

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie  
organismů



Pavel Zitta

**Molekulární podstata *in vivo* a *in vitro* diferenciacie dopaminergních neuronů u Parkinsonovy choroby**

Molecular basis of *in vivo* and *in vitro* differentiation of dopaminergic neurons in Parkinson's disease

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDR. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2021

## Abstrakt

Parkinsonova choroba (PD) je neurodegenerativní porucha způsobená v důsledku šířícího se procesu ztráty dopaminergních (DA) neuronů v oblasti substantia nigra pars compacta (SNc). DA neurony jsou hlavním zdrojem dopaminu (DA) v centrálním nervovém systému, jehož uvolňování hraje důležitou roli při řízení mnoha mozkových funkcí, včetně řízení nálady a pohybu. Indukce DA neuronů závisí na dvou signalizačních centrech Floor plate (FP) a Isthmickém organizátoru, známým také jako středo-zadní hranice (MHB) mozku. Utváří se signalizační kaskáda zapojující nemalé množství transkripčních faktorů, které prostřednictvím své exprese regulují diferenciaci DA neuronů. Následná stimulace plně maturovaných DA neuronů umožňuje uvolňování dopaminu v pohybových sítích mozkového kmene, což vyvolává pohyb. Nové objevy naznačují, že panuje detailní shoda mezi nejstaršími a dnešními zástupci obratlovců v organizaci DA drah. To může naznačovat, že tyto dráhy, jež mají současní zástupci obratlovců se vyvinuly již před více než 500 mil let.

Klíčová slova: dopaminergní neurony, diferenciaci, Parkinsonova choroba

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder caused by the spreading process of loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). DA neurons are a major source of dopamine (DA) in the central nervous system, the release of which plays an important role in controlling many brain functions, including mood and movement control. The induction of DA neurons depends on two signaling centers floor plate (FP) and an isthmic organizer, also known as the midbrain-hindbrain boundary (MHB) of the brain. A signaling cascade is formed by involving a large number of transcription factors that regulate the differentiation of DA neurons through their expression. Subsequent stimulation of fully mature DA neurons allows the release of dopamine in the locomotor networks of the brainstem, which causes movement. New discoveries suggest that there is a detailed consensus among the oldest and current vertebrate representatives in the organization of DA projections. This may indicate that these pathways, which have current representatives of vertebrates, evolved more than 500 million years ago.

Key words: dopaminergic neurons, differentiation, Parkinson's disease

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDR. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za jeho trpělivost a odborné rady, bez kterých bych se neobešel.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.4. 2021

Pavel Zitta

## Seznam zkratek

AP	anterior-posteriorní strana
ATMS	mesenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně
BMMS	mesenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřene
CNS	centrální nervová soustava
CPG	spinálního centrálního generátoru
DA	dopaminergní
DAT	dopaminový transportér
DV	dorso-ventralní strana
E	embryonální
FP	floor plate
GPe	vnější globus pallidus
GPI	vnitřní globus pallidus
iPS	indukované pluripotentní kmenové
MHB	středo-zadní hranice
MLR	mezencefalická pohybová oblast
MS	multipotentní kmenové
NS	neurální kmenové
PD	parkinsonova choroba
PT	posterior tuberkulum
RA	kyselina retinová
RP	roof plate
RS	retikulo-spinální
SNc / A9	substantia nigra pars compacta
SNr	substantia nigra pars reticula
STN	subthalamické jádro
TH	tyrosin hydroxyláza
Vmat2	ventrikulární membránový transportér
WJMS	wharton's jelly mezenchymální kmenové

# Obsah

ÚVOD .....	1
CÍL PRÁCE .....	2
<b>1. VÝVOJ DOPAMINERGNÍCH NEURONŮ <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. ČASNÉ UTVÁŘENÍ STŘEDNÍHO MOZKU .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. <i>Utváření nervové trubice</i> .....	3
1.1.2. <i>Utváření organizačního centra</i> .....	4
<b>2.1. GENERACE DOPAMINERGNÍCH NEURONŮ .....</b>	<b>6</b>
2.1.1. <i>Specifikace dopaminergních progenitorů</i> .....	6
2.1.2. <i>Neurogeneze, diferenciací a migrace</i> .....	6
2.1.3. <i>Maturace</i> .....	8
<b>2. FAKTORY ZAPOJENÉ DO VÝVOJE DOPAMINERGNÍCH NEURONŮ .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. TRANSKRIPČNÍ FAKTORY ZAPOJENÉ DO DIFERENCIACE .....</b>	<b>10</b>
2.1.1. <i>Transkripční faktory Lmx1a/b</i> .....	10
2.1.2. <i>Transkripční faktory En1/2</i> .....	10
2.1.3. <i>Transkripční faktory Foxa1/2</i> .....	11
2.1.4. <i>Transkripční faktor Nurr1</i> .....	11
2.1.5. <i>Transkripční faktor Pitx3</i> .....	11
<b>2.2. SIGNÁLNÍ DRÁHY V GENERACI DOPAMINERGNÍCH NEURONŮ STŘEDNÍHO MOZKU .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. <i>Signalizační protein Shh</i> .....	12
2.2.2. <i>Signalizační protein Wnt</i> .....	13
<b>3. DIFERENCIACE DOPAMINERGNÍCH NEURONŮ <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. PLURIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY .....</b>	<b>15</b>
3.1.1. <i>Embryonální kmenové buňky</i> .....	15
3.1.1.1. <i>Metoda embryonálních tělísek</i> .....	16
3.1.1.2. <i>Metoda co-kultury</i> .....	16
3.1.1.3. <i>Indukované pluripotentní kmenové buňky</i> .....	16
<b>3.2. PŘÍMÉ PŘEPROGRAMOVÁNÍ SOMATICKÝCH BUNĚK NA DOPAMINERGNÍ NEURONY .....</b>	<b>17</b>
3.2.1. <i>Indukce pomocí transkripčních faktorů</i> .....	17
3.2.2. <i>Indukce pomocí malých molekul</i> .....	18
<b>3.3. MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY .....</b>	<b>18</b>
3.3.1. <i>Porovnání zdrojů MS buněk pro dopaminergní diferenciaci</i> .....	19
3.3.1.1. <i>Kostní dřevina</i> .....	19
3.3.1.2. <i>Wharton's jelly</i> .....	19
3.3.1.3. <i>Tuková tkáň</i> .....	20
<b>4. EVOLUČNÍ ASPEKTY SIGNÁLNÍCH DIFERENČNÍCH DRAH .....</b>	<b>21</b>

<b>4.1.</b>	<b>MEZENECFALICKÁ POHYBOVÁ OBLAST .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.</b>	<b>VZESTUPNÉ PROJEKCE DOPAMINERGNÍ DRÁHY .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3.</b>	<b>SESTUPNÁ PROJEKCE DOPAMINERGNÍ DRÁHY .....</b>	<b>23</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>24</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>25</b>

## Úvod

Dopaminergní (DA) neurony syntetizují neurotransmitter dopamin a tvoří hlavní zdroj dopaminu centrální nervové soustavy. Největší populace těchto buněk se nachází na ventrální straně středního mozku a je rozdělena na tři oblasti, a to v největší míře v Substantia nigra (SN oblast známá jako A9) a ve Ventrální tegmentální oblasti (VTA nebo také A10), oblast s nejmenším výskytem DA neuronů se nazývá Retrorubrální pole (A8) (Fallon & Moore, 1978; Schultz, 1986; Stott & Ang, 2013). Počet DA neuronů ve středním mozku se napříč živočišnými druhy liší. U myši se jedná o cca 25 000 DA neuronů, u krysa je tento počet až 35 000. U dospělého člověka nacházíme mnohonásobně vyšší počty 450 000 – 600 000 DA neuronů (German et al., 1983; Pakkenberg et al., 1991; German & Manaye, 1993). Tyto neurony jsou promítány do předního mozku a tvoří tak nigrostriatální, mezolimbickou a mezokortikální dráhu dopaminergního systému. SN je rozdělena na 3 podskupiny; SN pars compacta (SNc), SN pars lateralis a SN pars reticulata (shrnutí v Hernández & Rodríguez, 2000). Neurony nacházející se v SNc inervují dorsolaterální striatum a caudate putamen, tvoří nigrostriatální dráhu, která je klíčová v kontrole motorických funkcí a pohybu jako součást systému, motorické smyčky bazálních ganglií (shrnutí v Chinta & Andersen, 2005; Prakash & Wurst, 2006; Arenas et al., 2015). Největší inervace vede do striata (Schultz, 1986). Každá oblast DA neuronů je určena pro kontrolu/regulaci specifických funkcí mozku. Se stárnutím se počet DA neuronu ve středním mozku snižuje přibližně o 40% (Fearnley et al., 1991).

Ztráta DA neuronů v SNc vede k neurodegenerativnímu onemocnění zvaném Parkinsonova choroba (Schultz, 1986). Toto neurodegenerativní onemocnění jako první popsal britský lékař James Parkinson v roce 1817 (Horowski et al., 1995). Parkinsonova choroba (PD) je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním. Je způsobena ztrátou DA neuronů v SNc, přičemž musí dojít ke ztrátě přibližně 80% dopaminu ve striatu a 50% nigralních neuronů, pro objevení prvních příznaků choroby (shrnutí v Marsden, 1990). Nedostatek dopaminu se projevuje postupným zhoršováním ovládnutí motorických funkcí. Jeho největším rizikovým faktorem je věk, kdy během 45 – 94 let života dochází téměř až k exponenciálnímu výskytu a postihuje bezmála 2% světové populace starší 60let (Dorsey et al., 2007; Driver et al., 2009).

Můžeme tedy tvrdit, že je zde tedy přímá korelace, kdy s narůstajícím věkem populace se zvyšuje riziko neurodegenerativního onemocnění. Měli bychom si však uvědomit, že nemoci spojené se stárnutím mohou být důsledky biologických procesů, které je třeba pochopit a zkoumat z evolučního hlediska (shrnutí v Rose et al., 2002). Jelikož jedinec s PD ve volné přírodě dlouho nepřežije, nemohl být vyvíjen selektivní tlak na naše předky a tedy nemohli získat odolnost vůči neurodegeneraci (shrnutí v Vernier et al., 2004).

## **Cíl práce**

Cílem práce je popsat základní molekulární mechanismy diferenciacce dopaminergních neuronů v mozku zdravých lidí a lidí trpících Parkinsonovou chorobou. Důraz je kladen na evoluční aspekty signálních diferenciacčních drah a na možnost *in vitro* diferenciacce dopaminergních neuronů z pluripotentních a multipotentních kmenových buněk.

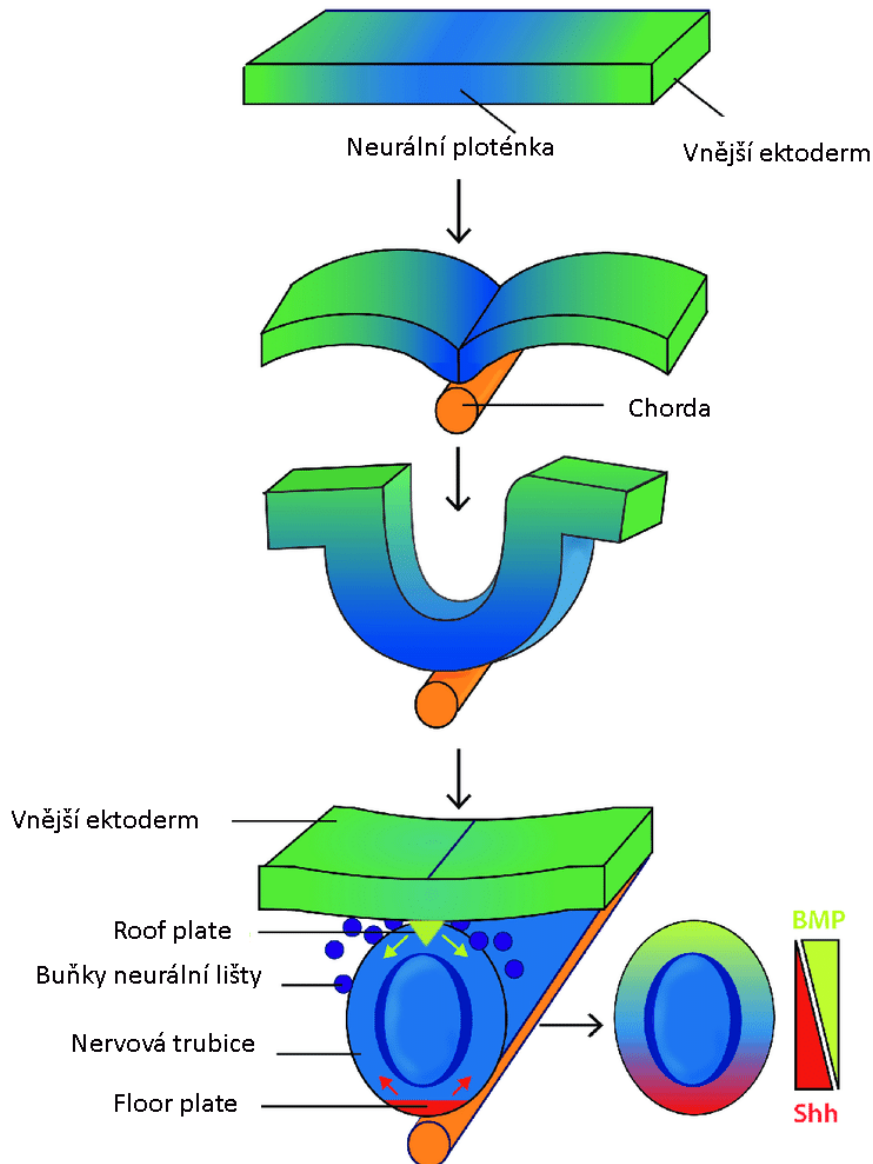
## **1. Vývoj DA neuronů *in vivo***

Vznik DA neuronů zahrnuje několik komplexních kroků jako časného utváření středního mozku, specifikaci mitotických prekurzorů, diferenciaci postmitotických DA neuronů až po maturaci DA neuronů. Během těchto fází dochází ke vzájemné souhře transkripčních faktorů a morfogenů umožňující správný vývoj DA neuronů. Mozek je během toho rozdělován do několika oblastí na přední, střední a zadní část. Mezi střední a zadní částí vzniká organizační centrum zvané Isthmic organizátor. Spolu se signální centrem zvaným Floor plate (FP), uvolňují signální proteiny, které hrají nezastupitelnou roli ve správné regulaci exprese transkripčních faktorů a tím umožňují vznik DA progenitorů.

