

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Martin Zelený

Metody izolace jednotlivých subpopulací neurálních kmenových buněk

Methods of isolation of individual subpopulations of neural stem cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Martina Zíková, CSc.

Praha, 2022

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, 3.4.2022

Martin Zelený

Poděkování

Rád bych poděkoval především své školitelce Mgr. Martině Zikové, CSc, za trpělivost, vstřícnost a rady při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat všem blízkým a své přítelkyni, za jejich podporu a pomoc.

Abstrakt:

Kmenové buňky mají obrovský léčebný potenciál, no zatím nejsou prozkoumané dost na to, aby se dali využít v klinické praxi. Proto je důležitý jejich další výzkum. Jedním z typů kmenových buněk jsou neurální kmenové buňky, které dávají vzniknout neurálním a gliovým buňkám v mozku. Neurální kmenové buňky jsou v dospělém organismu přítomny na dvou místech, v subventrikulární zóně předního mozku a v subgranulární zóně hipokampu. Neurální kmenové buňky nejsou jedním specifickým typem buněk, ale skupinou různých subpopulací s odlišnou genovou expresí. V mé bakalářské práci jsem se zaměřil na metody, které se používají na výzkum těchto subpopulací, a to konkrétně na jejich izolaci a charakterizaci jejich exprese.

Klíčové slova: neurální kmenové buňky, neurogení zóny, molekulární markery

Abstract:

Stem cells have huge medical potential, but they are not explored enough for the use in medicine yet. Because of that, their further research is important. One group of the stem cells are neural stem cells, which are differentiating into the neural and glial cells in the brain. Neural stem cells are present at the two areas in the adult brain, subventricular zone and subgranular zone of hippocampus. Neural stem cells are not one homogenous population of cells, but rather various subpopulations with different cell expression. In my bachelor thesis I described the methods, which are used in the research of neural stem cell subpopulations. Described methods focused mainly on the isolation and gene expression.

Keywords: neural stem cells, neurogenic zones, molecular markers

Seznam zkratek

aNSC – activated neural stem cells, aktivované neurální kmenové buňky

ASC – adult stem cells, dospělé kmenové buňky

BLBP – brain lipid-binding protein

cDNA – komplementární DNA

CFP – cyane fluorescence protein

COP – committed oligodendrocyte precursors, oligodendrocytické prekurzory

Dll1 – Notch ligand Delta-like 1

EGFR – epidermal growth factor

ESC – embryonic stem cells, embryonální kmenové buňky

FACS – fluorescent activated cell sorting

FC – fluid cytometry, průtoková cytometrie

GABA – kyselina γ -aminomáselná

GFAP – glial fibrillary acidic protein

GLAST – glutamate aspartate transporter

gRNA – guide RNA

GSC – germinal stem cells, zárodečné kmenové buňky

HSC – hematopoietic stem cells, hematopoietické kmenové buňky

IpSC – induced pluripotent stem cells, indukované pluripotentní kmenové buňky

Jag1 – Notch ligand Jagged1

NPC – neural progenitor cells, neurální progenitorové buňky

NSC – neural stem cells, neurální kmenové buňky

Oct-4 – octamer-binding transcription factor 4

OPC – oligodendrocyte progenitor cells, oligodendrocytické progenitorové buňky

PROM1 – promin-1

PSC – progenitor stem cells, progenitorové kmenové buňky

qNSC – quiescent neural stem cells, klidové neurální kmenové buňky

SC – stem cells, kmenové buňky

scRNA-seq – single-cell RNA sequencing, sekvenování RNA jedné buňky

SGZ – subgranular zone, subgranulární zóna

SSC – somatic stem cells, somatické kmenové buňky

SSEA-1 – stage-specific antigen 1

SVZ – subventricular zone, subventrikulární zóna

TACs – transient amplifying cells, přechodně dělící se buňky

TGF- β 1 – Transforming growth factor beta 1

V-SVZ – ventricular-subventricular zone, ventrikulární-subventrikulární zóna

Obsah

1	Úvod	1
2	Kmenové buňky	2
2.1	Definice a dělení	2
2.2	Vlastnosti	3
2.3	Typy kmenových buněk	4
2.3.1	Embryonální kmenové buňky	4
2.3.2	Indukované pluripotentní kmenové buňky	6
2.3.3	Dospělé kmenové buňky	6
3	Neurální kmenové buňky	7
3.1	Nika neurálních kmenových buněk	8
3.1.1	Subventrikulární zóna	8
3.1.2	Subgranulární zóna	9
3.2	Klidové a aktivované NSC	9
3.2.1	Vliv niky na aktivaci NSC	10
4	Metody izolace neurálních kmenových buněk	12
4.1	Lineage tracing	12
4.1.1	Exogenní značení	12
4.1.2	DNA transfekce	13
4.1.3	Virová transdukce	14
4.1.4	Cre-lox rekombinace	15
4.1.5	CRISPR-Cas9	15
4.2	Sekvenování RNA jedné buňky	16
4.2.1	RNA sekvenování	16
4.2.2	Sekvenování RNA jedné buňky	16
4.2.3	Principy průtokové cytometrie a FACS	16
5	Buněčné subpopulace NSC	18

5.1	Subventrikulární zóna.....	18
5.1.1	Plasticita NSC při vývoji a stárnutí	18
5.1.2	Regionální a pohlavní rozdíly	19
5.2	Subgranulární zóna	23
6	Závěr.....	25
7	Seznam literatury.....	27

1 Úvod

Výzkum kmenových buněk je velmi důležitý díky možnosti klinického využití, při traumatickém poškození mozku nebo při obnově buněk po radiačním poškození mozku. Praktické využití je zatím vzdálené, a proto jsou velmi podstatné metody jakými lze kmenové buňky podrobně studovat.

V této bakalářské jsem se věnoval metodám izolace neurálních kmenových buněk. Nejdříve jsem popsal, co jsou to kmenové buňky a jak je na základě jejich diferenciacních schopností a původu můžeme dělit. Kmenové buňky se liší od normálních buněk tím, že mají schopnost téměř neomezeného dělení buněk. Ačkoli počet a způsob dělení se může u jednotlivých typů kmenových buněk lišit, těmito způsoby jsou symetrické a asymetrické dělení buněk. Na základě původu kmenových buněk existuje několik typů, například indukované pluripotentní kmenové buňky, dospěle kmenové buňky a embryonální kmenové buňky.

Neurální kmenové buňky dávají vzniknout všem neurálním a gliovým buněčným typům. Neurální kmenové buňky se nacházejí v různém stádiu aktivace. Od téměř nedělicích se klidových, až po zcela aktivované neurální kmenové buňky, s několika mezistupni. Ty se dělí podle rozdílné exprese genů, produkce transkripčních faktorů a rozdílného metabolismu. Neurální kmenové buňky se nacházejí ve svých nikách. Nika je oblast, v které se nacházejí buňky a signální molekuly, zajišťující jejich signalizaci a udržení klidového stavu.

Mezi metody izolace neurálních kmenových buněk patří exogenní značení, DNA transfekce, transdukce a genové metody, jako je Cre-lox, CRISPR-Cas9 a sekvenování jedné buňky. V mé bakalářské práci jsem se věnoval primárně genovým metodám a speciálně sekvenování jedné buňky. Cílem bylo popsat jednotlivé subpopulace neurálních kmenových buněk na základě jejich genetické exprese.

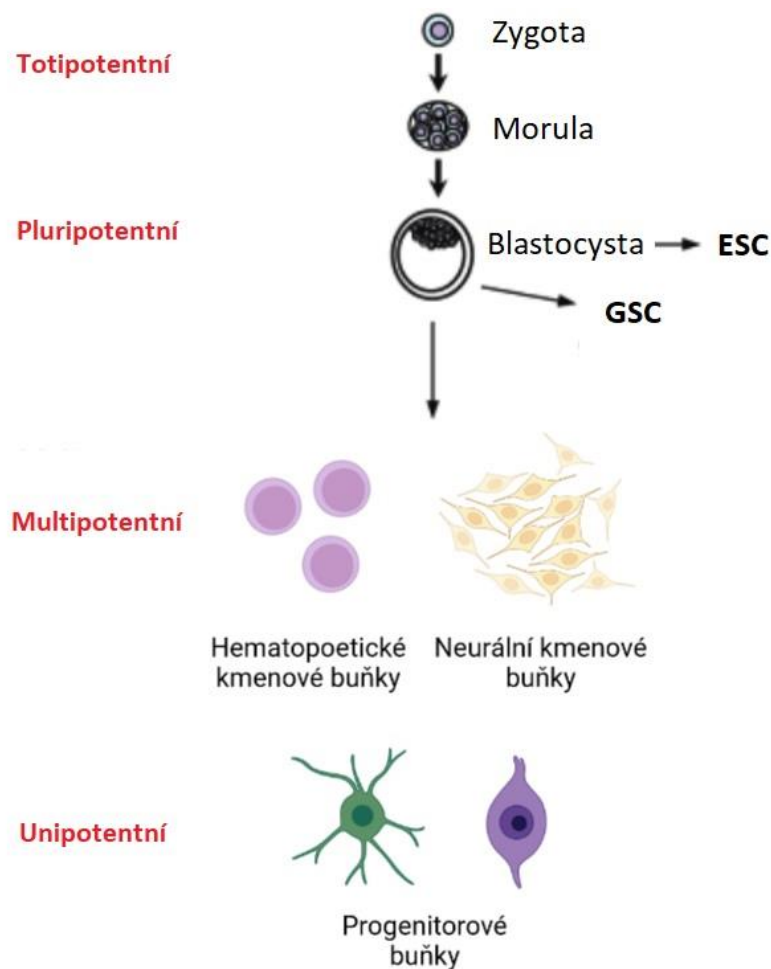
2 Kmenové buňky

2.1 Definice a dělení

Kmenové buňky (stem cells, SC) jsou nediferencované buňky, které jsou schopné udržovat buněčnou linii pomocí sebeobnovy a zároveň jsou schopné diferencovat do určitého buněčného typu (Reya *et al.*, 2001).

Existují dva způsoby, jak můžeme dělit kmenové buňky, podle schopnosti diferenciace a podle původu. Na základě diferenciace se dělí na buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní (Sobhani *et al.*, 2017). A na základě původu se kmenové buňky dělí do tří skupin, na embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESC), zárodečné kmenové buňky (germinal stem cells, GSC) a somatické kmenové buňky (somatic stem cells, SSC) (Soltysova, Altanerova a Altaner, 2005).

Totipotentní buňky jsou schopné vytvořit všechny typy buněk, včetně extraembryonálních buněk placenty. Totipotentní je v rámci organismu jen zygota až 8-buňkové stádium moruly. Další vývojové stádium je blastocysta, která je tvořena embryonálními kmenovými buňkami (embryonic stem cells, ESC) a zárodečnými kmenovými buňkami (germinal stem cells), které jsou pluripotentní. Pluripotentní buňky se dokáží diferencovat na všechny buněčné typy přítomné v dospělém organismu (Czyz *et al.*, 2003). Dospělé kmenové buňky (adult stem cells, ASC) jsou schopné tvořit alespoň jeden buněčný typ. Buňky, které se dokáží diferencovat do více buněčných typů, ale ne tolika jako pluripotentní buňky se nazývají buňky multipotentní, patří mezi ně například hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells, HSC) anebo neurální kmenové buňky (neural stem cells, NSC). Unipotentní buňky jsou nejméně plastické, a proto jsou schopné diferencovat pouze ve specifický buněčný typ, jsou to například progenitorové kmenové buňky (progenitor stem cells, PSC) (Obrázek 1) (Sobhani *et al.*, 2017).



