

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Kristýna Hebenstreitová

Lidské *in vitro* modely pro studium epilepsie
Human *in vitro* models for epilepsy research

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Šárka Danačíková

Praha, 2021

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, 6. 5. 2021

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat své školitelce Mgr. Šárce Danačíkové za všechny čas, který mi věnovala, za její velmi cenné rady a připomínky a za nové dovednosti, které jsem se pod jejím vedením naučila. Dále bych ráda poděkovala doc. MUDr. Jakobovi Otáhalovi, PhD. za velmi odborné a podnětné konzultace. V neposlední řadě děkuji Janě Bradáčové za jazykovou korekturu. Na závěr bych chtěla poděkovat také Mgr. Mírcě Salavové a Bc. Zuzaně Borové za korekturu, odpovědi na nespočet mých dotazů a přátelskou podporu během mého psaní.

Abstrakt

Epilepsie je nejčastější chronické neurologické onemocnění postihující asi 1 % světové populace. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, které je charakterizované opakovaným výskytem záchvatů. Současná farmakologická léčba je symptomatická a přibližně u jedné třetiny pacientů dochází k rozvoji farmakorezistentní epilepsie. Tato práce poskytuje přehled současných poznatků o modelování epilepsie, přičemž se zaměřuje na lidské *in vitro* modely. Jako velmi slibné *in vitro* modely pro modelování genetických epilepsií se jeví buněčné linie, například linie odvozené od lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk nebo lidských neurálních kmenových buněk, které umožňují zavedení potenciálně patologických mutací a následnou diferenciaci v mnoho různých buněčných typů. Lidské *in vitro* modely epilepsie hrají důležitou roli v porozumění procesu epileptogeneze, iktogeneze, mechanismu účinku antiepileptik a uplatňují se při hledání nových léčivých látek. Epilepsie představuje pro pacienty velké břemeno, proto je důležité zabývat se výzkumem nejen molekulárních mechanismů epileptogeneze, ale i vývojem personalizované terapie, která může znamenat naději pro mnoho (i farmakorezistentních) pacientů.

Klíčová slova: epilepsie, lidské *in vitro* modely, neurální kmenové buňky, personalizovaná medicína

Abstract

Epilepsy is the most common chronic neurological disease that affects around 1 % of the world population. It is a multifactorial disease, which is characterised by recurrent seizures. Present pharmacological treatment is symptomatic and approximately one third of the patients develop pharmacoresistant epilepsy. This bachelor thesis presents an overview of current knowledge about the modelling of epilepsy, while focusing on human *in vitro* models. Cell lines appear to be very promising *in vitro* models for modelling genetic epilepsies. For example, cell lines derived from human induced pluripotent stem cells or human neural stem cells, which both allow for introduction of potentially pathological mutations and further differentiation into many different cell types. Human *in vitro* models of epilepsy play important role in understanding the process of epileptogenesis, ictogenesis, mechanism of antiepileptic drugs effects and are used in the search for new active substances. Epilepsy comes with great burden of disease for the patients, that is why it is very important to research not only the molecular mechanisms of epileptogenesis, but also advancements of personalised therapy, which could give hope to many (even pharmacoresistant) patients.

Key words: epilepsy, human *in vitro* models, neural stem cells, personalised medicine

Seznam použitých zkratek

BMP	kostní morfogenický protein (bone morphogenic protein)
c-Myc	buněčný onkogen myelocytomatózy (cellular myelocytomatosis oncogen)
Cas9	s CRISPRem-sdružené geny (CRISPR-associated genes)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous system)
CRISPR	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
ENSTem-A	neimortalizovaná linie neurálních progenitorů odvozených z H9 linie lidských embryonálních kmenových buněk (non-immortalised neural progenitor cell line derived from H9 human embryonic stem cell line)
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein (glial fibrillary acidic protein)
H9	buněčná linie lidských embryonálních kmenových buněk (human embryonic stem cell line)
hESCs	lidské embryonální kmenové buňky (human embryonic stem cells)
hiPSCs	lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (human induced pluripotent stem cells)
hNSCs	lidské neurální kmenové buňky (human neural stem cells)
hPSCs	lidské pluripotentní kmenové buňky (human pluripotent stem cells)
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
Klf4	faktor 4 podobný Krüppel (Krüppel-like factor 4)
LM-NSC008	L-MYC imortalizovaná linie neurálních kmenových buněk derivována z lidské fetální mozkové tkáně (immortalised human NSC line derived from human fetal brain)
L-Myc	ptačí virální onkogen myelocytomatózy homolog 1 odvozený z karcinomu plic (v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived)

MERRF	myoklonická epilepsie s potrhanými červenými svalovými vlákny (myoclonic epilepsy associated with ragged red fibers)
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
NSCs	neurální kmenové buňky (neural stem cells)
O4	oligodentocytární marker (oligodentocyte marker)
Oct3/4	transkripční faktor vazby oktameru (octamer binding transcription factor)
ReNcells CX	imortalizovaná neurální buněčná linie odvozená z kortexu lidské fetální mozkové tkáně (immortalised neural cell line derived from human fetal cortical tissue)
ReNcells VM	imortalizovaná neurální buněčná linie odvozená z ventrálního mesencephalonu lidské fetální mozkové tkáně (immortalised neural cell line derived from human fetal ventral mesencephalon tissue)
Sox2	oblast Y rozhodující o pohlaví–box 2 (sex determining region Y–box 2)
Sox9	oblast Y rozhodující o pohlaví–box 9 (sex determining region Y–box 9)

Obsah

Úvod.....	1
1 Modely epilepsie.....	3
1.1 Animální modely	5
1.2 Humánní <i>in vitro</i> modely.....	6
1.2.1 Organotypické kultury	7
1.2.2 Lidské embryonální kmenové buňky	8
1.2.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky	9
1.2.4 Neurální kmenové buňky	10
1.2.5 Cerebrální organoidy.....	10
2 Buněčné linie lidských neurálních kmenových buněk a neurálních progenitorů	13
2.1 Neurální vývoj <i>in vitro</i>	15
2.2 Neurální buněčné linie	17
Závěr	20
Seznam literatury	22

Úvod

Epilepsie je nejčastější chronické neurologické onemocnění na světě charakterizované opakovaným výskytem záchvatů. Postihuje zhruba 1 % světové populace a pojí se s různými psychickými, psychiatrickými a kognitivními komorbiditami (Tellez-Zenteno *et al.*, 2005; Tellez-Zenteno *et al.*, 2007), sociální stigmatizací (Fiest *et al.*, 2014) a ekonomickými dopady (Begley & Beghi, 2002; Wijnen *et al.*, 2017).

Epileptický záchvat je definován jako přechodný výskyt příznaků (např. nekontrolovatelných záškubů) v důsledku abnormální excesivní nebo synchronní neuronální aktivity v mozku (Fisher *et al.*, 2005). Jedná se o multifaktoriální onemocnění, téměř u 75 % epilepsií je příčina vzniku neznámá. Možným důvodem může být například poranění mozku (strukturální změny), cévní mozková příhoda, infekce centrální nervové soustavy (CNS), vrozená mozková vada nebo metabolická porucha. Mnoho epilepsií má také genetický původ (Helbig *et al.*, 2016). Důvodem, proč mnohdy nelze určit původ onemocnění u konkrétního pacienta, může být nedostatečná citlivost současných diagnostických metod. Dále u geneticky podmíněných epilepsií často neznáme mechanismus působení mutací. Je tedy nutná změna přístupu v detekování a testování mutací, zavádění nových metod a cílení na personalizovanou diagnostiku epilepsie. Příkladem může být skutečnost, že zavedení magnetické rezonance (MRI, z angl. magnetic resonance imaging) jako součásti diagnostické rutiny vedlo k objasnění přibližně 12 % příčin vzniku epilepsie (Thomas & Berkovic, 2014 dle King *et al.*, 1998;). Nejvyšší incidenci můžeme pozorovat u dětí (až 75 % druhů epilepsií), dále pak u dospělých starších 60 let (Fiest *et al.*, 2017).

Standardní léčba spočívá v kombinaci antiepileptik, avšak tyto léky mívají často nepříznivé vedlejší účinky a jejich dávkování je mnohdy nutné zvyšovat (Chen *et al.*, 2017). Farmakologická léčba je pouze symptomatická, potlačuje projevy epilepsie (záchvaty), ale neřeší jejich příčinu. U jedné třetiny pacientů dochází k rozvoji refrakterní (farmakorezistentní) epilepsie, jejímž možným řešením je chirurgický zákrok (Kwan *et al.*, 2010; Kwan & Brodie, 2000). Chirurgický zákrok však není vhodný pro každého z farmakorezistentních pacientů (Engel, 2018; West *et al.*, 2016).

Pacienti s epilepsií a jejich rodiny se potýkají se stigmatizací, což může vést až k sociální izolaci nebo diskriminaci a velkým socioekonomickým dopadům. Pacienti nemohou řádně vykonávat své zaměstnání či studovat a musí čelit omezením v každodenním životě. Jedná se proto o závažný společenský problém (Fiest *et al.*, 2014).

Základní klasifikace epilepsie vychází ze třídění záchvatů podle jejich počátku. Záchvaty jsou děleny na fokální (také parciální), generalizované a s neznámým začátkem. Fokální záchvaty mají počátek pouze v jedné hemisféře. Generalizované záchvaty se projevují aktivitou v obou hemisférách. Záchvaty s neznámým začátkem manifestují známky záchvatu, avšak lokalizace jeho počátku v mozku není známa (Falco-Walter *et al.*, 2018).

Dále lze epilepsie dělit dle jejich etiologie na idiopatické, symptomatické, vyvolané a kryptogenní. Idiopatické epilepsie mají genetický nebo předpokládaný genetický původ bez výrazných neuroanatomických a neuropatologických změn. Symptomatické zahrnují syndromy spojené s neuroanatomickými nebo neuropatologickými změnami, často získané v důsledku jiného onemocnění. Příčinou vyvolaných epilepsií je systémový nebo environmentální faktor, kdy nedochází k výrazným neuroanatomickým a neuropatologickým změnám. Kryptogenní epilepsie jsou poté syndromy předpokládané symptomatické povahy, u kterých nebyla zjištěna příčina (Shorvon, 2011).

Cílem této práce je podat přehled a srovnání základních modelů využívaných pro studium epilepsie. Práce stručně popíše modely animální a dále se zaměří na humánní *in vitro* modely. Hlavním záměrem je shrnutí základních informací o neurálních buněčných liniích a evaluace komerčně dostupných buněčných linií. Závěrem práce zhodnotí potenciální využití těchto linií pro studium epilepsie.

Vzhledem k vysoké prevalenci epilepsie, výraznému snížení kvality života, multifaktoriálnímu původu, a rozvoji refrakterní epilepsie u cca 30 % pacientů (Smith *et al.*, 2018), je výzkum personalizovaného modelování tohoto onemocnění velmi důležitý.