### **1.1. Časné utváření středního mozku**

#### **1.1.1. Utváření nervové trubice**

Při gastrulaci vajíčka vznikají tři zárodečné listy endoderm, mezoderm a ektoderm. Specifickým typem ektodermu je neuroektoderm, který dává vzniku nervové soustavě, pomocí neuroepithelických buněk. Tyto buňky formují neurální ploténku, jejíž okraje se zvednou a vytvoří neurální valy, které se přeloží, následně spojí a vytvoří tak neurální trubici (viz obr. 1). Neurální trubice se rozvíjí do čtyř domén přední mozek, střední mozek, zadní mozek a mícha. Na ose hřbetní a břišní existují dvě struktury ovlivňující správný vývoj buněk. Roof plate (RP) a Floor plate (FP), umístěné podél hřbetní a ventrální středové linie neurální trubice. Jedná se o signální centra, uvolňující sekreční proteiny Wnt (RP) a Shh (FP). Společně pracují na specifikaci a vzniku různých typů neuronů ve vyvíjejícím se středním mozku, včetně DA neuronů

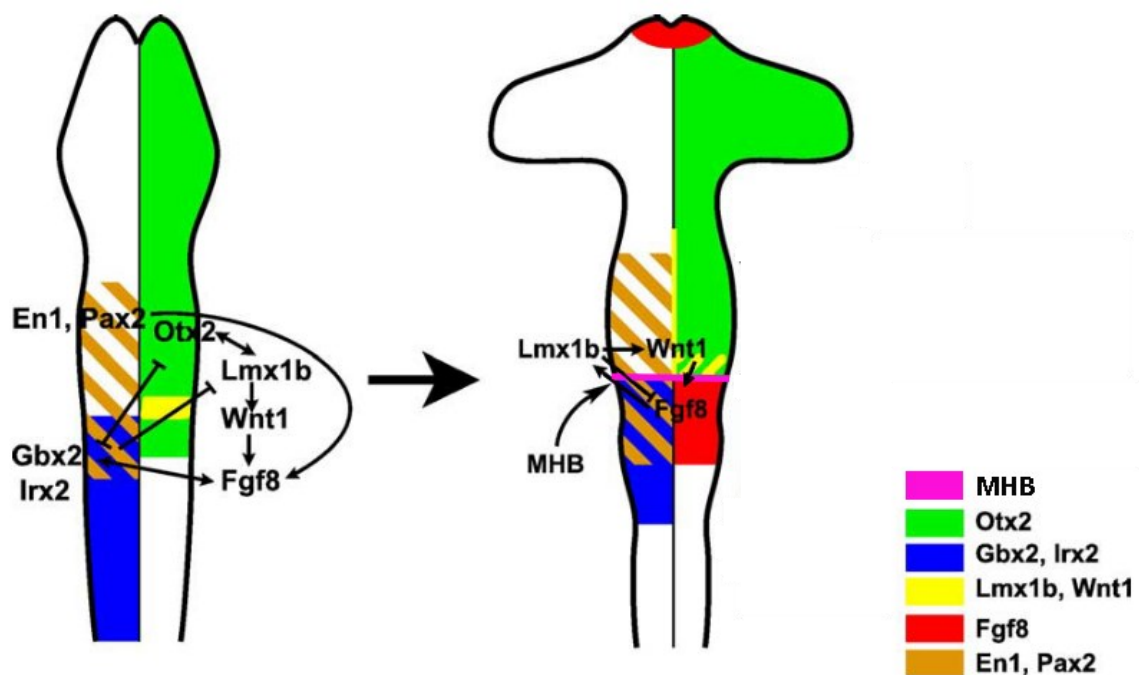


Obrázek 1 | Schéma principu utváření nervové trubice. Okraje neurální ploténky se zvednou a vytvoří neurální valy, které se přeloží a následně spojí, a dojde tak k vytvoření neurální trubice. Červené šipky značí směr šíření Shh, vylučovaného z Floor plate a zelené šipky značí směr inhibitoru BMP vylučovaného z Roof plate. Spolu vzorují nervovou trubici podél její ventro-dorzální osy. (převzato z [Shparberg et al., 2019](#)) – upraveno

### 1.1.2. Utváření organizačního centra

Ve vyvíjející se centrální nervové soustavě (CNS) se mezi oblastmi středního a zadního mozku tvoří středo-zadní hranice (MHB). Signalizační centrum zvané také jako Isthmic organizer, je sekundární organizátor, jehož formace začíná v čase E7.5 ([Wassarman et al., 1997](#)), prostřednictvím koordinované exprese a vzájemné represe Otx2 pro střední mozek, a Gbx2 pro zadní mozek (viz obr. 2) ([Wassarman et al., 1997](#); [Broccoli et al., 1999](#)).

Během časně embryonální fáze se kolem rozhraní Gbx2 a Otx2 aktivují dráhy Wnt, Pax a Fgf8, které se zde podílejí na fungování MHB. Expres transkripčních faktorů domény Pax (Pax2, Pax5) jsou důležité v regulaci a správného utváření středního mozku v ranném stádiu vývoje. Jejich exprese předchází transkripčním faktorům En1 a En2 (Urbánek et al., 1994; Rowitch & McMahon, 1995) a signalizačnímu proteinu Wnt1 (McMahon et al., 1992), který udržuje expresi En genů (Danielian & McMahon, 1996). Otx2 hraje zásadní roli v regulaci exprese genů En1 a En2, delece těchto genů vede ke ztrátě DA neuronů (Millen et al., 1994; Simon et al., 2001). Reguluje též signalizační proteiny Shh a FGF8 (Brodski et al., 2003) a zároveň je třeba k expresi Wnt1 (Rhinn et al., 1998). Signalizační protein Fgf8 je zásadní pro vývoj a správné utváření MHB (Meyers et al., 1998). Během pozdější fáze ranného utváření středního mozku dochází k ustanovení rovnováhy mezi na sebe závislých faktorů (shrnutí v Rhinn & Brand, 2001).



Obrázek 2| Schéma komplexnosti genů vztahující se k organizačnímu centru. Otx2 je exprimován v rostrální nervové trubici a Gbx2 v zadní nervové trubici už od velmi raných stadií vývoje. V důsledku jejich interakce dojde k ustanovení hranice mezi nimi a vznikne tak MHB. Ostatní geny slouží k indukci exprese Fgf8 a zároveň pomáhají v definování oblasti středního mozku. (převzato z Nakamura et al., 2005) – upraveno

## 2.1. Generace dopaminergních neuronů

### 2.1.1. Specifikace dopaminergních progenitorů

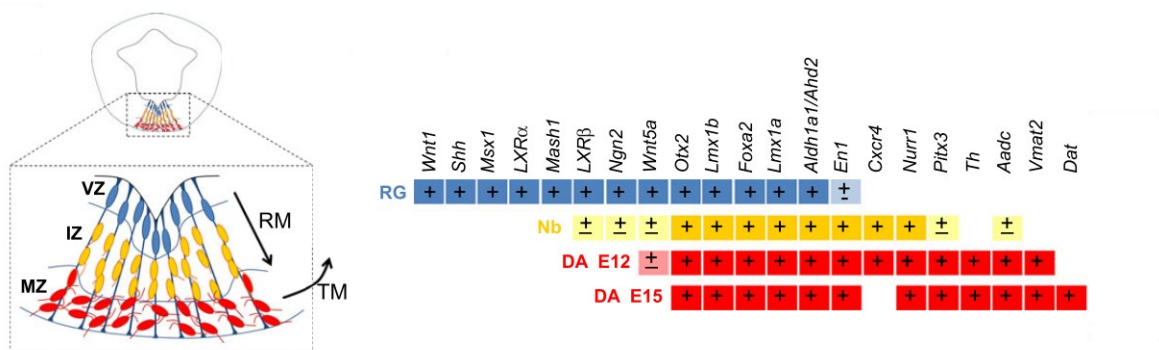
Specifikace buněčných typů závisí na správném fungování organizačních center, podléhající signálům aktivující expresi transkripčních faktorů. Specifikace začíná v čase E9 a končí přibližně v E14 (shrnutí v [Gale & Li, 2008](#)) a spouští se ustanovením antero - posteriorní (AP) a dorzo - ventrální (DV) domény, to je řízeno signály z organizačních center a indukci genové exprese, která rozlišuje zadní a střední mozek ([Vernay et al., 2005](#)). Signalizační centra FP a MHB společně kódují dvě signální molekuly, potřebné pro indukci neuronových prekursorů, podél DV (Shh) a AP (Fgf8) os neurální trubice ([Ye et al., 1998](#)).

Glykoprotein Shh je exprimován chordou, indukuje vznik FP a později je exprimován FP ([Echelard et al., 1993](#); [Ericson et al., 1996](#)). Sekreční protein Fgf8 je exprimován v MHB v zadním mozku a spouští expresi Wnt1, čímž pomáhá formování MHB ([Crossley et al., 1996](#)). Díky vzájemné interakci regulují transkripční faktory Lmx1a/b, Otx2, Ngn2, a Mash1 a ovlivňují tím identitu DA progenitorů ([Smidt et al., 2000](#); [Puelles et al., 2004](#); [Andersson et al., 2006a](#); [Andersson et al., 2006b](#); [Kele et al., 2006](#)). Včetně skupiny transkripčních faktorů Foxa1, Foxa2 (Foxa1/2), pozitivně regulující expresi Lmx1a/b ([Lin et al., 2009](#)). Hrají tím nepostradatelnou roli pro správnou specifikaci neuronů na ventrální straně středního mozku ([Puelles et al., 2004](#); [Bayly et al., 2007](#)). Prekursori DA neuronů se pohybují ventrálně v proliferační fázi na ventrální straně, při diferenciaci se jejich pohyb mění na laterální. Tímto buňky získají DA specifikaci a spouští neurogenezi, při které dochází k post-mitotické diferenciaci.

### 2.1.2. Neurogeneze, diferenciaci a migrace

Neurogeneze probíhá ve ventrikulární zóně FP, kontrolovaná transkripčními faktory Mash1 a Ngn2 ([Andersson et al., 2006a](#); [Kele et al., 2006](#)). Současně je stále udržována exprese genů Otx2, Lmx1a/b a Foxa1/2, kontrolující identitu progenitorů ([Puelles et al., 2004](#); [Andersson et al., 2006a](#); [Ferri et al., 2007](#)). Spolu s tím je antagonisticky potlačovaná exprese Shh signalizací Wnt / beta-*katenin*, přičemž jejich vzájemně vyvážená rovnováha je důležitá pro diferenciaci progenitorů do DA neuronů ([Joksimovic et al., 2009](#); [Tang et al., 2010](#)). Odstranění beta-*katenu*inu z ventrální části středního mozku vede ke ztrátě buněčné polaritativy DA progenitorů. V Důsledku toho dochází k narušení neurogeneze, a migrace DA neuronů do SNc ([Tang et al., 2009](#)). Následně DA progenitory generují postmitotické DA buňky – nezralé DA neurony, které se pomocí Ngn2 dostanou do střední vrstvy FP, kde přibližně v čase E10,5 začínají exprimovat protein Nurr1. Na obr. 3 a 5 je vidět zapojení genů v celkovém průběhu vývoje DA neuronů.

Protein Nurr1 patří do rodiny intracelulárních transkripčních faktorů. Jeho indukce je pravděpodobně závislá na expresi transkripčních faktorů Foxa1 a Foxa2 (Ferri et al., 2007). Částečně určuje fenotyp DA a je důležitý pro regulaci tyrozin hydroxylázy (Th), vezikulárního monoaminového transportéru 2 a dopaminového transportéru (DAT) (Zetterström et al., 1997; Sacchetti et al., 1999; Hermanson et al., 2003; Smits et al., 2003). Myši, kterým chybí gen pro Nurr1 nejsou schopné generovat DA, brání vzniku TH, AADC, VMAT a DAT a umírají krátce po narození (Zetterström et al., 1997; Castillo et al., 1998). Je tedy pravděpodobné, že Nurr1 funguje jako regulátor indukce neurotransmitter-fenotypové identity DA neuronů a podílí se na řízení exprese molekul regulující syntézu DA neuronů (shrnutí v Hegarty et al., 2013).

