neurotransmiteru a aktivaci jeho receptorů. Kyselina γ-aminomaselná (GABA), hlavní neurotransmiter používaný zralými interneurony v mozku, způsobuje depolarizaci nervových progenitorů a nezralých neuronů v dospělém mozku. GABA je uvolňována neuroblasty v SEZ, kde reguluje proliferaci NKB [8, 26].

Je stále nejasné, jak jsou NKB udržovány aktivní po celý život, a jaké buněčné interakce, molekulární kaskády nebo zodpovědné buněčné signály regulují chování NKB. Vzhledem k tomu, že plasticita NKB je závislá na mikroprostředí, budoucí studie by měly zkoumat, jak heterogenita NKB ovlivňuje buněčnou konkurenci v rámci stejného niché a zda tato heterogenita umožňuje přizpůsobení se odlišným mikroenvironmentálním podnětům. Pochopení signalizačních mechanismů, které mohou ovlivnit chování populace NKB, bude rozhodující pro úspěšnost klinických aplikací a pro vývoj léčebných strategií založených na mobilizaci endogenních NKB [8].

1.2.4 Faktory ovlivňující NKB

1.2.4.1 Trofické faktory

Nervový růstový faktor (NGF) podporuje přežití, růst neuritů a tvorbu neurotransmiterů cholinergních neuronů, neuronů gangliových dorsálních kořenů a dalších. Intraventrikulární podávání NGF může zvýšit proliferaci SEZ *in vivo*. *In vitro* ošetření neurosfér pomocí NGF vedlo k diferenciaci bipolárních neuroblastů a cholinergních neuronů [8].

EGF (epidermální růstový faktor) a FGF2 jsou dva růstové faktory důležité pro udržování a proliferaci NKB. Exogenní EGF může vyvolat diferenciaci dospělých NKB do gliových

buněk *in vivo*, zatímco FGF2 stimuluje proliferaci NKB. IGF-1 (insulin-like growth factor 1) je peptid podporující růst, který je důležitý během vývoje mozku. U myší IGF-1 KO[1] je počet granulózních buněk v hipokampu, hustota oligodendrocytů a neurony v *bulbus olfactorius* a celková velikost mozku zmenšena. Naopak nadměrná exprese IGF-1 vede ke zvýšení velikosti mozku a obsahu myelinu. Receptory IGF-1 jsou exprimovány v dospělém *gyrus dentatus*. Periferní infúze IGF-1 zvyšuje proliferaci progenitorové buňky v SGZ a selektivně indukuje jejich neurogenezi. Bylo prokázáno, že LIF podporuje sebeobnovu NKB a podporuje vitalitu zralých oligodendrocytů *in vitro* [8].

1.2.4.2 Wnt

Wnt signalizace a proteiny Wnt jsou důležité pro udržování kmenových buněk různých linií. V nervovém systému je signální dráha Wnt hlavním regulátorem aktivity adultních NKB a progenitorových buněk [27, 28].

Přítomnost signalizace Wnt uvnitř SVZ naznačuje úlohu Wnt ve vývoji CNS. Exogenní protein Wnt podporuje klonální expanzi populací kmenových buněk, které mohou generovat neurony, astrocyty a oligodendrocyty. Použitím inhibitoru Wnt bylo zjištěno, že je Wnt potřebný pro sebeobnovu a expanzi KB. Wnt proteiny mají různé účinky na různé populace buněk. Inhibují nervovou diferenciaci NKB a udržují pluripotenci EKB. U jiných progenitorových populací mohou diferenciaci naopak podporovat [27].

Signál Wnt je nezbytný pro udržení populace KB, které vedou ke vzniku středního mozku, což dokládají výsledky experimentálních studií s Wnt1 KO myšmi, které vykazují agenezi středního mozku. Wnt3a podporuje diferenciaci KB na linie neuronů a astrocytů. Při nedostatku Wnt3a se z důvodu nedostatku proliferace NKB nedostatečně rozvíjí hipokampus. Signalizace Wnt7a indukuje diferenciaci NKB, což snižuje zásobu neurálních progenitorových buněk v pozdních vývojových stádiích [27].

Pozorování aktivity Wnt dráhy v radiálních buňkách SVZ, schopnost Wnt proteinů vést k expanzi kmenových buněk *in vitro* a pozorování, že zablokování dráhy vede k vyčerpání NKB v kultuře, poukazují na důležitost Wnt dráhy při regulaci sebeobnovy kmenových buněk CNS [27, 28].

[1] KO – knock out – geneticky upravený organismus, ve kterém byl změněn genom podle místně řízené rekombinaci tak, že byl gen odstraněn [118].

1.2.4.3 Notch

Expresse Notch ligandů byla pozorována v celé SEZ. Signální dráha Notch reguluje interakce mezi fyzicky sousedícími buňkami. Signalizace Notch indukuje expresi genů jako je Hes1, který potlačuje expresi proneurálních genů a podporuje udržování fenotypu NKB. Exprese Hes1 potlačuje hladinu exprese Mash1, která je vysoce exprimována v progenitorových buňkách. Naopak se ukázalo, že Mash1 podporuje expresi ligandu Notch, což naznačuje mechanismus předpokládané zpětné vazby prostřednictvím inhibice mezi progenitorovými buňkami a NKB přímým kontaktem buněk [29]. Notch1, membránový receptor, který se váže na ligandy přítomné na sousední buňce je nutný pro udržování dospělých hipokampálních kmenových a progenitorových buněk a dospělé neuronogeneze v hipokampu. V nepřítomnosti Notch1 byla narušena samoobnova a expanze buněk exprimujících nestin a snížil se počet generovaných neuronů v *gyrus dentatus* [8]. Signalizace Notch je klíčovým regulátorem klidového stavu NKB a inhibice Notch postačuje k tomu, aby se klidové NKB aktivovaly [29].

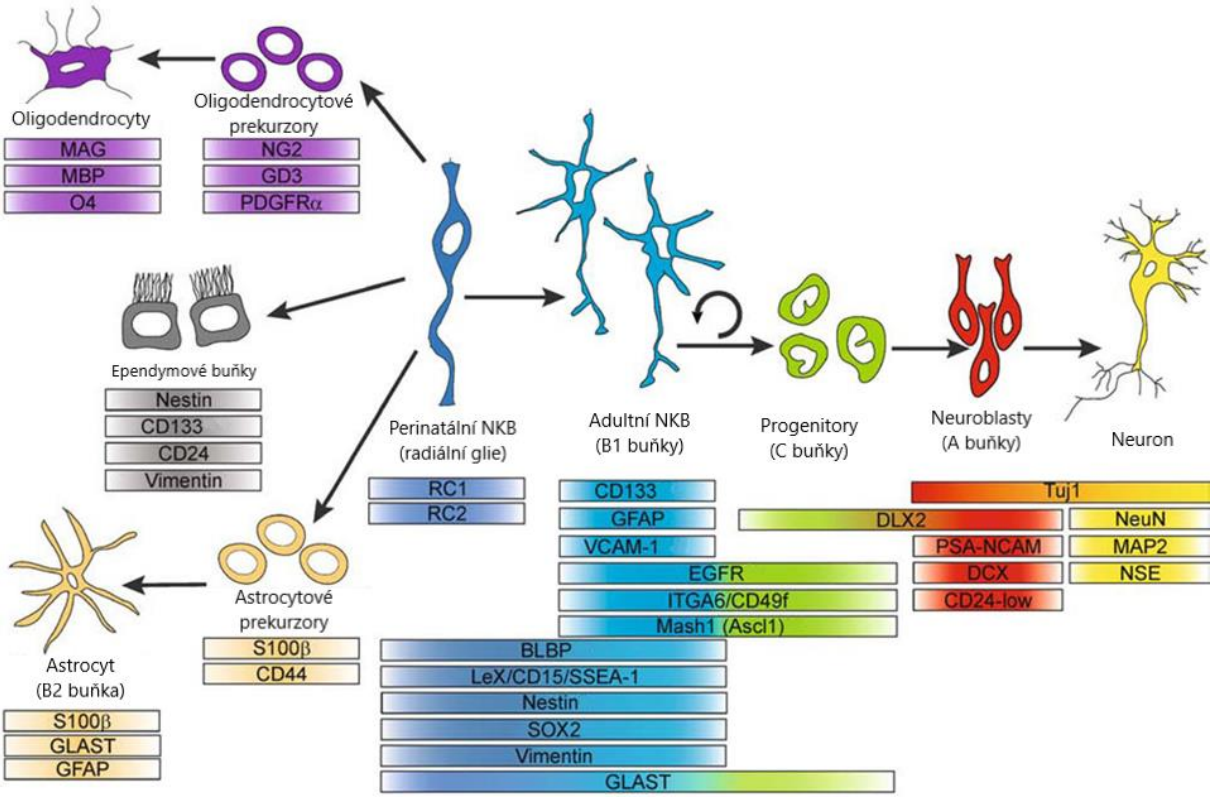
1.2.4.4 Ephrin-B / EphB

Receptory Eph tyrosin kinázy a jejich ephrin ligandy ovlivňují interakce buněk v mnoha vývojových a dospělých tkáních. Jsou důležitými regulátory proliferace, diferenciace, životaschopnosti a migrace kmenových nebo progenitorových buněk. Několik Eph tyrosinkinázových receptorů a jejich ephrin ligandů jsou exprimovány v SEZ a podílejí se na regulaci migrace neuroblastů a proliferaci buněk neurálních progenitorů. Blokování interakce ephrin-B / EphB vede k přetvoření niché způsobem, který je srovnatelný s účinky poškození nebo stárnutí, což naznačuje, že tato třída molekul může regulovat plasticitu NKB [8, 30].

EphB receptory jsou exprimovány ependymovými buňkami a astrocyty. Aktivita EphB působí ve směru toku signálů Notch a je dostatečná k záchraně ztráty ependymových buněk indukované potlačenou signalizací Notch. EphB2, který působí v signální dráze Notch, je také nutný pro udržení charakteristik ependymových buněk, inhibicí přechodu z ependymové buňky na astrocyt [30].

1.2.5 Markery neurálních kmenových buněk

Neurogenní oblasti dospělého savčího mozku byly velmi dobře charakterizovány, avšak pro NKB zatím není znám žádný specifický marker [24]. Analýza NKB se nejčastěji opírá a identifikaci různých markerů (Obr. 2). Nejběžnějšími markery NKB jsou například nestin, GFAP, Musashi1 a 2 nebo Sox2. Žádný z těchto uvedených markerů není dostatečně specifický pro identifikaci NKB [20].



Obr. 2 – Markery NKB, prekurzorů a zralých buněk CNS.
Převzato a upraveno z [29].

Nestin je protein intermediárního filamenta vyjádřený v mitoticky aktivních oblastech rozvíjejícího se a dospělého mozku. U myší je exprese nestinu v počátečních stádiích embryonálního vývoje pozorována a postupně klesá během postnatálního období. Nestin-imunopozitivní buňky nejsou obecně detekovány v dospělém mozku, s výjimkou dvou klíčivých zón, SEZ a SGZ, a proto se běžně používá jako jeden znak NKB. Nicméně nestin nemůže být jednoznačně interpretován jako marker NKB, protože je také exprimován v diferencovaných buňkách, jako jsou astrocyty a neuroblasty nebo i ve svalových, endotelových a některých nádorových buňkách [31, 32].

GFAP, gliální fibrilární kyselý protein, je specifický marker, který rozlišuje astrocyty od jiných gliových buněk [33]. Je exprimován také ependymovými buňkami a radiálními gliovými buňkami. Exprese GFAP buňkami dokládá jejich původ z radiální glie [20].

NCAM, adhezní molekula neurálních buněk, je přítomen v celém CNS během pozdních embryonálních a raných postnatálních období. Poté jeho exprese rychle klesá. V hypotalamu je NCAM hojně přítomen v buňkách ependymového povrchu třetí komory. Imunoreaktivita NCAM byla také spojena s neurogenezí, je stále detekovatelná u neuroblastů v SEZ i *gyrus dentatus* [34].

PCNA, jaderný antigen proliferujících buněk je částí DNA δ-polymerázy. Ovlivňuje celou řadu důležitých buněčných procesů včetně metabolismu nukleových kyselin jako součást replikačního a opravného mechanismu [35, 36]. PCNA je využíván jako marker proliferujících buněk např. v SEZ [37] a je exprimován také v rostoucích nádorech [38].

Sox2 je transkripční faktor nezbytný pro udržení sebeobnovy NKB. Při neurogenezi je Sox2 exprimován ve všech buňkách neurální trubice, stejně jako v proliferujících progenitorech CNS [20, 37].

Prominin-1 (CD133) je membránový glykoprotein původně identifikován v neuroepitelu myšího embrya. U lidí byl původně popsán jako specifický marker hematopoetických progenitorových buněk a dalších embryonálních epitelů [39]. Buňky $C133^{+}$ mají vlastnosti kmenových buněk (sebeobnova, diferenciace, vysoká proliferace). V současné době se prominin-1 používá pro izolaci a identifikaci KB z řady tkání např. kostní dřeně, mozku, ledvin, jater, kůže či glioblastomu [40].

Pro rozeznávání klidových NKB se využívá exprese specifických markerů, Oct4, Sox2, Nanog, FoxO3 nebo také dlouhodobé zadržování BrdU[2] (bromodeoxyuridinu) [20]. Diferencované prekurzory kmenových buněk a neuroblasty jsou běžně rozpoznány expresí doublecortinu (neuronální migrační protein, DCX) a NCAM [41].

[2] Principem testu dlouhodobého zadržování bromodeoxyuridinu (5-bromo-2'-deoxyuridin, BrdU) je začlenění BrdU do DNA, jestliže buňka proliferuje, do několika hodin až dní pozitivita BrdU v buňkách zřeďovacím principem vymizí. Přítomnost BrdU pozitivních buněk, 3-4 týdny po podání BrdU, dokládá jejich klidový stav [119].

1.3 Neurogeneze

Mozková kůra savců se skládá z velkého množství nervových a gliových buněk, které se vyvíjejí z neurálních kmenových buněk v průběhu embryonálního vývoje a prvních postnatálních týdnů. Během tohoto procesu se přechod z NKB na plně diferencované neurony a glie nazývá neuronogeze a gliogeneze [42].

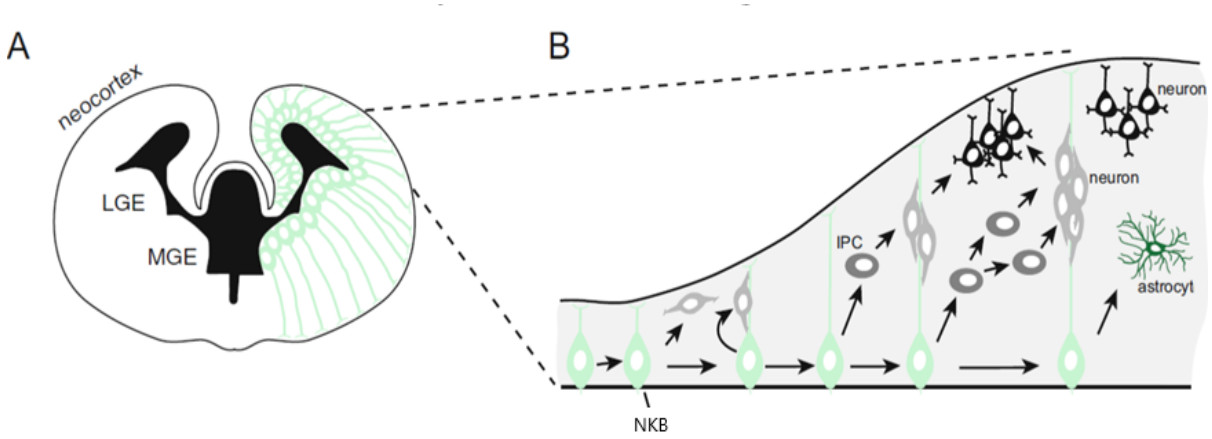
Během embryonálního vývoje generují NKB téměř všechny neurony CNS. Avšak brzy po narození je neurogenní potenciál NKB vysoce omezen a neuronogeneze se vyskytuje pouze ve specializovaných oblastech mozku [10].

Dvě zárodečné oblasti vyvíjejícího se mozku savců, ventrikulární zóna (VZ) a později subventrikulární zóna (SVZ) vytvářejí většinu neuronů a gliových buněk v CNS savců [43]. Buňky tvořené těmito oblastmi jsou od sebe navzájem morfologicky odlišné a produkují odlišné potomstvo [44].

Buňky VZ jsou potomstvem neurální trubice a diferencují se prenatálně na radiální glie, neurony a astrocyty. Radiální glie se rozprostírá od stěny komory až k povrchu vyvíjejícího se neokorexu a pomáhají tak k migraci neuroblastů do šedé hmoty, kde vyzrávají v projekční neurony. Tímto způsobem se vytvářejí jednotlivé vrstvy neokortexu. Nedlouho poté, co se z VZ vytvoří první neurony, se objeví druhá proliferativní populace SVZ. Zatímco proliferativní frakce VZ rychle klesá, populace buněk SVZ exponenciálně narůstá během druhé třetiny prenatálního vývoje. Počet buněk v SVZ vrcholí během prvního týdne po narození u hlodavců a přibližně v 35. týdnu těhotenství u lidí, po níž se SVZ začíná zmenšovat [44].

VZ tvoří neurony v hlubších vrstvách neokortexu, zatímco SVZ tvoří neurony ve vrstvách povrchových. Toto potvrzuje exprese transkripčních faktorů Otx1 a Svet1 u myších embryí. Otx1 je jediný ukazatel, který konkrétně označuje, jak neurony hluboké vrstvy, tak jejich progenitory. Zatímco Svet1 označuje buňky SVZ a neurony vnější vrstvy [44].

V počátečním vývoji jsou velké shluky buněk viditelné jako vyvýšeniny přilehlé ke stěnám laterálních komor. Tyto vyvýšeniny jsou kolektivně nazývány gangliovými eminencemi. V rozvíjejícím se předním mozku během vývoje plodu lze rozlišovat čtyři odlišné části SVZ na základě morfologie, velikosti buněk i data embryonálního vývoje. Tyto čtyři oblasti jsou mediální gangliová eminence (MGE), laterální gangliová eminence (LGE), kaudální gangliová eminence (CGE) a SVZ. Každá oblast je obohacena o progenitory, které vytvářejí různé typy neuronů a glií, které pokračují v osídlování dalších oblastí vyvíjecího se mozku (Obr. 3) [44].

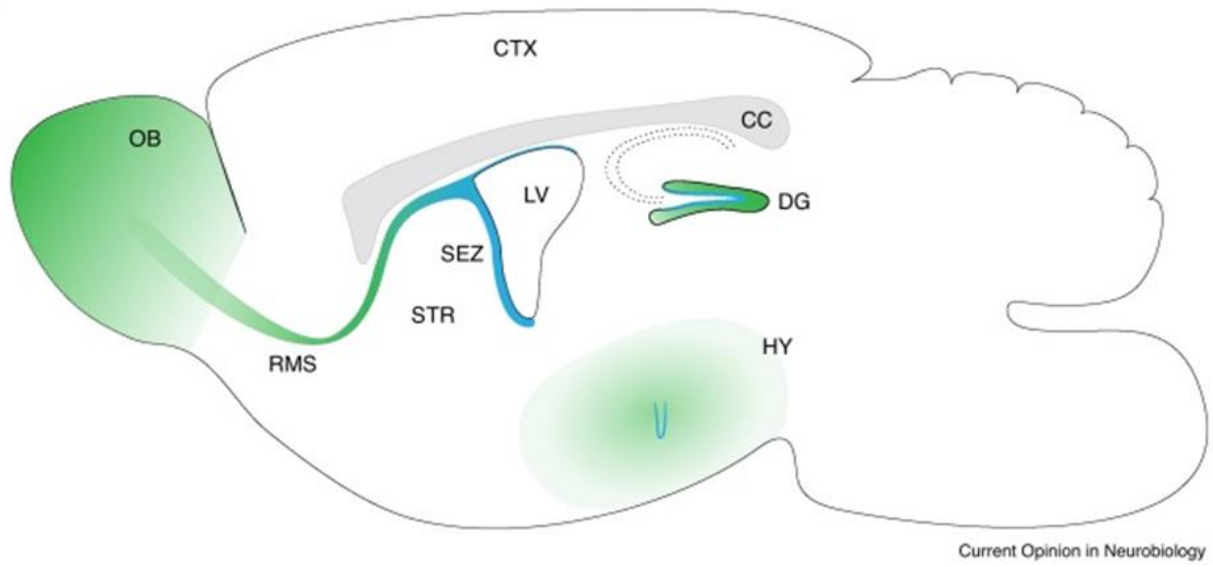


Obr. 3 – Embryonální neurogeneze.
Schématické znázornění neurogeneze v embryonálním kortexu mozku hlodavců. (A) Řez embryonálním předním mozkem zobrazující neokortex, laterální gangliovou eminenci (LGE) a mediální gangliovou eminenci (MGE). (B) Schématické znázornění sekvenčních vývojových kroků neurogeneze myšího embrya. Upraveno a převzato z [10].

V šedesátých letech 20. století se začaly objevovat studie buněčné proliferace v mozku dospělých potkanů. Tato nová zjištění byla podpořena metodou začlenění značeného thymidinu do DNA buněk. Identifikace proliferujících buněk ale neodhalila nové neurony, potvrzena byla jen přítomnost gliových buněk [45]. O tři roky později byl vznik nových neuronů prokázán u dospělých potkanů v subgranulární zóně gyrus *dentatus* hipokampu [46], a poté i v subependymální zóně postranních komor [47].

Neuronogeneze v dospělém lidském mozku byla prokázána v roce 1998, stejně tak byla doložena adultní neuronogeneze i u primátů [48].

V adultním mozku se neuronogeneze vyskytuje pouze v oblastech, ve kterých jsou udržovány vývojové signály a morfogeny, jako jsou BMPs (z angl. *bone morphogenetic proteins,* kostní morfogenetické proteiny), Notch, Eph a Noggin [44]. U dospělého mozku savců jsou nejlépe popsány dvě hlavní neurogenní oblasti, a to subgranulární zóna *gyrus dentatus* hipokampu a subependymální zóna postranních mozkových komor (Obr. 4) [25]. Za další možnou neurogenní zónu je považována stěna třetí komory hypotalamu [31]. V těchto neurogenních oblastech vedle sebe existují klidové i aktivované kmenové buňky, které generují nové buňky po celý život organismu [20].



Obr. 4 – Neuronogeneze v savčím dospělém mozku.
Adultní NKB (modré oblasti) produkují nové neurony (v zelených oblastech). Adultní NKB se nacházejí v SEZ stěny postranní komory (LV), SGZ gyrus dentatus (DG) a v hypotalamu (HY), OB – bulbus olfacotirus, RMS – rostrální migrační proud, STR – striatum, CTX – neokortex, CC – corpus callosum [49].

Nové údaje naznačují, že běžné vnější podněty, jako je fyzická aktivita, učení, reakce na okolní prostředí, stres nebo stárnutí ovlivňují adultní neurogenezi. Kromě toho se zdá, že neurogeneze je i nástrojem pro komplexní kognitivní funkce [20].

1.4 Adultní neurogenní zóny

1.4.1 Subependymální zóna

SEZ je považována za zbytek zárodečné zóny, která ohraničuje postranní mozkové komory a vytváří se již během embryonálního vývoje [43]. V dospělosti přetrvává a nepřetržitě u hlodavců podporuje *bulbus olfactorius* novými buňkami. V rámci dospělé SEZ tvoří aktivované NKB neuroblasty, které procházejí rostrálním migračním proudem (RMS) do bulbus olfactorius, kde se během 3-6 týdnů diferencují ve zralé neurony [20, 31].

První pokusy o identifikaci NKB v SEZ naznačovaly, že by ependymové buňky mohly být odpovědné za neurogenezi této oblasti. Podávání BrdU dospělým myším označilo mnoho ependymálních buněk a ty vykazovaly dlouhodobé zadržování BrdU. Následně bylo prokázáno, že ependymální buňky jsou klidové a nemají vlastnosti NKB [20].

Exprese zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) pod GFAP (gliální fibrilární kyselý protein) promotorem naznačuje, že astrocyty jsou kandidáty na NKB. Tento výsledek podpořil poznatek, že GFAP pozitivní buňky označené *in vivo* v SEZ generují buňky, které migrují do *bulbus olfactorius* [20].