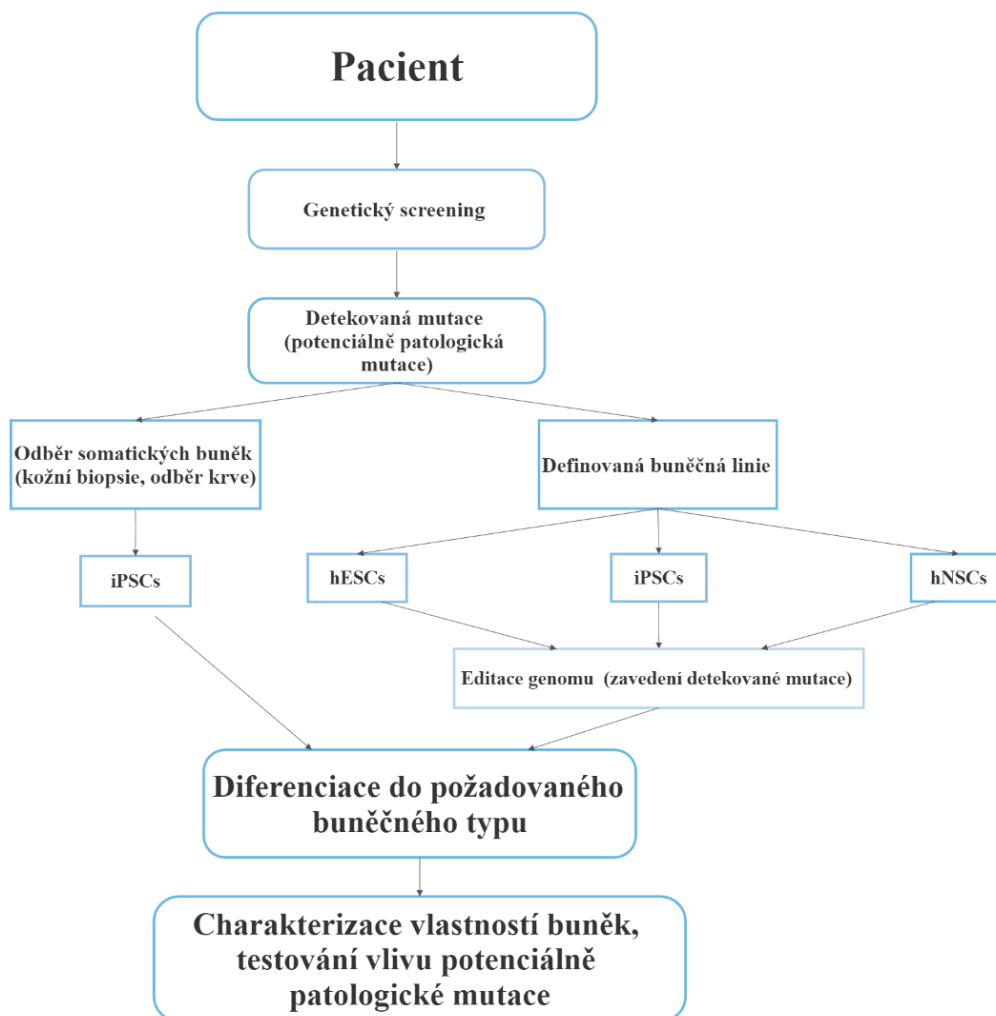
1 Modely epilepsie

Studium epilepsie, jakožto multifaktoriálního onemocnění, zahrnuje výzkum a modelování rozmanitých neurobiologických mechanismů. Pokroky v tomto základním výzkumu umožňují rozvoj nových experimentálních přístupů a přesah do translační medicíny.

V současné době existují různé modely pro studium epilepsie, které lze dělit na animální a humánní. Animální modely lze dále dělit na *in vivo* a *in vitro*. Humánní modely jsou *in vitro* modely. Dle etiologie modelované epilepsie mohou být modely charakterizované například jako genetické modely (Aygün, 2020; Schuster *et al.*, 2019) či modely získané epilepsie (po mrtvici nebo traumatu, indukované elektrošokem či chemokonvulzantem) (Bar-Klein *et al.*, 2016; Patra *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2018). Na základě typu experimentů, pro které jsou modely vhodné, lze modely dále členit například na elektrofyziologické nebo chemické. Chemické modely epilepsie jsou definovány jako systémy, které jsou založené na aplikaci či odnětí určité chemické látky s následným výskytem epileptické symptomatologie. Mohou tak být využity například pro výzkum působení antiepileptik (de Deyn *et al.*, 1992).

Pro úspěšné modelování epilepsie je nutné stanovit vhodný model. Je třeba posoudit několik různých aspektů práce s modelem, a zda je pro konkrétní experiment vhodný svými vlastnostmi – musí být tzv. „fit for purpose“. Například zda použít *in vitro* model (například buněčnou kulturu) či *in vivo* model (například modelový organismus). U animálních modelů je potřeba zohlednit například skutečnost, že existuje několik způsobů, jak získat epileptický animální model (selekce epileptických jedinců, genetické modifikace, indukce) (Löscher, 2016). U humánních modelů je mimo jiné nutné stanovit, zda pracovat s tkání odebranou přímo od pacienta či s definovanými buněčnými liniemi, které lze modifikovat, viz schéma postupu při modelování genetické epilepsie konkrétního pacienta (Obr. č. 1). Těmto a dalším aspektům výběru vhodného modelu se práce bude věnovat v dalších kapitolách.

V této kapitole práce poskytne přehled základního dělení modelů, stručně definuje modely animální a zaměří se na *in vitro* modely humánní.



Obr. č. 1: Schéma znázorňující různé přístupy k *in vitro* modelování genetické epilepsie. Na počátku stojí konkrétní pacient s geneticky podmíněnou epilepsií. Pacient podstoupí genetický screening, který určí potenciálně patologickou mutaci či mutace. Následně lze pokračovat odběrem somatických buněk pacienta. Pro modelování epilepsie se nejčastěji jedná o kožní biopsii nebo odběr krve. Somatické buňky je následně možné reprogramovat na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs), které lze následně diferenciovat do požadovaného buněčného typu (např. neuronů), nebo transdiferenciovat do požadovaného buněčného typu (přímá přeměna jednoho buněčného typu v druhý, bez iPSCs stavu). Druhou možností, která nevyžaduje odběr somatických buněk pacienta, je práce s určitou definovanou buněčnou linií, například s lidskými embryonálními kmenovými buňkami (hESCs), iPSCs či lidskými neurálními kmenovými buňkami (hNSCs) od lidských dárců. Buněčná linie je následně geneticky editována, nejčastěji za využití segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromatických repetic a asociované nukleázy Cas9 (CRISPR/Cas9 systém), aby obsahovala detekovanou potenciálně patologickou mutaci. Dále následuje

diferenciace. Posledním krokem v obou případech je charakterizace vlastností kultivovaných buněk, testování vlivu potenciálně patologické mutace, případně srovnání vlastností buněk odvozených od somatických buněk a buněk odvozených z definované buněčné linie nesoucích mutaci (Caiazzo *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2018; M. Zhang *et al.*, 2018).

1.1 Animální modely

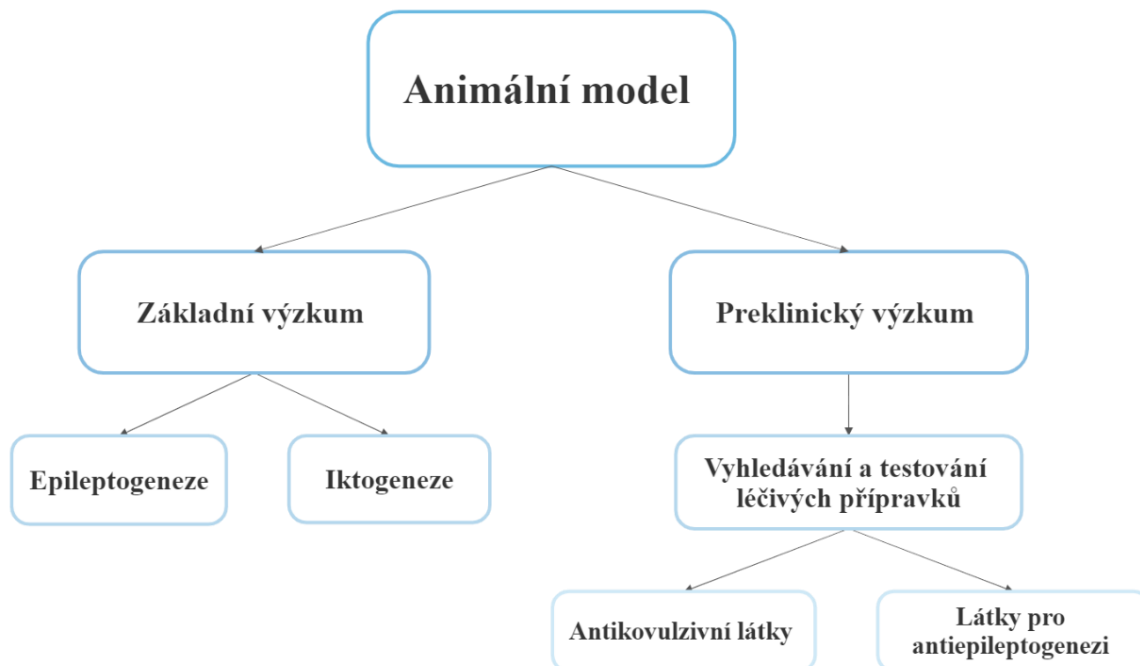
Animální modely jsou stále hojně využívány v oblasti výzkumu lidských neurologických onemocnění, hlavně z důvodu nedostatku zdravé lidské mozkové tkáně, která by sloužila jako kontrola. Nutno také vzít v potaz, že mechanismy epileptogeneze se značně liší napříč různými věkovými skupinami pacientů, pohlavími, etiologií a typem epilepsie (Annegers *et al.*, 1995; Rakhade & Jensen, 2009).

Tradičně se ve výzkumu epilepsie využívají hlavně savčí modely, primární volbou jsou modely hlodavčí (hlavně *Mus musculus* a *Rattus norvegicus domestica*). Kromě hlodavců, hlavně v prvních letech zkoumání epilepsie, sloužili jako modely také *Canis lupus familiaris* a *Felis catus* (Davis *et al.*, 2011; Ferrier, 1873; Gutnick & Prince, 1975; Wagner *et al.*, 2014). Nelze také opomenout zkoumání primátů postižených epilepsií, například *Papio hamadryas* (Gowda & Szabó, 2019; Young *et al.*, 2013). Pro studium epilepsie se dále využívají klasické modelové bezobratlé organismy, jako je *Drosophila melanogaster* (Sun *et al.*, 2012) a *Caenorhabditis elegans* (Zhu *et al.*, 2020), nebo obratlovci, jako je *Xenopus laevis* (Bell *et al.*, 2011) a *Danio rerio* (Baraban *et al.*, 2013). Netradičně mohou být pro modelování epilepsie využity například i želvy (*Chrysemys d'orbigny*) (Velluti *et al.*, 1997). Nicméně pouze živočichové, u kterých lze vyvolat, anebo se spontánně vyskytují epileptické záchvaty přetrvávající po určitou dobu, mohou být považováni za animální modely epilepsie. *In vitro* animální modely, například buněčné kultury, by poté měly být označovány jako modely záchvatů či epileptogenních mechanismů (Avanzini, 1995).

