

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy



Mgr. Monika Řehořová

Využití kmenových buněk v léčbě amyotrofické laterální sklerózy

The use of stem cells in the treatment of Amyotrophic lateral sclerosis

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.11.2019

Mgr. Monika Řehořová

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

ŘEHOŘOVÁ, Monika. *Využití kmenových buněk v léčbě amyotrofické laterální sklerózy [The use of stem cells in the treatment of Amyotrophic lateral sclerosis]*. Praha, 2019. 124 stran, 4 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. Školitel: Pavla Jendelová

Poděkování:

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Pavle Jendelové, PhD. za odborné vedení a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala všem mým kolegům, kteří se stali součástí mého každodenního „doktorského života“. V neposlední řadě bych chtěla velice poděkovat své rodině a manželovi za jejich nekonečnou trpělivost a podporu v období nezdařených experimentů a těžkých chvil v laboratoři.

Abstrakt:

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je neurodegenerativní onemocnění způsobené předčasnou/zrychlenou degradací motoneuronů (MN). V současné době není dostupná žádná účinná léčba. Buněčná terapie je považována za slibnou experimentální léčbu, která by mohla cílit na patologii komplexního onemocnění prostřednictvím mnoha potenciálních mechanismů. Porovnávali jsme efekt tří typů opakovaných aplikací lidských mesenchymálních kmenových buněk (hMSC): samotná intratekální aplikace, samotná intramuskulární aplikace a jejich kombinace. Nejlepší výsledky byly zaznamenány po kombinované opakované aplikaci hMSC. Pozorovali jsme záchranu MN, nervosvalových plotének a snížení hladiny proteinů podílejících se na signalizaci nekroptózy (Rip1, cl-casp 8), apoptózy (cl-casp 9) a autofágie (beklin 1), snížení astrogliózy a snížení hladiny astrocytového konexinu 43. Vhodnými kandidáty pro buněčnou terapii ALS mohou být i neurální prekurzory derivované z indukovaných pluripotentních kmenových buněk (NP-iPS). Intraspinální aplikace NP-iPS zvýšila mRNA expresi *BDNF* a *IGF-1*, naopak snížila expresi proapoptické *casp 3* a pozorovali jsme i jejich vliv na expresi složek perineurálních sítí (PNN).

Dalšími buněčnými kandidáty pro léčbu neurodegenerativních onemocnění jsou lidské embryonální kmenové buňky (hESC), nicméně pro jejich budoucí bezpečné využití je potřeba objasnit mechanismy, které způsobují jejich sklon k akumulaci mutací během manipulace v podmínkách *in vitro*. Lepší porozumění nám umožní modulovat tyto mechanismy a zabránit tak nežádoucímu vzniku mutací. Zjistili jsme, že v nízkých pasážích hESC jsou rychle a bezchybně opraveny dvouřetězcové zlomy prostřednictvím spojování konců zprostředkované ligázou 3 na základě mikrohomologie.

Dalším cílem práce bylo otestovat bezpečnost značení buněk pomocí dvou typů magnetických nanočástic (CZF a PLL- γ -Fe₂O₃) a sledovat jejich vliv na proliferační a diferenační potenciál NP-iPS do dopaminergních neuronů. Naše výsledky ukazují, že PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástice jsou vhodné pro neinvazivní detekci buněk pomocí magnetické rezonance, jelikož neovlivnily proliferační a diferenační potenciál NP-iPS. Zdá se, že PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástice by mohly být využity pro dlouhodobé sledování buněk a vyhodnocení jejich účinnosti u experimentálních modelů neurodegenerativních onemocnění.

Klíčová slova: Amyotrofická laterální skleróza, buněčná terapie, kmenové buňky, opravné mechanismy, magnetické nanočástice, magnetická rezonance

Abstract:

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease caused by degradation of motoneurons (MN). No effective treatment is currently available. Cellular therapy is considered to be a promising experimental treatment that could target the pathology of complex disease through many potential mechanisms. We compared the effect of three types of repeated applications of human mesenchymal stem cells (hMSC): intrathecal administrations, intramuscular administrations and the combination of these applications. Best results were obtained after combined repeated hMSC administrations. We observed the rescue of MN, neuromuscular junctions and decreasing levels of proteins involved in the signaling of necroptosis (Rip1, cl-casp 8), apoptosis (cl-casp 9) and autophagy (beclin 1), decreasing astrogliosis and the level of astrocytic connexin 43. Neural precursors derived from induced pluripotent stem cells (NP-iPS) are considered as other promising candidates for ALS therapy. Intraspinal administration of NP-iPS increased mRNA expression of *BDNF* and *IGF-1*, on the other hand decreased expression of proapoptotic *casp 3*. We also observed their effect on expression of components of perineural nets (PNN).

Human embryonic stem cells (hESC) are the other cell candidates for the treatment of neurodegenerative diseases. However it is necessary for their future safe use to clarify the mechanisms involved in the accumulation of mutations in those cells during *in vitro* cultivation. Better understanding will allow us to modulate these mechanisms to prevent mutations. We have found that double-strand breaks are repaired by Ligase 3- mediated- EJ quickly and efficiently and Ligase 3 contributes to maintaining the genome stability of hESC.

Another aim of the work was to test the safety and efficiency of two types of magnetic nanoparticles (CZF and PLL- γ -Fe₂O₃) to monitor their influence on proliferation and differentiation of NP-iPS into dopaminergic neurons. Our results show that PLL- γ -Fe₂O₃ nanoparticles are suitable for detection by magnetic resonance, because they did not affect the proliferation and differentiation potential of NP-iPS.

Klíčová slova: Amyotrophic lateral sclerosis, cell therapy, stem cells, repair mechanisms, magnetic nanoparticles, magnetic resonance

Obsah

1	Seznam zkratek	9
2	Úvod.....	13
2.1	Amyotrofická laterální skleróza	13
2.1.1	Epidemiologie ALS	14
2.1.2	Selektivní zranitelnost motoneuronů u ALS.....	15
2.1.3	Mechanismy zahrnuté v patologii ALS	17
2.1.4	Mechanismy buněčné smrti motoneuronů u ALS	23
2.1.5	Experimentální modely ALS	25
2.2	Buněčná terapie	27
2.2.1	Embryonální kmenové buňky	27
2.2.2	Indukované pluripotentní kmenové buňky	28
2.2.3	Mesenchymální kmenové buňky	32
2.3	Značení buněk pro <i>in vivo</i> aplikaci	33
3	Hypotézy a cíle práce.....	35
4	Materiál a metody	36
4.1	Typy použitých buněk	36
4.1.1	Lidské embryonální kmenové buňky (hESC).....	36
4.1.2	NP-iPS	37
4.1.3	Lidské mesenchymální kmenové buňky.....	38
4.2	Zvířecí model ALS.....	39
4.3	Posouzení progresu onemocnění	39
4.3.1	BBB test.....	39
4.3.2	Rotarod.....	40
4.3.3	Test svalové síly.....	40
4.3.4	Třiceti sekundový test.....	41
4.4	Aplikace buněk.....	41
4.4.1	Intratekální a intramuskulární aplikace hMSC	41
4.4.2	Intraspinální aplikace NP-iPS	42
4.5	Analýza genové exprese.....	43
4.6	Imunocytochemické barvení	44
4.7	Imunohistochemická analýza	45
4.8	Western blot	46
4.9	Analýza frekvence mutací (HPRT assay)	48
4.10	Pulzní gelová elektroforéza pro detekci DSB	48

4.11	Hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	49
4.12	Elektronový mikroskop	49
4.13	Zobrazení pomocí MR.....	50
4.14	Statistická analýza	50
5	Výsledky	51
5.1	Behaviorální analýza progresu onemocnění ALS u potkanů po aplikaci buněk.....	51
5.1.1	Aplikace hMSC.....	51
5.1.2	Aplikace NP-iPS	54
5.2	Neuroprotektivní efekt buněk	56
5.2.1	Mesenchymální kmenové buňky	56
5.2.2	NP-iPS	57
5.2.3	Osud transplantovaných buněk.....	59
5.3	Analýza expresního profilu vybraných genů	62
5.3.1	Mesenchymální kmenové buňky	62
5.3.2	NP-iPS	64
5.4	Analýza exprese vybraných proteinů	66
5.4.1	Mesenchymální kmenové buňky	66
5.4.2	NP-iPS	71
5.5	Analýza indukibility DSB a analýza indukibility proteinu Rad51 a 53BP1	73
5.6	Detekce hlavní opravné dráhy DSB v hESC.....	74
5.7	Analýza frekvence mutací.....	78
5.8	Účinnost značení NP-iPS pomocí magnetických nanočástic.....	79
5.9	Efekt magnetických nanočástic na proliferaci a neuronální diferenciaci NP-iPS.....	83
6	Diskuze	88
6.1	Pozitivní vliv aplikace kmenových buněk na patologii ALS.....	88
6.2	MMEJ přispívá ke zvýšení genomické stability u nízkých pasáží hESC v <i>in vitro</i> podmínkách.....	93
6.3	Magnetické nanočástice PLL- γ -Fe ₂ O ₃ jsou vhodné ke značení NP-iPS a sledování pomocí MR	95
7	Závěr	99
8	Souhrn.....	101
9	Summary.....	103
10	Publikace autorky	105
11	Literatura.....	107

1 Seznam zkratek

53BP1	<i>53-binding protein 1</i>
AbA	<i>Aberrant astrocytes</i> ; aberantní astrocyty
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
APE1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease</i> ; apurinní/apyrimidinní endonukleáza 1
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> ; Bcl-2 homologní antagonista
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i> ; Bcl-2 asociovaný X protein
BBB test	<i>Basso Beattie Bresnahan open field test</i> ; Bresnahanova hodnotící škála
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> ; neurotrofický faktor derivovaný z mozku
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> ; bázičkový fibroblastový růstový faktor
BER	<i>Base excision repair</i> ; bázoová excizní reparace
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
C9orf72	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i>
Casp	<i>Caspase</i> ; kaspáza
cNHEJ	<i>Canonical non-homologous end joining</i> ; klasické nehomologní spojování konců
CNS	<i>Central nervous system</i> ; centrální nervová soustava
CCTL	<i>Center of Cell therapy line</i> ; buněčná linie
CtIP	<i>Choline transporter-like protein</i>
CZF	<i>Silica-coated cobalt-zinc-ferrite nanoparticles</i>
DA	<i>Dopaminergic neurons</i> ; dopaminergní neurony
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> ; 4',6-diamidin-2-fenylindol
DDR	<i>DNA damage response</i> ; reakce na poškození DNA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ; kultivační médium
DNA PKc	<i>Catalytic subunit of DNA dependent protein kinase C</i> ; DNA protein kináza C
DPR	<i>Dipeptide repeat proteins</i>
DSB	<i>Double strand breaks</i> ; dvouřetězcové zlomy
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> ; endoplazmatické retikulum
ESC	<i>Embryonic stem cells</i> ; embryonální kmenové buňky
fALS	<i>Familial Amyotrophic lateral sclerosis</i> ; Familiální amyotrofická laterální skleróza

FBS	<i>Foetal bovine serum</i> ; fetální hovězí sérum
FGF8	<i>Fibroblast growth factor 8</i> ; fibroblastový růstový faktor 8
FUS	<i>RNA binding protein Fused in Sarcoma</i>
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> ; kyselina gama-aminomáselná
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> ; neurotrofický faktor z gliální linie
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> ; gliální fibrilární acidický protein
GrST	<i>Grip Strength Test</i> ; test svalové síly
HB9	<i>Homeobox gene 9</i>
hEFs	<i>Human ear fibroblasts</i> ; lidské ušní fibroblasty
hES-AS	<i>Astrocytes derived from human embryonic stem cells</i> Astrocyty derivované z lidských embryonálních kmenových buněk
hESC	<i>Human embryonic stem cells</i> ; lidské embryonální kmenové buňky
hMNP	<i>Human Motoneurons progenitor</i> ; lidské progenitory motoneuronů
HPRT	<i>Hypoxanthyl phosphorybosyltransferase</i> ; Hypoxantin fosforybosyltransferáze
hPSC	<i>Human pluripotent stem cells</i> ; lidské pluripotentní kmenové buňky
HR	<i>Homologous recombination</i> ; homologní rekombinace
Chat	<i>Choline acetyltransferase</i> ; Cholin acetyl transferáza
ICC	<i>Immunocytochemistry</i> ; imunocytochemické barvení
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor 1</i> ; insulínu podobný růstový faktor 1
IHC	<i>Imunohistochemistry</i> ; imunohistochemické barvení
iPS	<i>Induced pluripotent stem cells</i> ; indukované pluripotentní kmenové buňky
IR	<i>Ionizing radiation</i> ; ionizující záření
Lig 3 a Lig4	<i>DNA ligase 3 (4)</i> ; DNA ligáza
MEM	<i>Medium Essential Medium Eagle</i> ; kultivační médium
MF	<i>Mutation frequency</i> ; frekvence mutací
MLKL	<i>Mixed lineage kinase like protein</i> ; protein připomínající MLK kinázu
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i> mikrohomologií zprostředkované spojení konců
MN	<i>Motoneurons</i> ; motoneurony
MR	<i>Magnetic resonance</i> ; magnetická rezonance
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i> ; mezenchymální kmenová buňky
NGF	<i>Nerve growth factor</i> ; nervový růstový faktor