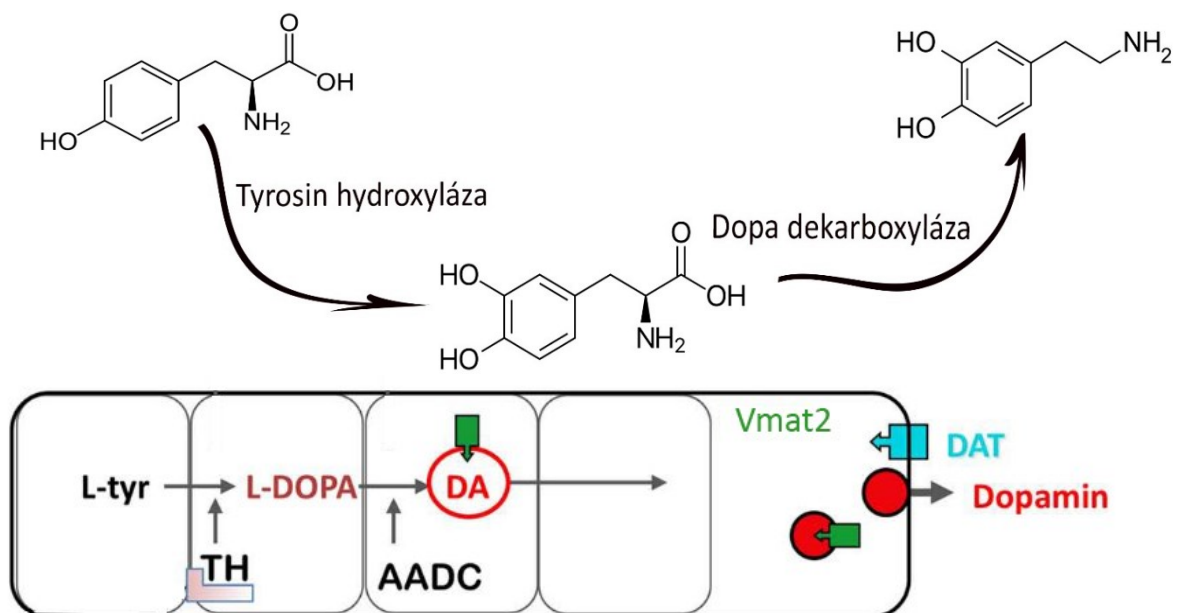


Obrázek 3| Schématické znázornění řezu Floor plate a exprese genů zapojených do průběhu neurogeneze a migrace. Ventriculární zóna (VZ) obsahuje radiální gliové buňky (RG, modré), které procházejí neurogenézí za účelem generování postmitotických neuroblastů (žluté). Ty následně, radiálně migrují střední vrstvou (IZ) a diferencují se na DA neurony (červená) v mantle zóně (MZ). Jak se buňky stávají neurony DA, migrují tangenciálně (TM) do SNc. RG buňky exprimují morfogeny a rané transkripční faktory, z nichž některé jsou také exprimovány v neuroblastech (Nb, žluté) a neuronech DA, což definuje celou linii DA neuronů. (převzato z Arenas et al., 2015) - upraveno

Nezralé, postmitotické DA neurony, ve kterých se nadále udržuje exprese transkripčních faktorů jako Foxa1/2 a Lmx1a/b, migrují radiálně podél vláken radiálních gliových buněk, skrz střední vrstvu (IZ) (Kawano et al., 1995). Během, které migrují do mantle zóny (MZ) a diferencují se na zralé DA neurony, které tangenciálně migrují do oblasti SN (Hanaway et al., 1971). Transkripční faktory z časně neurogeneze a diferenciace, které jsou stále udržovány, regulují aktivitu pozdějších transkripčních faktorů jako jsou Nurr1 a Pitx3. Bylo zjištěno, že exprese Nurr1 u pacientů trpících PD je rapidně snížena (Le et al., 2008). Po migraci prekurzorů do MZ začnou DA neurony exprimovat enzym tyrozin hydroxylázu (TH) a transkripční faktor Pitx3 (shrnutí v Arenas et al., 2015). Exprese Pitx3 probíhá pouze v DA neuronech ve středním mozku a spouští se po zahájení exprese TH okolo času E11,5, což naznačuje, že Pitx3 není zapojen do časného vývoje DA neuronů (Smidt et al., 1997; Smidt et al., 2004).

Pitx3 je vyžadován na počátku diferenciaci při tvorbě SNC, jeho nedostatek vede ke ztrátě DA neuronů v SN (Smidt et al., 2004; Maxwell et al., 2005).

Konečná fáze diferenciaci zahrnuje nejen expresi několika transkripčních faktorů popsaných výše, ale i zahájení exprese enzymů a transportních proteinů pro správné zpětné vychytávání a syntézu DA neuronů (viz obr 4). Včetně enzymů TH a L-amino dekarboxylázy (AADC), a transportních proteinů DAT a vezikulární monoaminový transportér 2 (Vmat2). Syntéza dopaminu je regulována enzymem TH (Blanchard et al., 1994), který ovlivňuje rychlost syntézy dopaminu, a umožňuje z aminokyseliny L-tyrozin, produkci L-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA). Aminokyselina L-DOPA je prekurzor dopaminu, která se dekarboxyluje enzymem AADC a vzniká dopamin.

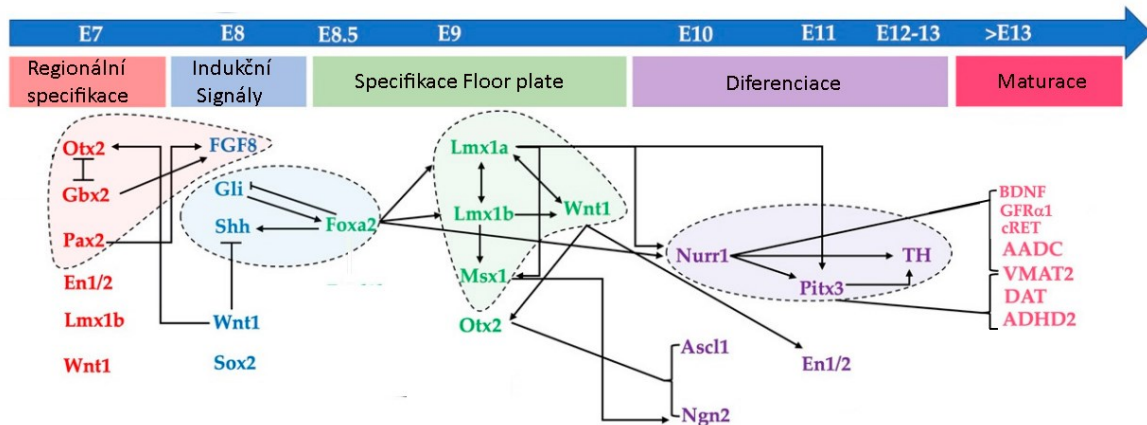


Obrázek 4 | Rovnice metabolické dráhy vzniku dopaminu a jeho cesta přes transportní proteiny ven z membrány. (převzato z Yamamoto & Vernier, 2011) – upraveno

### 2.1.3. Maturace

Zrání a udržování DA neuronů je regulováno několika transkripčními faktory popsány výše. Nicméně sem patří další zatím nezmíněné transkripční faktory jako BDNF. Mezi jehož funkce patří snižování ztráty TH pozitivních buněk, což naznačuje že pravděpodobně působí přímo k udržování DA neuronů, a zároveň tím může pozitivně regulovat fenotyp DA neuronů (Hyman et al., 1991). Jako další transkripční faktor podílející se na zrání a udržování životaschopnosti DA neuronů je GDNF (Lin et al., 1993). Ukázalo se, že BDNF a GDNF se nejen podílí na zrání DA neuronů, ale i na ochraně před

neurotoxinem 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem (MPTP) způsobující symptomy Parkinsonovi choroby (Hyman et al., 1991; Tomac et al., 1995). Na diferenciaci a udržování životaschopnosti DA neuronů se podílí velký počet morfogenů, transkripčních faktorů a trofických faktorů. Níže je schématické znázornění vývoje DA neuronů.



Obrázek 5 | Síť zapojených genů do kontroly postupného vývoje DA neuronů. Indukce, specifikace Floor plate, diferenciaci a zrání fenotypu DA neuronů v různých embryonálních (E) časech. Šípky označují stimulační účinky, zatímco kolmé čáry označují inhibiční účinky. Červeně označené transkripční faktory a molekuly jsou zapojené do utváření AP domény. Modře označené molekuly jsou zapojené do ventrálního vzorování. Zelená oblast seskupuje transkripční faktory podílející se na specifikaci FP středního mozku. Fialově a růžově označené molekuly, trofické a transkripční faktory jsou zapojené do syntetizování dopaminu, určování fenotypu a zrání a životaschopnosti DA neuronů. (převzato z Volpicelli et al., 2020) – upraveno

## 2. Faktory zapojené do vývoje dopaminergních neuronů

### 2.1. Transkripční faktory zapojené do diferenciaci

Do procesu diferenciaci DA neuronů ve středním mozku je zapojeno velké množství transkripčních faktorů, nezbytných pro správnou diferenciaci a dlouhodobého přežití DA neuronů. Patří mezi ně Lmx1a/b, En1/2, Foxa1/2, Nurr1 a Pitx3, včetně mnoha dalších. Jejich vzájemná kombinace navozuje indukci diferenciaci, kontroluje specifikaci a udává DA fenotyp.

#### 2.1.1. Transkripční faktory Lmx1a/b

Lmx1a a Lmx1b jsou časnými determinanty DA progenitorů. Patří do rodiny LIM-homeoboxu. Expresi Lmx1a začíná přibližně v čase E9, je indukována pomocí Lmx1b, jehož exprese začíná již v čase E7,5. Navíc je jejich exprese udržována napříč celým životním cyklem DA neuronů, ale jejich funkční význam v postnatálním životě není dosud zcela pochopen (Smidt et al., 2000; Andersson et al., 2006a). Společně, prostřednictvím exprese Wnt1 a Ngn2 regulují proliferaci, specifikaci a diferenciaci DA progenitorů, Expresi Ngn2 regulují pomocí Hes1, jenž negativně reguluje expresi Ngn2 (Yan et al., 2011). Zároveň exprese Ngn2 je pozitivně regulována expresí Msh1, jehož expresi indukuje právě Lmx1a. Ztráta fungování Lmx1a vede ke ztrátě funkčnosti těchto genů a dochází tím nevyhnutelně ke ztrátě DA neuronů (Andersson et al., 2006a). Inaktivace obou transkripčních faktorů Lmx1a/b vede ke zhoršení aktivity respiračního řetězce, zvýšenému oxidačnímu stresu a poškození mitochondriální DNA s následnou progresivní ztrátou DA neuronů (Doucet-Beaupré et al., 2016).

#### 2.1.2. Transkripční faktory En1/2

Transkripční faktory En1 a En2 se podílejí na vývoji středo-zadního mozku, vytvářením MHB během časné embryogeneze a v pozdější fázi jsou důležité při vývoji a generaci DA neuronů. Jejich exprese se spouští v čase mezi E12 až E14 a je udržována pomocí Wnt1 po celou dobu vývoje (Danielian & McMahon, 1996; Albéri et al., 2004). Nicméně En1 už byl detekován v čase E8 a En2 v E9,5, v tomto čase společně s Wnt1 pomáhají Otx2 a Gbx2 s vytvářením MHB (Davis et al., 1988; Danielian & McMahon, 1996).

En1 je vysoce exprimován všemi DA neurony od začátku jejich diferenciaci až do dospělosti v SNc, zatímco En2 je vysoce exprimován jejich podmnožinou. Při delecí En1/2 zcela chyběly DA neurony v SNc, což naznačuje, že jsou nezbytný pro přežití DA neuronů (Simon et al., 2001). Ztráta DA neuronů, způsobená delecí En1, může být antagonizována právě svým příbuzným rekombinantním proteinem En2, což může potvrzovat hypotézu, že proteiny En1 a E2 jsou vůči sobě biochemicky ekvivalentní a jsou schopné se nahradit (Hanks et al., 1995; Sonnier et al., 2007).

### 2.1.3. Transkripční faktory Foxa1/2

Transkripční faktory Foxa1 a Foxa2 patří do rodiny Fox proteinů. Regulují několik fází vývoje DA neuronů, včetně nezastupitelné role během specifikace a diferenciaci DA progenitorů. Během specifikace regulují rozsah neurogeneze v DA progenitorech, pozitivní regulací exprese Ngn2. Exprese se spouští ve ventrikulární zóně středního mozku v časech E10,5 a E12,5, a jejich exprese se jako u většiny transkripčních faktorů udržuje i v pozdějších fázích DA vývoje (Ferri et al., 2007).

Současně Foxa1/2 regulují expresi několika transkripčních faktorů jako En1, Lmx1a/b, včetně Nurr1 a expresi AADC a TH ve zralých neuronech během časné a pozdní diferenciaci DA neuronů (Ferri et al., 2007; Lin et al., 2009; Pristerà et al., 2015). V důsledku jejich delece dochází k významné ztrátě exprese TH a AADC a celkovému poklesu DA fenotypu v SNc (Stott et al., 2013; Pristerà et al., 2015).

### 2.1.4. Transkripční faktor Nurr1

Nurr1 je transkripční faktor patřící do rodiny jaderných receptorů, je nezbytně důležitý při diferenciaci, maturaci a pro udržování DA neuronů. Zároveň odporuje expresi DA markerů jako DAT, TH, AADC a VMAT2 a určuje tím fenotyp DA neuronů (Sakurada et al., 1999; Sacchetti et al., 2001; Hermanson et al., 2003). Jeho exprese se objevuje v čase E10,5 ve ventrální části středního mozku, kde se později diferencují postmitotické prekurzory na plnohodnotné DA neurony se správným fenotypem (Zetterström et al., 1997).

Nurr1 je též nezbytný také pro terminální diferenciaci, v pozdějších stádiích vývoje DA neuronů, řídí diferenciaci DA prekurzorů. Při jeho deleci, neuroepiteliální buňky přijímají normální ventrální lokalizaci a neuronový fenotyp charakterizovaný expresí transkripčního markeru Pitx3. Nicméně tyto prekurzory však neindukují DA fenotyp, což naznačuje, že Nurr1 je nepostradatelný pro stanovení DA fenotypu, přes expresi genů kódujících proteiny určující DA fenotyp a správnou syntézu dopaminu, jako TH, AADC, DAT a Vmat2. Exprese Nurr1 pokračuje ve zralých DA neuronů i v dospělosti, což dále může naznačovat funkci pro normální fungování zralých DA neuronů (Zetterstrom et al., 1997; Castillo et al., 1998; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Smits et al., 2003).