Žádný animální model nemůže plně demonstrovat multifaktoriální vlastnosti epilepsie. Idealizovaný, dokonalý model by měl rekapitulovat jak etiologii vzniku dané epilepsie u člověka, mít stejný fenotyp záchvatů, tak stejným způsobem odpovídat na konkrétní terapie (Willner, 1991). Z definice epilepsie (viz Úvod) by animální modely měly co nejvíce napodobovat abnormální neuronální aktivitu a ideálně reprezentovat neuroanatomické

(Schmeiser *et al.*, 2017; Sloviter *et al.*, 2006), biochemické (Ganguly *et al.*, 2001; Hester *et al.*, 2016; Jagirdar *et al.*, 2016; Pun *et al.*, 2012), genetické (J. Liu *et al.*, 2018) a další faktory tohoto onemocnění. V reálných podmínkách však animální modely splňují pouze některá z těchto kritérií, což představuje jejich hlavní limitaci (Grainger *et al.*, 2018).

Animální modely výrazně přispěly k rozvoji poznání epileptogeneze a účinku antiepileptik (viz Obr. č. 2) (Klein *et al.*, 2020). Avšak v oblasti translačního výzkumu je k nim nutné přistupovat jako k modelům komparativním.



Obr. č. 2: Schéma příkladů využití animálních modelů pro studium epilepsie.

1.2 Humánní *in vitro* modely

Navzdory tomu, že výzkum animálních modelů epilepsie se stále posouvá kupředu, obsahují animální modely určité limitace, kvůli kterým se nemohou vyrovnat modelům humánním (viz kapitola 1.1). Humánní *in vitro* modely zároveň umožňují snížení počtu experimentů na zvířatech a tím omezují jejich utrpení. Je proto nutné rozvíjet výzkum i v oblasti modelů humánních.

Na humánní *in vitro* modely je potřeba nahlížet z několika hledisek vzhledem k multifaktoriální povaze epilepsie. Lze rozlišovat například modely genetických epilepsií

nebo modely epilepsií získaných, například po mrtvici či traumatu. Každý z těchto modelů se bude mimo jiné lišit například v mechanismech epileptogeneze. Tyto hlediska je následně nutné zhodnotit při výběru vhodného systému pro modelování konkrétního syndromu.

Modelování geneticky zapříčiněných epilepsií předchází nutnost identifikace genů a jejich mutací vedoucích ke změně fenotypu a rozvoji epilepsie. Základy tomuto výzkumu byly položeny v roce 1990, kdy byl identifikován první gen asociovaný s klinickými projevy epilepsie. Konkrétně šlo o identifikaci tranzice v genu tRNA^{Lys} v lidské mitochondriální DNA jako příčiny myoklonické epilepsie s potrhanými červenými svalovými vlákny – MERRF syndromu (z angl. myoclonic epilepsy associated with ragged red fibers) (Shoffner *et al.*, 1990). V současné době známe více než 500 různých lokusů spojených s epilepsií (Noebels, 2015). Základní výzkum ukázal, že pro modelování genetických epilepsií nejsou vhodné animální modely, ač byly dříve primárně využívány geneticky modifikovaní hlodavci, nebo hlodavci selektovaní na základě spontánního výskytu zkoumané mutace. Jejich nevhodnost spočívá například v tom, že lidský mozek se vyvíjí jinak než hlodavčí a obsahuje například speciální buněčné podtypy, které se nenachází v mozku hlodavců (Boldog *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2012). Až objev způsobu derivace lidských embryonálních kmenových buněk (hESCs) v roce 1998 (Thomson, 1998) následovaný získáním indukovaných pluripotentních kmenových (iPSCs) buněk somatickým reprogramováním v roce 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006) vedl k rozvoji lepších alternativ pro modelování nejenom geneticky zapříčiněných epilepsií.

V následující kapitole se práce bude věnovat stručnému popisu různých druhů lidských buněčných linií a kultur vhodných pro *in vitro* modelování epilepsie.

1.2.1 Organotypické kultury

Při studiu savčích orgánů, a tedy i mozku, pomocí dvoudimenzionálních buněčných kultur narážíme na určitá omezení. Dvoudimenzionální (primární) buněčné kultury nemohou nikdy plnohodnotně fyziologicky simulovat *in vivo* systém z důvodu separace buněk a nedostatku kontaktu s ostatními buňkami. Možné řešení poskytují právě organotypické kultury, získané řezy zkoumaného orgánu, které vykazují určité vlastnosti pozorované v organismu v *in vitro* prostředí. Řezy zkoumaného orgánu se poté mohou dlouhodobě kultivovat ve vhodných médiích. Bylo pozorováno, že některé z těchto řezů jsou schopné vyvíjet spontánní epileptoformní aktivitu, jsou proto vhodné pro elektrofyzilogické testování

(Magalhães *et al.*, 2018). Limitacemi mohou být například složitá kultivace a vysoké nároky na kultivační médium. Některé otázky týkající se charakteristik kultivovaných neuronů zároveň zůstávají stále nezodpovězené (Humpel, 2018).

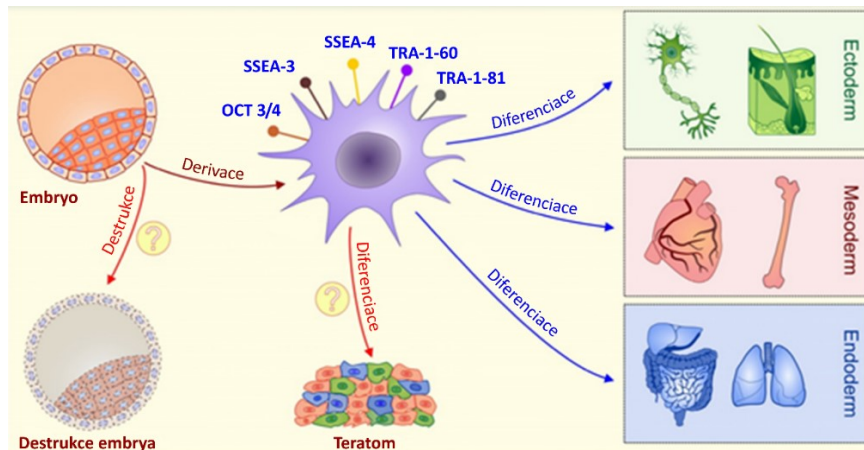
Hlavní výhodou organotypických kultur je udržení funkčních spojení třídídimenzionální struktury. V mozkových kulturách jsou tak zachovány některé vlastnosti původní tkáně, například neuronální konektivita nebo buněčná architektura. Třídídimenzionální prostředí lépe simuluje rozmanité buněčné procesy na molekulární úrovni, které nelze pozorovat u primárních buněčných kultur. Tkáň může pocházet buď z mozku pacienta po resekci epileptického ložiska nebo se může jednat o tkáň získanou *post mortem*. Současné kultivační techniky jsou však úspěšnější při použití tkáně novorozenců či perinatální lidské tkáně (Eugène *et al.*, 2014; Savary, 2018). Aplikací těchto technik na adultní tkáň pacientů se zabývají recentní studie (Nomura *et al.*, 2019). Organotypické kultury proto poskytují vhodný model hlavně pro studium mechanismů epileptogeneze, například po mozkovém traumatu nebo pro výzkum antiepileptik (Magalhães *et al.*, 2018)

1.2.2 Lidské embryonální kmenové buňky

hESCs jsou dobrým nástrojem pro modelování vývoje mozku a různých neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění. Jedná se o buňky získávané z časných embryí (blastocyst), které za vhodných podmínek *in vitro* zachovávají nediferencovaný pluripotentní stav a lze je množit téměř neomezeně (Obr. č. 3) (Thomson, 1998).

Výzkum se soustředí hlavně na jejich potenciální aplikaci v regenerativní medicíně. Z terapeutického hlediska se jeví slibně využití hESCs diferencovaných směrem k buněčným liniím CNS (Maroof *et al.*, 2013). Určité formy epilepsie se pojí s rozvojem zánětu a buněčné smrti, která může být významným faktorem přispívajícím k patogenezi tohoto onemocnění. Náhrada odumřelých buněk diferencovanými hESCs se jeví jako možná terapie určitých forem epilepsie. Například na myším modelu byly úspěšně potlačeny všechny projevy epilepsie po použití neurálních prekurzorů inhibičních neuronů derivovaných z hESCs. Po injekci prekurzorů do mozku epileptických myší buňky migrovaly a začlenily se do kortexu hostitele, což je předpokladem pro úspěšnou léčbu neurodegenerativních onemocnění za pomoci této technologie (Cunningham *et al.*, 2014).

Využití hESCs v léčbě lidských pacientů však provází určité kontroverze, jelikož získání hESCs provází nutnost zničení dárcovského embrya. Dále se ukazuje, že existuje jisté riziko rejekce tkáně po transplantaci hESCs do pacientova těla či případný rozvoj tumorů (Stojkovic, 2004; Volarevic *et al.*, 2018). Jedním ze způsobů, jak tyto, hlavně etické, problémy vyřešit se jeví indukování pluripotentních kmenových buněk (PSCs) přímo ze somatických buněk pacienta (Takahashi & Yamanaka, 2006).



Obr. č. 3: Schéma derivace a diferenciačního potenciálu lidských embryonálních kmenových buněk (hESCs). hESCs jsou pluripotentní, mohou tedy diferenciovat do buněk všech tří zárodečných listů – ektodermu, endodermu a mesodermu (převzato a upraveno dle Volarevic *et al.*, 2018).

1.2.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (hiPSCs) jsou definovány jako buňky, které mimikují morfologické a růstové vlastnosti, exprimují stejné markerové geny a povrchové antigeny jako hESCs. Díky zachování stavu pluripotence jsou schopny *in vitro* diferencovat do buněčných linií všech tří zárodečných listů. Jednou z výhod hiPSCs je samotný způsob jejich získávání – somatické reprogramování. Reprogramování buňky je docíleno pomocí retrovirální transdukce čtyř transkripčních faktorů do somatické buňky, nejčastěji fibroblastu. Transdukovanými transkripčními faktory jsou: transkripční faktor vazby oktameru (Oct3/4, z angl. octamer binding transcription factor), oblast Y rozhodující o pohlaví-box 2 (Sox2, z angl. sex determining region Y-box 2), faktor 4 podobný Krüppel (Klf4, z angl. Krüppel-like factor 4), buněčný onkogen myelocytomatózy (c-Myc, z angl. cellular myelocytomatosis oncogen) (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006).

