

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Aneta Wróblová

Diferenciační potenciál buněk neurální lišty

Differential potential of neural crest cells

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 5. 2018

Podpis

Poděkování

Poděkování směřuji mému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph.D. za ochotu, odborné vedení a věcné připomínky. V neposlední řadě pak děkuji své rodině a nejbližším za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Neurální lišta je tranzientní struktura formující se v rámci procesu neurulace, záhy podstupuje změnu fenotypu během epitel-mezenchymální tranzice. Následně buňky neurální lišty delaminují a migrují kolektivně i individuálně do míst svého určení, kde diferencují v široký repertoár mezenchymálních i non-mezenchymálních buněčných typů.

Tato práce si klade za cíl prověřit skutečný diferenciační potenciál těchto buněk na základě klíčových *in vitro* experimentů. Buňky neurální lišty vykazují nejen vysoce migratorní chování, ale i znaky kmenovosti, a to svou multipotencí a sebeobnovovací kapacitou. Rovněž zodpovídám otázky buněčné potence na úrovni populace neurální lišty i podél anterior-posteriorní osy.

Bylo nezbytné objasnit podstatu událostí vedoucích k indukci, specifikaci, epitel-mezenchymální tranzici a migraci buněk neurální lišty, poněvadž jsou pro diferenciační potenciál těchto buněk rozhodující. Velkou roli jak v diferenciaci, tak i v předcházejících procesech hraje genová regulační síť zahrnující vzájemně se ovlivňující signální kaskády.

Studium chování a diferenciace migratorních i post-migratorních buněk neurální lišty je významné pro výzkum zabývající se regenerativní medicínou a dokonce i možnostmi léčby rakoviny či neurokristopatií.

Klíčová slova: neurální lišta, multipotence, migrace, diferenciace, kmenové buňky

Abstract

The neural crest is a transient structure formed during the neurulation which undergoes change of phenotype in the process of epithelial-mesenchymal transition. Subsequently, neural crest cells delaminate and migrate collectively and individually to their place of destination, where they differentiate into a broad repertoire of mesenchymal and non-mesenchymal cell types.

This thesis aims to examine true differential potential of these cells based on crucial *in vitro* experiments. Neural crest cells show not only high migration potential, but also stem cells characteristics like multipotency and self-renewal capacity. I also provide answers to questions about cellular potency at the level of neural crest population and along anterior-posterior axis.

It was necessary to clarify the essence of events leading to induction, specification, epithelial-mesenchymal transition and migration of neural crest cells, since they are crucial for their differentiation potential. A major role in differentiation as well as in previous processes plays the gene regulatory network which is comprised of mutually affecting signalling pathways.

Studying the behaviour of migratory and post-migratory neural crest cells is important for the research of regenerative medicine and even cancer and neurocristopathic treatment.

Key words: neural crest, multipotency, migration, differentiation, stem cells

Seznam zkratek

BMP	Bone morphogenetic protein	Kostní morfogenetický protein
CXCR	Chemokine	Chemokin
EDNRB	Endothelin receptor type B	Endotelinový receptor typu B
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	Zelený fluorescenční protein
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	Epitelo-mezenchymální tranzice
ENS	Enteric nervous system	Enterická nervová soustava
ET	Endothelin	Endotelin
FGF	Fibroblast growth factor	Fibroblastový růstový faktor
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor	Neurotrofický faktor odvozený od gliových buněk
GRN (GRN)	Gene regulatory network	Genová regulační síť
NL (NC)	Neural crest	Neurální lišta
Nrp	Neuropilin	Neuropilin
PNS	Peripheral nervous system	Periferní nervová soustava
RET	Receptor tyrosine kinase	Tyrozín kinázový receptor
Robo	Roundabout	
SDF	Stromal cell-derived factor	Faktor odvozený od stromálních buněk
Sema	Semaphorin	Semaforin
Shh	Sonic hedgehog	
TGF- β	Transforming growth factor	Transformující růstový faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endoteliální růstový faktor
Wnt	Wingless/Int-1	

Obsah

1. Úvod	1
2. Historické milníky.....	2
3. Evoluční původ neurální lišty.....	3
4. Vznik a vývoj neurální lišty.....	4
4.1 Indukce a specifikace.....	4
4.2 Epitelo-mezenchymální tranzice a delaminace.....	5
4.3 Migrace a diferenciace.....	6
4.3.1 Trupová oblast.....	6
4.3.2 Hlavová oblast.....	8
4.3.3 Srdeční oblast.....	9
4.3.4 Lumbosakrální a vagální oblast.....	10
5. Diferenciační potenciál.....	11
5.1 Problematika heterogenity populace buněk.....	11
5.2 Diferenciační potenciál na axiální úrovni.....	11
5.3 Diferenciační potenciál migratorních buněk.....	12
5.3.1 Buňky hlavové neurální lišty.....	13
5.3.2 Buňky trupové neurální lišty.....	14
5.3.3 Buňky srdeční a vagální neurální lišty.....	15
5.4 Diferenciační potenciál post-migratorních buněk.....	16
5.4.1 Buňky neurální lišty v kožní tkáni.....	17
5.4.2 Buňky neurální lišty v kostní dřeni a zadních kořenech míšních.....	17
5.4.3 Buňky neurální lišty ve střevní tkáni.....	18
5.4.4 Buňky neurální lišty v srdeční tkáni.....	19
5.4.5 Buňky neurální lišty v karotickém tělísku.....	19
5.4.6 Buňky neurální lišty v kraniofaciálních tkáních.....	20
5.4.6.1 Rohovka.....	20
5.4.6.2 Duhovka.....	21
5.4.6.3 Tvrdé patro.....	21
5.4.6.4 Dutina ústní.....	21
5.4.6.5 Zuby.....	22
6. Analogie buněk neurální lišty s nádorovými buňkami.....	23
7. Závěr.....	25
8. Seznam literárních zdrojů.....	26

1. Úvod

Neurální lišta je tranzientní struktura tvořená populací buněk, jež jsou formovány ve vyvíjejícím se embryu v oblasti na pomezí neurální destičky a non-neurálního ektodermu. Jedná se o strukturu ve své podstatě dosti unikátní, jelikož ve velké míře přispívá k vývinu obratlovců do podoby takové, jak ji dnes známe.

Buňky NL podstupují brzy po gastrulaci epitel-mezenchymální tranzici, což je proces, při němž dochází ke změně buněčného fenotypu, separaci a emigraci buněk z neurálního epitelu.

Následně buňky NL migrují kolektivně i individuálně následující stereotypní dráhy do cílových oblastí, v nichž se usadí, a jakožto progenitorové buňky dávají vznik mnoha typům derivátů. Buňky NL vykazují určitou míru samoobnovovací kapacity a jsou schopny diferencovat v široké spektrum buněčných typů, mezi než patří nervové buňky a glia periferní nervové soustavy, pigmentové a endokrinní buňky, dále buňky kostní a pojivové tkáně obličejové části a další.

Z těchto důvodů bývá NL označována za tzv. čtvrtý zárodečný list, přestože její původ je prokazatelně ektodermální.

Cílem této práce je získat všeobecný přehled o dané problematice a porozumět procesům, které vedou k indukci, epitel-mezenchymální tranzici, delaminaci, následné migraci a zejména schopnosti buněk diferencovat ve výše zmiňované buněčné typy, pochopit, jakou roli v tomto procesu hrají enviromentálními faktory, a na základě recentních *in vitro* experimentů pokud možno ozřejmit, co je pro diferenciační potenciál migratorních a post-migratorních buněk NL klíčové.

Rovněž je nezbytné objasnit otázky nastolené v posledních desetiletích, a to zda-li jsou buňky NL skutečně multipotentní, či je jejich potenciál omezen již v brzkém stádiu, a jakým způsobem je koordinována genová regulační síť řídící jejich chování.

Dále je na místě představit možný terapeutický potenciál progenitorových buněk neurální lišty pro léčebné aplikace, případně jako zdroj nových poznatků týkajících se chování buněk nádorových, s nimiž buňky NL sdílí jisté charakteristické znaky.

2. Historické milníky

NL byla poprvé popsána v kuřecím embryu v roce 1868 Wilhelmem Hisem, který uvedl její možný název „Zwischenstrang“, volně přeloženo jako „mezipruh“, což odkazuje na polohu buněk NL. Rovněž zaznamenal, že její buňky přispívají k tvorbě spinálních ganglií a nervových buněk želatinové substance šedé hmoty míšni (His, 1868).

Dalším průkopníkem v objevech spojených s NL byla Julia Platt, která přišla mimo jiné s teorií, že tyto buňky přispívají k tvorbě viscerální chrupavky kraniofaciálního a branchiálního oblouku a dentin formujících buněk zubů. Nicméně její práce se setkala s vlnou nesouhlasu, jež byla potlačena až o několik desítek let později (Platt, 1890; cit. dle Hall, 1988).

Do popředí zájmu vědců se NL dostala v roce 1950 zejména díky Svenu Hörstadiovi. V rámci rozvíjejícího se oboru experimentální embryologie byly prováděny extirpační experimenty pomáhající rozeznat deriváty vzniklé z buněk NL, a to nejčastěji ablací (Hörstadius, 1950; cit. dle Bronner a Simões-Costa, 2016). Experimenty využívající metody hybridizace a embryonální transplantace sledující například chování chromosomů pak zase umožnily pochopení základních migratorních vzorů (Twitty a Niu; 1948).

V druhé polovině dvacátého století zažívá výzkum zabývající se NL rozmach vlivem stále se zdokonalujících technik. Jednou z nich bylo vložení štěpů NL z ^3H -thymidinem značeného embrya do neznačeného hostitele, což umožnilo sledovat osud migrujících buněk (kupř. Weston, 1963). Zásadní převrat v identifikaci derivátů buněk NL způsobila technika izolace křepelčího neurálního primordia a následného vložení do kuřecího embrya. V důsledku rozdílné stavby křepelčího jadérka totiž můžeme tyto migrující buňky snadno rozlišit (Le Douarin a Teillet; 1973). V otázkách týkajících se diferenciačního potenciálu buněk se zase uplatňuje použití technik klonání analýzy (Obr. 6; Cohen a Konigsberg, 1975).

Od extirpačních experimentů (Hörstadius, 1950; cit. dle Bronner a Simões-Costa, 2016) přes techniky radioaktivního ^3H -thymidin (Weston, 1963) až po moderní tzv. confetti technologie značení (Baggiolini a kol., 2015) NL stále zůstává atraktivním tématem výzkumu.

3. Evoluční původ neurální lišty

NL nacházíme u všech obratlovců, její původ je však otázkou. Spadajíce do kmenu strunatců předchází obratlovcům podkmeny (souhrně nazývány *Protochordata*) pláštěnci, reprezentováni sumkami, a bezlebeční, reprezentováni kopinatcem, přičemž první z uvedených vykazují tělní plán strunatců pouze v larválním stádiu.

Z toho, co dnes víme, lze vyvodit, že *Protochordata* postrádají NL v užším slova smyslu, ačkoliv s obratlovcem sdílí nejen podobné morfologické znaky jako chordu, segmentovanou svalovinu a hřbetní nervovou trubici (Gans a Northcutt, 1983), ale i aspekty genové regulační sítě, jež jsou ve vývoji obratlovců ve značné míře konzervovány (Yu a kol., 2008).

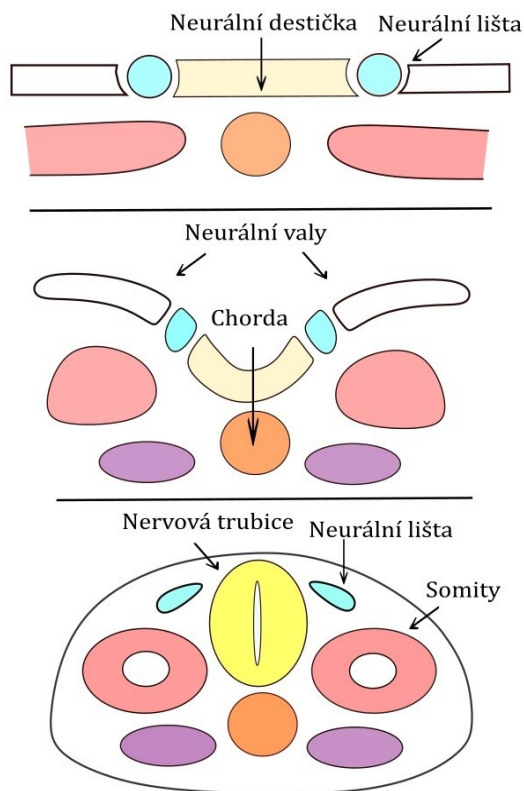
NL téměř jistě sehrála klíčovou roli v brzkém evolučním vývoji „nové hlavy“ obratlovců. Jak již víme, NL a epidermální plakody obratlovců dávají vznik mimo jiné mnoha senzoryckým i pojivovým strukturám. Je tedy možné nalézt určitou podobnost s NL v epidermální nervové síti *Protochordat*, která slouží ke kontrole funkce brv při přijímání potravy filtrací. Evoluční tranzice v obratlovce je spojena s přechodem od pasivního způsobu života k aktivní predaci. (Gans a Northcutt, 1983)

Nejnovější fylogenetické studie prezentují pláštěnce jakožto nejbližší skupinu obratlovců (Swalla a Smith, 2008). U pláštěnců dokonce nacházíme i buňky se schopností migrovat z nervové trubice a dávat vznik buňkám pigmentovým (Jeffery a kol., 2004), avšak přítomnost evolučních prekurzorů NL u předchůdců obratlovců je stále dosti diskutabilní.