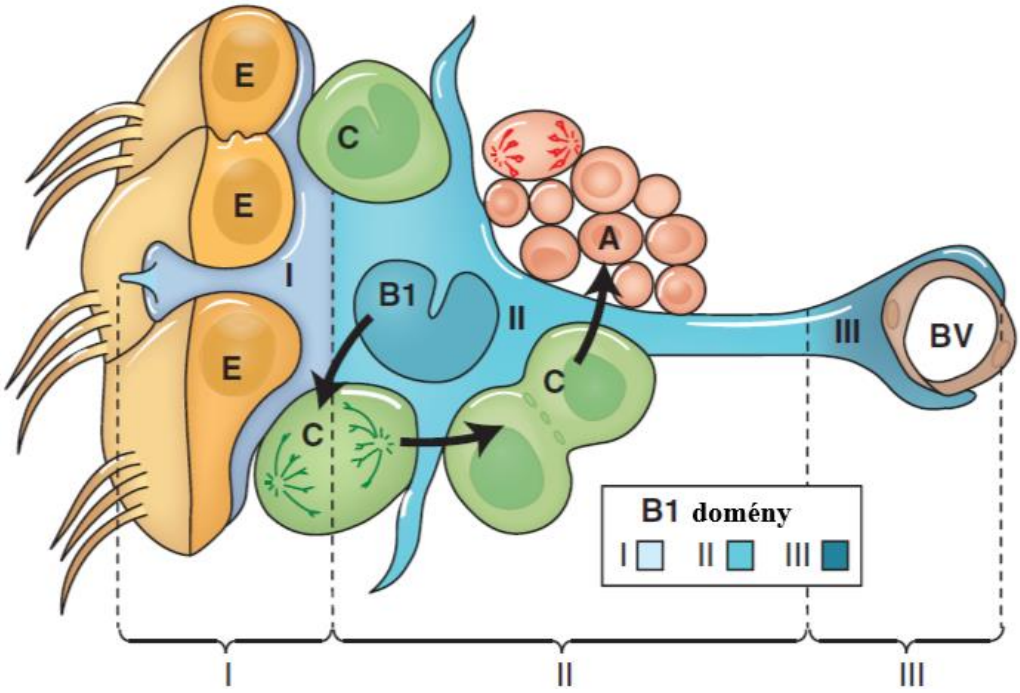
Struktura a organizace SEZ (Obr. 5) byla velmi podrobně studována, což vedlo ke klasifikaci čtyř hlavních buněčných typů. Buňky jsou označeny jako typy A, B1, B2 a C (Tab. 1) [44].

Tab. 1 – Klasifikace typů buněk SEZ.

Typ buněk	Předpokládaná buněčná identita
A	Neuroblasty
B1	NKB
B2	Nezralé astrocyty
C	Progenitory

Buňky A jsou neuroblasty, mají protáhlé tělo, mikrotubuly orientované podél dlouhé osy buňky a tmavou cytoplazmu bohatou na ribozomy. B1 a B2 typy buněk sdílejí charakteristiky astrocytů. B1 buňky zastávají funkci NKB, mají světlejší cytoplazmu s malým počtem ribozomů a B2 buňky jsou nezralé astrocyty. Čtvrtý typ buněk, buňky typu C, jsou velké buňky s velkými světlými jadérky. Jsou vysoce proliferativní, a představují multipotentní progenitory [44].

Na základě struktury a prostorového uspořádání buněk typu B1 je možné SEZ rozdělit do tří domén. Doména I (apikální) obsahuje apikální výběžek buněk typu B1 a ependymové buňky, doména II obsahuje buněčné tělo většiny buněk typu B1, které jsou v kontaktu s buňkami typu C a A, a doména III (bazální) obsahuje bazální výběžek B1 buňky s koncovými nožkami na cévách.



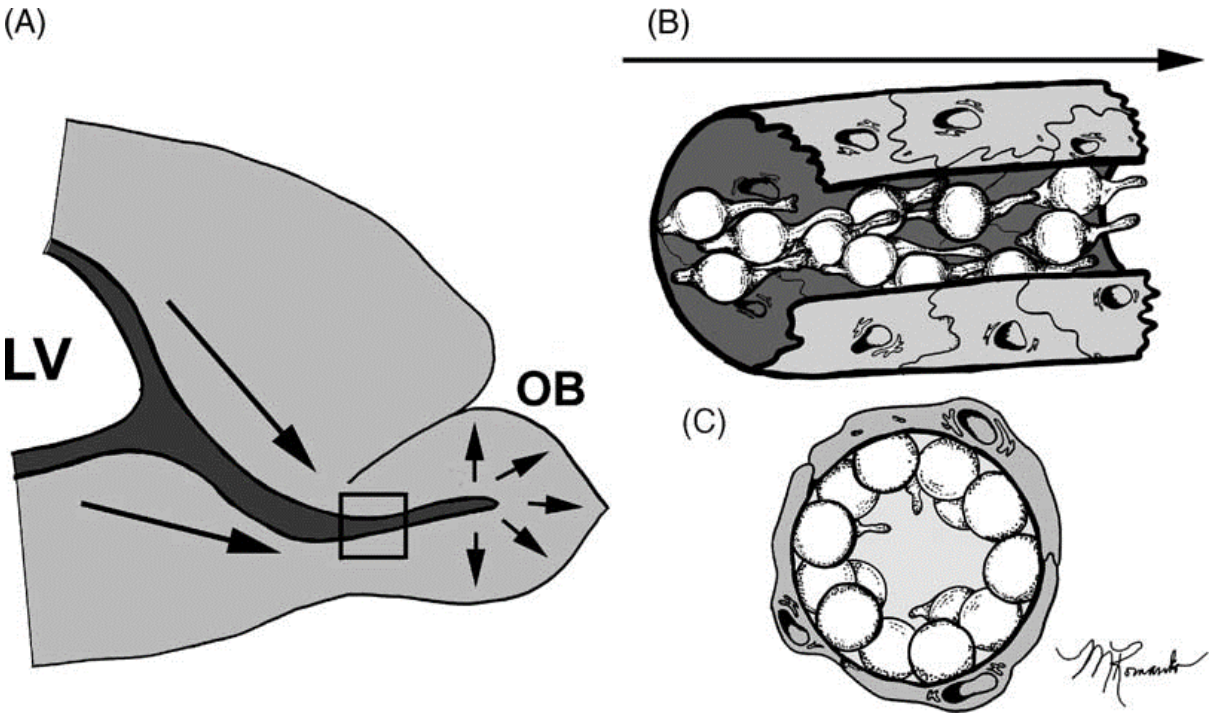
Obr. 5 – Schéma buněčné organizace SEZ.
B1 (modré) – astrocyty, které slouží jako kmenová buňka SEZ. C (zelené) – vysoce proliferativní progenitorové buňky. A (růžové) – migrující neuroblasty. BV – krevní céva (z angl. blood vessel). Apikální povrch buněk typu B1 má řasinku, která je zanořená v dutině postranní mozkové komory. Tyto apikální povrchy se nacházejí ve středu "ozubeného kola" složeného z ependymálních buněk (E – žlutá). Převzato a upraveno z [50].

Použitím imunohistochemie a konfokální mikroskopie povrchu postranní komory bylo zjištěno, že B1 buňky společně s ependymovými buňkami jsou v kontaktu s cerebrospinální tekutinou protékající komorou [20].

Rekonstrukce SEZ na úrovni elektronové mikroskopie odhalily řetězce neuroblastů obklopené těly a výběžky buněk B. Progenitorové buňky jsou nejčastěji nalezeny v malých shlucích. Absolutní poměr buněčných typů uvnitř SEZ prozatím nebyl stanoven, ale je zřejmé že progenitory v dospělé SEZ daleko převyšují počet NKB. Analýza poměru progenitorů a NKB, za použití injekcí ^{3}H thymidinu a BrdU, ukázala, že půl dne po usmrcení buněk proliferovalo méně než 1 % buněk SEZ. Toto malé procento proliferujících buněk kompletně doplní buňky SEZ za 8 dnů, což naznačuje, že tyto označené buňky jsou pravděpodobně KB, a že tvoří

nejvýše 1 % populace buněk SEZ. Výpočty založené na počtu buněk tvořících neurosféru naznačují, že v dospělém myším mozku je přibližně 1200 NKB [44].

Elektronová mikroskopie kombinovaná s označením migračních buněk ^{3}H thymidinem v rostrálním migračním proudu naznačuje, že migrující buňky jsou buňky typu A, neuroblasty (Obr. 6). Jak čas postupuje, v jádrech migrujících buněk se zachovává méně radiografických zrn, což naznačuje, že se neuroblasty při migraci v RMS dále dělí. Patnáct dní po injekci, většina značených buněk naplní vrstvu granulárních buněk v *bulbus olfactorius*. Tyto buňky jsou pozitivní pro neuron specifickou enolázu (NSE), zatímco buňky v RMS a SEZ zůstaly negativní. Tyto údaje ukazují vývoj nezralých progenitorových buněk SEZ migrujících skrz RMS do *bulbus olfactorius*, kde dozrávají do granulárních a periglomerulárních buněk (GABAergní interneurony) [44].



Obr. 6 – Migrace buněk ze SEZ rostrálním migračním proudem.
A – Cesta neuroblastů při migraci RMS na konečné místo v bulbus olfactorius (OB). B – Migrace neuroblastů tunelem tvořeným astrocyty. C – Průřez RMS. LV – postranní komora [44].

1.4.2 Subgranulární zóna

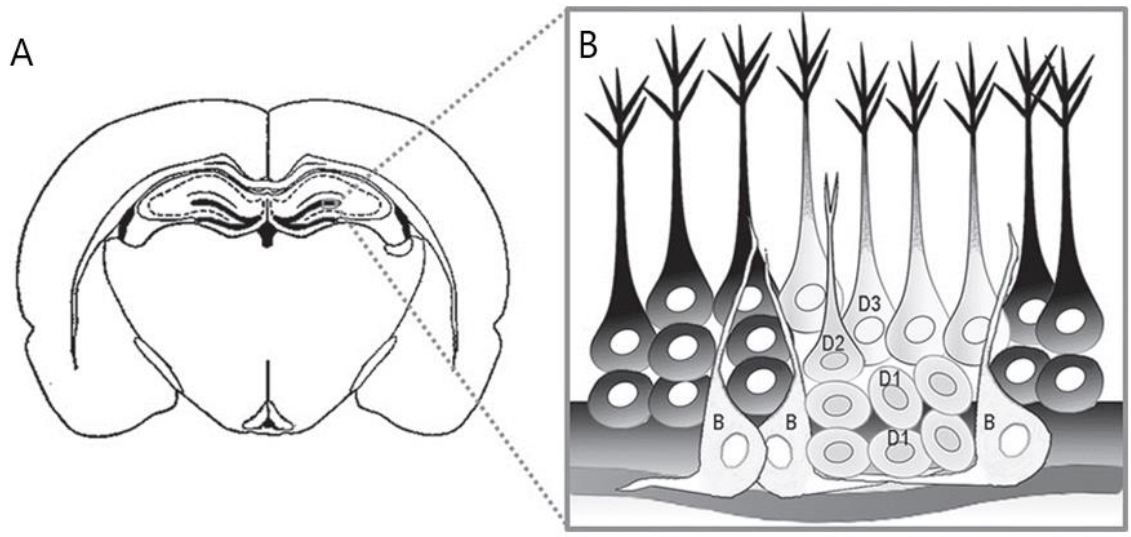
Subgranulární zóna je umístěna v hipokampu na rozhraní hilu a granulární vrstvy hipokampu. Odhaduje se, že v SGZ dospělých hlodavců se generuje přibližně 100 až 150 neuronů denně. Nově vzniklé neurony, které se integrují do místního obvodu, přežívají po dobu nejméně osmi měsíců u hlodavců a dvou let u lidí [24].

Neurální progenitorové buňky, které se vyskytují v SGZ, podobně jako kmenové buňky SEZ, mají vlastnosti astrocytů. Tyto buňky, nazývané B buňky nebo progenitory typu I, exprimují nestin, GFAP a Sox2, a mají výrazné radiální výběžky. I když exprimují astrocytový znak GFAP, tyto buňky jsou morfologicky a funkčně odlišné od zralých astrocytů [26]. B buňky produkují D buňky, progenitory typu II, které rychle proliferují a tvoří agregáty mezi radiálními výběžky B buněk. Obvykle tvoří shluky dvou až čtyř buněk a jsou pozitivní na NCAM a doublecortin. Analýza ultrastruktury prokázala tři subpopulace D buněk: D1, D2 a D3 (Obr. 7). D buňky generují migrující neuroblasty označované jako buňky typu III, které migrují do vnitřní vrstvy granulárních buněk a diferencují se na granulární neurony. Nově tvořené neurony mají kulaté tělo, dobře vyvinuté dendritické výběžky a jeden axon. Když tyto neurony vyzrávají, exprimují NeuN (neuronální jaderný antigen) a calbindin (protein vázající vápník). Celý proces diferenciace, zrání a integrace nových granulárních buněk nastává u myší během šesti až osmi týdnů po narození [20, 24, 25].

V SGZ existuje ještě druhá populace neurálních progenitorových buněk. Jsou to neradiální buňky taktéž vyjadřující Sox2 a nestin, ale na rozdíl od progenitorů typu I, které bývají klidové, se aktivně obnovují a neexprimují GFAP. Přesná funkce každé populace je stále nejasná. Hipokampus je spojen s pamětí a učením. Bylo prokázáno, že fyzická aktivita souvisí se zvýšením proliferace nervových progenitorových buněk a kognitivní stimulace souvisí s lepším přežíváním nově vznikajících neuronů [24].

NKB SGZ mohou autokriním způsobem regulovat vlastní klidové stádium. Laktadherin je vysoce exprimován v klidových NKB *gyrus dentatus*. Sledování chování NKB při deleci laktadherinu odhalilo významné zvýšení proliferujících KB, což naznačuje, že laktadherin blokuje aktivaci a proliferaci NKB [22].

Ačkoli molekulární a buněčná povaha hipokampálního niché nebyla jasně definována, zdá se, že podporuje NKB v produkci většího množství neuronů na úkor astrocytů [26].



Obr. 7 – Organizace subgranulární zóny dospělých hlodavců.
(A) Schematické znázornění koronálního řezu dospělého myšího mozku ukazujícího hipokampus. Subgranulární oblast gyrus dentatus je zvětšena v (B). (B) Buněčná organizace SGZ. Astrocyty SGZ – také nazývané B buňky – mají radiální výběžky a vedou ke vzniku progenitorových buněk (D1). D1 buňky se dělí a diferencují do nových granulárních buněk (D2), které se integrují do vrstev buněk gyrus dentatus (D3) [51].

1.4.3 Hypotalamus

Ukázalo se, že v hypotalamu proliferují endogenní NKB a mohou být indukovány k diferenciaci na neurony na základě fyziologických i farmakologických podnětů. Proliferace buněk a nová produkce neuronů byla zaznamenána u různých druhů hlodavců a větších savců, jako jsou např. ovce. Avšak u primátů údaje o hypotalamické neurogenezi prozatím popsány nebyly [31].

Řada důkazů podporuje hypotézu, že by hypotalamus mohl být potenciální adultní neurogenní zónou. Jeden z důkazů je vysoká úroveň exprese markerů spojených s morfologickou a buněčnou plasticitou v hypotalamu. V hypotalamu je polysialylovaná forma adhezní molekuly nervových buněk (PSA-NCAM) hojně přítomna ve výstelce a přilehlých oblastech třetí mozkové komory [31].

Techniky běžně používané k odhalení nových neuronů v SGZ a SEZ byly úspěšně použity i v hypotalamu. Takové techniky zahrnují kolokalizaci proliferačních markerů spolu se specifickými buněčnými markery pro neurony a neuroblasty (doublecortin, β-tubulin typu III, NeuN, MAP2), astrocyty (GFAP) a oligodendrocyty (galaktocerebrosidáza a myelin proteolipidový protein) [31].

V hypotalamu dospělého mozku byly hlášeny tři proliferační zóny. První proliferativní zóna v dorzální α1 oblasti po stimulaci IGF1 dokáže indukovat tanycyty ke tvorbě neuronů a astrocytů v sousedním hypotalamickém parenchymu. Druhá proliferativní zóna v dorzální α2 oblasti může být stimulována FGF2 aktivací symetrické sebeobnovy dorzálních α2 tanycytů nebo může být zdrojem neuronů a astrocytů a zřídka i oligodendrocytů. Ve třetí proliferační zóně, tzv. hypotalamické proliferativní oblasti umístěné v sousední eminenci, tanycyty proliferují symetricky, což vede ke vzniku neuronů, případně progenitorů oligodendrocytů [8].

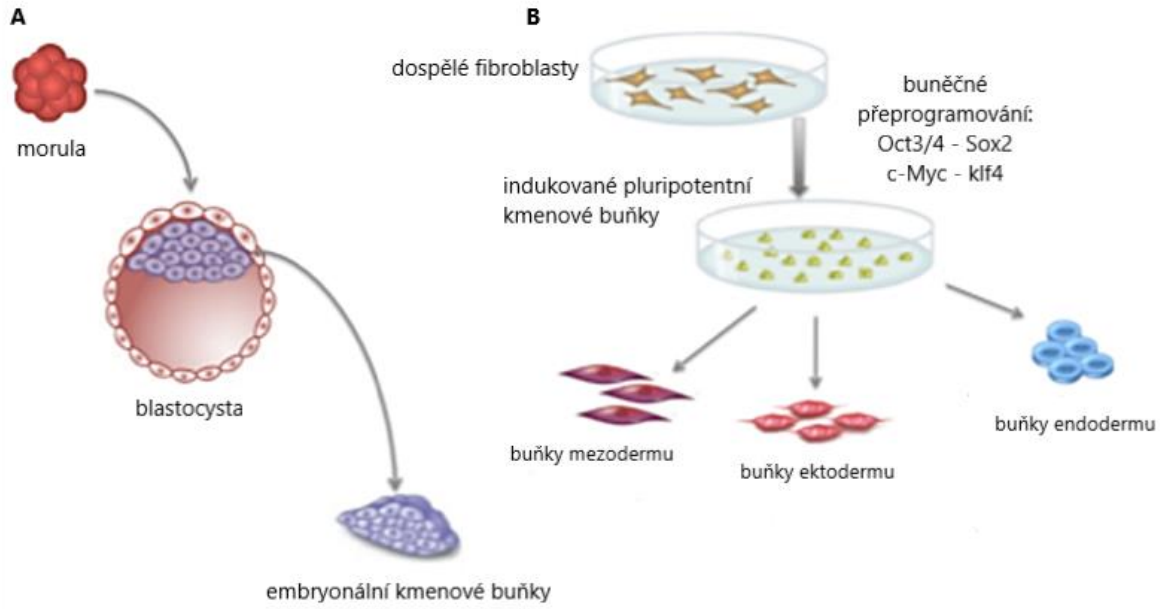
Hypotalamická neuronogeneze byla spojena s regulací tělesné hmotnosti a energetické rovnováhy [8].

1.5 Pluripotentní kmenové buňky

Pluripotentní kmenové buňky jsou buňky se schopností sebeobnovy a diferenciace do buněk tří zárodečných listů, tedy do všech buněk organismu. Mezi pluripotentní kmenové buňky patří embryonální kmenové buňky (EKB) a indukované pluripotentní kmenové buňky (iPS buňky, z angl. *induced pluripotent stem cells*) (Obr. 8) [52].

Pluripotence byla ale potvrzena i u dalších typů KB. Řadíme sem epiblastové kmenové buňky (EpiKB), jedné ze dvou buněčných vrstev diferencovaných z buněk embryoblastu. Pluripotentní jsou také některé buňky reprodukčních orgánů, primordiální zárodečné buňky a postnatální spermatogonie [53].

Po transplantaci mohou pluripotentní kmenové buňky generovat teratomy, ve kterých jsou nalezeny struktury odvozené z některého zárodečného listu [54].



Obr. 8 – Získání EKB a iPS buněk.
A – Embryonální kmenové buňky. B – Indukované pluripotentní kmenové buňky. Převzato a upraveno z [55].

1.5.1 Embryonální kmenové buňky

Během pátého až sedmého dne embryonálního vývoje člověka se tvoří blastocysta, která obsahuje pluripotentní buňky. Tato skupina buněk je označována jako embryoblast a obsahuje ji embryonální kmenové buňky (EKB) [56].

Že jsou EKB pluripotentní ukázal Gardner a kol. v roce 1968, kdy vytvořili chimérická zvířata přenosem buněk z embryoblastu jedné blastocysty do blastocysty jiné. *In vitro* lze pluripotenci EKB prokázat formováním embryoidních tělísek. V těch pak EKB spontánně diferencují ve

všechny buněčné typy ektodermu, mezodermu i endodermu. EKB částečně přispívají i k extraembryonálním tkáním, např. embryonálním obalům a částečně i placentě [53].

Až do konce devadesátých let 20. století byly EKB také generovány z vyšších druhů savců, nejprve z blastocyst primátů (mimo lidských) a následně i blastocyst lidských embryí [54].

1.5.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Pomocí faktorů přítomných v EKB, které jsou potřebné k obnovení pluripotentního stavu v somatických buňkách Yamanaka a Takahashi v roce 2006 [57] vyvinuli metodu, která prokázala, že myší fibroblasty lze pouze čtyřmi trofickými faktory; Oct4, Sox2, cMyc a Klf4, dediferenciovat na buňky téměř s veškerými vlastnostmi myších EKB. Takto přeprogramované myší fibroblasty mohou generovat buňky všech tří zárodečných listů. Takové buňky byly označeny jako indukované pluripotentní kmenové buňky (iPS). iPS byly později vytvořeny z různých somatických buněk myší, primátů i lidí [54].

1.6 Kultivace a diferenciace NKB

Pro detekci a expanzi kmenových buněk z dospělého mozku použili Reynolds a Weiss [7] bezsérový kultivační systém, přičemž většina primárních diferencovaných buněk CNS, které byly sklizeny, nepřežila. I když tento systém vedl ke smrti většiny buněčných typů odvozených z periventrikulární oblasti během tří dnů kultivace, umožnil malé populaci (asi 0,1%) buněk citlivých na epidermální růstový faktor (EGF), aby začaly aktivně proliferovat. Použitím tohoto kultivačního systému prokázali, že jediná dospělá buňka CNS by mohla proliferovat za vzniku shluku nediferencovaných buněk označovaných jako neurosféra, která by mohla být disociována za vzniku sekundárních sfér nebo indukována k diferenciaci, generující tři hlavní typy buněk CNS. Tímto způsobem prokázali, že buňka, kterou izolovali, vykazovala atributy proliferace, sebeobnovy a schopnost generovat řadu diferencovaných, funkčních buněk. Další studie ukázaly, že následkem dobře definovaného protokolu (s použitím EGF a FGF2) by se mohl vytvořit konzistentní, obnovitelný zdroj nediferencovaných prekurzorů CNS, které by mohly být rozšířeny jako neurosféry nebo diferencovány do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů [58, 59].

NKB mohou být také kultivovány systémem adherentní monovrstvy, metody vyvinuté na počátku 90. let. Oba systémy mají řadu výhod a nevýhod a je třeba pečlivě zvážit, který systém pro kultivaci využijeme. Obě metody jsou cenným nástrojem pro stanovení proliferačního i diferenciačního potenciálu NKB *in vitro* [60].

Neurosféry umožňují expandovat NKB *in vitro* a přímý odečet rozdílů v počtu a potenciálu prekurzorových buněk. Kromě toho jsou neurosféry také užitečným nástrojem pro studium vnitřní specifikace buněk, když jsou odstraněny z jejich normálního vnějšího prostředí. Vnější podněty mohou být studovány jednoduše přidáním faktoru zájmu do média a kvantifikace počtu a velikosti generovaných neurosfér. Hlavní nevýhodou kultivace neurosfér je tvorba jejich vlastního niché, tj. buňky ve středu neurosféry (zvláště velké neurosféry) jsou více diferencované než buňky na povrchu. Neurosféry obsahují nejen kmenové buňky, ale i jejich potomstva, progenitory a diferencované buňky [60].