### 2.1.5. Transkripční faktor Pitx3

Protein Pitx3 je jedním z dalších postmitotických transkripčních faktorů, zapojený do pozdější fáze diferenciaci DA neuronů. Jeho exprese se vyskytuje jeden den po startu exprese Nurr1, tedy relativně pozdě, a probíhá současně s expresí TH v čase E11,5 a je též udržována po zbytek života (Smidt et al.,

1997). Expres Pitx3 je výhradně omezena na oblast SNc, kde je jeho přítomnost vyžadována pro tvorbu subpopulace SNc na počátku terminální diferenciace DA neuronů (Smidt et al., 2004). Pitx3 pravděpodobně reguluje expresi TH, což může klást otázku, zdali je přítomnost Pitx3 sama o sobě dostatečná pro indukci exprese TH (Cazorla et al., 2000). Dále bylo, že Pitx3 se společně s Nurr1 podílí na určení DA fenotypu, prostřednictvím indukce DA markerů VMAT2 a DAT (Hwang et al., 2009).

Nedostatek Pitx3 vedl během terminální diferenciace ke ztrátě nově vznikajících DA neuronů v SNc. Nedostatek Pitx3 také způsobil ztrátu exprese TH, což koreluje s potřebou Pitx3 pro regulaci a indukci exprese TH v DA neuronech a celkové ztráty DA neuronů (Hwang et al., 2003; Maxwell et al., 2005).

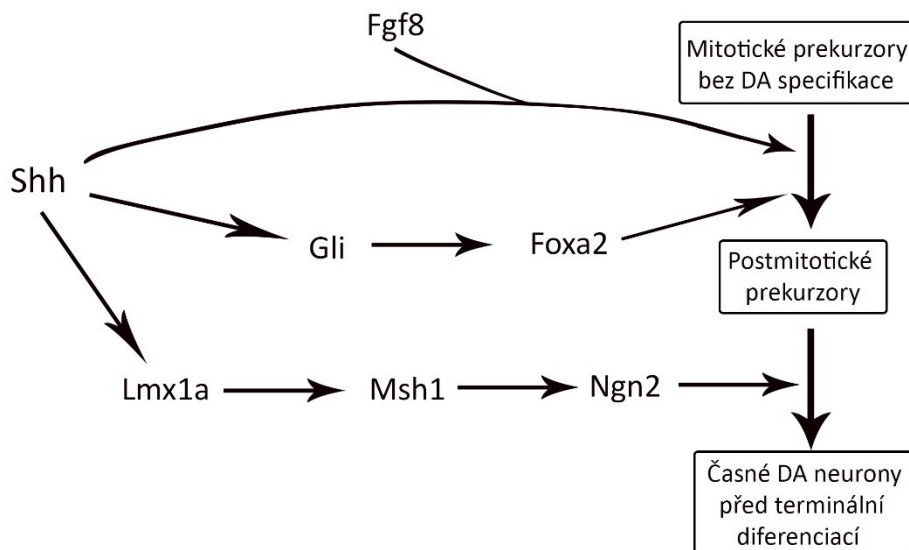
## 2.2. Signální dráhy v generaci dopaminergních neuronů středního mozku

Primární rolí těchto morfogenů je stanovit během neurálního vývoje ventrální identitu ve středním mozku. Jsou zapojeny do kontroly indukce, specifikace a udržování životaschopnosti DA neuronů.

### 2.2.1. Signalizační protein Shh

Sekreční protein Shh je jedním z prvních morfogenů, který se podílí na vývoji DA neuronů. Je exprimován během časně embryogeneze v chordě podél ventrální nervové trubice a později. Na tomto místě hraje roli ve fenotypové specifikaci ventrálních neuronů po celé délce CNS. Indukuje diferenciaci DA neuronů ve středním mozku a je jedním z prvních specifikačních faktorů, jehož expresi je vyžadována pro indukci diferenciace FP. Jeho expresi přetrvává i po tomto indukčním období a později je exprimován v FP (Hynes et al., 1995; Ericson et al., 1996; Miao et al., 1997). Na obr. 6 je vidět schéma signalizační kaskády Shh.

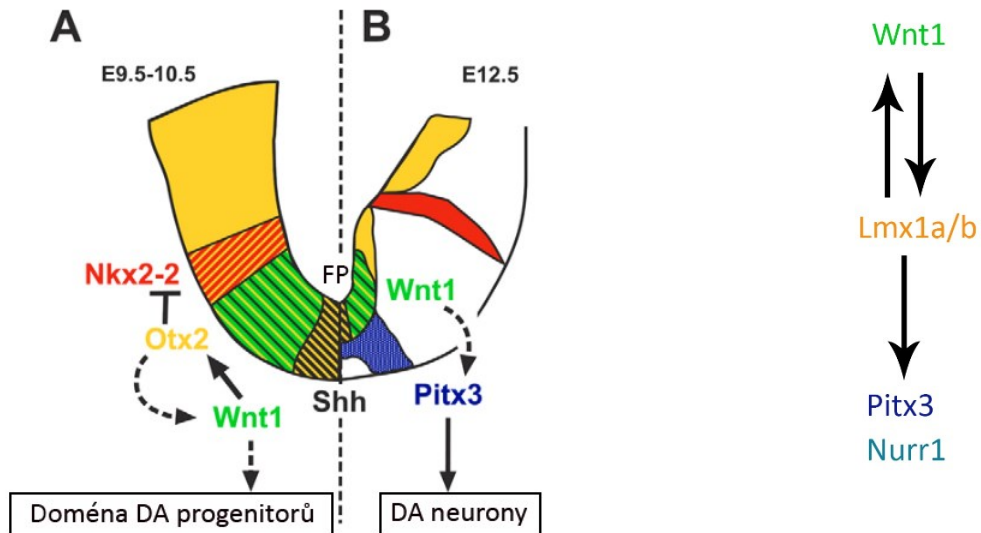
Shh indukuje expresi Lmx1a, která následně indukuje expresi svého efektoru Msh1, který pozitivně reguluje expresi Ngn2 (Andersson et al., 2006a). Současně bylo objeveno, že Shh exprimovaný z FP hraje klíčovou roli při indukci fenotypu DA prostřednictvím indukce exprese transkripčního faktoru Gli, kterým indukuje a reguluje expresi transkripčního faktoru Foxa2 (Sasaki et al., 1997). Dále bylo objeveno, že Shh chrání DA neurony před neurotoxinem MPTP *in vitro* (Miao et al., 1997). Společně s morfogenem Fgf8 stanovuje správné AP a DV vzorování nervové trubice (Ye et al., 1998).



Obrázek 6 | Zapojení Shh do signální kaskády, jenž svojí aktivitou indukuje expresi transkripčních faktorů zapojených do vývoje DA neuronů.

### 2.2.2. Signální protein Wnt

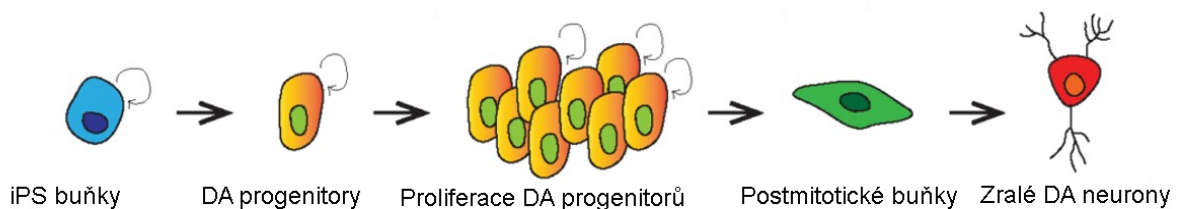
Protoonkogen Wnt1 je exprimován výlučně ve vyvíjejícím se CNS, konkrétně v MHB a dospělých varlatech, start exprese je přibližně v čase E9 a je nadále udržována (Wilkinson et al., 1987; McMahon & Bradley, 1990). Wnt1 je vyžadován pro proliferaci progenitorů, během neurogenese kontroluje molekulární kaskádu, prostřednictvím regulace transkripčních faktorů Otx2 a Nkx2-2, která je nezbytná k vytvoření domény DA progenitorů v časném embryonálním vývoji. Mimo to podporuje diferenciaci na postmitotické prekurzory a následně se podílí na signální kaskádě terminální diferenciaci a ustanovení DA fenotypu (viz obr. 7) (Castelo-Branco et al., 2003; Prakash et al., 2006). Diferenciaci je regulována prostřednictvím kontroly exprese několika transkripčních faktorů jako je Lmx1a/b, Pitx3 a Nurr1. Bylo zjištěno, že po startu exprese Lmx1a dochází k jakési autoregulaci mezi Wnt1 a Lmx1a (Chung et al., 2009). Odstranění Wnt1 mělo za následek defektní expresi Lmx1a, Nurr1 a Pitx3 a úplnou ztrátu neuronů DA (Prakash et al., 2006; Andersson et al., 2013).



Obrázek 7 | Schématické znázornění průřezu středního mozku FP a překrývajících se expresí Shh (černá) a Wnt1 (zelená). Wnt1 zajišťuje správné ustanovení progenitorové domény a udržení vznikajících postmitotických prekurzorů. Otx2 (žlutý) je v této fázi exprimován v celém mozkovém neuroepitelu, který se překrývá s úzkým pruhem odpovídajícím expresní doméně Nkx2-2 (červená). Protein Otx2 je zase nezbytný pro represi Nkx2-2 na tomto území neurální trubice. B) Wnt1 indukuje expresi Pitx3 a Nurr1 během terminální diferenciace. Plné šipky označují přímé genetické interakce; přerušované šipky označují genetické interakce, které jsou dostatečné pouze pro aktivaci, či represi odpovídajícího genu. (převzato z Prakash et al., 2006) – upraveno

### 3. Diferenciace dopaminergních neuronů *in vitro*

V současné době, kdy se zvyšuje průměrný věk života, se současně s tím zvyšuje pravděpodobnost onemocnění nějakou neurodegenerativní chorobou. V současnosti se odhaduje, že přibližně 2% celkové populace trpí Parkinsonovou chorobou. Je způsobena ztrátou dopaminergních neuronů v SNC. Jako velká naděje v boji proti tomuto onemocnění se jeví možnost generovat DA neurony *in vitro*, například neurální kmenové (NS) buňky jsou možné použít při léčbě PD. Nicméně generace NS buněk je komplikovaná a vyvěrá zde otázka, jak moc je to etické. Jako možnost se tedy jeví využití možnosti přeprogramování somatických buněk jako fibroblastů nebo využití kmenových buněk, včetně embryonálních kmenových (ES) buněk, indukovaných pluripotentních kmenových (iPS) buněk a mezenchymálních kmenových (MS) buněk.



Obrázek 8 | Průběh diferenciace z indukovaných pluripotentních buněk na zralé DA neurony. (převzato z Fedele et al., 2017) - upraveno

Pluripotence je schopnost buněk diferenciovat se, ze všech tří zárodečných vrstev, do různých buněčných typů, včetně DA neuronů. Studium kmenových buněk se zaměřuje na dlouhodobé cíle jako úspěšné odvození pluripotentních kmenových buněk z buněk pacienta. Pluripotentní kmenové buňky mohou vznikat přirozeným vývojem nebo přeprogramováním somatické buňky – fibroblastu (Takahashi et al., 2007). Typickým příkladem pluripotentní buňky jsou ES buňky.

#### 3.1. Pluripotentní kmenové buňky

##### 3.1.1. Embryonální kmenové buňky

Vznikají z totipotentních buněk z vnitřní strany blastocysty (Thomson et al., 1998). Vykazují proliferační i diferenciální schopnost, tudíž je lze efektivně diferenciovat na nepřeberné množství buněčných typů *in vitro*, a tedy i na neurální prekursorové buňky, které vedou ke vzniku neuronových buněk v kultuře (viz obr. 8) (Wernig et al., 2008).

Počáteční přístupy neurální diferenciace byly založeny na přizpůsobování protokolů myších neurálních buněk, k vývoji lidským buňkám. Diferenciace DA neuronů z ES buněk *in vitro* by měla

záviset na indukci stejných transkripčních faktorů, které jsou exprimovány v buňkách CNS *in vivo* (Lee et al., 2000). Existuje několik přístupů pro diferenciaci DA neuronů, mezi dvě hlavní metody se řadí metoda co-kultury a systém embryodních tělísek. V zásadě všechny metody diferenciaci DA neuronů, využívající pluripotentní kmenové buňky primárně sdílejí tři základní diferenciací stádia: neuralizaci, specifikaci a maturaci.

#### **3.1.1.1. Metoda embryodních tělísek**

První představená metoda získávání DA neuronů z myších ES buněk byla založena na generaci embryodního tělíska a selekci buněk pozitivních na nestin (Lee et al., 2000). Metoda, obsahuje několik kroků; indukci neuroepiteliálních buněk v nepřítomnosti růstových faktorů, diferenciaci neuroepiteliálních buněk na progenitory středního mozku za přítomnosti sekrečních proteinů FGF8 a SHH, a následnou diferenciaci progenitorů, prostřednictvím neurotrofních faktorů, na TH pozitivní buňky, schopné uvolňovat dopamin (Ma et al., 2011). Bylo zjištěno, že nadměrná exprese transkripčního faktoru Nurr1, zvyšuje podíl TH pozitivních buněk (Kim et al., 2002).

#### **3.1.1.2. Metoda co-kultury**

Nedlouho poté byla zveřejněna další metoda pro generování DA neuronů. Metoda založená na co-kultuře ES buněk, která neprobíhá v agregátech jako EB systém, ale na monovrstvě stromálních buněk odvozených z kostní dřeně. Při neurální indukci co-kultivační metodou se využívají vyživující stromální buňky MS5 a PA6 spolu s podpůrnými růstovými faktory nebo astrocyty středního mozku (Perrier et al., 2004; Roy et al., 2006). Při absenci exogenního kostního morfogenetického proteinu 4 (BMP4) se ES buňky mohou diferenciovat na neurální prekurzory a neurony (Carpenter et al., 2006). Co-kultura podporuje především vznik neurálních prekurzorů, které mohou být aktivací SHH a FGF8 signálních proteinů diferenciovány na DA neurony (Kawasaki et al., 2000; Yan et al., 2005). Účinnost generování TH-pozitivních neuronů touto metodou je srovnatelná s účinností složitější metodou EB, s nadměrnou expresí Nurr1 (Carpenter et al., 2006).