NGS myši	<i>NOD scid gamma mouse</i> ; imunodeficitní myši
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> ; nehomologní spojení konců
NMJ	<i>Neuromuscular junction</i> ; nervosvalové spojení
NP-iPS	<i>Neural precursors derived from iPS</i> ; neurální prekurzory odvozené od iPS
NT 3 a 4	<i>Neurotrophin 3 a 4</i> ; neurotrofin 3 a 4
Oct-4	<i>Octamer-4</i> ; Oktamer 4
OPTN	<i>Optineurin</i> ; Optineurin
PARP1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i> ; sodnofosfátový pufr
PET	<i>Positron-emission tomography</i> ; pozitronová emisní tomografie
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> ; paraformaldehyd
PFGE	<i>Pulse-field gel electrophoresis</i> ; pulzní gelová elektroforéza
PLL	<i>poly-L-lysine</i> ; poly-L-lysin
PolQ	<i>DNA polymerase theta</i> ; DNA polymeráza theta
Rad51	<i>DNA repair protein Rad51</i> ; DNA opravný protein Rad51
RAN	<i>RAs-related Nuclear protein</i>
RIF1	<i>Replication Timing Regulatory Factor 1</i>
RIPK1 a 3	<i>Receptor-interacting protein kinase</i> ; receptor interagující protein kináza
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; ribonukleová kyselina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; reaktivní formy kyslíku
sALS	<i>Sporadic Amyotrophic lateral sclerosis</i> ; sporadická amyotrofická laterální skleróza
SEM	<i>Standard error of the mean</i> ; střední chyba průměru
SHH	<i>Sonic Hedgehog Signaling Molecule</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Sod1 ^{G93A}	<i>Superoxide dismutase 1</i> ; superoxiddismutáza
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> ; jednofotonová emisní výpočetní tomografie
SQSTM1	<i>Sequestome 1 (synonyms ubiquitin-binding protein p62)</i>
SSBs	<i>Single strand breaks</i> ; jednořetězcové zlomy
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TDP-43	<i>TAR DNA binding protein 43</i>
TG	<i>6-thioguanine</i> ; 6-thioquanin

TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i> ; tyrozinhydroxyláza
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i> ; faktor nádorové nekrozy α
WB	<i>Western blot</i> ; western blot
WT	<i>Wild type</i> ; divoký typ
XLJ	<i>Non-homologous end joining factor 1</i> ; nehomologní koncový spojovací faktor
XRCC1 a 4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1 a 4</i>
γ H ₂ AX	<i>Histone H₂A.X phosphorylated on serine</i> ; Histon H ₂ AX fosforylovaný na serinu

2 Úvod

Neurodegenerativní onemocnění je obecné označení pro řadu chorob, které jsou charakterizovány chronickou ztrátou určitých populací neuronů. Příčiny, proč jsou některé části mozku a míchy postiženy a jiné zůstávají nedotčené, jsou neznámé. Předpokládá se, že jsou způsobeny interakcemi genetických a environmentálních faktorů. V současné době neexistuje žádný účinný lék pro tato onemocnění. Nicméně lepší pochopení mechanismů přispívajících k neurodegeneraci by mohlo přispět k vývoji nových terapeutických přístupů. Mezi hlavní neurodegenerativní onemocnění patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a amyotrofická laterální skleróza. V této práci se zaměřím konkrétně na amyotrofickou laterální sklerózu a potenciální terapeutický efekt kmenových buněk.

2.1 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je závažné onemocnění charakterizované degenerací a následnou smrtí motoneuronů (MN) v mozku a míše. Společné klinické projevy ALS zahrnují svalovou slabost vedoucí k svalové atrofii následovanou ochrnutím. Onemocnění postupuje velmi rychle s průměrnou dobou přežití tři až pět let po diagnóze. Hlavní příčinou smrti je selhání dýchacích svalů. Existuje však i malá podskupina případů ALS, přibližně 10% pacientů, kteří vykazují pomalejší průběh onemocnění a přežívají déle než 10 let po stanovení diagnózy. V Evropě se toto onemocnění častěji vyskytuje u mužů než u žen, obvykle se manifestuje ve věku mezi 50-60 lety (Logroscino et al., 2010), a obecně postihuje 4-5 osob ze 100 000 (Mehta et al., 2016).

Typ a průběh ALS je často klasifikovaný podle místa nástupu. Nejčastějším typem je spinální ALS (65%) projevující se prvotní svalovou slabostí v končetinách, zatímco bulbálních případů ALS je už známo méně (20-25%). Jedná se o progresivnější a závažnější typ ALS s počátečními příznaky jako jsou potíže s polykáním (dysfagie) a potíže s řečí (dysartie). Většina pacientů s ALS má frontotemporální demenci (Elamin et al., 2011), což se projevuje změnami osobnosti, podrážděností a dalšími symptomy, které se mohou vyskytnout jak před nástupem motorických příznaků, tak i po nich (Phukan et al., 2007; Strong et al., 2009).

Diagnostika onemocnění je především klinická a opírá se o tzv. revidovaná El Escorial kritéria. Diagnostika zahrnuje řadu laboratorních testů a elektromyografické vyšetření, které je klíčové pro potvrzení ztráty periferních MN (Daube, 2000).

V současné době stále neexistuje terapie, která by poskytla pacientům s ALS významný přínos, přestože jsou schválené dva farmaceutické léky. Jedním z nich je Riluzol, který zpomaluje progresi onemocnění o 3-6 měsíců (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996). Mechanismus účinku tohoto léku není zatím objasněn, ale předpokládá se, že snižuje presynaptické uvolňování glutamátu. Druhým lékem je nedávno schválený Edaravon, jehož mechanismus účinku je pravděpodobně založen na vychytávání volných radikálů a může tak snižovat oxidační stres v MN a gliových buňkách (Bhandari et al., 2018; Jaiswal, 2019).

2.1.1 Epidemiologie ALS

Většina případů (90%) ALS je sporadických s neznámou příčinou (sALS) a zbývajících 10% familiární formy ALS (fALS) je způsobeno dědičnou genetickou mutací. První popsanou genetickou příčinou ALS byla mutace v *SOD1* genu v roce 1993 (Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993). Od té doby bylo identifikováno více než 20 dalších mutací způsobujících ALS (Tabulka 1). Přibližně 20% případů fALS je způsobeno mutací v genu *SOD1*, 4-5% případů je výsledkem mutace v genech *TARDBP* a *FUS*, více než 30% případů je spojeno s mutacemi v *C9ORF72* a zbytek je důsledkem mutací v *alsin (ALS2)*, *SETX*, *SPG11*, *VAPB*, *ANG*, *OPTN* a dalšími neznámými geny (Zou et al., 2017).

Tabulka 1: Mutace asociované s rizikem rozvoje ALS

Geny	Lokalizace	Dědičnost	Funkce proteinu
SOD1	21q22.11	AD,AR	metabolismus superoxidu
ALS2	2q33.2	AR	obchodování s vesikuly
SETX	9q34.13	AR	RNA metabolismus
SPG11	15q21.1	AR	oprava poškození DNA
FUS	16p11.2	AD,AR	RNA metabolismus
VAPB	20q13.33	AD	obchodování s vesikuly
ANG	14q11.1	AD	angiogeneze
TARDBP	1p36.22	AD	RNA metabolismus
FIG4	6q21	AD,AR	obchodování s vesikuly
OPTN	10p13	AD,AR	obchodování s vesikuly, autofágie
ATXN2	12q24.12	AD	endocytóza, RNA translace
VCP	9p13.3	AD	proteasom, obchodování s vesikuly
UBQLN2	Xp11.21	XL	proteasom

SIGMAR1	9p13.3	AR	proteasom
CHMP2B	3p11.2	AD	obchodování s vesikuly
PFN1	17p13.3	AD	cytoskeletární dynamika
C9orf72	9p21.2	AD	RNA metabolismus
MATR3	5q31.2	AD	RNA metabolismus
CHCHD10	22q11.23	AD	Mitochondriální dysfunkce
SQSTM1	5q35.3	AD	ubikvitinace, autofágie
HNRNPA1	12q13.13	AD	RNA metabolismus
HNRNPA2B1	7q15.2	AD	RNA metabolismus
TBK1	12q14.2	AD	autofágie

AD-autozomálně dominantní; AR-autozomálně recesivní; XL- X vázaná dědičnost

2.1.2 Selektivní zranitelnost motoneuronů u ALS

I přes identifikaci celé řady genů zapříčiňujících ALS stále není jasné, proč selektivně degenerují právě MN, když jsou mutované proteiny exprimovány všudypřítomně. Navíc MN se vyznačují rozdílnou citlivostí v tkáních ALS (Kaplan et al., 2014). Zatímco míšní MN jsou degenerovány už na počátku onemocnění, tak některé mozkové MN, jako např. okulomotorické, jsou rezistentní až do konečné fáze onemocnění. Avšak i v případě míšních α -MN můžeme pozorovat rozdílnou zranitelnost, kde fázické (rychlé) α -MN jsou citlivější než tónické (pomalé) α -MN (Pun et al., 2006). Tato selektivní neuronální zranitelnost byla pozorována jak u fALS, tak sALS (Comley et al., 2015; Nimchinsky et al., 2000), což naznačuje, že existují společné molekulární mechanismy zapříčiňující tuto degeneraci. V současné době víme, že rezistentní MN se od citlivých MN liší genovým expresním profilem (Brockington et al., 2013) a morfologií, kde rezistentní MN mají zvýšený růst neuritů a hustší dendritické větvení (Osling et al., 2019). Zdá se, že rezistentní MN se snaží kompenzovat ztrátu citlivějších MN navázáním nových synaptických spojení (Clark et al., 2016; Schaefer et al., 2005).

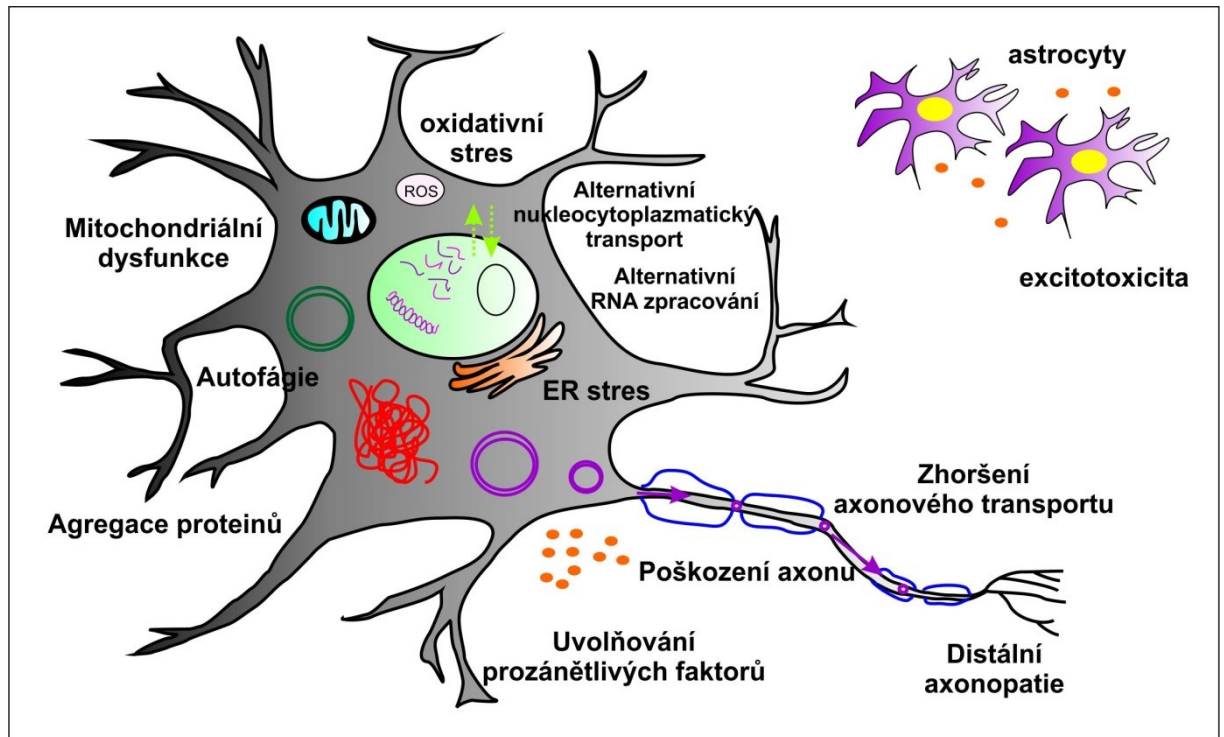
Mikročipová analýza odhalila mezi senzitivními a rezistentními MN odlišnou expresi genů, které kódují proteiny zapojené do synaptického přenosu, ubikvitinace, mitochondriální funkce, transkripční regulace, funkce imunitního systému a extracelulární matrix (Brockington et al., 2013). Nejvýznamnější rozdíly byly zaznamenány v genech zapojených do synaptického přenosu, zejména u podjednotek glutamátových (např. AMPA) a GABA receptorů. Autoři naznačují, že senzitivní MN jsou daleko citlivější k excitotoxicitě než rezistentní MN u ALS. Předpokládají, že tento rozdíl v citlivosti je způsobený rozdílem ve vstupních proudech zprostředkovaných AMPA a GABA receptory v MN.