Možnou překážkou pro využití v regenerativní či personalizované medicíně může být skutečnost, že v imunodeficientních myších formují iPSCs teratomy, mají tedy onkogenní potenciál a často vykazují genomovou nestabilitu. Ukazuje se ale, že tyto vlastnosti mohou být dané technickými omezeními jejich reprogramování (Gore *et al.*, 2011; Tapia & Schöler, 2016). Jako řešení se nabízí vynechání onkogenů, tedy Klf4 a c-Myc, a použití pouze faktorů Oct4 a Sox2, které jsou, jak se experimentálně prokázalo, esenciální a zároveň dostačující k reprogramování lidských somatických buněk na hiPSCs (Park *et al.*, 2008).

Navzdory tomu, že přetrvávají otázky o jejich bezpečnosti, úspěšné reprogramování diferencovaných lidských somatických buněk do pluripotentního stavu umožnilo vytvoření kmenových buněk specifických pro konkrétního pacienta. Objev způsobu derivace hiPSCs proto vedl k rozvoji nových, snadněji optimalizovatelných možností, jak modelovat nejrůznější onemocnění včetně epilepsie pacientovi na míru. Tím se nabízejí řešení etických otázek a příležitosti k lepšímu porozumění mechanismu vzniku onemocnění, bezpečnému farmakologickému screeningu, ale i tvorbě personalizované terapie.

1.2.4 Neurální kmenové buňky

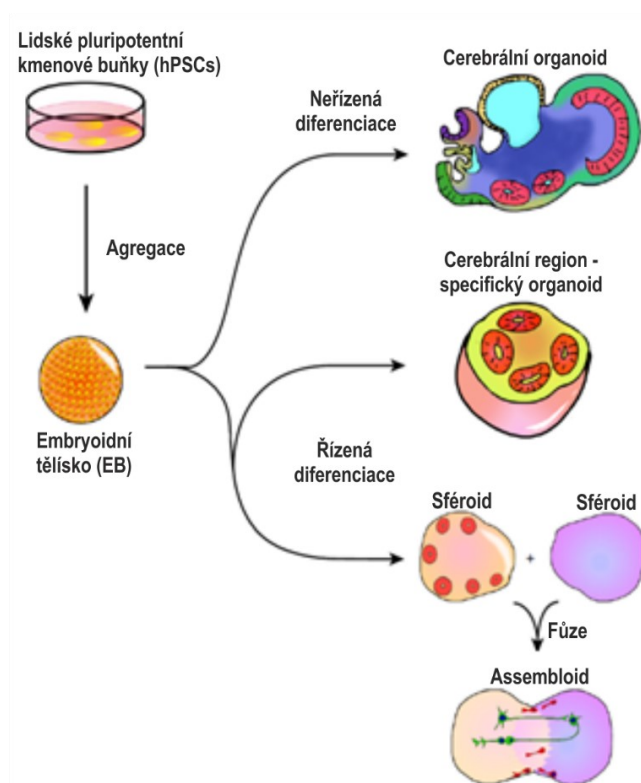
Lidské pluripotentní kmenové buňky (hPSCs) mohou dát vzniknout další velmi slibně se jevící buněčné linii pro modelování epilepsie – lidským neurálním kmenovým buňkám (hNSCs), respektive lidským neurálním progenitorům. hNSCs a progenitorům bude věnována následující kapitola (viz Kapitola 3), kde bude představeno schéma vývoje kmenových buněk neurálním směrem, charakterizovány vybrané komerčně dostupné neurální linie a popsáno jejich využití ve výzkumu epilepsie.

1.2.5 Cerebrální organoidy

Cerebrální organoidy jsou třídimenzionální samoorganizované struktury, které napodobují buněčnou organizaci, expresní (Camp *et al.*, 2015) a epigenetické (Luo *et al.*, 2016) charakteristiky vyvíjejícího se lidského mozku. Velikost organoidu se pohybuje v řádu milimetrů, přičemž může být tvořen stovky tisíc až miliony buněk. Cerebrální organoidy jsou produkovány z hPSCs, které jsou díky svým charakteristikám schopny diferencovat do různých neurálních buněčných typů na základě stimulace konkrétními morfogeny. Rozlišují se dva typy cerebrálních organoidů (viz Obr. č. 3). Prvním typem

jsou region specifické organoidy, které jsou indukovány k vývoji určitým směrem a představují model konkrétní oblasti mozku – např. středního mozku (Jo *et al.*, 2016). Druhým typem jsou organoidy, které modelují „kompletní“ lidský fetální mozek, respektive představují jednotku, která se skládá z více oblastí mozku (Giandomenico *et al.*, 2021).

Kultivace buněk ve dvoudimenzionálním prostředí poskytuje pouze limitované podmínky pro tvorbu organizovaných buněčných struktur a jejich funkčního propojení (Pasca *et al.*, 2015). Studie ukázaly, že pokud je buňkám umožněno volně se vznášet v médiu, či pokud je jim poskytnuta 3D matrix pro růst, organizují se do 3D struktur: organoidů (Qian *et al.*, 2018). Recentní pokroky ve studiu cerebrálních organoidů ukázaly, že se jedná o vhodný nástroj pro porozumění časného vývoje mozku tudíž i vhodný genetický model. Potenciální využití se tak nabízí i v personalizované terapii neurodegenerativních onemocnění včetně epilepsie, či při výzkumu patologických vývojových mechanismů těchto syndromů (Bershteyn *et al.*, 2017; Lancaster *et al.*, 2013).



Obr. č. 3: Schéma neřízeného a řízeného vývoje v tvorbě cerebrálních organoidů. Neřízená diferenciace využívá endogenní signalizaci lidských pluripotentních kmenových buněk (hPSCs) a jejich schopnosti se diferenciovat do tkání mimikujících vyvíjející se mozek. Řízená

diferenciace využívá růstových faktorů a jiných malých molekul k tvorbě sféroidů, které představují konkrétní tkáňový typ. Pro tvorbu cerebrálních region-specifických organoidů se využívá konkrétních "patterning" (vzorujících) faktorů pro nasměrování k tvorbě modelu určité oblasti mozku. Asembloidy poté reprezentují interakce mezi tkáněmi, které představují sféroidy (převzato a upraveno dle Qian *et al.*, 2019)

2 Buněčné linie lidských neurálních kmenových buněk a neurálních progenitorů

Komplexita a sofistikovanost mozku přináší mnoho výzev pro translační neurovědu. Přechod od úspěšných experimentů na zvířecích modelech k úspěšným lidským klinickým zkouškám se ukázal jako problematický. K překonání takových obtíží nám stále chybí plné porozumění specifickým reakcím mozku na určitá poranění či nemoci. Získávání vzorků živé mozkové tkáně je však velmi obtížné. *Post mortem* získaná tkáň vykazuje pouze omezené vlastnosti živé tkáně, a proto je nedostatečným nástrojem v odhalování mechanismů patogeneze. Nové výzkumy v oblasti hNSCs začínají nacházet řešení těchto problémů – nahrazují lidskou tkáň buněčnými liniemi. V současné době je již možné generovat teoreticky neomezené množství neurálních progenitorů, které jsou schopny diferencovat na neurony s charakteristickou morfologií a molekulární biologii terminálně diferencovaných lidských neuronů (Y. Liu *et al.*, 2020).

hNSCs vznikají *in vitro* diferenciací lidských PSCs, např. hESCs nebo hiPSCs, neurálním směrem a jsou definovány dvěma vlastnostmi: schopností sebeobnovení a multipotencí (Bohaciakova *et al.*, 2019; Tao & Zhang, 2016). K diferenciaci dochází působením různorodých morfogenů, přičemž výběrem konkrétní kombinace morfogenů lze nasměrovat hNSCs k diferenciaci do určitého neurálního buněčného typu (Perrier *et al.*, 2004; S. C. Zhang *et al.*, 2001). Nabízí se tak možnost využití hNSCs v modelování časného neurálního vývoje, patologických procesů a jejich terapie.

Aby bylo možné extrapolovat data získaná experimenty v modelech tvořených hNSCs na *in vivo* podmínky, je nutné pro modelování použít takovou buněčnou linii, která bude co nejlépe mimikovat fyziologický stav hNSCs. Zde narážíme na určitá omezení. Omezeními využití hNSCs jsou: limitovaná dostupnost donorů buněk, nízká míra proliferace a obtížnost dlouhodobé expanze *in vitro*, nesnadná produkce požadovaného počtu buněk a zároveň zachování stabilního fenotypu napříč pasážemi. Na řešení těchto problémů se zaměřují recentní studie zabývající se vývojovými liniemi hNSCs, ale i komerčně dostupné buněčné linie (Oh *et al.*, 2018).

Neurálním kmenovým buňkám (NSCs) byla v uplynulých 15 letech věnována zvýšená vědecká i komerční pozornost. Zásluhy za to lze přičíst jejich plasticitě, která je definována jako schopnost tvořit různé fenotypy s potenciálem téměř neomezené sebeobnovy, uvolňovat trofické a imunomodulační faktory a využívat časové a prostorové dynamiky. Díky plasticitě lze potenciálně využívat hNSCs například k testování neurotoxicity, tkáňovému inženýrství (hlavně k regeneraci neurální tkáně), buněčné terapii, farmakologickým testům a personalizované terapii. Vzhledem k rostoucímu zájmu o vývoj buněčných terapií zaměřených na neurodegenerativní onemocnění dochází k velkým pokrokům ve vývoji hNSCs, které se svými vlastnostmi velmi přibližují endogenním hNSCs (Ottoboni *et al.*, 2020).