#### **3.1.1.3. Indukované pluripotentní kmenové buňky**

Navzdory obrovskému potenciálu, který ES buňky nabízejí, ať už ve vývojové biologii nebo transplantační medicíně, naráží zde na odpor části populace v oblasti etiky. Nicméně se v roce 2006 objevilo možné řešení v podobě přeprogramování somatických buněk na tzv. indukované pluripotentní kmenové (iPS) buňky (Takahashi & Yamanaka, 2006). iPS buňky jsou svojí proliferací, morfologií, povrchovými antigeny a genovou expresí podobné ES buňkám (Takahashi et al., 2007). Tvoří tedy stejně jako ES buňky neomezený zdroj, jakéhokoliv typu lidských buněk.

Následně stejně jako u ES buněk probíhá několik vývojových kroků, začínaje vytvořením ektodermu, neurální ploténky, neuroepiteliálních buněk, následným vytvořením FP a stejným mechanismem vytvořeny DA progenitory, které se ve ventrikulární zóně, za přítomnosti ektopických genů, diferencují na postmitotické neurony, které migrují do dalších vrstev a následně se diferencují na zralé DA neurony.

### **3.2. Přímé přeprogramování somatických buněk na dopaminergní neurony**

Další slibný způsob získávání DA neuronů spočívá v přímém přeprogramování fibroblastů na zralé neurony. Pomocí přímé konverze se můžeme chytře vyhnout několika vývojovým krokům. Můžeme tím snížit imunitní reakci a vyhnout se tvořením nádorů. Existuje několik přístupů přímé konverze fibroblastů. Podle jedné studie stačí pouze tři transkripční faktory k vytvoření funkčních indukovaných neuronů, Brn2, Myt1l a Mash1 ([Vierbuchen et al., 2010](#)). Mezi další přístupy přímé konverze fibroblastů na neurony patří ektopická exprese miRNA nebo využití malých molekul ([Victor et al., 2014](#); [Hu et al., 2015](#)). Indukované DA neurony jsou schopné uvolňovat dopamin a stejně jako DA neurony vykazují spontánní elektrickou aktivitu ([Caiazzo et al., 2011](#)).

#### **3.2.1. Indukce pomocí transkripčních faktorů**

Indukce nervových buněk z fibroblastů pomocí transkripčních faktorů spolu s faktory určující identitu DA neuronů Lmx1a a Foxa2 generují funkční DA neurony, aniž by se vrátily do stádia progenitorových buněk ([Pfisterer et al., 2011](#)). Podstatnou úlohou Lmx1a je indukce exprese Msx1, který spolu s Lmx1a pomáhá určit DA identitu ([Andersson et al., 2006a](#)). Do konverze je zapojeno několik dalších transkripčních faktorů jako Ngn2, Sox2, Otx2 a Nurr1. Nicméně nedávná studie naznačuje, že transkripční faktory Ngn2 a Sox2 jsou postradatelné ([Sheng et al., 2012](#)).

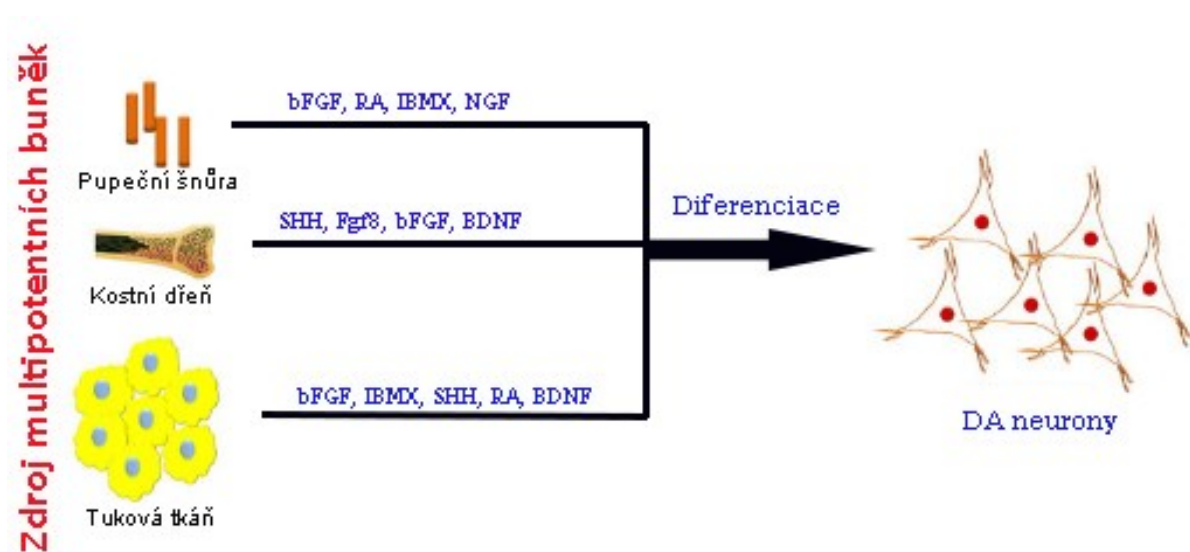
Podstatným faktorem je Nurr1. Stejně jak bylo uvedeno výše, protein Nurr1 spolu s Pitx3 reguluje terminální diferenciaci DA neuronů, řídí diferenciaci postmitotických buněk až k plnohodnotným DA neuronům a navozuje expresi genů TH, VMAT, DAT a dalších, určující finální fenotyp DA neuronů ve středním mozku ([Zetterström et al., 1997](#); [Sacchetti et al., 1999](#); [Hermanson et al., 2003](#); [Smits et al., 2003](#)). Nicméně rizika spojená s genetickými manipulacemi mohou v budoucnu vyústit k omezení využití ([Qin et al., 2020](#)). Bylo objeveno, že účinnost konverze může být zvýšena malými molekulami v kombinaci s minimálním počtem transkripčních faktorů ([Ladewig et al., 2012](#)).

### 3.2.2. Indukce pomocí malých molekul

Alternativní přístup přímého přeprogramování je nahrazení transkripčních molekul malými molekulami, které aktivují endogenní expresi neuronově specifických genů a tím fibroblasty přeprogramují na funkční neurony (Li et al., 2015). Mezi tyto malé molekuly, které jsou schopny indukovat neurální osud buněk patří například CHIR99021, GSK-3 $\beta$ , Repsox, SB-431542 a LDN-193189 (Ladewig et al., 2012; Cheng et al., 2014). Jejich výhoda spočívá v propustnosti a snadné manipulovatelnosti, jelikož účinky jsou reverzibilní a lehce se regulují koncentrací a vzájemnou kombinací. Jejich syntéza je finančně udržitelná a co je podstatné, nejsou schopné navodit imunitní reakci. Indukované DA neurony pomocí metody malých molekul a proteinů definující identitu DA neuronů, vykazovaly neurální morfologii, elektrofyziologické vlastnosti a zároveň exprimovaly DA markery (Qin et al., 2020).

### 3.3. Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové (MS) buňky jsou multipotentní kmenové buňky se schopností samo-obnovy a diferenciací do několika různých buněčných typů, včetně chondrocytů, adipocytů, osteoblastů a neuronů (Bardach & Kelly, 1988). Multipotentní MS buňky se nachází téměř ve všech tkáních, včetně tukové tkáně, placenty, kostní dřeně a mnoho dalších (Pittenger et al., 1999; Zuk et al., 2001; Anker et al., 2004; Zhang et al., 2004). Navíc se ukázalo, že mají protizánětlivé a trofické vlastnosti. Podporují neurogenezi a neuroprotekcii, jsou imunosupresivní a po transplantaci nevytváří nádory (Schwerk et al., 2015). S ohledem na tyto vlastnosti, včetně vysoké etnické přijatelnosti a snadné izolaci jsou považovány za ideální zdroj pro produkci DA neuronů.



Obrázek 9 | Schéma diferenciací MS buněk na DA neurony, indukci různých signálních molekul. Klíč: kyselina retinová (RA), neutrofický faktor (BDNF), 3-isobutyl-1-methyxanthin (IBMX). (převzato z Venkatesh & Sen, 2017) – upraveno

### 3.3.1. Porovnání zdrojů MS buněk pro dopaminergní diferenciaci

Multipotentní MS buňky, jak už bylo uvedeno výše, mohou být izolovány z mnoha možných zdrojů. Hlavním zdrojem pro produkci DA neuronů se uvádí kostní dřev a tuková tkáň (Pittenger et al., 1999; Zuk et al., 2001). Nicméně lze využít i jiné tkáně, včetně zdrojů z perinatální fáze, zahrnující například izolaci z krve pupeční šňůry a plodové vody (Anker et al., 2003; Seshareddy et al., 2008). Několik studií ukázalo, že MS buňky se mohou *in vitro* diferenciovat na DA neurony, schopné exprese DA markerů, elektrofyziologické aktivity a sekrece dopaminu. Úroveň neurální diferenciaci ovšem záleží na původu zdroje MS buněk (Wegmeyer et al., 2013) a tedy i účinnosti generace DA neuronů, a to v rozmezí cca 11% - 71%, (Jiang et al., 2003; Dezawa et al., 2004; Trzaska et al., 2007; Ko et al., 2015). Nicméně při nedostatečné indukci a podpůrného materiálu dochází ke špatné kontrole životaschopnosti a diferenciaci buněk (Bagher et al., 2016). Na obr. 9 je vidět několik zdrojů multipotentních buněk pro možnou diferenciaci.

#### 3.3.1.1. Kostní dřev

Stromální buňky kostní dřev (BMMS) pochází z kosterní tkáň a tvoří velký a snadno dostupný zdroj MS buněk. Lze je snadno izolovat, a zároveň zachovat jejich plasticitu. Mají nízký potenciál k vytváření maligních buněk, a stejně jako většina multipotentních buněk mohou být indukovány k diferenciaci na neurony (shrnutí v Bianco et al., 2001). Kromě toho mají BMMS buňky imuno-modulační vlastnosti a snižují zánět (Tse et al., 2003).

Mezi nejslibnější studie s využitím kostní dřev jako zdroje MS buněk a kombinací SHH a růstových faktorů FGF8 a bFGF lze DA neurony generovat s účinností až 67% (Trzaska et al., 2007). Při dodání *Lmx1a* se fenotyp DA neuronů výrazně zvýšil (Barzilay et al., 2009). Takto diferencované DA neurony z MS buněk vykazovaly expresi DA specifických markerů, včetně *Nurr1*, *TH*, *Pitx3* a *DAT* a byly tak označeny za zralé DA neurony (Trzaska et al., 2009). Tyto výsledky podporují využití BMMS buněk jako zdroj pro *in vitro* generaci DA neuronů.

#### 3.3.1.2. Wharton's jelly

Wharton's jelly je oblast v pupeční šňůře, ze které mohou být izolované MS buňky. Wharton's jelly mezenchymální kmenové (WJMS) buňky jsou známé svým potenciálem diferencovat se na mesodermální a ne-mesodermální buňky, tedy včetně neuronů. Zisk neuronů exprimující neurofilamenta z MS buněk pupeční šňůry bylo cca 87% (Fu et al., 2004). Dále bylo prokázáno, že WJMS buňky mají schopnost diferenciaci na DA neurony, a to s účinností přibližně 12,7% (Fu et al., 2006). Mají vyšší proliferační potenciál a větší *in vitro* expanzní vlastnosti než další MSC odvozené z dospělých tkání jako například z kostní dřev (Wu et al., 2009).

Pupeční šňůra je embryonální tkáň, která spojuje matku a plod. Zároveň se jedná o nekontroverzní zdroj multipotentních buněk s nízkou imunologickou nekompatibilitou. To naznačuje možnost využití WJMS buněk jako potenciálně zajímavé náhrady MS buněk kostní dřeně pro alogenní aplikace (Yoo et al., 2009).

Neurální indukce DA neuronů z Wharton's jelly oblasti probíhala postupnou kultivací s užitím SHH, FGF8 a forsokolinu (Fu et al., 2006; Paldino et al., 2014). Forsokolin zvyšuje intracelulární hladinu cAMP a podporuje vývoj a přežití DA neuronu ve středním mozku (Paldino et al., 2014). Tyto dopaminergní neurony byly poté transplantovány do striata potkanů, u nichž dříve došlo k Parkinsonově chorobě. Výsledky ukázaly, že transplantace *in vitro* diferencovaných HUMSC zmírnila rotaci vyvolanou lézí amfetaminem u parkinsonských potkanů, což tedy můžeme brát jako důkaz pro medicínální využití (Fu et al., 2006). Zajímavé je, že i když mají WJMS buňky a BMMS buňky společný původ, tak mají své jedinečné vlastnosti (shrnutí v Weiss & Troyer, 2006; Paldino et al., 2014).

### **3.3.1.3. Tuková tkáň**

Dalším možným zdrojem MS buněk může být tuková tkáň. Mesenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (ATMS) lze je snadno získat ve velkém počtu s minimálními vedlejšími účinky a úmrtností, zvláště ve srovnání s BMMS buňkami. Kromě toho mohou být ATMS buňky štěpeny do různých autologních míst u pacienta, na rozdíl od WJMS buněk (Marei et al., 2018).

Takto získané multipotentní buňky mají stejně jako ostatní MS buňky schopnost regenerace a multipotentní diferenciaci. Stejně tak jsou ATMS imunopresivní a s nízkým potenciálem pro tvorbu maligních buněk (Schwerk et al., 2015). DA neurony odvozené z ATMS buněk, po inkubaci s růstovými faktory vykazovaly DA specifické markery, a navíc se i významně zvýšila exprese MAP2, PITX3 a TH faktorů (Rad et al., 2017). Nicméně ATMS buňky, nejsou tak dobře prostudovány a je třeba je podrobit dalšímu výzkumu.