Dalším faktorem přispívajícím k citlivosti míšních α -MN mohou být specializované sktruktury extracelulární matrix (ECM) nazývané perineurální síť (PNN). Jakým způsobem PNN chrání MN, zatím není známo, ale MN neobalené PNN jsou daleko více citlivé k oxidačnímu stresu, exitotoxicitě či agregaci špatně složených proteinů (Suttkus et al., 2016). PNN jsou složeny z chondroitin sulfát proteoglykanů (CSGP), vazebných proteinů a tenascinů. CSGP v PNN obklopující spinální MN jsou přítomné v různé míře, což poukazuje na heterogenitu PNN v míše. PNN obklopující MN jsou složeny převážně z agrekanu, ale i brevikanu, neurokanu, verzikanu a fosfakanu (Matthews et al., 2002; Vitellaro-Zuccarello et al., 2007). Předchozí studie ukazují, že degradace PNN pozorovaná během progresu ALS může přispět k degeneraci MN a progresi onemocnění (Forostyak et al., 2014; Lemarchant et al., 2016).

Další studie prokázaly, že citlivé MN mají omezenou pufrovací kapacitu Ca^{2+} v porovnání s rezistentními MN (Palecek et al., 1999; Vanselow & Keller, 2000). Tyto výsledky naznačují, že pro selektivní zranitelnost ALS MN může být určující neurální excitabilita a excitotoxicita. Jiné studie ukazují, že k vyšší citlivosti MN může přispět mitochondriální dysfunkce či defekty v axonálním transportu a endoplazmatickém retikulu (De vos et al., 2007; Kiskinis et al., 2014; Lautenschläger et al., 2013; Melkov et al., 2016; Saxena et al., 2009).

2.1.3 Mechanizmy zahrnuté v patologii ALS

K patogenezi ALS přispívá mnoho mechanismů, ale je stále nejasné, jak tyto události vzájemně interagují, aby zahájily selektivní smrt MN (Obrázek 1).



Obrázek 1: Molekulární mechanismy vedoucí k degeneraci motoneuronů u ALS. ALS je komplexní onemocnění zahrnující aktivaci celé řady dysregulovaných buněčných mechanismů, vedoucích k degeneraci motoneuronů. K progresi ALS přispívají i dysfunkční interakce se sousedními buňkami jako např. gliovými buňkami.

2.1.3.1 Regulace a zpracování RNA

Jedním z hlavních patologických mechanismů podílejících se na vzniku a progresi onemocnění ALS je narušení regulace a zpracování RNA. Některé z genů (hlavně *TDP-43*, *SOD1*, *FUS* a *C9orf72*) souvisejících s ALS, jsou zapojeny do zpracování RNA, jako je transkripce, alternativní sestřih, stabilita a transport RNA (Buratti & Baralle, 2001; Chen et al., 2014; Gendron et al., 2013; Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Zdá se, že MN jsou obzvláště citlivé k chybnému RNA zpracování.

Analýza RNA z MN exprimujících některý z ALS genů odhalila změny v profilech messengerové RNA (mRNA) a mikro RNA (miRNA) uvnitř buněčných těl a axonů v porovnání se zdravými MN (Rotem et al., 2017). Ve skutečnosti většina genů, jejichž transkripty byly změněny v modelu SOD1, nebyly změněny v modelu TDP-43 a naopak. Tento objev je v souladu s pozorovaným odlišným fenotypem fALS způsobené SOD1 mutací

a fenotypem fALS způsobené TDP-43. Pravděpodobně jsou v těchto modelech ALS aktivovány různé patogenní dráhy, které vyvolají podobnou MN toxicitu vedoucí k ALS fenotypu. Nejčastější ALS mutací spojovanou s RNA dysfunkcí je opakující se hexanukleotidová expanze v *C9orf72*. Patologická hexanukleotidová expanze v *C9orf72* způsobuje akumulaci toxických RNA ložisek (Gendron et al., 2013), které usnadňují nábor RNA vázajících proteinů a dochází tak k narušení normální funkce těchto proteinů. Tato RNA ohniska jsou schopná sekvestrovat i jaderné proteiny jako jsou TDP-43 a FUS, což ovlivňuje jejich RNA cíle a dochází tak k narušení zpracování RNA. Mutace v *C9orf72*, *SOD1*, *TDP-43* a *FUS* narušují různé fáze zpracování RNA a mnohé z nich jsou sdíleny. TDP-43 hraje roli při sestřihu, transportu a stabilitě RNA (Colombrita et al., 2012; Sephton et al., 2011), zatímco FUS reguluje sestřihové události pro udržení a přežití neuronů (Lagier-Tourenne et al., 2012). Na rozdíl od TDP-43 a FUS neobsahuje *SOD1* RNA vázající motiv, ale některé studie naznačují potenciální roli mutantního *SOD1* v regulaci RNA metabolismu (Chen et al., 2014; Lu et al., 2009).

2.1.3.2 Proteinopatie u ALS

Schopnost regulovat a řídit lokální syntézu proteinů je důležitá pro správný vývoj, přežití, funkci a plasticitu neuronů, vzhledem k tomu, že reagují na vnější podněty a různé stimuly (Baleriola & Hengst, 2015; Shigeoka et al., 2016). Narušení syntézy lokálních proteinů, akumulace a/nebo multimerizace proteinů může být pro MN toxická (Alami et al., 2014; Gershoni-Emek et al., 2015). Jedním z charakteristických znaků sALS a fALS je abnormální cytoplazmatická akumulace TDP-43 (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Tyto nerozpustné cytoplazmatické agregáty mohou být způsobeny transkripčními a epigenetickými změnami nebo narušeným nukleocytoplazmatickým transportem (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006; Winton et al., 2009). Tendence TDP-43 přecházet z jádra do cytoplazmy a tvořit nerozpustné agregáty má negativní dopad na buněčnou proteolýzu, obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu a glutamátové excitotoxicitě a celkově na přežití buněk (Jiang et al., 2019; Khalfallah et al., 2018). V MN ALS byly pozorovány nejen agregáty TDP-43, ale i např. inkluze *SOD1*, *FUS* a/nebo *OPTN* proteinové agregáty (Arai et al., 2006; Bruijn, 1998; Maruyama et al., 2010; Z. Sun et al., 2011). V nedávné studii bylo prokázáno, že rozpustný chybně složený *SOD1* přispívá k progresi ALS, zatímco agregovaný *SOD1* může sloužit k sekvestraci toxických proteinů a působí tak neuroprotektivně v tomto onemocnění (Gill et al., 2019). Jedna ze vzácných mutací fALS je v genu *OPTN*, který kóduje

autofágický adaptérový protein, a jakékoliv změny v jeho hladině, rozpustnosti a lokalizaci mohou být škodlivé pro proces autofágie (Maruyama et al., 2010).

2.1.3.3 Autofágie

Autofágie je základní intracelulární proces používaný k udržování buněčné homeostázy degradací a recyklací dysfunkčních komponent. Řada mutací kauzativních genů souvisejících s ALS škodlivě ovlivňuje proces autofágie, např. *SQSTM1* a *OPTN* gen, které kódují selektivní autofágové receptory SQSTM1/p62 a optineurin nebo TBK1 (kináza zapojená do autofágie) a řada dalších (Z. Liu et al., 2014). Dokonce se ukázalo, že nejčastější fALS mutace *C9orf72* se účastní autofágického procesu (Sellier et al., 2016; Sullivan et al., 2016).

Publikace zabývající se rolí autofágie během progresu onemocnění ALS přinášejí rozporuplné výsledky. Role autofágie v ALS zůstává tedy stále nejasná. Zvýšená hladina autofágie může podpořit buněčnou smrt a naopak, snížení hladiny může vést k hromadění proteinových agregátů a organel, což způsobí buněčnou dysfunkci (Lee et al., 2015). Tyto rozdíly mohou být způsobeny použitím různých experimentálních modelů ALS, buněčnou specifitou či cílením na různé komponenty autofágie v odlišných fázích onemocnění. První detailní popis aktivace autofágie v MN během progresu ALS byl popsán v roce 2017 (Rudnick et al., 2017). Kromě časově závislé změny v prevalenci typů inkluzních tělísek také zjistili, že různé typy inkluzí se rozdělily podle odlišné citlivosti MN v ALS. V této studii identifikovali protichůdnou roli autofágie v MN na začátku a konci onemocnění ALS. Zatímco na počátku onemocnění má autofágie příznivou roli, tak na konci onemocnění se podílí na degradaci MN.

2.1.3.4 Stres endoplazmatického retikula

Stres endoplazmatického retikula (ER) je stresová reakce, během které jsou rozložené a/nebo chybně složené proteiny zadrženy v ER, což aktivuje signální dráhy, které se souhrnně označují jako unfolded protein response (UPR). ER stres byl detekován jak u fALS, včetně SOD1 (Nishitoh et al., 2008), TDP-43 (Walker et al., 2013), *C9orf72* (Dafinca et al., 2016) a FUS (Farg et al., 2012), ale i u pacientů se sALS (Ilieva et al., 2007). Saxena ve své studii ukazuje, že v ALS jsou citlivé MN mnohem více náchylné k ER stresu než rezistentní MN (Saxena et al., 2009).

2.1.3.5 Mitochondriální dysfunkce

Mitochondrie jsou velmi důležité orgány, které kromě jejich dobře známé role producentů ATP oxidační fosforylací hrají důležitou roli i v biogenezi fosfolipidů, homeostáze vápníku a apoptóze. Důkazy získané z experimentálních modelů ALS jak *in vitro*, tak *in vivo*, a ze studií pacientů prokázaly řadu defektů v mitochondriích, které přispívají k degeneraci MN (Kiskinis et al., 2014; J. Liu et al., 2004). Mitochondriální dysfunkce je považována za časnou událost v patogenezi ALS. Jednou z prvních morfologických změn zaznamenaných u mitochondrií během progresu ALS byla jejich vakuolizace, dilatace a dále dezorganizace mitochondriálních krist a membrány (Fujita et al., 1996; Kong & Xu, 1998; Wong et al., 1995). Kromě morfologických abnormalit jsou u mitochondrií ALS přítomny i funkční změny, včetně vadné oxidativní fosforylace, produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), snížené kapacity vychytávání vápníku a defektní mitochondriální dynamika. Nejen abnormální mitochondriální morfologie a funkce byla pozorována u ALS, ale i vadná buněčná distribuce mitochondrií. Pro přežití MN je nezbytné, aby mitochondrie byly účinně transportovány a lokalizovány na místa s vysokými metabolickými a energetickými požadavky, jako např. synapse. Porucha axonálního transportu (Magrané et al., 2014), tak i abnormální mitochondriální distribuce byla zaznamenána jak u SOD1, tak TDP-43 transgenních myších linií. Většina těchto mitochondriálních abnormalit je pozorována už před nástupem symptomů, což naznačuje, že mitochondrie hrají klíčovou roli v patogenezi onemocnění. Zejména SOD1 a TDP-43 jsou zapojeny do regulace mitochondriální dynamiky. Několikrát bylo prokázáno, že akumulace agregovaných mutantních proteinů SOD1 a TDP-43 uvnitř nebo na povrchu mitochondrií způsobují poškození a dysfunkci mitochondrií (Magrané et al., 2014).

2.1.3.6 Distální axonopatie

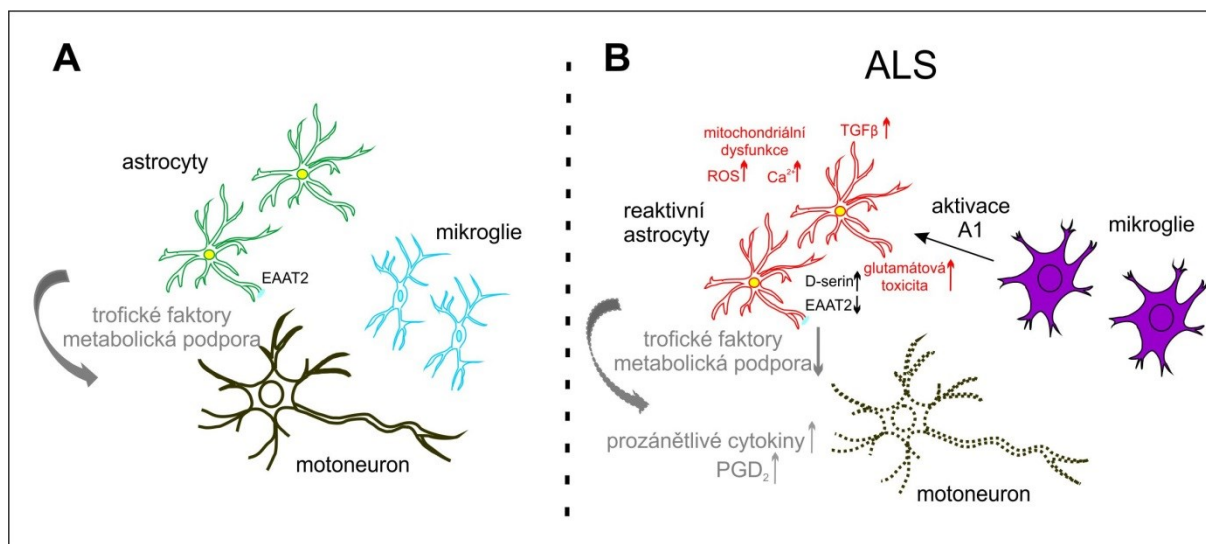
Některé studie naznačují, že degeneraci MN u ALS předchází axonální degenerace, ztráta periferních axonů a destrukce nervových terminálů (Fischer et al., 2004; Moloney et al., 2014). V distální axonopatii hrají hlavní roli gliové a svalové buňky, které vylučují faktory ovlivňující přežití a zdraví MN (Moloney et al., 2017; Tsitkanou et al., 2016). V nedávné studii Maimon prokázal, že svaly s mutací SOD1 vylučují destabilizující faktory jako je Sema3A, který usnadňuje degeneraci axonů a narušení nervosvalové ploténky (NMJ) (Maimon et al., 2018). NMJ je vysoce specializovaná synapse, která umožňuje řízenou

signalizaci mezi svalem a nervem nezbytnou pro funkci kosterního svalstva. Bylo prokázáno, že k degeneraci NMJ přispívá oxidační stres (Lanfranconi et al., 2017) a mitochondriální dysfunkce (Sasaki & Iwata, 2007; Sotelo-Silveira et al., 2009).