4. Vznik a vývoj neurální lišty

4.1 Indukce a specifikace

Ektoderm obratlovců dává v průběhu procesu neurulace vznik třem strukturám, a sice neurální trubici, epidermis a NL (Obr. 1). Všeobecně uznávaný fakt tvrdí, že k indukci NL dochází v oblasti mezi neurální destičkou a non-neurálním ektodermem během gastrulace, k čemuž je zapotřebí tkáňová interakce mezi těmito dvěma strukturami (Rollhäuser-ter Horst, 1977). Na druhou stranu bylo prokázáno,



Obrázek 1.: Proces neurulace: Ektoderm a paraxiální mezoderm podílejí se na tvorbě neurální destičky. NL je umístěna mezi neurální destičkou a non-neurálním ektodermem. Dochází k fúzi neurálních valů a vzniku nervové trubice. Buňky NL nalezneme v dorzálním regionu nervové trubice, poté podstupují EMT, delaminaci a následnou migraci (upraveno dle Rollhäuser-ter Horst, 1977; Selleck a kol., 1993).

že u kuřecího embrya probíhá determinace NL ještě před samotným založením neurální destičky (Basch a kol., 2006). V minulosti nebylo snadné rozlišit indukci NL a neurální indukci zahrnující formování nervového systému, jejichž nezávislost dnes již osvětluje řada studií (Wawersick a kol., 2005).

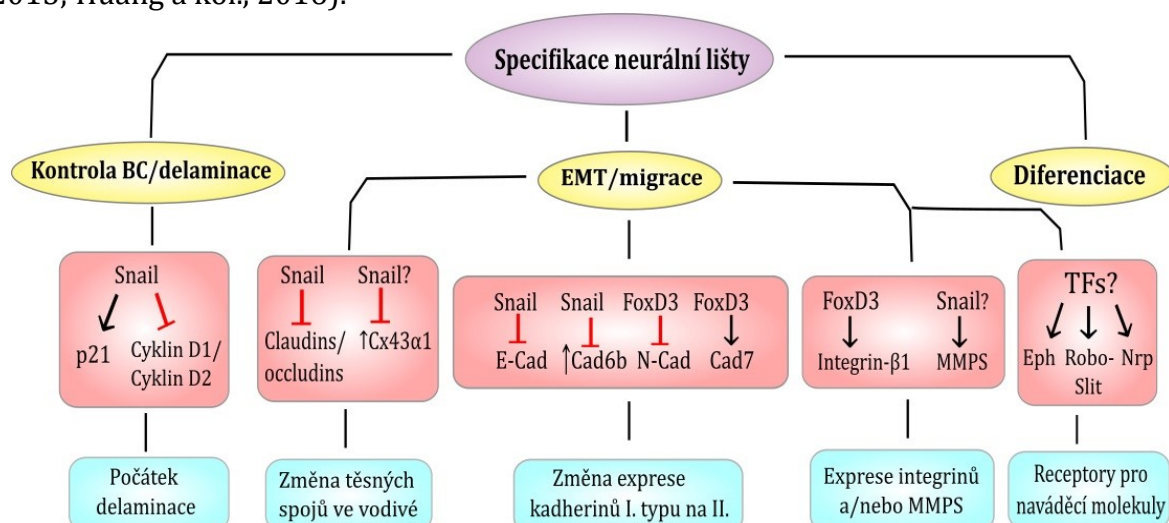
Při vzniku i vývoji NL hraje nezastupitelnou roli GRS zahrnující indukční signály, jmenovitě BMP, Wnt, FGF a Notch, jež ustanovují okraj neurální destičky upregulací transkripčních faktorů jako *Msx1/2*, *Pax3/7*, *AP-2*, *Zic*. Tyto specifikátory okraje neurální destičky zase upregulují geny jako *Slug/Snail*, *FoxD3*, *Id*, *c-Myc* a geny *SoxE* (shrnutí v Meulemans a Bronner-Fraser, 2004; Monsoro-Burq a kol., 2005). Dle mnoha studií byla za příčinu indukce považována reakce ektodermu na intermediární hladinu BMP, kterou určují antagonisté jako např. chordin a noggin (Marchant a kol., 1998). Dnes je však známo, že BMP, ač nesporně důležitý, nepůsobí sám (kupř. Endo a kol., 2012).

4.2 Epitelo-mezenchymální tranzice a delaminace

Jedná se o dva propojené a na sobě závislé procesy, leč jejich průběh a časová posloupnost je v rámci regionalizované struktury NL značně variabilní (kupř. Theveneau a kol., 2007). Jak je všeobecně známo, delaminací rozumíme odloučení vrstvy buněk, která se synchronně rozdělí a vytvoří uvnitř dutinu pro další migrující buňky.

Naproti tomu epitelo-mezenchymální tranzice je soubor molekulárně řízených procesů vedoucích ke změně fenotypu buněk z epitelového na mezenchymální. EMT je nutným předpokladem pro následnou buněčnou migraci a její průběh je pro diferenciační potenciál buněk NL zcela klíčový. Tento proces zahrnuje cytoskeletální přeskupení, rozvolnění buněčných spojů, ztrátu apikálně-bazální polarity buněk, kontrakci buněčného protažení, rozpad bazální laminy a změny v buněčné adhezi (Ahlstrom a Erickson, 2009; shrnuto v Thiery a kol., 2009).

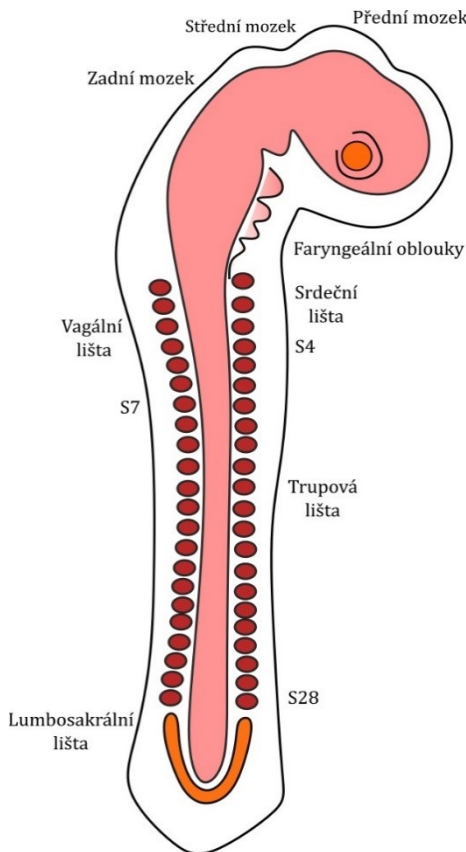
Zahájení EMT probíhá vlivem a vzájemnou interakcí extracelulárních signálů jako např. BMP, jenž je modulován nogginem (Sela-Donnenfeld a Kalcheim, 1999), a Wnt (Burstyn-Cohen a kol., 2004). Dále pak se na tomto procesu podílí také komponenty extracelulární matrix jako kyselina hyaluronová (Zoltan-Jones a kol., 2003), které naopak regulují expresi transkripčních faktorů, konkrétně Snail1, Snail2 (Barrallo-Gimeno a Nieto, 2005), FoxD3 (Fairchild a kol., 2014) a další. Vliv těchto faktorů zapříčiňuje výše jmenované změny (Obr. 2). Důležitým hybatelem je rovněž změna exprese transmembránových proteinů kadherinů, která je napříč druhy obratlovců i fázemi migrace variabilní, vzhledem k tomu, že je zodpovědná za kontaktní inhibici (Scarpa a kol., 2015; Huang a kol., 2016).



Obrázek 2.: Specifikace NL: Buňky podstupují EMT, indukci vstupu do S-fáze buněčného cyklu umožňující delaminaci a následně i migraci (upraveno dle Sauka-Spengler a Bronner-Fraser, 2008).

4.3 Migrace a diferenciaci

Po specifikaci buňky NL delaminují a migrují z dorzálního regionu nervové trubice do cílových míst. Samotná migrace probíhá u savců během uzavírání nervové trubice, které postupuje v rostro-kaudálním směru (Nichols, 1981), zatímco u ptáků až po jejím uzavření (Selleck a Bronner-Fraser, 1995). Naproti tomu u ryb je migrace uskutečněna



Obrázek 3.: Regionalizace NL podle úrovně somitů (upraveno dle Gilbert, 2013).

pomocí ztlustění na pomezí neurální destičky a epidermis (Sadaghiani a Vielkind, 1989). NL je možné regionalizovat uvedeným způsobem (Obr. 3).

4.3.1 Trupová oblast

Buňky této oblasti u ptáků a savců migrují ve dvou proudech, a sice ventrální cestou přes anteriorní část sklerotomů, přičemž takto migrující buňky jsou prekurzory pro sympatická a spinální ganglia a gliové buňky, a cestou dorzolaterální mezi somity a ektodermem pak migrují presumptivní pigmentové buňky kolonizující epidermis (Rickmann a kol., 1985; Weston, 1963).

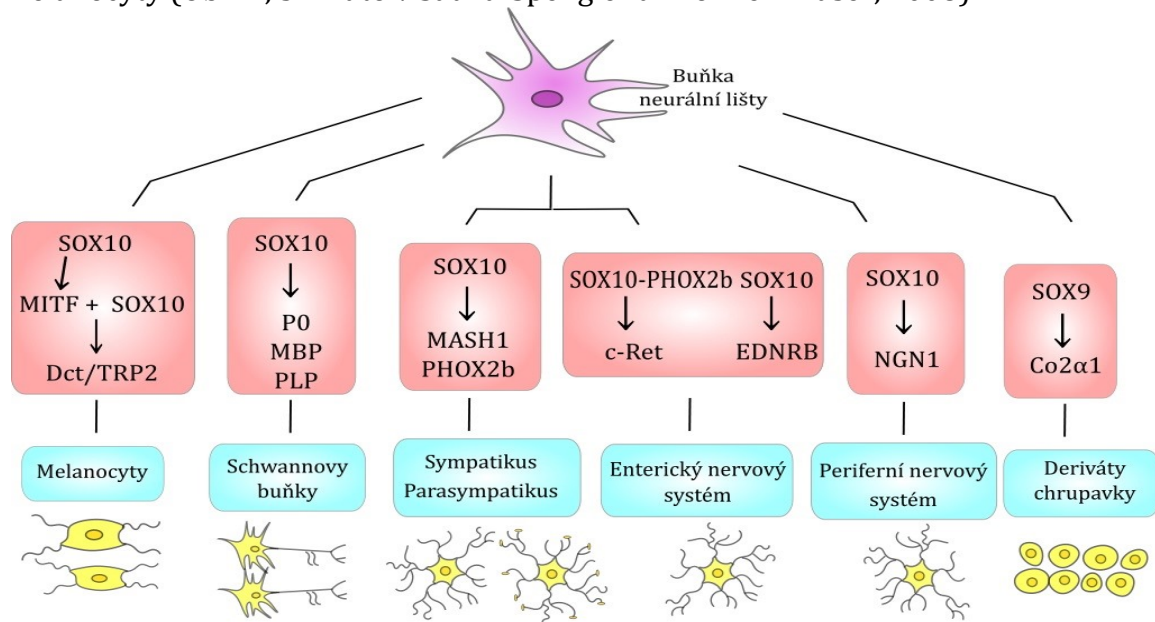
U obojživelníků tyto buňky migrují nejčastěji mezi somitem a nervovou trubicí, minoritně pak i laterálně (Collazo a kol. 1993), zatímco u ryb je tatáž migratorní cesta doplňována druhou, která prochází mezi somity a ektodermem (Raible a kol., 1992).

Pro správný průběh migrace je vyžadována interakce mezi buňkami a jejich prostředím.