V mozku dospělých savců, včetně člověka, jsou NSCs lokalizovány například v subgranulární zóně hipokampu a v subventrikulární zóně mozku. Tyto kmenové buňky se následně dělí a diferencují. Proces dělení a diferenciací NSCs se nazývá neurogeneze. Ukazuje se, že neurogeneze přetrvává ve striatu (Ernst *et al.*, 2014) a v hipokampu (Spalding *et al.*, 2013) u lidí po celý život (Boldrini *et al.*, 2018), avšak v hipokampu se stoupajícím věkem výrazně klesá (Sorrells *et al.*, 2018).

hNSCs CNS jsou multipotentní, mohou tedy diferencovat do astrocytů, neuronů i oligodendrocytů. Další významnou charakteristikou je jejich schopnost sebeobnovy. Neurální progenitor je termín označující buňku s více omezeným potenciálem, než má neurální kmenová buňka. Prekurzor je méně rigidní termín, který označuje jakoukoli buňku, která je vývojově časnější než buňka jiná (McKay, 1997). Dle některých autorů je termín neurální prekurzor termínem sjednocujícím neurální kmenové buňky a neurální progenitory (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). Výše zmíněné termíny nicméně potřebují striktnější definice, protože v současné literatuře často dochází k jejich synonymizaci a některé popsané buňky svými vlastnostmi plně neodpovídají kategoriím, do kterých by z definice měly zapadat. Co se týče schopnosti sebeobnovy, dělení a udržování hNSCs, bylo navrženo několik různých modelů, které jsou stále předmětem výzkumů a lze je tedy zatím brát jako prototypické. Ve stručnosti lze uvést dvě schémata dělení hNSCs. Neurální kmenová buňka může podstoupit symetrické dělení a dát vzniknout dvěma identickým dceřiným buňkám, a tím navýšit populaci kmenových buněk. Alternativně může neurální kmenová buňka podstoupit asymetrické dělení, v takovém případě jsou komponenty cytoplazmy

asymetricky rozděleny mezi dvě dceřiné buňky, dá tím vzniknout jedné buňce kmenové a jednomu neurálnímu progenitoru (Lazutkin *et al.*, 2019).

hNSCs mohou být kultivovány za neadherentních podmínek *in vitro*, čímž vzniknou klonálně odvozené kolonie označované jako neurosféry. Tyto buňky lze také kultivovat jako dvourozměrné adherentní monovrstvy (Adams & Morshead, 2018; Walker & Kempermann, 2014). V následujícím textu práce poskytneme přehled vývojových stádiích neurálních buněčných typů a charakteristiky jejich diferenciaci z hPSCs.

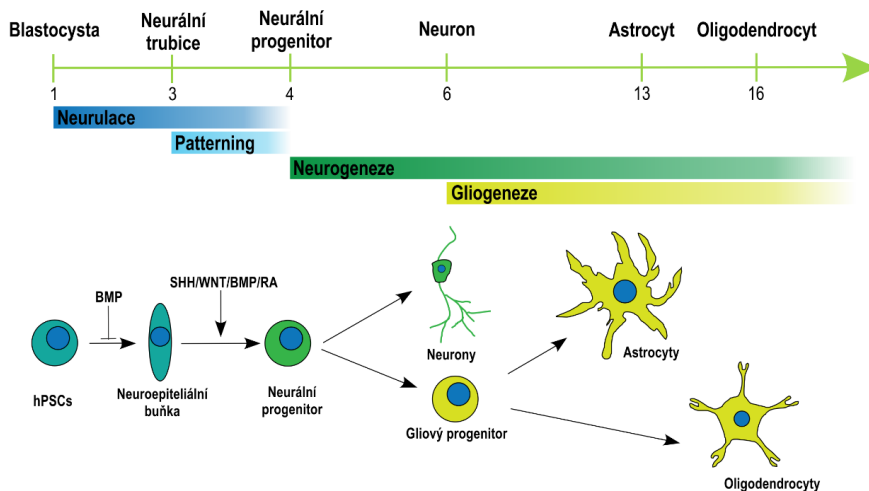
2.1 Neurální vývoj *in vitro*

Lidské pluripotentní kmenové buňky (hESCs a iPSCs) jsou velmi dobrým nástrojem pro modelování neurálního vývoje, studium patologických procesů i mechanismu účinku nových léčiv. Generování konkrétních neurálních buněčných typů z hPSCs nabízí možnost vytvářet buněčné linie obsahující buňky v určité fázi diferenciaci, což umožňuje studium různých buněčných typů a podtypů vyskytujících se v lidském mozku (Tao & Zhang, 2016). Studium diferenciaci hPSCs vedlo k objevu obecných principů pro tvorbu neurálních progenitorů směřujících konkrétním směrem v neurálním vývoji. Pochopení zákonitostí neurálního vývoje *in vivo* umožnilo vznik protokolů pro generování neuronů (Zhang *et al.*, 2013), astrocytů (X. Li *et al.*, 2018) a oligodendrocytů *in vitro* (Ehrlich *et al.*, 2017). Zlepšování současných metodologických postupů pro derivaci a kultivaci buněk neurální linie je stále předmětem studií (Marton *et al.*, 2019).

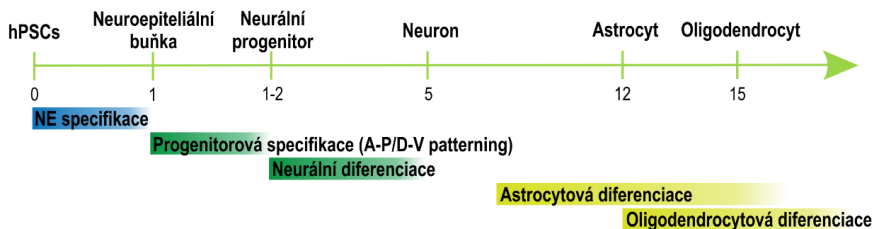
Prvním krokem pro diferenciaci hPSCs neurálním směrem je napodobení *in vivo* neurální indukce (viz Obr. č. 4). Odstranění komponent z média, které umožňují hPSCs zachování schopnosti sebeobnovy, vede k nastartování diferenciaci hPSCs směrem ke všem třem zárodečným listům (Tao & Zhang, 2016). Kultivace hPSCs v médiu bez séra poté indukuje diferenciaci neurálním směrem, jelikož favorizuje neurální buňky a omezuje buňky endodermálního a mesodermálního původu (Luzuriaga *et al.*, 2019). Dochází ke vzniku neuroepiteliálních buněk nebo hNSC. Diferencující kmenové buňky produkují fibroblastový růstový faktor (FGF, z angl. fibroblast growth factor), např. FGF5, jehož exprese je spojena se zahájením diferenciaci (Mossahebi-Mohammadi *et al.*, 2020), a inhibitory kostního morfogenického proteinu (BMP, z angl. bone morphogenic protein), čímž podporují diferenciaci neurálním směrem (Yoo *et al.*, 2011). Dále dochází ke vzniku neurálních

progenitorů, které jsou předurčené k další diferenciaci do jedné ze tří možných linií – zralých neuronů, astrocytů a oligodendrocytů (Reubinoff *et al.*, 2001).

Neurální vývoj in vivo (v týdnech)



Neurální diferenciace in vitro (v týdnech)



Obr. č. 4: Chronologické srovnání *in vivo* neurálního vývoje a *in vitro* neurální diferenciace včetně výčtu hlavních morfogenů zajišťujících diferenciační vzory (převzato a upraveno dle Tao & Zhang, 2016).

Gradient morfogenů, které se účastní specifikace neurálních progenitorů, jak podle antero-posteriorní, tak podle dorso-ventrální osy, dále předurčuje diferenciaci progenitorů do místně i funkčně specifického buněčného podtypu (např. progenitory s dorzální identitou předního mozku se stávají výlučně glutamátovými neurony) (Tao & Zhang, 2016). V současné době existuje mnoho diferenciačních protokolů, které se zaměřují na dosažení co největší efektivity, výtěžnosti a čistoty produkovaných buněk (Pasca *et al.*, 2015; Pawlowski *et al.*, 2017; Petersen & Strappe, 2016). Alternativní možností, jak pracovat s neurálními kulturami a vyhnout se procesu diferenciace buněk hPSC je zakoupení

již definované, dobře charakterizované buněčné linie neurálních progenitorů. Shrnutí vybraných komerčně dostupných neurálních linií se bude práce věnovat v následující kapitole.

2.2 Neurální buněčné linie

Přestože existuje spousta diferenciačních protokolů, pro účely editace genomu (např. pomocí metody CRISPR/Cas9) (Bressan *et al.*, 2017) a následného testování potenciálně patologických mutací je vhodné zakoupení již definované buněčné linie – nejčastěji neurálních progenitorů. Komerčně dostupné linie obsahují dobře charakterizované buňky v určité vývojové fázi, proto poskytují více homogenní výsledky a zároveň úsporu času eliminací nutných diferenciačních kroků. V této kapitole práce poskytneme shrnutí vybraných komerčně dostupných linií vhodných pro *in vitro* modelování epilepsie, konkrétně ReNcell Neural progenitors, ENStem-A a LM-NSC008. V současné době jsou na vzestupu také linie odvozené od hiPSCs, a to buď od zdravých dárců, či dárců s konkrétním onemocněním (např. buněčné linie od společnosti XCell Science) (Thorne *et al.*, 2016).

ReNcell™ Human Neural Progenitor Cells (MilliporeSigma) jsou imortalizované neurální buněčné linie odvozené z lidské fetální mozkové tkáně. K dostání jsou dvě různé linie, ReNcell CX a ReNcell VM. ReNcell CX jsou derivovány z kortexu a ReNcell VM z ventrálního mesencephalonu. Jak ReNcell CX, tak ReNcell VM jsou imortalizovány pomocí transdukce transkripčního faktoru homologu onkogenu ptačí virové myelocytomatózy (v-myc, z angl. avian myelocytomatosis viral oncogene homolog). Jejich klidový membránový potenciál je cca -60 mV, avšak nedochází k tvorbě akčních potenciálů. Mohou diferenciovat do neuronů, astrocytů i oligodendrocytů. V diferencovaném stavu ReNcell CX linie nevykazuje stejné elektrofyziologické vlastnosti, jako ReNcell VM při využití shodných diferenciačních protokolů (Donato *et al.*, 2007). ReNcell CX i ReNcell VM zachovávají stabilní fenotyp a genotyp i při dlouhodobé kultivaci – až 45 pasáží bez ztráty schopnosti diferencovat (Yip *et al.*, 2020). V nediferencovaném stavu exprimují obě linie Nestin a Sox2 (markery NSCs). Po diferenciaci do neuronů exprimovaly ReNcell CX β III-tubulin a po diferenciaci do gliových buněk gliální fibrilární kyselý protein (GFAP, z angl. glial fibrillary acidic protein) – markery daných diferencovaných buněčných typů (Miljan, 2017). ReNcell CX byly využity i v jedné recentní studii zabývající se epilepsií. V této studii byla sledována degradace lysinu v ReNcell CX, lidských astrocytech

a fibrobastech. Deficience antiquitinu, enzymu účastnícího se degradace lysinu, je hlavní příčinou na vitamínu B6 závislé epilepsii. Autoři prokázali, že saccharopinová dráha je hlavní dráhou lysinové degradace v lidských mozkových buňkách. Výsledky studie naznačují, že inhibice saccharopinové dráhy by mohla být léčbou pro deficienci antiquitinu (Crowther *et al.*, 2019).