Obrázek 1 Schéma vývoje jedince a změna schopností diferenciacce buněk. Upraveno z (Czyz *et al.*, 2003).

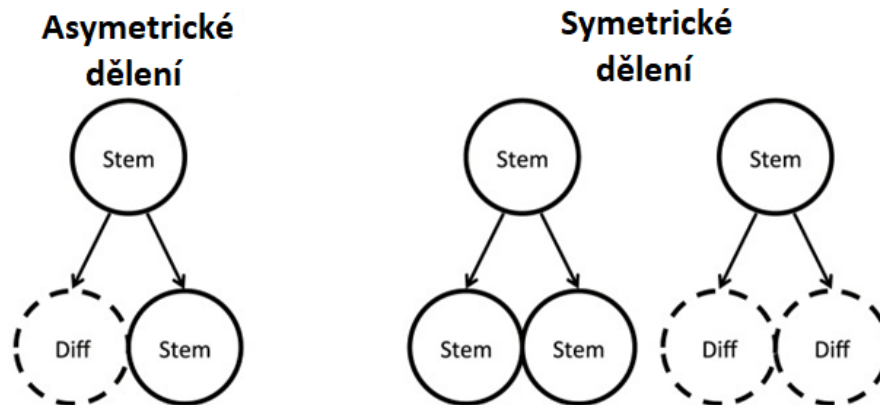
2.2 Vlastnosti

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky, se schopnosti diferencovat v různé buněčné typy. Jsou specifické svou schopností vytvářet další buňky, které následně diferencují. Zároveň jsou schopné zachovat svou kmenovost. Důležitou vlastností pro zachování kmenovosti je schopnost procházet téměř neomezeným počtem buněčných dělení. Kromě produkce různých buněčných typů jsou také zodpovědné za zachování integrity a regenerace dané tkáně (Foster *et al.*, 2002).

Kmenové buňky se mohou dělit různými způsoby. Jedním ze způsobů je asymetrické buněčné dělení, při kterém vznikají dvě dceřiné buňky, jedna diferencující, druhá buňka kmenová s možností dalšího dělení. Diferencující buňka má pevně daný buněčný osud a trvale ztrácí vlastnosti kmenových buněk (Inaba a Yamashita, 2012).

Druhým typem je symetrické buněčné dělení, které umožňuje navýšení počtu kmenových buněk, uplatňující se při poranění, vývoji organismu a zachování populace kmenových buněk.

Také umožňuje vznik dvou diferencovaných dceřiných buněk (Obrázek 2). Kombinace obou způsobů symetrického dělení je alternativou k asymetrickému buněčnému dělení (Morrison a Kimble, 2006; Yang, Plikus a Komarova, 2015).



Obrázek 2 Asymetrické a symetrické dělení kmenových buněk. Stem – kmenová buňka; Diff – diferencovaná buňka. Upraveno z (Shahriyari a Komarova, 2013).

2.3 Typy kmenových buněk

2.3.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky pocházejí z vnitřní buněčné hmoty v blastocystě (Czyz *et al.*, 2003). ESC jsou schopné neomezeného dělení bez diferenciaci, čím zachovávají svou kmenovost (Suda *et al.*, 1987). Jsou to pluripotentní buňky, co znamená, že mohou diferencovat do mnoha buněčných typů odvozených ze všech tří zárodečných listů. Mohou z nich vzniknout i zárodečné kmenové buňky a následně vaječné buňky a spermie. Experiment Bradley *et al.* ukázal, že jsou schopné integrovat se do všech fetálních tkání během vývoje organismu. V experimentu vložili myši ESC do blastocysty druhé myši. Následně pozorovali chimérické pohlavní buňky, které pocházeli z obou organismů (Bradley *et al.*, 1984). Další vlastností embryonálních kmenových buněk je, že jsou klonogenní. To znamená, že z jediné embryonální kmenové buňky může vzniknout kolonie identických buněk, se stejnými vlastnostmi jako původní buňka (Li *et al.*, 2010).

Embryonální kmenové buňky si udržují plný – diploidní, kompletní karyotyp. ESC nemají inaktivovaný X chromozom. V buněčném cyklu ESC chybí G1 fáze. Většinu času se nacházejí v S fázi buněčného cyklu, ve které syntetizují novou DNA. Na rozdíl od diferencovaných somatických buněk nepotřebují vnější stimul k iniciaci replikace DNA. Embryonální kmenové buňky exprimují transkripční faktor Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4), který může

aktivovat nebo inhibovat soubor genů udržující ESC v proliferativním, nediferencovaném stavu. ESC mají na povrchu specifický SSEA-1 antigen (stage-specific antigen 1) (Solter a Knowles, 1978), také mají membránový receptor gp130 (Niwa *et al.*, 1998) a specifickou aktivitu alkalické fosfatázy a telomerázy (Wobus *et al.*, 1984; Armstrong *et al.*, 2000).

Lidské embryonální kmenové buňky byli poprvé získané Thomsonem *et al.* v roce 1998 z blastocysty (Thomson *et al.*, 1998). Lidské embryonální kmenové buňky mají stejné vlastnosti, jako ESC získané z jiných organismů. Těmito vlastnostmi jsou specifické povrchové markery a transkripční faktory, pluripotence, schopnost neomezeného dělení a kompletní karyotyp (Hoffman a Carpenter, 2005). Ale v některých věcech se liší od jiných, například myších embryonálních kmenových buněk, nedají se efektivně množit z jediné buňky, vyžadují jiné podmínky pro růst a mají specifickou buněčnou morfolologii (Thomson *et al.*, 1998). Posléze se ukázalo, že tyto rozdíly byly dané tím, že jednotlivé buněčné kmeny pocházeli z různých vývojových stadií (Nichols a Smith, 2009).

Embryonální kmenové buňky mají experimentální využití v produkci buněk s geneticky sníženou produkcí určitého genu, takzvané knockout buňky v genech, které jsou *in vivo* embryonálně letální. Produkce ESC bez daného genu nám umožňuje zkoumat jeho funkci (Thomas a Capecchi, 1987; Czyz a Wobus, 2001). Dalším experimentálním využitím ESC je výzkum diferenciací buněk. Když jsou kmenové buňky kultivované ve specifických podmínkách, mohou diferencovat na neurální buňky, srdeční buňky, hematopoetické, epitelální, svalové, endodermální nebo chondrogenní buňky (Czyz a Wobus, 2001). Můžeme zkoumat vliv růstových a diferenciacních faktorů, signálních molekul a mezibuněčné hmoty (Braun *et al.*, 1994; Rohwedel *et al.*, 1998).

Potenciální klinické využití předpověděli již Thomson *et al.*, když izolovali první lidské embryonální kmenové buňky (Thomson *et al.*, 1998). V současnosti se ukazuje, že převedení do klinické praxe bude velice složité. Mezi první problémy klinického využití lidských ESC, které se ukázaly patřila jejich kultivace v médiích obsahujících proteiny z jiných organismů, jako je například fetální hovězí sérum. Bylo ukázané, že lidské sérové protilátky imunitně reagují na cizí kultivační médium (Martin *et al.*, 2005). Dalším problémem kultivace s využitím proteinů získaných z cizích organismů je potenciální přítomnost patogenů (Hoffman a Carpenter, 2005). Souvisejícím problémem byla jejich kultivace na podkladě myších embryonálních buněk, která mohla kromě již zmíněných problémů vést k mezibuněčné komunikaci a přenosu xenogenních molekul z myších buněk do lidských (Kubikova *et al.*,

2009). Odpovědí na oba tyto problémy je kultivace buněk v médiu bez buněčného podkladu v přesně definovaných podmínkách s využitím výhradně rekombinačních proteinů a složek purifikovaných z lidského materiálu (Ludwig *et al.*, 2006).

Dalším problémem je histokompatibilita těchto tkání. Na to, abychom mohli vyrobit implantát pro konkrétního člověka, bychom museli použít jeho embryonální kmenové buňky. Řešením tohoto problému je transfer buněčného jádra z pacientových buněk do ESC (Cibelli *et al.*, 2001; Tachibana *et al.*, 2013). Neopomenutelným problémem využití embryonálních kmenových buněk jsou otázky legality a etiky, které jsou s tím spojené (Scott, 2008). Řešením tohoto problému by mohlo být využití kmenových buněk z dospělých jedinců a jejich dediferenciace na indukované pluripotentní kmenové buňky (Takahashi *et al.*, 2007) a následná diferenciaci na požadovaný typ buněk (Li *et al.*, 2016).

2.3.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

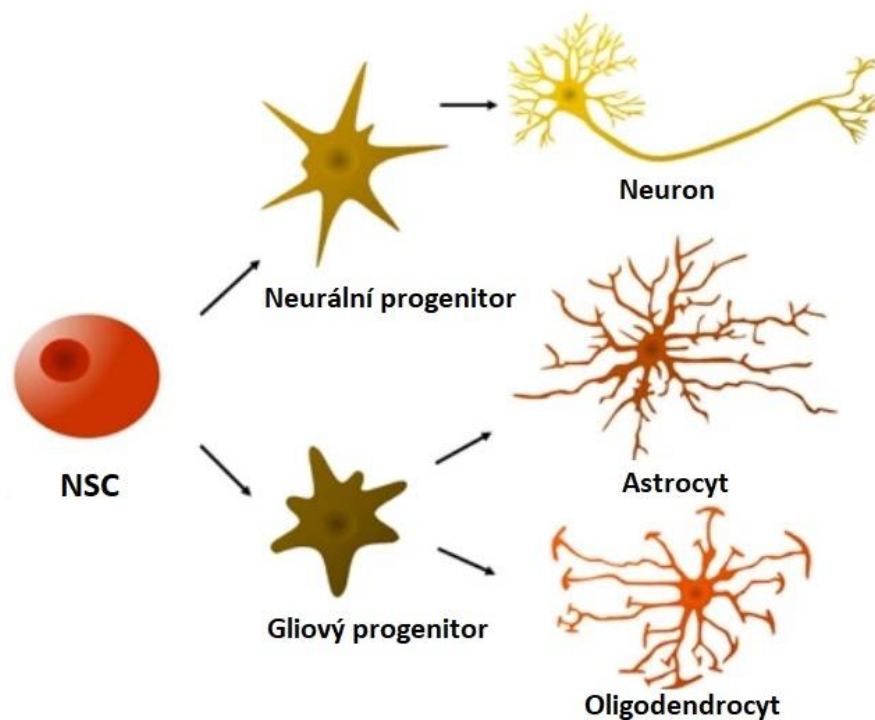
Indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells, IpSC), jsou druhem kmenových buněk, které vznikly typicky dediferencováním dospělé somatické buňky. To se dělá pomocí vystavení čtyřem transkripčním faktorům: OCT4 a SOX2 v kombinaci s KLF4 a MYC nebo NANOG a LIN28. Takto vzniklé buňky získávají schopnosti embryonálních kmenových buněk (Takahashi a Yamanaka, 2006).

2.3.3 Dospělé kmenové buňky

Dospělé kmenové buňky mají důležitou roli v zachování homeostázy dané tkáně. Jsou podporovány okolním mikroprostředím, nazývajícím se nika. Dospělé kmenové buňky bývají multipotentní nebo unipotentní. Jedním z typů dospělých kmenových buněk jsou neurální kmenové buňky (Doetsch *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2002).

