

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Denisa Koleničová

**Indukcia neurogenézy a gliogenézy po ischemickom poškodení CNS - úloha
Wnt signálnej dráhy**

Induction of neurogenesis and gliogenesis after ischemic CNS injury - the role
of Wnt signaling pathway

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslava Anděrová, CSc.

Praha 2014

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, 24.4. 2014

Denisa Koleničová

Pod'akovanie

V nasledujúcich riadkoch by som rada poďakovala svojej školiteľke, Ing. Miroslave Anděrovej CSc., za starostlivé prečítanie rukopisu a všetky podnety a rady, ktoré mi počas písania práce dávala. Bez tejto pomoci by práca nemohla vzniknúť.

Veľké vďaka patrí aj kolektívu Oddelenia bunkovej neurofyziológie Ústavu experimentálnej medicíny Akadémie Vied Českej republiky v Prahe, a to najmä Mgr. Jánovi Kriškovi za odbornú pomoc a trpezlivosť počas mojej práce v laboratóriu.

Samostatné poďakovanie patrí aj PaedDr. Vlaste Ďurfinovej, za pomoc pri gramatickej úprave práce a môjmu bratovi Mgr. Branislavovi Koleničovi a zvyšku rodiny za veľkú podporu počas štúdia. Bez nej by to tiež nešlo.

Abstrakt

Bakalárska práca sa zaoberá ischemickým poškodením centrálného nervového systému (CNS), ktoré je jednou z najčastejších príčin úmrtia a invalidity na svete, a jeho možným liečením prostredníctvom indukcie neurogenézy. Skladá sa z troch základných častí. Prvá časť je zameraná na popis hlavných neurogénnych oblastí CNS, teda subventrikulárnej zóny a gyru dentatu (GD) hipokampu, a to ako na bunkovej úrovni, tak i na molekulárnej úrovni. Druhá časť je venovaná predovšetkým typom ischemického poškodenia, fokálnej a globálnej mozgovej ischémii. Samostatná kapitola v tejto časti práce popisuje zmeny v neurogenéze a gliogenéze po ischemickom poškodení mozgu, a teda zmenu v indukcii radiálnych gliových buniek, proliferácii a migrácii neurálnych progenitorových buniek a neuroblastov. V tejto kapitole je tiež popísaná aktivácia astrocytov, mikroglií a NG2 gliových buniek (nazývaných tiež polydendrocyty) po ischemickom poškodení CNS. Posledná, tretia časť práce, je zameraná na signálne dráhy, ktoré významne ovplyvňujú neurogenézu: Shh (z anglického *Sonic hedgehog homolog*), Notch a Wnt (z anglického *Wingless/Integrated*) signálna dráha. Najväčšia pozornosť je venovaná Wnt signálnej dráhe, ktorá je dôležitou súčasťou molekulárnych mechanizmov prebiehajúcich vo vnútri nervových buniek.

Kľúčové slová: neurogenéza, gliogenéza, hipokampus, *gyrus dentatus*, subventrikulárna zóna, ischemické poškodenie, Wnt/ β -katenín signálna dráha

Abstract

This bachelor thesis is focused on ischemic injury of the central nervous system (CNS), one of the most frequent causes of death and disability in the world, and its possible treatment via the induction of neurogenesis. It consists of three different parts. In the first part, main neurogenic regions of the CNS, the subventricular zone and *gyrus dentatus* (GD) of the hippocampus, are described at the cellular, as well as molecular level. The second part is mainly dedicated to ischemic injury, to the global and focal brain ischemia. A particular chapter of this part describes changes in neurogenesis and gliogenesis after ischemic injury of the brain, changes in the induction of radial glial cells, proliferation and migration of neural progenitor cells and neuroblasts. In this chapter, we also describe the activation of astrocytes, microglia and NG2 glia (also known as polydendrocytes) after ischemic injury of the CNS. The last, third part of the bachelor thesis, is focused on signaling pathways, which significantly influence neurogenesis: Shh (Sonic hedgehog homolog), Notch and Wnt (Wingless/Integrated) signaling pathways. Special attention is devoted to the Wnt signaling pathway, which is an essential part of molecular mechanisms in nerve cells.

Keywords: neurogenesis, gliogenesis, hippocampus, *gyrus dentatus*, subventricular zone, ischemic injury, Wnt/ β -catenin signaling pathway

Zoznam použitých skratiek

3-PGDH	3-fosfoglycerátdehydrogenáza (<i>3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>)
β-TrCP	väzbový proteín (<i>β-transducing repeat-containing protein</i>)
APC	nádorový supresorový gén (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
BLBP	proteín viažuci lipid (<i>brain lipid binding protein</i>)
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridín (<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>)
CaMKII	kalmodulín dependentná kináza II (<i>calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
cAMP	cyklický adenosín monofosfát (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
cGMP	cyklický guanosín monofosfát (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CBF1	C promótor viažuci faktor 1 (<i>C-promoter binding factor 1</i>)
CK1	kazeín kináza 1 (<i>casein kinase 1</i>)
CNS	centrálny nervový systém (<i>central nervous system</i>)
CXC4	CXC chemokínový receptor 4 (<i>CXC chemokine receptor 4</i>)
DCX	proteín asociovaný s mikrotubulmi (<i>doublecortin</i>)
Dlx2	transkripčný faktor (<i>distal-less homeobox 2</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dvl	proteín (<i>Dishevelled</i>)
EGF	epidermálny rastový faktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktoru (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EPO	erytropoetín (<i>erythropoetin</i>)
ERbB	receptor epidermálneho rastového faktoru (<i>erythroblastosis oncogene B</i>)
Fzd	receptor (<i>Frizzled</i>)
GABA_A	membránový receptor (<i>gamma-aminobutyric acid type A</i>)

GAD65	glutamátová dekarboxyláza (<i>glutamic acid decarboxylase 65</i>)
GCL	granulárne bunky (<i>granular cell layer</i>)
GD	<i>gyrus dentatus</i>
GFAP	gliálny acidický proteín (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GL	vrstva glomerulárnych buniek (<i>glomerular layer</i>)
GLAST	glutamát-aspartátový transportér (<i>glutamate-aspartate transporter</i>)
Gli1	transkripčný faktor (<i>glioma-associated oncogene homolog 1</i>)
GS	glutamát syntáza (<i>glutamate synthase</i>)
GSK	glykogén syntáza kináza (<i>glycogen synthase kinase</i>)
GSK-3α	glykogén syntáza kináza-3 α (<i>glycogen synthase kinase-3α</i>)
GSK-3β	glykogén syntáza kináza-3 β (<i>glycogen synthase kinase-3β</i>)
GTP	guanozíntrifosfát (<i>guanosine triphosphate</i>)
Gai	inhibičný G proteín (<i>inhibitory G protein</i>)
hA	horizontálne astrocyty (<i>horizontal astrocytes</i>)
Hes1	transkripčný faktor Notch signalizácie (<i>hairy enhancer of split 1</i>)
ICAT	inhibitor β -katenínu a TCF4 (<i>Inhibitor of β-catenin and TCF4</i>)
JNK	terminálna kináza (<i>Jun N-terminal kinase</i>)
L1	retrotranspozón (<i>long interspersed element-1</i>)
Lef	transkripčný faktor (<i>lymphoid enhancer factor</i>)
LRP	koreceptor Wnt signalizácie (<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>)
LV	postranná komora (<i>lateral ventricle</i>)
Mash1	transkripčný faktor (<i>mammalian achaete shute homolog 1</i>)

MCAO	oklúzia prostredných mozgových artérii (<i>middle cerebral artery occlusion</i>)
MCL	vrstva mitrálnych buniek (<i>mitral cell layer</i>)
MT	metalothoniáza (<i>methalothionase</i>)
Msi1	RNA viažuci proteín (<i>Musashi 1</i>)
NF-AT	transkripčný faktor (<i>nuclear factor of activated T-cells</i>)
NeuroD1	transkripčný faktor (<i>Neurogenic Differentiation 1</i>)
NG2	chondroitín sulfát proteoglykán (<i>neuron-glia antigen 2 chondroitin sulphate proteoglycan</i>)
NICD	intracelulárna Notch doména (<i>Notch intracellular domain</i>)
OB	čuchový lalok (<i>olfactory bulb</i>)
Olig2	transkripčný faktor oligodendrocytov (<i>oligodendrocyte transcription factor 2</i>)
PCP	plošná bunková polarita (<i>planar cell polarity</i>)
PKA	proteínkináza A (<i>protein kinase A</i>)
PKC	proteínkináza C (<i>protein kinase C</i>)
Prox1	transkripčný faktor (<i>prospero homeobox protein 1</i>)
PSA-NCAM	polysialová adhézna molekula neurónu (<i>poly-sialylated-neural cell-adhesion molecule</i>)
Ptc1	receptor Shh signalizácie (<i>Patched 1</i>)
rA	radiálne astrocyty (<i>radial astrocytes</i>)
Rac	malá Ras GTPáza
Rho	malá Ras GTPáza
RMS	rostrálny migračný prúd (<i>rostral migratory stream</i>)
RNA	kyselina ribonukleová (<i>ribonucleic acid</i>)
S100β	astrogliálny Ca ²⁺ viažuci proteín (<i>astroglial-derived Ca²⁺ binding protein β</i>)

SDF1α	faktor 1 α produkovaný stromálnymi bunkami (<i>stromal cell-derived factor 1α</i>)
SGZ	subgranulárna zóna (<i>subgranular zone</i>)
Shh	signálna dráha (<i>Sonic Hedgehog homolog</i>)
Smo	receptor Shh signalizácie (<i>Smoothened</i>)
Sox2	transkripčný faktor (<i>(sex determining region Y)-box 2</i>)
SVZ	subventrikulárna zóna (<i>subventricular zone</i>)
TCF	transkripčný faktor T-buniek (<i>T-cell factor</i>)
TLE1	transkripčný korepresor Wnt signalizácie (<i>transducin-like enhancer 1</i>)
TUC-4	marker nezrelých neurónov (<i>TOAD-64/Ulip-1/CRMP-4</i>)
Tuj-1	III. trieda β -tubulínu (<i>neuron-specific class III β-tubulin 1</i>)
VZ	ventrikulárna zóna (<i>ventricular zone</i>)
Wnt	signálna dráha (<i>Wingless/Integrated</i>)

Úvod	1
1 Neurogenéza a gliogenéza v dospelom centrálnom nervovom systéme	2
1.1 Hipokampus	2
1.1.1 Oblasti hipokampu	2
1.1.2 Gyrus dentatus	3
1.1.3 Populácie astrocytov v subgranulárnej zóne gyru dentatu	3
1.2 Subventrikulárna zóna	6
1.2.1 Architektúra a kompozícia buniek v dospeljej subventrikulárnej zóne	6
1.2.2 Usporiadanie buniek v dospeljej subventrikulárnej zóne	8
1.2.3 Pôvod tvorby nových neurálnych buniek	10
2 Ischemické poškodenie centrálného nervového systému	11
2.1 Typy mozgovej ischemie	11
2.1.1 Fokálna ischemia	11
2.1.2 Globálna ischemia	12
3 Zmeny v neurogenéze a v gliogenéze po ischemickom poškodení mozgu	13
3.1 Zmeny v subgranulárnej zóne hipokampu po ischemickom poškodení centrálného nervového systému	13
3.2 Zmeny v subventrikulárnej zóne postranných komôr po ischemickom poškodení centrálného nervového systému	13
3.2.1 Proliferácia neurálnych progenitorových buniek	13
3.2.2 Proliferácia a migrácia neuroblastov	14
3.2.3 Indukcia radiálnych gliových buniek	15
3.3 Astrocyty a ich aktivácia po ischemickom poškodení centrálného nervového systému	15
3.4 Mikroglie a ich aktivácia po ischemickom poškodení centrálného nervového systému	16
3.5 Polydendrocyty a ich reakcia na ischemické poškodenie centrálného nervového systému	16
4 Signálne dráhy regulujúce neurogenézu po ischemickom poškodení centrálného nervového systému	18
4.1 Notch signálna dráha	18
4.2 Sonic hedgehog homolog signálna dráha	19
5 Úloha Wnt signálnej dráhy v neurogenéze	21
5.1 Nekanonická Wnt signálna dráha	21
5.1.1 Wnt/PCP signálna dráha	21

Indukcia neurogenézy a gliogenézy po ischemickom poškodení CNS- úloha Wnt signálnej dráhy

5.1.2 Wnt/Ca ²⁺ signálna dráha.....	21
5.1.3 Neurogenéza v dospelom hipokampe a nekanonická Wnt signálna dráha.....	21
5.2 Kanonická Wnt signálna dráha	22
5.2.1 Funkcia a regulácia β -katenínu	22
5.2.2 Molekulárny mechanizmus kanonickej Wnt signálnej dráhy.....	22
5.2.3 Neurogenéza v dospelom hipokampe a kanonická Wnt signálna dráha	24
6 Záver	27

Úvod

Ochabnutie, znecitlivenie tváre, rúk, alebo i nôh, často na jednej strane tela, problémy s rozprávaním, znížená schopnosť porozumieť reči iného človeka pri komunikácii, závraty a bezvedomie. Tieto, ale i mnohé ďalšie poruchy, sú príznakom poškodenia mozgu, nazývaného mozgová ischemia. Práve toto poškodenie mozgu je jednou z najčastejších príčin úmrtia ľudí na celom svete. Ročne má na svedomí viac ako pätnásť miliónov úmrtí¹. Hoci riziko ischemického poškodenia stúpa s vekom, jeho percentuálne zastúpenie sa zvyšuje i u mladých ľudí. Napriek tomu, že žijeme v dobe technického a medicínskeho pokroku, ani dnes ešte stále neexistuje účinná terapia, ktorá by mala za následok obnovenie poškodeného nervového tkaniva.