V současné době byla distální axonopatie pozorována nejen u SOD1 modelu ALS (Fischer et al., 2004), ale i u C9orf72, FUS a TDP-43 (Picher-Martel et al., 2016). Na druhou stranu některé studie naznačují, že těla MN mohou degenerovat odlišnými mechanizmy, než degenerují jejich axony (Gould et al., 2006; Rouaux et al., 2007). Pokud tyto dva procesy mají opravdu odlišné molekulární mechanizmy, je třeba zvážit terapie, které by cílily jak na zachování buněčných těl, tak i MN axonů. Proto jsme se v naší studii zaměřili na porovnání terapeutického účinku intratekální a intramuskulární aplikace mesenchymálních kmenových buněk (MSC) a jejich kombinace (výsledky jsou prezentovány v kapitolách 5.2, 5.3 a 5.4).

2.1.3.7 Zapojení gliových buněk do patologie ALS

Přibývá stále více studií přinášejících nové důkazy, že k degeneraci a následné smrti MN u ALS přispívá dysfunkce sousedních buněk, jako například astrocytů (Papadeas et al., 2011; Yamanaka et al., 2008). Astrocyty jsou velmi důležité pro zdravý vývoj a funkci neuronů, poskytují jim jak trofickou, tak metabolickou a strukturální podporu (Obrázek 2 A). Astrocyty hrají ale důležitou roli i v synaptické signalizaci, regulaci krevního toku a mohou silně ovlivnit nervové prekuzory/kmenové buňky v dospělé CNS (Seifert et al., 2006). Bylo prokázáno, že astrocyty izolované ze SOD1^{G93A} myší linie mění svůj fenotyp, včetně morfologie a expresního profilu (Rossi et al., 2008). Tento typ astrocytů je často pojmenován jako reaktivní. Tripathi ukázal, že samotný reaktivní stav astrocytů přispívá k agregaci proteinů (UBIQUITIN, p62 a TDP43) v MN a degeneraci neuritů (Tripathi et al., 2017) (Obrázek 2B). Tvorba těchto cytoplazmatických inkluzí v MN je charakteristickým znakem ALS a byla pozorována i v kokultúrách s reaktivními astrocyty izolovanými ze zdravých zvířat. Toto zjištění naznačuje, že reaktivní astrocyty podporují patologii ALS nezávisle na jejich genotypu.



Obrázek 2: Role astrocytu a jejich vliv na MN u ALS. (A) Ve zdravém prostředí astrocyty poskytují neuronům trofickou, metabolickou a strukturální podporu. (B) Zatímco u ALS, astrocyty mění svůj expresní profil a morfologii a dochází k ztrátě jejich homeostatické podpory neuronům.

Nedávno bylo zjištěno, že existuje více podskupin reaktivních astrocytů, které pojmenovali A1 a A2 (Clarke et al., 2018; Liddelow et al., 2017). A1 astrocyty ztratily schopnost podporovat přežití oligodendrocytů a neuronů a byly aktivované prostřednictvím mikrogliaální sekrece tří faktorů TNF- α , C1q a IL-1 α (Liddelow et al., 2017). A1 reaktivní astrocyty byly pozorované i u ALS. A2 reaktivní astrocyty se naopak vyznačovaly sekrecí neuroprotektivních faktorů, které mohou podporovat přežití a růst neuronů. Tento objev ukazuje, že reaktivní astrocyty jsou fenotypově heterogenní. S velkou pravděpodobností se i u ALS vyskytují fenotypové a funkčně rozdílné astrocyty.

Díaz-Amarilla objevil abnormální fenotyp reaktivních astrocytů vznikající během ALS progresu, které pojmenoval jako „aberantní“ astrocyty (AbA) (Díaz-Amarilla et al., 2011). Tyto astrocyty se vyznačovaly vysokou mírou proliferace *in vitro* a koexpresí astrocytových a mikrogliaálních markerů, ale postrádajících glutamátový transportér a NG2 glykoprotein (Díaz-Amarilla et al., 2011; Trias et al., 2013). Podobný typ astrocytů byl pozorován v blízkosti degenerujících MN a jejich počet s progresí onemocnění prudce vzrostl. Bylo zjištěno, že AbA vylučují neurotoxické faktory, které jsou až 10x agresivnější pro MN v porovnání s astrocyty se SOD1 mutací izolovaných z novorozenečích myší.

Toxické vlastnosti ALS astrocytů byly potvrzeny jak na buněčných, tak na zvířecích modelech (Di Giorgio et al., 2007, 2008; Marchetto et al., 2008; Nagai et al., 2007). Zdá se, že pokud jsou gliální buňky vystaveny buněčnému stresu, jako je exprese mutantních ALS genů, mají predispozice stát se neurotoxickými. Taková zranitelnost může být spojena s permanentními epigenetickými změnami, vyvolávajícími aktivní gliový fenotyp. Astrocyty

exprimující mutantní SOD1 vykazují přímou a selektivní toxicitu pro MN vylučováním různých faktorů (Di Giorgio et al., 2008; Marchetto et al., 2008; Nagai et al., 2007). I když přesné molekulární mechanismy způsobující toxický charakter astrocytů zůstávají nejasné, tak během posledních let byla identifikována řada toxických mechanismů a faktorů, včetně transportérů glutamátu, prostaglandinu, ROS a prozánětlivých cytokinů (Boillée et al., 2006; Di Giorgio et al., 2007; Haidet-Phillips et al., 2011; Marchetto et al., 2008; Nagai et al., 2007; Re et al., 2014). Jiné studie naznačují vliv zvýšeného Na, K ATPázového komplexu nebo zvýšené regulace proteinu mezerového spojení konexinu 43 na toxicitu zprostředkovanou astrocyty (Almad et al., 2016; Gallardo et al., 2014). Toxický účinek astrocytů je společným znakem jak fALS, tak sALS (Haidet-Phillips et al., 2011; Re et al., 2014; Tong et al., 2013).

Selektivní redukce mutantní exprese SOD1 nejen v astrocytech (L. Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008), ale i v mikroglíích (Boillée et al., 2006; L. Wang et al., 2009) a oligodendrocytech (Kang et al., 2013) zpomalila progresi ALS, což naznačuje zapojení i jiných gliálních buněk v patogenezi ALS. Zdá se, že mutace v gliálních buňkách přispívají spíše k progresi onemocnění, zatímco mutace v MN k její iniciaci.

2.1.4 Mechanizmy buněčné smrti motoneuronů u ALS

Během posledních let se objevilo mnoho nových forem programované buněčné smrti často spojené s vysokou specifitou k určitým buněčným typům (Johann et al., 2015; Re et al., 2014). Z toho důvodu je třeba zvážit, jestli alternativní formy programované buněčné smrti nehrají roli v procesu neurodegenerace ALS.

2.1.4.1 Role apoptózy v ALS

Celá řada studií provedených na transgenních myších modelech SOD1 poskytuje důkazy, že apoptóza je pravděpodobně jeden z mechanismů podílejících se na smrti MN během progresu ALS (Nagley et al., 2010; Cedric Raoul et al., 2005; Sathasivam & Shaw, 2005). Apoptóza je charakteristická řadou různých morfologických změn. Buňka se zmenšuje a kondenzuje, dochází k odbourání cytoskeletu, jaderné fragmentaci membrány a rozpadá se na apoptická tělíška. Morfologické analýzy, jak z experimentálních modelů, tak z posmrtné tkáně ALS pacientů naznačují, že degenerující neurony vykazují určité znaky připomínající apoptózu, nicméně u většiny umírajících buněk můžeme pozorovat spíše neapoptickou

morfologii s některými rysy připomínající například autofágickou smrt (Guégan & Przedborski, 2003).

Vzhledem k nejasným výsledkům morfologických studií se zdá, že přesvědčivějším přístupem k hodnocení role apoptózy u ALS může být spíše zacílení na klíčové faktory a sledování, jestli ovlivní průběh nemoci. Apoptózy se účastní dvě hlavní proteinové rodiny, a to Bcl-2 (B-cell lymfoma 2) a kaspázy (*CASPASEs Cystein-dependent ASP-artate-specific proteASEs*) (Czabotar et al., 2014). Proteiny Bcl-2 rodiny jsou proapoptické (Bax, Bak) nebo antiapoptické (Bcl-2) a regulují propustnost vnější mitochondriální membrány, což je velmi důležitý krok v průběhu programované buněčné smrti (apoptóza). Proapoptické proteiny Bax a Bak tvoří póry ve vnější mitochondriální membráně, které jsou zodpovědné za uvolňování cytochromu c a dalších mitochondriálních apoptických faktorů (Bleicken et al., 2013). Uvoňováním mitochondriálního cytochromu c dochází k aktivaci kaspázy 3 (Narula et al., 1999).

Nadměrná exprese Bcl-2 zpozdila nástup onemocnění a prodloužila přežití u transgenní myši linie SOD1^{G93A} (Kostic et al., 1997). Podobný efekt jako u nadměrné exprese Bcl-2 byl pozorován po podání N-benzyloxycarbonyl-Val-Asp-fluoromethylketone (zVAD.fmk) do mozkové komory myši SOD1^{G93A}, což je širokospektrální inhibitor kaspáz (Li et al., 2000). Nicméně ani v jednom případě nedošlo k prodloužení progresu onemocnění (počet dní od nástupu onemocnění k úmrtí). Je zajímavé, že delece *Bax* v transgenní myši linii SOD1^{G93A} zcela zachránila MN, zpozdila nástup onemocnění a prodloužila přežití, nicméně nedokázala zabránit neuromuskulární denervaci a mitochondriální vakuolizaci (Gould et al., 2006). Zatímco neuronální delece jak *Bax*, tak *Bak* zabránila smrti MN tak i degeneraci axonů u transgenní linie SOD1^{G93A} (Reyes et al., 2010). Pozorované bylo i zpoždění motorické progresu onemocnění a myši déle přežívaly. Tyto výsledky naznačují, že poškozené MN v ALS aktivují mitochondriální apoptickou dráhu na počátku onemocnění a že apoptická signalizace přispívá k neuromuskulární degeneraci a neuronální dysfunkci. Vzhledem k tomu, že u transgenních myších SOD1 linií jsou morfologické znaky apoptózy u degenerujících MN poměrně vzácné a inhibice kaspáz poskytují jen mírné zlepšení, je nezbytné zvážit, jestli jiný typ programované buněčné smrti, jako např. nekroptóza, nehraje roli v degeneraci MN.

2.1.4.2 Role nekroptózy v ALS

Nekroptóza je alternativní programovaná buněčná smrt s výraznými molekulárními rozdíly v porovnání s apoptózou, nejvýznamnějším rysem je nezávislost na aktivaci kaspáz.

Nekroptóza vykazuje podobné morfologické znaky jako nekróza, zahrnující včasné narušení integrity membrány. V důsledku tohoto narušení buněčné membrány dochází k uvolnění buněčného obsahu do extracelulární matrix, což může způsobit a zhoršit zánět okolní tkáně. Nekroptóza může být spuštěna vazbou TNF- α k jeho receptoru TNFR1 a je podporována inhibicí kaspázy 8 (casp 8) (de Almagro & Vucic, 2015). Nekroptóza je zprostředkována aktivací RIPK1 a RIPK3, což vede k tvorbě nekrozomu (Y. Cho et al., 2009; He et al., 2009). Po aktivaci RIPK3 dochází k fosforylaci a oligomerizaci proteinu MLKL, který se translokuje do plazmatické membrány a vyvolává její permeabilizaci (L. Sun et al., 2012; Zhao et al., 2012).

Re poprvé navrhl, že nekroptóza může hrát důležitou roli v buněčné smrti MN u ALS (Re et al., 2014). K potvrzení této hypotézy použil *in vitro* model jak fALS tak sALS. Prokázal, že MN reagují na toxické ALS astrocyty zapojením nekroptického aparátu, který vede k jejich degeneraci a zániku. Zjistil, že tento mechanismus je závislý na RIPK1, RIPK3, MLKL a Bax, nikoliv však na kaspázové aktivitě, která je specifická pro apoptózu.