3 Neurální kmenové buňky

První buňky nervového systému v embryogenezi jsou neuroepiteliální buňky nervové trubice. Z neuroepiteliálních buněk pak vznikají radiální gliové buňky (Schmechel a Rakic, 1979), ty nejsou multipotentní, dávají vzniknout jenom jednomu konkrétnímu buněčnému typu, buď astorcytům, oligodendrocytům nebo neuronům (Grove *et al.*, 1993). Ne všechny neuroepiteliální buňky se promění na radiální gliové buňky, část z nich si zachová svou multipotentnost i v dospělosti, ty posléze nazýváme neurálními kmenovými buňkami (Rowitch a Kriegstein, 2010). NSC *in vivo* jsou multipotentními buňkami a dávají vzniknout, jak neuronům, tak i gliovým buňkám (Obrázek 3) (Doetsch *et al.*, 1999; Gage, 2000) Gliové progenitorové buňky diferencují na astrocyty a oligodendrocyty (Tang, Yu a Cheng, 2017). *In vitro* za přítomnosti specifických faktorů mohou NSC dávat vzniku i jiným buněčným typům (Mahabadi *et al.*, 2015).



Obrázek 3 Schéma diferenciací neurálních kmenových buněk. Upraveno z (Tang, Yu a Cheng, 2017).

Neurální kmenové buňky se nevyskytují pouze ve vyvíjejícím se mozku, ale i v dospělém mozku všech savců, včetně lidí. Místa kde se NCS v mozku nacházejí jsou specifická, jedním z nich je subventrikulární zóna (subventricular zone, SVZ) předního mozku. Je to nejvíce neurogení oblast, protože obsahuje nejvíce neurálních kmenových buněk, které zajišťují celoživotní obnovu neuronů čichového nervu (Reynolds a Weiss, 1992). Druhou oblastí je

subgranulární zóna (subgranular zone, SGZ) hipokampu v oblasti gyrus dentatus, podílející se zde na buněčné obnově (Eriksson *et al.*, 1998).

3.1 Nika neurálních kmenových buněk

Nika neurálních kmenových buněk definuje zónu, kde se i po embryonálním vývoji zachovává produkce nových buněk nervového systému. Tato neustálá zásoba nových neuronů a gliových buněk dodává během života částečnou plasticitu, i když jen pro určité části mozku (Altman a Bayer, 1990; Corbin, Nery a Fishell, 2001; Ge *et al.*, 2007). Důležité pro zachování niky kmenových buněk jsou mikroenvironmentální podmínky a mezibuněčné interakce, zajišťující rovnováhu mezi klidovým (quiescence) a proliferačním stavem, který vede k tvorbě neurálních nebo gliových buněk (Lee *et al.*, 2012). Takovými nikami jsou subventrikulární zóna předního mozku a subgranulární zóna hipokampu. Mezi molekuly ovlivňující NSC patří neurotransmitery z neuronů přítomných v gyrus dentatus i inervace ze vzdálených neuronů (Young, Taylor a Bordey, 2011).

3.1.1 Subventrikulární zóna

Nika SVZ obsahuje čtyři buněčné typy: neuroblasty, astrocyty SVZ, přechodně progenitorové buňky a ependymální buňky (Gonzalez-Perez, 2012). Ependymální buňky vystylají dutiny centrální nervové soustavy a podílejí se významnou částí na homeostáze a tvorbě mozkomíšního moku (Sawamoto *et al.*, 2006). Neuroblasty se také někdy nazývají buňkami typu A, astrocyty SVZ se nazývají buňkami typu B, ty dávají vzniknout přechodně progenitorovým buňkám typu C, ependymální buňky jsou buňkami typu E. Buňky B jsou klidové buňky, z kterých vznikají aktivně prolifерující buňky C a z nich vznikají progenitorové buňky typu A (Gonzalez-Perez, 2012).

Astrocyty SVZ, tedy buňky typu B pocházejí z radiálních glií (Doetsch *et al.*, 1999). Na rozdíl od radiálních glií mají kratší výběžky, kterými mohou vytvářet spojení a pronikat přes ependymální vrstvu do mozkových komor. Stejně tak jsou v kontaktu s endoteliálními buňkami a buňkami pericytů v cévních stěnách. Předpokládá se, že tyto spoje hrají důležitou roli v aktivaci neurálních kmenových buněk (Shen *et al.*, 2004; Mirzadeh *et al.*, 2008). Buňky typu B jsou charakteristické přítomností GFAP proteinu (glial fibrillary acidic protein) a zároveň jinými charakteristickými vlastnostmi astrocytů (Doetsch *et al.*, 1999).

V experimentu Doetscha a ostatních po odstranění C buněk, A buněk a částí B buněk ze subventrikulární zóny došlo po dvou týdnech k opětovnému doplnění chybějících buněk (Doetsch *et al.*, 1999). Po odstranění všech dělicích se buněk SVZ, zůstaly pouze klidové B buňky, následně došlo k jejich aktivaci a vzniku nových C buněk a z nich dále A buněk. V buněčné kultuře byl pro vznik buněk A nutný mezibuněčný kontakt mezi buňkami B a C (Lim a Alvarez-buylla, 1999). Neurální kmenové buňky SVZ udržují svou niku pomocí symetrického dělení, kdy okolo 20% buněk zůstává kmenovými buňkami a 80% buněk se diferencuje (Obernier *et al.*, 2018).

3.1.2 Subgranulární zóna

Nika subgranulární zóny se nachází v gyrus dentatus hipokampu a je menší než nika subventrikulární zóny. Podobně jako u SVZ, je počáteční kmenovou buňkou buňka s charakteristikami astrocytu. Na rozdíl od astrocytů SVZ si astrocyty SGZ zachovávají dlouhé dendritické výběžky. Dělením astrocytů SGZ vznikají buňky typu D, které jsou obdobou C buněk v SVZ. Nově diferencující D buňky se přemisťují podél dendritických výběžků astrocytů a postupně diferencují v granulární buňky (Seri *et al.*, 2001, 2004).

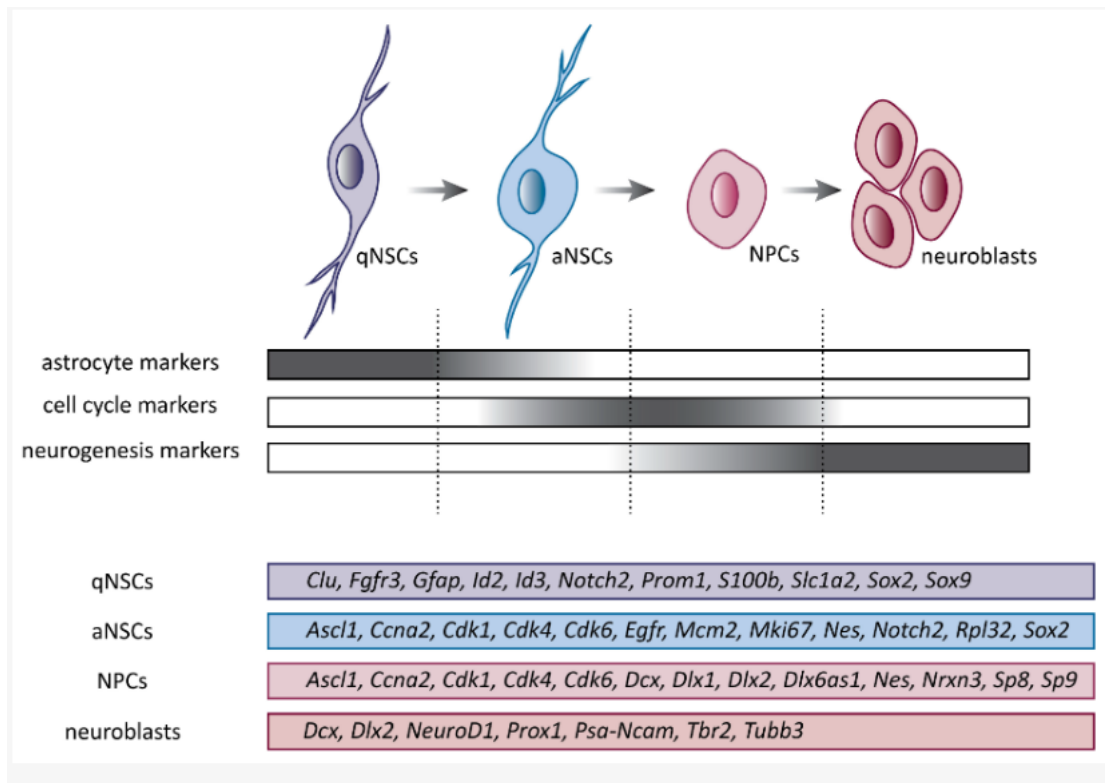
3.2 Klidové a aktivované NSC

Radiální gliové buňky, které se nacházejí v mozkové kůře vyvíjejícího se organismu, jsou silně proliferující buňky. Část z nich se nediferencuje, ale stane se neurálními kmenovými buňkami, které mohou být následně aktivované v dospělém organismu a tvořit interneurony v bulbus olfactorius (Furutachi *et al.*, 2015). Podobně jsou na tom i NSC v subventrikulární zóně.

Narozdíl od dalších tkání, jako jsou svaly a játra, kde kmenové buňky při normálním stavu zůstávají v klidu, dospělé neurální kmenové buňky můžeme najít, hned v několika různých fázích aktivace (Daynac *et al.*, 2016). Použitím metody single-cell transcriptomics se podařilo objasnit jednotlivé fáze, kterými prochází neurální kmenová buňka od klidového stavu po zcela diferencovaný neuron. Jsou čtyři hlavní stádia, kterými musí diferencující buňka projít, každé stádium ještě můžeme rozlišit na několik mezi stavů. Prvním nejméně diferencovaným stavem jsou klidové neurální kmenové buňky (quiescent neural stem cells, qNSC), jemuž může předcházet spící NSC (dormant NSC). Následujícím stavem je přechod na aktivovanou neurální kmenovou buňku (activated neural stem cells, aNSC). Ta dává vzniknout neurálním

progenitorovým buňkám (neural progenitor cells, NPC) a z nich vznikají neuroblasty (Michaelidesová et al., 2019).

Každé stádium má svou specifickou genovou expresi, typické geny pro jednotlivá stadia jsou na Obrázek 4.



Obrázek 4 Jednotlivá stadia diferenciace neurálních kmenových buněk a jejich charakteristická genová exprese. Převzato z (Michaelidesová et al., 2019)

Neurální kmenové buňky ve svém nejvíce klidovém stavu, mají vysokou expresi gliálních markerů, velmi nízkou úroveň translace a vysokou glykolytickou aktivitu. Tyto buňky postupně zvyšují proteinovou syntézu, aby vstoupily do méně klidového stádia vedoucího k postupné přeměně na aktivní kmenovou buňku. V aktivním stavu exprimují více liniově specifických transkripčních faktorů, mají sníženou expresi gliálních markerů a vysokou úroveň translace (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Po tom, co se buňka stane aktivní, se již nemůže vrátit zpět do klidového stavu a po několika děleních se vyčerpá (Calzolari et al., 2015).

3.2.1 Vliv niky na aktivaci NSC

Dělení NSC je závislé na mnoha vnějších faktorech, které jsou udržovány nikou. Mezi nejdůležitější úlohy niky patří udržení klidového stavu. To zabraňuje přemnožení neuroblastů

a vyčerpání stavu klidových NSC (Rolando *et al.*, 2012; Kawaguchi *et al.*, 2013). Existuje několik signálů podporujících klidový stav kmenových buněk. Prvním je zpětnovazební signalizace diferencovaných a aktivních buněk, exprimujících Notch ligand Delta-like 1 (Dll1). Ten signalizuje neurálním kmenovým buňkám přes receptory Notch, aby udržovali klidový stav NSC (Kawaguchi *et al.*, 2013). Druhým způsobem signalizace je Nogo A tvořený neuroblasty v SVZ, který signalizuje přes Nogo receptor 1 nacházející se na klidových NSC (Rolando *et al.*, 2012).