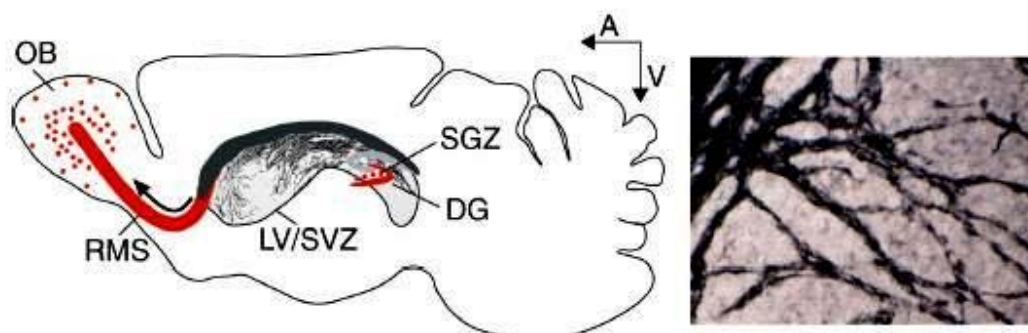
Ako je to možné? Pravdepodobne je to dané tým, že veľmi dlhú dobu ľudia zastávali názor, že centrálny nervový systém (CNS) nemá žiadnu schopnosť regenerácie. Prelomovými v tomto smere boli dve práce. Prvá bola publikovaná v roku 1965. Autori Altman a Das v nej objavili bunkovú proliferáciu v mozgu potkana. Druhá práca prišla až o tridsaťtri rokov neskôr, a to v roku 1998. Autorom je Peter S. Erikson a vo svojej práci poukazuje na to, že tvorba nových neurónov je možná i v ľudskom mozgu. Tieto objavy ovplyvnili do veľkej miery súčasnosť, kedy laboratória po celom svete zameriavajú svoj výskum na neurálne kmeňové bunky a hľadanie nových terapeutických prístupov s hlavným cieľom obnoviť funkciu nervového tkaniva.

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo zhrnúť doposiaľ nadobudnuté poznatky o neurogenéze a gliogenéze v CNS. V prvej časti práce sme sa zamerali na dve oblasti CNS, *gyrus dentatus* (GD) hipokampu a subventrikulárnu zónu (SVZ). Ide o oblasti, v ktorých v dospelosti prebieha proces neurogenézy. Okrem toho bolo dokázané, že po ischemickom poškodení mozgu sa práve v týchto dvoch oblastiach zvyšuje tvorba nových neurónov. Ďalšia časť je venovaná rôznym typom ischemického poškodenia mozgu. Zamerali sme sa v nej najmä na reakcie vybraných bunkových typov CNS na ischemické poškodenie. Posledná časť popisuje dôležité signálne dráhy, prostredníctvom ktorých je možné regulovať neurogenézu. Dôraz kladieme predovšetkým na molekulárny mechanizmus Wnt signálnej dráhy a procesy, ktorými pravdepodobne ovplyvňuje priebeh neurogenézy, najmä proliferáciu a diferenciáciu buniek po ischemickom poškodení mozgu.

Prevzaté z: ¹<http://mozkova-mrtvice.zdrave.cz/kdyz-se-rekne-mozkova-mrtvice/>

1 Neurogenéza a gliogenéza v dospelom centrálnom nervovom systéme

Neurogenéza, tvorba nových neurónov, prebieha v mozgu dospelého človeka najmä v dvoch neurogénnych oblastiach. Konkrétne v GD hipokampu a v SVZ postranných komôr predného mozgu (Obr. 1).



Obr. 1: Neurogenéza v mozgu dospelého cicavca. Pomocou šípok schematicky naznačený úsek prechádzajúci cez mozog dospeljej myši; zobrazenie postrannej komory a dve základné neurogénne oblasti: subventrikulárna zóna (SVZ), ktorá leží pozdĺž postrannej komory (LV; bledosivá farba) a subgranulárna zóna (SGZ) hipokampu. SVZ obsahuje rozsiahlu sieť polysialovej adhézneho molekuly (PSA-NCAM) neurónu, ktorá okrajovo súvisí s migráciou neurónov smerujúcich do čuchového laloku (čierna línia v postrannej komore) (Doetsch *et al.*, 2003).

1.1 Hipokampus

Hipokampus je súčasťou veľkého mozgu. Nachádza sa v strednej časti spánkového laloku. Je súčasťou limbického systému. Informácie z limbického systému a mozgovej kôry ďalej smeruje do predného talamu, hypotalamu a ďalších častí mozgu. Medzi hlavné funkcie hipokampu patrí účasť na tvorbe podmienených reflexov. Okrem toho má aj schopnosť posttetanickej potenciácie, čo je dej dôležitý pre tvorbu pamäťovej stopy.

1.1.1 Oblasti hipokampu

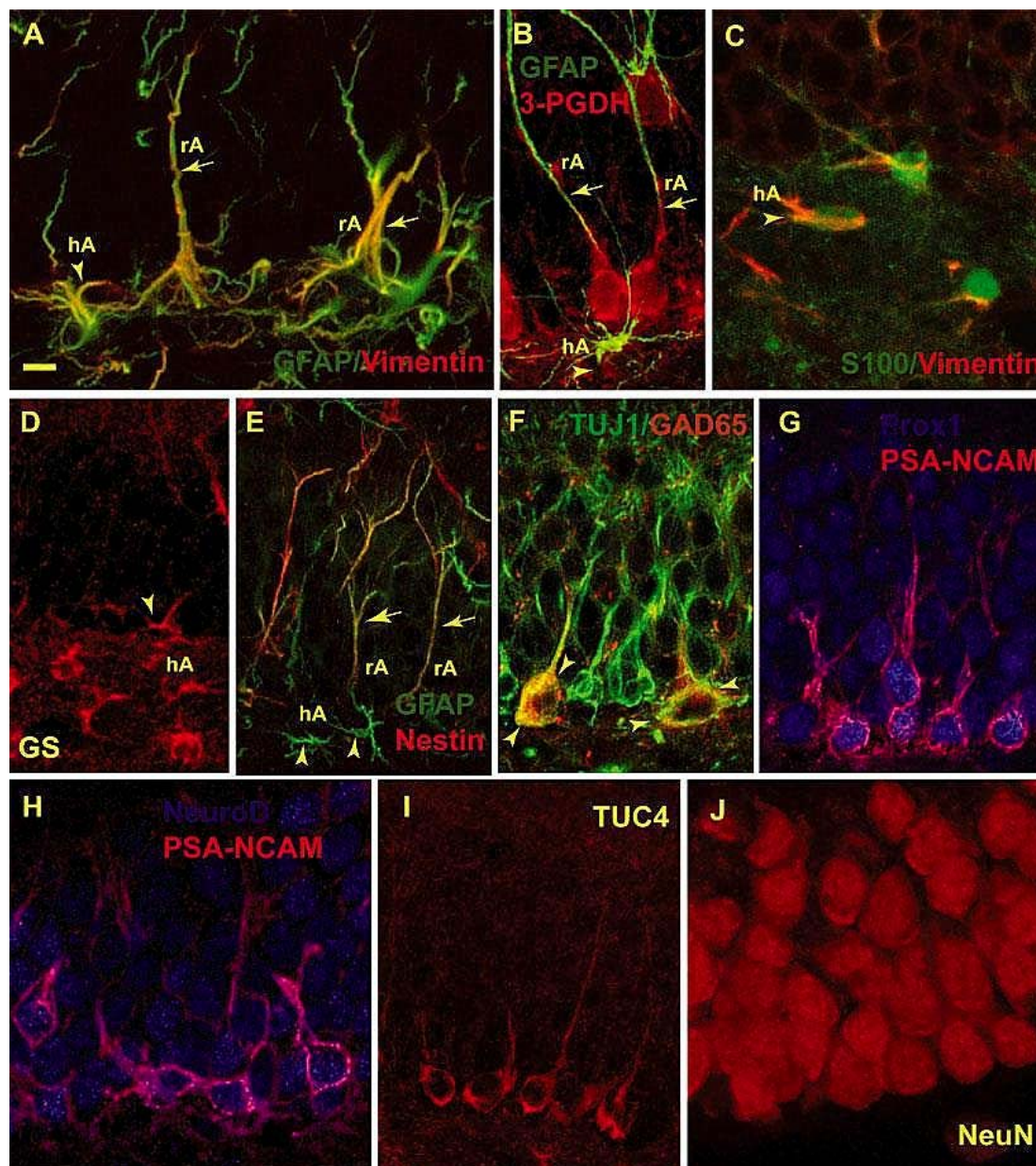
Štruktúru hipokampu môžeme rozdeliť na niekoľko základných oblastí: *cornu Ammonis* (CA), ktorý sa ďalej delí na útvary CA 1-4, *subiculum* a GD. K hipokampu sa radí ešte entorinálna kôra, *parasubiculum* a *presubiculum*. V oblasti GD, dochádza v dospelosti k neurogenéze (Altman & Das, 1965). Hlavnou funkciou neurogenézy je neustála tvorba nových buniek, ktoré sú následne zaradené do už fungujúceho CNS (Toni *et al.*, 2008). Vďaka tomuto procesu dochádza pravdepodobne k priebežnému nahradzovaniu odumretých neurónov a zvýšeniu plasticity dospelého mozgu (van Praag *et al.*, 2002).

1.1.2 *Gyrus dentatus*

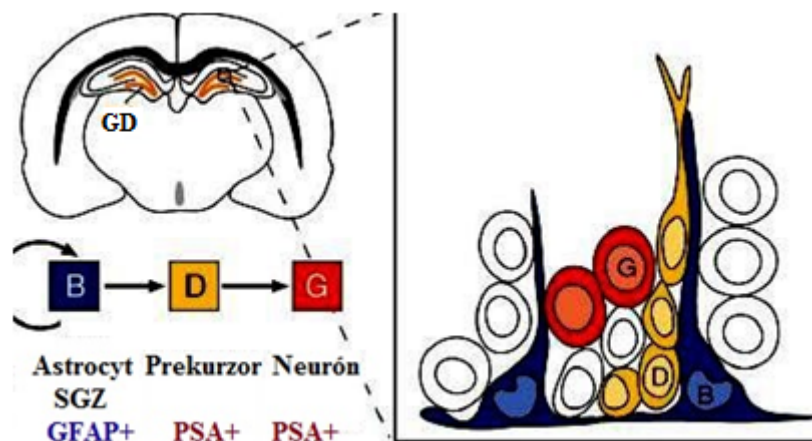
Nové neuróny vznikajú v dospelom GD v subgranulárnej zóne (SGZ), a to nielen u človeka, ale aj u všetkých cicavcov (Altman & Das, 1965). Viac ako 250 000 nových neurónov sa vytvorí v GD potkana každý mesiac (Cameron & McKay, 2001). Subgranulárna zóna je lokalizovaná medzi vrstvou granulárnych buniek (GCL) a hilom hipokampu (Palmer *et al.*, 2000).

1.1.3 *Populácie astrocytov v subgranulárnej zóne gyru dentatu*

V subgranulárnej zóne GD môžeme nájsť dve základné populácie astrocytov, a to radiálne a horizontálne astrocyty. Horizontálne astrocyty sú spravidla pretiahnuté, zatiaľ čo radiálne astrocyty majú okrúhle, polygonálne alebo triangulárne telo. Oba typy astrocytov obsahujú svetlú cytoplazmu, hustú sieť intermediárnych filamentov, nepravidelné kontúry bunky umiestnené medzi susednými bunkami, chromatín v granuliach, malé endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie tmavšie než neuróny. Kontakt s inými astrocytmi je u oboch typov rovnako sprostredkovaný pomocou medzerovitých spojení „*gap junctions*“ (Peters *et al.*, 1991). Tak, ako po morfolologickej stránke môžeme nájsť spoločné i odlišné znaky u týchto dvoch populácií astrocytov, je to i po stránke imunocytochemickej (Obr. 2). Radiálne i horizontálne astrocyty exprimujú gliálny fibrilárny acidický proteín (GFAP), ktorý je považovaný za marker „dospelých“ astrocytov (Bignami & Dahl, 1973). Ďalšími spoločnými markermi sú napríklad vimentín, ktorý predstavuje marker neurálnych kmeňových buniek a „nezrelých“ astrocytov (Sancho-Tello *et al.*, 1995), transkripčný faktor Mash1 (z anglického *mammalian achate schute homolog 1*) (Johnson *et al.*, 1990), RNA väzbový proteín Msi1 (z anglického *Musashi 1*), taktiež typický pre astrocyty (Sakakibara *et al.*, 1996), a 3-fosfoglycerátdehydrogenáza (3-PGDH) (Yamasaki *et al.*, 2001). Existujú ale i markery, ktorými môžeme tieto dve populácie astrocytov od seba odlíšiť. Napríklad nestín, marker neuroepiteliálnych kmeňových buniek, sa nachádza iba v radiálnych astrocytoch (Lendahl *et al.*, 1990), zatiaľ čo S100 β , vápnikový väzbový proteín, sa nachádza iba v horizontálnych astrocytoch (Cocchia, 1981). V niektorých horizontálnych astrocytoch je tiež exprimovaná glutamín syntetáza, enzým, ktorý mení glutamát na glutamín (Fages *et al.*, 1988).