## 4. Evoluční aspekty signálních diferenčních drah

Dopamin, jako jeden z hlavních neurotransmiterů, rozhodně hrál klíčovou roli v adaptaci chování zvířat po celou dobu vývoje. DA fenotyp závisí na současné expresi mnoha molekulárních složek skládajícího se z biosyntetických enzymů TH, AADC a transportérů DAT a Vmat2, jak bylo popsáno výše. Většina těchto složek je společná napříč ostatními monoaminovými systémy, jejichž funkční flexibilita a vývojová schopnost poskytovaná duplikací odpovídajících genů umožnila velkou diverzifikaci těchto systémů, což naznačuje společný původ těchto systémů. Tyto rysy přispěly k přizpůsobení mozkových funkcí velmi variabilnímu způsobu života obratlovců (shrnuto v [Yamamoto & Vernier, 2011](#)).

### 4.1. Mezencefalická pohybová oblast

Jedna oblast umístěná ve středním mozku, ze které lze iniciovat pohyb, je mezencefalická pohybová oblast (MLR). Když je oblast MLR aktivována, vytváří svalové synergie, které jsou základem pro pohyb většiny živočichů ([Cabelguen et al., 2003](#)). Zvyšování intenzity stimulace MLR vede k rostoucí aktivaci retikulospinálních (RS) buněk a postupnému zvyšování rychlosti pohybu ([Cabelguen et al., 2003](#)). MLR přijímá projekce z bazálních ganglií, včetně SNc. DA neurony z SNc modulují pohyb pomocí svých vzestupných projekcí do bazálních ganglií, které směřují dolů do MLR a oblasti mozkového kmene ovládající pohyb. Jejich regulační funkce excitability striatálních buněk vede při disfunkci vzestupné DA dráhy k motorickým deficitům a ke vzniku PD ([Ryczko et al., 2013](#)). Nicméně kromě svých vzestupných projekcí, DA neurony vytvářejí také přímé sestupné projekce z SNc, do pohybových sítí mozkového kmene ([Ryczko et al., 2013](#)).

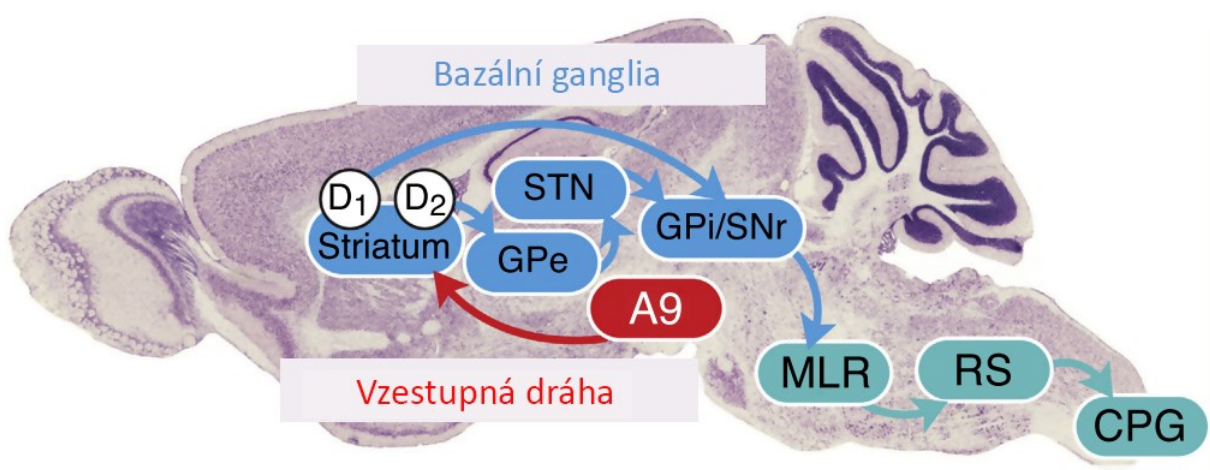
Aktivita DA neuronů, která řídí pohyb je ovládána prostřednictvím několika neurotransmitterových systémů, včetně kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné, acetylcholinu a glutamátu. Cholinergní neurony jsou difúzní populací, směřující dorso-kaudálním směrem k SNc a evokují DA neurony k aktivitě ([Clarke et al., 1987](#); [Xiao et al., 2009](#); [Estakhr et al., 2017](#)). MLR bylo objeveno u všech obratlovců, od mihulí, mloků až přes vyšší zástupce jako ptáků, myši a opic, jedná se o velmi konzervovanou strukturu kontrolující pohyb napříč všemi obratlovci ([Eidelberg et al., 1981](#); [Sholomenko et al., 1991](#); [Cabelguen et al., 2003](#); [Sirota et al., 2000](#); [Lee et al., 2014](#); [Ryczko et al., 2017](#)).

### 4.2. Vzestupné projekce dopaminergní dráhy

Vzestupné projekce DA dráhy by se daly popsat jako nervové cesty, které vedou nahoru z míchy směrem k mozku a přenáší smyslové informace. Existují dvě varianty těchto drah, přímá a nepřímá (viz obr. 10 a 11). První upřednostňuje expresi DA D1 receptorů, prostřednictvím dopaminu, jenž zvyšuje

excitabilitu striálních neuronů, které se přímo promítají do výstupních neuronů bazálních ganglií (Gerfen et al., 1990). Bazální ganglia jsou skupinou subkortikálních jader, mezi které patří striatum, vnější segment globus pallidus (GPe), vnitřní segment globus pallidus (GPI), subthalamické jádro (STN) a SN. Přímá dráha představuje přímou cestu bazálními gangliemi, při které substantia nigra pars reticula (SNr) dostávají přímé projekce ze striata. Výsledkem je následná projekce do MLR, způsobující zmírnění inhibice vysílané z bazálních ganglií a umožnění pohybu (shrnutí v Albin et al., 1989).

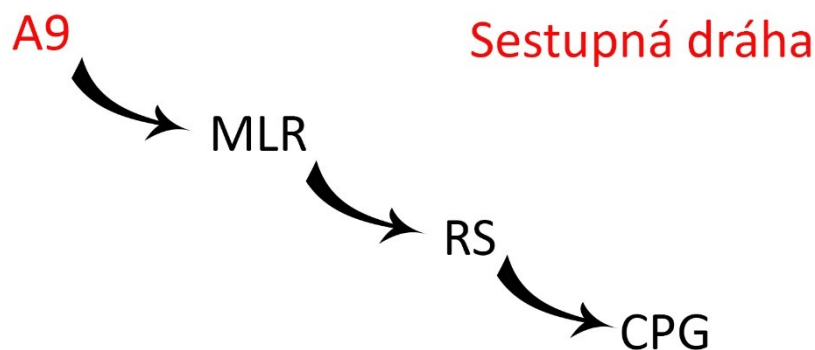
Druhá varianta je nepřímá projekce, která vede skrz neurony bazálních ganglií. Exprimuje se DA D2 receptor, kdy ze striata nedochází k projekci přímo do SNr, ale dráha začíná projekcí ze striata do GPe přes STN, které opět cílí na výstupní úroveň bazálních ganglií vedoucí následně do MLR. Výsledkem je opět snížená inhibice motorických center (shrnutí v Albin et al., 1989). Též shrnutí v (Ryczko & Dubuc, 2017; Fougère et al., 2019). Konektivita bazálních ganglií, včetně všech složek a projekcí je mezi obratlovci, od mihulí až po savce vysoce konzervována. To může naznačovat na evoluční základ bazálních ganglií u současných obratlovců, a tedy položení základů umožňující lokomoci u všech obratlovců (Pombal et al., 1997; Stephenson-Jones et al., 2011). Všechny tyto poznatky samozřejmě vedly k hypotéze, že disfunkce v těchto projekcích vede ke vzniku PD (Kravitz et al., 2010). Nicméně byla objevena další projekce DA dráhy, která má přinejmenším stejný význam jako vzestupné projekce. Jedná se o sestupnou DA dráhu, která obchází bazální ganglia a ústí přímo do MLR (Beckstead et al., 1979).



Obrázek 10 | Schéma vzestupné projekce DA dráhy, začínající ze substantia nigra pars compacta (A9) a končící v mezencefalické pohybové oblasti (MLR). Ve striatu jsou znázorněny D1 a D2 receptory umožňující buď přímou nebo nepřímou dráhu. MLR zahrnuje pedunkulopontinní jádro, ze kterého jsou vysílány projekce do retikulo-spinálního (RS) jádra, které zase vysílá projekce do spinálního centrálního generátoru (CPG) vytvářející vzory pohybu (převzato z Fougère et al., 2019) – upraveno

### 4.3. Sestupná projekce dopaminergní dráhy

Role sestupné dopaminergní dráhy v regulaci pohybové aktivity byla prvně popsána u jednoho z nejstarších zástupců obratlovců, u mihule. Sestupná projekce DA dráhy u mihulí začíná z posterior tuberkula (PT) a ústí v MLR. PT je diencephalická oblast, která obsahuje populaci DA neuronů a je tak považována za homologa k SNc u savců. Poskytuje vstup do oblasti MLR, kde prostřednictvím uvolňovaného dopaminu závislém na receptoru D1 silně způsobuje lokomoci (Ryczko et al., 2013). Omezení funkce D1 receptorů v MLR vedla ke snížené frekvenci pohybu (Ryczko et al., 2017). Tato projekce byla stejně jako u vzestupných drah popsána u několika obratlovců, včetně mihule, mloků, myši a opic (Rolland et al., 2009; Ryczko et al., 2013; Ryczko et al., 2016).



Obrázek 11 | Schéma sestupné projekce DA dráhy, která obchází bazální ganglia a směřuje přímo do MLR, ze kterého stejně jako u vzestupné dráhy následně probíhají projekce do mozkového kmene umožňující pohyb.

Při srovnání vzestupných a sestupných projekcí meso-diencefalických DA neuronů u mihulí, mloků a krys se ukazuje, že podíl vzestupných projekcí se během evoluce zvyšuje. To může vyplývat z rostoucích požadavků způsobených expanzí bazálních ganglií u savců, oproti fylogeneticky starším zástupcům obratlovců (Ryczko et al., 2016). Mihule patří do fylogeneticky nejstarší skupiny obratlovců, která se od evoluční linie savců liší přibližně o 564 milionů let (Kumar & Hedges, 1998). To znamená, že tyto projekce bazálních ganglií, které se nyní vyskytují i u vyšších obratlovců jako ptáků nebo primátů, se pravděpodobně vyvinuly již při začátku vývoje obratlovců. Tuto hypotézu potvrzují již u výše zmíněné studie, které popsaly DA projekce u různých druhů obratlovců (shrnutí v Grillner & Robertson, 2016).

## Závěr

PD je způsobena progresivní ztrátou nigrostriálních DA neuronů nacházející se ve středním mozku. Toto zjištění vedlo k expanzi výzkumu DA neuronů. Během posledních 20 let došlo ve výzkumu DA neuronů k obrovským poznatkům, které vedly k lepšímu pochopení mnoha molekulárních procesů a mechanismů, které jsou zapojeny do jejich vývoje a životaschopnosti, včetně objevení možné konverze z iPS buněk na plně diferencované neurony a stejně tak přímé transformace ze somatických buněk. Nicméně stále většina věcí zůstává neznámá a čeká na objevení. O co víc zajímavé je, že diskutovaná organizace DA neuronů středního mozku se zdá být zachována během celé fylogeneze obratlovců, což může znamenat, že tyto kritické prvky vzniku pohybu jsou napříč všemi obratlovci stejné, což by nám umožnilo využít další modelové systémy různých zástupců z podkmene obratlovců. Jejich studiem bychom mohli získat kompletní představu o vzniku a ztrátě DA neuronů, a následně tyto výsledky využít při léčbě PD.

## Seznam použité literatury

- Albéri, L., Sgadò, P., & Simon, H. H. (2004). Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development (Cambridge, England)*, 131(13), 3229–3236. <https://doi.org/10.1242/dev.01128>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-x](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-x)
- Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F., & Björklund, A. (2006b). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development*, 133(3), 507–516. <https://doi.org/10.1242/dev.02224>
- Andersson, E. R., Saltó, C., Villaescusa, J. C., Cajanek, L., Yang, S., Bryjova, L., Nagy, I. I., Vainio, S. J., Ramirez, C., Bryja, V., & Arenas, E. (2013). Wnt5a cooperates with canonical Wnts to generate midbrain dopaminergic neurons in vivo and in stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(7), 602–610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208524110>
- Andersson, Elisabet, Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., & Ericson, J. (2006a). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell*, 124(2), 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.037>
- Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development (Cambridge)*, 142(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>
- Bagher, Z., Azami, M., Ebrahimi-Barough, S., Mirzadeh, H., Solouk, A., Soleimani, M., Ai, J., Nourani, M. R., & Joghataei, M. T. (2016). Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Motor Neuron-Like Cells on Three-Dimensional Collagen-Grafted Nanofibers. *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2397–2408. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9199-x>
- Bardach, J., & Kelly, K. M. (1988). Role of animal models in experimental studies of craniofacial growth following cleft lip and palate repair. *Cleft Palate Journal*, 25(2), 103–113.
- Barzilay, R., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E., & Offen, D. (2009). Lentiviral delivery of LMX1a enhances dopaminergic phenotype in differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(4), 591–601. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0138>
- Bayly, R. D., Ngo, M., Aglyamova, G. V., & Agarwala, S. (2007). Regulation of ventral midbrain patterning by Hedgehog signaling. *Development*, 134(11), 2115–2124. <https://doi.org/10.1242/dev.02850>
- Beckstead, R. M., Domesick, V. B., & Nauta, W. J. H. (1979). Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Research*, 175(2), 191–217. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)91001-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)91001-1)
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., & Robey, P. G. (2001). Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem cells*, 19(3), 180–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-180>
- Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Vyas, S., Michel, P. P., Javoy-Agid, F., Uhl, G., & Agid, Y. (1994). Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Molecular Brain Research*, 22(1), 29–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90029-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90029-9)
- Broccoli, V., Boncinelli, E., & Wurst, W. (1999). The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature*, 401(6749), 164–168. <https://doi.org/10.1038/43670>
- Brodski, C., Vogt Weisenhorn, D. M., Signore, M., Sillaber, I., Oesterheld, M., Broccoli, V., Acampora, D., Simeone, A., & Wurst, W. (2003). Location and size of dopaminergic and serotonergic cell

- populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *Journal of Neuroscience*, 23(10), 4199–4207. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-10-04199.2003>
- Cabelguen, J. M., Bourcier-Lucas, C., & Dubuc, R. (2003). Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the salamander *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Neuroscience*, 23(6), 2434–2439. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-06-02434.2003>
- Caiazzo, M., Dell’Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T. D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Gustinich, S., Dityatev, A., & Broccoli, V. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), 224–227. <https://doi.org/10.1038/nature10284>
- Carpenter, M., Rao, M. S., Freed, W., & Zeng, X. (2006). Derivation and characterization of neuronal precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells in vitro. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 331, 153–167. <https://doi.org/10.1385/1-59745-046-4:153>
- Cazorla, P., Smidt, M. P., Malley, K. L. O., & Burbach, J. P. H. (2000). A Response Element for the Homeodomain Transcription Factor Ptx3 in the Tyrosine Hydroxylase Gene Promoter. *Journal of Neurochemistry*, 74(5):1829-37. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741829.x>
- Cheng, L., Hu, W., Qiu, B., Zhao, J., Yu, Y., Guan, W., Wang, M., Yang, W., & Pei, G. (2014). Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Research*, 24(6), 665–679. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.32>
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5), 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>
- Chung, S., Leung, A., Han, B. S., Chang, M. Y., Moon, J. I., Kim, C. H., Hong, S., Pruzsak, J., Isacson, O., & Kim, K. S. (2009). Wnt1-lmx1a forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the SHH-FoxA2 pathway. *Cell stem cell*, 5(6), 646–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.015>
- Clarke, P. B. S., Hommer, D. W., Pert, A., & Skirboll, L. R. (1987). Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience*, 23(3), 1011–1019. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90176-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90176-X)
- Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J. Jr., Sibley D.R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250(4986), 1429-32. <https://doi.org/10.1126/science.2147780>
- Crossley, P. H., Martinez, S., & Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380(6569), 66–68. <https://doi.org/10.1038/380066a0>
- Danielian, P. S., & McMahon, A. P. (1996). Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 383(6598), 332–334. <https://doi.org/10.1038/383332a0>
- Davis, C. A., Sandra, E. N., Rossant, J., & Joyner, A. L. (1988). Expression of the homeo box-containing gene En-2 delineates a specific region of the developing mouse brain. *Genes Dev.*, 2(3), 361-71. <https://doi.org/10.1101/gad.2.3.361>
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M., Suzuki, Y., & Ide, C. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 113(12), 1701–1710. <https://doi.org/10.1172/jci20935>

- Driver J.A., Logroscino G., Gaziano J.M., Kurth T. (2009). Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology*, 72(5), 432-8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000341769.50075.bb>
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., Marshall, F. J., Ravina, B. M., Schifitto, G., Siderowf, A., & Tanner, C. M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384 – 386. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>
- Doucet-Beaupré, H., Gilbert, C., Profes, M. S., Chabrat, A., Pacelli, C., Giguère, N., Rioux, V., Charest, J., Deng, Q., Laguna, A., Ericson, J., Perlmann, T., Angg, S. L., Cicchetti, F., Parent, M., Trudeau, L. E., & Lévesque, M. (2016). Lmx1a and Lmx1b regulate mitochondrial functions and survival of adult midbrain dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30), 4387–4396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520387113>
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), 1417–1430. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90627-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90627-3)
- Eidelberg, E., Walden, J. G., & Nguyen, L. H. (1981). Locomotor control in macaque monkeys. *Brain*, 104(4), 647–663. <https://doi.org/10.1093/brain/104.4.647-a>
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, 87(4), 661–673. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81386-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81386-0)
- Fallon, J. H., & Moore, R. Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *Journal of Comparative Neurology*, 180(3), 545–579. <https://doi.org/10.1002/cne.901800310>
- Fedele, S., Collo, G., Behr, K., Bischofberger, J., Müller, S., Kunath, T., Christensen, K., Gündner, A. L., Graf, M., Jagasia, R., & Taylor, V. (2017). Expansion of human midbrain floor plate progenitors from induced pluripotent stem cells increases dopaminergic neuron differentiation potential. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05633-1>
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., & Ang, S. L. (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*, 134(15), 2761–2769. <https://doi.org/10.1242/dev.000141>
- Fougère, M., Flaive, A., Frigon, A., & Ryczko, D. (2019). Descending dopaminergic control of brainstem locomotor circuits. *Current Opinion in Physiology*, 8, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.12.004>
- Fu, Y.-S., Cheng, Y.-C., Lin, M.-Y. A., Cheng, H., Chu, P.-M., Chou, S.-C., Shih, Y.-H., Ko, M.-H., & Sung, M.-S. (2006). Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton’s Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *Stem Cells*, 24(1), 115–124. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0053>
- Fu, Y. S., Shih, Y. T., Cheng, Y. C., & Min, M. Y. (2004). Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *Journal of Biomedical Science*, 11(5), 652–660. <https://doi.org/10.1159/000079678>
- Gale, E., & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*, 1, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-8>
- Garcia-Rill, E., Houser, C. R., Skinner, R. D., Smith, W., & Woodward, D. J. (1987). Locomotion-inducing sites in the vicinity of the pedunculopontine nucleus. *Brain Research Bulletin*, 18(6),

731–738. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90208-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90208-5)

- German, D. C., Schlusselberg, D. S., & Woodward, D. J. (1983). Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: From mouse to man. *Journal of Neural Transmission*, 57(4), 243–254. <https://doi.org/10.1007/BF01248996>
- German, Dwight C., & Manaye, K. F. (1993). Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): Three-dimensional reconstruction in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 331(3), 297–309. <https://doi.org/10.1002/cne.903310302>
- Castillo S.O., Baffi J.S., Palkovits M., Goldstein D.S., Kopin I.J., Witta J., Magnuson M.A., Nikodem V.M. (1998). Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the *Nurr1* gene. *Mol Cell Neurosci*, 11(1-2), 36-46. <https://doi.org/10.1006/mcne.1998.0673>
- González-Hernández, T., & Rodríguez, M. (2000). Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 421(1), 107–135. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000522\)421:1<107::AID-CNE7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000522)421:1<107::AID-CNE7>3.0.CO;2-F)
- G. Hanks M., Wurst W., Anson-Cartwright L., Auerbach A.B., Joyner A.L. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science*, 269(5224), 679-82. <https://doi.org/10.1126/science.7624797>
- Grillner, S., & Robertson, B. (2016). The Basal Ganglia Over 500 Million Years. *Current Biology*, 26(20), R1088–R1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.041>
- Hanaway, J., McConnell, J. A., & Netsky, M. G. (1971). Histogenesis of the substantia nigra, ventral tegmental area of Tsai and interpeduncular nucleus: An autoradiographic study of the mesencephalon in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 142(1), 59–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.901420105>
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M., & O’Keeffe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*, 379(2), 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>
- Hermanson, E., Joseph, B., Castro, D., Lindqvist, E., Aarnisalo, P., Wallén, Å., Benoit, G., Hengerer, B., Olson, L., & Perlmann, T. (2003). *Nurr1* regulates dopamine synthesis and storage in MN9D dopamine cells. *Experimental Cell Research*, 288(2), 324–334. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00216-7)
- Horowski, R., Horowski, L., Phil, C., Vogel, S., Poewe, W., & Kielhorn, F. W. (1995). An essay on wilhelm von humboldt and the shaking palsy: First comprehensive description of parkinson’s disease by a patient. *Neurology*, 45(3), 565–568. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.3.565>
- Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y., Xie, G., Zhao, H., Jin, Y., Tang, B., Yu, Y., Zhao, J., & Pei, G. (2015). Direct Conversion of Normal and Alzheimer’s Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*, 17(2), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.006>
- Hwang, D. Y., Hong, S., Jeong, J. W., Choi, S., Kim, H., Kim, J., & Kim, K. S. (2009). Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of *Pitx3* in the ventral midbrain dopamine neurons. *Journal of neurochemistry*, 111(5), 1202–1212. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06404.x>
- Hwang, D. Y., Ardayfio, P., Kang, U. J., Semina, E. V., & Kim, K. S. (2003). Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of *Pitx3*-deficient aphakia mice. *Molecular Brain Research*, 114(2), 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00162-1](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00162-1)

- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y. A., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P., & Lindsay, R. M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 350(6315), 230–232. <https://doi.org/10.1038/350230a0>
- Hynes, M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-lavigne, M., & Beachy, P. A. (1995). Induction of Midbrain Dopaminergic by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 15(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90062-4)
- in 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*, 22(7), 1338–1345. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H. J., Willemze, R., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 102(4), 1548–1549. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1291>
- Jiang, Y., Henderson, D., Blackstad, M., Chen, A., Miller, R. F., & Verfaillie, C. M. (2003). Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11854–11860. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834196100>
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D. G., & Awatramani, R. B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 12(2), 125–131. <https://doi.org/10.1038/nn.2243>
- Kawano, H., Ohyama, K., Kawamura, K., & Nagatsu, I. (1995). Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Developmental Brain Research*, 86(1), 101–113. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-3806\(95\)00018-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-3806(95)00018-9)
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., & Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 28(1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00083-0)
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., & Ang, S. L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 133(3), 495–505. <https://doi.org/10.1242/dev.02223>
- Kim J.H., Auerbach J.M., Rodríguez-Gómez J.A., Velasco I., Gavin D., Lumelsky N., Lee S.H., Nguyen J., Sánchez-Pernaute R., Bankiewicz K., McKay R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418(6893), 50–6. <https://doi.org/10.1038/nature00900>
- Ko, T. L., Fu, Y. Y., Shih, Y. H., Lin, Y. H., Ko, M. H., Fu, T. W., Lin, T. Y., Hsiao, H. S., Chu, P. M., & Fu, Y. S. (2015). A high-efficiency induction of dopaminergic cells from human umbilical mesenchymal stem cells for the treatment of hemiparkinsonian rats. *Cell Transplantation*, 24(11), 2251–2262. <https://doi.org/10.3727/096368914X685078>
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kumar, S., & Hedges, S. B. (1998). A molecular timescale for vertebrate development. *Nature*, 392, 917–920. <https://www.nature.com/articles/31927.pdf>
- Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F. J., Koch, P., & Brüstle, O. (2012). Small molecules enable highly efficient neuronal

- conversion of human fibroblasts. *Nature Methods*, 9(6), 575–578.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1972>
- Le, W., Pan, T., Huang, M., Xu, P., Xie, W., Zhu, W., Zhang, X., Deng, H., & Jankovic, J. (2008). Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 273(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.06.007>
- Lee, A. M., Hoy, J. L., Bonci, A., Wilbrecht, L., Stryker, M. P., & Niell, C. M. (2014). Identification of a brainstem circuit regulating visual cortical state in parallel with locomotion. *Neuron*, 83(2), 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.031>
- Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., & McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 18(6), 675–679. <https://doi.org/10.1038/76536>
- Fearnley J.M., Lees A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114(5), 2283-301. <https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
- Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., Zhu, J., & Du, X. (2015). Short Article Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons Short Article Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Stem Cell*, 17(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.003>
- Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y. E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., Briscoe, J., Whitsett, J. A., Goulding, M., Kaestner, K. H., & Ang, S. L. (2009). Foxa1 and Foxa2 function both upstream of and cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Developmental Biology*, 333(2), 386–396.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.006>
- Ma, L., Liu, Y., & Zhang, S. C. (2011). Directed differentiation of dopamine neurons from human pluripotent stem cells. *Methods in Molecular Biology*, 767(2), 411–418.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_30)
- Marei, H. E. S., El-Gamal, A., Althani, A., Afifi, N., Abd-Elmaksoud, A., Farag, A., Cenciarelli, C., Thomas, C., & Anwarul, H. (2018). Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 936–945. <https://doi.org/10.1002/jcp.25937>
- Marsden, C. D. (1990). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 335(8695), 948–952.  
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91006-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91006-v)
- Maxwell, S. L., Ho, H., Kuehner, E., Zhao, S., & Li, M. (2005). Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol.*, 282, 467–479.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.028>
- McMahon, A., & Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (in & l) Proto-Oncogene Is Required for Development of a Large Region of the Mouse Brain. *Cell*, 62, 1073–1085.
- McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., & McMahon, J. A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1- Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell*, 69(4), 581–595. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90222-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90222-X)
- Meyers, E. N., Lewandoski, M., & Martin, G. R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics*, 18(2), 136–141.  
<https://doi.org/10.1038/ng0298-136>
- Miao, N., Wang, M., Ott, J. A., D'Alessandro, J. S., Woolf, T. M., Bumcrot, D. A., Mahanthappa, N. K., & Pang, K. (1997). Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and