Signalizační dráha zahrnující receptory Eph rodiny a ephrinové ligandy vymezuje cestu buněk migrujících ventrálně, jakož i podněcuje migraci melanoblastů v pozdní dorzolaterální vlně (Santiago a Erickson, 2002). Další ze zapojených drah sestává z ligandu Sema-3F a receptoru Nrp-2 navádějící buněčnou migraci přes anterior sklerotomů (Gammill a kol., 2006). V neposlední řadě dermatomyotom exprimuje ligand Slit a časně migrující buňky zase receptor Robo, jejichž vzájemná interakce takto zamezuje průniku buněk v dorzolaterálním směru (Jia a kol., 2005).

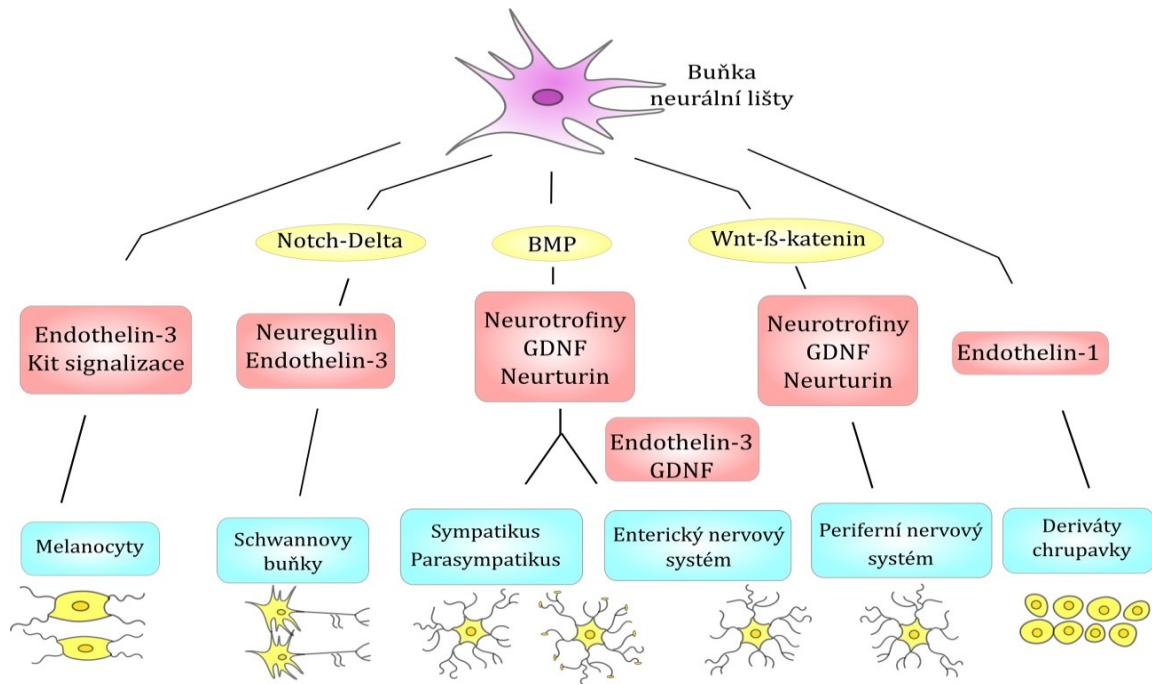
Signalizace ale zdaleka není jen represivní, ventrálně migrující buňky oblasti trupu vykazují chemotaktické chování v závislosti na interakci exprimovaného CXCR4 receptoru a ligandu SDF-1 (Kasemeier-Kulesa a kol., 2010).

Proces diferenciace je podmíněn přítomností tzv. genových baterií, což jsou sady genů udělující buňkám identitu. Ty jsou aktivovány transkripčními faktory, z nichž za zmínku stojí SoxE rodina zahrnující např. Sox10, jenž je nezbytný pro diferenciaci v neurony, glia a melanocyty (Obr. 4; shrnuto v Sauka-Spengler a Bronner-Fraser, 2008).



Obrázek 4.: Ilustrační schéma vybraných transkripčních faktorů zahrnutých v diferenciaci buněk NL (upraveno dle Sauka-Spengler a Bronner-Fraser, 2008).

BMP exprimovaný v oblasti dorzální aorty je kritický pro specifikaci buněk sympatoadrenální linie (Saito a kol., 2012), zatímco Wnt/ β -katenin signalizace je spojována s diferenciací sensorických neuronů (Obr. 5; Lee a kol., 2004). K produkci glií namísto neuronů jsou progenitorové buňky instruovány vlivem Notch/Delta a Neuregulin signalizace, a to i v přítomnosti BMP, jenž silně indukuje neuronální diferenciaci (Obr. 5; Kubu a kol., 2002). Pro specifikaci pigmentových buněk je vyžadováno působení Kit signalizace v kombinaci s Wnt a MITF a Sox10 faktory (Obr. 4 a 5; Parichy a kol., 1999; Greenhill a kol., 2011), a rovněž ET-3, který je kritický pro diferenciaci nejen pigmentových, ale i gliových buněk (Obr. 5; Trentin a kol., 2004). Tyto faktory hrají roli i v diferenciaci buněk pigmentových z prekursorů Schwannových buněk perzistujících v oblasti periferních nervů, což poukazuje nejen na existenci bipotentních progenitorových buněk pro tyto dva buněčné typy, ale i mimořádné melanocytární deriváty buněk migrujících původně ventrální cestou (Adameyko a kol., 2009).



Obrázek 5.: Ilustrační schéma vybraných signálů zprostředkujících diferenciaci buněk NL (upraveno dle Sauka-Spengler a Bronner-Fraser, 2008).

4.3.2 Hlavová oblast

Buňky hlavové NL se významně podílejí na stavbě hlavy obratlovců a diferencují ve značně široké spektrum buněčných typů – chondrocyty, osteocyty, melanocyty, myocyty, myofibroblasty, odontoblasty, nervové a gliové buňky PNS (Le Lièvre a Le Dourain, 1975). Buňky této oblasti migrují ve třech hlavních proudech. První z nich, nesoucí název trigeminální, je utvářen buňkami původem z předního a středního mozku a prvních dvou rhombomer zadního mozku, které osidlují mandibulární oblouk. Druhý proud tvoří buňky čtvrté rhombomery kolonizující hyoidní oblouk. Třetí a čtvrtý faryngeální oblouk je osídlen proudem buněk ze šesté a sedmé rhombomery (Lumsden a kol., 1991). Buňky oblasti třetí a páté rhombomery majoritně podléhají apoptóze, kdežto zbylé buňky přispívají malou měrou k ostatním proudům (Ellies a kol., 2002).

V probíhajícím vývoji NL hrají mnohdy tytéž signály odlišnou roli, jak můžeme pozorovat na příkladu Eph/ephrin signalizace, jež se významně podílí na segregaci migrujících buněčných proudů (Mellott a Burke, 2008). Utlumení dříve zmiňované signalizace Sema-3F a Nrp-2 by nadto vyústilo v osídlování jinak bezbuněčných zón či v abnormálně migrující proudy buněk (Gammill a kol., 2007). Obdobný efekt vyvolává i inhibice CXCR4/SDF-1 signalizace (Killian a kol., 2009).

Jakmile buňky dorazí na místo určení, je nezbytné zajistit správné osídlení. Významným chemoatraktantem zahrnutým v tomto kroku je VEGF, ligand receptoru NRP-1, který podněcuje osídlení druhého faryngeálního oblouku (McLennan a kol., 2010). Diferenciace buněk hlavové NL je specifická, neboť dává vznik jak mezenchymálním, tak i non-mezenchymálním derivátům (Le Lièvre a Le Dourain, 1975). Jednu z hlavních úloh přitom zastává signalizace FGF a TGF- β , jelikož je nezbytná pro diferenciaci, přežití buněk i proliferaci (Sasaki a kol., 2006), podobně jako signalizace BMP pro buněčnou specifikaci (Schumacher a kol., 2011). Je známo, že koncentrační gradient ET-1 ovlivňuje diferenciaci v buňky kostní, chrupavčité a pojivové tkáně (Obr. 5; Miller a kol., 2003). Pro specifikaci chondrogenní linie je taktéž zapotřebí faktor Sox9 (Obr. 4; Mori-Akiyama a kol., 2003). Jeong a kol. (2004) dále prokázali nepostradatelnost Shh signalizace pro celistvý kraniofaciální vývoj a tvorbu skeletogenních a chondrogenních struktur.

4.3.3 Srdeční oblast

Srdeční oblast NL rozkládající se na pomezí hlavové NL a trupu je významná pro evoluční proces tvorby kardiovaskulárního systému obratlovců.

Tyto buňky migrují přes cirkumfaryngeální hřbet a postupně kolonizují třetí, čtvrtý a šestý faryngeální oblouk v uvedeném pořadí (Kuratani a Kirby, 1992), kde tvoří buňky pojivové tkáně, neurony, glia, kardiomyocyty, buňky hladkého svalstva a melanocyty (Le Lièvre a Le Dourain, 1975). Nepostradatelnou funkci mají při zakládání bilaterálně symetrických artérií faryngeálních oblouků, jež jsou základem velkých cév (Bookman a kol., 1987). Ve výtokovém oddílu pak tvoří ganglia a část aortopulmonálního septa (Waldo a kol., 1998; Bajolle a kol., 2008).

Signalizace semaforin/Nrp a plexin zastává svou úlohu v řízení a navádění migrace buněk srdeční lišty do cílových míst (Toyofuku a kol., 2008), v interakci s VEGF je také esenciální v procesu angiogeneze (Gu a kol., 2003). Byl rovněž prokázán chemoatraktivní účinek CXCR4/SDF-1 a FGF-8 signalizace na migrující buňky srdeční NL (Sato a kol., 2011; Escot a kol., 2013). Pro výstavbu výtokového oddílu je vyžadována přítomnost N-kadherinu (Luo a kol., 2006), a zároveň i působení signálů Notch a BMP, jejichž vliv je pro indukci a úspěšné dokončení diferenciace v buňky hladkého svalstva nepostradatelný (Monzen a kol., 2002; High a kol., 2007). Negativní dopad na diferenciaci buněk srdeční NL má mimo jiné kombinace nadměrné exprese homocysteinu a nedostatku folátu (Boot a kol., 2003).

4.3.4 Lumbosakrální a vagální oblast

Buňky vagální oblasti, ležící mezi somity 1-7, a lumbosakrální oblasti, ležící posteriorně od 28. somitu (Obr. 3), kolonizují střevo a generují enterická ganglia (Le Douarin a Teillet, 1973). Vagální buňky migrují ve dvou hlavních proudech, přičemž první z nich je původcem srdeční lišty směřujícím dorzolaterálně do faryngeálních oblouků přes cirkumfaryngeální hřbet (Kuratani a Kirby, 1992), a taktéž menšiny buněk pokračujících dále v migraci do střeva, v jejichž separaci se uplatňuje vliv CXCR4/SDF-1 (Escot a kol., 2013). A konečně druhý proud buněk migruje ventrální cestou a kolonizuje tak střevo (Le Douarin a Teillet, 1973).

Buňky vagální NL kolonizující střevo jsou mimo jiné schopné migrovat do plic a formovat zde ganglia formovaná neurony a gliovými buňkami (Burns a Delalande, 2005).

Migraci vagálních buněk řídí ligand Slit-2 exprimovaný ve střevě, který zároveň brání vstupu buňkám trupové lišty produkujících receptory Robo. Na tomto příkladě prezentujeme dvojí funkci ligandu Slit-2, jenž v oblasti trupové lišty působí na migrující buňky stimulativně (De Bellard a kol., 2003). Tvorba funkční ENS je podmíněna nejen migrací buněk NL, ba i jejich proliferací, jež je hnacím motorem kolonizace a předchází samotné diferenciaci (Simpson a kol., 2007). V koordinaci všech těchto procesů se uplatňuje interakce mezi GDNF, ET-3 a BMP (Obr. 5), již zmiňovaný GDNF aktivuje mimo jiné receptor RET exprimovaný enterickými prekurzory neurální lišty (O'Donnell a Puri, 2008).

ET-3 a jeho receptor EDNRB podporují samotnou proliferaci buněk NL na úkor spuštění diferenciaci v neurony, a stanovují tak kritickou rovnováhu mezi dozrívající proliferací a počátkem diferenciaci (Obr. 5; Nagy a Goldstein, 2006). BMP signalizace má pleiomorfni účinky, v interakci s nogginem například ovlivňuje poměr buněk diferencujících v neurony či gliové buňky (Chalazonitis a kol., 2011), podobně jako transkripční faktory Sox10 a PHOX2B (Obr. 4; Nagashimada a kol., 2012).