Obr. 2: Imunohistochemická charakteristika subgranulárnej zóny. **A:** kombinované imunoznačenie proti gliálnemu fibrilárnemu acidickému proteínu (GFAP, zelená) a vimentínu (červená). **B:** označená 3-fosfoglycerátdehydrogenáza (3-PGDH; červená) a GFAP (zelená), spoločné označenie astrocytov. **C:** kombinované imunoznačenie horizontálnych astrocytov pomocou S100 β (zelená) a vimentínu (červená) v suranulárnej zóne (SGZ) a hile. **D:** imunoznačenie astrocytov SGZ pomocou glutamát syntetázy (GS; červená). **E:** imunoznačenie GFAP (zelená) a nestín (červená). Horizontálne astrocyty (hA; značené hrotmi šípok) sú nestín negatívne, zatiaľ čo radiálne astrocyty (rA; značené celými šípkami) sú označené pomocou GFAP a nestínu. **F:** imunoznačenie subgranulárnej zóny pomocou β -tubulínu III. triedy (Tuj1; zelená) a GAD65 (červená). Polyklonálna protilátka proti β -tubulínu III. triedy značí D bunky. **G:** Prox1 (z anglického *Prospero homeobox 1*) (modrá) a PSA-NCAM (červená). **H:** imunoznačenie v gyru dentatu pomocou NeuroD (modrá) a PSA-NCAM (červená). **I:** imunoznačenie v SGZ pomocou TUC-4 (červená). **J:** imunoznačenie rA a hA pomocou NeuN (červená). Škála merania: 5 μ m (snímky A-D) a 10 μ m (snímky F-J) (Seri *et al.*, 2004).



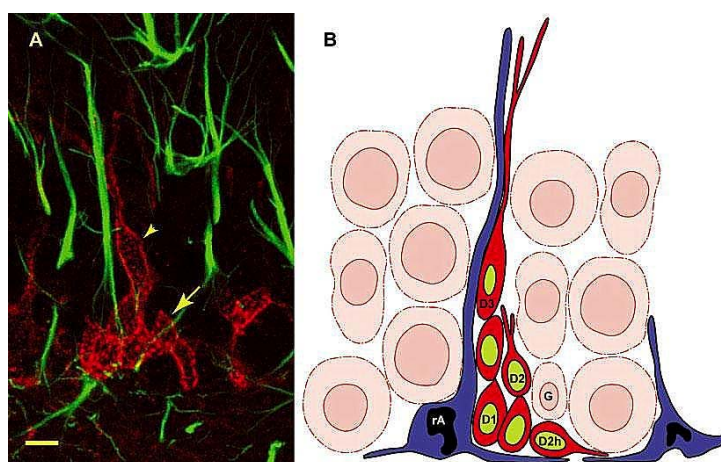
Obr. 3: Organizácia a bunkové typy v dospeljej subgranulárnej zóne. Schéma zobrazuje gyrus dentatus (GD; oranžová) v mozgu dospeljej myši a typy buniek v subgranulárnej zóne (SGZ). SGZ astrocyty (B; modrá, GFAP+) sú *in vivo* primárnymi prekuzormi, vďaka nim vznikajú prechodné prekuzory (D; žltá, GFAP-, PSA-NCAM+), ktoré generujú nové granulárne neuróny (G; červená; GFAP-, PSA-NCAM+) (Doetsch *et al.*, 2003).

Radiálne astrocyty sú považované za primárne progenitory. Delia sa počas vzniku D-buniek (Obr. 3), ktorých typickým markerom je DCX (z anglického *doublecortin*) a polysialová adhézna molekula neurónu (PSA-NCAM) (Obr. 3). D-bunky majú odlišnú štruktúru ako vyššie popísané astrocyty. Ich plazmatická membrána je hladká, cytoplazmu majú tmavú, s veľkým počtom polyribozómov (majú ich viac ako astrocyty, ale menej ako granulárne neuróny) i mitochondrie majú v porovnaní s astrocytmi svetlejšie a menšie (Seri *et al.*, 2001). Pomocou elektrónovej a konfokálnej mikroskopie v kombinácii s PSA-NCAM imunocytochémiou boli charakterizované tri základné subtypy D-buniek: D1, D2 a D3-bunky (Obr. 4). Predpokladá sa, že tieto tri základné subtypy predstavujú tri odlišné fázy v dozrievaní nových neurónov. D1-bunky sú vo vrstve granulárnych buniek usporiadané do zhlukov. Jeden zhluk tvoria dve až štyri bunky. Tie sedia v centre, ktoré je tvorené výbežkami astrocytov. Vďaka tomu dochádza k diferenciácii D-buniek na zrelé granulárne neuróny. Jedna D1-bunka sa rozdelí na dve dcérske D2-bunky. Avšak z týchto dvoch D2-buniek väčšinou len jedna pokračuje vo svojom vývoji, a to tak, že postupne predlžuje svoje výbežky dovtedy, kým jeden z výbežkov nedorastie až k priečnemu zosilneniu GCL (Seri *et al.*, 2004).

Okrem všeobecného popisu tvorby nových neurálnych buniek v GD hipokampu pomocou D-buniek existujú ešte ďalšie štúdie, ktoré popisujú dve skupiny Sox2⁺ buniek, tzv. radiálne a neradiálne. Predpokladá sa, že ide o kmeňové bunky. Transkripčný faktor Sox2 (z anglického (*sex determining region Y*)-box 2) je v spomínaných prácach používaný ako marker kmeňových buniek. Z delenia jednej radiálnej bunky môže vzniknúť jedna neradiálna

bunka a jeden DCX⁺ prekursor. Následne z neradiálnych buniek vznikajú astrocyty, zatiaľ čo z DCX⁺ prekursorov neuróny. Dôležité však je, že neradiálne Sox2⁺ kmeňové bunky majú potenciál zmeniť sa na bunky radiálne, čo poukazuje na rovnováhu medzi týmito dvomi typmi kmeňových buniek a možno i na ich dôležitú úlohu v homeostatickej kontrole dospelej neurogenézy (Suh *et al.*, 2007).

Astrocyty, ktoré oddeľujú D-bunky od hilu, sa nachádzajú v tesnom kontakte s cievami (Palmer *et al.*, 2000). To môže byť výhodné pre reguláciu migrácie, prípadne jej zastavenie z GCL alebo pre oddelenie astrocytov od faktorov prítomných v hile (Seri *et al.*, 2004).



Obr. 4: Model organizácie subgranulárnej zóny v koronálnej rovine. A: koronálny rez mozgu, imunoznačenie, proti gliálnemu fibrilárnemu acidickému proteínu (GFAP, zelená) a PSA-NCAM (červená). Zhhluk D1-buniek (šípka) v SGZ a D2-buniek (hroty šípok). **B:** schéma zobrazujúca organizáciu SGZ. Astrocyty (rA) s tangenciálnymi výbežkami na báze SGZ. Na schéme je vyznačené jadro (čierna) a cytoplazma (modrá) astrocytu. Na schéme vyznačené jadro (zelená) a cytoplazma (červená) D-bunky. Tieto bunky vytvárajú zhluky, ktoré sú umiestnené v centre tvorenom výbežkami astrocytov. D1-bunky v ňom dozrievajú na D2 a D3-bunky, ktoré sa usadia v GCL pozdĺž starších granulárnych neurónov (Seri *et al.*, 2004).

1.2 Subventrikulárna zóna

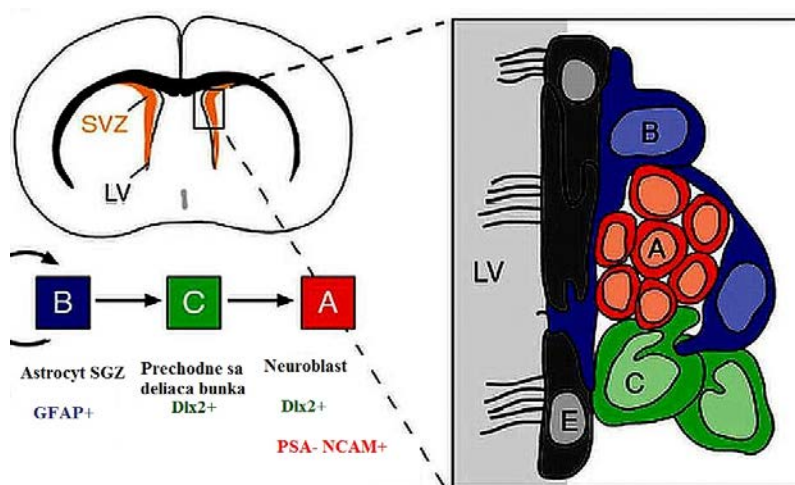
Na laterálnej strane postranných komôr mozgu je umiestnená SVZ. Je to zárodočná vrstva, ktorá vzniká počas embryonálneho vývoja a po čase sa vplyvom zmien dostáva do stavu, v ktorom udržiava svoje neurogénne vlastnosti až do dospelosti.

1.2.1 Architektúra a kompozícia buniek v dospelej subventrikulárnej zóne

Architektúra a kompozícia buniek v dospelej SVZ je dobre charakterizovaná na ultraštruktúrálnej úrovni (Obr. 5). V SVZ potkana a myši sa nachádzajú 4 základné typy

buniek: neuroblasty (A-bunky), astrocyty (B-bunky), prechodne sa deliace bunky, tzv. „*transit amplifying cells*“ (C-bunky) a endymálne bunky (E-bunky) (Doetsch *et al.*, 1997).

- ❖ **A-bunky:** migrujúce neuroblasty, migrujú ako homotypická reťaz (Doetsch *et al.*, 2003)
- ❖ **B-bunky:** astrocyty, oddeľujú reťazce A-buniek od endymálnej vrstvy a zároveň sú považované za neurálne kmeňové bunky (Mirzadeh *et al.*, 2008)
- ❖ **C-bunky:** veľmi rýchlo sa delia a vytvárajú zhľuky spojené s reťazcami A-buniek (Doetsch *et al.*, 2003)
- ❖ **E-bunky:** endymálne bunky. Rozlišujeme E1 a E2-bunky. E1 sú multiciliálne endymálne bunky, zatiaľ čo E2-bunky obsahujú iba 2 cílie. Vo všeobecnosti endymálne bunky vystielajú povrch komôr, avšak existujú rozdiely v ich priestorovej distribúcii. E2-bunky predstavujú menej než 5% z celkového počtu buniek pokrývajúcich povrch komôr (Mirzadeh *et al.*, 2008)



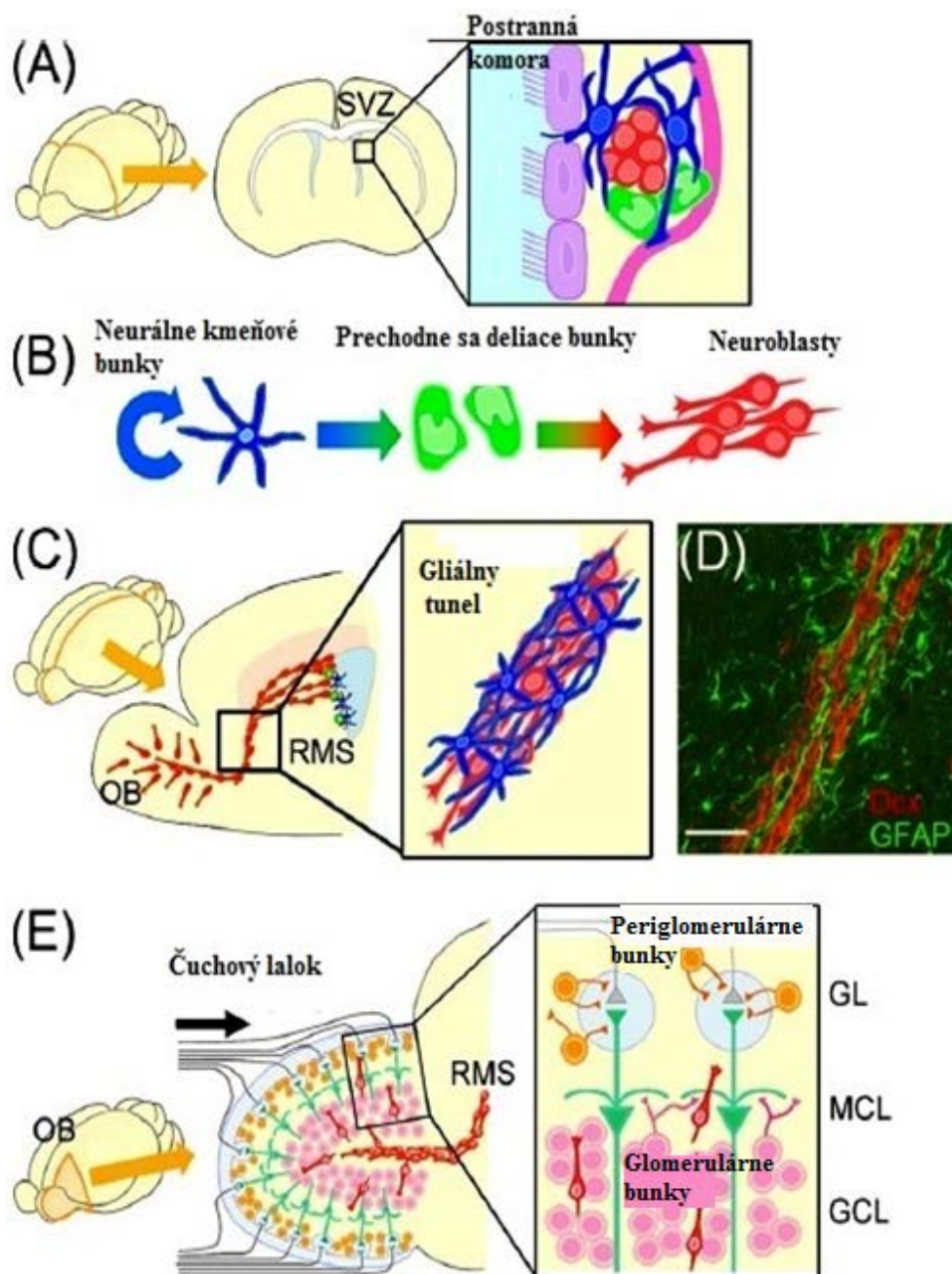
Obr. 5: Organizácia a typy buniek v dospeljej subventrikulárnej zóne. Schéma mozgu myši zobrazuje subventrikulárnu zónu (SVZ; oranžová), ktorá susedí s postrannou komorou (LV) a bunkové typy SVZ. Multiciliálne endymálne bunky (E; šedá) hraničiace s postrannou komorou. Sieť neuroblastov (A; červená) migrujúcich cez gliálne tunely vytvorené v SVZ z astrocytov (B; modrá). Prechodne sa deliace bunky, tzv. „*transit amplifying cells*“ (C; zelená). Občas vyčnievajú astrocyty SVZ a vytvárajú tak kontakt medzi postrannou komorou a endymálnymi bunkami. Tieto astrocyty SVZ majú len jedno cílium. Astrocyty SVZ (GFAP+) sú v tejto oblasti kmeňovými bunkami (GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM+). Pomocou C-buniek generujú neuroblasty (GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM-) (Doetsch *et al.*, 2003).