ENStem-A™ (MilliporeSigma) je neimortalizovaná linie neurálních progenitorů odvozených z H9 linie hESCs. ENStem-A progenitory tvoří uniformní kultury, dobře se propagují a rostou na mnoha různých substrátech. ENStem-A buňky jsou schopné diferenciovat do neurálních buněčných podtypů a jsou vhodné pro genetické modifikace. Zachovávají si schopnost diferenciaci po zhruba 15 pasáží. V nediferenciovaném stavu exprimují ENStem-A progenitory Nestin a Sox2 (Merck, 2008; Yip *et al.*, 2020). Ukázalo se, že mají potenciál migrovat do místa poškození v mozku po prodělané mrtvici. Autoři studie transplantovaly ENStem-A do oblasti kontralaterální k místu infarktu. Následně byly transplantované buňky osm týdnů sledovány za využití MRI. Výsledky studie ukázaly, že buňky byly v místě poškození mozkové tkáně detekovatelné již po jednom týdnu po transplantaci a jejich množství výrazně narostlo po čtyřech týdnech po transplantaci. Po osmi týdnech po transplantaci bylo zjištěno, že vysoké procento transplantovaných buněk migrovalo do místa poškození tkáně (Chang *et al.*, 2013). ENStem-A neurální prekurzory by mohly najít uplatnění v terapii epilepsie.

LM-NSC008 (např. Atlantis Bioscience) je imortalizovaná linie NSCs, která je derivována z lidské fetální mozkové tkáně: z této definice je odvozen i název (LM-NSC008, z angl. L-MYC – immortalized human NSC line derived from human fetal brain). LM-NSC008 NSCs byly imortalizovány pomocí transdukce ptačího virálního onkogenu myelocytomatózy homologu 1 odvozeného z karcinomu plic (L-MYC, z angl. v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived). LM-NSC008 buňky jsou schopné diferenciaci do neuronů – exprese β III-tubulinu, astrocytů – exprese oblasti Y rozhodující o pohlaví–box 9 (Sox9, z angl. sex determining region Y–box 9) a oligodendrocytů – exprese oligodendrocytárního markeru O4 (Z. Li *et al.*, 2016). Schopnost diferenciaci je zachována po alespoň 15 pasáží. Studie ukázaly, že LM-NSC008 buňky mají schopnost migrace, vykazují dlouhodobou stabilitu a žádnou tumorogenicitu *in vivo* ani *in vitro* (Z. Li *et al.*, 2016; Rockne *et al.*, 2018).

Využití komerčně dostupných linií v oblasti translačního výzkumu má velký potenciál. Hlavními výhodami zakoupení již charakterizované buněčné linie je definovanost této linie, jednoduché použití, neomezený přísun materiálu a úspora času, který je v personalizované terapii velice důležitý.

Závěr

Epilepsie je mezi neurologickými onemocněními na třetím místě na světě, co se týče tíhy onemocnění, kterou musí pacienti nést (Vos *et al.*, 2016). Existuje mnoho různých druhů epilepsie a epileptických syndromů, přičemž toto onemocnění postihuje jak děti, tak dospělé a seniory. Téměř 10 % lidí prodělá během svého života záchvat, nicméně ne každý záchvat nutně musí vést k diagnóze epilepsie (Hauser & Beghi, 2008 dle Annegers *et al.*, 1995). Je proto nutné soustředit se na porozumění mechanismům opakovaného rozvoje záchvatů a snažit se rozvíjet metody, které by umožnily záchvatům přecházet. Například léčba antiepileptiky se soustředí na předcházení rozvoje záchvatu, ač se jedná o léčbu pouze symptomatickou. Jinými slovy, antiepileptika léčí pouze symptom (záchvat), ale ne příčinu vzniku epilepsie.

Z důvodu multifaktoriální povahy epilepsie a nedostatku zdravé lidské tkáně, která by sloužila jako kontrola, je výzkum epilepsie u lidských pacientů velmi obtížný. Na počátku modelování epilepsie stály animální modely. Přestože žádný animální model nedokáže plně reflektovat konkrétní druh lidské epilepsie, byly dobrou *in vivo* výzkumnou alternativou a položily základ porozumění mechanismům epileptogeneze. Animální modely také stály za objevem většiny využívaných antiepileptik a dodnes slouží pro výzkum nových léčivých látek. V současné době se ale stále více přistupuje k modelování epilepsie *in vitro*, přičemž se jako modely využívají vzorky tkání či různé buněčné kultury. Jako kultura mohou sloužit somatické buňky pacienta nebo definované buněčné linie lidských dárců. Dárci poté mohou být jak lidé zdraví, tak i lidé s určitým onemocněním, které má být modelováno.

Rozvoj metod modelování epilepsie *in vitro*, umožnil i rozvoj personalizovaných přístupů k léčbě epilepsie, které představují terapie vyvinuté na míru konkrétnímu pacientovi. Při výběru humánního *in vitro* modelu je nutné vždy zhodnotit jeho vlastnosti, aby byl vhodný pro konkrétní výzkumný záměr. Například pro elektrofyziologické experimenty je nutné znát, jaká je exprese membránových receptorů a kanálů. Pro studium potenciálně patologické mutace je potřeba vybrat takovou buněčnou linii, která bude dobře geneticky editovatelná (např. kompetentní k transfekci), zhodnotit počet pasáží, po který si buňky zachovávají stabilitu genotypu a fenotypu, a v neposlední řadě je nutné znát schopnost linie diferencovat v požadované buněčné typy.

V současné době jsou pro *in vitro* modelování lidské epilepsie nejvíce využívány hiPSCs a hNSCs, které umožňují diferenciaci na požadovaný buněčný typ. Jelikož jedním z nejvíce zastoupených druhů epilepsie je epilepsie geneticky podmíněná (Fiest *et al.*, 2017), umožňují hiPSCs a hNSCs studium vlivu potenciálně patologických mutací na mnoho aspektů neurálního vývoje, synaptogeneze, epileptogeneze, iktogeneze, morfologie a funkce poškozených neurálních buněk. Pochopení mechanismů rozvoje, etiologie a fungování epilepsie pomocí *in vitro* modelů umožňuje vývoj nových léčivých látek, ale i dalších terapeutických přístupů (např. dietárních úprav) ke zmírnění dopadu onemocnění na život pacienta. Nezanedbatelné procento typů epilepsií má stále neznámou příčinu, a proto je rozvoj metod *in vitro* modelování epilepsie stále velmi důležitou oblastí, na kterou je nutné zaměřit budoucí výzkum.

Seznam literatury

- Adams, K. V., & Morshead, C. M. (2018). Neural stem cell heterogeneity in the mammalian forebrain. *Progress in Neurobiology*, *170*, 2–36. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.005>
- Annegers, J. F., Hauser, W. A., Lee, J. R., & Rocca, W. A. (1995). Incidence of Acute Symptomatic Seizures in Rochester, Minnesota, 1935-1984. *Epilepsia*, *36*(4), 327–333. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1995.tb01005.x>
- Avanzini, G. (1995). Animal models relevant to human epilepsies. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, *16*(1–2), 5–8. <https://doi.org/10.1007/BF02229068>
- Aygun, H. (2020). Trazodone increases seizures in a genetic WAG/Rij rat model of absence epilepsy while decreasing them in penicillin-evoked focal seizure model. *Epilepsy & Behavior : 103*(Pt A), 106847. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106847>
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., & Hortopan, G. A. (2013). Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3410>
- Bar-Klein, G., Klee, R., Brandt, C., Bankstahl, M., Bascuñana, P., Töllner, K., Dalipaj, H., Bankstahl, J. P., Friedman, A., & Löscher, W. (2016). Isoflurane prevents acquired epilepsy in rat models of temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, *80*(6), 896–908. <https://doi.org/10.1002/ana.24804>
- Begley, C. E., & Beghi, E. (2002). The economic cost of epilepsy: a review of the literature. *Epilepsia*, *43 Suppl 4*, 3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.4.2.x>
- Bell, M. R., Belarde, J. A., Johnson, H. F., & Aizenman, C. D. (2011). A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 505–512. <https://doi.org/10.1038/nn.2777>
- Bershteyn, M., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., di Lullo, E., Nene, A., Wynshaw-Boris, A., & Kriegstein, A. R. (2017). Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell*, *20*(4), 435-449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.007>
- Bohaciakova, D., Hruska-Plochan, M., Tsunemoto, R., Gifford, W. D., Driscoll, S. P., Glenn, T. D., Wu, S., Marsala, S., Navarro, M., Tadokoro, T., Juhas, S., Juhasova, J., Platoshyn, O., Piper, D., Sheckler, V., Ditsworth, D., Pfaff, S. L., & Marsala, M. (2019). A scalable solution for isolating human multipotent clinical-grade neural stem cells from ES precursors. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1163-7>
- Boldog, E., Bakken, T. E., Hodge, R. D., Novotny, M., Aevermann, B. D., Baka, J., Bordé, S., Close, J. L., Diez-Fuertes, F., Ding, S. L., Faragó, N., Kocsis, Á. K., Kovács, B., Maltzer, Z., McCorrison, J. M., Miller, J. A., Molnár, G., Oláh, G., Ozsvár, A., Rózsa, M., Shehata, I., Smith, K. A., Sunkin, S. M., Tran, D. N., Venepally, P., Wall, A., Puskás, L. G., Barzó, P., Steemers, F. J., Schork, N. J., Scheuermann, R. H., Lasken, R. S., Lein, E. S., Tamás, G. (2018). Transcriptomic and morphophysiological evidence

- for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1185–1195. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0205-2>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bressan, R. B., Dewari, P. S., Kalantzaki, M., Gangoso, E., Matjusaitis, M., Garcia-Diaz, C., Blin, C., Grant, V., Bulstrode, H., Gogolok, S., Skarnes, W. C., & Pollard, S. M. (2017). Efficient CRISPR/cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells. *Development (Cambridge)*, 144(4), 635–648. <https://doi.org/10.1242/dev.140855>
- Caiazzo, M., Dell’Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T. D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Gustincich, S., Dityatev, A., & Broccoli, V. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. In *Nature* (Vol. 476, Issue 7359, pp. 224–227). Nature. <https://doi.org/10.1038/nature10284>
- Camp, J. G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Bräuninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., Knoblich, J. A., Lachmann, R., Pääbo, S., Huttner, W. B., & Treutlein, B. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), 15672–15677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520760112>
- Chang, D. J., Oh, S. H., Lee, N., Choi, C., Jeon, I., Kim, H. S., Shin, D. A., Lee, S. E., Kim, D., & Song, J. (2013). Contralaterally transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursor cells (ENStem-A) migrate and improve brain functions in stroke-damaged rats. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(11), e53-8. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.93>
- Chen, B., Choi, H., Hirsch, L. J., Katz, A., Legge, A., Buchsbaum, R., & Detyniecki, K. (2017). Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 76, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.08.039>
- Crowther, L. M., Mathis, D., Poms, M., & Plecko, B. (2019). New insights into human lysine degradation pathways with relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(4), 620–628. <https://doi.org/10.1002/jimd.12076>
- Cunningham, M., Cho, J. H., Leung, A., Savvidis, G., Ahn, S., Moon, M., Lee, P. K. J., Han, J. J., Azimi, N., Kim, K. S., Bolshakov, V. Y., & Chung, S. (2014). hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice. *Cell Stem Cell*, 15(5), 559–573. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.006>
- Davis, K. A., Sturges, B. K., Vite, C. H., Ruedebusch, V., Worrell, G., Gardner, A. B., Leyde, K., Sheffield, W. D., & Litt, B. (2011). A novel implanted device to wirelessly record and analyze continuous intracranial canine EEG. *Epilepsy Research*, 96(1–2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.05.011>