Dospěle neurální kmenové buňky získávají signály od více proliferovaných buněk. Například neuroblasty sekretují nesynaptickou GABA (kyselina γ -aminomáselná), která se váže na GABA receptor typu A na qNSC a inhibuje tak jejich proliferaci (Liu *et al.*, 2005).

Velmi důležitá je také cévní signalizace, která působí prostřednictvím mezibuněčných kontaktů a sekrecí signalizačních molekul. Cévní endoteliální buňky exprimují signalizační molekulu Notch ligand Jagged1 (*jag1*), která udržuje klidový stav NSC (Ottone *et al.*, 2014). Na druhou stranu cévní signalizace může zároveň podporovat i proliferaci NSC (Crouch *et al.*, 2015). Jakmile buňka začne proliferovat, přestává být vnímavá pro klidovou signalizaci (Costa *et al.*, 2011).

Další možností, jak regulovat proliferaci buněk, je pomocí *TGF- β 1* (transforming growth factor beta 1). Produkují ho endoteliální buňky v nice. Zvýšená syntéza *TGF- β 1* má za následek přechod qNSC na spící NSC. Dále také zvyšuje šanci podlehnout apoptóze u proliferujících NSC. Naopak inhibice *TGF- β 1* signalizace má za následek zvýšení neurogenese a proliferace NSC (Pineda *et al.*, 2013). Celá signalizace je velmi složitý proces, kdy na buňku souběžně působí oba tlaky, jak udržení klidového stavu, tak přechod k proliferaci.

4 Metody izolace neurálních kmenových buněk

4.1 Lineage tracing

Principem sledování linie jedné buňky (lineage tracing) je pozorování fyziologických a patologických změn v dané buňce na základě specifických endogenních a exogenních buněčných markerů (Zhang *et al.*, 2020). Kořeny sledování buněčné linie sahají až na počátek dvacátého století (Conklin, 1905). V minulosti dokázali vědci dělit buňky jenom na základě jejich pozice, morfologie a jednoduchých biofyzikálních a biochemických vlastností. V současnosti dokážeme dělit buňky na základě specifických markerů, které exprimují. Víme určit jejich transkriptom, který nám říká v jaké fázi buněčného cyklu se daná buňka nachází, jaký je její metabolismus a mnoho dalšího (Wagner a Klein, 2020).

Základní dělení značení v sledování buněčné linie je na exogenní a endogenní. Exogenní značení je za pomoci nějaké látky, která se vloží do buňky a dostává se do jejích potomků. Toto značení je problematické, protože při dělení buněk postupně dochází k diluci a tak je možné sledovat buněčnou linii jen po omezenou dobu (Li *et al.*, 2016). V současnosti již existují metody značení genů, využívající homologní rekombinaci, které jsou stále po mnoha generacích. Tím, že značku vložíme jako genetickou informaci se při každém dělení buněk tato informace zreplikuje spolu s původním genomem. Ale jejich problémem je, že se nedají použít v buňkách určených na klinické využití, protože nechceme měnit jejich genetickou informaci. Z toho důvodu má i exogenní značení stále své důležité místo (Li *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

Základními předpoklady sledování buněčné linie je označení přesně definované buňky nebo skupiny buněk. Značení musí zůstat výhradně v původní buňce a jejích dceřiných buňkách. Značení musí být dostatečně stálé, aby bylo možné sledovat buňky po mnoho generací (Hsu, 2015).

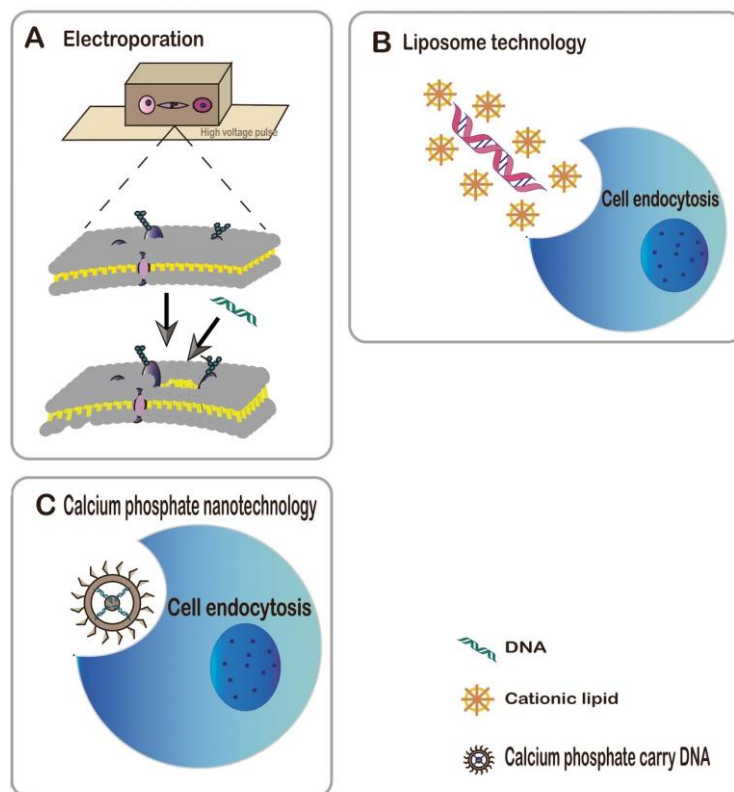
4.1.1 Exogenní značení

Mezi první formy značení buněk patřili vitální barviva. Jejich problémem je, že jsou rozpustné ve vodě a mohou přecházet do vedlejších buněk (Vogt, 1929). Následně byla vyvinuta barviva, která neprocházejí buněčnou membránou. Injikují se do specifické buňky a přecházejí jenom do jejích potomků (Serbedzija, Bronner-Fraser a Fraser, 1989). Například vznik radiálních

gliových buněk z neuroepiteliálních buněk neurální trubice, byl pozorován pomocí speciálního Golgiho barvení použitého v různých embryonálních stádiích (Schmechel a Rakic, 1979).

4.1.2 DNA transfekce

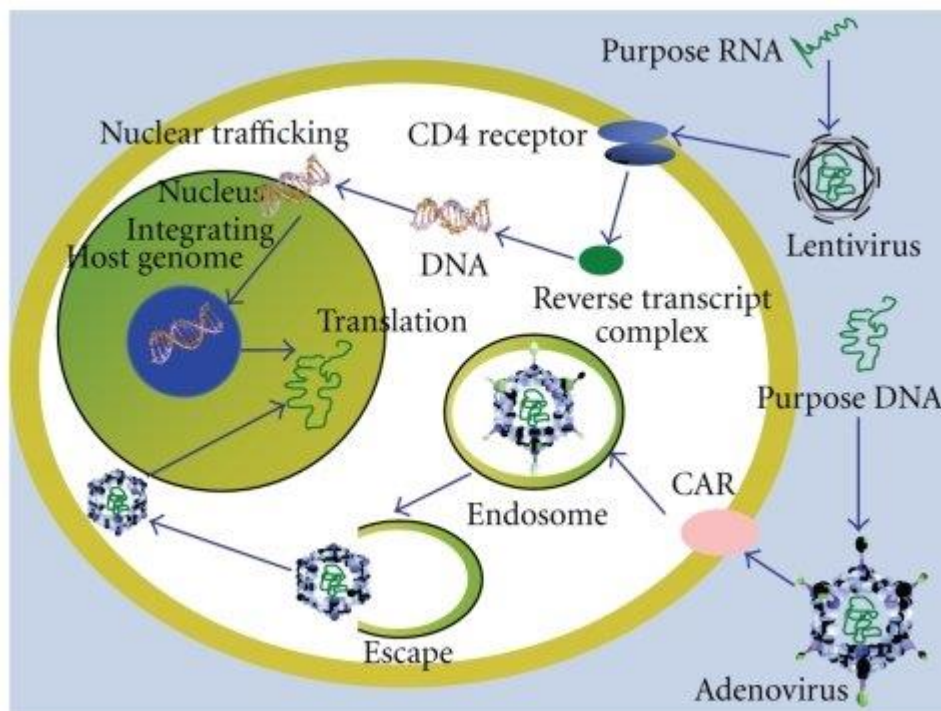
K DNA transfekci patří techniky, které slouží na přesun DNA do buňky. Nukleové kyseliny samotné nedokáží procházet buněčnou membránou. Jednou z technik, které to umožňují je elektroporace. Transfekovaná buňka je vložena do elektrického pole, kde dojde ke krátkému elektrickému impulzu (Neumann *et al.*, 1982). Novější transfekční technologie jsou lipozómy a fosforečnan vápenatý. Lipozómy jsou lipidové částice, tvořené koncentricky uspořádanou dvojvrstvou fosfolipidů, do kterých je zabalena transfekovaná nukleová kyselina. Lipozómy jsou endocytovány cílovou buňkou (dos Santos Rodrigues *et al.*, 2019). Nanočástice fosforečnanu vápenatého jsou efektivně pohlcovány cílovou buňkou, problematickou částí je spojení nukleové kyseliny a nanočástice (Obrázek 5) (Sokolova *et al.*, 2012). Společným problémem transfekčních technik je, že poškozují buňky a jejich další růst, proto tyto techniky nejsou často využívány pro sledování buněčné linie (Zhang *et al.*, 2020). Transfekovaná DNA při sledování buněčné linie bývá gen pro GFP (green fluorescent protein) (Chalfie *et al.*, 1994) nebo β -galaktosidázu (Son, Min a Joh, 1996).



Obrázek 5 A - Elektroporace; B - Lipozómy; C - Nanočástice fosforečnanu vápenatého; Upraveno ze (Zhang *et al.*, 2020).

4.1.3 Virová transdukce

Virová transdukce je méně cytotoxická než transfekce, ale je náročnější na použití a není vhodná pro klinické využití, protože nechceme pacientům dávat buňky s virem. Dalším problémem je, že může vyvolávat imunitní reakci u transdukované buňky a zahubit daný vir nebo transdukovanou buňku (Zhang *et al.*, 2020). Nejčastěji používanými viry jsou adenoviry, adeno-asociované viry a lentiviry (Obrázek 6) (Blömer *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009).



Obrázek 6 Mechanismus virové transdukce pomocí lentivirů a adenovirů (Chen *et al.*, 2010).

Existují protokoly popisující virovou transdukci neurálních buněk, jak *in vitro*, tak *in vivo* (Sarkis *et al.*, 2000; Wollebo, Woldemichaele a White, 2013). Virová transdukce byla využita také ve výzkumu subventrikulární zóny. V experimentu Levisona *et al.* sledovali pomocí retrovirového značení migraci gliových buněk ze SVZ a jejich diferenciaci na astrocyty nebo oligodendrocyty (Levison *et al.*, 1993). V experimentu Zerlina *et al.* také použili retrovirové značení a pozorovali diferenciaci gliových progenitorů SVZ na nemýelinované oligodendrocyty a myelinované oligodendrocyty, které byli přítomni současně (Zerlin, Milosevic a Goldman, 2004).