5. Diferenciační potenciál

5.1 Problematika heterogenity populace buněk

V posledních letech nastolujeme na poli studia vývoje NL otázky týkající se potenciálu dané buněčné populace. Není tomu tak dávno, co tato oblast budila značnou kontroverzi, některé studie totiž uvádí buňky NL jako populaci, jejíž potenciál byl omezen ještě před zahájením migratorní fáze. V tomto modelu se předpokládá, že každá z buněk dává vznik určitému buněčnému typu (kupř. Krispin a kol., 2010). Existuje taktéž nepřeborné množství studií dokazujících multipotenci těchto buněk, jejichž diferenciační potenciál je vymežován migratorními cestami vedoucími k cílovému místu a působícími enviromentálními faktory, a to jak na úrovni jednotlivých buněk (Bronner-Fraser a Fraser, 1988), tak v rámci celé populace (Baggiolini a kol., 2015).

Schopnost buněk NL diferencovat v několik buněčných typů vedla k předpokladu, že tyto buňky vykazují znaky kmenovosti. Dnes je již populace buněk NL pokládána za heterogenní směsici buněk s rozdílným diferenciačním potenciálem, jenž je proměnný nejen v průběhu migrace, ale i na axiální úrovni, a v níž dominuje podíl buněk multipotentních vykazujících určité charakteristiky kmenových buněk, ačkoliv tento fakt nadále zůstává předmětem diskuzí (Baggiolini a kol., 2015).

Stemple a Anderson (1992) jako první veřejnosti představili důkaz existence buněk NL s vlastnostmi kmenových buněk a sebeobnovovací schopností, která je ovšem limitovaná, nejedná se tedy o kmenové buňky v pravém slova smyslu. V současnosti je již prokázáno, že tyto kmenové buňky přetrvávají v adultních tkáních a představují alternativu pro použití v regenerativní medicíně, o čemž hovořím v nadcházejících kapitolách.

5.2 Diferenciační potenciál na axiální úrovni

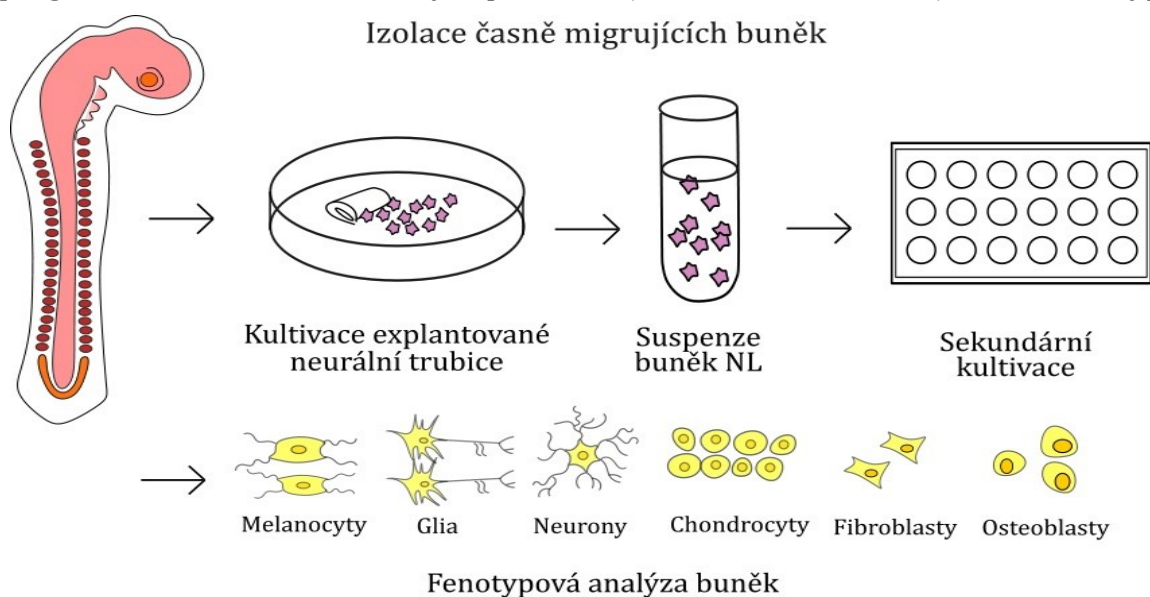
Heterogenita diferenciačního potenciálu buněk NL se projevuje nejen v celkové populaci, ale i mezi jednotlivými regiony podél anterior-posteriorní osy. Transplantační experimenty zaměřující populace buněk jednotlivých regionů odhalily, že osud buněk NL není fixován na neurální primordium, ale závisí na enviromentálním prostředí a signálech (shrnuto v Bronner a Simões-Costa, 2016). Transplantované buňky tak byly často schopny derivovat širší repertoár buněk než jim za běžných podmínek v původním prostředí přísluší (kupř. Schweizer a kol., 1983). Diferenciační potenciál buněk NL podél anterior-posteriorní osy lze tedy považovat za značně plastický.

V některých případech je ale repertoár derivovaných buněk podél osy omezen. Jak již víme, buňky hlavové NL mají schopnost odvozovat jak mezenchymální, tak i non- mezenchymální deriváty. Na druhou stranu buňky trupové oblasti s nimi tuto schopnost nesdílí nejen za přirozených podmínek, nýbrž i po transplantaci do oblasti hlavové lišty bez přímého ovlivnění enviromentálních faktorů daného prostředí (Lwigale a kol., 2004). Avšak mezenchymální potenciál buněk trupové lišty je v dnešní době předmětem diskuzí (Kague a kol., 2012), a to i z toho důvodu, že například původ fibroblastů vyskytujících se v savčím sedacím nervu je připisován trupovým buňkám (Joseph a kol., 2004).

V následujících kapitolách se budu podrobně věnovat schopnosti a ochotě buněk NL diferencovat v jednotlivé buněčné typy, jak bylo doposud zmapováno pomocí *in vitro* experimentů, a faktory toto ovlivňující.

5.3 Diferenciační potenciál migratorních buněk

Sledovat přirozený osud buněk NL nám dovolují *in vivo* techniky, zatímco díky experimentům provedeným *in vitro* jsme schopni vyhodnotit skutečný diferenciační potenciál buněk. V rámci *in vitro* experimentů jsou buňky vystaveny přesně definovanému prostředí za přítomnosti daných faktorů, což vede k odhalení kombinací signálů ovlivňujících diferenciační potenciál (Obr. 6; Cohen a Konigsberg, 1975). V důsledku využití těchto technik se diferenciační potenciál buněk NL pokládá za velmi plastický, jelikož je *in vitro* možné již specifikované deriváty dediferencovat v progenitorové stádium a za daných podmínek je transdiferencovat v jiné buněčné typy.

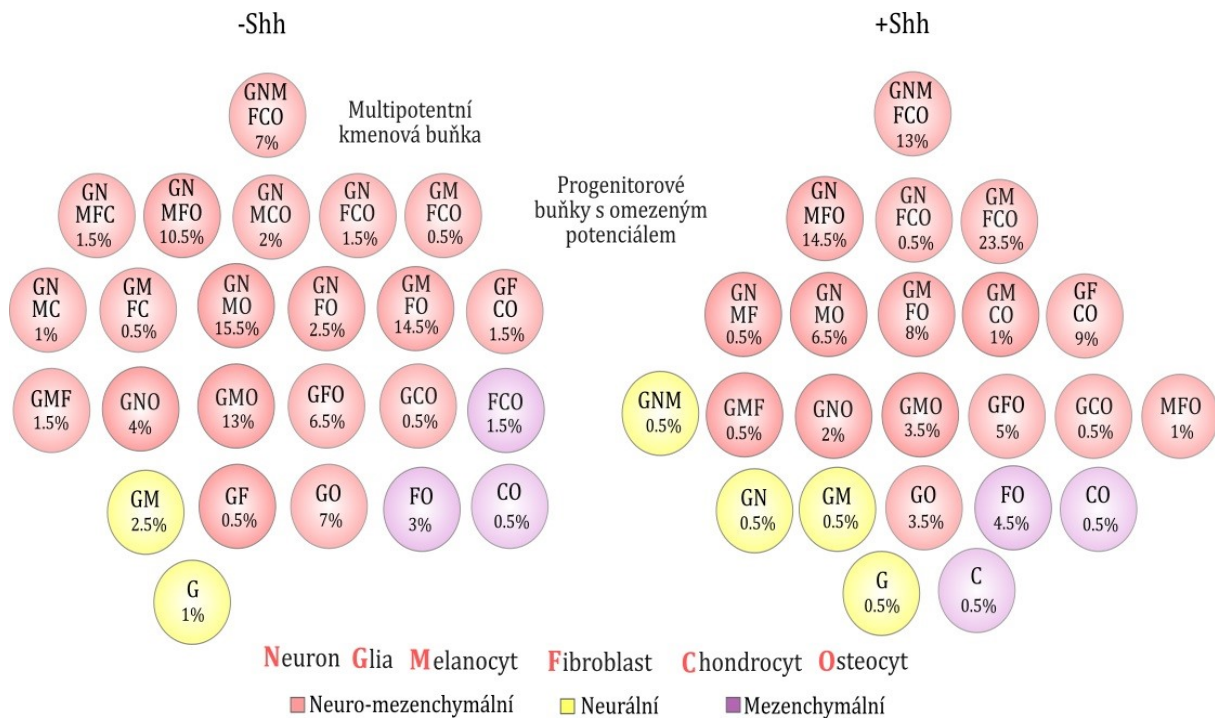


Obrázek 6.: *In vitro* klonální techniky sloužící k rozpoznání diferenciačního potenciálu buněk NL (upraveno dle Calloni a kol., 2007; Dupin a Sommer, 2012).

5.3.1 Buňky hlavové neurální lišty

V době poměrně nedávné způsobil revoluci objev multipotentních progenitorových buněk hlavové lišty nesoucích název GNMFCO (tzn. glia – neurony – melanocyty – fibroblasty – chondrocyty – osteoblasty), jež se vyznačují schopností derivovat mezenchymální i non-mezenchymální buněčné typy (Obr. 7).

V současnosti je hojně diskutován jejich kmenový potenciál (Calloni a kol., 2009).



Obrázek 7.: Model segregace progenitorové buněčné linie hlavové NL pod vlivem Shh: Postupná determinace multipotentních kmenových buněk diferencujících jak v mezenchymální, tak i non-mezenchymální deriváty, přičemž progenitorové buňky s kombinací obou typů zřetelně převažují (upraveno dle Calloni a kol., 2009).

Chondrogenní potenciál buněk hlavové lišty byl *in vitro* podrobně zkoumán Callonim a kol. (2007), kteří zjistili, že chondrocyty jsou ve většině případů derivovány z multipotentních či alespoň bipotentních progenitorových buněk. Chondrogenní potenciál je proměnný v závislosti na migratorní fázi, pozdě migrující buňky totiž mnohem ochotněji diferencují v neurální a pigmentové deriváty (Calloni a kol., 2007).

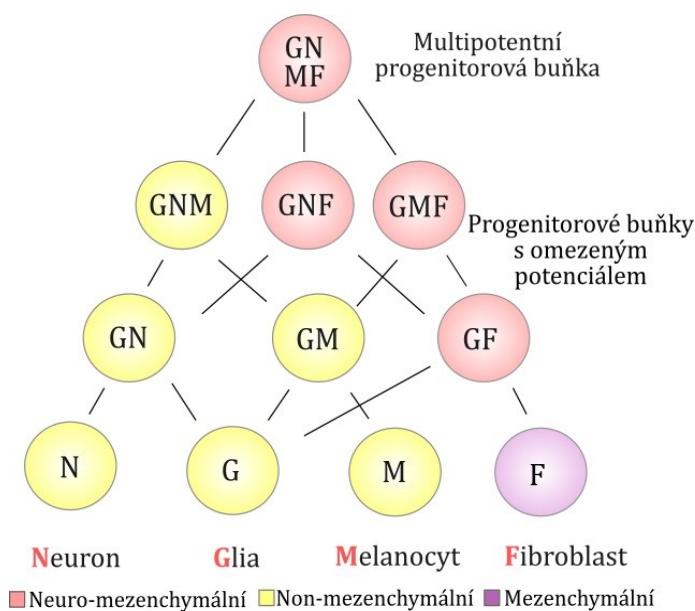
V navazující práci byl prověřován i skeletogenní potenciál těchto buněk. Kraniální buňky běžně diferencují ve dvojí typ osteoblastů, a sice endochondrální, jež jsou vázané na přítomnost chondrocytů, a dermální. Na základě klonálních experimentů lze tvrdit, že progenitorové buňky s variabilním podílem neuro-mezenchymálního potenciálu v kolonii dominují oproti buňkám se striktně omezeným potenciálem (Obr. 7).

Kromě multipotentních progenitorových GNMFCO buněk, jež stojí v segregáční hierarchii na vrcholu, byly identifikovány tři typy skeletogenních progenitorů – z nich převažuje onen výhradně osteogenní, v menší míře pak čistě chondrogenní a kombinace obou (Calloni a kol., 2009).