Adherentní monovrstevné kultury poskytují dobrý systém pro modelování *in vivo* proliferace. Adherentní kultury, ve kterých buňky zůstávají izolovanější a homogennější, mohou eliminovat heterogenní povahu neurosféry. Za těchto růstových podmínek prekurzorové buňky rychle proliferují a téměř všechny buňky se dělí a exprimují charakteristické nervové prekurzorové markery Nestin, Sox2 a BLBP (brain lipid-binding protein). Hlavní nevýhodou systému

monovrstvy ve srovnání s kultivací NKB jako neurosfér je nemožnost monitorování a kvantifikování jednotlivých klonů odvozených od prekurzorů [60].

Pro potvrzení multipotentního potenciálu buněk mohou být jak adherentní kultury, tak neurosféry diferencovány absencí mitogenu v přítomnosti séra. Je prokázáno, že takto diferencované NKB vedou ke vzniku neuronů i glií [60].

Vývoj a zrání neuronálních buněk *in vivo* závisí na různých typech chemické signalizace. Zpočátku, růstové faktory a chemoatraktanty uvolňované do extracelulárního prostoru progenitorovými buňkami spouští lokalizační specifickou diferenciaci. Při tvorbě neuritů vede lokální uvolňování neurotransmiterů k vývoji dendritu a zráním buněk k vytvoření dynamických sítí CNS. *In vitro* mohou být faktory obnoveny prostřednictvím doplňování média [61].

1.7 Kultivace a diferenciace embryonálních kmenových buněk

První izolace a kultivace EKB z myšího embrya v roce 1981 [62] otevřela možnost získat dostupný zdroj pluripotentních buněk a tím i možnost tvorby všech buněk organismu v laboratoři [63].

Vzhledem k tomu, že embryonální vývoj je zprostředkován sledem signálů, které rozhodují o osudu buněk, je diferenciace pluripotentních buněk *in vitro* řízena molekulami rekapitulující vývojový proces [64]. Příklady postupů zahrnují postupnou diferenciaci EKB na motorické neurony [65], oligodendrocyty [66], dopaminergní neurony [67], erytrocyty [68], hepatocyty [69] a další.

Kultivace myších EKB obvykle probíhá v přítomnosti podpůrných buněk, většinou fibroblastů, které byly inaktivovány např. mitomycinem. Tyto buňky tvoří vrstvu na dně kultivační nádoby a produkují faktory podporující přežití EKB. Pokud nejsou použity podpůrné buňky je třeba EKB kultivovat na miskách potažených želatinou nebo Matrigelem [70].

Jednou z nejpozoruhodnějších vlastností embryonálních kmenových buněk je jejich schopnost organizovat se do trojrozměrných struktur, které jsou schopny napodobit některé aspekty embryonálního vývoje. Takto vzniklé embryoidní tělíska představují experimentální *in vitro* model, který poskytl mnoho důležitých vodítek pro studium raného embryonálního vývoje [63, 71]. Embryoidní tělíska jsou kulaté struktury odvozené z EKB, které prošly některými z počátečních fází diferenciace, případně byly směřovány k diferenciaci za účelem generování specifičtějších typů buněk [72].

In vitro diferenciace EKB je účinným nástrojem pro studium specifikace linie. V kombinaci s moderními molekulárními nástroji pro značení linií a třídění buněk může *in vitro* produkce různých typů buněk z EKB poskytnout neomezené množství specifických buněk [71].

V diferencovaných embryoidních tělíscích se spontánně tvoří neuroepitel i NKB. Pro zvýšení účinnosti neurální diferenciace se využívá kyselina retinová (RA). Při tomto postupu se tvoří embryoidní tělíska po dobu čtyř dnů v nepřítomnosti RA a pak se kultivují po dobu dalších dnů v přítomnosti RA a výsledné buňky vykazují více neuronálních znaků jako jsou růst neuritů, exprese neuronálních markerů (β-III-tubulin a neurofilamenta) a další. Navzdory přidání velkého množství RA jsou tato tělíska stále heterogenní, obsahující další mesodermální a entodermální buňky, což ukazuje, že v těchto komplexních 3D strukturách je obtížné regulovat jednotlivé diferenciační kroky [63, 71].

Lidské NKB mohou být generovány a expandovány krátkodobě bez potřeby tvorby embryoidních tělísek v bezsérových podmínkách duální inhibicí signalizace SMAD [73] nebo synergickou inhibicí glykogen syntázy kinázy-3 (GSK3), transformujícího růstového faktoru β a signalizační dráhy Notch [74].

Náchylnost hEKB k buněčné smrti po disociaci jednotlivých buněk je podstatnou překážkou dlouhodobé kultivace hEKB, ale byla překonána pomocí malých molekul; PD0325901, CHIR99021 a Y27632 (ROCK inhibitor), v kombinaci s FGF2 si hEKB zachovávají pluripotentní potenciál i při dlouhodobém pasážování na povrchu potaženém fibronektinem [75].

In vitro diferenciace neuronů z embryonálních kmenových buněk může být vynikajícím přístupem ke studiu vlivu genů na různé neuronální funkce [76].

1.8 Imunohistochemie

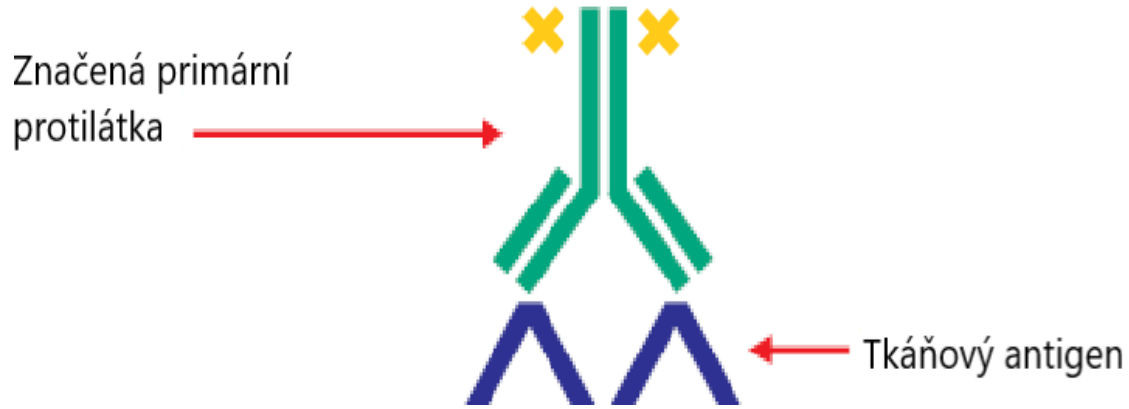
Imunohistochemické metody jsou založeny na reakci antigenu s protilátkou [77]. V rámci imunohistochemie se uplatňují monoklonální a polyklonální protilátky pro detekci specifických antigenů v tkáňových řezech. Místo navázané protilátky se vizualizuje fluorescenčním barvivem, enzymem, radioaktivním prvkem nebo koloidním zlatem [78].

První studie, ve které byla použita technika imunohistochemie, byla uvedena v roce 1941. V této studii byly použity protilátky značené fluoresceinem isothiokyanátem (FITC) k lokalizaci pneumokokových antigenů v infikovaných tkáních. V imunohistochemii se barvení provádí tak, aby bylo poškození tkáně nebo buněk co nejmenší, a za použití co nejmenšího množství protilátek [78].

1.8.1 Rozdělení imunohistochemických metod

Imunohistochemické metody rozdělujeme na metody přímé a nepřímé [77].

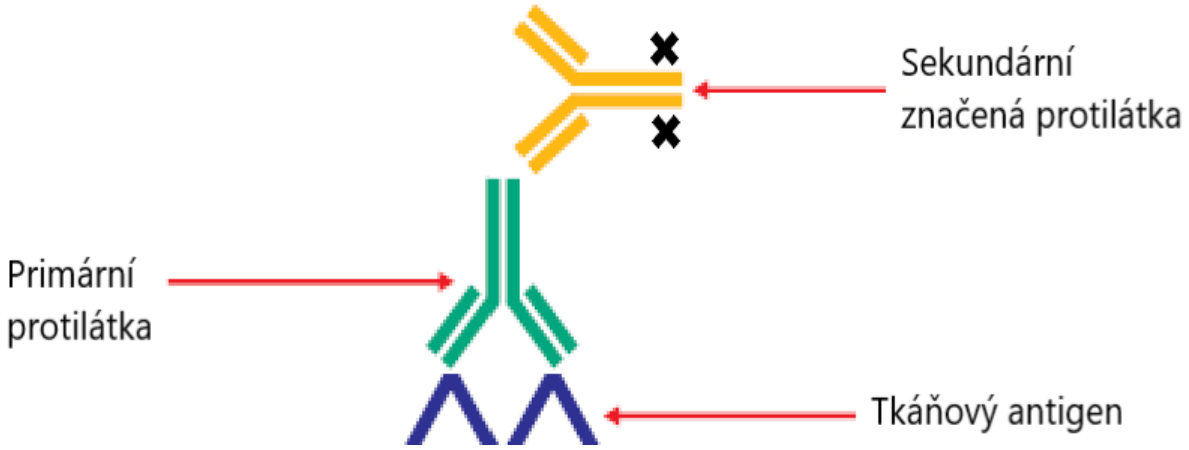
Přímá metoda je nejjednodušším způsobem lokalizace antigenu ve tkáni. Řez převrstvíme označenou protilátkou, která specificky reaguje s antigenem za vzniku označeného komplexu (Obr. 9). Hodnotíme rozmístění označených míst v tkáni. Přímá metoda je málo citlivá a používá se pouze v případě, že je ve studované tkáni vysoká koncentrace sledovaného antigenu [77, 79].



Obr. 9 – Přímá imunohistochemická metoda.
Převzato a upraveno z [80].

Principem nepřímé dvoustupňové metody je značená sekundární protilátka, která se váže na primární, antigen specifickou, protilátku (Obr. 10). Na primární protilátku se může navázat několik molekul značené sekundární protilátky, to je důvodem vysoké citlivosti metody

[79, 81]. Nevýhodou oproti přímé metodě je složitější zpracování. Nepřímou metodou můžeme prokazovat antigen nebo i protilátku [77].

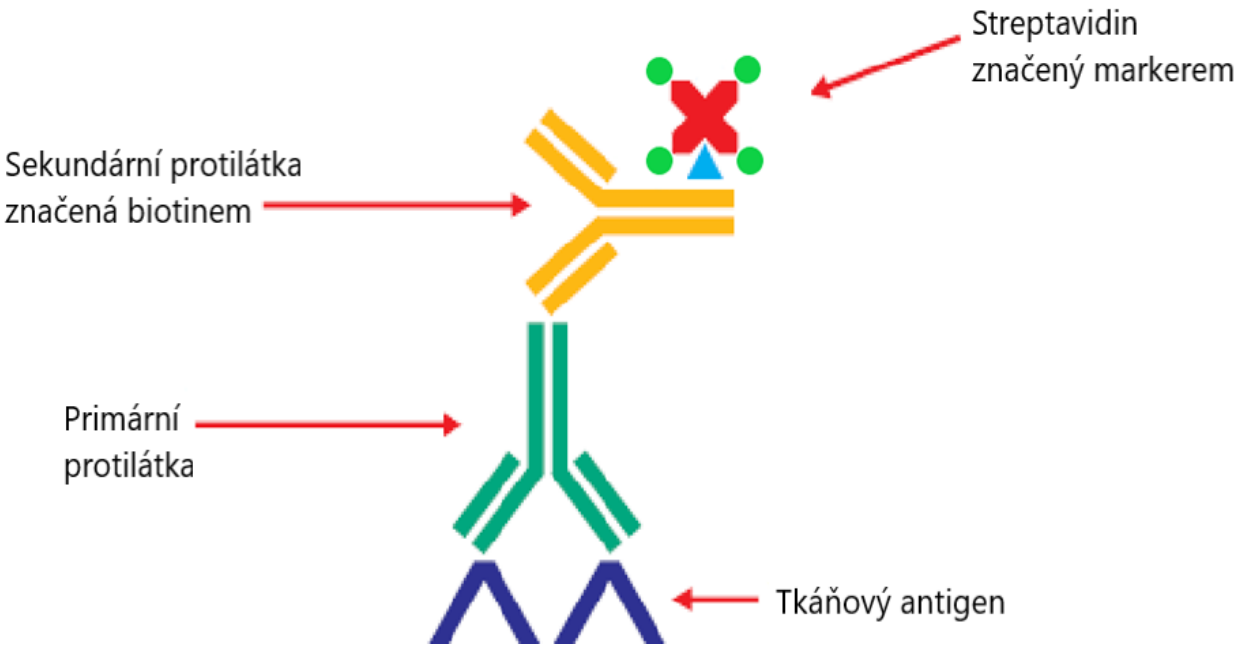


Obr. 10 – Nepřímá dvojstupňová imunohistochemická metoda.
Převzato a upraveno z [80].

Nepřímé trojstupňové metody jsou metody používané k zesílení signálu např. při nízkém množství antigenu ve tkáni. Primární protilátka reaguje s antigenem, následně dochází k navázání sekundární protilátky na primární protilátku a na takto vytvořený komplex nasedá značená terciární protilátka specifická proti protilátce sekundární [79, 81].

Mezi nejčastěji používané nepřímé trojstupňové metody řadíme metodu peroxidáza-antiperoxidázového komplexu (PAP) a metodu avidin-biotin komplexu (ABC). Metody jsou citlivější než přímá a dvojstupňová nepřímá ale jsou časově náročnější [81].

V praktické části je využívána nepřímá trojstupňová metoda LSAB (labbeled streptavidin-biotin) (Obr. 11). Neznačená primární protilátka se váže na tkáňový antigen. Na komplex antigen primární protilátka se váže značená sekundární protilátka značená biotinem. K následné vizualizaci se využívá značený streptavidin vázající se na biotin. V tomto případě je streptavidin značený křenovou peroxidázou (HRP).



Obr. 11 – Imunohistochemická metoda LSAB.

Převzato a upraveno z [80].

2 Cíle práce

- Znázornění neurogenních zón v adultním mozku hlodavců pomocí imunofenotypizace buněk v tkáňových řezech.

- Izolace a kultivace neurálních kmenových buněk.

- Kultivace embryonálních kmenových buněk a jejich následná diferenciace.

- Stanovení genové exprese vytipovaných markerů diferencovaných buněk pomocí qRT-PCR.

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje a pomůcky

- Automatické mikropipety (0,5 µl – 5 ml; Eppendorf, Německo)
- Buněčná škrabka (300 mm, Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Buněčné sítko (40 µm, 70 µm; nylon, Corning Incorporated, USA)
- Bürkerova komůrka (Blaubrand, BRAND GMBH + CO KG, Německo)
- Centrifuga (HERMLE Z300, Německo)
- Centrifugační zkumavky (15 ml, 50 ml; Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- CO_2 inkubátor (Steri-Cycle CO_2 Incubator, Thero Fisher Scientific, USA)
- Digestoř (HELAGO-CZ, Česká Republika)
- Filtr pro injekční stříkačku (0,22 µm; Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Fluorescenční mikroskop (Olympus, Německo)
- Chladící bloček pro udržení teploty – cooler (Cryo-Safe Cooler, Sigma-Aldrich, USA)
- Injekční stříkačky (10 ml, 20 ml; Chirana, Slovenská Republika)
- Inverzní mikroskop (Olympus CKX 41, Japonsko)
- Mikrospektrofotometr (UV/Vis Micro Spectrophotometer, ASP-2680, ACTGene, USA)
- Kryozkumavky (1,5 ml; Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Kultivační destičky (6–96-jamkové s rovným dnem; Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Laboratorní váhy (KERN & SOHN GmbH, Německo)
- Laminární box (Safeflow (BioAir), EuroClone, Itálie)
- Lednice
- Magnetická míchačka (MST digital, IKA Yellow-line, Nizozemsko)
- Mikrovlnná histostanice (KOS Microwave histoSTATION Milestone, Itálie)
- Mikrozkumavky (0,5 – 1,5 ml; Eppendorf, Německo)
- Mrazák
- Pasteurovy pipety (3 ml; Kartell S.p.A, Itálie)
- PCR 96-jamkové destičky a krycí fólie (Roche s.r.o., Švýcarsko)
- Petriho misky (60 mm, 100 mm; Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Podložní a krycí sklíčka (Bamed, Česká Republika)
- Sérologické pipety (5–25 ml; TPP – Techno Plastic Products, Švýcarsko)

- Skladovací láhve PET/HDPE – láhve na média (100-500 ml, SPL Life Sciences, Korejská Republika)
- Skleněný mikrohomogenizátor (P-Lab, ČR)
- Stereomikroskop (Olympus SZX 9, Japonsko)
- Systém pro ultračistou vodu (Milli-Q® Direct 8 Water Purification Systém, Německo)
- Špičky bez filtru (Standart/Bulk Tips, Epperndorf, Německo)
- Špičky s filtrem (PCR Clean/Sterile Tips, Eppendorf, Německo)
- PCR cyklery (T100™ Thermal Cycler, C1000™ Touch Thermal Cycler, BioRad, USA)
- UV čistič vzduchu (UVR-M, UV Cleaner-Recirculator, Biosan, Lotyšsko)
- Vodní lázeň (Julabo TW8, Německo)
- Vlhká komůrka (P-LAB a.s., Česká Republika)

3.2 Chemické a biologické látky

3.2.1 Kmenové buňky

- β-merkaptoethanol (čistota > 99,9 %, Sigma-Aldrich, USA)
- Akutáza (Stem Pro Accutase, Sigma Aldrich, USA)
- B27 suplement (Gibco™ B-27™ Supplement, Serum Free, USA)
- BMP4 (Recombinant Mouse BMP-4, BioLegend, USA)
- DMEM/F-12 (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, Gibco™, HEPES, USA)
    - + L-carnitin
    - + 15mM HEPES
- DMSO – dimethyl sulfoxid (čistota > 99,9 %, pro molekulární biologii, Sigma-Aldrich, USA)
- DPBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)
    - bez KCl
    - bez $MgCl_2$
- EGF (mouse epidermal grow factor, Gibco™, USA)
- FBS – fetální bovinní sérum (fetal bovine serum, heat inactivated, Sigma-Aldrich, USA)
- FGF2 (mouse basic fibroblast growth factor, Cell Signaling Technology, Nizozemsko)
- ITS (Insulin-Transferin-Selenium, 100x, Gibco™, USA)
- LIF (Leukemia Inhibitory Factor mouse, $1x10^8$ U/mg, Sigma-Aldrich, USA)
- Malé molekuly
    - PD0325901 – inhibitor MEK/ERK dráhy (10mM, Reprocell, USA)
    - CHIR99021 – inhibitor GSK3 (10mM, Reprocell, USA)
- Monothioglycerol (11,9M, Sigma Aldrich, USA)
- N2 suplement (Gibco™ N-2 Supplement (100X), USA)
- Neurobazální médium (NeuroBasal medium, Gibco™, USA)
- PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco™, USA)
    - bez $CaCl_2$
    - bez $MgCl_2$
- Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
    - penicilin – 10 000 jednotek
    - streptomycin – 10 mg/ml
    - v 0,9% NaCl
- TrypLE (Express Enzyme 1x, Sigma-Aldrich, USA)

- Trypanová modř (0,4%, Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin (0,25% EDTA solution, Sigma-Aldrich, USA)

3.2.2 qRT-PCR

- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche s.r.o., Švýcarsko)
- NF voda (Nuclease free water, Zymo Research, USA)
- Souprava pro izolaci RNA (Direct-zol™ RNA Miniprep, Zymo Research, USA)
- TRI Reagent® (The Epigenetics Company, USA)

3.2.3 Imunohistochemie

- Aceton (Lach-Ner, ČR)
- Citrátový pufr – 0,1 M, pH 6,0
    - Citrát sodný 0,1 M (2,9 g/100 ml)
    - Kyselina citronová 0,1 M (2,1 g/100 ml)
    - 41 ml 0,1 M citrátu sodného, 9 ml 0,1 M kyseliny citrónové a 450 ml redestilované vody
- DAB
    - 5 µl H_2O_2 (30%) (Lach-Ner, ČR)
    - 5 kapek dimethylformamidu (Lach-Ner, ČR)
    - 10 ml redestilované vody
    - 2 mg DAB – 3,3-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)
- DAPI (4′,6-diamidin-2′-phenylindol dihydrochlorid, Sigma-Aldrich, USA)
- Etanol (Lach-Ner, ČR)
- Hematoxylin
- Modrá skalice (pentahydrát síranu měďnatého) (Lach-Ner, ČR)
- Montovací médium (Bamed, ČR)
- Oslí sérum (Jackson ImmunoResearch, Velká Británie)
- Paraformaldehyd (4%)
- PBS – Fosfátový pufr, 0,1 M, pH 7,4 – 7,6
    - KH_2PO_4 – 0,2 g
    - $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 7,16 g
    - NaCl – 8,0 g
    - KCl – 0,2 g
    - Vše smícháno a rozpuštěno v 1000 ml redestilované vody

- PBS-T – 0,1%
    - 1000 ml PBS, 1 ml Triton X-100
- Primární protilátky
    - Anti – GFAP – polyklonální, králičí (Agilent Dako, USA)
    - Anti – NCAM – polyklonální, králičí (Millipore, USA)
    - Anti – Nestin (Rat 401) – monoklonální, myší (DSHB, USA)
- Roztok pro utlumení endogenní peroxidázy, 5% H_2O_2
    - 5 ml 30% H_2O_2 (Lach-Ner, ČR)
    - 25 ml redestilované vody
- Sekundární protilátky
    - Oslí anti-králičí, značená biotinem (Jackson ImmunoResearch, Velká Británie)
    - Oslí anti-myší, značená Cy3 (Jackson ImmunoResearch, Velká Británie)
- Streptavidin značený křenovou peroxidázou (Agilent Dako, USA)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Xylen (Lach-Ner, ČR)
- Želatina 0,1%
    - 0,1 g želatiny (Sigma Aldrich, USA)
    - 100 ml redestilované vody

3.3 Imunohistochemie na tkáňových řezech nervové tkáně

Společné kroky všech metod imunohistochemie.

Parafínové preparáty byly odparafinovány v xylenu a zavodněny pomocí sestupné alkoholové řady se zakončením v destilované vodě. V každém roztoku byly preparáty ponořeny 10 minut (3x xylen, 98%, 80%, 70% etanol, destilovaná voda).

Oplachy v PBS/PBS-T byly provedeny vždy třikrát po dobu 5 minut.

Permeabilizace byla prováděna pomocí 0,5% Tritonu X-100 (10 minut). Příprava: 2,5 ml Tritonu X-100 bylo doplněno do 500 ml PBS pufrem.

Ředění roztoků sér a protilátek bylo prováděno pomocí PBS-T (není-li uvedeno jinak).

Inkubace ve vlhké komůrce byla prováděna za laboratorní teploty a preparáty byly uchovávány ve tmě.

3.3.1 Průkaz NCAM trojstupňovou LSAB metodou

Pro průkaz NCAM pozitivních buněk byl použit histologický řez dospělé potkaní postranní mozkové komory.

Po odparafinování a zavodnění řezů byly preparáty ponořeny do 1000 ml citrátového pufru a vloženy do mikrovlnné trouby (histostanice) na 27 minut, kde byla provedena metoda antigen retrieval (odmaskování antigenu). Metoda antigen retrieval je využívána pro lepší přístupnost antigenů v tkáních konzervovaných formaldehydem, ve kterých může být snížena detekovatelnost proteinů. Po vytáhnutí preparátů z mikrovlnné histostanice byla sklíčka opláchnuta redestilovanou vodou a provedena permeabilizace. Následuje oplach v redestilované vodě. Endogenní peroxidáza byla utlumena 5% peroxidem vodíku. Takto byly preparáty inkubovány 3x po dobu deseti minut ve vlhké komůrce. Po inkubaci byl proveden jeden oplach po dobu pěti minut redestilovanou vodou a 3x PBS-T pufrem a preparáty byly převrstveny oslím sérem v ředění 1:20 a inkubovány 20 minut ve vlhké komůrce. Následně byla přidána primární polyklonální králičí protilátka GFAP ředěná 1:500 a vzorky inkubovány 50 minut ve vlhké komůrce. Poté byla znovu nakapána primární protilátka a preparáty ve vlhké komůrce inkubovány přes noc při 5 °C.