4.1.4 Cre-lox rekombinace

Je metoda používající se k místně specifické rekombinaci, umožňující inserce, delece, translokace a inverze. Tento systém se skládá z jediného enzymu Cre rekombinázy, který umožňuje rekombinaci mezi Lox místy. Takto můžeme aktivovat či potlačit expresi našeho genu. Lox místa mohou být v okolí cílového genu nebo v okolí jeho promotoru. Když máme jedince, který má ve všech buňkách stop kazetu před našim genem, můžeme ho zkřížit s jedincem který specificky exprimuje Cre rekombinázu. Aktivitu Cre rekombinázy lze kontrolovat, tak že její exprese bude probíhat jen pod kontrolou tkáňově nebo buněčně specifického promotoru nebo na místě, kde dojde k transdukcii virovým vektorem obsahujícím Cre rekombinázu (Hsu, 2015; Kim *et al.*, 2018).

Technika Cre-lox rekombinace byla použita například pro sledování vývoje buněčné linie neurálních progenitorových buněk v hipokampu. Zjistili že když byli NSC jednou aktivované, tak se již nevrátili do klidového stadia (Pilz *et al.*, 2018).

4.1.5 CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 je genetická metoda založena na základě bakteriálního protivirového obranného systému CRISPR-Cas9. Používá se na inaktivaci určitého genu nebo na specifické vložení cizorodé DNA do DNA, v našem případě na vložení reportérového genu. Tento systém se skládá z Cas9 nukleázového komplexu a uměle vyrobené gRNA (guide RNA) obsahující cílovou sekvenci.

Nejdříve se specificky váže Cas9 komplex na sekvenci dlouhou 23 párů bází, kde nukleáza Cas9 způsobuje v cílovém místě dvouvláknový zlom (Jinek *et al.*, 2012). Takto vzniklý dvouvláknový zlom může být opraven dvěma způsoby. První způsob, při kterém se uplatňuje nehomologní spojení konců, vede ke knockoutu genu. Při druhém způsobu se vkládá cílová sekvence opatřená homologními konci (Chatterjee a Walker, 2017). K sledování buněčné linie se CRISPR-Cas9 nejčastěji využívá na vytvoření náhodných mutací, které se pak dědí a pomocí sekvenování jednotlivých buněk dokážeme zjistit jejich původ, protože sdílejí stejné mutace (McKenna *et al.*, 2016).

4.2 Sekvenování RNA jedné buňky

4.2.1 RNA sekvenování

RNA sekvenování skupiny buněk poskytuje vzorek průměrné exprese dané skupiny (Mortazavi *et al.*, 2008). Tak ovšem vypadá průměrná buňka dané populace, ačkoli daná skupina může být vzorkem různorodé tkáně, proto výsledná exprese může být zavádějící. Například klonální rozdíly v rakovinné tkáni, kdy jednotlivé klony mohou mít rozdílnou expresi (Zhang *et al.*, 2016). Tkáně také mohou obsahovat malé populace méně častých buněk, jako jsou kmenové buňky, které lze rozeznat pouze na buněčné úrovni (Wen a Tang, 2016).

4.2.2 Sekvenování RNA jedné buňky

Sekvenování RNA jedné buňky (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq), není pouze jedna metoda, ale spíše souhrn různých metod aplikovaných na různé systémy při řešení různých otázek (Andrews a Hemberg, 2018). ScRNA-seq umožňuje zjistit genovou expresi na buněčné úrovni a tím vyřešit nedostatky běžného RNA sekvenování. Jsou zde tři komplikace, a to zachycení jednotlivých buněk, syntéza komplementární DNA (cDNA), analýza a vizualizace dat. Jednou z možností, jak izolovat jednotlivé buňky je FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting). Další možností je cDNA syntéza používající modifikovaný SMART-Seq2 protokol. Nebo pomocí mikroskopických kapek v olejové emulzi. Jako poslední metoda se používá Drop-Seq analyzující mRNA transkript z kapek obsahujících jednotlivé buňky v mnoha paralelních reakcích. Tato metoda používá zařízení rozčleňující kapky tak, aby obsahovali jednotlivé buňky (Nguyen *et al.*, 2018; Chen, Ning a Shi, 2019).

Celkově, každé scRNA-seq zahrnuje několik hlavních kroků: izolaci a lyzi jednotlivých buněk, převedení RNA do cDNA, přípravu knihovny namnožením cDNA a sekvenování. Izolace buněk zahrnuje disociaci vzorku do jednotlivých jamek PCR destičky nebo zachycením buněk do jednotlivých kapek, mikrojamek nebo komůrky s mikroskopickým množstvím tekutiny. Příprava knihovny zahrnuje reverzní transkripci a zmnožení dané mRNA, buď celé anebo 3'/5' značené od obou konců mRNA (Kolodziejczyk *et al.*, 2015).

4.2.3 Principy průtokové cytometrie a FACS

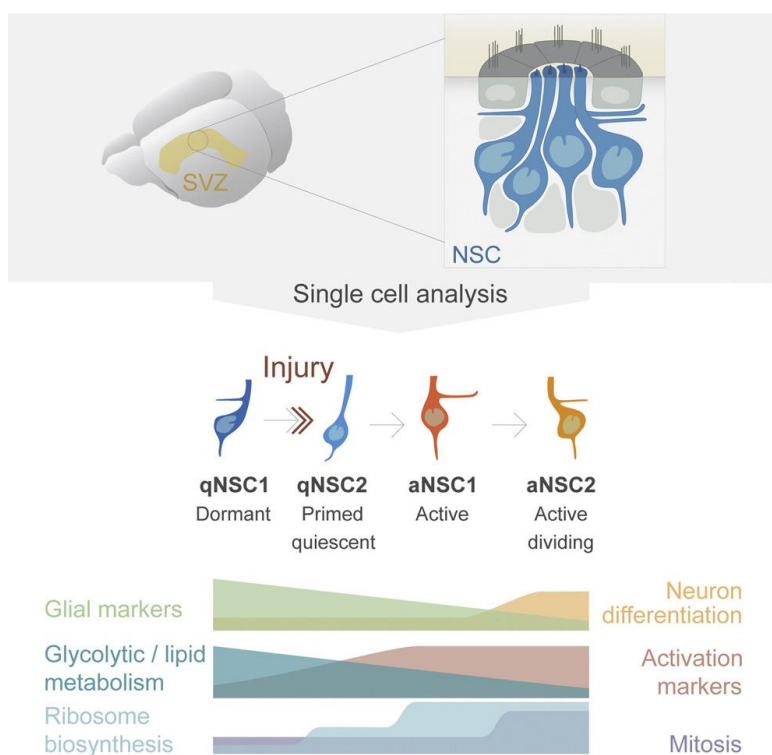
Průtoková cytometrie (fluid cytometry, FC) je metoda umožňující kvantitativní a kvalitativní analýzu jak fyzikálních, tak i fluorescenčních vlastností. Používá se k analyzování buněčné

suspenze, která může obsahovat populaci jednoho typu buněk nebo různorodou populaci. Buňky málokdy vykazují vlastní fluorescenci, a proto se používají fluorescenčně značené protilátky nebo fluorescenční barviva (Brown a Wittwer, 2000).

Hlavními komponenty průtokové cytometrie jsou fluidika, optika a elektronika. Fluidika obsahuje nádobku se vzorkem s buněčnou suspenzí, nejčastěji ve fyziologickém roztoku. Je velmi důležité, aby buňky procházely po jedné za sebou, čehož je docíleno pomocí hydrodynamické fokusace. Změnou tlaku, kterým je vpouštěna unášející tekutina a náš vzorek můžeme měnit parametry hydrodynamické fokusace. Dále vzorek prochází monochromatickým paprskem světla, který se při průchodu kapkou rozptyluje. Podle úhlu rozptylu lze určit sledované parametry procházející kapky. Novější a přesnější metodou je použití fluorescence, kdy pomocí řady senzorů detekujeme excitované záření flurochromů přítomných v jednotlivých buňkách. Fluorochromy absorbují světelné záření z přístroje a následně ho vyzáří ve specifické vlnové délce pro danou látku (Aebisher, Bartusik a Tabarkiewicz, 2017).

5 Buněčné subpopulace NSC

Neurální kmenové buňky jsou velmi heterogenní skupinou. Jednotlivé NSC exprimují rozdílnou kombinaci charakteristických faktorů kmenových buněk, jako jsou: GFAP, PROM1 (promin-1), GLAST (glutamate aspartate transporter), EGFR (epidermal growth factor) a BLBP (Brain lipid-binding protein) (Codega *et al.*, 2014; Giachino *et al.*, 2014). Důvod, proč exprimují rozdílné faktory je, že se nacházejí v různém stavu aktivace a mají i rozdílný diferenciační potenciál (Obrázek 7) (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015). Například GFAP a PROM1 jsou typické pro klidové NSC, EGFR je typický pro aktivované NSC, BLBP je typický pro dělicí se NSC (Codega *et al.*, 2014; Giachino *et al.*, 2014).



Obrázek 7 Změny v buněčných markerech během přechodu NSC z klidového do aktivního stadia. Převzato z (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015)

5.1 Subventrikulární zóna

5.1.1 Plasticita NSC při vývoji a stárnutí

V experimentu Daynaca *et al.* využili FACS na spočítání množství neurálních kmenových buněk oblasti SVZ u myši. Tuto analýzu zopakovali ve 2, 4, 6, 9 a 12 měsících. Na třídění buněk použili tři markery: *LeX*, *CD24* a *EGFR*. Tyto markery umožňují třídění neurálních

kmenových buněk do pěti kategorií: na klidové NSC (LeX^+), aktivované NSC (LeX^+ , $EGFR^+$), přechodně dělicí se buňky (transient amplifying cells, TACs) ($EGFR^+$), neuroblasty ($EGFR^+$, $CD24^+$) a migrující neuroblasty ($CD24^+$) (Obrázek 8) (Daynac *et al.*, 2016).



Obrázek 8 Změny v molekulárních markerech během vývoje. qNSC – klidové neurální kmenové buňky; aNSC – aktivované NSC; TAC – přechodně dělicí se buňky; Im. Nb – neuroblasty; Mig. Nb – migrující neuroblasty; Převzato z (Daynac *et al.*, 2016)

Ve dvou měsících u myši ještě není ukončena kritická perioda a je tam zvýšená plasticita. Naopak ve 12 měsících se už začíná projevovat stárnutí a plasticita se snižuje (Foscarin *et al.*, 2017). Množství klidových NSC a aktivovaných NSC zůstalo stálé během celého experimentu. Na druhou stranu množství jejich potomků se postupně snižovalo. Toto snížení bylo významné již při porovnání 2-měsíčního a 4-měsíčního mozku, kde by ještě nemělo docházet ke stárnutí. Nejvýznamnější byla změna v dělení aktivovaných NSC, i když nebyla změna v jejich množství. Aktivované NSC se v 6 měsících dělili méně než ve dvou, co následně vedlo ke snížení množství jejich potomků (Daynac *et al.*, 2016).

5.1.2 Regionální a pohlavní rozdíly

V experimentu Mizrak *et al.* analyzovali pomocí jednobuněčné RNA transkriptomiky buňky ventrální SVZ myšího mozku, aby vytvořili molekulární atlas. Před sekvenováním buňky rozdělili na oblasti na základě septo-laterální osy a dorzo-ventrální osy (Mizrak *et al.*, 2019). Neurální kmenové buňky SVZ dávají vzniknou specifickým interneuronům olfaktorického bulbu nebo gliálním buňkám v závislosti na jejich poloze v SVZ (Fiorelli *et al.*, 2015).