- protects these cells from toxic insult *In vitro*. *The Journal of neuroscience*, 17(15), 5891–5899. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05891.1997>
- Millen, K. J., Wurst, W., Herrup, K., & Joyner, A. L. (1994). Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development*, 120(3), 695–706. <https://doi.org/10.1242/dev.120.3.695>
- Nakamura, H., Katahira, T., Matsunaga, E., & Sato, T. (2005). Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Research Reviews*, 49(2), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.10.005>
- Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H. J. G., Dam, A. M., & Pakkenberg, H. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 54(1), 30–33. <https://doi.org/10.1136/jnnp.54.1.30>
- Paldino, E., Cenciarelli, C., Giampaolo, A., Milazzo, L., Pescatori, M., Hassan, H. J., & Casalbore, P. (2014). Induction of Dopaminergic Neurons From Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell by Forskolin. *Journal of Cellular Physiology*, 229(2), 232–244. <https://doi.org/10.1002/jcp.24442>
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., & Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12543–12548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404700101>
- Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., & Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10343–10348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105135108>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Pombal, M. A., Manira, A. E. L., & Grillner, S. (1997). Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: A combined tracing and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 386(1), 71–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970915\)386:1<71::AID-CNE8>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970915)386:1<71::AID-CNE8>3.0.CO;2-A)
- Prakash, N., & Wurst, W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(2), 187–206. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5387-6>
- Prakash, Nilima, Brodski, C., Naserke, T., Puellas, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D. M. V., Martinez, S., Arenas, E., Simeone, A., & Wurst, W. (2006). A *Wnt1*-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors *in vivo*. *Development*, 133(1), 89–98. <https://doi.org/10.1242/dev.02181>
- Pristerà, A., Lin, W., Kaufmann, A. K., Brimblecombe, K. R., Threlfell, S., Dodson, P. D., Magill, P. J., Fernandes, C., Cragg, S. J., & Ang, S. L. (2015). Transcription factors *FOXA1* and *FOXA2* maintain dopaminergic neuronal properties and control feeding behavior in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 4929–4938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503911112>
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S. L., Wurst, W., & Simeone, A. (2004). *Otx2* regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor

- domains in the ventral midbrain. *Development*, 131(9), 2037–2048.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01107>
- Qin, H., Zhao, A. D., Sun, M. L., Ma, K., & Fu, X. B. (2020). Direct conversion of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells using small molecules and protein factors. *Military Medical Research*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00284-2>
- Rad, A. A., Hasan Heidari, M., Aliaghaei, A., Eskandarian Broujeni, M., Shojaei, A., Abbaszadeh, H. A., Shaerzadeh, F., & Sadeghi, Y. (2017). In vitro differentiation of adipose derived stem cells into functional dopaminergic neurons. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(2), 595–605.  
<https://doi.org/10.13005/bpj/1146>
- Rhinn, M., & Brand, M. (2001). The midbrain-hindbrain boundary organizer. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(1), 34–42. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00171-9)
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Meur, M. Le, & Ang, S. L. (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development*, 125(5), 845–856.
- Rolland, A. S., Tandé, D., Herrero, M. T., Luquin, M. R., Vazquez-Claverie, M., Karachi, C., Hirsch, E. C., & François, C. (2009). Evidence for a dopaminergic innervation of the pedunculopontine nucleus in monkeys, and its drastic reduction after MPTP intoxication. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1321–1329. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06220.x>
- Rose, M. R., Mueller, L. D., & Long, A. D. (2002). Pharmacology, genomics, and the evolutionary biology of ageing. *Free Radical Research*, 36(12), 1293–1297.  
<https://doi.org/10.1080/1071576021000016535>
- Rowitch, D. H., & McMahon, A. P. (1995). Pax-2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mechanisms of Development*, 52(1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(95\)00380-J](https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00380-J)
- Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., & Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature Medicine*, 12(11), 1259–1268.  
<https://doi.org/10.1038/nm1495>
- Ryczko, D., Cone, J. J., Alpert, M. H., Goetz, L., Auclair, F., Dubé, C., Parent, M., Roitman, M. F., Alford, S., & Dubuc, R. (2016). A descending dopamine pathway conserved from basal vertebrates to mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(17), 2440–2449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600684113>
- Ryczko, D., & Dubuc, R. (2017). Dopamine and the brainstem locomotor networks: From lamprey to human. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00295>
- Ryczko, D., Grätsch, S., Auclair, F., Dubé, C., Bergeron, S., Alpert, M. H., Cone, J. J., Roitman, M. F., Alford, S., & Dubuc, R. (2013). Forebrain dopamine neurons project down to a brainstem region controlling locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 3235–3242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301125110>
- Ryczko, D., Grätsch, S., Schläger, L., Keuyalian, A., Boukhatem, Z., Garcia, C., Auclair, F., Buschges, A., & Dubuc, R. (2017). Nigral glutamatergic neurons control the speed of locomotion. *Journal of Neuroscience*, 37(40), 9759–9770. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1810-17.2017>
- Sacchetti, P., Brownschidle, L. A., Granneman, J. G., & Bannon, M. J. (1999). Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Molecular Brain Research*, 74(1–2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00275-2)
- Sacchetti, P., Mitchell, T. R., Granneman, J. G., & Bannon, M. J. (2001). Nurr1 enhances transcription

- of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *Journal of Neurochemistry* 76(5), 1565–1572. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00181.x>
- Sakurada, K., Ohshima-sakurada, M., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (1999). Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, 126(17), 4017–4026.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 $\beta$  floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*, 124(7), 1313–1322.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Burbach, J. P. H., & Conneely, O. M. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 4013–4018. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4013>
- Schultz, W. (1986). Responses of midbrain dopamine neurons to behavioral trigger stimuli in the monkey. *Journal of Neurophysiology*, 56(5), 1439–1461. <https://doi.org/10.1152/jn.1986.56.5.1439>
- Schwerk, A., Altschüler, J., Roch, M., Gossen, M., Winter, C., Berg, J., Kurtz, A., Akyüz, L., & Steiner, B. (2015). Adipose-derived human mesenchymal stem cells induce long-term neurogenic and anti-inflammatory effects and improve cognitive but not motor performance in a rat model of Parkinson's disease. *Regenerative Medicine*, 10(4), 431–446. <https://doi.org/10.2217/rme.15.17>
- Seshareddy, K., Troyer, D., & Weiss, M. L. (2008). Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton's Jelly of Umbilical Cord. *Methods in Cell Biology*, 86(08), 101–119. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)00006-X)
- Sheng, C., Zheng, Q., Wu, J., Xu, Z., Sang, L., Wang, L., Guo, C., Zhu, W., Tong, M., Liu, L., Li, W., Liu, Z. H., Zhao, X. Y., Wang, L., Chen, Z., & Zhou, Q. (2012). Generation of dopaminergic neurons directly from mouse fibroblasts and fibroblast-derived neural progenitors. *Cell Research*, 22(4), 769–772. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.32>
- Sholomenko, G. N., Funk, G. D., & Steeves, J. D. (1991). Avian locomotion activated by brainstem infusion of neurotransmitter agonists and antagonists - II.  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Experimental Brain Research*, 85(3), 674–681. <https://doi.org/10.1007/BF00231753>
- Shparberg, R. A., Glover, H. J., & Morris, M. B. (2019). Modeling Mammalian Commitment to the Neural Lineage Using Embryos and Embryonic Stem Cells. *Frontiers in physiology*, 10, 705. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00705>
- Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D., & O'Leary, D. D. M. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *Journal of Neuroscience*, 21(9), 3126–3134. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-09-03126.2001>
- Sirota, M. G., Di Prisco, G. V., & Dubuc, R. (2000). Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *European Journal of Neuroscience*, 12(11), 4081–4092. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00301.x>
- Smidt, M. P., van Schaick, H. S., Lanctôt, C., Tremblay, J. J., Cox, J. J., van der Kleij, A. A., Wolterink, G., Drouin, J., & Burbach, J. P. (1997). A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13305–13310. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13305>
- Smidt, M. P., Asbreuk, C. H. J., Cox, J. J., Chen, H., Johnson, R. L., & Burbach, J. P. H. (2000). A second

- independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nature Neuroscience*, 3(4), 337–341. <https://doi.org/10.1038/73902>
- Smidt, M. P., Smits, S. M., Bouwmeester, H., & Hamers, F. P. T. (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene *Pitx3*. *Development*, 131(5), 1145–1155. <https://doi.org/10.1242/dev.01022>
- Smits, S. M., Ponnio, T., Conneely, O. M., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2003). Involvement of *Nurr1* in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 18(7), 1731–1738. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02885.x>
- Sonnier, L., Pen, L., Hartmann, A., Bizot, J., Trovero, F., & Krebs, M. (2007). Progressive Loss of Dopaminergic Neurons in the Ventral Midbrain of Adult Mice Heterozygote for *Engrailed1*. *Journal of Neuroscience*, 27(5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4583-06.2007>
- Stephenson-Jones, M., Samuelsson, E., Ericsson, J., Robertson, B., & Grillner, S. (2011). Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Current Biology*, 21(13), 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.001>
- Stott, S. R.W., & Ang, S. L. (2013). The Generation of Midbrain Dopaminergic Neurons. *Comprehensive Developmental Neuroscience: Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*, 1, 435–453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397265-1.00099-X>
- Stott, S. R., Metzakopian, E., Lin, W., Kaestner, K. H., Hen, R., & Ang, S. L. (2013). *Foxa1* and *foxa2* are required for the maintenance of dopaminergic properties in ventral midbrain neurons at late embryonic stages. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(18), 8022–8034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4774-12.2013>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Mianzhi Tang, Yasunori Miyamoto, Eric J. Huang; Multiple roles of  $\beta$ -catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons. *Development* 15 June 2009; 136 (12): 2027–2038
- Tang, M., Villaescusa, J. C., Luo, S. X., Guitarte, C., Lei, S., Miyamoto, Y., Taketo, M. M., Arenas, E., & Huang, E. J. (2010). Interactions of Wnt /  $\beta$ -Catenin Signaling and Sonic Hedgehog Regulate the Neurogenesis of Ventral Midbrain Dopamine Neurons, 30(27), 9280–9291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0860-10.2010>
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–7. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.-F. H., Ögren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., & Olson, L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373(6512), 335–339. <https://doi.org/10.1038/373335a0>
- Trzaska, K. A., King, C. C., Li, K. Y., Kuzhikandathil, E. V., Nowycky, M. C., Ye, J. H., & Rameshwar, P. (2009). Brain-derived neurotrophic factor facilitates maturation of mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors to functional neurons. *Journal of Neurochemistry*, 110(3), 1058–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06201.x>

- Trzaska, K. A., Kuzhikandathil, E. V., & Rameshwar, P. (2007). Specification of a Dopaminergic Phenotype from Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 25(11), 2797–2808. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0212>
- Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), 389–397. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9>
- Urbánek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F., & Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5 BSAP. *Cell*, 79(5), 901–912. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90079-5)
- Venkatesh K., Sen D. (2017). Mesenchymal Stem Cells as a Source of Dopaminergic Neurons: A Potential Cell Based Therapy for Parkinson's Disease. *Current Stem Cell Research*, 12(4), 326-347. <https://doi.org/10.2174/1574888x12666161114122059>
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R., & Ang, S. L. (2005). Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *Journal of Neuroscience*, 25(19), 4856–4867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5158-04.2005>
- Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snapyan, M., Wersinger, C., & Sidhu, A. (2004). The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: Insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, 231–249. <https://doi.org/10.1196/annals.1332.015>
- Victor, M. B., Richner, M., Hermansteyne, T. O., Ransdell, J. L., Sobieski, C., Deng, P.-Y., Klyachko, V. A., Nerbonne, J. M., & Yoo, A. S. (2014). Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron*, 84(2), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.016>
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284), 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/nature08797>
- Volpicelli, F., Perrone-Capano, C., Bellenchi, G. C., Colucci-D'Amato, L., & Di Porzio, U. (2020). Molecular regulation in dopaminergic neuron development. Cues to unveil molecular pathogenesis and pharmacological targets of neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21113995>
- Castelo-Branco, G., Wagner, J., Rodriguez, F. J., Kele, J., Sousa, K., Rawal, N., Pasolli, H. A., Fuchs, E., Kitajewski, J., & Arenas, E. (2003). Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 12747–12752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1534900100>
- Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L. R., Martinez, S., & Martin, G. R. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development*, 124(15), 2923–2934.
- Wegmeyer, H., Bröske, A. M., Leddin, M., Kuentzer, K., Nisslbeck, A. K., Hupfeld, J., Wiechmann, K., Kuhlen, J., Von Schwerin, C., Stein, C., Knothe, S., Funk, J., Huss, R., & Neubauer, M. (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells and Development*, 22(19), 2606–2618. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0016>
- Weiss, M. L., & Troyer, D. L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews*, 2(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>
- Wernig, M., Zhao, J. P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton,

- M., Isacson, O., & Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5856–5861. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801677105>
- Wilkinson, D. G., Bailes, J. A., McMahon, A. P., & Hill, M. (1987). Expression of the Proto-Oncogene M-1 Is Restricted to Specific Neural Cells in the Developing Mouse Embryo. *Cell*, 50(1), 79–88.
- Wu, L. F., Wang, N. N., Liu, Y. S., & Wei, X. (2009). Differentiation of wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part A*, 15(10), 2865–2873. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0579>
- Xiao, C., Nashmi, R., McKinney, S., Cai, H., McIntosh, J. M., & Lester, H. A. (2009). Chronic nicotine selectively enhances  $\alpha 4\beta 2^*$  nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal dopamine pathway. *Journal of Neuroscience*, 29(40), 12428–12439. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2939-09.2009>
- Yamamoto, K., & Vernier, P. (2011). The evolution of dopamine systems in chordates. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 21. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00021>
- Yan, C. H., Levesque, M., Claxton, S., Johnson, R. L., & Ang, S. L. (2011). Lmx1a and Lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *Journal of Neuroscience*, 31(35), 12413–12425. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1077-11.2011>
- Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E. D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R. A., Thomson, J. A., & Zhang, S.-C. (2005). Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 23(6), 781–790. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0365>
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L. R., Hynes, M. A., & Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 93(5), 755–766. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81437-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81437-3)
- Yoo, K. H., Jang, I. K., Lee, M. W., Kim, H. E., Yang, M. S., Eom, Y., Lee, J. E., Kim, Y. J., Yang, S. K., Jung, H. L., Sung, K. W., Kim, C. W., & Koo, H. H. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular Immunology*, 259(2), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.06.010>
- Zetterström, R. H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B. J., Olson, L., & Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*, 276(5310), 248–250. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.248>
- Zhang, Y., Li, C., Jiang, X., Zhang, S., Wu, Y., Liu, B., Tang, P., & Mao, N. (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental Hematology*, 32(7), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.04.001>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>