Následující den byla po oplachu v PBS-T (3x) přidána sekundární polyklonální biotinylovaná oslí anti-králičí protilátka ředěná 1:250 a ve vlhké komůrce řezy inkubovány 45 minut. Po inkubaci a následném oplachu v PBS-T (3x) byl na preparáty aplikován streptavidin značený

křenovou peroxidázou (HRP) v ředění 1:300 a inkubován 45 minut. Po této inkubaci byly vzorky třikrát opláchnuty v PBS a přidán roztok DAB pro vizualizaci na dobu maximálně pěti minut. Pro zastavení reakce roztoku DAB byly preparáty dvakrát propláchnuty vodou. Následovalo přidání modré skalice na 5 minut pro zvýraznění reakce, opláchnutí redestilovanou vodou a dobarvení jader hematoxylinem (20 s).

Na závěr barvení pod tekoucí vodou jádra modrala po dobu deseti minut, preparáty odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 80%, 95% etanol – rychle), acetonem (5 minut), xylenem (3x 5 minut) a zamontovány.

3.3.2 Průkaz GFAP trojstupňovou LSAB metodou

Pro prokázání GFAP+ buněk byl použit histologický řez dospělé potkaní postranní mozkové komory.

Pro průkaz GFAP je použita králičí polyklonální protilátka anti-GFAP, ředění 1:500. Postup imunobarvení je obdobný průkazu NCAM (viz 3.3.1).

3.3.3 Průkaz nestinu dvojstupňovou metodou s fluorescenční detekcí

Pro důkaz nestinu v diferencovaných buňkách byla použita kultura myších EKB linie D3 ovlivněných 1mM kyselinou retinovou s kultivací v N2B27 médiu (Tab. 8).

Z kultivační destičky s buňkami bylo odsáto médium a nahrazeno 4% paraformaldehydem pro zafixování buněk. Po deseti minutách byl vzorek propláchnut pomocí PBS pufru (2 x 5 minut). Následně permeabilizujeme membránu 0,5% Tritonem (10 minut). Propláchneme 2x v PBS vždy po pěti minutách. Přidáváme oslí sérum, ředěné 1:20 v PBS, po 20 minutové inkubaci převrstvíme buňky primární monoklonální myší protilátkou anti-RAT 401 (anti-nestin), ředěnou v poměru 1:4, a inkubujeme 60 minut ve tmě. Po inkubaci opláchneme 2 x v PBS (5 minut) přidáme sekundární oslí polyklonální protilátku anti-myší značenou Cy3 (cyaninem 3) v ředění 1:200 (v PBS). Necháme 45 minut reagovat (ve tmě) a opět opláchneme v PBS. Pro dobarvení jader 5 minut inkubujeme s DAPI (ve tmě), opláchneme v redestilované vodě a speciálním montovacím médiem zamontujeme. Buňky prohlížíme ve fluorescenčním mikroskopu.

3.4 Neurální kmenové buňky

Veškerá práce s kmenovými buňkami, včetně přípravy médií probíhá v laminárním boxu.

3.4.1 Příprava média pro NKB

Pro kultivaci neurálních kmenových buněk bylo používáno v průběhu času více různých médií. Níže budou všechna sepsána a při popisování metod uvedeno, které bylo použito.

Pro kultivaci neurálních kmenových buněk izolovaných z 13,5denního embrya bylo používáno médium s komponentami pro tvorbu a kultivaci neurosfér. Podle Tab. 2 bylo připraveno médium do 500 ml zásobní sterilní láhve. Takto připravené médium bylo rozpipetováno po 40 ml a zamraženo. Jednu lahvičku s médiem necháváme v lednici. Před prací vytáhneme z lednice a hodinu necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.

Tab. 2 – Základní médium pro kultivaci NKB z 13,5denního embrya.

Složka	Finální koncentrace	Množství
DMEM/F12 (+L-glutamin, + HEPES)	1X	485 ml
ITS (100X)	1 % (v/v)	5 ml
B27 (50X)	2 % (v/v)	10 ml

Před použitím média přidáváme komponenty EGF, v koncentraci 20 ng/ml a FGF2 v koncentraci 10 ng/ml.

Pro kultivaci NKB izolovaných z 2denních a 7denních myší byla používána dvě základní média DMEM/F12 + N2 suplement a DMEM/F12 + B27 suplement. Složky daného média byly smíchány ve sterilních láhvích na médium o objemu 50 ml. Veškerá příprava médií probíhala v laminárním boxu.

DMEM/F12 + N2 médium bylo připraveno smícháním 50 ml DMEM/F12 a 0,5 ml N2 suplementu. DMEM/F12 + B27 médium bylo připraveno smícháním 50 ml DMEM/F12 a 1 ml B27 suplementu.

Takto připravená média jsou uchovávána v lednici a tvoří základ médií kompletovaných těsně před nasazením buněk.

Při kultivaci byly do základních médií přidávány růstové faktory EGF, FGF2 nebo LIF (Tab. 3). Byly tak vytvořeny čtyři typy kompletního média (Tab. 4) pro aktuální spotřebu. Médium s přídavkem FGF2 a EGF je vhodné pro tvoření definitivních neurosfér, naopak médium s přídavkem LIF je vhodné pro tvorbu primitivních neurosfér.

Tab. 3 – Složky přidávané do základních kultivačních médií pro NKB.

Složka (koncentrace zásobního roztoku)	**Finální koncentrace**
FGF2	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml
LIF (10 µg/ml)	10 ng/ml

Tab. 4 – Přehled složek kompletních kultivačních médií pro NKB.

1	DMEM/F12 + N2 + LIF
2	DMEM/F12 + N2 + FGF2 + EGF
3	DMEM/F12 + B27 + LIF
4	DMEM/F12 + B27 + FGF2 + EGF

Před prací média nepředehříváme ve vodní lázni. Po vytáhnutí z ledničky a po dobu asi 1 hodiny necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.

3.4.2 Izolace NKB

Pro izolaci neurálních kmenových buněk byly použity 13,5denní myší embrya, 2denní a 7denní myši.

Pro izolaci NKB z 13,5denních myších embryí.
Myš pomocí etheru uspíme, opatrně otevřeme dutinu břišní a odebereme embrya i s embryonálními obaly a umístíme je do roztoku pro transport (DPBS s ATB) na led. Přejdeme do sterilní laboratoře a postupně pod stereomikroskopem odstraníme mozkové obaly a vypreparujeme mozek.

Pro izolaci NKB z 2denních a 7denních myší.
Myš uspíme pomocí etheru a dekapitujeme. Odstraníme kůži a veškeré mozkové obaly a mozek vložíme do transportního roztoku (DPBS s ATB) na led. Takto vypreparovanou tkáň přeneseme do sterilní laboratoře a pod stereomikroskopem odebereme oblast postranní komory se SEZ a provedeme výřez pro zhotovení imunohistochemických kryořezů.

Dále je postup izolace NKB z mozkové tkáně stejný pro všechny námi využívané zdroje buněk.

Nerovou tkáň vložíme do skleněného tloučku a snažíme se ji co nejvíce rozmělnit. Přidáme 1 ml akutázy a necháme inkubovat 3-5 minut při laboratorní teplotě. Takto vytvořenou buněčnou suspenzi přeneseme do čtyřnásobku kultivačního média pro NKB a přefiltrujeme přes filtr (40 µm). Suspenzi přeneseme do centrifugační zkumavky a centrifugujeme 5 minut při

2500 rpm. Odstraníme supernatant, necháme 1 ml na dně, pořádně rozmícháme buněčný pelet a buňky spočítáme (viz 3.4.7).

Buňky nasazujeme na nové 6-jamkové destičky s hustotou 20 000 buněk/ml. Médium doplňujeme až do vytvoření prvních neurosfér. Kultivace probíhá v podmínkách: 5% CO_2, 37 °C a 90% vlhkost.

3.4.3 Kultivace NKB formou neurosfér

Neurální kmenové buňky byly kultivovány v 6-jamkových destičkách s 2 ml média na jamku a 96-jamkových destičkách s 200 µl média na jamku.

Kultivace NKB izolovaných z 13,5denního embrya.
Buňky byly kultivovány na 6-jamkových a 96-jamkových destičkách v médiu DMEM/F12 +B27 + ITS + EGF a FGF2 (přesné složení viz 3.4.1). Pasážování probíhalo podle morfologie tvořených neurosfér přibližně jednou týdně, dle potřeby bylo přidáno čerstvé médium. Při první pasáži byly buňky rozděleny na dvě části. Jedna byla přefiltrována přes sítko (40µm), druhá ne. Takto oddělené části byly kultivovány zvlášť ve stejném médiu. Při každém pasážování byla dodržována filtrace jen jedné části buněk.

Kultivace NKB izolovaných z 2denních a 7denních myší.
Pro kultivaci byly připraveny čtyři 6-jamkové destičky, v každé probíhala kultivace s jiným složením média. Byla použita základní média DMEM/F12 + B27 a DMEM/F12 + N2.

Pro přehlednost byly všechny kultivační destičky řádně popsány, a to typem buněk číslem pasáže, typem média a datem nasazení buněk na destičku. Kultivace NKB probíhala s hustotou nasazovaných buněk 20 000 buněk na 1 ml média, při 37 °C s 5 % CO_2 a při 90% vlhkosti.

Buňky byly pasážovány (viz 3.4.6) podle morfologie tvořených neurosfér, cca jednou týdně. Dle potřeby bylo přidáno čerstvé médium.

3.4.4 Rozmražení NKB

Buňky uchovávané v tekutém dusíku při -196 °C mohou být při potřebě další práce rozmraženy.

V zamrazovacím médiu je obsažen roztok DMSO (dimethylsulfoxid), který může poškozovat buňky, proto rozmrazování buněk vyžaduje rychlé zacházení.

Do sterilní centrifugační zkumavky si přichystáme 9 ml média, pro následné naředění rozmražené buněčné suspenze. Kryozkumavku rozmrazujeme ve vodní lázni cca 2 minuty, pro zrychlení rozmrazení můžeme obsah zkumavky promíchat lehkým protřepáním. Poté ihned

kryozkumavku sterilně přeneseme do flow-boxu a daný 1 ml buněčné suspenze rozmícháme v již připravených 9 ml média. Kryozkumavku pak ještě můžu vypláchnout trochou média (z těch 9 ml). Centrifugujeme 5 minut při 2000 rpm, odstraníme veškerý supernatant a k buněčnému peletu přidáme 1 ml média. Buňky pořádně promícháme pipetou. Přidáme objem média podle zvolené kultivační nádoby rozmícháme, podle potřeby přidáme komponenty a přeneseme do kultivační nádoby.

3.4.5 Kryokonzervace NKB

Buňky zamrazujeme pro uložení zásob buněk, pro přerušení práce apod. Buňky zamrazujeme po pasáži a nejlépe spočítané. Do jedné kryozkumavky dáváme cca $1 - 2 \times 10^6$ buněk na 1 ml zamrazovacího média. Do kryozkumavek napipetujeme 100 µl buněk + 900 µl DMSO – zamrazovací médium. Buněčná suspenze musí být dostatečně promíchána tak, aby se netvořily shluky buněk. Naplněné kryozkumavky zamrazujeme postupně. Nejprve je vložíme do vytemperovaného chladící bloček pro udržení teploty (cooler) a takto se vloží do mrazáku (-20 °C), po dvou hodinách se kryozkumavky přenesou do kryocentra (-80 °C), kde se nechají do druhého dne. Další den se kryozkumavky přesunou do tekutého dusíku (-196 °C), kde mohou být skladovány i několik let.

3.4.6 Pasážování NKB

Do centrifugační zkumavky z kultivační destičky odsajeme veškeré médium i s neurosférami a buňky centrifugujeme při 2500 rpm 5 minut. Supernatant odstraníme a buněčný pelet resuspendujeme v 1 ml akutázy (buňky 3x promícháme pipetou) a necháme 5 minut inkubovat za laboratorní teploty. Po inkubaci přidáme 4-6 ml nového média a opět centrifugujeme 5 minut při 2500 rpm. Opět odstraníme supernatant a přidáme 1 ml média. Při prvním pasážování přidáváme ještě 1 ml média a polovinu buněk (tj. 1 ml) přesejeme přes buněčné sítko (40 µm) do nové centrifugační zkumavky. Buňky v obou zkumavkách spočítáme a kultivujeme v různých jamkách. Následně zpracováváme disociované a nedisociované buňky odděleně.

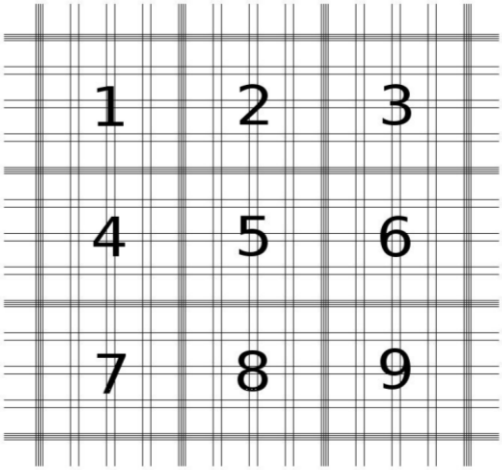
Na novou kultivační destičku nasadíme buňky s hustotou 20 000 buněk/1 ml média, připíšeme pasáž a znovu kultivujeme.

3.4.7 Počítání a nasazení buněk

Buňky počítáme při pasážování. Všechny buňky i s médiem centrifugujeme při 2000 rpm NKB (1000 rpm EKB). Odebereme supernatant a buňky resuspendujeme v 1 ml kultivačního média. Do mikrozkumavky si připravíme Trypanovou modř, ve které buňky ředíme 9:1, tj. 90 µl

Trypanové modři + 10 µl buněčné suspenze. Trypanová modř obarví mrtvé buňky na modro, počítáme jen buňky světlé, které jsou živé.

Pod mikroskopem prohlížíme 10 µl směsi v Bürkerově komůrce (zvětšení 10x). Počítáme pět velkých čtverců viz náhled v Obr. 12.



Obr. 12 – Schéma Bürkerovy komůrky [82].

V komůrce počítáme pět velkých čtverců, na obrázku označených čísly 1, 3, 5, 7 a 9. Počet spočítaných buněk si poznačíme a dosadíme do vztahu.

$$\text{počet buněk v 1 ml} = \frac{\sum buněk \times \text{ředění} \times 1000}{počet\ počítaných\ čtverců \times 0{,}1}$$

$$např.$$

$$počet\ buněk\ v\ 1\ ml = \frac{250 \times 10 \times 1000}{5 \times 0{,}1} = 5\ 000\ 000\ buněk/1ml$$

Pokud chceme nasadit 20 000 buněk/1ml na novou kultivační destičku, použijeme pro výpočet objemu buněčné suspenze trojčlenku. Do jedné jamky 6-jamkové destičky dáváme 2 ml média.

To nás vede k výpočtu:

$$20\ 000\ buněk \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 1\ ml$$

$$\underline{5\ 000\ 000\ buněk \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots x\ ml}$$

$$x = 0{,}004\ ml = 4\ \mu l\ buněčné\ suspenze\ na\ 1\ ml\ média$$

Pro nasazení buněk na jednu jamku 6-jamkové destičky potřebujeme 2 ml média. Smícháme tedy 8 µl naší buněčné suspenze a 1992 µl média.

Princip počítání ostatních buněk stejný.

3.5 Embryonální kmenové buňky

Veškerá práce s embryonálními kmenovými buňkami, včetně přípravy médií probíhá v laminárním boxu.

3.5.1 Kultivace myších embryonálních kmenových buněk

Pro kultivaci mEKB jako monolayeru potáhneme dno kultivační destičky 0,1% želatinou.

3.5.1.1 Příprava 0,1% želatiny

Na laboratorních vahách naváží me 0,1 g želatiny a přeneseme ji do skleněné láhve, kde ji rozmícháme ve 100 ml redestilované vody. Želatinu necháme hodinu bobtnat za občasného promíchání, aby nezůstala na dně nádoby. Poté ji vysterilizujeme v autoklávu při 120 °C po dobu 30 min (necháváme mírně pootevřené víčko). Sterilizovanou želatinu necháme vychladnout (víčko uzavíráme při vytáhnutí z autoklávu). Takto připravenou želatinu skladujeme při 4 °C.

Před použitím sterilní želatiny necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.

Kultivační 6-jamkovou destičku před kultivací potahujeme 0,1% želatinou, 1,5 ml želatiny / 1 jamka. Inkubujeme v inkubátoru (37°C) po dobu asi 2 hodin. Poté opatrně odsajeme zbylou želatinu a necháme vysušit (vše v laminárním boxu). Po vyschnutí je destička připravena k použití.

mEKB D3 kultivujeme na potažených 6 a 12-jamkových destičkách 0,1% želatinou v kompletním 2i médiu (Tab. 6). Kultivace mEKB D3 probíhá s hustotou nasazení buněk 200 000 buněk / 1 ml média při 37 °C s 5 % CO_2 a v 90% vlhkosti. Pro přehlednost byly všechny kultivační destičky řádně označeny.

Médium je třeba měnit každý den. Výměna zahrnuje opatrné odsátí starého média s mrtvými, plovoucími buňkami, bez toho, aniž bychom se dotkli špičkou dna jamky (vrstva buněk by se mohla odchlípnout) a velmi pomalé přidání čerstvého 2i média. Buňky rostou adherentně do konfluence asi 80% přibližně dva až tři dny. Poté je třeba buňky zpasážovat.

3.5.1.2 Příprava média pro kultivaci mEKB (2i médium)

Nejprve bylo připraveno serum free ES medium – SFES (Tab. 5), které tvoří základ kompletního 2i média pro kultivaci myších embryonálních kmenových buněk linie D3. Kompletní médium 2i (Tab. 6) bylo připraveno do láhve na médium a přefiltrováno pomocí injekční stříkačky s filtrem (0,22 μm).

Tab. 5 – Složení sérum free ES média.

Složka	Množství
Neurobazální médium	100 ml
DMEM/F12 médium	100 ml
N2 suplement	1 ml
B27 (+RA) suplement	2 ml
BSA frakce V (7,5% roztok)	1332 µl

Tab. 6 – Složení kompletního 2i média.

Složka	Finální koncentrace	Množství
SFES médium	1X	50 ml
PD0325901 (10 mM)	1 µM	5 µl
CHIR99021 (10 mM)	3 µM	15 µl
Monothioglycerol (11,9 M)	0,15 mM	0,63 µl
LIF (10^8 U/mg)	1000 U/mg	0,5 µl

3.5.2 Pasážování myších embryonálních kmenových buněk

Když buňky narostou do cca 80% konfluence, je třeba provést jejich pasážování. Opatrně odsajeme staré médium s plovoucími odumřelými buňkami a nahradíme jej 0,5 ml akutázy / jamku (6-jamková destička); necháme 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Pro zastavení aktivity akutázy přidáváme 2,5 ml SFES média a centrifugujeme při 1000 rpm 5 minut. Odsajeme supernatant a buňky resuspenzujeme v 1 ml SFES, spočítáme. Nasazujeme 200 000 buněk / 1 ml 2i média.

3.5.3 Rozmražení a kryokonzervace myších embryonálních kmenových buněk

Postup při rozmrazování i kryokonzervaci je podobný jako u NKB (viz 3.4.4 a 3.4.5), jen centrifugujeme rychlostí 1000 rpm a používáme médium, ve kterém budeme buňky kultivovat.

3.5.4 Diferenciace embryonálních kmenových buněk

3.5.4.1 Diferenciace mEKB formou agregátů

mEKB D3 buňky byly kultivovány v 2i médiu (9 jamek potažených 0,1% želatinou), po 4 dnech se tvoří agregáty podobné embryoidním tělískům. Z těchto jamek byly odebrány tři a přesazeny na novou 12-jamkovou destičku taktéž potaženou 0,1% želatinou a bylo přidáno diferenciační médium s fetálním bovinním sérem, glutaminem a LIF (viz Tab. 7). Další tři jamky byly přesazeny na 12-jamkovou destičku potaženou 0,1% želatinou a přidáno 2i médium (Tab. 6). Zbytek zůstal na původní destičce pro další kultivaci. Médium měníme každý den.

Po dvou dnech kultivace přesazených buněk na 12-jamkových destičkách (2i médium /diferenciační médium se sérem) byly buňky ovlivněny kyselinou retinovou o koncentraci 0,1 mM, 1 mM a 5 mM.

Po 24 hodinách kultivace s kyselinou retinovou (RA) bylo médium vyměněno za čisté 2i médium, popř. diferenciační médium se sérem (1 ml/jamka). Buňky byly dále kultivovány, médium měníme každý druhý den a pozorujeme morfologické změny.

Na doporučení konzultanta bylo desátý den kultivace vyměněno diferenciační médium se sérem na N2B27 médium (Tab. 8).

Tab. 7 – Složení diferenciačního média se sérem.

Složka	Finální koncentrace	Množství
DMEM (+ glukóza (4,5 g/l), – pyruvát sodný)	1X	50 ml
L-gutamin	4 mM	1 ml
FBS	20 % (v/v)	10 ml
LIF	1000 U/ml	0,5 µl

Tab. 8 – Složení N2B27 média.

Složka	Množství
DMEM/F12	96,4 ml
B27 suplement (50X)	1000 µl
N2 suplement (100X)	500 µl
β-merkaptoetanol (100 mM)	200 µl
MEM neesenciální aminokyseliny (100X)	500 µl
L-glutamin (200 mM)	250 µl
Penicilin/Strepromycin	1000 µl

3.5.5 Diferenciace mEKB s následnou qRT-PCR analýzou

Myší embryonální kmenové buňky linie D3 byly rozmrazeny a kultivovány v 6-jamkové destičce potažené 0,1% želatinou v kultivačním médiu s BMP4 a LIF (Tab. 9). Po dvou dnech kultivace byly buňky zpasážovány použitím TrypLE (10 minut, laboratorní teplota) a nasazeny do 6 jamek na novou 12-jamkovou destičku potaženou 0,1% želatinou v hustotě 30 000 buněk/ml. Takto nasazené buňky byly 24 hodin kultivovány v BMP4 médiu. Následně byly buňky diferencovány v médiu v přítomnosti LIF (Tab. 10) a bez přítomnosti LIF (Tab. 11), obojí s absencí BMP4. Diferenciace probíhala po dobu šesti dnů a každý den bylo buňkám

měněno médium. Všechna média byla při přípravě přefiltrována pomocí injekční stříkačky s filtrem (0,22 µm).

Po šesti dnech diferenciace byly buňky zpasážovány pomocí TrypLE a lyzovány použitím 500 µl roztoku TRI Reagent®. Z takto připraveného vzorku izolujeme RNA pro analýzu exprese vybraných genů metodou qRT-PCR.

Tab. 9 – Složení kultivačního BMP4 média.

Složka	Množství
DMEM/F12	25 ml
B27 suplement (50X)	500 µl
N2 suplement (100X)	250 µl
β-Merkaptoethanol (100 mM)	25 µl
MEM neesenciální aminokyseliny (100X)	250 µl
BSA frakce V (7,5%)	167 µl
LIF (1000 U/ml, 100X)	250 µl
BMP4	25 µl
Penicilin/Streptomycin	250 µl

Tab. 10 – Složení diferenciačního média s LIF.

Složka	Množství
DMEM/F12	25 ml
B27 suplement (50X)	500 µl
N2 suplement (100X)	250 µl
B-Merkaptoethanol (100 mM)	25 µl
MEM neesenciální aminokyseliny (100X)	250 µl
BSA frakce V (7,5%)	167 µl
LIF (1000 U/ml, 100X)	250 µl
Penicilin/Streptomycin	250 µl

Tab. 11 – Složení diferenciačního média bez LIF.

Složka	Množství
DMEM/F12	50 ml
B27 suplement (50X)	1000 µl
N2 suplement (100X)	500 µl
2-Merkaptoetanol (100 mM)	50 µl
MEM neesenciální aminokyseliny (100X)	500 µl
BSA frakce V (7,5%)	335 µl
Penicilin/Streptomycin	500 µl

3.5.5.1 Izolace RNA

Pro izolaci RNA lyzované buňky purifikujeme použitím izolační soupravy (Direct-Zol™ RNA MiniPrep). S každým vzorkem pracujeme zvlášť. Všechny zkumavky řádně popisujeme, aby nedošlo k záměně vzorků. Pracujeme velmi opatrně, abychom vzorky nekontaminovali.