1.2.2 Usporiadanie buniek v dospeljej subventrikulárnej zóne

Astrocyty SVZ (B-bunky) sú považované za neurálne kmeňové bunky (Doetsch *et al.*, 1999), ktoré exprimujú GFAP. Morfológicky sú nerozoznatelné od astrocytov nachádzajúcich sa v iných oblastiach, ktoré sa nezúčastňujú procesu neurogenézy. Tieto bunky sa rozmnožujú pomaly, nepretržite (Kaneko & Sawamoto, 2009) a na svojom povrchu exprimujú receptor pre epidermálny rastový faktot (EGF) (Pastrana *et al.*, 2009).

Kmeňové B-bunky následne generujú C-bunky, ktoré rýchlo proliferujú (Kaneko & Sawamoto, 2009). Nedávne výskumy ukázali, že regulátorom proliferácie a diferenciácie týchto buniek je signál Wnt/ β -katenín (Adachi *et al.*, 2007). Beta-katenín signalizácia podporuje proliferáciu C-buniek, a tak zväčšuje i množstvo buniek, čo nakoniec vedie k zvýšeniu novo generovaných neurónov v čuchovom laloku (OB; olfactory bulb) (Kaneko & Sawamoto, 2009). C-bunky totiž napomáhajú vzniku A-buniek, neuroblastov, ktoré potom migrujú do OB.

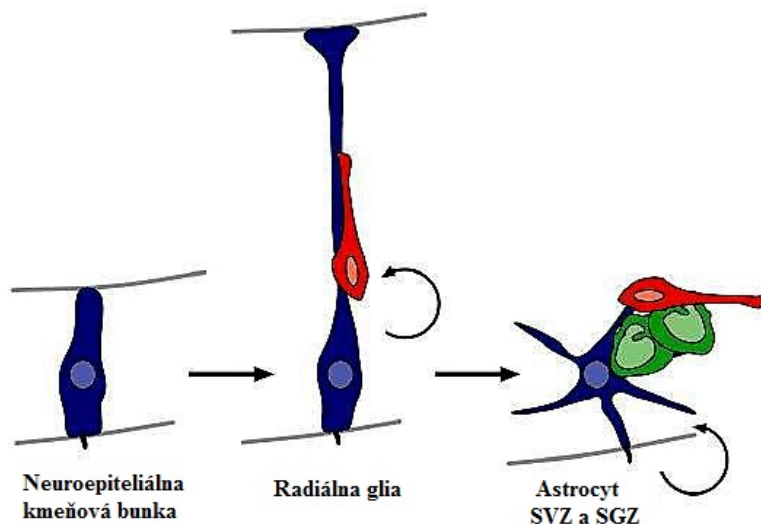
Neuroblasty putujú do OB prostredníctvom rostrálneho migračného prúdu (RMS) (Wichterle *et al.*, 1997). Sieť neuroblastov je obalená astrocytárnymi výbežkami, ktoré vytvárajú tzv. gliálny tunel (Lois *et al.*, 1996). Tieto astrocyty sú tiež schopné správať sa ako neurálne kmeňové bunky (Gritti *et al.*, 2002), ale ich rola v migrácii neuroblastov je zatiaľ neznáma. A-bunky sa v RMS pohybujú v smere toku cerebrospinálnej tekutiny. Napomáha im k tomu koncentračný gradient Slit-proteínov, ktoré sú produkované choroidálnym plexom. Ich hlavnou úlohou je navedenie A-buniek do OB (Sawamoto *et al.*, 2006). Napriek tomu, že sa RMS začína vyvíjať už pred narodením, reťazec neuroblastov a gliálne tunely sa objavujú až v dospelom RMS a nie sú pozorované v embryonálnej fáze alebo v skorom postnatálnom veku (Kaneko & Sawamoto, 2009). V OB sa reťazce A-buniek odpoja a migrujú do jednej z dvoch vrstiev, a to buď do vrstvy granulárnych buniek (GCL), alebo glomerulárnych (GL) (Obr. 6). Podľa vrstvy, do ktorej migrovali, sa následne diferencujú na jeden z dvoch typov čuchových interneurónov. Neuroblasty, ktoré migrujú do GCL, sa premieňajú na granulárne interneuróny, zatiaľ čo bunky putujúce do GL sa diferencujú na periglomerulárne interneuróny. Granulárne bunky sa neskôr delia na hlboké a povrchové bunky, pričom oba typy týchto buniek produkujú kalretinín. Na rozdiel od nich periglomerulárne bunky vytvárajú tri populácie buniek, a to bunky, ktoré exprimujú kalretinín, ale i kalbindín a tyrozín hydroxylázu. Dôležité je, že už predtým, než neuroblasty opustia SVZ, je určené, na aký typ čuchového interneurónu sa budú diferencovať (Merkle *et al.*, 2007).



Obr. 6: Neurogenéza v dospeljej subventrikulárnej zóne (SVZ). **A:** SVZ je lokalizovaná v postrannej komore predného mozgu. Nachádzajú sa v nej 4 typy buniek: ependymálne bunky, alebo E-bunky (fialová), neurálne kmeňové bunky, alebo B-bunky (modrá), prechodne sa deliace bunky, alebo C-bunky (zelená) a neuroblasty, alebo A-bunky (červená). Ružovou farbou sú znázornené cievy, s ktorými sú B-bunky v kontakte. **B:** B-bunky pri asymetrickom delení produkujú C-bunky, ktoré proliferujú a tvoria A-bunky. **C:** Novo generované A-bunky v reťazoch migrujú rostrálnym migračným prúdom (RMS) smerom k čuchovému laloku (OB). Modro sfarbené B-bunky sa pri tomto procese obaľujú a tvoria gliálny tunel. **D:** Imunohistochemické farbenie RMS; vo vnútri sú DCX pozitívne A-bunky migrujúce v reťazoch, obklopené GFAP pozitívnymi B-bunkami (mierka je 50 μ m). **E:** V čuchovom laloku A-bunky radiálne migrujú a diferencujú sa do granulórných a periglomerulárných buniek vo vrstve granulórných buniek (GCL) alebo glomerulárnej vrstve (GL) (Kaneko & Sawamoto, 2009).

1.2.3 Pôvod tvorby nových neurálnych buniek

Zdrojom radiálnych glií, ktoré sú považované za primárne neurálne progenitory, je ventrikulárna zóna (VZ), ktorá sa objavuje už počas embryonálneho vývoja (Peretto *et al.*, 2005). Radiálna glia dokáže exprimovať nestín, čo je znak spoločný s neuroepiteliálnymi bunkami. Okrem toho sú radiálne glie majoritne sa deliacimi bunkami v skorej kortikálnej ventrikulárnej zóne cicavcov (Doetsch *et al.*, 2003). V priebehu embryonálneho vývoja produkujú rôzne typy buniek (Obr. 7). Produkcia daného typu bunky závisí práve od oblasti VZ, z ktorej pochádzajú (Merkle *et al.*, 2007). U SVZ rozlišujeme 2 základné oblasti: oblasť laterálneho gangliového výčnelku a embryonálnej formy kôry (Young *et al.*, 2007). V postnatálnej diferenciácii radiálnych buniek na B-bunky si astrocyty SVZ ponechávajú schopnosť produkcie rôznych subpopulácií buniek (Merkle *et al.*, 2007).



Obr. 7: Model rodovej línie kmeňových buniek od embryogenézy po dospelosť. Kmeňové bunky sa pravdepodobne skladajú z neuroepiteliálnych kmeňových buniek, radiálnych glií a astrocytov. Z radiálnej glie (modrá) nevzniká iba neurón (červená), ale slúži tiež ako podpora pre migráciu. Z astrocytov (modrá) v subventrikulárnej zóne (SVZ) a subgranulárnej zóne (SGZ) vznikajú prostredníctvom progenitorových buniek (zelená) neuróny (červená) (Doetsch *et al.*, 2003).

2 Ischemické poškodenie centrálného nervového systému

Ischemické poškodenie mozgu je definované ako neurologický deficit, ktorý zapríčiňuje poruchu cievneho zásobovania mozgového tkaniva. Len v Spojených štátoch amerických trpí ročne viac ako 700 000 pacientov práve týmto ochorením. Uvádza sa, že je treťou najčastejšou príčinou smrti v západnom svete, a to hneď za srdcovými ochoreniami a rakovinou (Kissela *et al.*, 2001).

2.1 Typy mozgovej ischémie

Rozlišujeme dva typy mozgovej ischémie, a to ischémiu globálnu a fokálnu.

2.1.1 Fokálna ischémia

Fokálna ischémia je spôsobená redukciou alebo zastavením prietoku krvi mozgovou artériou. Niekedy býva spôsobená i pretrhnutím mozgovej tepny a následným krvácaním do parenchýmu mozgu.

V závislosti od formy ischemického poranenia vo všeobecnosti rozlišujeme dva typy modelov fokálnej mozgovej ischémie, a to trvalú a prechodnú ischémiu. Vo všeobecnosti, fokálna ischémia má za následok vytvorenie tzv. ischemického jadra, z ktorého sa degeneratívne zmeny šíria ďalej a je obklopené oblasťou menej poškodeného tkaniva, nazývanou penumbra (Hunter *et al.*, 1995).

Najčastejšie používaným modelom fokálnej ischémie je oklúzia strednej mozgovej artérie. Prevádza sa pomocou filamentu, ktorý sa zavedie do strednej mozgovej artérie, čo spôsobí jej uzavretie. Tento model, využívaný pri experimentoch, sa nazýva MCAO (z anglického *middle cerebral artery occlusion*). Po uskutočnení fokálnej ischémie pomocou modelu MCAO dochádza k infarktu striatu a príľahlej kôry temena (Arvidsson *et al.*, 2002).

Existujú však i ďalšie postupy, ako sa dá MCAO realizovať:

- ❖ **Tromboembolický model:** ide o injekciou spôsobené vytvorenie krvnej zrazeniny (Kudo *et al.*, 1982)
- ❖ **Model endotelínom indukovanej MCAO:** využíva schopnosť endotelínu-1 zužovať cievy (Sharkey & Butcher, 1995)

- ❖ **Model fotochemicky indukovanej trombózy:** základom tohto modelu sú látky, ktoré pri kontakte so svetlom spôsobujú smrť buniek. Medzi tieto látky patrí napríklad bengálska červeň (Watson *et al.*, 1985).

2.1.2 Globálna ischémia

Globálna ischémia je spôsobená zastavením srdcovej činnosti. K zlyhaniu srdcovej činnosti môže dôjsť pri srdcových arytmiách, hypotenzii, šokových stavoch alebo po úrazoch (Smith *et al.*, 1984). Po globálnej ischémii nastáva odumieranie neurónov najmä v troch základných oblastiach, ktorými sú hipokampus (oblasť CA1a CA4), striatum a neokortex (Kirino & Sano, 1984).

V laboratórnych podmienkach je možné mozgovú ischémiu realizovať dvomi spôsobmi. Prvá možnosť je zastaviť prietok krvi oboma karotídami a následne znížiť tlak látkami, ako sú pentolamín alebo trimetafan (Smith *et al.*, 1984). Druhá možnosť je zastaviť prietok krvi v štyroch cievach, ktoré zásobujú mozog. Najprv sa trvalo uzatvoria vertebrálne cievy a po dvadsiatich štyroch hodinách sa na určitú dobu uzavrujú i karotídy. Niekoľko dní po ischémii nastáva tzv. oneskorená bunková smrť, ktorá sa vyznačuje odumieraním neurónov (Kirino & Sano, 1984).

3 Zmeny v neurogenéze a v gliogenéze po ischemickom poškodení mozgu

Niekoľko hodín po ischemickom poškodení sú v mozgu dospelého cicavca spustené regeneračné procesy. Ide nie len o zmenu veľkosti a tvaru gliových buniek a zvýšenú proliferáciu neurálnych kmeňových buniek (B-buniek), ale i o zmenu diferenciačného potenciálu.

3.1 Zmeny v subgranulárnej zóne hipokampu po ischemickom poškodení centrálného nervového systému

Po indukcii MCAO nastane v SGZ hipokampu zvýšenie neurogenézy, kde radiálne astrocyty dosahujú najvyšší stupeň proliferácie 7 dní po ischemickom poranení CNS. Späť, na svoju pôvodnú hodnotu proliferácie, sa vracajú až po dobe 28 dní (Takasawa *et al.*, 2002). Väčšina nových buniek, ktoré vznikli po ischemickom poškodení, zaniká hneď po vzniku. Len približne 10 až 20% z týchto nových buniek prejde v GCL a hile procesom diferenciácie a stanú sa z nich GFAP pozitívne astrocyty (Komitova *et al.*, 2002).