Další důkazy o zapojení nekroptózy v ALS přinesli o dva roky později Ito (Ito et al., 2016). Popsal alternativní roli nekroptózy u ALS, ve kterém mutace v *Optn* aktivuje RIPK1 v mikroglíích, což je spojeno se zvýšenou sekrecí cytokinů a chemokinů. Zvýšená produkce zánětlivých faktorů mikroglíemi signalizovala degeneraci oligodendrocytů prostřednictvím nekroptózy aktivované pomocí TNF α . Degenerace oligodendrocytů vedla k poruchám myelinizace MN a výsledné axonopatii. Mutace v *Optn* je spojována jak s fALS tak sALS. Ito přináší možné vysvětlení, jakým způsobem tato mutace přispívá k progresi onemocnění. Prokázal, že RIPK1 a RIPK3 jsou zapojeny do axonální patologie i v jiném myším modelu ALS SOD1^{G93A}, u kterého byla prokázána včasná degenerace oligodendrocytů ještě před projevem symptomů (Ito et al., 2016; Kang et al., 2013).

2.1.5 Experimentální modely ALS

V současné době existuje celá řada transgenních zvířecích modelů, které pomáhají objasnit molekulární patologii ALS a její fenotypové důsledky. Každý typ má své vlastní charakteristické vlastnosti, které vyplývají z povahy zavedené mutace, ale nesou sebou i mnoho omezení. Nejrozšířenější zvířecí model ALS je založen na expresi lidského proteinu SOD1, který nese mutaci G93A (Gurney et al., 1994; Rosen et al., 1993). Od této původní studie vědci identifikovali dalších 150 mutací v *SOD1* genu souvisejících s ALS např. G37R (Wong et al., 1995), G85R (Bruijn et al., 1997) a G86R (Ripps et al., 1995). Tyto transgenní

linie se liší počátkem nástupu onemocnění, projevem a progresí, nicméně vykazují i společné rysy jako je ztráta motorických neuronů, axonální denervace, agregace proteinů, progresivní ochrnutí a snížená životaschopnost (Philips & Rothstein, 2015). Vzhledem k tomu, že transgenní linie myši s umlčeným *SOD1* genem vykazují normální fenotyp, se předpokládá, že *SOD1* způsobuje ALS spíše získáním toxické funkce. Jednou z nevýhod těchto modelů je, že mutantní gen musí být nadměrně exprimovaný, aby se během života zvířete vyvinul fenotyp podobný ALS (Lutz, 2018). Nadměrná exprese mutantního genu může vyvolat otázku, zda základní mechanismus degenerace MN je relevantní k lidské formě ALS. Transgenní myši model *SOD1*^{G93A} zůstává stále nejrozšířenějším modelem pro studium degenerace MN u ALS. Tento model vykazuje v lumbální části míchy v konečné fázi onemocnění ztrátu 40-50% MN. Vzhledem k malé velikosti myšního modelu se k testování potenciálních terapeutických přístupů jako je např. implantace kmenových buněk používají transgenní linie potkanů.

Další hlavní transgenní modely ALS jsou založeny na mutaci TDP-43, FUS a C9orf72 (Lutz, 2018). V roce 2016 byla vyvinuta nová transgenní myši linie s hexanukleotidovou opakující se expanzí C9orf72, nejčastější genetickou mutací spojovanou s onemocněním ALS (Y. Liu et al., 2016). Tento myši model vykazuje snížené přežití, ochrnutí, svalovou denervaci, ztrátu MN, chování podobné úzkosti, kortikální a hipokampální neurodegeneraci, tvorbu ohnisek RNA, agregaci proteinů a cytoplazmatické agregáty TDP-43. Nicméně tento fenotyp se projevil pouze u samic a nikoliv u samců. Molekulární podstata tohoto rozdílu dosud není vysvětlena, přispívajícími faktory může být hormonální regulace nebo pohlavně specifické rozdíly v zánětlivých reakcích (Y. Liu et al., 2016).

Vzhledem k tomu, že patologické proteinové (ubikvitinové) inkluze obsahující TDP-43 byly identifikovány v postižených neuronech jak u sALS tak fALS, mohly by modely s mutací v TDP-43 lépe reprezentovat patologii většiny pacientů s ALS. Biochemická analýza mozků a mích pacientů s ALS identifikovala TDP-43 jako hlavní složku ubikvitinových inkluzí (Mackenzie et al., 2007). TDP-43 se primárně nachází v jádrech zdravých MN, avšak ve většině forem ALS se tyto agregáty nachází v cytosolu (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Není jasné, zda toxicita je zprostředkována ztrátou funkce TDP-43 v jádru nebo akumulací agregátů v cytoplazmě, popřípadě kombinací obou těchto jevů (Lutz, 2018). Přibližně bylo vytvořeno 20 transgenních modelů spojených s mutací TDP-43, lišících se typem promotoru a mírou exprese TDP-43 (Picher-Martel et al., 2016). Ukázalo se, že hladina exprese mutantního TDP-43 koreluje se závažností onemocnění (Wegorzewska et al., 2009). Transgenní myši nadměrně exprimující buď divoký typ nebo mutantní TDP-43 časně

ochrnuly a uhynuly, nicméně TDP-43 agregáty se v ubikvitinových inkluzích vyskytovaly jen zřídka anebo vůbec (Stallings et al., 2010; Wegorzewska et al., 2009; Xu et al., 2010, 2011). Toto zjištění vzbuzuje obavy ohledně platnosti těchto transgenních linií jako modelu ALS.

FUS myší modely umírají krátce po narození v důsledku respiračního selhání a vykazují sníženou tělesnou hmotnost a velikost (Hicks et al., 2000). Nicméně bylo vytvořeno několik myších kmenů za účelem pochopení FUS patologie, i když ne vždy se jednalo o ALS patologii (Devoy et al., 2017; Nolan et al., 2016).

Ačkoli žádný z myších modelů plně nerekapituluje lidský stav, téměř všechny pomáhají vědcům porozumět normálním a abnormálním biologickým procesům, za předpokladu, že jsou zváženy jednotlivé charakteristiky každého typu modelu a jim odpovídající interpretace dat.

2.2 Buněčná terapie

Vzhledem k nedostatečně účinné léčbě pacientů s ALS se objevila celá řada experimentálních terapeutických přístupů, včetně protizánětlivé terapie, antiglutamatergní a antioxidační terapie a terapie založené na transplantaci kmenových buněk různého původu. Kmenové buňky se zdají být vhodnými kandidáty díky svým jedinečným vlastnostem.

2.2.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cells, ESC) jsou derivované z vnitřní buněčné masy 5-6 denních embryí ve stádiu blastocysty (Thomson, 1998), mají velký potenciál proliferace a mají schopnost diferenciaci do všech tří zárodečných linií (ektodermální, mezodermální a endodermální). Lidské ESC (hESC) se mohou účinně diferencovat do MN, exprimujících cholin acetyl transferázu (Chat) a HB9 a majících vhodné elektrofyziologické vlastnosti zralých MN (Du et al., 2015; Shin et al., 2005).

Transplantované motoneuronové progenitory (hMNP) derivované z hESC byly schopné ochránit endogenní MN v blízkosti implantace u SOD1 transgenní potkaní linie (Wyatt et al., 2011). Příznivý efekt hMNP byl v této studii přisuzován jejich schopnosti aktivně vylučovat růstové faktory, včetně NGF a NT-3. Pozitivní také je, že transplantované buňky přežívaly více než 2 měsíce po implantaci a některé z nich vykazovaly známky zralých MN. Avšak je třeba ještě překonat řadu překážek pojících se s generováním MN. Navíc

vzhledem k nepříznivému ALS prostředí vůči MN se zdá, že gliové buňky mají větší potenciál jako kandidáti pro léčbu ALS.

Intratekální aplikace mladých astrocytů derivovaných z embryonálních kmenových buněk (hES-AC) způsobila pozdní nástup onemocnění, zlepšila motorickou aktivitu v porovnání s kontrolní skupinou (Izrael et al., 2018). *In vitro* charakterizace těchto hES-AC ukázala podobné funkční vlastnosti, jako mají „zdravé astrocyty“ zahrnující např. schopnost vychytávat glutamát, podporu axonálního růstu, produkci a sekreci širokého množství neuroprotektivních faktorů a v neposlední řadě ochranu MN před oxidačním stresem. Sekundárním cílem studie bylo stanovení bezpečnosti, biodistribuce, toxicity a tumorogenního potenciálu a proto byly hES-AC transplantovány do imunodeficitních NGS myši. Po devíti měsících nedošlo k vývoji teratomu ani žádného jiného nádoru. Histologická analýza ukázala, že buňky exprimující astrocytické markery přežívaly po celou dobu trvání studie připojené k pia mater. Bezpečnost a terapeutický potenciál těchto hES-AC se v současné době hodnotí v klinické studii fáze I u pacientů s ALS.

2.2.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Navzdory obrovskému potenciálu hESC v léčbě různých onemocnění, je jejich klinické využití omezeno závažnými etickými problémy spojenými se zničením embrya při derivaci hESC a potenciálním imunitním odmítnutím buněk příjemcem. Jako alternativní zdroj pluripotentních kmenových buněk (pluripotent stem cells, PSC) jsou lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells, iPS) reprogramované ze somatických buněk prostřednictvím ektopické exprese transkripčních faktorů (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). iPS mají mnoho společných vlastností s hESC, včetně podobné morfologie, genové exprese a *in vitro* diferenciací kapacity (Stadtfield & Hochedlinger, 2010). Navíc iPS derivované přímo z tkání pacienta se mohou používat pro modelování celé řady onemocnění *in vitro*, pro studium jejich mechanismů a pro screening léků. Nicméně, stejně jako hESC jsou iPS náchylné ke genomickým aberacím, které by mohly ohrozit jejich stabilitu, což přináší vážné obavy ohledně bezpečného použití iPS v klinické praxi.

U iPS bylo zaznamenáno hned několik mechanismů přispívajících k rozvoji genetických mutací u těchto buněk. Jedním z nich mohou být přímo rodičovské somatické buňky, ze kterých jsou iPS derivovány (Abyzov et al., 2012; Gore et al., 2011). Jsou-li v somatických buňkách mutace, mohou být také přeneseny do iPS linie. Nicméně genomická nestabilita může nastat v kterékoliv fázi generování iPS linií během reprogramování a

dlouhodobou kultivací. U lidských iPS pozorovali, že reprogramování je spojené s delecí nádorových supresorových genů, zatímco čas v kultuře byl spojen s duplikacemi onkogenních genů (Laurent et al., 2012). V další kapitole se budu podrobněji zabývat genomovou nestabilitou lidských PSC (hPSC) konkrétně hESC v kultivačních *in vitro* podmínkách.

2.2.2.1 Role opravných mechanismů hPSC

Jak již bylo zmíněno, hPSC jsou jedny z hlavních kandidátů pro buněčnou terapii řady onemocnění CNS hlavně díky jejich schopnosti diferencovat do různých typů neurálních buněk. Nicméně pro jejich předpokládané použití v regenerativní medicíně je nutné nakultivovat dostatečný počet buněk, což se pojí s jejich dlouhodobou kultivací v podmínkách *in vitro* (Kropp et al., 2017). Během dlouhodobé kultivace dochází k narušení jejich genetické a epigenetické stability. Mezi nejčastější změny karyotypu hESC patří zisk chromozomu 1, 12, 17, 20 nebo X (Amps et al., 2012; Catalina et al., 2008; Draper et al., 2004; Gertow et al., 2007; Seol et al., 2008). Tyto abnormality mohou mít vliv na jejich schopnost účinně se diferencovat do různých buněčných typů (Zhang et al., 2016), popřípadě zvýšit jejich maligní potenciál.

Markouli a kolektiv se snažili objasnit, jak ovlivňuje jedna z nejčastějších genomických abnormalit 20q11.21 diferenciační kapacitu hPSC (Markouli et al., 2019). Zjistili, že tato mutace má dramaticky negativní účinek na neuroektodermální diferenciační potenciál, ale přitom si zachovává svou schopnost diferenciace na deriváty mezodermy. Ukázali, že hlavní příčinou těchto změn je nadměrná exprese Bcl-XL, což vede ke snížení signalizace apoptózy.

Ukázalo se, že PSC mají zvýšenou hladinu dvouřetězcových zlomů (double strand breaks, DSB) v porovnání s diferencovanými buňkami a toto zvýšení je připisováno jejich vysoké proliferační kapacitě (Vallabhaneni et al., 2018). Rychlá proliferace v hESC buňkách je způsobena změnou exprese klíčových genů buněčného cyklu, modifikací kontrolních bodů, změnou metabolické regulace (Shyh-Chang et al., 2013). Buněčný cyklus hESC je kratší v porovnání s diferencovanými buňkami (Becker et al., 2006), což hESC může vystavit zvýšenému riziku chybování při replikaci (Momcilovic et al., 2010). Oprava DNA u PSC musí být tedy rychlá a účinná, aby se zabránilo další akumulaci mutací, které by mohly vést k propagaci nádoru. Bylo prokázáno, že hESC mají mnohem vyšší expresi genů zapojených do různých opravných mechanismů, což vede k účinnější a rychlejší reakci na poškození DNA než u diferencovaných buněk (Adams et al., 2010; Luo et al., 2012; Momcilovic et al.,

2010). Potenciální zdroje poškození u hESC mohou být tedy jak endogenního původu (např. metabolickou aktivitou a replikací DNA), tak exogenního původu (např. UV a ionizující záření). Pokud je poškození příliš závažné, mohou buňky také zahájit programovanou buněčnou smrt, která odstraní buňky s poškozenou DNA z populace (Desmarais et al., 2012).