K lyzátům přidáváme 500 µl etanolu (používáme 100% etanol, čistý na nukleázy) a opatrně promícháme. Takto připravené vzorky přenášíme na kolonky (Zymo-Spin™ IIC Column) připravené ve sběrných zkumavkách a centrifugujeme 30 s při 16 000 g, roztok zachycený ve sběrné zkumavce vylijeme. Kolonky převedeme do nových sběrných zkumavek a přidáme 400 µl RNA promývacího pufru, stočíme (16 000 g, 30 s), roztok vylijeme. Pro zabránění kontaminace genomovou DNA vzorky ošetříme DNázou I. Do čisté zkumavky napipetujeme 5 µl DNázy I. a 75 µl pufru pro štěpení DNA a promícháme. Takto připravený roztok přeneseme na kolonku a inkubujeme 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci přidáme do kolonky 400 µl Direct-Zol™ RNA PreWash, centrifugujeme (16 000 g, 30 s), roztok odlejeme a promytí zopakujeme. Dále kolonku promyjeme 700 µl RNA promývacím pufrem a centrifugujeme 2 minuty při 16 000 g, aby se zajistilo úplné odstranění pufru. Kolonky přemístíme do nových RNase free sběrných zkumavek a eluujeme RNA přidáním 50 µl NF vody (Nuclease Free water) na kolonku. Centrifugujeme 30 s při 16 000 g.

Získaný vzorek RNA je, co nejdříve využit pro syntézu cDNA a zbývající RNA je uložena při -80 °C.

3.5.5.2 Syntéza cDNA

Pro přepis mRNA do DNA využijeme syntézu komplementární DNA (cDNA) v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou. Expresi vybraných genů následně kvantifikujeme pomocí qRT-PCR.

Před syntézou cDNA ověříme čistotu a koncentraci vyizolované RNA použitím mikrospektrofotometru. Pro měření využíváme jen 2,5 µl vzorku, jako blank slouží NF voda.

Pro syntézu cDNA je třeba připravit vzorek obsahující reagencie pro syntézu cDNA a izolovanou RNA. Celkově bude mít připravený vzorek pro syntézu cDNA 20 µl; 10 µl vyizolované RNA o koncentraci 500 ng/µl + 10 µl směsi reagencií pro syntézu cDNA (Tab. 12).

Při ověřování čistoty vyizolované RNA ve vzorcích byla stanovena koncentrace RNA ve vzorku. Roztoky RNA byly naředěny pomocí NF vody na koncentraci 500 ng / µl.

Tab. 12 – Reagencie pro syntézu cDNA.

Reagencie	Objemy pro jeden vzorek (10 µl)
10X RT pufr	2 µl
25X dNTP (deoxynukleotidy; 100 mM)	0,8 µl
10X RT primer (specifický pro mRNA)	2 µl
MultiScribe reverzní transkriptáza	1 µl
NF voda	4,2 µl

Takto připravené reakční směsi (o objemu 20 µl; vzorek RNA + reagencie) jsou vloženy do PCR cykleru, kde je cDNA syntetizována dle námi nastavených parametrů (Tab. 13).

Tab. 13 – Jednotlivé kroky syntézy cDNA.

Krok	Teplota	Doba trvání kroku
1.	25°C	10 min.
2.	37°C	120 min.
3.	85°C	5 min.
4.	12°C	∞

Získané vzorky amlplifikované cDNA jsou využívány pro hodnocení exprese vybraných antigenů metodou real time PCR. Jako kontrolní vzorek je využívána cDNA z buněk kultivovaných v BMP4 médiu.

3.5.5.3 qRT-PCR vybraných markerů diferencovaných mEKB

Analýza genové exprese byla provedena pro sedm následujících genů: Pou5f1 (Oct4), Sox2, Nanog, Sox1, Ccdc141, Pax6 a Nestin. Pro kvantifikaci využíváme SYBR green v přítomnosti primerů o koncentraci 400 nM. Objem reakční směsi je 15 µl. Jako vnitřní kontrolu genové exprese využíváme β-aktin (referenční gen).

Naředěné primery promícháme s roztokem Light Cycler 480 SYBR Green I master mix (Taq DNA polymeráza a barvivo SYBR green I pro dvouřetězcovou DNA). Do 96-jamkové destičky pro PCR napipetujeme roztok reagencií a naředěný vzorek 10 ng cDNA (viz pipetovací schéma Tab. 14). Vzorky ředíme pro naředění a snížení koncentrace příměsí reakčních komponent z předešlé syntézy cDNA natolik aby neznehodnocovaly nadcházející qRT-PCR. Data jsou reprezentována jako standartní chyba průměru technických triplikátů.

Tab. 14 – Pipetovací schéma.

	BMP4	**LIF+**	**LIF–**	**BMP4**	**LIF+**	**LIF–**	**BMP4**	**LIF+**	**LIF–**	**BMP4**	**LIF+**	**LIF–**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	β-aktin	β-aktin	β-aktin	Pou5f1	Pou5f1	Pou5f1	Sox2	Sox2	Sox2	Nanog	Nanog	Nanog
B	β-aktin	β-aktin	β-aktin	Pou5f1	Pou5f1	Pou5f1	Sox2	Sox2	Sox2	Nanog	Nanog	Nanog
C	β-aktin	β-aktin	β-aktin	Pou5f1	Pou5f1	Pou5f1	Sox2	Sox2	Sox2	Nanog	Nanog	Nanog
D	Ccdc141	Ccdc141	Ccdc141	Sox1	Sox1	Sox1	Pax6	Pax6	Pax6	Nestin	Nestin	Nestin
E	Ccdc141	Ccdc141	Ccdc141	Sox1	Sox1	Sox1	Pax6	Pax6	Pax6	Nestin	Nestin	Nestin
F	Ccdc141	Ccdc141	Ccdc141	Sox1	Sox1	Sox1	Pax6	Pax6	Pax6	Nestin	Nestin	Nestin

Jakmile dopipetujeme poslední vzorek destičku shora přikryjeme samolepící krycí fólií a snažíme se destičku co nejlépe utěsnit, abychom minimalizovali odpařování. Destičku centrifugujeme, aby reakční směs klesla na dno jamiček (3000 rpm, 2 minuty).

Kvantitativní RT-PCR byla provedena na přístroji BioRad CFX96 Touch podle následujícího programu (Tab. 15).

Tab. 15 – Program qRT-PCR.

	Krok	**Teplota**	**Doba trvání kroku**
	1.	95 °C	5 min.
Opakování 40x	2.	95 °C	10 s
	3.	60 °C	20 s
	4.	72 °C	30 s
	5.	65 - 95 °C	Závěrečná extenze

Výsledky jsou znázorněny pomocí grafu, který odpovídá ΔCT (cycle treshold) hodnotám každého genu pro daný vzorek.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Výsledky a diskuze imunohistochemických metod

V této práci budou výsledky prezentovány na základě imunohistochemických metod a kultivace buněk s jejich následnou fenotypizací. Imunodetekce umožňuje identifikovat buněčné typy pomocí jejich rozdílné antigenní výbavy. Možnost vizualizace struktur tkáně pomocí obarvených řezů je výhodou této metody, může se ale stát, že během barvení zabarvíme i pozadí. Tomu se snažíme předejít dodržováním časů inkubace s protilátkami, blokováním endogenní peroxidázy nebo volbou odpovídajícího detekčního systému.

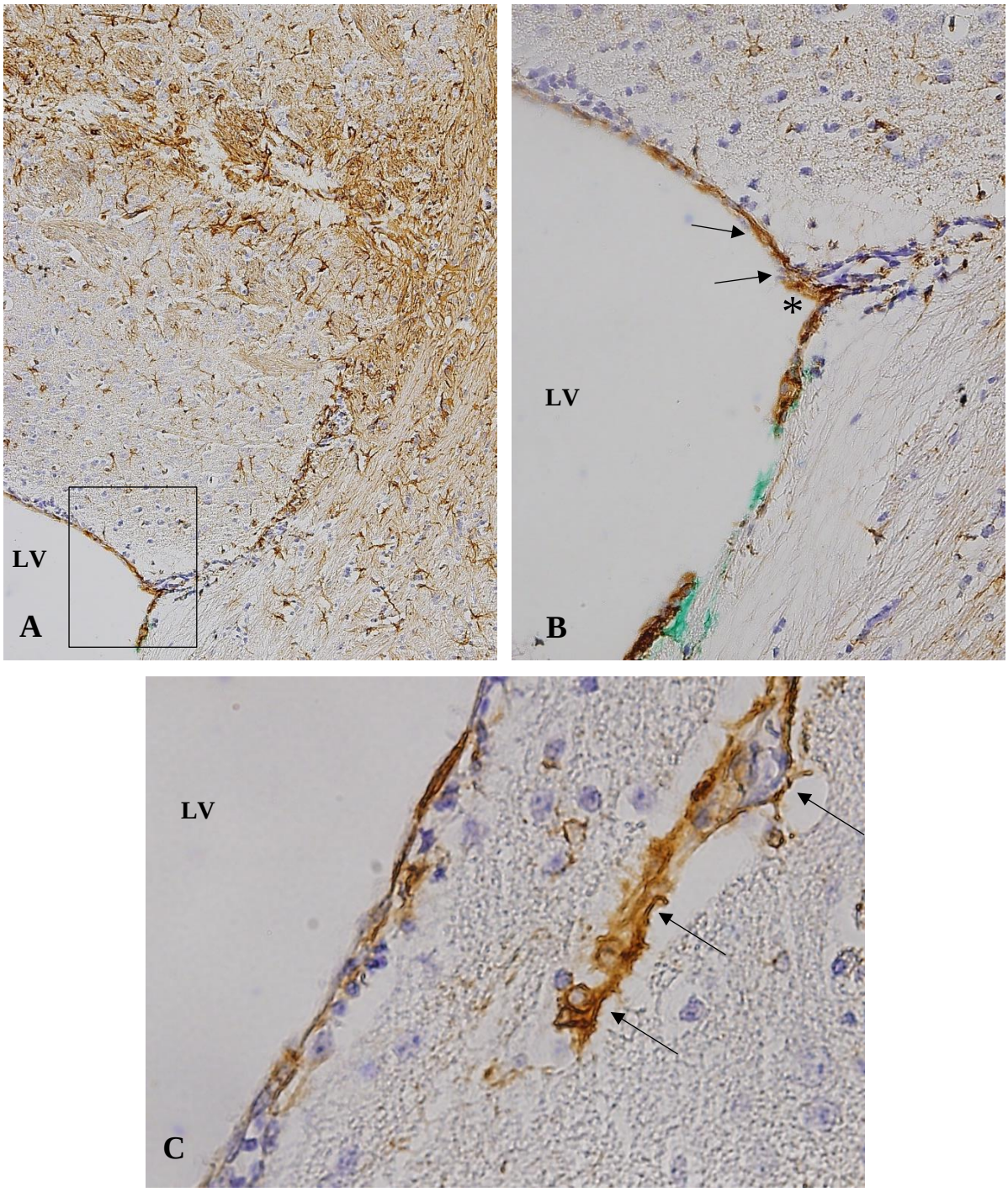
Pro antigeny s enzymatickým znázorněním jsme využili třístupňovou metodu LSAB, která umožňuje výrazné zesílení specifického signálu. Pro použití v konvenčním světelném mikroskopu jsme volili imunoperoxidázovou detekci, která vyžaduje zablokovat aktivitu endogenní peroxidázy, abychom předešli falešné pozitivitě. Detekce specifických markerů ve tkáni fixované formalínem (v odparafinovaných řezech) vyžaduje provést odmaskování antigenů (antigen retrieval).

4.1.1 Průkaz specifických markerů neurálních buněk v mozku potkana

Dospělá neurogeneze probíhá v subependymální zóně postranních mozkových komor a v subgranulární zóně *gyrus dentatus.* Imunohistochemickým barvením v této práci prokazujeme neurální markery buněk subependymální zóny. Našimi vzorky pro imunohistochemii jsou řezy mozkem potkana, zpracovávány a barveny metodami popsanými výše. Pro pozorování SEZ byly vybrány následující markery: gliální fibrilární kyselý protein (GFAP), adhezní molekula neurálních buněk (NCAM), doublecortin (DCX) a jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA).

Exprese intermediárního filamenta GFAP ve zralých astrocytech [83] je detekována pomocí třístupňové LSAB metody. Neurální progenitorové buňky dospělých jedinců jsou podobné astrocytům, které jsou pozitivní na GFAP, ale v některých stádiách vývoje jsou schopny se diferencovat v neurony [84]. Proto byl tento marker využit pro spolehlivé sledování těl i výběžků astrocytárních buněk rozptýlených napříč celou mozkovou tkání [85]. Pozorované intenzivnější zbarvení lemující povrch boční mozkové komory potvrzuje podíl astrocytů na stavbě subependymální zóny (Obr. 13). V SEZ astrocyty tvoří podpůrnou vrstvu, niché proliferujících NKB a jejich progenitorů, a svými výběžky je obklopují [8]. Zvýšená intenzita GFAP byla pozorována i na povrchu mozkových cév včetně krevních kapilár (Obr. 13 – C). Výběžky astroglií obalují kapiláry v CNS a tvoří část *membrana limitans gliae perivascularis*,

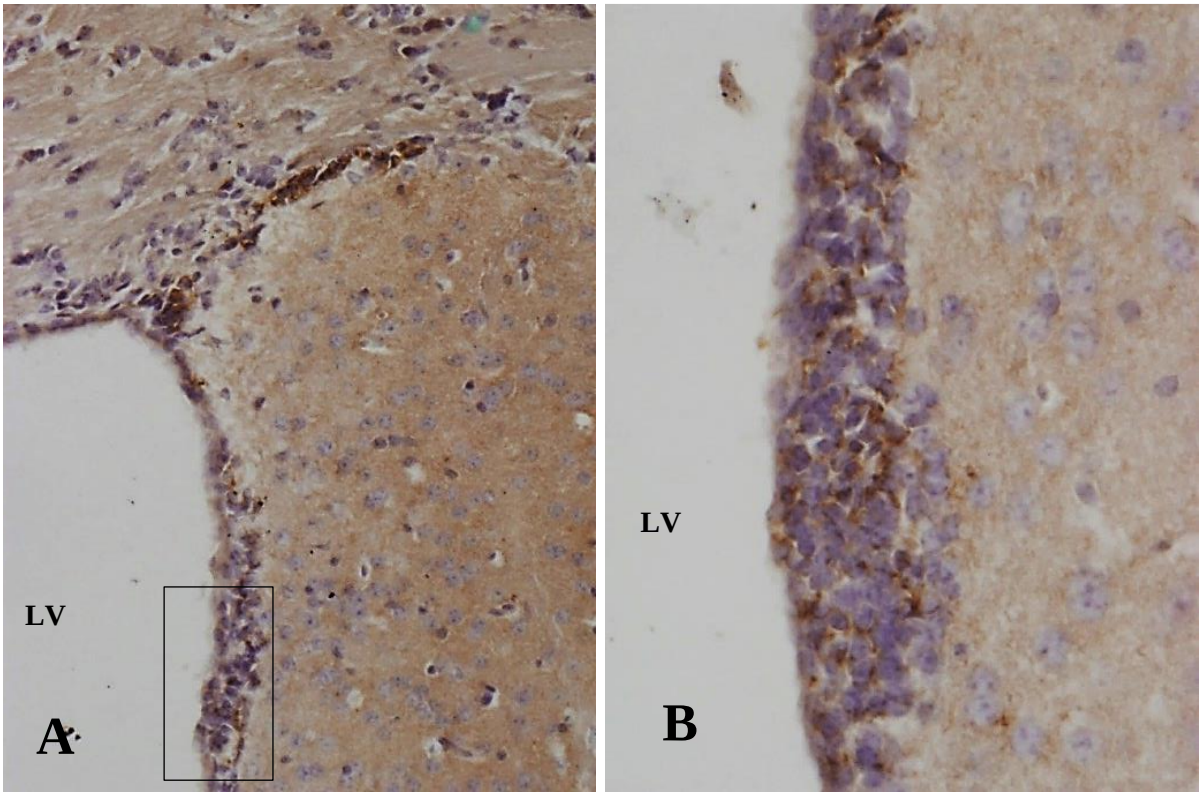
tj. ohraničující perivaskulární gliovou membránu, která je jednou z nezbytných komponent hematoencefalické bariéry [86, 87].



Obr. 13 – Imunohistochemický průkaz GFAP v koronárním řezu mozkem potkana.
A – Intenzivní hnědé zbarvení v mozkové tkáni znázorňuje uspořádání astrocytů napříč mozkovou tkání. Specificky (hnědě) jsou zbarvena těla i výběžky astroglií. Ve výřezu pozorujeme tmavě zbarvené astrocyty v SEZ. Zvětšení 10x. B – Výřez z A. Intenzivně zbarvená těla astrocytů ukazují rozmístění SEZ (šipky) lemující povrch laterální mozkové komory. Hvězdička (*) označuje místo vycestování neuroblastů ze SEZ do RMS. Zvětšení 20x. C – Znázornění perivaskulární membrány tvořené výběžky astrocytů ohraničující mozkovou krevní cévu (označeno šipkami). Zvětšení 40x.

NKB nebo primární progenitory s radiální morfologií exprimující gliální markery, jako je GFAP se diferencují na následné progenitory, které již radiální morfologii nevykazují a exprimují pouze neuronální markery včetně NCAM a doublecortinu (DCX) [84]. Proto následně v SEZ pozorujeme expresi adhezní molekuly neurálních buněk (NCAM) a DCX.

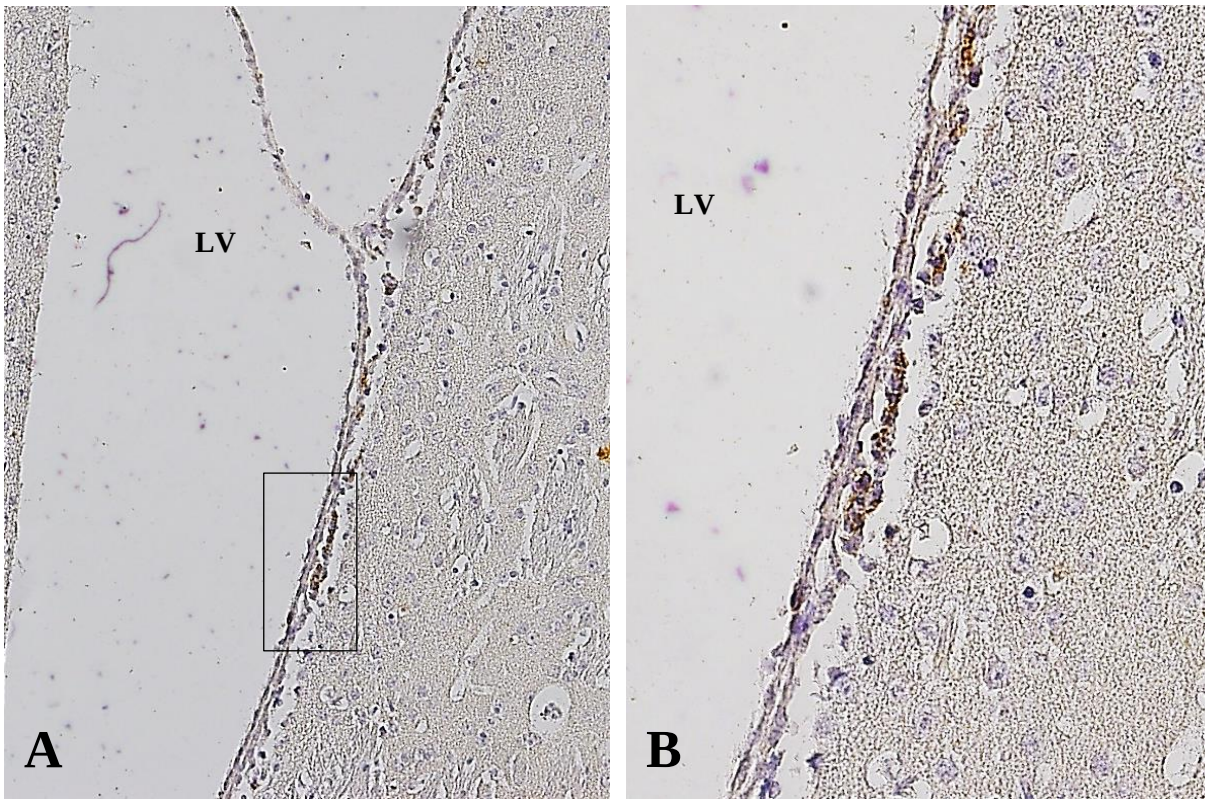
NCAM, adhezivní molekula neurálních buněk, je exprimována na povrchu většiny buněk nervového systému [88]. NCAM je vysoce exprimován v nově vzniklých neuronových prekurzorech (neuroblastech) obsažených v SEZ, které následně migrují rostrálním migračním proudem do *bulbus olfactorius* [34, 89]. Tmavé zbarvení buněk v oblasti SEZ a jejich následné vycestovávání potvrzuje přítomnost NCAM+ buněk v našich vzorcích (Obr. 14).



Obr. 14 – Imunohistochemický průkaz NCAM v koronárním řezu mozkem potkana
A – Náhled na přechod SEZ v mozkový parenchym. Tmavé zbarvení mozkové tkáně poukazuje na přítomnost NCAM+ buněk v celé oblasti mozkové tkáně, v oblasti SEZ je zbarvení intenzivnější, intenzivní zbarvení pozorujeme i v místě vycestovávání neuroblastů ze SEZ. Zvětšení 10x. B – Výřez z A. Detail SEZ. Intenzivní zbarvení skupin NCAM+ neuroblastů v SEZ. Zvětšení 20x.

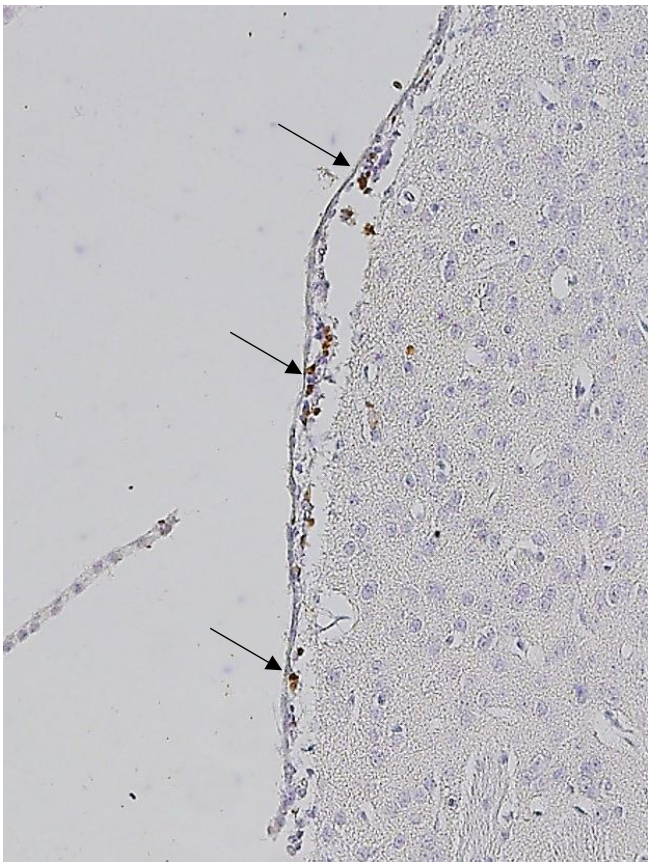
Dalším pozorovaným neuronálním markerem je doublecortin (DCX). DCX je fosfoprotein spojený s mikrotubuly, exprimován specificky v prakticky všech migrujících neuronových prekurzorech vyvíjející se CNS [90]. Během adultní neurogeneze exprese DCX začíná, když jsou generovány neuroblasty a snižuje se s výskytem zralého neuronálního markeru NeuN [91].

Naše výsledky barvení pro DCX+ buňky dokládají pozitivitu doubecortinu v SEZ (Obr. 15). To odpovídá obecným tvrzením, že je DCX generován neuroblasty. Data skupiny Couillard-Despress a kol. navíc potvrzují DCX jako spolehlivý a specifický marker, který odráží úroveň adultní neurogeneze dospělých a její modulaci [92].