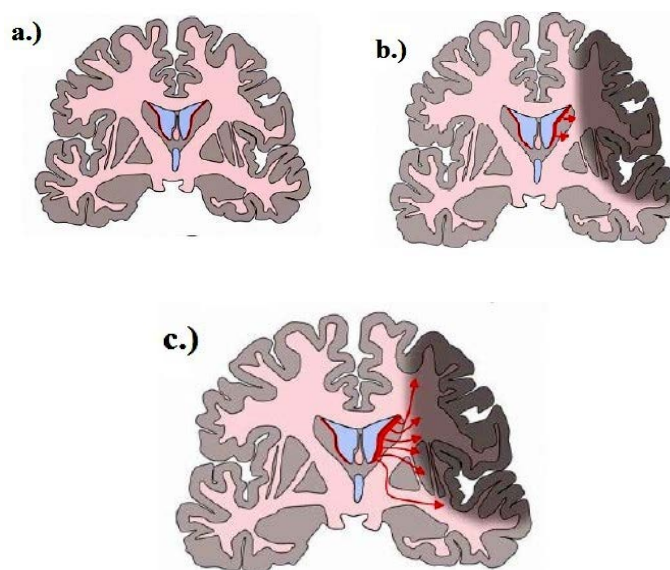
3.2 Zmeny v subventrikulárnej zóne postranných komôr po ischemickom poškodení centrálného nervového systému

Rovnako ako v hipokampe, tak i v postranných komorách SVZ je hlavnou zmenou, ktorá nastane po indukcii fokálnej ischemie, zvýšená proliferácia a neurogenéza. Zvýšená miera proliferácie buniek pretrváva ešte 4 mesiace po ischemickom poranení CNS (Thored *et al.*, 2006).

3.2.1 Proliferácia neurálnych progenitorových buniek

Po ischemickom poškodení mozgu u cicavcov dochádza k zvýšenej proliferácii gliových buniek a tiež k produkcii nových neurónov. Percento proliferujúcich buniek a doba trvania bunkového cyklu sú dvomi rozhodujúcimi parametrami v cytokinéze neokortikálnej neurogenézy (Nowakowski *et al.*, 1989). Dĺžka bunkového cyklu aktívne sa deliacich buniek SVZ u dospelého potkana je 18-21 hodín. Tento čas zostáva relatívne konštantný počas celého života organizmu (Smith & Luskin, 1998). Mozgová ischemia mení dobu trvania bunkového cyklu a podiel proliferujúcich buniek SVZ, ktoré sa podieľajú na indukcii neurogenézy po ischemickom poškodení CNS (Zhang *et al.*, 2006). Analýzy rastovej frakcie a fáz bunkového cyklu aktívne proliferujúcich buniek SVZ sú vykonávané označením S-fázy pomocou látky 5-bromo-2'-deoxyuridín (BrdU) (Nowakowski *et al.*, 1989). *In vivo* štúdie odhalili, že

mozgová ischemia značne zvyšuje množstvo buniek deliacich sa v SVZ (Obr. 8) a spôsobuje skrátenie G1-fázy bunkového cyklu. Začiatok delenia nastáva po dvoch dňoch (24% aktívne proliferujúcich buniek) a maximum je dosiahnuté po uplynutí siedmich dní (31% aktívne proliferujúcich buniek) po ischemickom poškodení. Štrnásť dní po mozgovej ischemii sa určitá časť deliacich sa buniek, ktoré sa rozmnožujú, vráti opäť na úroveň zaznamenanú dva dni pred poškodením (24%), tento stav zostáva určitú dobu konštantný (Zhang *et al.*, 2006). Počas kortikálnej neurogenézy je čas trvania bunkového cyklu spájaný s vývojom progenitorových buniek a tiež s predĺžením G1-fázy bunkového cyklu neuroepiteliálnych buniek, spúšťajúcich neuronálnu diferenciáciu (Huttner & Kosodo, 2005).



Obr. 8: Mobilizácia endogénnych neurálnych kmeňových buniek v ľudskom mozgu po mozgovej ischemii.
a.) Neurálne kmeňové bunky (B-bunky) v subventrikulárnej zóne dospelého človeka. b.) Proliferácia B-buniek, ktorá po ischemickom poškodení narastá a umožňuje čiastočnú náhradu buniek v miestach poškodenia. c.) Mobilizácia B-buniek za pomoci rastových a neurotrofných faktorov, ktoré podporujú proliferáciu, migráciu, diferenciáciu a prežitie buniek po ischemickom poranení (Burns *et al.*, 2009).

3.2.2 Proliferácia a migrácia neuroblastov

Neuroblasty, A-bunky, migrujú v nepoškodenej SVZ mozgu za pomoci RMS. Po ischemickom poškodení sa však smer migrácie neuroblastov zmení, a to tak, že sa začnú pohybovať na miesto, ktoré bolo poškodené mozgovou ischemiou, tj. neuroblasty začnú migrovať k striatu a k poškodenej mozgovej kôre (Jin *et al.*, 2003). Striatum je pre A-bunky častejším cieľom migrácie. Na toto miesto sú navádzané vďaka signálom, ktoré vysielajú nervové bunky v poškodenej oblasti (Thored *et al.*, 2006). Ako uvádza vo svojej práci Thored

a spoluautori, medzi faktory, ktoré navádzajú neuroblasty po ischemickom poškodení, patrí napríklad faktor 1 α . Tento faktor je vylučovaný stromálnymi bunkami (SDF-1 α). Výskumy ukázali, že faktor 1 α aktivuje chemokínový receptor CXCR4 (Thored *et al.*, 2006). Taktiež bolo zistené, že faktor SDF-1 α produkujú poškodené neuróny a chemokínový receptor CXCR4 nájdeme v neuroblastoch SVZ. Avšak z celkového množstva novo vzniknutých neurónov, ktoré vzniknú v priebehu šiestich týždňov po mozgovej ischémii, prežije iba 0,2% (Arvidsson *et al.*, 2002).

3.2.3 Indukcia radiálnych gliových buniek

Okrem zvýšenia proliferácie progenitorových buniek, indukuje ischemické poškodenie i delenie endymálnych buniek. Endymálne bunky exprimujú mnoho markerov typických pre radiálne gliové bunky vrátane cdc2 kinázy, ktorá fosforyluje vimentín, astrocytárny glutamátový transportér (GLAST) (Shibata *et al.*, 1997) a proteín viažuci lipid (BLBP). Počas embryonálneho vývoja fungujú radiálne gliové bunky ako neurálne kmeňové bunky. Existuje viacero štúdií zaoberajúcich sa vzťahom endymálnych buniek a radiálnych gliových buniek. Niektoré naznačujú, že endymálne bunky sú neurálnymi kmeňovými bunkami, ďalšie však poukazujú na to, že endymálne bunky hraničiace s ventrikulárnou stenou nemajú charakteristiku neurálnych kmeňových buniek (Johansson *et al.*, 1999). Je ale možné, že ischemické poškodenie indukuje transformáciu endymálnych kmeňových buniek na radiálne kmeňové bunky (Zhang *et al.*, 2008).

3.3 Astrocyty a ich aktivácia po ischemickom poškodení centrálného nervového systému

Astrocyty sú najväčšie a najpočetnejšie bunky zo skupiny neurogliových buniek, ktoré sa podieľajú na homeostáze mozgu. Po morfolologickej stránke sa vyznačujú početnými dlhými výbežkami, z ktorých niektoré majú ešte rozšírené zakončenia. V sivej hmote CNS sa vyskytujú plazmatické astrocyty. Majú objemnú cytoplazmu a pomerne široké, vetviace sa výbežky, ktoré sú však kratšie než u fibrilárnych astrocytov. Od fibrilárnych astrocytov sa odlišujú aj menším počtom intermediárnych filamentov. Fibrilárne astrocyty sa nachádzajú najmä v bielej hmote CNS. Majú dlhé výbežky s veľkým množstvom gliových filamentov. Astrocyty sú spojené pomocou „gap junction“ a vďaka týmto medzerovým spojeniam tvoria trojrozmernú sieť buniek, ktorou sa môžu signálne molekuly šíriť na pomerne veľké vzdialenosti. Za fyziologických podmienok astrocyty zaisťujú homeostázu iónov/neurotransmiterov i pH. Vďaka obsahu glykogénu slúžia ako energetický zásobovač neurónov. Ich výbežky sa tiež podieľajú na udržaní hematoencefalickej bariéry.

Po ischemickom poškodení CNS sa začnú astrocyty z mozgovej kôry deliť a vytvárať tzv. reaktívne astrocyty (Buffo *et al.*, 2008). Tieto astrocyty sú základom reaktívnej gliózy. Ide o astrocyty, ktoré majú nielen zväčšené telo a výbežky, ale taktiež i vo zvýšenej miere exprimujú progenitorové markery ako nestín, vimentín, BLBP a GFAP (Pforte *et al.*, 2005). Podieľajú sa na tvorbe gliálnej jazvy, ktorá uzatvára miesto poranenia (Rudge & Silver, 1990).

3.4 Mikroglie a ich aktivácia po ischemickom poškodení centrálného nervového systému

Mikroglie sú bunky mezodermálneho pôvodu. Vyskytujú sa v sivej aj bielej hmote CNS. Morfologicky ide o malé pretiahnuté bunky s nepravidelnými výbežkami. Ich jadrá sú oválne, tmavé a uložené rovnobežne s osou bunky. Tieto bunky vznikajú z kmeňových buniek v kostnej dreni a následne migrujú do mozgu krvným riečiskom skôr, než sa uzavrie hematoencefalická bariéra. Mikroglie patria do monocytomakrofágového systému. Ak nastane poškodenie CNS, prejaví sa ich schopnosť fagocytovať.

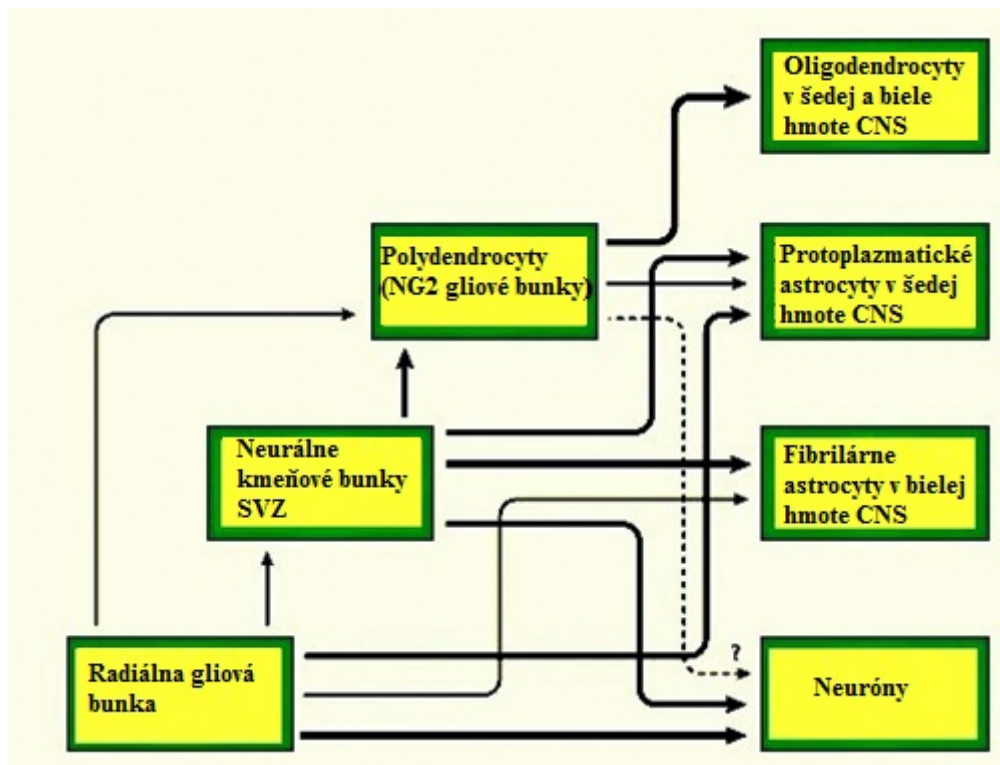
Po ischemickom poškodení CNS sa uvoľní v mieste poranenia veľké množstvo ATP z astrocytov, oligodendrocytov a endoteliálnych buniek. Práve ATP je zodpovedné za tzv. aktivovanie mikroglíí (Davalos *et al.*, 2005). Následne sa vysoko aktivované mikroglie priamo presúvajú k poškodeným i mŕtvym bunkám, ktoré vďaka schopnosti fagocytózy pohltia (Petersen & Dailey, 2004).

3.5 Polydendrocyty a ich reakcia na ischemické poškodenie centrálného nervového systému

Polydendrocyty sú známe i ako NG2 gliové bunky alebo prekursor oligodendrocytov. Ich názov je odvodený od proteoglykánu NG2, ktorý exprimujú a je súčasťou ich cytoplazmatickej membrány (Chittajalu *et al.*, 2004). Celý názov tohto proteínu je NG2 chondroitín sulfát proteoglykán, prvýkrát bol charakterizovaný na konci 20. storočia (Stallcup, 1981). Štruktúrne je tvorený z veľkej extracelulárnej domény a krátkej cytoplazmatickej časti (Nishiyama *et al.*, 1991). Polydendrocyty sa podieľajú na tvorbe oligodendrocytov v bielej i v šedej hmote (Obr. 9). Okrem toho tvoria subpopuláciu protoplazmatických astrocytov, a to v šedej hmote predného mozgu a v mieche (Zhu *et al.*, 2008). O tom, či dôjde k diferenciácii polydendrocytov na oligodendrocyty alebo protoplazmatické astrocyty, rozhoduje Olig2, transkripčný faktor oligodendrocytov. Ak dôjde k zadržaniu Olig2 vo vnútri jadra, nastane diferenciácia bunky na oligodendrocyt. Naopak,

presun z jadra do cytoplazmy spôsobí diferenciáciu polydendrocytu na astrocyt (Zhao *et al.*, 2009).