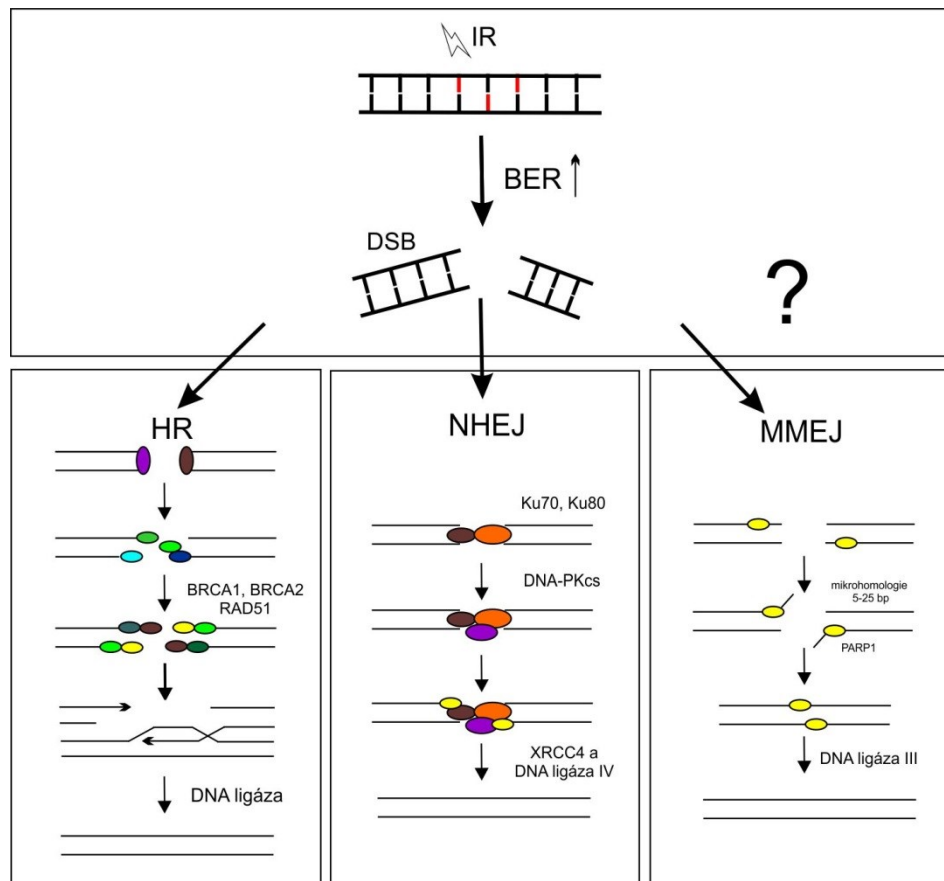
Pro bezpečné použití PSC je nutné porozumět mechanismům zajišťujícím stabilitu genomu a odpověď na poškození DNA i v kultivačních *in vitro* podmínkách. Získané znalosti nám pomohou optimalizovat podmínky kultivace a schopnost modulovat tyto mechanismy by mohla vést k prevenci nežádoucí akumulace mutací během *in vitro* kultivace. V kapitole 5.5-5.8 se zabývám tím, jakým způsobem se vyrovnávají hESC s poškozením DNA v *in vitro* kultivačních podmínkách.

V závislosti na typu poškození buňka volí vhodný opravný mechanismus. Jedno z nejběžnějších poškození je oxidativní poškození vzniklé ROS, kterým je buňka nepřetržitě vystavena díky mitochondriální aktivitě a nevyvážené intracelulární redukcí kyslíku. Hlavním opravným mechanismem zapojeným u hESC při reakci na oxidační poškození je básová excizní reparace (BER) (Krutá et al., 2013). Bylo zjištěno, že v průběhu opravy seskupeného oxidativního poškození pomocí BER, může endonukleázová aktivita vytvořit jednořetězcové zlomy (single strand breaks, SSBs), které jsou v těsné blízkosti, což zapříčiní tvorbu DSB (Krutá et al., 2013) a může tak participovat na zvýšeném riziku přestaveb genomu. DSB představují velmi nebezpečný typ poškození DNA (Jackson, 2002) a musí být co nejdříve opraveny. V kapitole 5.6 diskutuji, jaký opravný mechanismus hESC volí při opravě těchto škodlivých DSB.

Hlavními opravnými mechanismy DSB jsou homologní rekombinace (HR), klasické nehomologní spojování konců (canonical non-homologous end joining; cNHEJ) a relativně nedávno objevená dráha mikrohomologií zprostředkované spojení konců (microhomology-mediated end-joining; MMEJ) (Obrázek 3). Který mechanismus buňka zvolí na opravu DSB, záleží na mnoha faktorech, např. na fázi buněčného cyklu nebo přítomnosti dostupných proteinů (Delacôte & Lopez, 2008). Zatímco DSB mohou být opraveny pomocí NHEJ v průběhu celého buněčného cyklu, HR je aktivní pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu, kdy je k dispozici intaktní sesterská chromatida vedoucí k bezchybné opravě DSB. V porovnání s HR má NHEJ vyšší sklon k mutacím a malignitě (Brady et al., 2003). Klíčovými proteiny HR jsou Rad51 a BRCA1, zatímco 53BP1 je hlavním hráčem v NHEJ. 53BP1 je multifunkční DDR protein, který hraje důležitou roli při volbě opravné cesty DSB: 53BP1 inhibuje resekci DNA a v důsledku toho potlačuje HR a zvýhodňuje NHEJ (Callen et al., 2013; Chapman et al., 2013; Escibano-Díaz et al., 2013). Prvním krokem NHEJ je nábor heterodimeru Ku70/80

na konce poškozené DNA, následuje interakce s katalytickou podjednotkou DNA protein kinázou C (PKCs) a dochází ke stabilizaci konců zlomené DNA (Rathmell & Chu, 1994). Kaskáda proteinových fosforylačních reakcí nakonec vede k odstranění jednořetězcových přesahů zlomených konců DNA (Ma et al., 2002) a následné spojení konců komplexem ligázy IV, XRCC4 a XLF13 (Ahnesorg et al., 2006).

MMEJ bylo původně identifikováno jako záložní opravný mechanismus v nepřítomnosti NHEJ a HR. Bylo prokázáno, že 53BP1 v přítomnosti BRCA1 podporuje opravu DSB nejenom pomocí NHEJ, ale i MMEJ (Xiong et al., 2015). Je zřejmé, že MMEJ závisí na řadě proteinů, včetně PARP1, XRCC1 a DNA ligázy I nebo III, z nichž mnohé se účastní dalších opravných drah (Sallmyr & Tomkinson, 2018).



Obrázek 3: Účinná BER přispívá k tvorbě dvouřetězcových zlomů (DSB) u hESC a může být tak potenciální zdroj genomických přestaveb. DSB je velmi nebezpečné poškození a buňka má několik mechanismů, jak je opravit. Hlavními opravnými mechanismy DSB jsou homologní rekombinace (HR), nehomologní spojení konců (NHEJ) a mikrohomologií zprostředkované spojení konců (MMEJ). Jaký mechanismus buňka zvolí, záleží na mnoha faktorech např. fáze buněčného cyklu nebo přítomnosti dostupných proteinů.

2.2.3 Mesenchymální kmenové buňky

MSC jsou multipotentní buňky, které se primárně diferencují na buňky mesenchymálního původu jako jsou fibroblasty, osteoblasty, adipocyty, chondrocyty. MSC mohou být různého původu izolované např. z kostní dřeně, tukové tkáně, pupečníku a řady dalších tkání. V závislosti na jejich původu se tyto buňky mohou lišit biologickými funkcemi, potenciálem diferenciací a expresním profilem. Nicméně všechny MSC musí splňovat definici schválenou v roce 2006 Mezinárodní společností pro buněčnou terapii. Hlavní terapeutický potenciál MSC je připisován jejich parakrinním schopnostem, tj. vylučování různých neurotrofních faktorů a cytokinů. Dále mají imunomodulační, antiapoptické a protizánětlivé účinky, modulují reaktivitu astrocytů a mikroglíí. Z těchto důvodů se zdá, že jejich příznivý účinek v léčbě řady onemocnění je zprostředkovaný spíše podpůrnou funkcí, než schopností nahradit degenerující buňky.

Velkou výhodou aplikace MSC je jejich autologní transplantace, i když i ta má svá určitá omezení. Jeden z problémů spočívá v kultivaci MSC od starších pacientů a obtíže spojené s izolací účinné populace MSC od pacientů s neurodegenerativním onemocněním, např. ALS. Výsledky naznačují, že MSC izolované přímo z pacienta trpícího ALS (MSC-ALS) mají sníženou expresi pluripotentních markerů jako *Oct-4* a *Nanog* a sníženou schopnost produkovat trofické faktory (G.-W. Cho et al., 2010). Bylo prokázáno, že schopnost MSC-ALS sekretovat tyto faktory, je přímo úměrná progresi onemocnění (Koh et al., 2012). Dále byly pozorovány rozdíly v adipogenní diferenciaci (Matejkova et al., 2018) a reakci na stimulaci prozánětlivých cytokinů (Javorkova et al., 2019). Na druhou stranu nebyly do třetí pasáže pozorovány morfologické změny, abnormality karyotypu a změny v růstu (Ferrero et al., 2008) a MSC-ALS vykazovaly srovnatelné imunomodulační vlastnosti jako MSC zdravých dárců (Javorkova et al., 2019). Nicméně s dlouhodobou kultivací MSC-ALS se projevíly morfologické změny a s výškou pasáže docházelo k postupnému snižování protizánětlivých, neuroprotektivních a diferenciacních vlastností MSC-ALS (Choi et al., 2010). Tyto výsledky naznačují, že MSC od zdravých dárců by mohly být lepší volbou pro pacienty s ALS. Bylo prokázáno, že MSC mají sníženou expresi MHC I a žádnou expresi MHC II, což snižuje náchylnost k imunitní odpovědi (Ryan et al., 2005).

Preklinické studie na experimentálních modelech ALS prokázaly, že aplikace MSC částečně obnoví motorické funkce, sníží rychlost progresu onemocnění a prodlouží přežívání zvířat (Forostyak et al., 2014; H. Kim et al., 2010; Uccelli et al., 2012; Vercelli et al., 2008; Zhou et al., 2013). Na zvířecích modelech ALS byly testovány různé terapeutické přístupy,

lišící se způsobem podání MSC (např. intravenózní, intratekální, intracerebrální a intraspinální), množstvím buněk a časem aplikace. Vzhledem k zjištění, že neuromuskulární denervace předchází nástupu klinických příznaků a smrti MN u ALS, se některé studie zaměřily na terapeutický efekt transplantovaných MSC ve svalech např. *quadriceps femoris* (Rando et al., 2018). Intramuskulární aplikace MSC zpomalila klinický průběh ALS, stabilizovala NMJ a prodloužila přežití díky schopnosti MSC sekretovat růstové faktory GDNF, NT4.

Na základě těchto příznivých výsledků z preklinických studií byly navrženy klinické studie ve fázi I/II (Karussis et al., 2011; H. Y. Kim et al., 2014; Prabhakar et al., 2012; Staff et al., 2016; Syková et al., 2017). Výsledky z klinických studií sice prokázaly, že léčba pomocí MSC je bezpečná a dobře tolerována pacienty, nicméně vedla pouze k mírnému zlepšení klinických projevů ALS pacientů. Z tohoto důvodu je třeba lépe objasnit přesné mechanismy, kterými jsou aplikované MSC prospěšné pro ALS pacienty a posílit tak jejich účinek vhodným podáním, či kombinací s jinými způsoby léčby.

2.3 Značení buněk pro *in vivo* aplikaci

Pro zajištění účinné a úspěšné léčby kmenovými buňkami je nezbytné vyhodnotit jejich biologické chování v *in vivo* podmínkách. Získané informace by mohly pomoci stanovit optimální počet transplantovaných buněk, identifikovat optimální způsob podání a definovat terapeutické okno, během kterého je transplantace terapeutických buněk klinicky úspěšná.

Existuje celá řada zobrazovacích metod, pomocí kterých můžeme sledovat osud transplantovaných buněk, např. pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní výpočetní tomografie (Single-Photon Emission Tomography, SPECT) a magnetická rezonance (MR). Zobrazení MR nabízí několik výhod oproti jiným metodám, např. umožňuje neinvazivní dlouhodobé a opakované monitorování buněk a poskytuje informace o podrobné anatomické struktuře. Jiné metody jako PET a SPECT neumožní dlouhodobé sledování a navíc ionizující záření nebo radionukleotidy mohou poškodit DNA a zvýšit tak riziko karcinogeneze, popřípadě způsobit smrt buněk (Nguyen et al., 2014).

Hlavní nevýhodou MR je jeho nízká citlivost, proto pro usnadnění monitorování transplantovaných buněk musí být před implantací označeny kontrastními látkami. Těmito látkami jsou například sloučeniny železa, sloučeniny gadolinia a perfluoruhlíku obsahující F^{19} (PFC) (Muja & Bulte, 2009). Tyto kontrastní látky jsou schopné změnit relaxační časy T1 nebo T2.

Tradiční klasifikace kontrastních látek je podle vlivu na konkrétní relaxační čas na T1 nebo T2 kontrastní látky. Nicméně toto dělení není přesné vzhledem k tomu, že T1 kontrastní látky mohou ovlivnit i T2 relaxační čas a naopak. Zkrácení relaxačního času T1 vede ke zvýšení intenzity signálu („pozitivní“ kontrast), zatímco zkrácení relaxačního času T2 vede ke snížení intenzity signálu („negativní“ kontrast). Většina kontrastních látek používaných v medicíně patří do T1 kategorie.