Calloni a kol. (2007 a 2009) ve svých pracích prokázali význačný vliv morfogenu Shh na diferenciační potenciál buněk hlavové lišty. Prvním z důsledků jeho působení je prokazatelné zvýšení podílu progenitorů GNMFCO v kolonii, pozitivně ovlivňuje taktéž počet progenitorových buněk fibroblastů, chondrocytů a endochondrálních osteoblastů, zatímco neurálně-pigmentový potenciál je v přítomnosti Shh spíše potlačován (Obr. 7).

5.3.2 Buňky trupové neurální lišty

Následující prvotní experimenty Cohena a Konigsberga (1975), jež vedly k objevu progenitorů pro melanocyty i nepigmentové buňky, identifikovali Trentin a kol. (2004)



Obrázek 8.: Model segregace progenitorové buněčné linie trupové NL (upraveno dle Trentin a kol., 2004).

vysoce multipotentní progenitorové buňky trupové NL derivující glia, neurony, melanocyty a fibroblasty (GNMF), jejichž postupnou lineární segregaci pozorujeme na obrázku 8.

Mezenchymální potenciál buněk trupové NL byl pro vědce zabývající se studiem NL odjakživa atraktivním tématem. Přestože buňky trupové NL v přirozených podmínkách derivují s výjimkou fibroblastů sedacího nervu pouze non-mezenchymální buněčné typy, v současné době již není tajemstvím,

že v definovaných *in vitro* kulturách tyto buňky nabývají schopnosti diferencovat i v mezenchymální deriváty, a to jmenovitě v adipocyty (Billon a kol., 2007), chondrocyty (Calloni a kol., 2007) i osteoblasty (McGonell a Graham, 2002), ačkoliv ve značně omezené míře.

V oblasti trupu Calloni a kol. (2007) prokázali existenci ne zcela běžných progenitorových buněk s potenciálem derivovat glia, fibroblasty a chondrocyty. Na tomto místě je nutno poznamenat, že jak v hlavové, tak i v trupové části NL dosud nebyl prokázán vznik mezenchymálních derivátů ze samostatných prekurzorů (Calloni a kol., 2007; 2009). Pozoruhodné rovněž je, že mezi všemi těmito progenitory dodnes nebyl nalezen takový, který by byl zcela zbaven schopnosti generovat buňky gliové.

Dlouhou dobu panovalo přesvědčení, že buňky pigmentové linie jsou ve svém potenciálu omezeny již před počátkem migratorní fáze, předešlé studie však dokazují schopnost derivovat melanocyty i z multipotentních progenitorů (Trentin a kol., 2004; shrnuto v Dupin a Sommer, 2012).

5.3.3 Buňky srdeční a vagální neurální lišty

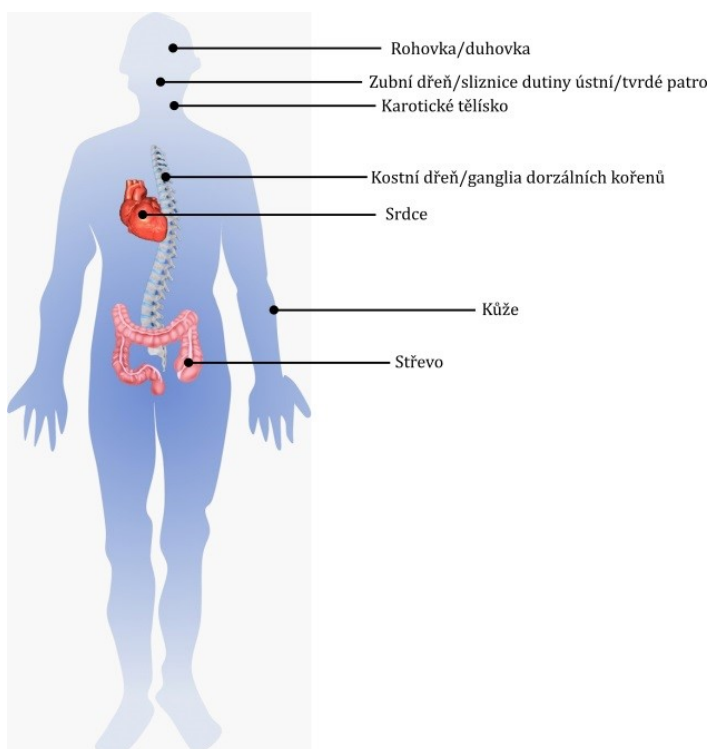
I diferenciační potenciál srdeční lišty byl prověřován, ačkoliv ve značně omezené míře oproti předešlým regionům. Klíčová studie Youn a kol. (2003) veřejnosti představila existenci multipotentní srdeční progenitorové buňky derivující neurony, chondrocyty, glia, myofibroblasty a melanocyty, spolu s dalšími na potenciálu omezenými prekurzory derivujícími buňky svalové linie ať už samostatně, či v kombinaci s řídce se vyskytujícími chondrocyty a gliovými buňkami.

Co se týče buněk vagální NL generujících enterická glia a neurony, předpokládá se majoritní výskyt buněk multipotentních schopných derivovat obojí buněčné typy na základě působení kombinace daných signálů oproti progenitorům s omezeným potenciálem (Natarajan a kol., 1999).

I přes výše zmíněné by si výzkum migratorních buněk srdeční i vagální lišty zasloužil více pozornosti v otázce diferenciačního potenciálu, jelikož recentní studie podstatně schází, podrobněji se budu věnovat diferenciačnímu potenciálu post- migratorních buněk všech těchto regionů v následující kapitole.

5.4 Diferenciační potenciál post-migratorních buněk

Jak již bylo řečeno, diferenciační potenciál buněk NL je pokládán za poměrně plastický, tento fakt je podložen mimo jiné schopností zpětné *in vitro* dediferenciace již určených buněk a jejich následnou transdiferenciací v rozličné buněčné typy. Takovým případem jsou např. melanocyty a Schwannovy buňky vyznačující se nestabilním buněčným fenotypem, což bylo dokázáno ve studii Dupin a kol. (2003). Zmíněné buňky jsou totiž schopny *in vitro* pod vlivem ET-3 dediferencovat v bipotentní glio-melanocytární progenitory a znovu diferencovat v obojí buněčné typy. Následující studie Real a kol. (2006) potvrdila schopnost pigmentových buněk transdiferencovat v glia a myofibroblasty, a zároveň dediferencovat v multipotentní progenitorové buňky schopné sebeobnovy. Recentní studie Greene a kol. (2015) zase prokázala transdiferenciační potenciál u buněk chrupavčitých, jež jsou *in vitro* schopny diferenciaci v buňky neurální linie.



Obrázek 9.: Schematické znázornění zdrojových oblastí kmenových buněk NL (upraveno dle Liu a Cheung, 2016).

Multipotentní kmenové buňky neurální lišty vykazující určitý samoobnovovací potenciál se vyskytují nejen ve vyvíjejícím se embryu, ale setrvávají rovněž i ve specifických tkáních dospělého organismu, a to jmenovitě ve střevě, kůži, v zubní dřeni a parodontálních vazech, i v dřeni kostní, v zadních kořenech míšních, v srdci, dutině ústní a v karotickém tělísku (Obr. 9; shrnuto v Liu a Cheung, 2016).

Ve snaze prověřit diferenciační potenciál buněk NL odvozených z těchto tkání představuji v následující části vybrané *in vitro* experimenty provedené na kmenových buňkách z daných tkání izolovaných.

5.4.1 Buňky neurální lišty v kožní tkáni

Identifikace kmenových buněk perzistujících v kůži adultního organismu jakožto nejsnadněji izolovatelných z buněk byla průlomová. Jako první byly v kůži faciální oblasti objeveny tzv. kožní prekursorové buňky setrvávající ve vlasových folikulech a dermálních papilách. Bylo zjištěno, že tyto buňky vykazují sebeobnovovací kapacitu, exprimují markery embryonálních buněk NL a *in vitro* formují tzv. sféroidy, což je adherentní seskupení buněk kmenových a progenitorových, derivující neurony, buňky hladkého svalstva, glia a melanocyty (Fernandes a kol., 2004).

Další populací kmenových buněk odvozených z NL perzistujících v kožní tkáni jsou tzv. kmenové buňky epidermální, jež byly nalezeny ve folikulech hmatových chlupů u myši. Tyto buňky se vyznačují podobnými vlastnostmi jako kožní prekursorové buňky a jsou obdobně schopné derivovat *in vitro* mnoho buněčných typů charakteristických pro NL jako např. melanocyty, glia, neurony, buňky hladkého svalstva, chondrocyty a myofibroblasty (Sieber-Blum a kol., 2004; Nagoshi a kol., 2008).

Výskyt lidských epidermálních kmenových buněk vlasových folikul byl rovněž zaznamenán. Hlavní uplatnění by pravděpodobně mohly nalézt mimo jiné v léčbě míšních zranění, periferních nervů a regeneraci kostní tkáně vzhledem k tomu, že je možné u nich *in vitro* indukovat diferenciaci mnoha buněčných typů příznačných pro NL. Nicméně užití jak buněk epidermálních, tak kožních prekursorových je stále velkou neznámou a je potřeba dalších *in vivo* experimentů (kupř. Clewes a kol., 2011; Sakaue a Sieber-Blum, 2015).

5.4.2 Buňky neurální lišty v kostní dřeni a zadních kořenech míšních

Kmenové buňky původem z NL setrvávající v kostní dřeni, zadních kořenech míšních a rovněž i ve folikulech hmatových chlupů lze izolovat z transgenní myši nesoucí NL- specifickou expresi P0-Cre/Floxed-EGFP a Wnt1-Cre/Floxed-EGFP pomocí průtokové cytometrie, z tohoto důvodu zde prověříme diferenciační potenciál všech těchto tkání zároveň. Tyto *in vitro* kultivované a sféroidy formující buňky projevují schopnost derivovat neurony, glia a myofibroblasty, přičemž ony tripotentní progenitorové buňky pocházely majoritně z oblasti zadních kořenů míšních (74.6%), jež vykazují i nejvyšší sebeobnovovací kapacitu, v menším počtu pak z tkáně kostní dřene (3.3%) a folikul hmatových chlupů (7.3%).

Progenitorové buňky posledních dvou zmíněných tkání byly povětšinou bipotentní či unipotentní, v kostní dřeni pak derivují zejména myofibroblasty a v hmatových chloupkách kromě myofibroblastů i neurony. Progenitory zadních kořenů míšních tedy nejenže vykazují nejsilnější diferenciační potenciál, ale také ve větší míře exprimují markery *Sox10* a *p75*, příznačné pro buňky NL, a *Nestin* a *Musashi-1*, charakteristické pro buňky kmenové (Nagoshi a kol., 2008).

Pro úplnost nemůžeme opomenout studii Li a kol. (2007), kteří izolovali progenitorové buňky NL zadních kořenů míšních z křesy a prokázali jejich multipotenci, neboť tyto buňky v kultuře derivovaly neurony, glia a buňky hladké svaloviny a kromě toho exprimovaly *Nestin* a *p75*.

I terapeutický potenciál těchto tkání pro použití v regenerativní medicíně je značný, kupříkladu kmenové buňky kostní dřene mohou být v budoucnu používány pro regeneraci periferních nervů, jak bylo prokázáno na krysím modelu ve studii Shi a kol. (2016).

5.4.3 Buňky neurální lišty ve střevní tkáni

Bylo prokázáno, že kmenové buňky NL perzistují i ve střevní tkáni dospělého organismu, s čímž vyvstaly otázky týkající se diferenciačního potenciálu těchto buněk. Po izolaci pomocí metody průtokové cytometrie a následné kultivaci bylo možné v kultuře identifikovat kmenové buňky tvořící sféroidy, jež exprimují markery *p75* a *integrin $\alpha 4$* charakteristické pro kmenové buňky NL, a dále disponují schopností derivovat glia, neurony a myofibroblasty v různých kombinacích, ačkoliv je zřejmé, že s postupujícím embryonálním vývojem tyto buňky na diferenciačním potenciálu i sebeobnovovací kapacitě prokazatelně ztrácí (Kruger a kol., 2002).

Naopak *in vivo* transplantační experimenty potvrdily vyšší citlivost k působení gliogenních faktorů, a tudíž preferenční schopnost diferenciace adultních kmenových buněk v buňky gliové, a to v ustáleném stavu i po různorodých zraněních. Na druhou stranu nelze opomenout buňky minoritně derivující neurony (Joseph a kol., 2011).

Výše zmíněné a mnohé další studie představují značný terapeutický potenciál kmenových buněk střevní tkáně pro léčbu poškození ENS, jenž si však stále žádá dalšího výzkumu (Dettmann a kol., 2014).