Po ischemickom poranení CNS sa zvyšuje proliferácia NG2 gliových buniek v ischemickej penumbre, no v ischemickom jadre ich počet klesá. Najvyšší nárast NG2 gliových buniek nastáva medzi 3. a 7. dňom po ischemickom poranení. Veľký pokles počtu buniek v jadre nastáva najmä dôsledkom odumierania oligodendrocytov, ktoré sú citlivé na nedostatok kyslíka (Ohta *et al.*, 2003).



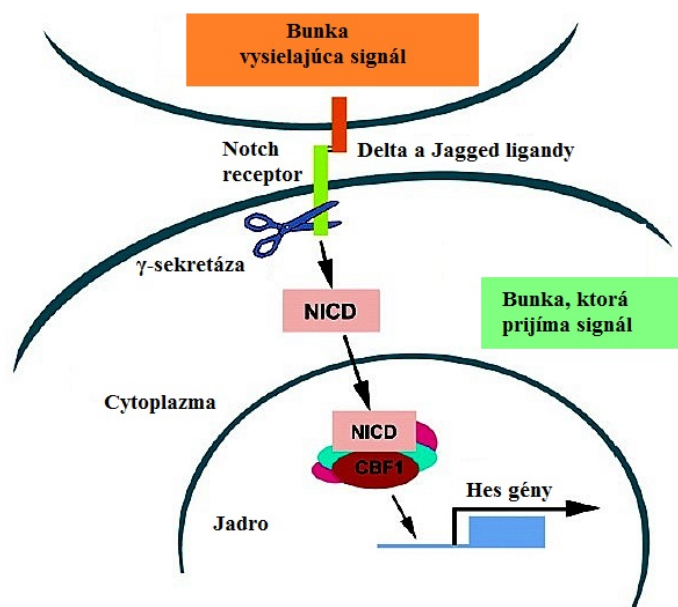
Obr. 9: Hypotetický vzťah príbuznosti rôznych línií buniek v centrálnom nervovom systéme. Schéma znázorňujúca pôvod gliových buniek. Polydendrocyty sa diferencujú na oligodendrocyty a protoplazmatické astrocyty. Hrúbka šípiek naznačuje relatívny príspevok progenitorovej populácie buniek. Šípka tvorená z bodiek poukazuje na možný vznik neurónov z polydendrocytov (Nishiyama *et al.*, 2009).

4 Signálne dráhy regulujúce neurogenézu po ischemickom poškodení centrálného nervového systému

Medzi základné dráhy regulujúce neurogenézu po mozgovej ischemii patrí Notch, Sonic hedgehog homolog a Wnt/ β -katenín signálna dráha. Aktivácia týchto signálnych dráh vedie k zvýšeniu proliferácie a diferenciácie endogénnych progenitorových buniek *in vivo*.

4.1 Notch signálna dráha

Notch receptory sú transmembránové proteíny aktivované pomocou *Delta* a *Jagged* ligandov (Gaiano *et al.*, 2000). K exprimovaniu Notch receptorov dochádza v neurónoch, zatiaľ čo Notch ligandy (*Jagged*) sú exprimované v astrocytoch. Práve lokalizácia expzie receptora a ligandu v iných bunkách, naznačuje vzájomnú spoluprácu týchto buniek (Wang *et al.*, 2009). Po naviazaní ligandu na receptor dôjde k uvoľneniu Notch intracelulárnej domény (NICD) (Zhang *et al.*, 2008). Aby sa NICD aktivovala, musí byť rozštiepená pomocou presenilínu-1 a γ -sekrétázy, enzýmového komplexu, a translokovaná do jadra (Obr. 10). V jadre sa NICD komplex spája s C promótorom viažucim faktor 1 (CBF1) a aktivuje transkripciu faktorov patriacich do génovej rodiny Hes (Gaiano *et al.*, 2000).



Obr. 10: Notch signálna dráha. Po naviazaní ligandov z rodiny *Delta* a *Jagged* (z bunky vysielajúcej signál) na Notch receptor (v bunke prijímajúcej signál) je intracelulárna Notch doména (NICD) rozštiepená pomocou γ -sekrétázy, enzýmového komplexu. Následne je NICD translokovaná do jadra a spojená s C promótorom viažucim faktor 1 (CBF1) a aktivuje ďalšie gény patriace do rodiny Hes génov (Zhang *et al.*, 2008).

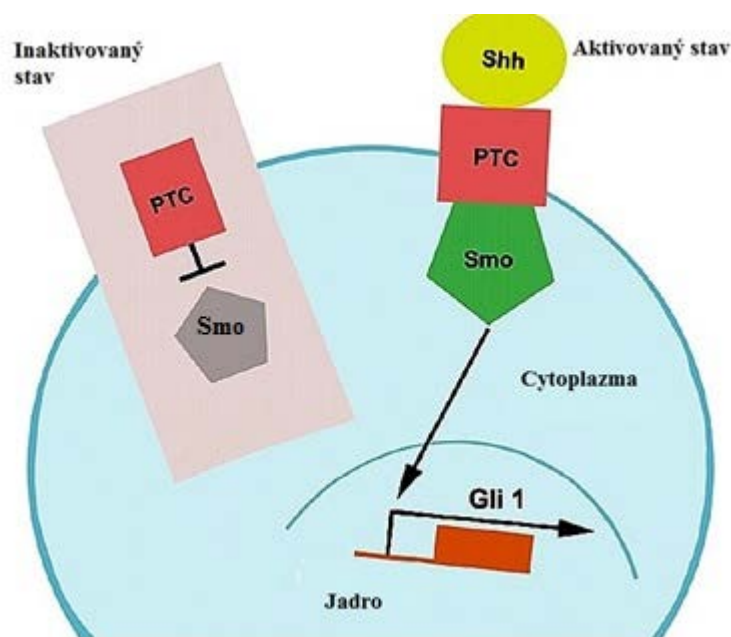
Notch signálna dráha počas vývoja zaisťuje tvorbu neurálnych progenitorových buniek a podporuje tvorbu astrocytov cez reguláciu bunkového cyklu a interakciu s ciliárnym neurotrofickým faktorom (Nagao *et al.*, 2007). *In vitro* štúdie odhalili, že mozgová ischemia zvyšuje expresiu Notch a Hes1 v neurálnych progenitorových bunkách SVZ a podporuje translokáciu NICD do jadra (Zhang *et al.*, 2008). Je možné, že práve Notch signál zvyšuje expanziu populácie neurálnych progenitorových buniek po ischemickom poškodení (Gaiano *et al.*, 2000). Podstatné však je, že Notch signálna dráha spolu so Sonic hedgehog signálnou dráhou reguluje neurálne kmeňové bunky (Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2006).

4.2 Sonic hedgehog homolog signálna dráha

Sonic hedgehog homolog (Shh) signálna dráha je spolu s epidermálnym rastovým faktorom (EGF) dôležitým regulátorom proliferácie neurálnych kmeňových buniek (Palma *et al.*, 2005).

Kanonická Shh signálna dráha vyžaduje pre svoju aktiváciu väzbu na receptor, ktorým je Ptch1 (z anglického *Patched1*). Inaktiváciou Shh dráhy je potlačený receptor Ptch1 a zároveň i koreceptor Smo (z anglického *Smoothened*) (Obr. 11). Naopak, v aktivovanom stave koreceptor Smo znižuje produkciu cyklického adenosín monofosfátu (cAMP) prostredníctvom inhibičného G proteínu (Gai) (Ogden *et al.*, 2008), tým je inhibovaná i proteínkináza A (PKA), čo spôsobí, že sa zastaví fosforylácia transkripčného faktoru Gli1 (Huangfu & Anderson, 2006). Gli1 je transkripčný faktor, ktorý sa používa ako marker efektorových buniek Shh signálnej dráhy. V dospelom mozgu je jeho produkcia potvrdená u buniek typu B a C. U B-buniek má za úlohu udržiavať ich neurogénny potenciál, zatiaľ čo u C-buniek je zodpovedný za zvýšenú proliferáciu (Palma *et al.*, 2005). Inaktivácia Shh signálu zníži tvorbu neurálnych kmeňových buniek typu B a naopak zvýši proliferáciu buniek typu C v SVZ (Balordi & Fishell, 2007).

EGF receptor patrí do rodiny ERbB tyrozín kinázových receptorov (ERbB 1-4). Po naviazaní ligandu receptor dimerizuje a jeho intracelulárna tyrozín kinázová doména aktivuje fosforyláciu samotného receptora, ale i iných intracelulárnych proteínov, ktorých úloha je signalizácia alebo vezikulárny transport (Sorkin & Goh, 2008). EGF sa nachádza v SVZ iba u buniek typu B a C. Naviazanie EGF na receptor spôsobuje zvýšenú tvorbu C-buniek v SVZ. K tomuto procesu však dochádza iba v čase prítomnosti EGF počas prvého týždňa po ischemickom poškodení. Ak tento stav pretrvá, dochádza k inhibícii premeny C-buniek na A-bunky (Ninomiya *et al.*, 2006).



Obr. 11: Shh signálna dráha. Pokiaľ je Shh (z anglického *Sonic hedgehog homolog*) signálna dráha inaktivovaná, Ptc1 (z anglického *Patched 1*) potlačí aktiváciu Smo (z anglického *Smoothened*), a tým i celú transdukčnú kaskádu. Ak je Shh aktivovaná, tak po naviazaní Ptc1 sa aktivuje Smo a tento komplex reguluje aktivitu Gli1 (z anglického *glioma-associated oncogene homolog 1*) v jadre (Zhang *et al.*, 2008).

Shh signálna dráha sprostredkováva i tvorbu erythropoetínu (EPO) (Wang *et al.*, 2007). EPO reguluje neurogenézu u myši ako v nepoškodenej, tak i v ischemicky poškodenej SVZ, a to prostredníctvom EPO receptoru (Shingo *et al.*, 2001). Samotný EPO je produkovaný astrocytmi, zatiaľ čo EPO receptor, na ktorý pôsobí, sa nachádza na neurónoch (Liu *et al.*, 2006). EPO výrazne zvyšuje aktiváciu neurogenézy po ischemickom poškodení (Wang *et al.*, 2004). Blokovanie Shh signálnej dráhy prostredníctvom cyklopamínu, ktorý je špecifickým inhibítorom Smo, potláča i zvýšenie neurogenézy pomocou EPO (Wang *et al.*, 2007). Úloha EPO je však ešte významnejšia. Uplatňuje sa totiž pri ochrane CNS pred reaktívnymi zlúčeninami kyslíku a voľnými radikálmi. Tento dej sa uskutočňuje za pomoci metalothionáz (MTs), ktoré aktivuje EPO v mozgu po ischemickom poškodení. MTs chránia neuróny pred poškodením, po trvalej MCAO. Práve ochranou neurónov prispievajú MTs k zmenšeniu objemu ischemickej penumbry v mozgovej kôre (Wakida *et al.*, 2007).

Prvýkrát sa Shh signálna dráha objavuje v organizme už počas ranej embryogenézy. Konkrétne pri ventralizácii nervovej trubice a tvorbe CNS (Ericson *et al.*, 1997). Počas neskorej embryogenézy má inú úlohu. Pôsobí na bunky v SVZ a SGZ. V nich udržuje tzv. „tiché“ kmeňové bunky v stave, v ktorom môžu produkovať iné bunky a zároveň samé seba (Ahn & Joyner, 2005).

5 Úloha Wnt signálnej dráhy v neurogenéze

Nedávne výskumy preukázali, že Wnt proteíny sú hlavné fyziologické regulátory mnohých aspektov kmeňových buniek. Ako bolo už v texte spomenuté i neurogenéza v dospelom mozgu je regulovaná okrem iných i za pomoci Wnt (z anglického *Wingless/Integrated*) signálnej dráhy. Wnt signálnu dráhu môžeme kategorizovať do dvoch typov, a to na kanonickú a nekanonickú dráhu. V dospelaj neurogenéze má veľký význam najmä kanonická, teda Wnt/ β -katenín signálna dráha.

5.1 Nekanonická Wnt signálna dráha

Nekanonická Wnt signálna dráha má dve základné vnútrobunkové kaskády, Wnt/PCP (planar cell polarity) a Wnt/ Ca^{2+} signálnu dráhu.

5.1.1 Wnt/PCP signálna dráha

V prípade Wnt/PCP signálnej dráhy je Wnt proteín viazaný s Fzd (z anglického *Frizzled*) receptorom na bunkovom povrchu a spôsobuje aktiváciu malých GTPáz Rho/Rac alebo kinázy JNK (z anglického *Jun N-terminal kinase*). Táto aktivácia reguluje génovú expresiu a následnú organizáciu cytoskeletu, ktorá je kľúčovou morfogenetickou udalosťou počas vývoja (Axelrod *et al.*, 1998).

5.1.2 Wnt/ Ca^{2+} signálna dráha

Aktivácia Wnt/ Ca^{2+} signálnej dráhy nastáva tiež po naviazaní ligandu z rodiny Wnt na Fzd receptor. Avšak po tomto kroku nasleduje stimulácia G proteínu a aktivácia fosfolipázy C (PLC), čím sa zvyšuje intracelulárna koncentrácia Ca^{2+} iónov a znižuje sa množstvo cyklického guanozín monofosfátu (cGMP). Zvýšením koncentrácie vápnikových iónov v cytoplazme sa aktivuje proteínkináza C (PKC) a kalmodulín dependentná kináza II (CaMKII). PKC a CaMKII majú schopnosť stimulovať rôzne transkripčné faktory, ako napríklad NF-AT (z anglického *nuclear factor of activated T-cells*) (Kühl *et al.*, 2000).