Přesnější klasifikace kontrastních látek nabízí spíše zařazení podle chování látek v magnetickém poli, např. paramagnetické kontrastní látky (obvykle obsahující gadolinium a mangan) a superparamagnetické (obvykle obsahující oxid železa). Běžným T2 kontrastním činidlem je superparamagnetický oxid železa (SPIO), jehož hlavní složkou může být magnetit (Fe_3O_4) nebo maghemit (Fe_2O_3) (Bulte & Kraitchman, 2004). Paramagnetická a superparamagnetická činidla umožňují pouze nepřímou detekci prostřednictvím MR. Pro kvantifikaci buněk je lepší použít zobrazování pomocí fluoru (F^{19}) (Holland et al., 1977). Vzhledem k nízkému množství v těle je jen velmi nízký signál pozadí (Partlow et al., 2007; Srinivas et al., 2007) a umožňuje detekovat přesnější lokalizaci buněk (Bulte, 2005).

Efektivita značení kontrastními látkami může být charakterizována hodnotami relaxivity r_1 (longitudiální) a r_2 (transverzální). Mezi nejoblíbenější kontrastní látky patří magnetické nanočástice oxidu železa, zejména díky jejich snadné syntéze, povrchové modifikaci a nízké toxicitě (Fatima & Kim, 2018). Magnetické nanočástice složené z oxidu železa jsou slibné, protože vykazují dobrou biokompatibilitu (Jain et al., 2008), silný magnetismus (Corchero & Villaverde, 2009) a užitečné zobrazovací vlastnosti (Rümenapp et al., 2012). Pro biokompatibilitu je nutná vhodná povrchová úprava, jinak může dojít k aglomeraci, ztrátě magnetizmu a toxickému účinku. Saito naznačuje, že pro optimalizaci kontrastu MR je kritičtější povrchový povlak než velikost částic (Saito et al., 2012). Pro povrchovou úpravu magnetických nanočástic může být použit dextran, PEG-COOH, 2,3-dimerkaptojantarová kyselina (DMSA), křemičitý obal, ligandy odvozené od dopaminu. Zvolení vhodné povrchové úpravy hraje zásadní roli pro zvýšení kontrastního účinku nanočástic ve tkáni.

Navzdory svým výhodám mohou použité částice železa vytvářet ROS. Produkce ROS může vést k oxidačnímu stresu a následné buněčné dysfunkci či smrti buněk (Fu et al., 2014; Manke et al., 2013). Při výběru vhodných kontrastních látek musí být zohledněny jak fyzikálně-chemické vlastnosti pro MR zobrazení tak i chování v biologickém prostředí zejména toxicita a biodistribuce.

3 Hypotézy a cíle práce

Souhrnným cílem této práce bylo studovat molekulární mechanismy zodpovědné za potenciální regenerační/neuroprotektivní účinek kmenových buněk u experimentálního modelu ALS.

Hypotéza 1: Předpokládáme, že opakovaná aplikace hMSC do míchy v kombinaci s opakovanou aplikací hMSC do svalu zvýší neuroprotektivní účinek těchto buněk u SOD1^{G93A} potkanů. Zesílení tohoto efektu by mohlo být způsobeno modifikací jednou ze tří signálních drah buněčné smrti v míše SOD1^{G93A} potkanů.

Hypotéza 2: Předpokládáme, že NP-iPS mohou integrovat do hostitelské tkáně ve větším měřítku než MSC, což by mohlo vést k zesílení regenerace přímým kontaktem a stabilizaci PNN chránících MN před toxickým ALS prostředím.

Hypotéza 3: Předpokládáme, že opravné mechanismy hrají důležitou roli v potenciální malignitě hESC. Detailnější pochopení, jak se hESC vyrovnávají s poškozením DNA, může přispět k jejich budoucímu bezpečnému využití v regenerativní medicíně.

Hypotéza 4: Magnetické nanočástice CZF a PLL- γ -Fe₂O₃ zvyšují citlivost detekce NP-iPS pomocí MR, nicméně mohou ovlivnit viabilitu NP-iPS a jejich diferenciační potenciál.

Cíle práce:

- 1) Vyhodnotit efekt kombinované opakované intratekální a intramuskulární aplikace MSC na mechanismy buněčné smrti (apoptóza, nekroptóza a autofágie) v míše SOD1^{G93A} potkanů.
- 2) Vyhodnotit efekt intraspinální aplikace NP-iPS na PNN v míše SOD1^{G93A} potkanů.
- 3) Odhalit jakým způsobem se časné pasáže hESC vyrovnávají s poškozením DNA.
- 4) Ověřit a porovnat cytotoxicitu magnetických nanočástic (PLL- γ -Fe₂O₃ a CZF) na *in vitro* kultuře NP-iPS a vyhodnotit jejich vliv na proliferační a diferenciační potenciál těchto buněk.

4 Materiál a metody

4.1 Typy použitých buněk

4.1.1 Lidské embryonální kmenové buňky (hESC)

V experimentech zabývajících se stabilitou genomu byly použity hESC linie CCTL12 (center for Cell Therapy Line 12) a linie CCTL14 (center for Cell Therapy Line 14), charakterizované v článku Adewumi et al., 2007 a byly kultivovány na mitoticky inaktivovaných myších embryonálních fibroblastech, jak bylo popsáno dříve (Dvorak et al., 2005) nebo podložní vrstvě tvořené bezbuněčnou matrix MatrigelTM (BD Biosciences). Ve stručnosti, pro kultivaci bylo použito médium obsahující: DMEM/F12, 15% FBS, 1% neesenciálních aminokyselin, 2mM L-glutamin, 0,1 mM β -merkaptoetanol, 4 ng/ml lidský rekombinantní fibroblastový růstový faktor (hrFGF) a penicilin/streptomycin a v případě kultivace na matrigelu bylo použito kondiciované medium z inaktivovaných myších fibroblastů (mEF). Buňky byly pasážovány každý 4-5 den. Jako model diferencovaných buněk byly použity lidské ušní fibroblasty (human ear fibroblasts; hEFs) linie BR1112203, získané z Národního centra tkání v Brně, do pasáže 10.

4.1.1.1 *Inhibitory a induktory použité pro analýzu opravných drah v hESC*

K indukci DNA poškození byly buňky vystaveny 3 nebo 10 Gy ¹³⁷Cs γ -ray IR (2Gy/min, použitím OLG-1; VF a.s.). Reakce na γ -záření byla sledována v čase 0 a po 2 hodinách. Je třeba poznamenat, že 0h odpovídá 15 minutám vzorku na ledu, kdy jsou buněčné procesy zpomaleny, ale ne zcela zastaveny. Pro analýzu opravných drah byly použity specifické inhibitory NHEJ jako Nu7026 (5 μ M, NU; Sigma-Aldrich) nebo Nu7441 (1 μ M, Selleckchem), aplikované 1 h před indukovaným poškozením (IR). Ke snížení exprese PARP1 byl použit olaparib (1 μ M, Selleckchem), aplikovaný 2 hodiny před indukovaným poškozením. K inhibici BER byl použit metoxyamin (3mM, MilliporeSigma), aplikovaný 1 h před indukovaným poškozením. Dále pro analýzu opravných drah byly buňky transfekovány siRNA pomocí X-tremeGene siRNA Transfection Reagent (Roche) ke snížení exprese Lig3 (50pmol, NM_00231; Sigma Aldrich a siRNA 121668; ThermoFisher Scientific), 53BP1 (50pmol, NM_005657; Sigma Aldrich), Lig4 (50 pmol; Sigma Aldrich) a PolQ (50 pmol, 122556; Sigma Aldrich). Úspěšné snížení exprese (24 a 48 h po transfekci) bylo potvrzeno pomocí imunocytochemické analýzy (ICC) a westernovým přenosem (WB).

4.1.2 NP-iPS

Lidské neurální prekuzory derivované z indukovaných pluripotentních buněk (NP-iPS) byly použity ve studii k vyhodnocení jejich terapeutického potenciálu v léčbě ALS a ve studii sledující toxicitu nanočástic na NP-iPS. NP-iPS byly připraveny v laboratoři Brigitte Onteniente v Paříži (Polentes et al., 2012). NP-iPS byly derivované z buněčné linie IMR90 (fetální plicní fibroblasty, ATCC, USA) a transdukovány pomocí lentivirového vektoru v kombinaci s lidskou cDNA OCT4, SOX2, NANOG a LIN28 (Yu et al., 2007). Selektce klonu a validace iPS linie a derivace neurálních prekuzorů byla dříve detailně popsána v článku Polentes et al. 2012. Ve stručnosti, rané neurální prekuzory byly produkovány v nízko adhezivním prostředí v přítomnosti Noggin (500ng/ml; R&D Systems), inhibitoru dráhy TGF- β SB 431542 (10 nM; Sigma), bFGF (10 μ g/ml; Pepro Tech) a BDNF (20 μ g/ml; Pepro Tech). NP-iPS byly kultivovány v kultivačních lahvích potažených poly-L-ornitinem (0,002% v destilované vodě) a lamininem (10 μ g/ml v DMEM:F12). Pro kultivaci bylo použito médium obsahující: DMEM:F12 a Neurobazální médium (1:1), B27 supplement (1:50), N2 supplement (1:100; GIBCO, Life Technologies), L-glutamin (2mM; Sigma), penicilin a streptomycin (50 U/ml; GIBCO), FGF (10 ng/ml; PeproTech), EGF (10 ng/ml; Peprotech) a BDNF (20ng/ml; PeproTech). Médium bylo měněno každý druhý den. NP-iPS byly před implantací do SOD1^{G93A} potkanů předdiferencovány. Předdiferenciace probíhala kultivací 7 dní ve stejném médiu, avšak bez přítomnosti FGF a EGF.

4.1.2.1 Diferenciace NP-iPS do dopaminergních neuronů

Diferenciace do dopaminergních neuronů (DA) byla provedena podle protokolu Cho, Hwang, and Kim 2008. Ve stručnosti, NP-iPS byly kultivovány v diferenciacním médiu obsahujícím DMEM:F12, B27 supplement (1:50), N2 supplement (1:100), neesenciální aminokyseliny (1%; Gibco, Life Technologies), L-glutamin (1mM; SigmaAldrich), 2-merkaptoetanol (0,1 mM) a primocin (100 μ g/ml). Čtvrtý kultivační den byl do diferenciacního média přidán SHH (200ng/ml; PeproTech) a FGF8 (100ng/ml; PeproTech) a osmý den byla přidána kyselina askorbová (200 μ M; Sigma-Aldrich) a kyselina retinová (5x10⁻⁵M, Sigma-Aldrich). Médium bylo měněno každý druhý den po dobu 14 dní.

4.1.2.2 Značení NP-iPS pomocí nanočástic na bázi oxidu železa

Ke značení NP-iPS byly použity dva typy nanočástic CZF a PLL- γ -Fe₂O₃. CZF nanočástice byly připraveny na Fyzikálním ústavě AVČR, Oddělení magnetik a supravodičů.

Jádro CZF nanočástic je tvořeno kobaltnato-zinečnatým feritem (Co, Zn, Fe) a obaleno oxidem křemičitým. Nanočástice PLL- γ -Fe₂O₃ byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie AVČR, Centrum Polymerních materiálů a technologií. Detailní postup přípravy nanočástic je možné najít v článcích (Novotna et al., 2016) a (Babic et al., 2008). K vyhodnocení potenciálu značení NP-iPS byly zvoleny tři odlišné koncentrace (5, 10 a 15 μ g Fe/ml v kultivačním médiu) nanočástic CZF nebo PLL- γ -Fe₂O₃. NP-iPS byly inkubovány s nanočásticemi po dobu 72 hodin. Po této inkubaci byly buňky promyty třikrát PBS k odstranění plovoucích nanočástic. Za účelem vyhodnocení množství označených NP-iPS, byly buňky fixovány vychlazeným metanolem po dobu 5 minut a inkubovány s 2% ferrokyanidem draselným a 6% kyselinou chlorovodíkovou po dobu 30 minut (barvení na berlínskou modř). Po inkubaci byly NP-iPS dobarveny jádrovou červení. NP-iPS byly snímány pomocí mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Německo) a počet označených buněk byl vyhodnocen pomocí programu ImageJ.

K vyhodnocení změn v buněčné viabilitě, morfolonii a růstu způsobené nanočásticemi na bázi oxidu železa byl použit přístroj xCELLigence RTCA (ACEA Bioscience, San Diego, USA). Bylo nasazeno 20 000 NP-iPS na destičku E 16 potaženou poly-L-ornitinem a lamininem. Růst buněk byl sledován v reálném čase přístrojem xCELLigence RTCA po dobu 72 hodin. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech a ve třech opakováních.