5.4.4 Buňky neurální lišty v srdeční tkáni

In vitro klonální experimenty provedené na fetálních buňkách srdečního regionu NL zaznamenaly, že jen malá část z nich je schopná sebeobnovy a multipotentní diferenciaci (Youn a kol., 2003), zde se pokusíme odhalit zmíněné vlastnosti u kmenových buněk NL setrvávajících v adultní srdeční tkáni.

Tyto buňky byly v srdci identifikovány jakožto tzv. postranní populace tkáňově specifických a částečně dormantních buněk, jež exprimují *Nestin* a *Musashi-1* představující markery nediferencovaných buněčných prekurzorů. Dané dormantní buňky jsou pod vlivem příhodných podmínek schopny diferencovat v několik buněčných typů, což bylo prokázáno pomocí *in vitro* experimentů, v definované kultuře se totiž tyto buňky seskupují ve sféroidy a derivují neurony, glia, buňky hladkého svalstva a kardiomyocyty. Ovšem i v případě buněk srdeční tkáně se sebeobnovovací kapacita v mnoha případech redukuje s věkem, je tedy ožehavé hovořit o kmenovosti těchto buněk (Tomita a kol., 2005).

V nedávné době došlo v srdeční tkáni k rozpoznání progenitorových buněk nesoucích *cKit+* marker, které odvozují svůj původ od buněk NL a *in vitro* vykazují schopnost derivovat nejen kardiomyocyty, ale i další deriváty příznačné pro buňky srdeční NL (Hatzistergos a kol., 2015).

Kmenové buňky srdeční lišty mimo jiné představují slibnou alternativu pro léčbu nejrůznějších srdečních chorob, jak navrhuje např. studie El-Helou a kol. (2008), v níž byly kmenové buňky srdeční tkáně schopné migrovat do infarktem postižené oblasti a přispívaly k reparativní vaskularizaci.

5.4.5 Buňky neurální lišty v karotickém tělísku

Karotické tělísko je chemoreceptorový orgán umístěný v oblasti větví se krkavice sloužící k monitorování hladiny kyslíku v okolním prostředí. K tomuto účelu využívá O₂- senzitivní buňky I. typu obklopené podpůrnými gliovými buňkami II. typu. Pardal a kol. (2007) identifikovali v karotickém tělísku skupinu multipotentních buněk II. typu odvozených od NL vykazujících sebeobnovovací kapacitu, ochotných tvořit v kultuře sféroidy a diferencovat v dopaminergní neurony a buňky hladkého svalstva. Mimo to jsou tyto buňky při nedostatku kyslíku schopny zvrátit svůj fenotyp z gliového (*GFAP+*) v progenitorové buňky (*Nestin+*) dále derivující buňky I. typu (*TH+*).

Kmenové buňky NL izolované z karotického tělíska jsou příslibem pro použití v léčbě Parkinsonovy choroby v důsledku jejich schopnosti derivovat dopaminergní neurony, což bylo prokázáno transplantačními experimenty na zvířecích modelech. Nicméně komplikací zůstává limitovaný zdroj tkáně, s čímž by ovšem mohly pomoci progenitorové buňky NL *in vitro* derivující buňky I. typu a množící tak potřebnou tkáň (Muñoz-Manchado a kol., 2013).

5.4.6 Buňky neurální lišty v kraniofaciálních tkáních

V úvodu zmíním studii Zhao a kol. (2006) prověřující diferenciační potenciál post-migratorních buněk kranialní NL izolovaných v nediferencovaném stavu z prvního branchiálního oblouku. Zde byla dokázána sebeobnovovací kapacita a multipotence těchto buněk v *in vitro* kultuře derivujících neurony, glia, myofibroblasty, osteoblasty a další. Dále se zaměřím na diferenciační potenciál kmenových buněk NL perzistujících v adultních tkáních kraniofaciální oblasti.

5.4.6.1 Rohovka

Rohovka je orgán sestávající ze tří komponent, a sice z povrchového epitelu, endotelu a stroma, jenž je vyplněno keratocyty. Tyto buňky jsou odvozeny od NL a vykazují znaky buněk kmenových, tedy sebeobnovu a multipotenci, a rovněž i schopnost hojit rohovkovou tkáň v průběhu života. Transplantační experimenty prokázaly ochotu keratocytů diferencovat v buňky hladkého svalstva, myofibroblasty, a endoteliální buňky, avšak jejich plasticita je omezena, neboť pokusy diferenciace v buňky nervové a chrupavčité selhaly (Lwigale a kol., 2005).

Ve stromální tkáni byly identifikovány prekurzorové keratocytární buňky, jež prokázaly silný diferenciační potenciál. V *in vitro* kultuře totiž formují sféroidy a následně derivují myofibroblasty a keratocyty, ale i chondrocyty, adipocyty a neurony (Yoshida a kol., 2006).

5.4.6.2 Duhovka

Kikuchi a kol. (2011) odhalili přítomnost kmenových buněk odvozených z NL v duhovce oka. Izolované buňky formovaly EGFP+ sféroidy a exprimovaly markery NL *p75* a *SOX10*, jakož i markery kmenových buněk *Nestin*, *Sox2* a *Musashi*. Navíc byly tyto buňky schopné derivovat buňky hladkého svalstva, glia, neurony a chondrocyty.

Duhovka by v budoucnu mohla být buněčným zdrojem pro regenerativní terapii už jen z toho důvodu, že je poměrně snadno přístupná běžným chirurgickým zákrokem (Kikuchi a kol., 2011).

5.4.6.3 Tvrdé patro

Kmenové buňky tvrdého patra odvozené z NL izolované z krysy exprimují markery jako *Nestin*, *p75* a *Sox2*, v *in vitro* kultuře jsou pak schopny diferencovat v buňky nervové a gliové, další deriváty však prozatím nebyly pozorovány. Dané buňky byly nicméně zaznamenány i v lidské tkáni tvrdého patra, ačkoliv jejich diferenciační potenciál, sebeobnovovací schopnost i NL původ ještě nebyl uspokojivě prokázán (Widera a kol., 2009).

5.4.6.4 Dutina ústní

Dormantní stromální buňky nalezené ve sliznici dutiny ústní a jazyku u myši jsou odvozené z NL, jak ostatně dokládají vysokým počtem exprimovaných markerů pro NL charakteristických. Znaky kmenovosti a značnou plasticitu vykazují diferenciací v široké spektrum buněčných typů – např. buňky hladkého svalstva, neurony, glia a osteoblasty (Bodduppaly a kol., 2016). Kmenové buňky izolované z lidské sliznice dutiny ústní tvoří v *in vitro* kultuře sféroidy a derivují osteoblasty, adipocyty, myocyty, chondrocyty a neurony. Rovněž se vyznačují sebeobnovovací schopností a expresí markerů potvrzujících jejich původ z NL.

I sliznice dutiny ústní je vhodným potenciálním zdrojem buněk pro regenerativní terapie, a to zejména pro jejich snadnou dosažitelnost a silné regenerační schopnosti (Abe a kol., 2016).

5.4.6.5 Zuby

Kmenové buňky NL setrvávající v dřeni zubů a v parodontálních vazech exprimují markery typické pro NL, ale zároveň i markery mezenchymálních kmenových buněk, jakož i sdílí některé jejich charakteristické vlastnosti (Techawattanawisal a kol., 2007; Janebodin a kol., 2010). Avšak kmenové buňky zubní dřene ty mezenchymální v lecčems předčí, jako např. v početnosti na celkovou populaci buněk a taktéž v rychlosti růstu dané populace (Alge a kol., 2010).

Kmenové buňky izolované z lidské zubní dřene prokazují multipotenci svou ochotou diferencovat *in vitro* v chondrocyty, adipocyty, neurony, melanocyty, buňky hladkého svalstva, osteoblasty a pochopitelně odontoblasty. Mimo jiné hrají význačnou roli v regeneraci zubních tkání *in vivo* diferenciací v dentin produkující odontoblasty. Pro klinické aplikace jsou kmenové buňky zubní dřene vhodným kandidátem pro jejich snadnou izolovatelnost a využití by mohly nalézt nejen v regeneraci zubních tkání, ale i mnoha dalších derivátů NL (Janebodin a kol., 2011).

Jak již bylo řečeno, mezi kmenové buňky derivované z NL patří i ty parodontálních vazů, jež v kultuře formují sféroidy a derivují buňky neurální, gliální a svalové linie. Tyto buňky jsou potenciálně použitelné jak pro buněčné terapie, tak i v léčbě degenerativních onemocnění nervové soustavy či svalové dystrofie (Techawattanawisal a kol., 2007).

6. Analogie buněk neurální lišty s nádorovými buňkami

Objev multipotentních kmenových buněk rezidujících v tkáních adultního organismu umožnil nový přístup v oblasti cílených buněčných terapií, v léčbě neurokristopatií a nejen to. Buňky NL totiž prokazatelně sdílí mnoho morfologických a molekulárních znaků s buňkami nádorovými (Obr. 10).

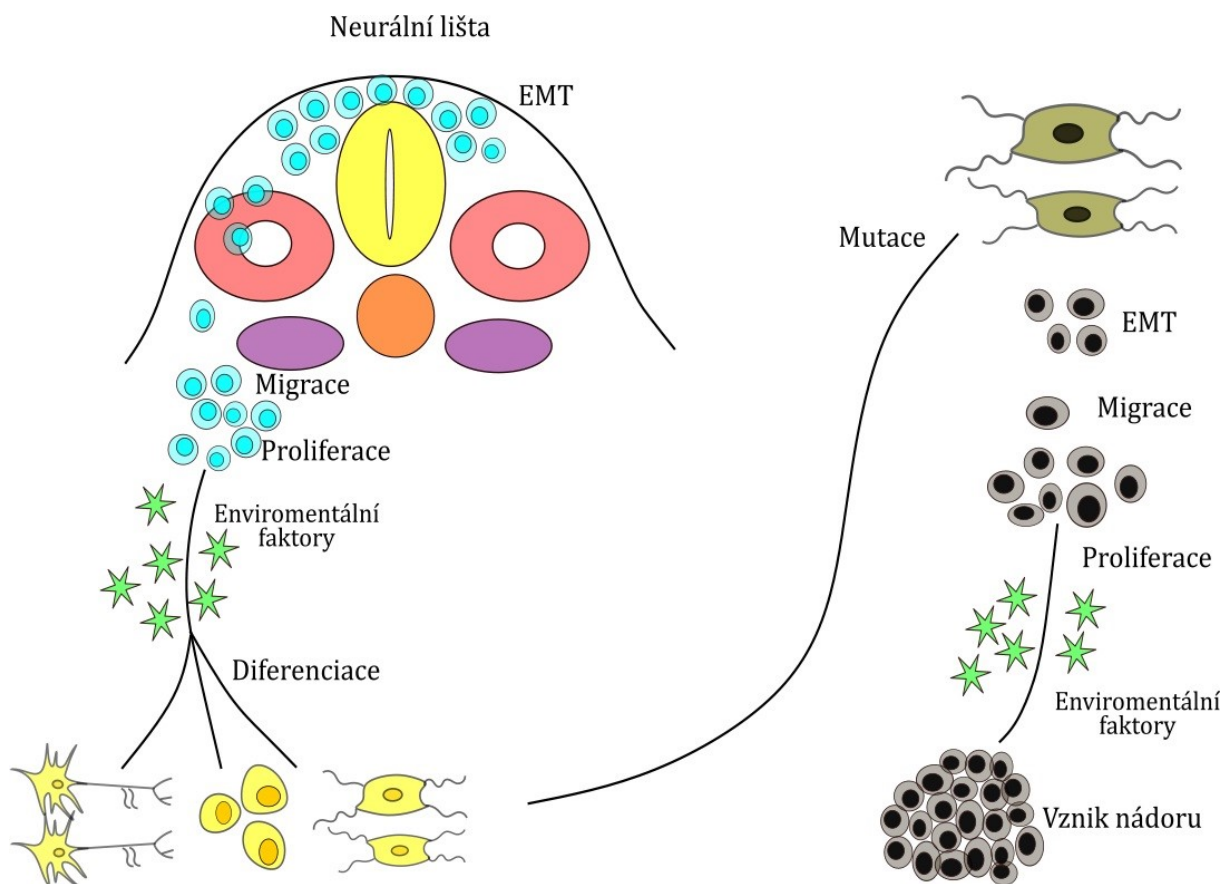
Stejně jako buňky NL i nádorové buňky podstupují v časném embryonálním vývoji změnu fenotypu během EMT s tím rozdílem, že rakovinné buňky mění během probíhající metastáze svůj fenotyp zpátky na epitelový, což má za následek zvýšení jejich odolnosti. EMT buněk NL i rakovinných zahrnuje obdobné změny v buněčné adhezi, cytoskeletální přeskupení, ztrátu apikálně-bazální polaritu a rozvolnění buněčných spojů, což je způsobeno změnami v buněčné signalizaci. Podobnost je možné spatřovat i v chování signalizačních drah a transkripčních faktorů klíčových pro migraci obou buněčných typů. Obojí buňky vykazují vysoce migratorní a invazivní chování (shrnuto v Bayindir a Esrefoglu, 2016).