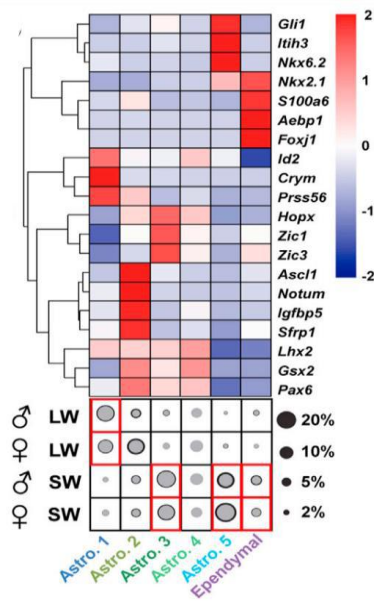
Ventrální SVZ obsahovala astrocyty, buňky neurální linie, buňky oligodendrocytické linie, mikroglie, ependymové buňky, endoteliální buňky, pericyty a fibroblasty. Mezi buňky neurální linie patří aNSC, TAC a neuroblasty. Mikroglie byli přítomny hlavně na laterální straně (Mizrak *et al.*, 2019). To je v souladu s tím, že mikroglie jsou důležité pro migraci neurálních progenitorů (Ribeiro Xavier *et al.*, 2015), které se také vyskytují na laterální straně. Astrocyty

z různých oblastí měli odlišnou míru exprese určitých markerů, jak na dorzo-ventrální ose, tak na septo-laterální.

Na základě analýzy dat byly identifikovány dva druhy mikroglíí, označeny jako A a B. Oboje exprimující mikroglální markery *Tmem119*, *Aif1* a *Cx3cr1*. Ovšem mikroglie B exprimuje navíc časné transkripční faktory a prozánětlivé chemokiny. Aktivované mikroglie se více větví, díky čemu je možné je barvit protilátkami.

Neurony SVZ produkují neurotransmitery důležité pro regulaci dospělých kmenových buněk a jejich potomstvo. Byly objeveny tři subpopulace těchto neuronů. Nejdůležitější je subpopulace Neuron 3 exprimující *Chat* kam patří ChAT+ podílející se na regulaci buněk ventrikulární-subventrikulární zóny (ventricular-subventricular zone, V-SVZ). Jako další byli objeveny 3 typy endoteliálních buněk, na základě zvýšeného množství exprese genů určili, že Endo.1 odpovídá endoteliálním kapilárním buňkám, Endo.2 venálním endoteliálním buňkám a Endo.3 arteriálním endoteliálním buňkám.

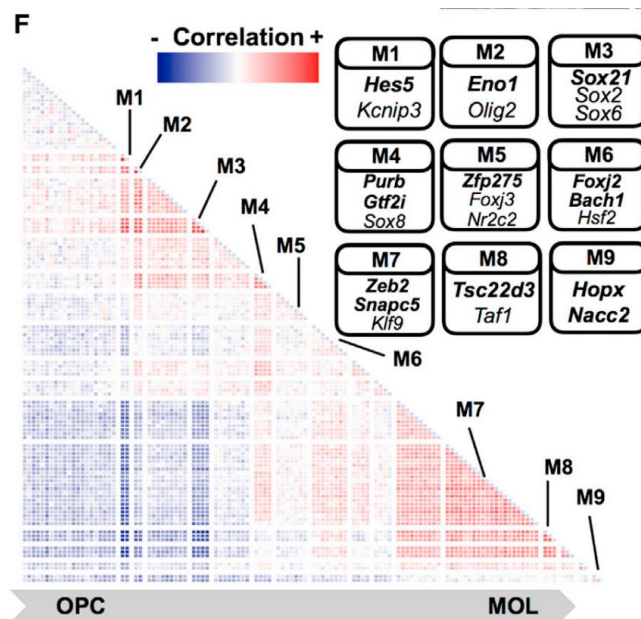
Shlukovou analýzou bylo objeveno pět subpopulací astrocytů. Nazývající se Astro.1 až Astro.5, kromě Astro.2 exprimovali všechny astrocyty geny třetí mozkové komory, naopak Astro.2 exprimovalo tancyte2 markery. Astro.1 se nacházejí na laterální straně, Astro.3 a Astro.5 na septální straně, zbývající Astro.2 a Astro.4 byly rozděleny rovnoměrně. Astro.1 exprimovali ve zvýšené míře *Crym*, *Prss56*, a *Id2*; Astro.2 *Notum*, *Sfrp1*, *Igfbp5*, *S100a6*, *Thbs4*, a *Ascl1*; Astro.3 genovou rodinu *Hopx* a *Zic*; Astro.5 *Agt*, *Gli1*, *Itih3*, a *Nkx6-2*. Díky tomu se podařilo lokalizovat jednotlivé subpopulace astrocytů (Obrázek 9).



Obrázek 9 V horní části grafu je heatmapa ukazující expresi markerů a transkripčních faktorů astrocytální linie a ependymálních buněk. V dolní části je zobrazené množství astrocytů v jednotlivých oblastech. Červenou jsou vyznačeny typy buněk převážně se vyskytující v dané oblasti.

Astro.2 hrají roli v aktivaci neurálních kmenových buněk, nacházejí se na místě, kde dochází k diferenciaci aktivovaných neurálních kmenových buněk na neuroblasty. Nejvyšší exprese proliferačních markerů *mKi67*, *Mcm2*, a *Top2a1* byla právě v těchto buňkách. Naopak snížená exprese byla v podskupině neuroblastů pozitivních na *Dcx+*. Navíc TACs produkovaly *Ssc11* a *Egfr* před typickými geny buněčného cyklu. To znamená, že aktivace SC a proliferace se mohou dít nezávisle na sobě.

Mezi buňky oligodendrocytické linie patří oligodendrocytické progenitorové buňky (oligodendrocyte progenitor cells, OPCs), oligodendrocytické prekurzory (committed oligodendrocyte precursors, COPs), nově formované oligodendrocyty (newly formed oligodendrocytes), myelin-formující oligodendrocyty (myelin-forming oligodendrocytes). Bylo potvrzeno, že OPCs a COPs se vyskytují na septální straně V-SVZ. Navíc ve větším množství u samců než u samic. Na druhou stranu na laterální straně bylo více proliferujících neurálních progenitorů u obou pohlaví. Buňky oligodendrocytické linie mají společné transkripční faktory *Kcnp3*, *Olig2*, *Sox2*, *Klf9* a jejich expresní partnery *Hes5*, *Eno1*, *Sox21*, *Purb*, *Zfp275*, *Foxj2*, *Zeb2*, *Tsc22d3*, a *Hopx* (Obrázek 10).



Obrázek 10 Vlevo je Heatmapa ukazující korelační matici pro jednotlivé moduly transkripčních faktorů.

Samci měli oproti samicím zvýšenou expresi proliferativních molekul na laterální straně, a naopak klidových molekul na septální straně. Samičí astrocyty měli zvýšenou expresi receptorů pro neurotransmitery a iontové kanály.

Více proliferujících neurálních progenitorů bylo na laterální straně jak u samců, tak i u samic. Na druhou stranu více oligodendrocytických progenitorů bylo na septální straně, přičemž u samců proliferovali více než u samic.

Důležitou nevyřešenou otázkou u neurálních kmenových buněk je, jestli jsou skutečně multipotentní, a tedy schopné tvořit jak neurony, tak gliové buňky nebo každá tvoří pouze neurony nebo jenom gliové buňky. První způsob, který na její vyřešení použili byla korelace expresních profilů jednotlivých buněk. Jenom malá část z kmenových buněk silně korelovala s neurálními progenitory nebo s oligodendrocytickými progenitory. Subpopulace Astro.2 korelovala s oběma typy progenitorů, zatímco subpopulace Asto.3 korelovala jenom s oligodendrocytickými progenitory, což je v souladu s tím, že se Astro.3 nachází na septální straně, kde je větší množství oligodendrocytických progenitorů.

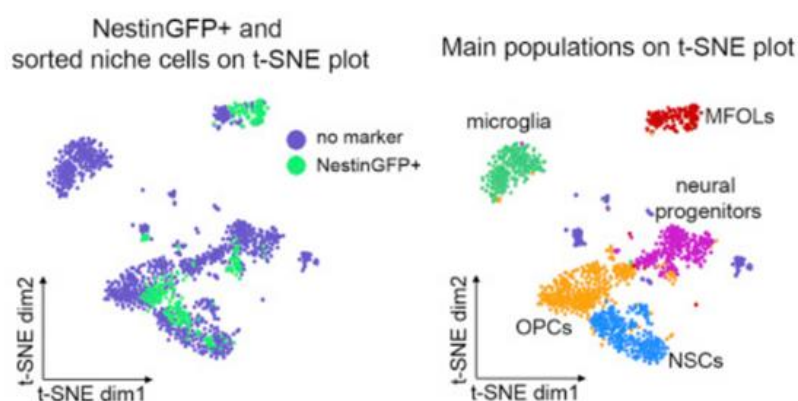
Druhý způsob, kterým chtěli zjistit, jestli jsou konkrétní kmenové buňky předurčeny stát se neurony nebo gliovými buňkami byla analýza genů specifických pro některou z linií. Mnoho genů, které korelovali s neurálními progenitory korelovalo zároveň i s oligodendrocytickými progenitory, byli to hlavně *Sl100a6*, *Notum*, *Dbi*, *Sfrp1*, *Ascl1*, *Vim*, *Thbs4* a *Rpl32*. Naopak

některé markery korelovali výhradně s jedním typem progenitorových buněk. Markery aktivovaných NSC (*Ascl1*, *Nes*, *Gsx2*) korelovali s oběma typy progenitorů. Markery klidových NSC (*Vcam1*, *Cdh2*, *Nr2e1*, *Slpr1*, *Hes5*) s progenitory nekorelovali (Mizrak *et al.*, 2019).

5.2 Subgranulární zóna

V experimentu Shin *et al.* použili transgenní myši vytvořené pomocí virové transdukce s fluorescenčním CFP (cyane fluorescence protein) pod specifickým promotorem neurálních kmenových buněk *Nestin*. Potom pomocí sc-RNAseq sledovali exprimované transkripční faktory u NSC. To že sledují NSC si potvrdili přítomností známých transkripčních faktorů *Sox4*, *Sox11*, *Foxg1*, *Tbr2*, *Insm1*, *Tcf12*, a *Nfib*. Objevili dosud neprozkoumané transkripční faktory, které byli exprimovány ve zvýšené míře u NSC jako je *Hmgb2*, *Hmgb3*, *Smarcc1/Baf155*, *Nfia*, *Nfix* (Shin *et al.*, 2015).

V předcházejících experimentech sledovali jenom skupinu buněk, která byla pozitivní na konkrétní marker, například *Nestin*, když chtěli sledovat neurální kmenové buňky (Shin *et al.*, 2015), nebo GLAST pro izolaci NSC (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015). Nevýhodou tohoto přístupu je, že nemůžeme objevit nějakou novou subpopulaci, jejichž markery neznáme (Obrázek 11). V experimentu Artegiani *et al.* sledovali všechny buňky gyrus dentatus hipokampu. Nejprve oddělili pomocí FACS ze vzorku neurony, protože ty tvoří největší frakci všech buněk a komplikují zkoumání ostatních buněčných typů. Na zbývající buňky použili sekvenování RNA jednotlivých buněk.