- de Deyn, P. P., D'Hooge, R., Marescau, B., & Pei, Y.-Q. (1992). Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Research*, *12*(2), 87–110. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(92\)90030-W](https://doi.org/10.1016/0920-1211(92)90030-W)
- Donato, R., Miljan, E. A., Hines, S. J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., Edwards, F. A., & Sinden, J. D. (2007). Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neuroscience*, *8*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-36>
- Ehrlich, M., Mozafari, S., Glatza, M., Starost, L., Velychko, S., Hallmann, A.-L., Cui, Q.-L., Schambach, A., Kim, K.-P., Bachelin, C., Marteyn, A., Hargus, G., Johnson, R. M., Antel, J., Sternecker, J., Zaehres, H., Schöler, H. R., Baron-Van Evercooren, A., & Kuhlmann, T. (2017). Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(11), E2243–E2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614412114>
- Engel, J. (2018). The current place of epilepsy surgery. *Current Opinion in Neurology*, *31*(2), 192–197. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000528>
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., & Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, *156*(5), 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>
- Eugène, E., Cluzeaud, F., Cifuentes-Diaz, C., Fricker, D., le Duigou, C., Clemenceau, S., Baulac, M., Poncer, J.-C., & Miles, R. (2014). An organotypic brain slice preparation from adult patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, *235*, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.07.009>
- Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E., & Fisher, R. S. (2018). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Research*, *139*, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015>
- Ferrier, D. (1873). Experimental researches in cerebral physiology and pathology. *British Medical Journal*, *1*(643), 457. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.643.457>
- Fiest, K. M., Birbeck, G. L., Jacoby, A., & Jette, N. (2014). Stigma in Epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *14*(5), 444. <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0444-x>
- Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C.-S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D. L., & Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology*, *88*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, *46*(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T., & Poo, M. ming. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, *105*(4), 521–532. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00341-5)

- Giandomenico, S. L., Sutcliffe, M., & Lancaster, M. A. (2021). Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development. *Nature Protocols*, *16*(2), 579–602. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00433-w>
- Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M. A., Kiskinis, E., Lee, J. H., Loh, Y. H., Manos, P. D., Montserrat, N., Panopoulos, A. D., Ruiz, S., Wilbert, M. L., Yu, J., Kirkness, E. F., Belmonte, J. C. I., Rossi, J., Thomson, J. A., Eggan, K., Daley, G. Q., Goldstein, L. S.B., Zhang, K. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *471*(7336), 63–67. <https://doi.org/10.1038/nature09805>
- Gowda, S., & Szabó, C. Á. (2019). Effects of ketamine on EEG in baboons with genetic generalized epilepsy. *Epilepsy Research*, *154*, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.04.008>
- Grainger, A. I., King, M. C., Nagel, D. A., Parri, H. R., Coleman, M. D., & Hill, E. J. (2018). In vitro models for seizure-liability testing using induced pluripotent stem cells. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00590>
- Gutnick, M. J., & Prince, D. A. (1975). Effects of projected cortical epileptiform discharges on neuronal activities in ventrobasal thalamus of the cat: Ictal discharge. *Experimental Neurology*, *46*(2), 418–431. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(75\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(75)90146-6)
- *Hauser, W. A., & Beghi, E. (2008). First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia*, *49*, 8–12. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01443.x>
- Helbig, K. L., Farwell Hagman, K. D., Shinde, D. N., Mroske, C., Powis, Z., Li, S., Tang, S., Helbig, I. (2016). Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genetics in Medicine*, *18*(9), 898–905. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.186>
- Hester, M. S., Hosford, B. E., Santos, V. R., Singh, S. P., Rolle, I. J., LaSarge, C. L., Liska, J. P., Garcia-Cairasco, N., & Danzer, S. C. (2016). Impact of rapamycin on status epilepticus induced hippocampal pathology and weight gain. *Experimental Neurology*, *280*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.03.015>
- Humpel, C. (2018). Organotypic Brain Slice Cultures. *Current Protocols in Immunology*, *123*(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpim.59>
- Jagirdar, R., Drexel, M., Bukovac, A., Tasan, R. O., & Sperk, G. (2016). Expression of class II histone deacetylases in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, *136*(4), 717–730. <https://doi.org/10.1111/jnc.13440>
- Jo, J., Xiao, Y., Sun, A. X., Cukuroglu, E., Tran, H. D., Göke, J., Tan, Z. Y., Saw, T. Y., Tan, C. P., Lokman, H., Lee, Y., Kim, D., Ko, H. S., Kim, S. O., Park, J. H., Cho, N. J., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Shin, J. H., Weinberger, D. R., Tan, E., King J., Hyunsoo S., Ng, H. H. (2016). Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons. *Cell Stem Cell*, *19*(2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.005>
- King, M. A., Newton, M. R., Jackson, G. D., Fitt, G. J., Mitchell, L. A., Silvapulle, M. J., & Berkovic, S. F. (1998). Epileptology of the first-seizure presentation: a clinical, electroencephalographic, and magnetic resonance imaging study of 300 consecutive

- patients. *The Lancet*, 352(9133), 1007–1011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03543-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03543-0)
- Klein, P., Friedman, A., Hameed, M. Q., Kaminski, R. M., Bar-Klein, G., Klitgaard, H., Koepp, M., Jozwiak, S., Prince, D. A., Rotenberg, A., Twyman, R., Vezzani, A., Wong, M., & Löscher, W. (2020). Repurposed molecules for antiepileptogenesis: Missing an opportunity to prevent epilepsy? *Epilepsia*, 61(3), 359–386. <https://doi.org/10.1111/epi.16450>
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Hauser, W. A., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. In *Epilepsia* (Vol. 51, Issue 6, pp. 1069–1077). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>
- Kwan, P., & Brodie, M. J. (2000). Early Identification of Refractory Epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 342(5), 314–319. <https://doi.org/10.1056/nejm200002033420503>
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
- Lazutkin, A., Podgorny, O., & Enikolopov, G. (2019). Modes of division and differentiation of neural stem cells. *Behavioural Brain Research*, 374, 112118. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112118>
- Li, X., Tao, Y., Bradley, R., Du, Z., Tao, Y., Kong, L., Dong, Y., Jones, J., Yan, Y., Harder, C. R. K., Friedman, L. M., Bilal, M., Hoffmann, B., & Zhang, S. C. (2018). Fast Generation of Functional Subtype Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11(4), 998–1008. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.019>
- Li, Z., Oganessian, D., Mooney, R., Rong, X., Christensen, M. J., Shahmany, D., Perrigue, P. M., Benetatos, J., Tsururyan, L., Aramburo, S., Annala, A. J., Lu, Y., Najbauer, J., Wu, X., Barish, M. E., Brody, D. L., Aboody, K. S., & Gutova, M. (2016). L-MYC Expression Maintains Self-Renewal and Prolongs Multipotency of Primary Human Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 7(3), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.013>
- Liu, J., Tong, L., Song, S., Niu, Y., Li, J., Wu, X., Zhang, J., Zai, C. C., Luo, F., Wu, J., Li, H., Wong, A. H. C., Sun, R., Liu, F., & Li, B. (2018). Novel and de novo mutations in pediatric refractory epilepsy. *Molecular Brain*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0392-5>
- Liu, Y., Michalska, A. E., Dottori, M., Eaton, E., Courtney, J.-M., Antonic, A., & Howells, D. W. (2020). Differential susceptibility of human neural progenitors and neurons to ischaemic injury. *Brain Research Bulletin*, 156(November 2019), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.12.005>
- Löscher, W. (2016). Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. In *Epilepsy Research* (Vol. 126, pp. 157–184). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.05.016>

- Luo, C., Lancaster, M. A., Castanon, R., Nery, J. R., Knoblich, J. A., & Ecker, J. R. (2016). Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain. *Cell Reports*, 17(12), 3369–3384. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.001>
- Luzuriaga, J., Pineda, J. R., Irastorza, I., Uribe-Etxebarria, V., García-Gallastegui, P., Encinas, J. M., Chamero, P., Unda, F., & Ibarretxe, G. (2019). BDNF and NT3 reprogram human ectomesenchymal dental pulp stem cells to neurogenic and gliogenic neural crest progenitors cultured in serum-free medium. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 52(6), 1361–1380. <https://doi.org/10.33594/0000000096>
- Magalhães, D. M., Pereira, N., Rombo, D. M., Beltrão-Cavacas, C., Sebastião, A. M., & Valente, C. A. (2018). Ex vivo model of epilepsy in organotypic slices—a new tool for drug screening. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1225-2>
- Maroof, A. M., Keros, S., Tyson, J. A., Ying, S. W., Ganat, Y. M., Merkle, F. T., Liu, B., Goulburn, A., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Widmer, H. R., Eggan, K., Goldstein, P. A., Anderson, S. A., & Studer, L. (2013). Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(5), 559–572. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.008>
- Marton, R. M., Miura, Y., Sloan, S. A., Li, Q., Revah, O., Levy, R. J., Huguenard, J. R., & Pasca, S. P. (2019). Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nature Neuroscience*, 22(3), 484–491. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0316-9>
- McKay, R. (1997). Stem Cells in the Central Nervous System. *Science*, 276(5309), 66–71. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.66>
- Merck. (2008). ENStem-A Adherent Human Neural Progenitors: A New Source of Primary Human Neural Cells. In *Millipore Corporation*.
- Miljan, E. A. (2017). ReNcell® Human Neural Progenitors. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/rencell-human-neural-progenitors.html>
- Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J. S., & Li, X. (2020). FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>
- *Noebels, J. (2015). Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nature Neuroscience*, 18(3), 344–350. <https://doi.org/10.1038/nn.3933>
- Nomura, S., Kida, H., Hirayama, Y., Imoto, H., Inoue, T., Moriyama, H., Mitsushima, D., & Suzuki, M. (2019). Reduction of spike generation frequency by cooling in brain slices from rats and from patients with epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(11), 2286–2294. <https://doi.org/10.1177/0271678X18795365>
- Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development (Cambridge)*, 146(4), dev156059. <https://doi.org/10.1242/dev.156059>
- Oh, J. H., Jung, C. R., Lee, M. O., Kim, J., & Son, M. Y. (2018). Comparative analysis of human embryonic stem cell-derived neural stem cells as an in vitro human model. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(2), 783–790. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3298>