Kromě spojitosti s podobností chování buněk NL a rakovinných zmíním skutečnost, že z buněk NL může taktéž vznikat několik nádorových typů jako např. neuroblastom, ganglioneurom, melanom a další (Obr. 10).

Použití buněk NL, a *in vivo* embryonických modelů jako takových, ke studiu chování a charakteristik rakovinných buněk poskytuje nový vhled do zkoumání hranic jejich plasticity a možnosti cíleného přeprogramování těchto buněk.

Dosavadní léčba rakoviny zahrnuje operaci, chemoterapii a radioterapii, avšak účinnost s přihlédnutím i k vedlejším účinkům není dostatečně uspokojivá. Ve snaze zlepšit úroveň léčby rakoviny se výzkum soustředí mimo jiné na použití cílených terapií (shrnuto v Maguire a kol., 2015).

NL je ideálním modelem pro studium klíčových charakteristik sdílených s metastázujícími buňkami – zejména EMT, migrace a invaze. Z tohoto důvodu představují buňky NL výborný příklad pro lepší porozumění molekulárním mechanismům a pro studium modelového chování invadujících buněk, což by tak v budoucnu mohlo vnést význačné poznatky do výzkumu pro léčbu rakoviny (shrnuto v Bayindir a Esrefoglu, 2016).



Obrázek 10.: Ilustrační schéma mechanismů sdílených buňkami NL a rakovinnými – EMT, migrace a proliferace (upraveno dle Maguire a kol., 2015).

7. Závěr

Ačkoliv byla NL popsána již v roce 1868, větší pozornosti se jí dostalo o mnoho desítek let později a až v posledních několika letech se stala atraktivním tématem výzkumu zejména v oblasti regenerativní medicíny. NL je jakožto tranzientní struktura formována v rámci procesu neurulace, buňky NL následně podstupují změnu fenotypu vlivem probíhající EMT a migrují do míst svého určení. Celý průběh těchto událostí od indukce přes specifikaci až po buněčnou migraci je řízen vzájemnou koordinací signalizačních drah, jejichž vztahy jsem se v této práci pokusila objasnit, třebaže k plnému pochopení těchto složitých procesů je bezpochyby zapotřebí dalších experimentů.

Hlavním zaměřením mé práce byl ovšem diferenciační potenciál buněk NL, jenž je výše popsanými procesy prokazatelně ovlivňován. *In vivo* migrující nspecifikované buňky jsou na své cestě vymezovány k osvojení určitého buněčného typu vlivem působících signálů. Pokud jsou tyto změněny, mohou i buňky zvrátit svůj potenciál a diferencovat v mnohdy širší spektrum buněčných typů.

Otázkou nastolenou v posledních desetiletích byl diferenciační potenciál buněčné populace NL. Existuje mnoho studií zastávajících tvrzení, že populace buněk NL je na svém potenciálu omezena již v počátečních fázích migrace, nicméně v dnešní době převládá všeobecný názor považující tuto populaci za heterogenní směsici buněk, jejichž osud je určován v různých migratorních fázích. Tato teorie je podpořena i faktem, že rozdílný diferenciační potenciál buněk NL se projevuje taktéž na axiální úrovni v rámci regionů NL.

Podstatná část mé práce je věnována vybraným klíčovými studiím *in vitro* prověřujících diferenciační potenciál migratorních i post-migratorních buněk, na jejichž základě lze dojít k závěru, že potenciál buněk NL je značně plastický. Již určené buňky odvozené z NL jsou totiž schopné působením definovaných environmentálních faktorů dediferencovat do progenitorového stádia a poté transdiferencovat v jiné buněčné typy. Rovněž nelze opomenout, že buňky NL vykazují znaky kmenovosti a to nejen svou multipotencí, ale i částečnou schopností sebeobnovy.

Buňky NL perzistující v mnoha tkáních dospělého organismu jsou nadějí pro využití v cílených buněčných terapiích a léčbě neurokristopatií, i když od soudobých experimentů prokazujících regenerační potenciál ke skutečnému použití v medicíně nás čeká ještě dlouhá cesta. Nicméně buňky NL jsou fascinujícím tématem a na poli vědy by si tak v budoucnu zasloužily více pozornosti už jen z toho důvodu, že by mohly vnést cenné poznatky pro porozumění chování rakovinných buněk.

8. Seznam literárních zdrojů

- Abe, S., Yamaguchi, S., Sato, Y., Harada, K., 2016. Sphere-derived multipotent progenitor cells obtained from human oral mucosa are enriched in neural crest cells. *Stem cells translational medicine*, 5, 17-128.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J. A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., Usoskin, D., 2009. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*, 139, 366-379.
- Ahlstrom, J. D., Erickson, C. A., 2009. The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: A 'tail' of multiple non-obligatory cellular mechanisms. *Development*, 136, 1801-1812.
- Alge, D. L., Zhou, D., Adams, L. L., Wyss, B. K., Shadday, M. D., Woods, E. J., Chu, G., Goebel, W. S., 2010. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4, 73-81.
- Baggiolini, A., Varum, S., Matoes, M. J., Bettosini, D., Nassy, J., Bonalli, M., Ziegler, U., Dimou, L., Clevers, H., Furrer, R., Sommer, L. 2015. Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell*, 16, 314-322.
- Bajolle, F., Zaffran, S., Meilhac, S. M., Dandonneau, M., Chang, T., Kelly, R. G., Buckingham, M. E., 2008. Myocardium at the base of the aorta and pulmonary trunk is prefigured in the outflow tract of the heart and in subdomains of the second heart field. *Developmental biology*, 313, 25-34.
- Barrallo-Gimeno, A., Nieto, M. A., 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: Implications in development and cancer. *Development*, 132, 3151-3161.
- Basch, M. L., Bronner-Fraser, M., García-Castro, M.I., 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature*, 441, 218.
- *Bayindir, N., Esrefoglu, M., 2016. An overview of the neural crest cells and tumor metastasis. *Bezmialem Science*, 4, 65-69.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M. C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W. D., Kessaris, N., Dani, C., Dupin, E., 2007. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*, 134, 2283-2292
- Boddupally, K., Wang, G., Chen, Y., Kobiela, A., 2016. Lgr5 marks neural crest derived multipotent oral stromal stem cells. *Stem cells*, 34, 720-731.
- Bookman, D. E., Redmond, M. E., Waldo, K., Davis, H., Kirby, M. L. 1987. Effect of neural crest ablation on development of the heart and arch arteries in the chick. *Developmental Dynamics*, 180, 332-341.
- Boot, M. J., Steegers-Theunissen, R. P., Poelmann, R. E., Van Iperen, L., Lindemans, J., Groot, G. D., Adriana, C., 2003. Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. *Developmental Dynamics*, 227, 301-308.

* Sekundární zdroj

Bronner-Fraser, M., Fraser, S. E., 1988. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature*, 335, 161.

*Bronner, M., Simões-Costa, M. 2016. The neural crest migrating into the twenty-first century. *Current Topics in Developmental Biology*, 116, 115-34.

Burns, A. J., Delalande, J. M., 2005. Neural crest cell origin for intrinsic ganglia of the developing chicken lung. *Developmental biology*, 277, 63-79.

Burstyn-Cohen, T., Stanleigh, J., Sela-Donenfeld, D., Kalcheim, C., 2004. Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition. *Development*, 131, 5327-5339.

Calloni, G. W., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N. M., Dupin, E., 2007. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19879-19884.

Calloni, G. W., Le Douarin, N. M., Dupin, E., 2009. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8947-8952.

Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., Nieto, M. A., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell biology*, 2, 76.

Clewes, O., Narytnyk, A., Gillinder, K. R., Loughney, A.D., Murdoch, A. P., Sieber-Blum, M., 2011. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC) - characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7, 799-814.

Cohen, A. M., Konicsberg, I. R. 1975. A Clonal approach to the problem of neural crest determination. *Developmental Biology*, 46, 262-280.

Collazo, A., Bronner-Fraser, M. and Fraser, S. E., 1993. Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration. *Development*, 118, 363-376.

De Bellard, M. E., Rao, Y., Bronner-Fraser, M., 2003. Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *J Cell Biol*, 162, 269-279.

Dettmann, H. M., Zhang, Y., Wronna, N., Kraushaar, U., Guenther, E., Mohr, R., Neckel, P. H., Mack, A., Fuchs, J., Just, L., Obermayr, F., 2014. Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system. *PloS one*, 9, e97792.

Dupin, E., Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P., Le Douarin, N. M., 2003. Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: Transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5229-5233.

*Dupin, E., Sommer, L., 2012. Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. *Developmental biology*, 366, 83-95.

El-Helou, V., Beguin, P. C., Assimakopoulos, J., Clement, R., Gosselin, H., Brugada, R., Aumont, A., Biernaskie, J., Villeneuve, L., Leung, T. K., Fernandes, K. J. L., 2008. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 45, 694-702.

Ellies, D. L., Tucker, A. S., Lumsden, A., 2002. Apoptosis of premigratory neural crest cells in rhombomeres 3 and 5: Consequences for patterning of the branchial region. *Developmental biology*, 251, 118-128.

Endo, Y., Ishiwata-Endo, H., Yamada, K. M., 2012. Extracellular matrix protein anosmin promotes neural crest formation and regulates FGF, BMP, and WNT activities. *Developmental cell*, 23, 305-316.

Escot, S., Blavet, C., Härtle, S., Duband, J. L., Fournier-Thibault, C., 2013. Misregulation of SDF1-CXCR4 signaling impairs early cardiac neural crest cell migration leading to conotruncal defects novelty and significance. *Circulation research*, 113, 505-516.

Fairchild, C. L., Conway, J. P., Schiffmacher, A. T., Taneyhill, L. A., Gammill, L. S., 2014. FoxD3 regulates cranial neural crest EMT via downregulation of tetraspanin18 independent of its functions during neural crest formation. *Mechanisms of development*, 132, 1-12.

Fernandes, K. J., McKenzie, I. A., Mill, P., Smith, K. M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N. R., Toma, J. G., Kaplan, D. R., 2004. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature cell biology*, 6, 1082.

Gammill, L. S., Gonzalez, C., Bronner-Fraser, M., 2007. Neuropilin 2/semaphorin 3F signaling is essential for cranial neural crest migration and trigeminal ganglion condensation. *Developmental neurobiology*, 67, 47-56.

Gammill, L.S., Gonzalez, C., Gu, C., Bronner-Fraser, M., 2006. Guidance of trunk neural crest migration requires neuropilin 2/semaphorin 3F signaling. *Development*, 133, 99-106.

Gans, C., Northcutt, G. R., 1983. Neural crest and the origin of *Vertebrates*: A new head. *Science*, 220, 268-273.

*Gilbert, S. F., 2014. *Developmental Biology*. 10th edition. *Sinauer Associates*, 719.

Greene, C. A., Green, C. R., Sherwin, T., 2015. Transdifferentiation of chondrocytes into neuron-like cells induced by neuronal lineage specifying growth factors. *Cell biology international*, 39, 185-191.

Greenhill, E. R., Rocco, A., Vibert, L., Nikaido, M., Kelsh, R. N., 2011. An iterative genetic and dynamical modelling approach identifies novel features of the gene regulatory network underlying melanocyte development. *PLoS genetics*, 7, e1002265.

Gu, C., Rodriguez, E.R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritsch, B., Richards, L. J., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D., 2003. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Developmental cell*, 5, 45-57.

*Hall, B. K., 1988. The neural crest in development and evolution. *Springer Science & Business Media*, 313.

Hatzistergos, K. E., Takeuchi, L. M., Saur, D., Seidler, B., Dymecki, S.M., Mai, J. J., White, I. A., Balkan, W., Kanashiro-Takeuchi, R. M., Schally, A. V., Hare, J. M., 2015. cKit+ cardiac progenitors of neural crest origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 13051-13056.

High, F. A., Zhang, M., Proweller, A., Tu, L., Parmacek, M. S., Pear, W. S., Epstein, J. A., 2007. An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation. *The Journal of clinical investigation*, 117, 353-363.