Obr. 15 – Imunohistochemický průkaz DCX v řezu mozkem dospělé myši.
A – Tmavé zbarvení v oblasti SEZ odpovídající DCX+ buňkám poukazuje na výskyt neuroblastů v dané neurogenní zóně. Zvětšení 10x. B – Výřez z A. Detail na DCX+ oblast SEZ. Zvětšení 20x.

Posledním markerem sledovaným imunohistochemicky v SEZ myšího mozku je PCNA. PCNA, jaderný antigen proliferujících buněk, je nezbytný pro buněčné dělení a identifikuje nedávno rozdělené buňky v mozku zvířat. PCNA marker je využíván ve studiích, kde dochází k buněčnému dělení tak rychle, že by tradiční markery byly zředěny, a nemohly být detekovány. Pozitivita buněk na PCNA byla nalezena např. ve specifických centrech dospělého hypotalamu prasat [93]. PCNA pozitivní jádra byla příležitostně nalezena v SEZ, pravděpodobně jak neuroblastů, dělících se progenitorových/kmenových buněk, tak podpůrných gliových buněk (Obr. 16).



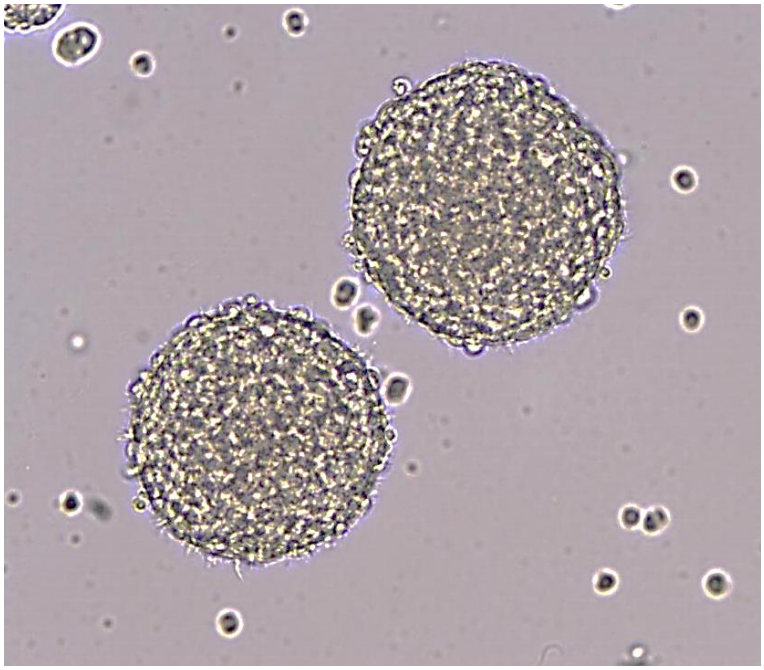
Obr. 16 – Imunohistochemický průkaz PCNA v řezu mozkem dospělé myši.
Náhled na myší dospělou SEZ s buňkami pozitivními na PCNA. Šipkami označené části SEZ zobrazující PCNA+ buněčná jádra proliferujících buněk. Časté nakupení drobných pozitivních buněk je typické pro neuroblasty. Zvětšení 10x.

Výsledky imunohistochemických průkazů námi vybraných antigenů ukazují subependymální zónu jako oblast obsahující heterogenní populaci buněk. Ve sledované SEZ řezů mozku myší/potkanů detekujeme buňky astrocytární povahy, prekurzory neuronů, ale i buňky právě proliferující kmenové či progenitorové buňky. Komplexním pohledem na všechny výsledky můžeme vyvodit závěr, že tyto znaky SEZ dokládají její neurogenní aktivitu.

4.2 Výsledky kultivace NKB a diskuze

Kultivace reprezentuje *in vitro* pěstování živých buněk s možností jejich pozorování pomocí mikroskopických technik. Správná kultivace umožňuje nejen přežívání buněk a uchování jejich fenotypu, ale případně taky jejich proliferaci (až expanzi) či diferenciaci. Buňky kultivujeme několika způsoby např. jako buněčnou suspenzi tzv. neurosféry (neurosphere assay) [7] nebo přilehlé na dno kultivační nádobky, kdy buňky tvoří monolayer. Kultivace neurosfér se využívá k izolaci neurálních kmenových buněk z tkáně CNS a k průkazu kritických atributů proliferace, rozsáhlé sebeobnovy a produkci diferencovaného potomstva [59].

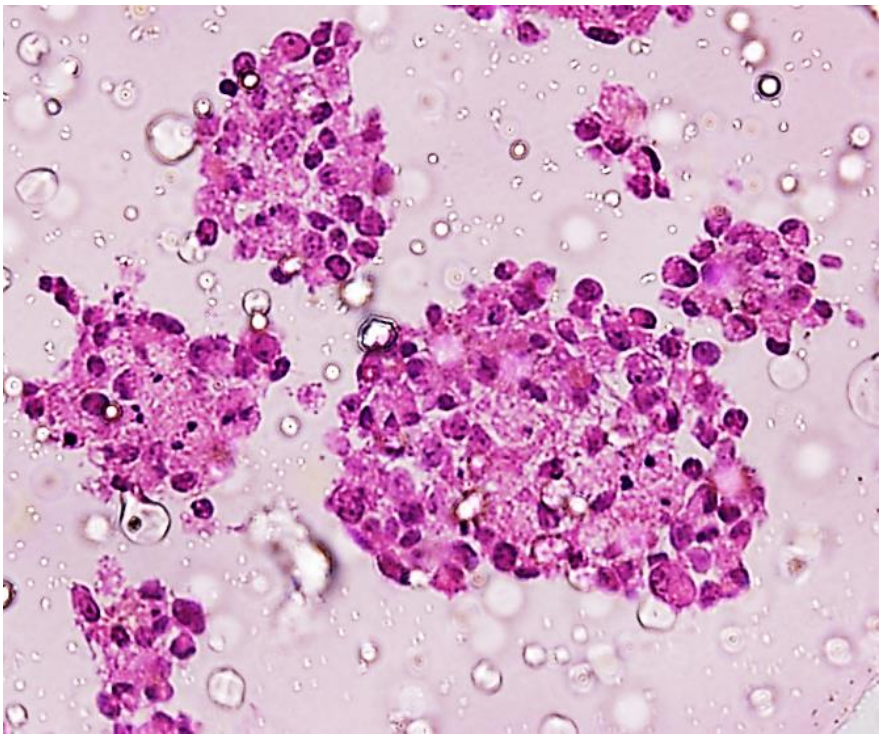
Neurosféry jsou klonální struktury vytvořené *in vitro* z disociovaných primárních tkání CNS. Neurosféry typicky rostou jako plovoucí trojrozměrné mnohobuněčné útvary sestávající se ze stovek až desetitisíců buněk a dosahující průměru 300-400 μm [94] (Obr. 17). Když je kultivační nádobka opatřena adhezivním povrchem neurosféry přilnou ke dnu a buňky z kulaté sféry odstředivě migrují a diferencují se na neurální buňky [95].



Obr. 17 – Detail morfologie neurosfér.
Devátý den kultivace. Neurosféry mají kulatý tvar a pravidelné okraje. Zvětšení 10x.

Dle stáří myšího embrya, ze kterého jsou NKB izolovány, můžeme předpokládat, jaký typ neurosfér se bude tvořit. Primitivních neurosféry s širším diferenciačním potenciálem nebo definitivní, které nemají diferenciační potenciál tak široký. Médium s přídavkem FGF2 a EGF je vhodné pro tvoření definitivních neurosfér, naopak médium s přídavkem LIF je vhodné pro tvorbu neurosfér primitivních [14, 16].

Cílem práce s NKB byla izolace NKB z mozků myších embryí, namnožení NKB tvorbou neurosfér a jejich expanze. Izolovali jsme NKB z mozků 13,5denních embryí a kultivovali je dle protokolu pro tvorbu neurosfér, tj. v bezsérových podmínkách s obsahem růstových faktorů EGF a FGF2 pro jejich mitogenní a trofické vlastnosti. Po izolaci a následných pěti dnech kultivace se vytvořily drobné neurosféry, které během dalších dvou dnů narostly tak, že byly na kultivační destičce viditelné i pouhým okem, následně byly histologicky zpracovány a obarveny hematoxylinem-eosinem (Obr. 18).



Obr. 18 – Histologický řez kultivovanými neurosférami.
Neurosféry s homogenní strukturou, kde se buňky nachází v podobném stádiu diferenciace. Nejvyšší buněčnou denzitu vykazují povrchové části neurosfér, které mají nejlepší přístup ke složkám buněčného media, a kde se vyskytuje nejvíce kmenových/progenitorových buněk. Naopak centrální partie, které obsahují méně buněk, představují mikroprostředí podporující buněčnou diferenciaci. Sedmý den kultivace, barvení hematoxylin-eosin. Zvětšení 40x.

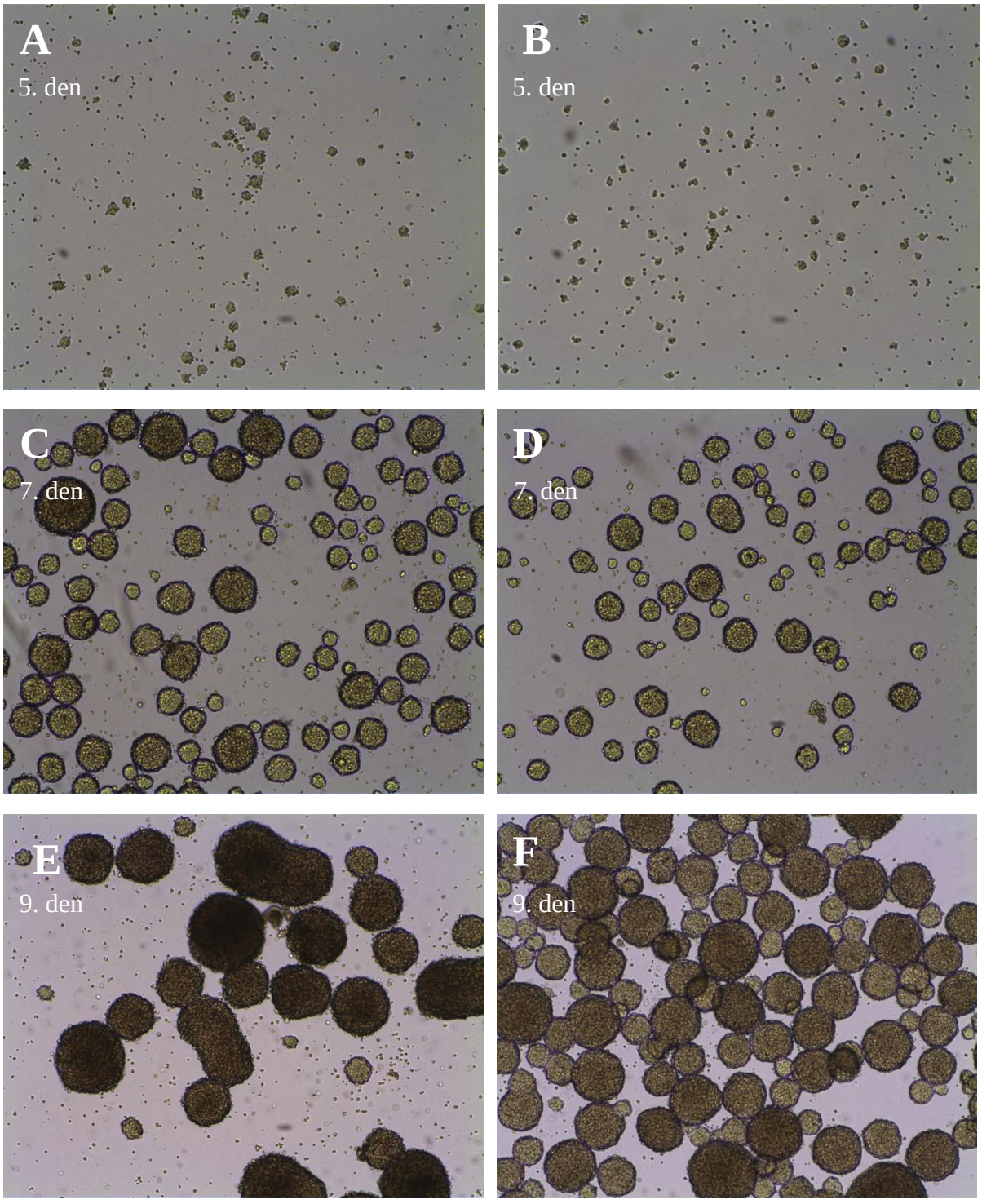
Pro porovnání byly buňky od izolace rozděleny na dvě části. Jedna byla vždy při pasáži přefiltrována, buňky tak byly více disociované a v kultuře se tvořily především monoklonální neurosféry, zatímco druhá nepřefiltrovaná část, kde buňky tolik disociované nebyly a kultura má vysokou hustotu buněk, se tvoří smíšené polyklonální neurosféry (filtrace přes buněčné sítko s velikostí pórů 40 μm).

Na Obr. 19 pozorujeme nepatrné rozdíly disociované a nedisociované kultury neurosfér. V disociované kultuře se tvoří více neurosfér, ale oproti nedisociované kultuře jsou menší, což zapříčinila disociace. Morfologie neurosfér obou kultur je velmi podobná. U delší kultivace neurosfér dochází k agregaci neurosfér a odumírání buněk uvnitř neurosfér (tmavé zbarvení buněk). Buňky mohou umírat přirozeně, např. populace diferencovanějších buněk, nebo díky nedostatečném zásobování buněk uvnitř neurosféry růstovými faktory a živinami z média.

Bull & Bartlett [96] byli schopni generovat multipotentní sféry z disociovaného hipokampu dospělých myší, ale tyto neurosféry byly schopny pouze omezené sebeobnovy ve formě velmi malého množství sekundárních a terciárních neurosfér. Ve srovnání s výsledky Marshalla, Reynoldse a Laywella, kteří izolovali NKB ze SEZ, kdy se neurosféry tvořily až 10 pasáží [95]. Je tak zřejmé, že klony odvozené z hippokampu jsou rozdílné a nesplňují požadavky pro rozsáhlou sebeobnovu. V našem experimentu jsme izolované buňky z oblasti laterálních mozkových komor kultivovali ve formě neurosfér deset pasáží, následně byly buňky zamraženy a skladovány v -80 °C. Délka pasážování tak podporuje výsledky Marshalla a kol. Po rozmrazení byla v kultuře nalezena kontaminace a s ohledem na ostatní buňky v laboratoři byly buňky zlikvidovány.

Dále byly izolovány NKB z postnatálních KB, a to 2denních a 7denních myší. Většina nasazených buněk byla kontaminována. Ke kontaminaci pravděpodobně došlo při preparaci mozkové tkáně z hlavy, při které vyvstává riziko přenesení bakterií osidlující dutinu nosní a ústní do média, v němž preparace probíhá. Po tří týdenní kultivaci se v pouze jedné jamce (7denní, médium DMEM/F12 + N2 suplement + EGF a FGF2) vytvořilo malé množství neurosfér. Po pasáži buňky neurosféry netvořily.

Z těchto technických důvodů jsem se proto v další práci zaměřila na možnost získání neurálních elementů z pluripotentních kmenových buněk, konkrétně jsem se věnovala diferenciaci myších embryonálních kmenových buněk a studiu vybraných faktorů a signálních cest ovlivňujících neurogenezi.



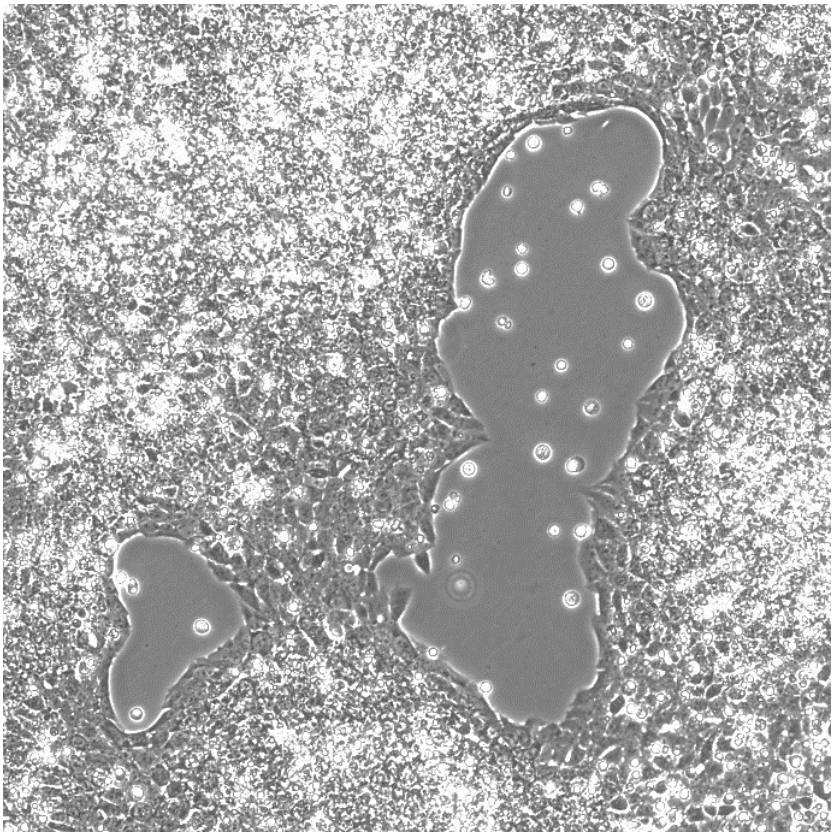
Obr. 19 – Kultivace NKB formou neurosfér.

Fotodokumentace průběhu kultivace NKB formou neurosfér v bezsérovém médiu v přítomnosti faktorů EGF a FGF2 (NKB jsou izolovány z 13,5denního embrya). A, C, E – Neurosféry tvořené z nedisociovaných buněk. B, D, F – Neurosféry tvořené z disociovaných buněk. Zvětšení 4x.

4.3 Výsledky kultivace a diferenciace EKB a diskuze

Pro kultivaci embryonálních kmenových buněk jsme využívali buněčnou linii mEKB D3. Tato linie byla poprvé izolována ze čtyřdenní myší blastocysty v roce 1985 [97]. Využívané buňky byly před kultivací hluboce zmraženy v kapalném dusíku (-196 °C). Požadované konfluence kolem 80 %, při kultivaci v 6-jamkových destičkách, buňky dosahovaly po přibližně sedmi dnech. Pro udržení pluripotence a zamezení spontánní diferenciace byly kultivovány v přítomnosti LIF na destičkách potažených 0,1% želatinou. Malé molekuly PD0325901 a CHIR99021 v médiu napomáhají k zamezení rozsáhlé buněčné smrti a k zachování pluripotence [98].

Díky potažení dna kultivačních destiček želatinou buňky přisedají na dno a rostou ve formě monolayeru (Obr. 20).



Obr. 20 – Kultivace myších embryonálních kmenových buněk.
Buněčná linie mEKB linie D3 byla kultivována v 2i kompletním bezsérovém médiu pro kultivaci embryonálních buněk. Kultivační destička potažená 0,1% želatinou, buňky rostou formou monolayeru, pátý den kultivace. Zvětšení 10x.

Takto kultivované buňky dále využíváme pro neurální diferenciaci formou agregátů podobných embryoidním tělískům.

Docílení neurální diferenciace *in vitro* je možné několika způsoby. Jedním dobře známým je diferenciace zprostředkovaná kyselinou retinovou (RA), která navázáním na receptor RA na jaderné membráně aktivuje signální dráhy k indukci neurální diferenciace [99]. Pro diferenciaci pomocí RA bylo zavedeno několik postupů, z čehož nejběžnější je metoda -4 / +4 RA, která zahrnuje čtyřdenní tvorbu embryoidních tělísek (EB) pro aktivaci buněk v diferenciačním stavu, po nichž následují čtyři dny, kdy jsou buňky ošetřeny kyselinou retinovou pro neurální indukci [100]. Modifikací této metody je kultivace embryoidních tělísek ve visících kapkách [101]. Dalším postupem je přidání RA do monolayeru adherentní kultury mEKB [102].

Ačkoli využití RA pro diferenciaci je časté, má i své nevýhody například její špatná rozpustnost ve vodném roztoku a rychlá degradace buněčným metabolismem. Proto je pro požadovanou diferenciaci zapotřebí regulace koncentrace RA. Navíc díky začlenění RA do jaderné membrány, mohou mít vysoké koncentrace přidávané RA (>10 mM) za následek dramaticky pokles životnosti buněk [103].

V této části práce jsme diferencovali mEKB třemi metodami. Tvorbou embryoidních tělísek s přídavkem RA, tvorbou neurálních cyst za vzniku neurálních trubic, taktéž pomocí RA a pomocí kultivace v BMP4 médiu s následnou diferenciací v přítomnosti LIF nebo jeho nepřítomnosti.

Níže jsou zdokumentovány výsledky pokusů o diferenciaci mEKB v neurální buňky.

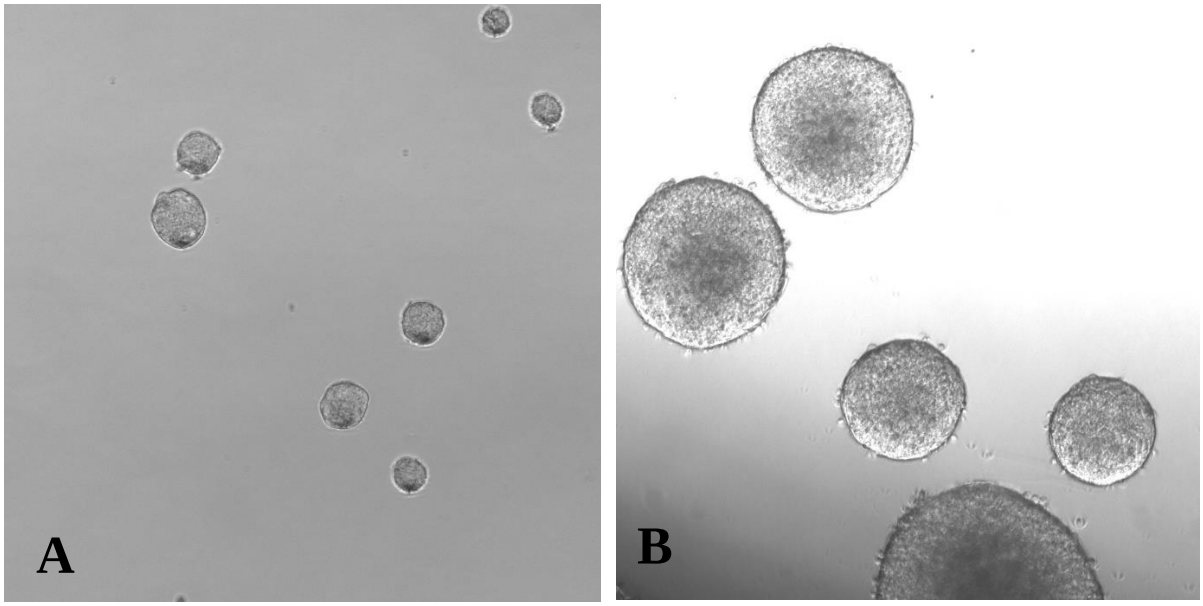
4.3.1 Neurální diferenciace mEKB kyselinou retinovou

Postup pro generování neurálních buněk zahrnující tvorbu embryoidních tělísek probíhá ve dvou krocích. První fázi tvoří čtyřdenní kultivace mEKB (Tab. 7) s jejich shlukováním do embryoidních tělísek. V druhé fázi pak dochází k přesazení tělísek na želatinou potažené destičky a k samotné diferenciaci pomocí přídavku kyseliny retinové [104].