- Ottoboni, L., von Wunster, B., & Martino, G. (2020). Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00148>
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., & Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, *451*(7175), 141–146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>
- Pasca, A. M., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Tian, Y., Makinson, C. D., Huber, N., Kim, C. H., Park, J. Y., O'Rourke, N. A., Nguyen, K. D., Smith, S. J., Huguenard, J. R., Geschwind, D. H., Barres, B. A., & Pasca, S. P. (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature Methods*, *12*(7), 671–678. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3415>
- Patra, P. H., Barker-Haliski, M., White, H. S., Whalley, B. J., Glyn, S., Sandhu, H., Jones, N., Bazelot, M., Williams, C. M., & McNeish, A. J. (2019). Cannabidiol reduces seizures and associated behavioral comorbidities in a range of animal seizure and epilepsy models. *Epilepsia*, *60*(2), 303–314. <https://doi.org/10.1111/epi.14629>
- Pawlowski, M., Ortmann, D., Bertero, A., Tavares, J. M., Pedersen, R. A., Vallier, L., & Kotter, M. R. N. (2017). Inducible and Deterministic Forward Programming of Human Pluripotent Stem Cells into Neurons, Skeletal Myocytes, and Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports*, *8*(4), 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.016>
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., & Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(34), 12543–12548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404700101>
- Petersen, G. F., & Strappe, P. M. (2016). Generation of diverse neural cell types through direct conversion. In *World Journal of Stem Cells* (Vol. 8, Issue 2, pp. 32–46). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i2.32>
- Pun, R. Y. K., Rolle, I. J., LaSarge, C. L., Hosford, B. E., Rosen, J. M., Uhl, J. D., Schmeltzer, S. N., Faulkner, C., Bronson, S. L., Murphy, B. L., Richards, D. A., Holland, K. D., & Danzer, S. C. (2012). Excessive Activation of mTOR in Postnatally Generated Granule Cells Is Sufficient to Cause Epilepsy. *Neuron*, *75*(6), 1022–1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.002>
- Qian, X., Jacob, F., Song, M. M., Nguyen, H. N., Song, H., & Ming, G. L. (2018). Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nature Protocols*, *13*(3), 565–580. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.152>
- Qian, X., Song, H., & Ming, G. L. (2019). Brain organoids: Advances, applications and challenges. In *Development (Cambridge)* (Vol. 146, Issue 8, p. dev166074). <https://doi.org/10.1242/dev.166074>
- Rakhade, S. N., & Jensen, F. E. (2009). Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nature Reviews Neurology*, *5*(7), 380–391. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.80>
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., & Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *19*(12), 1134–1140. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1134>
- Rockne, R. C., Adhikarla, V., Tsaturyan, L., Li, Z., Masihi, M. B., Aboody, K. S., Barish, M. E., & Gutova, M. (2018). Long-term stability and computational analysis of migration

- patterns of L-MYC immortalized neural stem cells in the brain. *PLoS ONE*, *13*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199967>
- Savary, E. (2018). Imaging pathological activities of human brain tissue in organotypic culture. *Journal of Neurological Disorders*, *06*, 33–44. <https://doi.org/10.4172/2329-6895-C9-049>
- Schmeiser, B., Zentner, J., Prinz, M., Brandt, A., & Freiman, T. M. (2017). Extent of mossy fiber sprouting in patients with mesiotemporal lobe epilepsy correlates with neuronal cell loss and granule cell dispersion. *Epilepsy Research*, *129*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.11.011>
- Schuster, J., Laan, L., Klar, J., Jin, Z., Huss, M., Korol, S., Noraddin, F. H., Sobol, M., Birnir, B., & Dahl, N. (2019). Transcriptomes of Dravet syndrome iPSC derived GABAergic cells reveal dysregulated pathways for chromatin remodeling and neurodevelopment. *Neurobiology of Disease*, *132*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104583>
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M. S., Seibel, P., Ballinger, S. W., & Wallace, D. C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, *61*(6), 931–937. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90059-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90059-n)
- Shorvon, S. D. (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, *52*(6), 1052–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03041.x>
- Sloviter, R. S., Zappone, C. A., Harvey, B. D., & Frotscher, M. (2006). Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: Possible anatomical substrate of granule cell hyperinhibition in chronically epileptic rats. *Journal of Comparative Neurology*, *494*(6), 944–960. <https://doi.org/10.1002/cne.20850>
- Smith, D., Rau, T., Poulsen, A., MacWilliams, Z., Patterson, D., Kelly, W., & Poulsen, D. (2018). Convulsive seizures and EEG spikes after lateral fluid-percussion injury in the rat. *Epilepsy Research*, *147*, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.09.005>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, *555*(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisén, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, *153*(6), 1219. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>
- Stojkovic, M. (2004). Derivation of Human Embryonic Stem Cells from Day-8 Blastocysts Recovered after Three-Step In Vitro Culture. *Stem Cells*, *22*(5), 790–797. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-790>
- Sun, L., Gilligan, J., Staber, C., Schutte, R. J., Nguyen, V., O’Dowd, D. K., & Reenan, R. (2012). A knock-in model of human epilepsy in *Drosophila* reveals a novel cellular

- mechanism associated with heat-induced seizure. *Journal of Neuroscience*, 32(41), 14146–14155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2932-12.2012>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tao, Y., & Zhang, S.-C. (2016). Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 19(5), 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.015>
- Tapia, N., & Schöler, H. R. (2016). Molecular Obstacles to Clinical Translation of iPSCs. *Cell Stem Cell*, 19(3), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.017>
- Tellez-Zenteno, José F., Matijevic, S., & Wiebe, S. (2005). Somatic comorbidity of epilepsy in the general population in Canada. *Epilepsia*, 46(12), 1955–1962. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00344.x>
- Tellez-Zenteno, Jose F., Patten, S. B., Jetté, N., Williams, J., & Wiebe, S. (2007). Psychiatric comorbidity in epilepsy: A population-based analysis. *Epilepsia*, 48(12), 2336–2344. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01222.x>
- *Thomas, R. H., & Berkovic, S. F. (2014). The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. *Nature Reviews Neurology*, 10(5), 283–292. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.62>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thorne, N., Malik, N., Shah, S., Zhao, J., Class, B., Aguisanda, F., Southall, N., Xia, M., McKew, J. C., Rao, M., & Zheng, W. (2016). High-Throughput Phenotypic Screening of Human Astrocytes to Identify Compounds That Protect Against Oxidative Stress. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(5), 613–627. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0170>
- Velluti, J. C., Costa da Costa, J., & Russo, R. E. (1997). The cerebral hemisphere of the turtle in vitro. An experimental model with spontaneous interictal-like spikes for the study of epilepsy. *Epilepsy Research*, 28(1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(97\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(97)00028-4)
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., & Stojkovic, M. (2018). Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 15, Issue 1, pp. 36–45). <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
- Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Brown, A., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Chen, A. Z., Coggeshall, M., Cornaby, L., Dandona, L., Dicker, D. J., Dilegge, T., Erskine, H. E., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Fleming, T., Forouzanfar, M. H., Zeeb, H., Zuhlke, L. J. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1545–1602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)

- Wagner, E., Rosati, M., Molin, J., Foitzik, U., Wahle, A. M., Fischer, A., Matiasek, L. A., Reese, S., Flegel, T., Matiasek, ; Kaspar, & Matiasek, K. (2014). *Hippocampal Sclerosis in Feline Epilepsy*. <https://doi.org/10.1111/bpa.12147>
- Walker, T. L., & Kempermann, G. (2014). One Mouse, Two Cultures: Isolation and Culture of Adult Neural Stem Cells from the Two Neurogenic Zones of Individual Mice. *J. Vis. Exp*, 84, 51225. <https://doi.org/10.3791/51225>
- West, S., Nolan, S. J., & Newton, R. (2016). Surgery for epilepsy: A systematic review of current evidence. In *Epileptic Disorders* (Vol. 18, Issue 2, pp. 113–121). <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0825>
- Wijnen, B. F. M., van Mastrigt, G. A. P. G., Evers, S. M. A. A., Gershuni, O., Lambrechts, D. A. J. E., Majoie, M. H. J. M., Postulart, D., Aldenkamp, B. A. P., & de Kinderen, R. J. A. (2017). A systematic review of economic evaluations of treatments for patients with epilepsy. *Epilepsia*, 58(5), 706–726. <https://doi.org/10.1111/epi.13655>
- Willner, P. (1991). Animal models as simulations of depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 131–136. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90529-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90529-2)
- Xu, X., Gao, D., Wang, P., Chen, J., Ruan, J., Xu, J., & Xia, X. (2018). Efficient homology-directed gene editing by CRISPR/Cas9 in human stem and primary cells using tube electroporation. *Scientific Reports*, 8(1), 11649. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30227-w>
- Yip, J. L. K., Lee, M. M. K., Leung, C. C. Y., Tse, M. K., Cheung, A. S. T., & Wong, Y. H. (2020). AGS3 and Gai3 Are Concomitantly Upregulated as Part of the Spindle Orientation Complex during Differentiation of Human Neural Progenitor Cells. *Molecules*, 25(21), 5169. <https://doi.org/10.3390/molecules25215169>
- Yoo, Y. D., Huang, C. T., Zhang, X., Lavaute, T. M., & Zhang, S. C. (2011). Fibroblast growth factor regulates human neuroectoderm specification through ERK1/2-PARP-1 pathway. *Stem Cells*, 29(12), 1975–1982. <https://doi.org/10.1002/stem.758>
- Young, N. A., Szabó, C. A., Phelix, C. F., Flaherty, D. K., Balaram, P., Foust-Yeoman, K. B., Collins, C. E., & Kaas, J. H. (2013). Epileptic baboons have lower numbers of neurons in specific areas of cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 19107–19112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318894110>
- Zeng, H., Shen, E. H., Hohmann, J. G., Oh, S. W., Bernard, A., Royall, J. J., Glattfelder, K. J., Sunkin, S. M., Morris, J. A., Guillozet-Bongaarts, A. L., Smith, K. A., Ebbert, A. J., Swanson, B., Kuan, L., Page, D. T., Overly, C. C., Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Hof, P. R., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Jones, A. R. (2012). Large-scale cellular-resolution gene profiling in human neocortex reveals species-specific molecular signatures. *Cell*, 149(2), 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.052>
- Zhang, M., Ngo, J., Pirozzi, F., Sun, Y. P., & Wynshaw-Boris, A. (2018). Highly efficient methods to obtain homogeneous dorsal neural progenitor cells from human and mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0812-6>
- Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O., & Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1129>

- Zhang, Y., Pak, C. H., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., Xu, W., Yang, N., Danko, T., Chen, L., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2013). Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*, *78*(5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.029>
- Zhu, B., Mak, J. C. H., Morris, A. P., Marson, A. G., Barclay, J. W., Sills, G. J., & Morgan, A. (2020). Functional analysis of epilepsy-associated variants in STXBP1/Munc18-1 using humanized *Caenorhabditis elegans*. *Epilepsia*, *61*(4), 810–821. <https://doi.org/10.1111/epi.16464>