- His, W., 1868. Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. *FCW Vogel*, Leipzig.
- Huang, C., Kratzer, M. C., Wedlich, D., Kashef, J., 2016. E-cadherin is required for cranial neural crest migration in *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 411, 159-171.
- Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A., Gershon, M. D., 2011. Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Developmental biology*, 350, 64-79.
- Janebodin, K., Horst, O. V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B., Reyes, M., 2011. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PloS one*, 6, e27526.
- Jeffery, W. R., Strickler, A. G., Yamamoto, Y. 2004. Migratory neural crest-like cells form body pigmentation in a urochordate embryo. *Nature*, 431, 696-9.
- Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A. H., McMahon, A. P., 2004. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes & development*, 18, 937-951.
- Jia, L., Cheng, L., Raper, J., 2005. Slit/Robo signaling is necessary to confine early neural crest cells to the ventral migratory pathway in the trunk. *Developmental biology*, 282, 411-421.
- Joseph, N., Mukoyama, Y. S., Mosher, J., Jaegle, M., Crone, S., Dormand, E. L., Lee, K. F., Meijer, D., Anderson, D., Morrison, S., 2004. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development*, 131, 5599-5612.
- Joseph, N. M., He, S., Quintana, E., Kim, Y. G., Núñez, G., Morrison, S. J., 2011. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *The Journal of clinical investigation*, 121, 3398-3411.
- Kague, E., Gallagher, M., Burke, S., Parsons, M., Franz-Odenaal, T., Fisher, S., 2012. Skeletogenic fate of zebrafish cranial and trunk neural crest. *PloS one*, 7, e47394.
- Kasemeier-Kulesa, J. C., McLennan, R., Romine, M. H., Kulesa, P. M., Lefcort, F., 2010. CXCR4 controls ventral migration of sympathetic precursor cells. *Journal of Neuroscience*, 30, 13078-13088.
- Kikuchi, M., Hayashi, R., Kanakubo, S., Ogasawara, A., Yamato, M., Osumi, N., Nishida, K., 2011. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes to Cells*, 16, 273-281.
- Killian, E. C. O., Birkholz, D. A., Artinger, K. B., 2009. A role for chemokine signaling in neural crest cell migration and craniofacial development. *Developmental biology*, 333, 161-172.
- Krispin, S., Nitzan, E., Kassem, Y., Kalcheim, C., 2010. Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. *Development*, 137, 585-595.
- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., Morrison, S. J., 2002. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, 35, 657-669.

- Kubu, C. J., Orimoto, K., Morrison, S. J., Weinmaster, G., Anderson, D. J., Verdi, J. M., 2002. Developmental changes in Notch1 and numb expression mediated by local cell–cell interactions underlie progressively increasing delta sensitivity in neural crest stem cells. *Developmental biology*, 244, 199-214.
- Kuratani, S. C., Kirby, M. L., 1992. Migration and distribution of circumpharyngeal crest cells in the chick embryo. *The Anatomical record*, 234, 263-280.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 30, 31-48.
- Lee, H. Y., Kléber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M. M., Kemler, R., Sommer, L., 2004. Instructive role of Wnt/ β -catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science*, 303, 1020-1023.
- Le Lièvre, C. S., Le Douarin, N. M., 1975. Mesenchymal derivatives of the neural crest: Analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Development*, 34, 125-154.
- Li, H. Y., Say, E. H. M., Zhou, X. F., 2007. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem cells*, 25, 2053-2065.
- *Liu, J. A., Cheung, M., 2016. Neural crest stem cells and their potential therapeutic applications. *Developmental biology*, 419, 199-216.
- Lumsden, A., Sprawson, N., Graham, A., 1991. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development*, 113, 1281-1291.
- Luo, Y., High, F. A., Epstein, J. A., Radice, G. L., 2006. N-cadherin is required for neural crest remodeling of the cardiac outflow tract. *Developmental biology*, 299, 517-528.
- Lwigale, P. Y., Conrad, G. W., Bronner-Fraser, M., 2004. Graded potential of neural crest to form cornea, sensory neurons and cartilage along the rostrocaudal axis. *Development*, 131, 1979-1991.
- Lwigale, P. Y., Cressy, P. A., Bronner-Fraser, M., 2005. Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties. *Developmental biology*, 288, 284-293.
- *Maguire, L. H., Thomas, A. R., Goldstein, A. M., 2015. Tumors of the neural crest: Common themes in development and cancer. *Developmental Dynamics*, 244, 311-322.
- Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N. & Mayor, R. 1998. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Developmental Biology*, 198, 319–329.
- McGonnell, I. M., Graham, A., 2002. Trunk neural crest has skeletogenic potential. *Current Biology*, 12, 767-771.
- McLennan, R., Teddy, J. M., Kasemeier-Kulesa, J. C., Romine, M. H., Kulesa, P. M., 2010. Vascular endothelial growth factor (VEGF) regulates cranial neural crest migration *in vivo*. *Developmental biology*, 339, 114-125.
- Mellott, D. O., Burke, R.D., 2008. Divergent roles for Eph and ephrin in avian cranial neural crest. *BMC developmental biology*, 8, 56.

- *Meulemans, D. & Bronner-Fraser, M. 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental Cell*, 7, 291–299.
- Miller, C.T., Yelon, D., Stainier, D.Y. and Kimmel, C.B., 2003. Two endothelin 1 effectors, hand2 and bapx1, pattern ventral pharyngeal cartilage and the jaw joint. *Development*, 130, 1353-1365.
- Monsoro-Burq, A. H., Wang, E., Harland, R., 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during Xenopus neural crest induction. *Developmental cell*, 8, 167-178.
- Monzen, K., Nagai, R., Komuro, I., 2002. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. *Trends in cardiovascular medicine*, 12, 263-269.
- Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H., de Crombrughe, B., 2003. Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9360-9365.
- Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J. L., Echevarría, M., López-Barneo, J. and Toledo-Aral, J. J., 2013. Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 34, 902-915.
- Nagashimada, M., Ohta, H., Li, C., Nakao, K., Uesaka, T., Brunet, J. F., Amiel, J., Trochet, D., Wakayama, T., Enomoto, H., 2012. Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *The Journal of clinical investigation*, 122, 3145-3158.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Kubota, Y., Nakamura, M., Nagai, Y., Satoh, E., Morikawa, S., Okada, Y., Mabuchi, Y., Katoh, H., Okada, S., 2008. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell stem cell*, 2, 392-403.
- Nagy, N., Goldstein, A. M., 2006. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental biology*, 293, 203-217.
- Natarajan, D., Grigoriou, M., Marcos-Gutierrez, C. V., Atkins, C., Pachnis, V., 1999. Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture. *Development*, 126, 157-168.
- Nichols, D. H., 1981. Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. *Development*, 64, 105-120.
- O'Donnell, A. M., Puri, P., 2008. RET/GDNF signalling in vagal neural crest-derived neurons of the chick embryo cloaca. *Pediatric surgery international*, 24, 1211-1214.
- Raible, D.W., Wood, A., Hodsdon, W., Henion, P.D., Weston, J.A. and Eisen, J.S., 1992. Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Developmental dynamics*, 195, 29-42.
- Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R., López-Barneo, J., 2007. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*, 131, 364-377.
- Parichy, D. M., Rawls, J. F., Pratt, S. J., Whitfield, T. T., Johnson, S. L., 1999. Zebrafish sparse corresponds to an orthologue of c-kit and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes, but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development. *Development*, 26, 3425-3436.

- Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N. M., Dupin, E., 2006. Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Developmental biology*, 300, 656-669.
- Rickmann, M., Fawcett, J. W., Keynes, R. J., 1985. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *Development*, 90, 437-455.
- Rollhauser-ter, Horst J. 1977. Artificial neural induction in *Amphibia*. I. Sandwich explants. *Anatomy and Embryology*, 151, 309–16.
- Sadaghiani, B., Vielkind, J. R., 1989. Neural crest development in *Xiphophorus* fishes: Scanning electron and light microscopic studies. *Development*, 105, 487-504.
- Santiago, A., Erickson, C.A., 2002. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development*, 129, 3621-3632.
- Sasaki, T., Ito, Y., Bringas, P., Chou, S., Urata, M. M., Slavkin, H., Chai, Y., 2006. TGF β -mediated FGF signaling is crucial for regulating cranial neural crest cell proliferation during frontal bone development. *Development*, 133, 371-381.
- Saito, D., Takase, Y., Murai, H., Takahashi, Y., 2012. The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science*, 336, 1578-1581.
- Sato, A., Scholl, A. M., Kuhn, E. B., Stadt, H. A., Decker, J. R., Pegram, K., Hutson, M.R., Kirby, M. L., 2011. FGF8 signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells. *Developmental biology*, 354, 18-30.
- Sakaue, M., Sieber-Blum, M., 2015. Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. *Development*, 142, 3188-3197.
- *Sauka-Spengler, T., Bronner-Fraser, M., 2008. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Molecular cell biology*, 9, 557.
- Scarpa, E., Szabó, A., Bibonne, A., Theveneau, E., Parsons, M., Mayor, R., 2015. Cadherin switch during EMT in neural crest cells leads to contact inhibition of locomotion via repolarization of forces. *Developmental cell*, 34, 421-434.
- Sela-Donofeld, D., Kalcheim, C., 1999. Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development*, 126, 4749–4762.
- Selleck, M. A., Bronner-Fraser, M., 1995. Origins of the avian neural crest: The role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, 121, 525-538.
- *Selleck, M. A., Scherson, T. Y. and Bronner-Fraser, M., 1993. Origins of neural crest cell diversity. *Developmental biology*, 159, 1-11.
- Shi, H., Gong, Y., Qiang, L., Li, X., Zhang, S., Gao, J., Li, K., Ji, X., Tian, L., Gu, X., Ding, F., 2016. Derivation of Schwann cell precursors from neural crest cells resident in bone marrow for cell therapy to improve peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 89, 25-37.
- Schumacher, J. A., Hashiguchi, M., Nguyen, V. H., Mullins, M. C., 2011. An intermediate level of BMP signaling directly specifies cranial neural crest progenitor cells in zebrafish. *PLoS One*, 6, e27403.

- Schweizer, G., Ayer-Le Lièvre, C., Le Douarin, N. M., 1983. Restrictions of developmental capacities in the dorsal root ganglia during the course of development. *Cell differentiation*, 13, 191-200.
- Sieber-Blum, M., Grim, M., Hu, Y. F., Szeder, V., 2004. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Developmental Dynamics*, 231, 258-269.
- Simpson, M. J., Zhang, D. C., Mariani, M., Landman, K. A., Newgreen, D. F., 2007. Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Developmental biology*, 302, 553-568.
- Stemple, D. L., Anderson, D. J., 1992. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71, 973-985.
- Swalla, Billie J., Smith, A. B. 2008. Deciphering deuterostome phylogeny: Molecular, morphological and palaeontological perspectives. *The Royal Society*, 363, 1557-1568.
- Techawattanawisal, W., Nakahama, K., Komaki, M., Abe, M., Takagi, Y., Morita, I., 2007. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357, 917-923.
- Theveneau, E. Duband, J. L., Altabef, M., 2007. Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PLoS One*, 2, e1142.
- *Thiery, J. P. Aclouque, H., Huang, R. Y., Nieto, M. A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-8907.
- Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Osumi, N., 2005. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol*, 170, 1135-1146.
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Makino, N., Takamatsu, H., Takegahara, N., Suto, F., Hori, M., Fujisawa, H., Kumanogoh, A., 2008. Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Developmental biology*, 321, 251-262.
- Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N. M., Dupin, E., 2004. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4495-4500.
- Twitty, V. C., Niu, M. C. 1948. Causal analysis of chromatophore migration. *Journal of Experimental Zoology*, 108, 405-37.
- Waldo, K., Miyagawa-Tomita, S., Kumiski, D., Kirby, M. L., 1998. Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: Aortic sac to ventricular septal closure. *Developmental biology*, 196, 129-144.
- Wawersik, S., Evola, C., Whitman, M. 2005. Conditional BMP inhibition in *Xenopus* reveals stage-specific roles for BMPs in neural and neural crest induction. *Developmental Biology*, 277, 425-442.
- Weston, J. A. 1963. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Developmental Biology*, 6, 279-310.
- Widera, D., Zander, C., Heidbreder, M., Kasperek, Y., Noll, T., Seitz, O., Saldamli, B., Sudhoff, H., Sader, R., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., 2009. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem cells*, 27, 1899-1910.

Yoshida, S., Shimmura, S., Nagoshi, N., Fukuda, K., Matsuzaki, Y., Okano, H., Tsubota, K., 2006. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem cells*, 24, 2714-2722.

Youn, Y. H., Feng, J., Tessarollo, L., Ito, K., Sieber-Blum, M., 2003. Neural crest stem cell and cardiac endothelium defects in the TrkC null mouse. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24, 160-170.

Yu, Jr-Kai, Meulemans, D., McKeown, S. J., Bronner-Fraser, M. 2008. Insights from the *Amphioxus* genome on the origin of vertebrate neural crest. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 18, 1127-1132.

Zhao, H., Bringas, P., Chai, Y., 2006. An in vitro model for characterizing the post-migratory cranial neural crest cells of the first branchial arch. *Developmental dynamics*, 235, 1433-1440.

Zoltan-Jones, A., Huang, L., Ghatak, S., Toole, B. P., 2003. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 45801-45810.