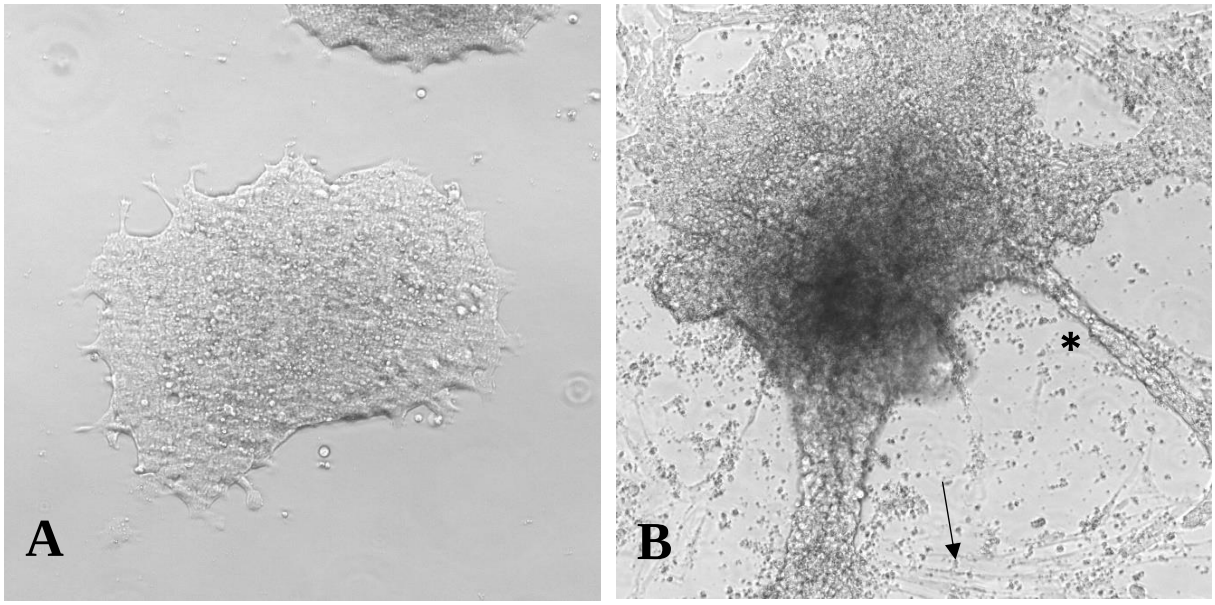
Vystavení rostoucích embryoidních tělísek vysoké koncentraci RA výrazně zvyšuje rychlost neurální diferenciace, zatímco nízká koncentrace RA indukuje více mesodermálních buněk [105]. Proto využíváme relativně vysoké koncentrace RA (0,1 – 5 mM).

Po třech dnech kultivace se buňky začaly shlukovat, sedmý den tvořily trojrozměrné sféroidy podobné embryoidním tělískům (Obr. 21). Takto vytvořené sféroidy byly přesazeny a byla přidána kyselina retinová v koncentracích 0,1 mM, 1 mM a 5 mM. Takto byly buňky dále kultivovány, přibližně dvakrát týdně bylo měněno médium. S ovlivněním RA sféroidy přisedly a začaly z nich vycestovávat buňky. Po šesti dnech bylo na doporučení změněno médium na

N2B27 a po dalších dvou dnech byla morfologie buněk v kultuře s 1 mM kyselinou retinovou výrazně změněna, buňky začaly vytvářet cytoplazmatické výběžky (Obr. 22).



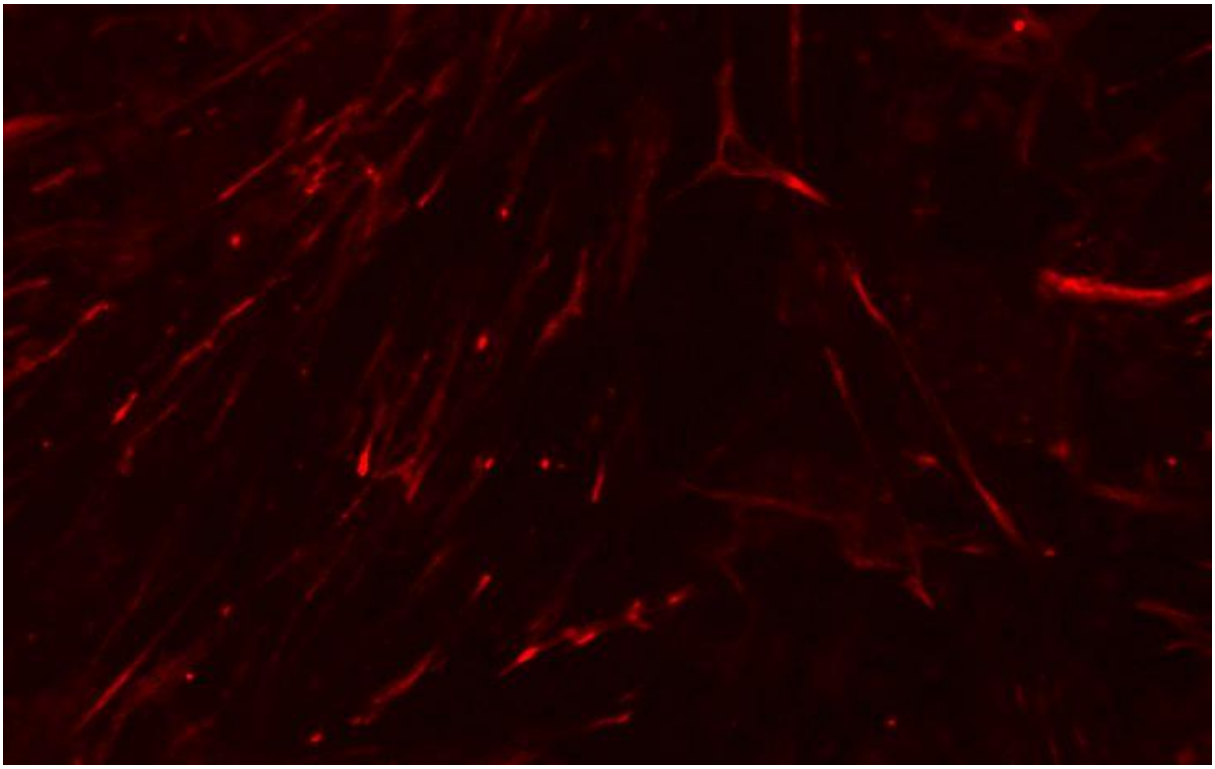
Obr. 21 – Tvorba sféroidů podobných embryoidním tělískům.
A – Shlukování buněk, třetí den kultivace. B – Sféroidy podobné embryoidním tělískům, sedmý den kultivace. Zvětšení 10x.



Obr. 22 – Diferenciace mEKB D3, ovlivněním 1mM kyselinou retinovou.
A – Druhý den diferenciace (diferenciační médium pro EB), přisednutí EB. B – Osmý den diferenciace (druhý den v N2B27 médiu). Buňky tvořící velké trojrozměrné shluky s cytoplazmatickými výběžky obsahující axony nervových buněk (označené ∗), podél kterých migrují další buňky; typickými nálezy jsou protáhlé výběžky (označené šipkou) a heterogenní směs vydiferencovaných buněk. A-B – Zvětšení 10x.

Agregáty v kulturách s 0,1 mM a 5 mM kyselinou retinovou také přisedly, ale nezačaly se diferencovat ani po změně média, což odporuje tvrzení, že s vyšší koncentrací RA se zrychluje neurální diferenciace [105]. Problémy s diferenciací mohly být ve všech kulturách spojeny se špatnou rozpustností kyseliny retinové v médiu, takže výsledná koncentrace ovlivňující chování buněk mohla být značně rozdílná. Vliv změny média na morfologii a diferenciaci buněk mohl být způsoben přítomností kyseliny retinové v N2 suplementu obsaženém v novém médiu (N2B27 médium).

Pro potvrzení neurálního charakteru byl proveden imunocytochemický průkaz nestinu, který je klíčovým markerem exprimovaným nezralými neurálními buňkami [94]. Obr. 23 potvrzuje pozitivitu námi vydiferencovaných myších embryonálních kmenových buněk za indukce 1 mM kyselinou retinovou.



Obr. 23 – Imunocytochemický průkaz nestinu.
Průkaz nestinu pomocí dvojstupňové metody (značení Cy3) v diferencovaných myších embryonálních kmenových buňkách. Diferenciace metodou tvorby embryonálních tělísek s přídavkem kyseliny retinové. Dvanáctý den diferenciace (šestý den po výměně média na N2B27). Zvětšení 10x.

4.3.2 Diferenciace mEKB směrem k neuroektodermu

Pro lepší pochopení účinku leukemického inhibičního faktoru (LIF) na neurogenezi, jsme diferencovali mEKB D3 buněčnou linii směrem k neuroektodermu. Před vlastní diferenciací byly buňky kultivovány v médiu s LIF a BMP4. Po odstranění BMP4 se buňky postupně diferencují na neurální kmenové buňky během šesti dní v médiích obsahujících LIF (LIF+) nebo LIF neobsahující (LIF–).

Klíč, že by LIF mohl být zapojen do neurální diferenciace EKB, vychází ze skutečnosti, že v podmínkách kultivace s nízkou hustotou a bez séra byly identifikovány EKB s vlastnostmi neurálních progenitorů [106].

Signální dráha LIF v CNS funguje synergicky s jinými signálními drahami. LIF i BMP4 samostatně podporují pluripotenci buněk. Protože společným působením dochází k synergickému účinku a molekuly jsou tak účinnější [102], jsme pro kultivaci mEKB využili spojení těchto dvou faktorů.

Signalizace kostního morfogenetického proteinu (BMP4) hraje klíčovou roli při udržování pluripotence mEKB a má negativní vliv na jejich neurální diferenciaci [107, 108], proto se tento faktor využívá pro kultivaci a sebeobnovu mEKB.

LIF je schopen udržovat EKB v pluripotentním stavu prostřednictvím podpory sebeobnovy nebo potlačení diferenciace buněk. Je proto v laboratořích široce využíván k udržení pluripotence mEKB, zatímco jeho odebrání umožňuje diferenciaci mEKB do různých typů buněk tří zárodečných vrstev [102, 109]. Navíc bylo zjištěno, že LIF neselektivně inhibuje apoptózu buněk a podporuje buněčnou proliferaci během neurální diferenciace EKB [109]. Zdá se, že aby EKB podstoupily tvorbu neurálních buněk je přítomnost LIF v médiu nutná [106].

Následně byla metodou kvantitativní RT-PCR analyzována exprese vybraných markerů pluripotence a časné neurogeneze. Pro dostatečnou analýzu diferencovaných buněk jsme sledovali sedm genů, mezi něž patří: Pou5f1 (Oct4), Sox2 a Nanog jako markery pluripotence a Sox1, Ccdc141, Nestin a Pax6 jako markery časné neurogenní diferenciace.

Jako markery pluripotence sledujeme například gen Pau5f1 kódující protein Oct4, jehož exprese je spojena s pluripotentními vlastnostmi kmenových buněk a je základním faktorem řídícím časná stádia embryogeneze savců [110]. Mezi další sledované pluripotentní markery patří Sox2 (viz 1.2.5) a Nanog, který je nezbytný pro normální vývoj časných myších embryí a pro schopnost sebeobnovy mEKB [111].

Sox1 je oproti Sox2 ve vývoji exprimován později, současně s tvorbou neurální lišty. Po neurální indukci je exprese Sox1 omezena na neurální prekurzory podél celé anteroposteriorní osy vyvíjejícího se embrya a následně na adultní NKB [112]. Dalším markerem časné neurogeneze je gen Ccdc141, který hraje roli v migraci buněk po povrchu radiálních glií i ve vývoji nervového systému [113]. Nestin je exprimován v definitivních NKB, progenitorech, radiální gliích a časných prekurzorech jednotlivých linií neurálních buněk včetně neuroblastů, u nichž však s postupem diferenciace mizí tak, jak je nahrazován jiným typem intermediárních filament, např. vimentinem, GFAP a neurofilamenty. Pro NKB je nestin základním proteinem pro přežití a pro schopnost sebeobnovy [114]. Posledním sledovaným genem je Pax6. Pax6 je transkripční faktor nezbytný pro vývoj oka, mozku ale i slinivky břišní. Jeho zvýšená exprese v mEKB podporuje diferenciaci buněk v neurony [115].

Sledováním genové exprese těchto vybraných markerů pozorujeme rozdíly mezi diferencovanými buňkami s přítomností LIF, bez LIF a nediferencovaných buněk kultivovaných v přítomnosti BMP4 a LIF.

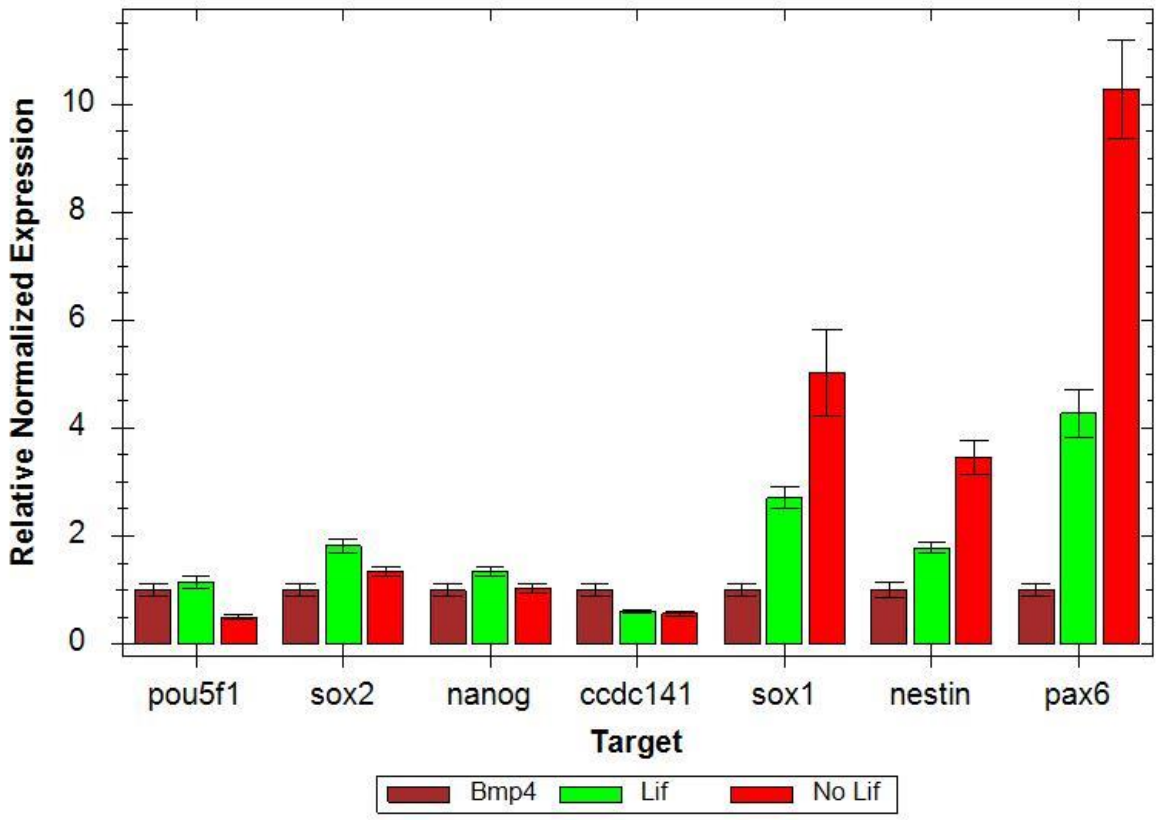
Před samotnou analýzou genové exprese pomocí qRT-PCR jsme mikrospektrofotometricky analyzovali vzorky izolované RNA pro ověření jejich čistoty a koncentrace izolované RNA. Čistotu vzorku nukleové kyseliny hodnotíme z poměrů absorbancí pro dané skupiny látek. Poměr absorbance při 260 nm (nukleové kyseliny) a 280 nm (proteiny) vyjadřuje míru kontaminace nukleové kyseliny proteiny. Čistá RNA má hodnotu poměru A260/A280 ~ 2, čistá DNA pak ~ 1,8. Pokud je hodnota výrazně nižší, je vzorek kontaminován proteiny [116]. Dalším parametrem je hodnota poměru A260/A230, kterým hodnotíme míru kontaminace reagenciemi. Světlo při 230 nm totiž absorbují sloučeniny používané při izolaci RNA nejčastěji fenol a etanol. Proto poměr A260/A230 odráží kontaminaci těmito sloučeninami a čistý vzorek nukleové kyseliny by měl mít hodnotu ~ 2,2 [117].

Spektrofotometrické ověření potvrdilo čistotu izolované RNA v našich vzorcích (Tab. 16).

Tab. 16 – Ověření čistoty vzorků a stanovení koncentrace izolované RNA.

Vzorek	A260/A280	A260/A230	Koncentrace
LIF +	1,96	2,22	1024 ng/µl
LIF –	1,97	2,24	938,9 ng/µl

Kvantifikace qRT-PCR je relativní. Porovnávali jsme množství fluorescence testovaných vzorků a vnitřního standardu (β-aktin).



Graf 1 – Relativní normalizovaná exprese sledovaných genů.
Kontrolní vzorek – BMP4. Vnitřní standard (referenční gen) – β-aktin.

V grafu 1 vidíme, že v přítomnosti LIF, mají buňky zvýšenou expresi klíčových faktorů pluripotence Pou5f1 (Oct4), Sox2 a Nanog, ve srovnání s kontrolním vzorkem, buňkami kultivovanými v médiu s LIF a BMP4. Navíc byla zvýšená exprese detekována i u časných neurogenní markerů, tj. Sox1, Nestin, Pax6, což potvrzuje tvrzení He a kol. ve studii efektu LIF na neurogenní diferenciaci EKB [109]. Nicméně u povrchového markeru Cdcc141 byla exprese snížena. Když jsme porovnali genovou expresi u diferencovaných buněk bez přítomnosti LIF, byla exprese základních pluripotentních markerů oproti kontrole také zvýšena, ale v buňkách kultivovaných bez přítomnosti LIF měly časné neurální geny dvojnásobně vyšší expresi. Závěrem lze říci, že LIF udržuje expresi klíčových faktorů pluripotence, aniž by bránil nebo dokonce inhiboval neurální diferenciaci.

5 Závěr

Neurální kmenové buňky v dospělém mozku hlodavců se vyskytují v místech nazývaných neurogenní zóny. Mezi tyto oblasti patří subependymální zóna laterálních mozkových komor, subgranulární zóna *gyrus dentatus* hipokampu a v hypotalamu v oblasti výstelky třetí mozkové komory. Nové neurony mohou generovat NKB vyskytující se v neurogenním niché těchto oblastí, ale také embryonální kmenové buňky s pluripotentním potenciálem, které jsme v praktické části diferencovali *in vitro* směrem k neuroektodermu.

Teoretická část práce se zaměřuje na popis neurogenních zón dospělého mozku jejich niché a neurálních kmenových buněk. Neurální kmenové buňky jsou multipotentní KB s plasticitou diferenciačního potenciálu ovlivňovanou například jejich mikroprostředím (dalšími buňkami i sekretovanými látkami), kterým se práce také zabývá. Kapitola věnovaná popisu neurálních kmenových buněk se dále zaměřuje na vývoj těchto buněk a jejich progenitorů, a jejich detekci v tkáních pomocí specifických markerů.

Praktická část zahrnuje imunohistochemické zpracování řezů mozkovou tkání hlodavců, přesněji oblasti subependymální zóny, kde pozorujeme expresi neurálních markerů, a to: gliálního fibrilárního proteinu (GFAP), adhezní molekuly neurálních buněk (NCAM), doublecortinu (DCX) a jaderného antigenu proliferujících buněk (PCNA). Pozorování těchto složek nám umožňuje sledovat neurogenezi probíhající v SEZ, přesněji na typy buněk osidlující neurogenní niché, popřípadě i jejich migraci (NCAM+ neuroblasty).

Velkou částí laboratorní práce zahrnovala kultivace buněk. Kultivovali jsme neurální kmenové buňky izolované ze 13,5denních myších embryí, formou neurosfér. Sledovali jsme jejich morfologii a expanzi NKB v neurosférách, pozorovali vlastnosti mitogenních faktorů EGF, FGF2 a LIF přidávaných do média a vliv disociace buněk na tvorbu neurosfér.

Dalšími kultivovanými buňkami byly myší embryonální kmenové buňky linie D3. Tyto buňky mohou být diferenciací směřovány k neurálnímu osudu. O to jsme se také v praktické části pokoušeli. Pro diferenciaci mEKB jsme vybrali dvě metody, jedná se o kultivaci mEKB formou embryoidních tělísek s následnou neurální indukcí přídavkem kyseliny retinové a o vliv leukemického inhibičního faktoru (LIF) na diferenciaci mEKB směrem k neurálním progenitorovým buňkám.

Experiment efektu LIF na mEKB byl zakončen analýzou genové transkripce pomocí metody kvantitativní RT-PCR, kde jsme sledovali vybrané geny pluripotence a časné neurogeneze.

Z výsledků tohoto experimentu můžeme vyčíst, že ač je LIF faktorem pro udržení pluripotence, tak jeho přítomnost v kultuře mEKB D3 nebrání neurální diferenciaci. Tyto výsledky by mohly být v budoucnosti podpořeny diferenciaci s následnou imunocytochemickou detekcí markerů neurálních progenitorů a zralých neuronů.

Objev kontinuální neurogeneze v dospělém mozku savců vyvrátil staré dogma a poskytl nový pohled na plasticitu zralého nervového systému. Od té doby je adultní neurogeneze velmi studovaným tématem. Přestože již známe oblasti adultní neurogeneze, obsah neurogenního niché a signální dráhy udržující neurální prekurzory je stále mnoho pochodů, které je třeba objasnit. Možným využitím studií kmenových buněk by byla stimulace jejich regeneračního potenciálu k obnovení poškozených funkcí způsobených poraněním nebo neurodegenerativním onemocněním.

6 Citovaná literatura

[1] J. J. Breunig, T. F. Haydar a P. Rakic, „Neural stem cells: Historical perspective and future prospects," *Neuron,* sv. 70, č. 4, str. 614-625, 2011.

[2] S. Filip, I. Hruška a J. Mokrý, Kmenové buňky: Biologie, medicína, filozofie, Praha: Galén, 2006.

[3] H. Ma, Y. Yang a M. Ma, „Totipotent of stem cell," *Stem Cell,* sv. 3, č. 4, str. 1-5, 2012.

[4] K. Smetana, „Editorial – Kmenové buňky," *Kontakt,* sv. XII, č. 3, str. 251-254, 2010.

[5] M. Götz a W. B. Huttner, „The cell biology of neurogenesis," *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* sv. 6, č. 10, str. 777-788, 2005.

[6] S. A. Goldman a F. Nottebohm, „Neuronal production, migration, and differentation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain," *Proceedings of the National Academy of the Sciences of United States of America,* sv. 80, str. 2390-2394, 1983.

[7] B. A. Reynolds a S. Weiss, „Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system," *Science,* sv. 255, č. 5052, str. 1707-1710, 1992.

[8] J. P. Andreotti, W. N. Silva, A. C. Costa, C. O. Bitencourt, F. C. Bitencourt, L. M. Coimbra-Campos, R. R. Resende, L. A. Magno , M. A. Romano-Silva, A. Mintz a A. Birbrair, „Neural stem cell niche heterogenity," *Seminars in Cell and Developmental Biology,* str. S1084-9521(18)30057-0. 2019.

[9] L. D. Shoemaker a H. I. Kornblum, „Neural stem cells (NSCs) and proteomics," *Molecular & Cellular Proteomics,* sv. 15, č. 2, str. 344-354, 2016.

[10] J. Schneider, J. Karpf a R. Beckervordersandforth, „Role of astrocytes in the neurogenic niches," *Methods in Molecular Biology,* sv. 1938, str. 19-33, 2019.

[11] S. Temple, „Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture," *Nature,* sv. 340, č. 6233, str. 471-473, 1989.

[12] R. Bai, G. Gao, Y. Xing a H. Xue, „Two outward potassium current types are expressed during the neural differentiation of neural stem cells," *Neural Regeneration Research,* sv. 8, č. 28, str. 2656-2665, 2013.

[13] Y. H. Yu, G. Narayanan, S. Sankaran, S. Ramasamy, S. Y. Chan, S. Lin, J. Chen, H. Yang, H. Srivats a S. Ahmed, „Purification, visualization, and molecular signature of neural stem cells," *Stem Cells and Development,* sv. 25, č. 2, str. 189-201, 2016.