5.1.3 Neurogenéza v dospelom hipokampe a nekanonická Wnt signálna dráha

Je možné, že neurogenéza, ktorá prebieha v dospelom hipokampe, je regulovaná i prostredníctvom nekanonickej Wnt signálnej dráhy. Konkrétne ide o reguláciu správnej polarizácie a migrácie nových neurónov v dospelom mozgu. Navyše v kultivovaných hipokampálnych neurónoch dokáže Wnt-5a ligand aktivovať nekanonickú Wnt signálnu

kaskádu, ktorá hrá významnú úlohu v štruktúre a funkcii synapsíí. Wnt5-a indukuje recykláciu funkčného GABA_A receptoru (z anglického *γ-aminobutyric acid type A*) nachádzajúceho sa na hipokampálnych neurónoch, a to prostredníctvom aktivácie CaMKII, čo umožňuje následnú moduláciu inhibície synapsíí (Varela-Nallar & Inestrosa, 2013).

5.2 Kanonická Wnt signálna dráha

Kanonická Wnt signálna dráha využíva k prenosu signálu β-atenín, preto býva často označovaná i ako Wnt/β-atenín signálna dráha.

5.2.1 Funkcia a regulácia β-atenínu

Beta-atenín má v bunke mnoho rozmanitých funkcií. Podieľa sa napríklad na tvorbe adherentných spojov medzi bunkami, zakotvuje aktínové vlákna v cytoskelete, aktivuje rodinu transkripčných faktorov TCF (z anglického *T-cell factor*)/LEF (z anglického *lymphoid enhancer factor*) a zúčastňuje sa na zosilnení a separácii centrozómov. Vo veľkom množstve sa β-atenín nachádza v cytoplazmatickej membráne, avšak nájdeme ho i v cytoplazme a v jadre, kde je prísne regulovaný (Valenta *et al.*, 2012).

V cytoplazme je β-atenín regulovaný prostredníctvom fosforylácie deštrukčným komplexom, ktorý je zložený z kináz GSK3α (*glycogen synthase kinase 3α*) alebo GSK3β (z anglického *glycogen synthase kinase 3β*), a dvomi, tzv. „scaffold“ proteínmi AXIN a APC (z anglického *adenomatous polyposis coli*). Fosforylácia β-atenínu kinázou GSK3β je signálom pre jeho ubiquitináciu a následnú degradáciu proteazómom v cytoplazme. Pri aktivovanej kanonickej Wnt signálnej dráhe je kináza GSK3β inhibovaná, a β-atenín nie je degradovaný (Liu *et al.*, 2002)

5.2.2 Molekulárny mechanizmus kanonickej Wnt signálnej dráhy

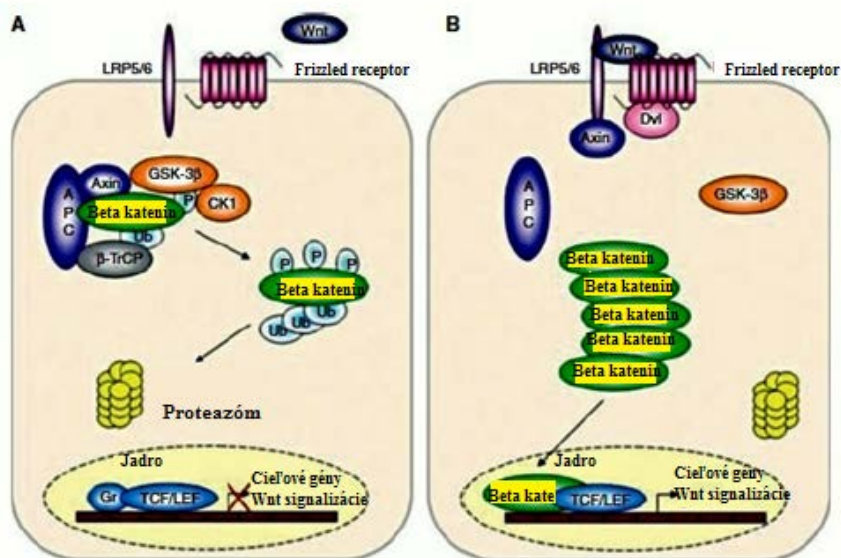
Pri absencii Wnt signálu sa vytvára v cytoplazme tzv. deštrukčný komplex (Obr. 12). Skladá sa z proteínu AXIN, APC, kinázy GSK3β a kazeín kinázy 1 (CK1). Jeho úlohou je fosforylácia β-atenínu, ktorý sa nachádza voľne v cytoplazme (Ikeda *et al.*, 1998). Fosforylovaný β-atenín vytvára väzbu s proteínom β-TrCP (z anglického *β-transducing repeat-containing protein*), ktorý je jedným z komponentov E3 ubiquitín ligázového komplexu. Ten katalyzuje ubiquitináciu β-atenínu. Po tomto kroku je β-atenín v cytoplazme degradovaný proteazómom (Liu *et al.*, 2002). Počas absencie β-atenínu sa v jadre tvorí komplex Groucho/TLE (z anglického *transducin-like enhancer 1*), ktorý potláča transkripčné

faktory TCF/LEF, čo má za následok inhibíciu exprese cieľových Wnt génov (Zhang *et al.*, 2011).

Za prítomnosti Wnt proteínov nastáva aktivácia Wnt signálnej dráhy, a to naviazaním ligandu na Fzd receptor (Obr. 12). Po naviazaní Wnt ligandu na receptor Fzd a koreceptor LRP (z anglického *lipoprotein receptor-related protein*) nastávajú dve významné interakcie:

- 1.) Receptor Fzd interaguje s proteínom Dvl (z anglického *Dishevelled protein*) (Wong *et al.*, 2003).
- 2.) Na koreceptor LRP sa naviaže AXIN (Tamai *et al.*, 2004).

Väzba Axínu a Dvl je dôležitá, pretože vďaka nej nedochádza k vytvoreniu deštruktívneho komplexu a k degradácii β -katenínu proteazómom. Nastáva teda hromadenie β -katenínu v cytoplazme, čo umožní jeho translokáciu do jadra. A v jadre β -katenín spolu s transkripčnými faktormi TCF/LEF pôsobí ako aktivátor transkripcie cieľových génov Wnt signálnej dráhy (Tamai *et al.*, 2004).



Obr. 12: Kanonická Wnt signálna dráha. A: Počas absencie Wnt proteínu nastáva tvorba deštruktívneho komplexu pozostávajúceho z proteínu Axínu, APC (z anglického *adenomatous polyposis coli*), serín/treonín kinázy GSK3 β (z anglického *glycogen synthase kinase 3 β*), a kazeín kinázy 1 (CK1; z anglického *casein kinase I*), ktorý udržiava nízku hladinu β -katenínu. GSK3 β fosforyluje molekulu β -katenínu. Následne β -TrCP (z anglického *β -Transducing repeat-containing protein*) degraduje β -katenín, a jeho degradácia je dokončená za pomoci proteazómu. Nedostatok β -katenínu v jadre spôsobí prostredníctvom vzniknutého Gr komplexu (z anglického *Groucho complex*), potlačenie transkripčných faktorov TCF (z anglického *T-cell factor*)/LEF (z anglického *lymphoid enhancer factor*) a tým i inhibíciu cieľových génov Wnt signalizácie. **B:** Ak je Wnt proteín

prítomný, vytvorí väzbu s Fzd (z anglického *Frizzled*) receptorom, ktorý je tvorený siedmimi transmembránovými doménami a tiež i s koreceptorom LRP (z anglického *lipoprotein receptor-related protein*). Fzd receptor interaguje s cytoplazmatickým proteínom Dvl (z anglického *Dishevelled protein*). Aktivovaný Dvl proteín vedie k inhibícii GSK3 β . Inhibícia GSK3 β má za následok nahromadenie stabilizovaného β -katenínu v cytoplazme a jeho následnú translokáciu do jadra. V jadre interaguje β -katenín s TCF/LEF, čím sa formuje transkripčný komplex vedúci k aktivácii cieľových génov Wnt signalizácie, ktoré sa zúčastňujú na bunkovej proliferácii alebo bunkovej smrti (Zhang *et al.*, 2011).

Wnt signálna dráha môže byť inhibovaná prostredníctvom sekrečného proteínu Dkk (z anglického *Dickkopf*) a to po jeho naviazaní na koreceptor LRP5/6. Ďalším významným inhibítorom tejto dráhy je proteín ICAT (z anglického *Inhibitor of β -catenin and TCF4*), ktorý zabraňuje tvorebe komplexu β -katenín a TCF4 v jadre (Tago *et al.*, 2004).

5.2.3 Neurogenéza v dospelom hipokampe a kanonická Wnt signálna dráha

Je známe, že nové neuróny sa tvoria neustále z neurálnych kmeňových buniek, napriek tomu ale molekulárny mechanizmus regulácie dospeljej neurogenézy stále nie je jasný. Mnoho rozličných štúdií odhalilo, že do neurogenézy v GD dospelého hipokampu je zapojená Wnt signálna dráha.

❖ Proteín Wnt-3

Použitie hybridizácie odhalilo, že proteín Wnt-3 je exprimovaný v tesnej blízkosti SGZ, teda oblasti hipokampu, kde nastáva proliferácia a diferenciácia progenitorových buniek na granulórne neuróny. Wnt-3 je v dospeljej SGZ exprimovaný astrocytmi. Jeho úlohou je stimulácia aktivácie Wnt/ β -katenín signálnej dráhy v progenitoroch dospelého hipokampu. Okrem toho indukuje Wnt-3 i diferenciáciu týchto progenitorových buniek na neuróny. Regulácia neurogenézy v dospelom mozgu prostredníctvom Wnt signálnej dráhy bola preukázaná aj v *in vivo* štúdiách (Lie *et al.*, 2005). Ako uvádza vo svojej práci Lie a spoluautori, inhibícia dráhy by mala za následok zníženie proliferácie neurálnych kmeňových buniek a celkovej neurogenézy, zatiaľ čo jej aktivácia by naopak zvyšovala neurogenézu v SGZ.

❖ Génový promótor NeuroD1

NeuroD1 je proneurálny transkripčný faktor, so základnou štruktúrou „*helix-loop-helix*“. Ide o esenciálny transkripčný faktor pre vývoj CNS, konkrétne pre tvorbu granulórných buniek v hipokampe a mozočku. Kuwabara a spoluautori vo svojej práci

poukazujú na to, že potenciálny molekulárny mechanizmus regulácie neurogenézy v dospelom hipokampe, prostredníctvom Wnt signálnej dráhy, je pravdepodobne spojený práve s transkripčnou aktiváciou faktoru NeuroD1, na ktorom je závislá aktivácia Wnt/ β -katenín signálnej dráhy. Génový promótor NeuroD1 pokrýva DNA väzbové miesta pre Sox2 ale i TCF/LEF transkripčné faktory. Počas vývoja CNS proteín Sox zabraňuje neurogenéze a neprirodzená expresia tohto proteínu má za následok smrť proneurálnych buniek. Preto ak aktivácia tohto génu vyvolá aktiváciu kanonickej Wnt signálnej dráhy, nastane zároveň i odstránenie Sox represie z jeho promótoru (Kuwabara *et al.*, 2009). Aktivácia týchto génov teda nepriamo zahŕňa aktiváciu kanonickej Wnt signálnej dráhy.

❖ **Proteín Prox1**

Ďalším cieľovým génom, ktorý môže byť podstatný pre neurogénny účinok Wnt/ β -katenín signálnej dráhy je Prox1 (z anglického *prospero-related homeobox 1 gene*). Prox1 je exprimovaný v novo vzniknutých i v dospelých granulárnych bunkách hipokampu. V minulosti bolo dokázané, že Prox1 je dôležitý pre vývoj šošovky, lymfatických ciev a v diferenciácii interneurónov miechy. Nedávno však bolo preukázané, že Prox1 je dôležitý i pri vzniku hipokampálnych granulárnych buniek. Konkrétne pre ich správnu diferenciáciu a prežitie nových buniek. Treba však zdôrazniť, že neslúži k udržiavaniu granulárnych buniek po ich úplnom dozretí (Karalay *et al.*, 2011).

❖ **Promótorová oblasť L1**

L1s (z anglického *long interspersed element-1*) sú retrotranspozóny, bohato sa vyskytujúce v genóme cicavcov, ktorý tvoria až z 20%. Odhaduje sa, že ľudský genóm je zložený priemerne z 80 až 100 retrotranspozónových elementov, a 10% z nich je klasifikovaných ako „vysoko aktívne“. Pre porovnanie, genóm myši pozostáva z 3000 L1s (Muotri *et al.*, 2005). Muotri a spoluautori vo svojej práci ďalej uvádzajú, že promótorová oblasť L1 retrotranspozónov, ktorá je aktivovaná počas neurogenézy, obsahuje tiež dvojité väzbové miesto pre Sox2 a TCF/LEF. Preto je možné, že aktivácia Wnt signálnej dráhy môže spôsobiť zvýšenie expresie génov ležiacich v blízkosti L1 lokusov, ktoré sú dôležité pri neurogenéze, ako napríklad DCX (Muotri *et al.*, 2005).