Obrázek 11 Vlevo jsou všechny zkoumané buňky, zelenou jsou *Nestin* pozitivní, *Nestin* se používá jako marker NSC. Vidíme, že ho neobsahují všechny relevantní buňky. Vpravo jsou ty samé buňky rozděleny na základě buněčných linií, které objevili v gyrus dentatus hipokampu. Převzato z (Artegiani *et al.*, 2017)

Na základě genové exprese rozeznali NSC (*Aldoc*, *Apoe*, *Id4*, *Hopx*, *Sox9*, *GFAP*, *GLAST*, *Sox2*), neurální progenitorové buňky (*Eomes*, *Neurod1*, *Dcx*, *Ccnd2*), OPC (*Olig1*, *Olig2*,

Sox10, Pdgfra, Ng2), myelin-formující oligodendrocyty (*Plp1, Mal, Mog, Mbp*) a mikroglie (*Csf1r, Cx3cr*).

Astrocyty a NSC sdílejí mnoho markerů, proto tvořili v analýze jednu skupinu. Astrocyty mají oproti NSC navíc typické astrocytární markery jako je *S100β* a *Fzd2* (Artegiani *et al.*, 2017).

6 Závěr

Neurální kmenové buňky mají velký potenciál v oblasti medicínského využití. Jako je léčba traumatické poranění mozku anebo obnova neurálních progenitorů po radioterapii. Ovšem zatím je klinické využití velmi vzdáleno, a proto se v současnosti výzkum zaměřuje hlavně na neurální kmenové buňky, jejich vlastností a definování jednotlivých buněčných subpopulací a také na zlepšení jednotlivých metod používaných při výzkumu neurálních kmenových buněk.

Klíčovou roli k pochopení a dalším studiu kmenových buněk hrají jejich markery. Genetické markery, exprimované u jednotlivých buněk, nám umožňují rozeznat buněčné populace a stadia v kterých se buňky nacházejí.

Na základě výzkumů buněk v subventrikulární zóně, kde sledovali buněčnou linii neurálních kmenových buněk a jejich transkriptomiku, pomocí scRNA-seq byly odhaleny jednotlivá stadia proliferace neurálních kmenových buněk a dále i jejich subpopulace. Jednotlivé stadia na základě genetických markerů jsou qNSC, aNSC, TAC, neuroblasty a migrující neuroblasty (Daynac et al., 2016). V jiné studii objevili dvě stadia astrocytů, tedy klidových NSC a aNSC, TAC a pouze jeden typ neuroblastů (Mizrak et al., 2019). Jednotlivá stadia se liší podle použitých izolačních metod v daném výzkumu. Všeobecně přijímané rozdělení je na qNSC, aNSC, neurální progenitory a diferencované neuroblasty (Michaelidesová *et al.*, 2019).

Kromě stádií proliferace byly popsány těmito metodami i jednotlivé subpopulace mikroglíí, endoteliálních buněk, astrocytů, tedy NSC a oligodendrocytů. Jednotlivé subpopulace mikroglíí se dělily na mikroglie A a mikroglie B. Subpopulace endoteliálních buněk byly Endo.1, Endo.2 a Endo.3, podle druhu cév, které tvořily. Subpopulace astrocytů obsahovala Astro.1 až Astro.5, dělení probíhalo na základě exprese jednotlivých markerů a lokalizace jednotlivých subpopulací. Poslední sledovanou subpopulací byla oligodendrocytická linie. Kam patří OPCs, COPS, nově formované oligodendrocyty a myelin-formující oligodendrocyty.

Jednotlivé subpopulace jsou regionálně specifické, na laterální straně SVZ se nacházejí ve zvýšené míře proliferující neurální progenitory a další buňky stimulující buněčnou proliferaci. Na septální straně SVZ se na druhou stranu vyskytují více oligodendrocytické progenitory (Mizrak *et al.*, 2019).

Při výzkumu neurálních kmenových buněk SGZ se ukázalo, že při použití metod snažících se izolovat NSC pomocí specifických markerů (Shin *et al.*, 2015), došlo k vyloučení částí NSC. Tyto vyloučené buňky tvořily jinou subpopulaci NSC, u které nedocházelo k expresi sledovaného markeru. Na základě scRNA-seq, bylo zjištěno, že podle genové exprese jsou také neurálními kmenovými buňkami, tvořící jinou subpopulaci (Artegiani *et al.*, 2017). Proto se stále častěji používají metody založené na scRNA-seq, kterými lze sledovat velké množství buněk.

Budoucí využití se nabízí v porovnání jednotlivých částí mozku za pomoci scRNA-seq. Zajímavé by bylo také zjistit mezipohlavní rozdíly i v dalších oblastech mozku a podrobněji prozkoumat změny při jeho stárnutí a za patologických podmínek.

Bylo již zjištěno mnoho podmínek, při kterých probíhá proliferace NSC, ale stále chybí vlastní molekuly a dráhy za to zodpovědné. Pro správné porozumění všem mechanismům je velmi důležité studovat NSC jako celou niku včetně všech buněk, metodami které to umožňují, jako je scRNA-seq.

7 Seznam literatury

Aebisher, D., Bartusik, D. and Tabarkiewicz, J. (2017) ‘Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine’, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 85, pp. 434–443. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.048.

Altman, J. and Bayer, S. A. (1990) ‘Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods.’, *The Journal of comparative neurology*, 301(3), pp. 365–381. doi: 10.1002/cne.903010304.

Andrews, T. S. and Hemberg, M. (2018) ‘Identifying cell populations with scRNASeq’, *Molecular Aspects of Medicine*, 59, pp. 114–122. doi: 10.1016/j.mam.2017.07.002.

Armstrong, L. *et al.* (2000) ‘mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells.’, *Mechanisms of development*, 97(1–2), pp. 109–116. doi: 10.1016/s0925-4773(00)00423-8.

Artegiani, B. *et al.* (2017) ‘A Single-Cell RNA Sequencing Study Reveals Cellular and Molecular Dynamics of the Hippocampal Neurogenic Niche’, *Cell Reports*, 21(11), pp. 3271–3284. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.050.

Blömer, U. *et al.* (2005) ‘Shuttle of lentiviral vectors via transplanted cells in vivo.’, *Gene therapy*, 12(1), pp. 67–74. doi: 10.1038/sj.gt.3302384.

Bradley, A. *et al.* (1984) ‘Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines’, *Nature*, 309(5965), pp. 255–256. doi: 10.1038/309255a0.

Braun, T. *et al.* (1994) ‘MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice.’, *Development (Cambridge, England)*, 120(11), pp. 3083–3092. doi: 10.1242/dev.120.11.3083.

Brown, M. and Wittwer, C. (2000) ‘Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology’, *Clinical Chemistry*, 46(8 II), pp. 1221–1229. doi: 10.1093/clinchem/46.8.1221.

Calzolari, F. *et al.* (2015) ‘Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone’, *Nature Neuroscience*, 18(4), pp. 490–492. doi: 10.1038/nn.3963.

- Chalfie, M. *et al.* (1994) ‘Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression’, *Science*, 263(5148), pp. 802–805. doi: 10.1126/science.8303295.
- Chatterjee, N. and Walker, G. C. (2017) ‘Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis.’, *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), pp. 235–263. doi: 10.1002/em.22087.
- Chen, G., Ning, B. and Shi, T. (2019) ‘Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis’, *Frontiers in Genetics*, 10. doi: 10.3389/fgene.2019.00317.
- Chen, Y.-Z. *et al.* (2010) ‘Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy.’, *Clinical & developmental immunology*, 2010, p. 565643. doi: 10.1155/2010/565643.
- Cibelli, J. B. *et al.* (2001) ‘Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development’, *E-Biomed*, 2(5), pp. 25–31. doi: 10.1089/152489001753262168.
- Codega, P. *et al.* (2014) ‘Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche’, *Neuron*, 82(3), pp. 545–559. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.039>.
- Conklin, E. G. (1905) ‘The Mutation Theory From the Standpoint of Cytology.’, *Science (New York, N.Y.)*, 21(536), pp. 525–529. doi: 10.1126/science.21.536.525.
- Corbin, J. G., Nery, S. and Fishell, G. (2001) ‘Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain.’, *Nature neuroscience*, 4 Suppl, pp. 1177–1182. doi: 10.1038/n749.
- Costa, M. R. *et al.* (2011) ‘Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro’, *Development*, 138(6), pp. 1057–1068. doi: 10.1242/dev.061663.
- Crouch, E. E. *et al.* (2015) ‘Regional and stage-specific effects of prospectively purified vascular cells on the adult V-SVZ neural stem cell lineage’, *Journal of Neuroscience*, 35(11), pp. 4528–4539. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1188-14.2015.
- Czyz, J. *et al.* (2003) ‘Potential of embryonic and adult stem cells in vitro’, *Biological Chemistry*, 384(10–11), pp. 1391–1409. doi: 10.1515/BC.2003.155.

- Czyz, J. and Wobus, A. (2001) 'Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors.', *Differentiation; research in biological diversity*, 68(4–5), pp. 167–174. doi: 10.1046/j.1432-0436.2001.680404.x.
- Daynac, M. *et al.* (2016) 'Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells', *Scientific Reports*, 6(November 2015), pp. 1–10. doi: 10.1038/srep21505.
- Doetsch, F. *et al.* (1999) 'Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain', 97, pp. 703–716. Available at: [internal-pdf://171.18.31.238/008693427208823Doetsch 1999.pdf](internal-pdf://171.18.31.238/008693427208823Doetsch%201999.pdf).
- Eriksson, P. S. *et al.* (1998) 'Neurogenesis in the adult human hippocampus', *Nature Medicine*, 4(11), pp. 1313–1317.
- Fiorelli, R. *et al.* (2015) 'Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis', *Development (Cambridge)*, 142(12), pp. 2109–2120. doi: 10.1242/dev.119966.
- Foscarin, S. *et al.* (2017) 'Brain ageing changes proteoglycan sulfation, rendering perineuronal nets more inhibitory', *Aging*, 9(6), pp. 1607–1622.
- Foster, C. S. *et al.* (2002) 'An introduction to stem cells', *Journal of Pathology*, 197(4), pp. 419–423. doi: 10.1002/path.1187.
- Furutachi, S. *et al.* (2015) 'Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells', *Nature Neuroscience*, 18(5), pp. 657–665. doi: 10.1038/nn.3989.
- Gage, F. H. (2000) 'Mammalian Neural Stem Cells', *Science*, 287(5457), pp. 1433–1438. doi: 10.1126/science.287.5457.1433.
- Ge, S. *et al.* (2007) 'A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain.', *Neuron*, 54(4), pp. 559–566. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.002.
- Giachino, C. *et al.* (2014) 'Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population.', *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(1), pp. 70–84. doi: 10.1002/stem.1520.
- Gonzalez-Perez, O. (2012) 'Neural stem cells in the adult human brain.', *Biological and*

biomedical reports, 2(1), pp. 59–69.

Grove, E. A. *et al.* (1993) ‘Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex.’, *Development (Cambridge, England)*, 117(2), pp. 553–561. doi: 10.1242/dev.117.2.553.

Hoffman, L. M. and Carpenter, M. K. (2005) ‘Characterization and culture of human embryonic stem cells’, *Nature Biotechnology*, 23(6), pp. 699–708. doi: 10.1038/nbt1102.

Hsu, Y.-C. (2015) ‘Theory and Practice of Lineage Tracing.’, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 33(11), pp. 3197–3204. doi: 10.1002/stem.2123.

Inaba, M. and Yamashita, Y. M. (2012) ‘Asymmetric stem cell division: precision for robustness.’, *Cell stem cell*, 11(4), pp. 461–469. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.003.