[14] W. Xu, N. Lakshman a C. M. Morshead, „Building a central nervous system: The neural stem cell lineage revealed," *Neurogenesis,* sv. 4, č. 1, str. 1-8, 2017.

[15] R. Leeder, „Primitive neural stem cells on the mouse brain," University of Toronto, Toronto, 2015.

[16] R. P. Salewski, J. Buttigieg, R. A. Mitchell, D. van der Kooy, A. Nagy a M. G. Fehlings, „The generation of definitive neural stem cells from PiggyBac transposon-induced pluripotent stem cells can be enhanced by induction of the NOTCH signaling pathway," *Stem Cells and Development,* sv. 22, č. 3, str. 383-396, 2012.

[17] F. T. Merkle, Z. Mirzadeh a A. Alvarez-Buylla, „Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain," *Science,* sv. 317, č. 5836, str. 381-384, 2007.

[18] Y. Yan, S. Shin, B. S. Jha, Q. Liu, J. Sheng, F. Li, M. Zhan, J. Davis, K. Bharti, X. Zeng, M. Rao, N. Malik a M. C. Vemuri, „Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells," *Stem Cells Translational Medicine,* sv. 2, č. 11, str. 862-870, 2013.

[19] L. Clarke a D. van der Kooy, „Low oxygen enhances primitive and definitive neural stem cell colony formation by inhibiting distinct cell death pathways," *Stem Cells,* sv. 27, č. 8, str. 1879-1886, 2009.

[20] I. Decimo, F. Bifari, M. Krampera a G. Fumagalli, „Neural stem cell niches in health and diseases," *Current Pharmaceutical Design,* sv. 18, č. 13, str. 1755-1783, 2012.

[21] C. Zhu, S. Mahesula, S. Temple a E. Kokovay, „Heterogenous expression of SDFI retains actively proliferating neural progenitors in the capilary compartment of the niche," *Stem Cell Reports,* sv. 12, č. 1, str. 6-13, 2019.

[22] Y. Zhou, A. M. Bond, J. E. Shade , Y. Zhu, C.-h. O. Davis, X. Wang, Y. Su, K.-J. Yoon, A. T. Phan, W. J. Chen, J. H. Oh, N. Marsh-Armstrong, K. Atabai, G.-l. Ming a H. Song, „Autocrine Mfge8 signaling prevents developmental exhaustion of the adult neural stem cell pool," *Cell Stem Cell,* sv. 23, č. 3, str. 444-452, 2018.

[23] D. Petrik, M. H. Myoga, S. Grade, N. J. Gerkau, M. Pusch, C. R. Rose, B. Grothe a M. Götz, „Epithelial sodium channel regulates adult neural stem cell proliferation in a flow-dependent manner," *Cell Stem Cell,* sv. 22, č. 6, str. 865-878, 2018.

[24] C. Zaverucha-do-Valle, F. Gubert , L. Mesentier-Louro, E. Scemes, F. Pitossi, M. F. Santiago a R. Mendez-Otero, „Resident neural stem cells," v *Resident stem cells amd regenerative therapy*, Oxford, Academic Press, str. 69-87, 2013.

[25] P. S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A.-M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson a F. H. Gage, „Neurogenesis in the adult human hippocampus," *Nature Medicine,* sv. 4, č. 11, str. 1313-1317, 1998.

[26] H. Suh, A. Consiglio, J. Ray, T. Sawai, K. A. D'Amour a F. H. Gage, „In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus," *Cell Stem Cell,* sv. 1, č. 5, str. 515-528, 2007.

[27] M. Y. S. Kalani, S. H. Cheshier, B. J. Cord, S. R. Bababeygy, H. Vogel, I. L. Weissman, T. D. Palmer a R. Nusse, „Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells," *Proceedings of the National Academy of the Sciences of United States of America,* sv. 105, č. 44, str. 16970-16975, 2008.

[28] D.-C. Lie, S. A. Colamarino, H.-J. Song, L. Désiré, H. Mira, A. Consiglio, E. S. Lein, S. Jessberger, H. Lansford, A. R. Dearie a F. H. Gage, „Wnt signalling regulates adult hippocampal," *Nature,* sv. 437, č. 7063, str. 4371370-1375, 2005.

[29] G. Rushing a R. A. Ihrie, „Neural stem cell heterogeneity through time and space in ventricular-subventricular zone," *Frontiers in Biology,* sv. 11, č. 4, str. 261-284, 2016.

[30] M. J. Chumley, T. Catchpole, R. E. Silvany, S. G. Kernie a M. Henkemeyer, „EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis," *Journal od Neuroscience,* sv. 27, č. 49, str. 13481-13490, 2007.

[31] M. Migaud, M. Batailler, S. Segura, A. Duittoz, I. Franceschini a D. Pillon, „Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative stud between the hypotalamus and the classical neurogenic zones," *European Journal of Neuroscience,* sv. 32, č. 12, str. 2042-2052, 2010.

[32] S. Suzuki, J. Namiki, S. Shibata, Y. Mastuzaki a H. Okano, „The neural stem/progenitor cell marker nestin Is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, sv. 58, č. 8, str. 721-730, 2010.

[33] „GFAP_HUMAN," UniProtKB/Swiss-Prot, 13. 2. 2019. [Online]. Dostupné z: https://www.uniprot.org/uniprot/P14136. [Přístup získán 19. 2. 2019].

[34] H. Cremer, G. Chazal, P. M. Lledo, G. Rougon, M. F. Montaron , W. Mayo, M. Le Moal a D. N. Abrous, „PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity," *International Journal of Developmental Neuroscience,* sv. 18, č. 2-3, str. 213-220, 2000.

[35] Z. Kelman, „PCNA: structure, funcions and interactions," *Oncogene,* sv. 14, č. 6, str. 629-640, 1997.

[36] D.-W. Li, G.-R. Li, B.-L. Zhang, J.-J. Feng a H. Zhao, „Damage to dopaminergic neurons is mediated by proliferating cell nuclear antigen through the p53 pathway under conditions of oxidative stress in a cell model of Parkinson's disease," *International Journal of Molecular Medicine,* sv. 37, č. 2, str. 429-435, 2016.

[37] N. Hong, M.-H. Kim, C. K. Min, H. J. Kim a J. H. Lee, „The co-expression of Neogenin with SOX2 in hippocampal neurons," *Biochemical and Biophysical Research Communications,* sv. 490, č. 2, str. 453-459, 2017.

[38] X. Wang, D. Wang, N. Yuan, F. Liu, F. Wang, B. Wang a D. Zhou, „The prognostic value of PCNA expression in patients with osteosarcoma," *Medicine,* sv. 96, č. 41, str. e8254, 2017.

[39] H. Okazaki, A. Kanda, S. Kanda, T. Shimono, Y. Yun, Y. Kobayashi, Z. Wang, H. Ooka, K. Suzuki, D. B. Van, K. Tomoda, H. Iwai a T. Nishiyama, „Cells expressing prominin-1 in neonatal murine inferior colliculus differentiate into neurons and glia," *Molecular Neurobiology,* sv. 55, č. 6, str. 4998-5005, 2018.

[40] E. Irollo a G. Pirozzi, „CD133: to be or not to be, is this the real question?," *American Journal of Translational Research,* sv. 5, č. 6, str. 563-581, 2013.

[41] Y. Cai, K. Xiong, Y. Chu, D.-w. Luo, X.-G. Luo, X.-Y. Youan, R. G. Struble, R. W. Clough, D. D. Spencer, A. Williamson, J. H. Kordower, P. R. Patrylo a X.-X. Yan, „Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups," *Experimental Neurology,* sv. 216, č. 2, str. 342-356, 2009.

[42] M.-A. Fawal a A. Davy, „Impact of metabolic pathways and epigenetics on neural stem cells," *Epigenetics Insights,* sv. 11, str. 1-5, 2018.

[43] J. B. Angevine Jr., D. Bodian, A. J. Coulombre, M. V. Edds Jr., V. Hamburger, M. Jacobson, K. M. Lyser, M. C. Prestige, R. L. Sidman, S. Varon a P. A. Weiss, „Embryonic vertebrate central nervous system: Revised Terminology. The Boulder committee," *The Anatomical Record,* sv. 166, č. 2, str. 257-261, 1970.

[44] C. Y. Brazel, M. J. Romanko, R. P. Rothstein a S. W. Levison, „Roles of the mammalian subventricular zone in brain development," *Progress in Neurobilogy,* sv. 69, č. 1, str. 49-69, 2003.

[45] J. Altman, „Are new neurons formed in the brains of adult mammals?," *Science,* sv. 135, č. 3509, str. 1127-1128, 1962.

[46] J. Altman a G. D. Das, „Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats," *Journal of Comparative Neurology,* sv. 124, č. 3, str. 319-335, 1965.

[47] J. Altman, „Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb," *Journal of Comparative Neurology,* sv. 137, č. 4, str. 433-457, 1969.

[48] E. Gould, A. J. Reeves, M. Fallah, P. Tanapat, C. G. Gross a E. Fuchs, „Hippocampal neurogenesis in adult old world primates," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* sv. 96, č. 9, str. 5263-5267, 1999.

[49] S. Falk a M. Götz, „Glial control of neurogenesis,“ *Current Opinion in Neurobiology,* č. 47, str. 188-195, 2017.

[50] D. A. Lim a A. Alvarez-Buylla, „The adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis,“ *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,* sv. 8, č. 5, str. 1-33, 2016.

[51] A. J. Eisch, H. A. Cameron, J. M. Encinas, L. A. Meltzer, G.-L. Ming a L. S. Overstreet-Wadiche, „Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: Hope or Hype?,“ *The Journal of Neuroscience,* sv. 28, č. 46, str. 11785-11791, 2008.

[52] „Pluripotentní kmenové buňky,“ Nature, 2005. [Online]. Dostupné z: https://www.nature.com/subjects/pluripotent-stem-cells. [Přístup získán 26. 2. 2019].

[53] F. M. Watt a R. R. Driskell, „The therapeutic potential of stem cells,“ *Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences,* sv. 365, č. 1537, str. 155-163, 2010.

[54] C. Verfaillie, „Pluripotent stem cells,“ *Transfusion Clinique et Biologique,* sv. 16, č. 2, str. 65-69, 2009.

[55] A. Glejzer, V. Neirincjx, B. Rogister a S. Wislet-Gendebien, „Neural crest stem cells from adult bone marrow: A new source for cell replacement therapy?,“ v *Advances in Regenerative Medicine,* InetchOpen, str. 1-18, 2011.

[56] D. Ilic a C. Ogilvie, „Concise review: Human embryonic stem cells—What have we done? What are we doing? Where are we going?,“ *Stem Cells,* sv. 35, č. 1, str. 17-25, 2016.

[57] K. Takahashi a S. Yamanaka, „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors,“ *Cell,* sv. 126, č. 4, str. 663-676, 2006.

[58] Y. Li, M. Liu, Y. Yan a S.-T. Yang, „Neural differentiation from pluripotent stem cells: The role of natural and systhetic extracellular matrix,“ *World Journal of Stem Cells,* sv. 6, č. 1, str. 11-23, 2014.

[59] L. P. Deleyrolle, R. L. Rietze a B. A. Reynolds, „The neurosphere assay, a method under scrutiny,“ *Acta Neuropsychiatrica,* sv. 20, č. 1, str. 2-8, 2008.

[60] T. L. Walker a G. Kempermann, „One mouse, two cultures: isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice," *Journal of Visualized Experiments,* sv. 25, č. 84, str. e51225, 2014.

[61] M. Engel, D. Do-Ha, S. S. Muñoz a L. Ooi, „Common pitfalls of stem cell differentiation: a guide to improving protocols for neurodegenerative disease models and research," *Cellular and Molecular Life Sciences,* sv. 73, č. 19, str. 3693-3709, 2016.

[62] M. J. Evans a M. H. Kaufman, „Establishment in culture od pluripotential cells from mouse embryos," *Nature,* sv. 292, č. 5819, str. 154-156, 1981.

[63] M. Bibel, J. Richter, K. Schrenk, K. L. Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz a Y. Barde, „Diferentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage," *Nature Neuroscience,* sv. 7, č. 9, str. 1003-1009, 2004.

[64] M. Tarunina, D. Hernandez, C. J. Johnson, S. Rybtsov, V. Ramathas, M. Jeyakumar, T. Watson, L. Hook, A. Medvinsky, C. Mason a Y. Choo, „Directed differentiation of embryonic stem cells using a bead-based combinatorial screening method," *PLOS One,* sv. 9, č. 9, str. e104301, 2014.

[65] H. Lee, G. Al Shamy, Y. Elkabetz, C. M. Schofield, N. L. Harrison, G. Panagiotakos, N. D. Socci, V. Tabar a L. Studer, „Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons," *Stem Cells,* sv. 25, č. 8, str. 1931-1939, 2007.

[66] G. I. Nistor, M. O. Totoiu, N. Haque, M. K. Carpenter a H. S. Keirstead, „Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation," *Glia,* sv. 49, č. 3, str. 385-396, 2005.

[67] S. Kriks, J.-W. Shim, J. Piao, Y. M. Ganat, D. R. Wakeman, Z. Xie, L. Carrillo-Reid, G. Auyeung, C. Antonacci, A. Buch, L. Yang, F. M. Beal, J. D. Surmeier, J. H. Kordower, V. Tabar a L. Studer, „Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease," *Nature,* sv. 480, č. 7378, str. 547-551, 2011.

[68] S.-J. Lu, Q. Feng, J. S. Park, L. Vida, B.-S. Lee, M. Strausbauch, P. J. Wettstein, G. R. Honig a R. Lanza, „Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells," *Blood,* sv. 112, č. 12, str. 4475-4484, 2008.

[69] S. Agarwal, K. L. Holton a R. Lanza, „Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells,“ *Stem Cells,* sv. 26, č. 5, str. 1117-1127, 2008.

[70] Y. Znahg, W. Li, T. Laurent a S. Ding, „Small molecules, big roles – the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming,“ *Journal of Cell Science,* sv. 125, č. 23, str. 5609-5620, 2012.

[71] J. M. Brickman a P. Serup, „Properties of embryoid bodies,“ *Intersisciplinary Reviews: Developmental Biology,* sv. 6, č. 2, str. e259, 2016.

[72] M. Kibschull, „Differentiating mouse embryonic stem cells into embryoid bodies in AggreWell plates,“ *Cold Spring Harbor Protocols,* č. 6, str. pdb.prot094169, 2017.

[73] S. M. Chambers, C. A. Fasano, E. P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain a L. Studer, „Highly efficient neural conversion by dual inhibition of SMAD signaling,“ *Nature Biotechnology,* sv. 27, č. 3, str. 275-280, 2009.

[74] W. Li, W. Sun, Y. Zhang, W. Wei, R. Ambasudhan, P. Xia, M. Talantova, T. Lin, J. Kim, X. Wang, W. R. Kim, S. A. Lipton, K. Zhang a S. Ding, „Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* sv. 108, č. 20, str. 8299-8304, 2011.

[75] H. Tsutsui, B. Valamehr, A. Hindoyan, R. Qiao, X. Ding, S. Guo, O. N. Witte, X. Liu, C.-M. Ho a H. Wu, „An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells,“ *Nature Communications,* sv. 2, č. 167, str. 1-8, 2011.

[76] C. Strübing, G. Ahnert-Hilger, J. Shan, B. Wiedenmann, J. Hescheler a A. M. Wobus, „Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons,“ *Mechanisms of Development,* sv. 53, č. 2, str. 275-287, 1995.

[77] S. Čech, „Imunohistochemie a imunohistochemické metody,“ [Online]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/OH_txt1-5.htm. [Přístup získán 26. 2. 2019].

[78] J. Duraiyan, R. Govindarajan, K. Kaliyappan a M. Palanisamy, „Applications of immunohistochemistry,“ *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences,* sv. 4, č. 6, str. s307-s309, 2012.

[79] M. Beranová a Z. Tonar, „Principy a příklady imunohistochemie,“ 2002. [Online]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf. [Přístup získán 26. 2. 2019].

[80] D. Belina, B. Giro, H. Ashenafi, T. Demissie a Y. Muktar, „Review on camel liver pathology and its major diagnostic approaches,“ *Global Journal of Veterinary Medicine and Research,* sv. 3, č. 1, str. 68-79, 2015.

[81] K. Dvořák, Z. Dvořáková, J. Feit, Z. Lukáš a J. Šmardová, „Základy histopatologickýxh vyšetřovacích metod,“ 2008. [Online]. Dostupné z: https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf. [Přístup získán 26. 2. 2019].

[82] R. Martinez, „How to count cells with a Neubauer chamber,“ 14. 7. 2011. [Online]. Dostupné z: https://membs.org/membs/uploads/education_images/1462615559Counting%20cells.pdf. [Přístup získán 21. 3. 2019].

[83] A. D. R. Garcia, N. B. Douan, T. Imura, T. G. Bush a M. V. Sofroniew, „GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain,“ *Nature Neuroscience,* sv. 7, č. 11, str. 1233-1241, 2004.

[84] Y. Liu, T. Namba, J. Liu, R. Suzuki, S. Shioda a T. Seki, „Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus,“ *Neuroscience,* sv. 166, č. 1, str. 241-251, 2010.

[85] T. Seki, T. Namba, H. Mochizuki a M. úOnodera, „Clustering, migration, and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus,“ *Journal of Comparative Neurology,* sv. 502, č. 2, str. 275-290, 2007.

[86] M. Orel, „Podpůrné buňky a jejich role,“ v *Nervové buňky a jejich svět*, Praha, Grada Publishing, str. 143-149, 2015.

[87] M. V. Sofroniew, „Astrocytes: biology and pathology,“ *Acta Neuropathologica,* sv. 119, č. 1, str. 7-35, 2010.

[88] L. Bonfanti, „PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis,“ *Progres in Neurobiology,* sv. 80, č. 3, str. 129-164, 2006.

[89] L. Bonfanti a D. T. Theodosis, „Expression of polysyalylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb,“ *Neuroscience,* sv. 62, č. 1, str. 291-305, 1994.

[90] S. Couillard-Despres, J. Winklwe, G. Uyanik a L. Aigner, „Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis?,“ *Current Molecular Medicine,* sv. 1, č. 6, str. 677-688, 2001.

[91] M. S. Rao a A. K. Shetty, „Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus,“ *The European Journal of Neuroscience,* sv. 19, č. 2, str. 234-246, 2004.

[92] S. Couilard-Despres, B. Winner, S. Schaubeck, R. Aigner, M. Vroemen, N. Weidner, U. Bogdahn, J. Winkler, H.-G. Kuhn a L. Aigner, „Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis,“ *European Journal of Neuroscience,* sv. 21, č. 1, str. 1-14, 2005.

[93] S. L. Rankin, G. D. Partow, R. D. McCurdy, E. D. Giles a K. R. S. Fisher, „The use of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry with a unique functional marker to detect postnatal neurogenesis in paraffin-embedded sections of the mature pig brain,“ *Brain Research Protocols,* sv. 13, č. 2, str. 69-75, 2004.

[94] J. Mokrý, Neurální prekurzorové buňky a jejich kultivace, Praha: Galén, 1999.

[95] G. P. Marshall, B. A. Reynolds a E. D. Laywell, „Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo,“ *Current Pharmaceutical Biotechnology,* sv. 8, č. 3, str. 141-145, 2007.

[96] N. D. Bull a P. F. Bartlett, „The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell,“ *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience,* sv. 25, č. 47, str. 10815-10821, 2005.

[97] T. C. Doetschman, H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt a R. Kemler, „The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium," *Journal of Embryology and Experimental Morphology,* č. 87, str. 27-45, 1985.

[98] K.-H. Lee, „Conditions and techniques for mouse embryonic stem cell derivation and culture," v *Pluripotent Stem Cells,* str. 85-115, 2013.

[99] J. Corcoran, B. Shroot , J. Pizzey a M. Maden, „The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia," *Journal of Cell Science,* č. 113, str. 2567-2574, 2000.

[100] A. Fraichard, O. Chassande, G. Bilbaut, C. Dehay, P. Savatier a J. Samarut, „In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons," *Journal of Cell Science,* č. 108, str. 3181-3188, 1995.

[101] X. Wang a P. Yang, „In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method.," *Journal of Visualized Experiments,* č. 17, str. e825, 2008.

[102] Q.-L. Ying, M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li a A. Smith, „Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture," *Nature,* sv. 21, č. 2, str. 183-186, 2003.

[103] J. Xu, H. Wang, T. Liang, X. Cai, X. Rao, Z. Huang a G. Sheng, „Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture," *Molecular Biology Reports,* sv. 39, č. 2, str. 789-795, 2012.

[104] B.-T. Tan, L. Wang, S. Li, Z.-Y. Long, Y.-M. Wu a Y. Liu, „Retinoic acid induced the differentiation of neural stem cells from embryonic spinal cord into functional neurons in vitro," *International Journal of Clinical and Experimental Pathology,* sv. 8, č. 7, str. 8129-8135, 2015.

[105] Y. Okada, T. Shimazaki, G. Sobue a H. Okano, „Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mose embryonic stem cells," *Developmental Biology,* sv. 275, č. 1, str. 124-142, 2004.

[106] V. Tropepe, S. Hitoshi, C. Sirad, T. W. Mak, J. Rossant a D. van der Kooy, „Direct neural fate specification from embryonic stem cells,“ *Neuron,* sv. 30, č. 1, str. 65-78, 2001.

[107] K. Zhang, L. Li, C. Huang, C. Shen, F. Tan, C. Xia, P. Liu, J. Rossant a N. Jing, „Dinstinct functions of BMP4 during different stages of mouse ES cell neural commitment,“ *Development and Stem Cells,* sv. 137, č. 13, str. 2095-2105, 2010.

[108] X. Qi, T. G. Li, J. Hao, J. Wang, H. Simmons, S. Miura, Y. Mishina a G. Q. Zhao, „BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* sv. 101, č. 16, str. 6027-6032, 2004.

[109] Z. He, J.-j. Li, C.-h. Zhen, L.-y. Feng a X.-y. Ding, „Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation,“ *Acta Pharmacologia Sinica,* sv. 27, č. 1, str. 80-90, 2006.

[110] D. Zeineddine, A. A. Hammoud, M. Mortada a H. Boeuf, „The Oct4 protein: more than a magic stemness marker,“ *American Journal of Stem Cells,* sv. 3, č. 2, str. 74-82, 2014.

[111] A. Filipczyk, K. Gkatzis, J. Fu, P. S. Hoppe, H. Lickert, K. Anastassiadis a T. Schroeder, „Biallelic expression of nanog protein in mouse embryonic stem cells,“ *Cell Stem Cell,* sv. 13, č. 1, str. 12-13, 2013.

[112] L. Kan, N. Israsena, Z. Zhang, M. Hu, L.-R. Zhao, A. Jalali, V. Sahni a J. A. Kessler, „Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis,“ *Developmental Biology,* sv. 269, č. 2, str. 580-594, 2004.

[113] T. Fukuda, S. Sugita, R. Inatome a S. Yanagi, „CAMDI, a novel disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) – binding protein, is required for radial migration,“ *Journal of Biological chemistry,* sv. 285, č. 52, str. 40554-40561, 2010.

[114] J. Zhang a J. Jiao, „Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis,“ *BioMed Research International,* str. 1-14, 2015.

[115] N. Shimizu, H. Watanabe, J. Kubota, J. Wu, R. Saito, T. Yokoi, T. Era, T. Iwatsubo, T. Watanabe, S. Nishina, N. Azuma, T. Katada a H. Nishina, „Pax6-5a promotes neuronal diferentiation of murine embryonic stem cells," *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* sv. 32, č. 6, str. 999-1003, 2009.

[116] C. F. Barbas III, D. R. Burton, J. K. Scott a G. J. Silverman, „Quantitation of DNA and RNA," *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007.

[117] B. Matlock, „Assessment of Nucleic Acid Purity," 2015. [Online]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf. [Přístup získán 25. 4. 2019].

[118] „Farlex Partner Medical Dictionary," Farflex, 2012. [Online]. Dostupné z: https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/KO%27d. [Přístup získán 20. 2. 2019].

[119] M. J. Wojzowicz a N. Kee, „BrdU assay for neurogenesis in rodents," *Nature,* sv. 1, č. 3, str. 1399-1405, 2006.