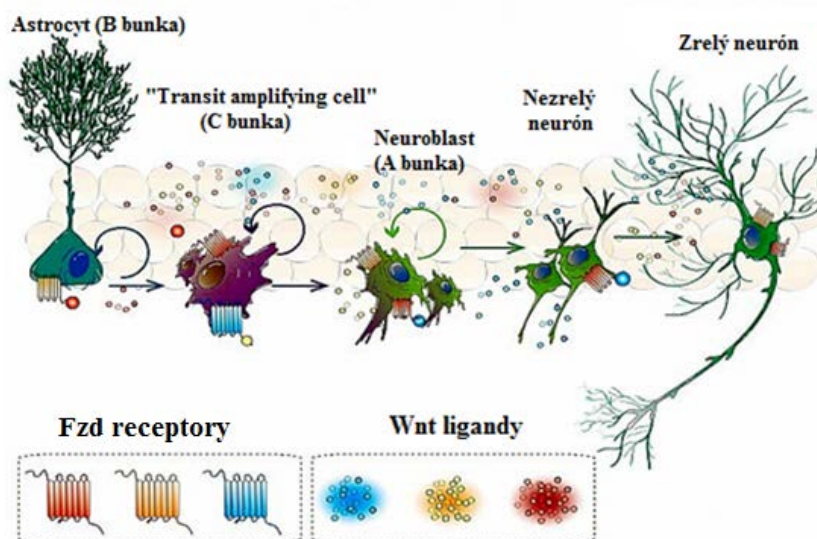
Široká rodina Wnt proteínov bola identifikovaná u rôznych druhov živočíchov a ukázalo sa, že u väčšiny hrajú tieto proteíny významnú úlohu pri bunkovej signalizácii

(Axelrod *et al.*, 1998). U cicavcov bolo zatiaľ identifikovaných približne 19 typov Wnt ligandov a 10 typov Fzd receptorov (Varela-Nallar & Inestrosa, 2013).

Bolo tiež dokázané, že expresia Fzd receptorov počas postnatálneho vývoja je odlišná. K vysokej expresii dochádza v dospelosti ale i v ranom postnatálnom vývoji. V kultivovaných hipokampálnych neurónoch je distribúcia Fzd receptorov veľmi špecifická, vzhľadom na to, že niektoré z nich sú lokalizované v synaptických regiónoch a iné v mladých neurónoch (Varela-Nallar *et al.*, 2012).

Wnt ligandy môžu regulovať rôzne stupne neurogenézy a sú základom pre špecifický účinok kanonickej i nekanonickej Wnt signálnej dráhy. Príkladom sú ligandy Wnt-5a a Wnt-3a, ktoré majú odlišný účinok v neurálnych prekurzorových bunkách kultivovaných z postnatálnej SVZ (Pino *et al.*, 2011).

Práve dvojitá regulácia Wnt ligandov v tomto neurogénom regióne je zodpovedná za špecifickú expresiu Wnt ligandov počas tvorby a dozrievania interneurónov SVZ. Či nastáva rovnaká regulácia i počas neurogenézy v SGZ zatiaľ nie je známe. V hipokampe všetky kroky neurogenézy prebiehajú v GD, kde sa nachádzajú kmeňové bunky i nové neuróny v rôznom stupni svojho vývoja a v tesnej blízkosti (Obr. 13). Z tohto dôvodu i všetky regulačné faktory neurogenézy by sa mali nachádzať v GD (Varela-Nallar & Inestrosa, 2013).



Obr. 13: Regulácia neurogenézy v hipokampe pomocou špecifických Wnt receptorov. Schematická ilustrácia neurogenézy v subgranulárnej zóne. Kmeňové a progenitorové bunky, nezrelé neuróny a zrelé neuróny sú neustále prítomné v gyre dentatu. V hipokampe môžu byť v týchto bunkách indukované rozmanité signálne kaskády, ktoré regulujú rozličné štádiá neurogenézy interakciou so špecifickými receptormi (Varela-Nallar & Inestrosa, 2013).

6 Záver

Do roku 2030 sa množstvo jednotlivcov postihnutých mozgovou ischémiou po šesťdesiatom piatom roku života pravdepodobne zdvojnásobí. Navyše sa predpokladá zdvojnásobenie rizika ischémie v každej dekáde života po dosiahnutí päťdesiateho piatego roku (Burns *et al.*, 2009). Práve preto naberá stále viac na vážnosti pokrok v prevencii a liečení tohto ochorenia.

Existuje možnosť zníženia rizika mozgovej ischémie a to znížením rizikových faktorov, medzi ktoré patria: nedostatočne liečená alebo neliečená arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus, fibrilácia predsiení srdca, fajčenie, zlá životospráva, nadmerná konzumácia alkoholu, nedostatok pohybu a nadmerný stres².

Stredom záujmu regeneratívnej medicíny je objavenie účinnej terapie mozgovej ischémie, ktorá doposiaľ neexistuje. Veľkou nádejou sú kmeňové bunky. Sú to bunky s veľkou schopnosťou proliferácie a diferenciácie. Nachádzajú sa v dospelom mozgu a sú schopné vytvárať bunkové typy začínajúc od astrocytov, cez polydendrocyty až po neuróny.

Proces neurogenézy je regulovaný mnohými signálnymi dráhami. V súčasnosti je v tvorbe nových neurónov v dospelom hipokampe zdôrazňovaná najmä dôležitosť Wnt signálnej dráhy. Kanonická Wnt/ β -katenín signálna dráha je veľmi významná predovšetkým pre udržiavanie a obnovu kmeňových buniek, ich proliferáciu a diferenciáciu. Wnt ligandy patria v SGZ medzi signálne molekuly, ktoré dokážu regulovať vývoj neurogenézy. Dynamická regulácia neurogenézy prostredníctvom Wnt signálnej dráhy by mohla byť podstatná predovšetkým pre zlepšenie fyzickej i psychickej kondície ľudí postihnutých ischemickým poškodením.

Prevzaté z: ²<http://www.zdravie.sk/choroba/27284/cievna-mozgova-prihoda-mozgova-porazka>

7 Zoznam použitej literatúry

Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K (2007), Beta-katenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem cells* 25:2827-2836

Ahn S, Joyner AL (2005), In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437:894-897

Altman J, Das GD (1965), Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology* 124:319-336

Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kitappa R, McKay RD (2006), Notch signaling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 442:823-826

Arvidsson A, Collin T, Krik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002), Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine* 8:963-970

Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N (1998), Differential recruitment of Dishvelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12:2610-2622

Balordi F, Fishell G (2007), Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *The Journal of Neuroscience* 27:5936-5947

Bignami A, Dahl D (1973), Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res* 49:393-402

Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M (2008), Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *PNAS* 105:3581-3586

Burns TC, Verfaillie CM, Low WC (2009), Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *The Journal of Comparative Neurology* 515:125-144

Cameron HA, McKay RD (2001), Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology* 435:406-417

Cocchia D (1981), Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. *Cell Tissue Res* 214:529-540

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005), ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vitro. *Natural Neuroscience* 8:752-758

Doetsch F (2003), The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience* 6:1127-1134

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999), Subventricular zone astrocytes are neural stem cell in the adult mammalian brain. *Cell Press* 97:703-716

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997), Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular geminal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience* 17:5046-5061

Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, van Heyningen V, Jessel TM (1997), Graded Sonic Hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:451-466

Fages C, Khelil M, Rolland B, Bridoux AM, Tardy M (1988), Glutamine synthetase: a marker of an astroglial subpopulation in primary cultures of defined brain areas. *Development Neuroscience* 10:47-56

Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000), Radial glia identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26:395-404

Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (2002), Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension an olfactory bulb of adult rodents. *The Journal of Neuroscience* 22:437-445

Huangfu D, Anderson KV (2006), Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 133:3-14

Hunter AJ, Green AR, Cross AJ (1995), Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends in Pharmacological Sciences* 16:23-128

Huttner WB, Kosodo Y (2005), Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* 17:648-657

Chittajalu R, Aguirre A, Gallo V (2004), NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *The Journal of Physiology* 561:109-122

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998), Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *The EMBO Journal* 17:1371-1384

Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Bateur S, Greenberg DA (2003), Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24:171-189

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999), Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34

Johnson JE, Birren SJ, Anderson DJ (1990), Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursor. *Nature* 346:858-861

Kaneko N, Sawamoto K (2009), Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neuroscience Research* 63:155-164

Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A, Schwark M, Jagasia R, Taketo MM, Tarabykin V, Lie DC, Jessberger S (2011), Prospero-related homeobox 1 gene (Prox) is regulated by canonical Wnt signalling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *PNAS* 108:5807-5812

Kirino T, Sano K (1984), Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathologica* 62:201-208

Kissela B, Broderick J, Woo D, Kothari R, Miller R, Khoury J, Brott T, Pancioli A, Jauch E, Gebel J, Shukla R, Alwell K, Tomsick T (2001), Greater Cincinnati/Northern Kentucky stroke study: volume of first-ever ischemic stroke among blacks in a population-based study. *Stroke* 32:1285-1290

Komitova M, Perfilieva E, Mattson B, Eriksson PS, Johansson BB (2002), Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *The Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22:852-860

Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N (1982), An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 13:505-508

Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH (2009), Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nature Neuroscience* 12:1097-1105

Kühl, M, Sheldahl, LC, Malbon, CC, Moon, RT (2000), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in xenopus. *The Journal of Biological Chemistry* 275:12701-12711

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990), CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie, Gage FH (2005), Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375

Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z (2002), Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual kinase mechanism. *Cell* 108:837-847

Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno I, Urabe T (2006), Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *The Journal of Neurochemistry* 96:1101-1110

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996), Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981

Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007), Mosaic organization of neural stem cell in the adult brain. *Science* 317:381-384

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008), Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278

Muotri AR, Chu Vi T., Marchetto MCN, Deng V, Moran JV, Gage FH (2005), Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435:903-910

Nagao M, Sugimori M, Nakafugu M (2007), Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells. *Molecular and Cellular Biology* 27:3982-3994

Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K (2006), Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neuroscience Letters* 403:63-67

Nishiyama A, Dahlin KJ, Prince JT, Johnstone SR, Stallcup WB (1991), The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *The Journal of Cell Biology* 114:359-371

Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X (2009), Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 10:9-22

Nowakowski RS, Levin SB, Miller MW (1989), Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *The Journal of Neurocytology* 18:311-318

Ogden SK, Fei DL, Schilling NS, Ahmed YF, Hwa J, Robbins DJ (2008), G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothed in Hedgehog signalling. *Nature* 456:967-9670

Ohta K, Masanori I, Keiko S, Nobuhiko O, Isao N, Mikio S, Koji A (2003), Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats, after transient cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* 335:159-162

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005), Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335-344

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000), Vascular Niche for Adult Hippocampal Neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 425:479-494

Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009), Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *PNAS* 106:6387-6392

Peretto P, Giachino C, Aimar P, Fasolo A, Bonfanti L (2005), Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *The Journal of Comparative Neurology* 487:407-427

Peters A, Palay SL, Webster HdF (1991), The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. *New York: Oxford University Press*

Petersen MA, Dailey ME (2004), Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206

Pforte C, Henrich-Noack P, Baldauf K, Reymann KG (2005), Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neuroscience* 136:1133-1146

Pino D, Choe Y, Pleasure SJ (2011), Wnt5a controls neurite development in olfactory bulb interneurons. *ASN Neuro* 3:125-133

Rudge JS, Silver J (1990), Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *The Journal of Neuroscience* 10:3594-3603

Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kuribara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H (1996), Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Developmental Biology* 176:230-242

Sancho-Tello M, Valles S, Montoliu C, Renau-Piqueras J, Guerri C (1995), Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glia cultures. *Glia* 15:157-166

Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006), New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-3-632

Seri B, García- Verdugo JM, Collado- Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004), Cell Types, Lineage and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 478:359-378

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001), Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 21:7153-7160

Sharkey J, Butcher SP (1995), Charakterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *The Journal of Neuroscience Methods* 60:125-131

Shibata T, Yamada K, Watamabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y (1997), Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 17:9212-9219

Shingo T., Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S (2001), Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *The Journal of Neuroscience* 21:9733-9743

Smith CM, Luskin MB (1998), Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Department of Cell Biology* 213:220-227

Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK (1984), Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurologica Scandinavica* 69:385-401

Sorkin A, Goh LK (2008), Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental Cell Research* 314:3093-3106

Stallcup WB (1981), The NG2 antigen , a putative lineage marker: imunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Developmental Biology* 83:154-165

Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007), In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox²⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515-528

Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T (2000), Inhibition of Wnt signaling by ICAT a novel β -catenin-interacting protein. *Genes & Development* 14:1741-1749

Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M (2002), Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22:299-307

Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X (2004), A Mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell* 13:149-156

Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006), Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Cell Stem Cell* 1:515-528

Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008), Neurons born in adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Natural Neuroscience* 11:901-907

Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012), The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO Journal* 31:2714-2736

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002), Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034

Varela-Nallar L, Inestrosa CN (2013), Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cellular Neuroscience*,7:1-11

Varela-Nallar L, Ramirez VT, Gonzalez-Billault C (2012), Frizzled receptors in neurons: From growth cones to the synapse. *Cytoskeleton* 69:528-534

Wakida K, Shimazawa M, Hozumi I, Satoh M, Nagase H, Inuzuka T, Hara H (2007), Neuroprotective effect of erythropoietin, and role of methallothionein-1 and -2, in permanent focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 148:105-114

Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004), Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35:1732-1737

Wang L, Zhang ZG, Gregg SR, Zhang RI, Jiao Z, Litourneau Y, Liu X, Feng Y, Gerwien J, Torup L, Leist M, Noguchi CT, Chen ZY, Chopp M (2007), The sonic hedgehog pathway mediates carbamylated EPO enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282:32462-30470

Wang X, Mao X, Xie L, Greenberg DA, Jin K (2009), Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29:1644-1654

Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Grinsberg MD (1985), Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of Neurology* 17:497-504

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997), Direct evidence for homotypic glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-791

Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J (2003), Direct binding of the PDZ domain of Dischvelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Molecular Cell* 12:1251-1260

Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M (2001), 3-phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for L-serine biosynthesis, is preferentially expressed in radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience* 21:7691-7704

Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD (2007), Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience* 27:8286-8296

Zhang L, Yang X, Yang S, Zhang J (2011), The Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 33:1-8

Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M (2008), Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* 55:345-352

Zhang RL, Zhang ZG, Lu M, Wang Y, Yang JJ, Chopp M (2006), Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26:857-863

Zhao JW, Raha-Chowdhury R, Fawcett JW, Watts C (2009), Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2⁺ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice. *European Journal of Neuroscience* 29:1853-1869

Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A (2008), NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135:145-157