Jinek, M. *et al.* (2012) ‘A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity’, *Science*, 337(6096), pp. 816–821. doi: 10.1126/science.1225829.

Kawaguchi, D. *et al.* (2013) ‘Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis’, *Nature Communications*, 4(1), p. 1880. doi: 10.1038/ncomms2895.

Kim, H. *et al.* (2018) ‘Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes.’, *Laboratory animal research*, 34(4), pp. 147–159. doi: 10.5625/lar.2018.34.4.147.

Kolodziejczyk, A. A. *et al.* (2015) ‘The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing’, *Molecular Cell*, 58(4), pp. 610–620. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.005>.

Kubikova, I. *et al.* (2009) ‘Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin.’, *Cytotherapy*, 11(3), pp. 330–40, 1 p following 340. doi: 10.1080/14653240802595531.

Lee, C. *et al.* (2012) ‘The molecular profiles of neural stem cell niche in the adult subventricular zone.’, *PloS one*, 7(11), p. e50501. doi: 10.1371/journal.pone.0050501.

Levison, S. W. *et al.* (1993) ‘The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated.’, *Development*

(Cambridge, England), 119(3), pp. 611–622. doi: 10.1242/dev.119.3.611.

Li, K. *et al.* (2016) ‘Differentiation of pluripotent stem cells for regenerative medicine’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(1), pp. 1–4. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.182.

Li, L. *et al.* (2010) ‘Individual cell movement, asymmetric colony expansion, Rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells’, *Biophysical Journal*, 98(11), pp. 2442–2451. doi: 10.1016/j.bpj.2010.02.029.

Lim, A. D. and Alvarez-buylla, A. (1999) ‘Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), pp. 7526–7531. doi: 10.1073/pnas.96.13.7526.

Liu, X. *et al.* (2005) ‘Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors’, *Nature Neuroscience*, 8(9), pp. 1179–1187. doi: 10.1038/nn1522.

Llorens-Bobadilla, E. *et al.* (2015) ‘Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury’, *Cell Stem Cell*, 17(3), pp. 329–340. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002>.

Ludwig, T. E. *et al.* (2006) ‘Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions’, *Nature Biotechnology*, 24(2), pp. 185–187. doi: 10.1038/nbt1177.

Mahabadi, V. *et al.* (2015) ‘In vitro differentiation of neural stem cells into noradrenergic-like cells.’, *International journal of molecular and cellular medicine*, 4(1), pp. 22–31.

Martin, M. J. *et al.* (2005) ‘Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid.’, *Nature medicine*, 11(2), pp. 228–232. doi: 10.1038/nm1181.

McKenna, A. *et al.* (2016) ‘Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing’, *Science*, 353(6298), p. aaf7907. doi: 10.1126/science.aaf7907.

Michaelidesová, A. *et al.* (2019) ‘Effects of Radiation Therapy on Neural Stem Cells’, *Genes*, 10(9). doi: 10.3390/genes10090640.

Mirzadeh, Z. *et al.* (2008) ‘Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the

ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain.’, *Cell stem cell*, 3(3), pp. 265–278. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.004.

Mizrak, D. *et al.* (2019) ‘Single-Cell Analysis of Regional Differences in Adult V-SVZ Neural Stem Cell Lineages’, *Cell Reports*, 26(2), pp. 394–406.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.044.

Morrison, S. J. and Kimble, J. (2006) ‘Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer.’, *Nature*, 441(7097), pp. 1068–1074. doi: 10.1038/nature04956.

Mortazavi, A. *et al.* (2008) ‘Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq’, *Nature Methods*, 5(7), pp. 621–628. doi: 10.1038/nmeth.1226.

Neumann, E. *et al.* (1982) ‘Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.’, *The EMBO journal*, 1(7), pp. 841–845.

Nguyen, A. *et al.* (2018) ‘Single Cell RNA Sequencing of Rare Immune Cell Populations’, *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01553.

Nichols, J. and Smith, A. (2009) ‘Naive and Primed Pluripotent States’, *Cell Stem Cell*, 4(6), pp. 487–492. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.015.

Niwa, H. *et al.* (1998) ‘Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3.’, *Genes & development*, 12(13), pp. 2048–2060. doi: 10.1101/gad.12.13.2048.

Obernier, K. *et al.* (2018) ‘Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation’, *Cell Stem Cell*, 22(2), pp. 221–234.e8. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.003.

Ottone, C. *et al.* (2014) ‘Direct cell–cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells’, *Nature Cell Biology*, 16(11), pp. 1045–1056. doi: 10.1038/ncb3045.

Pilz, G.-A. *et al.* (2018) ‘Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus’, *Science*, 359(6376), pp. 658–662. doi: 10.1126/science.aao5056.

Pineda, J. R. *et al.* (2013) ‘Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain.’, *EMBO molecular medicine*, 5(4), pp. 548–562. doi: 10.1002/emmm.201202197.

Reya, T. *et al.* (2001) 'Stem cells, cancer, and cancer stem cells.', *Nature*, 414(6859), pp. 105–111. doi: 10.1038/35102167.

Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1992) 'Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System', *Science*, 255(5052), pp. 1707–1710. doi: 10.1126/science.1553558.

Ribeiro Xavier, A. L. *et al.* (2015) 'A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone', *Journal of Neuroscience*, 35(34), pp. 11848–11861. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015.

Rohwedel, J. *et al.* (1998) 'Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro.', *Developmental biology*, 201(2), pp. 167–184. doi: 10.1006/dbio.1998.9002.

Rolando, C. *et al.* (2012) 'Distinct roles of Nogo-A and nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult neural stem cell function and neuroblast migration', *Journal of Neuroscience*, 32(49), pp. 17788–17799. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3142-12.2012.

Rowitch, D. H. and Kriegstein, A. R. (2010) 'Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification', *Nature*, 468(7321), pp. 214–222. doi: 10.1038/nature09611.

dos Santos Rodrigues, B. *et al.* (2019) 'Functionalized liposomal nanoparticles for efficient gene delivery system to neuronal cell transfection', *International Journal of Pharmaceutics*, 566(May), pp. 717–730. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.06.026.

Sarkis, C. *et al.* (2000) 'Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), pp. 14638–14643. doi: 10.1073/pnas.260472897.

Sawamoto, K. *et al.* (2006) 'New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain.', *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), pp. 629–632. doi: 10.1126/science.1119133.

Schmechel, D. E. and Rakic, P. (1979) 'A golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes', *Anatomy and Embryology*, 156(2), pp. 115–152. doi: 10.1007/BF00300010.

Scott, C. T. (2008) 'Stem cells: New frontiers of ethics, law, and policy', *Neurosurgical*

Focus, 24(3–4), pp. 1–4. doi: 10.3171/FOC/2008/24/3-4/E22.

Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M. and Fraser, S. E. (1989) ‘A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration.’, *Development (Cambridge, England)*, 106(4), pp. 809–816. doi: 10.1242/dev.106.4.809.

Seri, B. *et al.* (2001) ‘Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus’, *Journal of Neuroscience*, 21(18), pp. 7153–7160. doi: 10.1523/jneurosci.21-18-07153.2001.

Seri, B. *et al.* (2004) ‘Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus.’, *The Journal of comparative neurology*, 478(4), pp. 359–378. doi: 10.1002/cne.20288.

Shahriyari, L. and Komarova, N. L. (2013) ‘Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer?’, *PloS one*, 8(10), p. e76195. doi: 10.1371/journal.pone.0076195.

Shen, Q. *et al.* (2004) ‘Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells.’, *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675), pp. 1338–1340. doi: 10.1126/science.1095505.

Shin, J. *et al.* (2015) ‘Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis’, *Cell Stem Cell*, 17(3), pp. 360–372. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.013>.

Sobhani, A. *et al.* (2017) ‘Multipotent stem cell and current application’, *Acta Medica Iranica*, 55(1), pp. 6–23.

Sokolova, V. *et al.* (2012) ‘Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes’, *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6). doi: 10.1007/s11051-012-0910-9.

Solter, D. and Knowles, B. B. (1978) ‘Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1).’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(11), pp. 5565–5569. doi: 10.1073/pnas.75.11.5565.

Soltysova, A., Altanerova, V. and Altaner, C. (2005) ‘Cancer stem cells’, *Neoplasma*, 52(6), pp. 435–440.

Son, J. H., Min, N. and Joh, T. H. (1996) 'Early ontogeny of catecholaminergic cell lineage in brain and peripheral neurons monitored by tyrosine hydroxylase-lacZ transgene.', *Brain research. Molecular brain research*, 36(2), pp. 300–308. doi: 10.1016/0169-328x(95)00255-q.

Suda, Y. *et al.* (1987) 'Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential.', *Journal of cellular physiology*, 133(1), pp. 197–201. doi: 10.1002/jcp.1041330127.

Tachibana, M. *et al.* (2013) 'Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer', *Cell*, 153(6), pp. 1228–1238. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.006.

Takahashi, K. *et al.* (2007) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors', *Cell*, 131(5), pp. 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', *Cell*, 126(4), pp. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tang, Y., Yu, P. and Cheng, L. (2017) 'Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells', *Cell Death & Disease*, 8(10), pp. e3108–e3108. doi: 10.1038/cddis.2017.504.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987) 'Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.', *Cell*, 51(3), pp. 503–512. doi: 10.1016/0092-8674(87)90646-5.

Thomson, J. A. *et al.* (1998) 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.', *Science*, 282(5391), pp. 1145–1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.

Vogt, W. (1929) 'Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit Örtlicher Vitalfärbung : II. Teil. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren', *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 120(1), pp. 384–706. doi: 10.1007/BF02109667.

Wagner, D. E. and Klein, A. M. (2020) 'Lineage tracing meets single-cell omics: opportunities and challenges', *Nature Reviews Genetics*, 21(7), pp. 410–427. doi: 10.1038/s41576-020-0223-2.

Wen, L. and Tang, F. (2016) 'Single-cell sequencing in stem cell biology', *Genome Biology*,

17(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13059-016-0941-0.

Wobus, A. M. *et al.* (1984) ‘Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo.’, *Experimental cell research*, 152(1), pp. 212–219. doi: 10.1016/0014-4827(84)90246-5.

Wollebo, H. S., Woldemichaele, B. and White, M. K. (2013) ‘Lentiviral transduction of neuronal cells.’, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1078, pp. 141–146. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_12.

Yang, J., Plikus, M. V and Komarova, N. L. (2015) ‘The Role of Symmetric Stem Cell Divisions in Tissue Homeostasis.’, *PLoS computational biology*, 11(12), p. e1004629. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004629.

Young, S. Z., Taylor, M. M. and Bordey, A. (2011) ‘Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis’, *European Journal of Neuroscience*, 33(6), pp. 1123–1132. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07611.x.

Zerlin, M., Milosevic, A. and Goldman, J. E. (2004) ‘Glial progenitors of the neonatal subventricular zone differentiate asynchronously, leading to spatial dispersion of glial clones and to the persistence of immature glia in the adult mammalian CNS.’, *Developmental biology*, 270(1), pp. 200–213. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.02.024.

Zhang, X. *et al.* (2016) ‘Single-Cell sequencing for precise cancer research: Progress and prospects’, *Cancer Research*, 76(6), pp. 1305–1312. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1907.

Zhang, Y. *et al.* (2020) ‘Lineage tracing: technology tool for exploring the development, regeneration, and disease of the digestive system’, *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s13287-020-01941-y.

Zhu, W. *et al.* (2009) ‘Postischemic IGF-1 gene transfer promotes neurovascular regeneration after experimental stroke.’, *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(9), pp. 1528–1537. doi: 10.1038/jcbfm.2009.75.