4.1.3 Lidské mesenchymální kmenové buňky

Lidské mesenchymální kmenové buňky (hMSC) byly použity ve studii k vyhodnocení jejich terapeutického potenciálu v léčbě ALS. hMSC byly kultivovány v 37°C, 5% CO₂ a médium bylo měněno dvakrát týdně. hMSC byly analyzovány pro povrchové markery pomocí průtokové cytometrie (FACS) (FACS Aria flow cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA), jak bylo popsáno dříve (Turnovcova et al., 2009) a použity na intratekální a intramuskulární aplikaci. Buňky byly pozitivní na CD105, CD73 a CD90 a zároveň negativní na CD45, CD34, CD14 a CD11b, CD79 α a HLA-DR (Human Leukocyte Antigens locus DR). Buňky byly kultivovány v médiu obsahujícím: alfa-Minimum Essential Medium (α -MEM) bez přítomnosti ribonukleotidů, deoxyribonukleotidů a UltraGlutaminu (Lonza, Švýcarsko) nahrazené 5% alogenním destičkovým lyzátem (Bioinova, Praha, Česká Republika) a 10 μ g/ml gentamycinu (Lek Pharmaceuticals, Slovinsko).

4.2 Zvířecí model ALS

Jako zvířecí familiární model ALS byly použity transgenní Sprague Dawley potkani, kteří exprimují lidský *SOD1* gen nesoucí Gly-93-Ala mutaci (G93A) (Taconic, USA) (SOD1). Všichni potkani, kteří byli použiti v experimentech ve studii s hMSC, byli behaviorálně testováni a náhodně rozděleni do pěti skupin: 1) SOD1 potkani opakovaně léčeni pomocí hMSC do míchy v kombinaci s aplikací do svalu (M+S; N=12); 2) SOD1 potkani opakovaně léčeni pomocí hMSC pouze do míchy (M, N=9); 3) SOD1 potkani opakovaně léčeni pomocí hMSC pouze do svalu (S, N=8); 4) SOD1 potkani s opakovanou aplikací fosfátového pufru (PBS) do míchy (kontrola) v kombinaci s aplikací do svalu (SOD1, N=12); 5) netransgenní potkani (WT, N=10).

Všichni potkani, kteří byli použiti v experimentech ve studii s NP-iPS, byli náhodně rozděleni do čtyř skupin: 1) SOD1 potkani léčeni pomocí NP-iPS, čas podání před nástupem prvních příznaků (asymptomatická fáze; asympt, N=9); 2) SOD1 potkani léčeni pomocí NP-iPS, čas podání s nástupem příznaků (symptomatická fáze; sympt, N=5); 3) SOD1 potkani s aplikací PBS (PBS; N=13); 4) netransgenní potkani (WT; N=7).

Tyto studie byly provedeny v souladu se směrnicemi Evropské rady z 22. září 2010 (2010/63/EU) a zároveň podle protokolů schválených Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny.

4.3 Posouzení progresu onemocnění

K vyhodnocení počátku onemocnění, průběhu a konečné fáze ALS onemocnění byla u zvířat sledována hmotnost, motorické funkce (použitím BBB testu, rotarodu) a síla úchopu (úchopový silový test (GrST)). Všechny behaviorální testy byly provedeny jednou týdně, zvířata začala být hodnocena ve věku 100 dní a testování pokračovalo do konečné fáze onemocnění. Konečná fáze onemocnění byla označena ve chvíli, kdy se potkan nebyl schopný postavit z boku na nohy během 30s nebo měl paralyzované 2 nebo více končetiny nebo ztratil 30% váhy, či vykazoval 75% snížení motorické aktivity a 75% snížení síly úchopu. Konečná fáze byla zaznamenána, když potkani nesplňovali 2 ze 3 kritérií.

4.3.1 BBB test

Ke kvantifikaci stupně paralýzy zadních končetin u SOD1 potkanů jsme použili Basso Beattie a Bresnahanovu hodnotící škálu (0-21) v otevřené aréně s drobnými modifikacemi pro

SOD1 potkany (Forostyak et al., 2014). Skóre od 0 do 21 jsou definovány: 21 indikuje zdravého potkana s koordinovanou chůzí, plným rozsahem pohybu kloubů, stabilitou trupu, paralelním umístěním tlapek. 0 indikuje fázi, kdy potkani nebyli schopni vstát z boku za 30 sekund.

4.3.2 Rotarod

Rovnováha, motorická koordinace, síla a fyzická kondice byly hodnoceny pomocí Rotorodu (Ugo Basile) (Obrázek 4). Zvířata byla trénovaná na rotarodu dva týdny před aplikací hMSC. Potkani byli postaveni na pomalu rotující válec s konstantní rychlostí 15 rpm. Zvířata běžela na rotujícím válci po dobu 180 sekund (5x 5 minut interval).



Obrázek 4: Ilustrativní foto Rotorad
(<http://www.teguhpharma.com.my/ugo-data.html>)

4.3.3 Test svalové síly

Grip strenght test (GrSt) je použit k vyhodnocení síly svalů končetin (Obrázek 5). Zvířeti bylo umožněno uchopit kovovou mřížku a pak je taženo dozadu ve vodorovné rovině. Uchopovací síla se zaznamenává na tenzometru (Grip Strenght Meter BSGT2S, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Síla úchopu potkaních zadních nohou byla měřena jednou týdně. Test svalové síly představuje doplňkový test k rotarodu.



Obrázek 5: Ilustrativní foto testu svalové síly
(<https://www.harvardapparatus.co.uk/g3-grip-strength-meter.html>)

4.3.4 Třiceti sekundový test

Třiceti sekundový test byl použit k dalšímu hodnocení a potvrzení konečné fáze onemocnění ALS. Zvíře bylo položeno na bok a byl měřen čas strávený v pozici na boku, než bylo zvíře schopné se znovu postavit na nohy. Jako konečná fáze onemocnění byla hodnocena neschopnost potkana postavit se zpět na nohy do 30 s.

4.4 Aplikace buněk

K prevenci možného imunitního odmítnutí aplikovaných buněk byla zvířata imunosuprimována pomocí kombinace Sandimmun (10mg/kg; Novartis Pharama AG, Švýcarsko), Immuran (4mg/ml; GlaxoSmithKline, USA) a Solu-Medrol (2mg/kg, Pfizer, Belgie). Imunosuprese byla experimentálními zvířaty podávána po celou dobu až do konečné fáze onemocnění ALS. Před samotnou aplikací buněk byli potkani uspáni pomocí anestetika Isofluran (3%, Forane, Abbott Laboratories, UK).

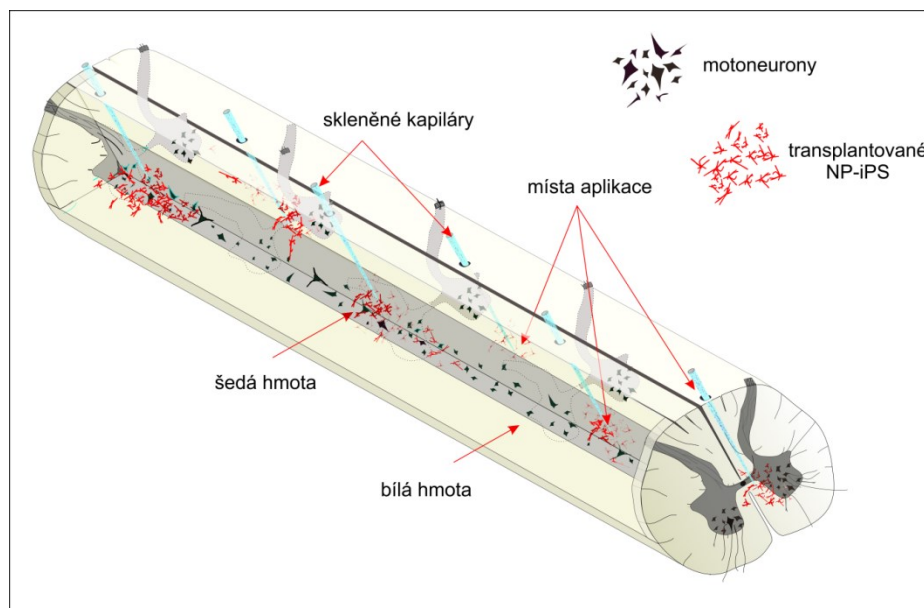
4.4.1 Intratekální a intramuskulární aplikace hMSC

První aplikace hMSC byla provedena s nástupem prvotních příznaků ALS (přibližně ve věku 18 týdnů). Další dvě aplikace hMSC byly provedeny po 14 dnech a 28 dnech od první aplikace. Buněčná suspenze (5×10^5 hMSC, maximální objem 50 μ l) byla aplikována do spinálního kanálu na úrovni obratle L3-L5. Pro aplikaci buněčné suspenze byla zvolena metoda lumbální punkce, která je široce využívána v klinické medicíně, je méně invazivní, a proto je vhodnou metodou pro opakovanou aplikaci. Pro ověření správného podání buněk do

spinálního kanálu bylo před aplikací odebráno malé množství potkaního mozkomíšního moku (CSF). Intratekální podání buněčné suspenze obecně netrvalo déle než 15-20 minut. Skupina potkanů s aplikací hMSC do svalu obdržela 3 injekce buněčné suspenze (2×10^5 hMSC, $3 \times 100 \mu\text{l}$ v jedné aplikaci) použitím Omnican 50 insulin syringe (B Braun, Melsungen AG OMG, Německo) do *quadriceps femoris* do obou zadních končetin. Po implantacích, byli potkani pozorováni několik dní pro ověření, jestli operace nezpůsobila motorické poškození, jako je paralýza nebo třes v zadních končetinách.

4.4.2 Intraspinální aplikace NP-iPS

NP-iPS byly aplikovány intraspínálně do tříměsíčních SOD1 potkanů (asymptomatická skupina) a do pětíměsíčních až šestíměsíčních SOD1 potkanů (symptomatická skupina). Buněčná suspenze v koncentraci 5×10^4 NP-iPS/ μl v PBS byla aplikována intraspínálně na úrovni Th10-11, jak bylo popsáno již dříve (Forostyak et al., 2011). Ve stručnosti, na úrovni Th10-11 obdrželi potkani 6 intraspínálních injekcí se suspenzí NP-iPS: 3 injekce byly na levé a tři na pravé straně vždy s minimálním odstupem 3 mm od sebe. Každá injekce obsahovala koncentraci 5×10^4 NP-iPS/ μl , celkově tedy potkan obdržel 3×10^5 NP-iPS. Buňky byly aplikovány do ventrálních rohů míchy pomocí stereotaktické aparatury podle následujících kritérií: hloubka injekce byla 3mm od dorzálního povrchu a 2 mm od středu na levou a pravou stranu. Injekce byly provedeny pomocí skleněné pipety o šířce $1 \mu\text{m}$ použitím Nano-Injektoru (Stoelting Co., Wood USA) (Obrázek 6). Jedna aplikace trvala 1 minutu. K zabránění úniku buněk z místa aplikace byla skleněná pipeta ponechána v místě vpichu další minutu. Kontrolní skupina potkanů obdržela za stejných podmínek místo buněčné suspenze PBS. Operace byla provedena v aseptických podmínkách pomocí OPMI-1 operačního mikroskopu (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo).



Obrázek 6: Schéma intraspinální aplikace NP-iPS

4.5 Analýza genové exprese

Celkové množství RNA bylo izolováno z lidských NP-iPS použitím RNase Plus Mini Kit (Kat. č. 74134) z QIAGEN GmbH (Hilden, Německo), podle doporučení v návodu. Na syntézu cDNA z RNA byl použit Transcriptor Universal cDNA Master (Kat. č. 05893151001; Roche). Pro detekci úrovně exprese lidských genů byly použity následující TagMan eseje: *NES* /Hs00707120/, *TUBB3* /Hs00801390/, *GFAP* /Hs00909233/, *TH* /Hs00165941/, *SYP* /Hs00300531/, *ENI* /Hs00154977/, *NR4A2* /Hs00428691/, *FOXA2* /Hs00232764/. Pro qPCR byla použita 96 jamková destička, do které bylo odebráno 20 μl reakční směsi obsahující 500 ng extrahované RNA. Úroveň exprese lidských genů byla normalizována k referenčnímu genu *GAPDH* /Hs99999905/. Data genové exprese v diferencovaných buňkách jsou normalizována k nediferencované kontrole NP-iPS. Data z genové exprese lidských genů v diferencovaných a nediferencovaných NP-iPS byla detekována pomocí StepOnePlus™ real-time PCR cycler a analyzována pomocí StepOnePlus™ Softweru (verze 2.3).

Celkové množství RNA bylo izolováno z lumbální části míchy použitím AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Kat. č. 80004) z QIAGEN GmbH (Hilden, Německo) podle doporučení v návodu. Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru (NanoPhotometer™ P-Class, Mnichov, Německo). Na syntézu cDNA z RNA byl použit Transcriptor Universal cDNA Master (Kat. č. 05893151001; Roche) nebo High Pure RNA Paraffin Kit (Kat.č. 03270289001; Roche), podle doporučení v návodu. Pro qPCR byla

použita 96 jamková destička, do které bylo odebráno 10 μ l reakční směsi obsahující 1 μ g RNA. Reakční směs byla složena z FastStar Universal Probe Master (Roche) a TagMan Gene Expression Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Amplifikace byla detekována pomocí StepOnePlusTM real-time PCR cycler. Pro detekci nekroptických genů byly použity následující TagMan eseje: *RipK1* /Rn01757369/, *RipK3* /Rn01481949/, *MLKL* /Rn01432489/, *casp8* /Rn00574069/ a pro detekci genů asociovaných s apoptózou: *casp-3* /Rn00563902/, *casp-9* /Rn00581212/, *Bax* /Rn02532082/, *Bcl-2* /Rn99999125/. Úroveň exprese nekroptických a apoptických genů byla normalizována k referenčnímu genu *GAPDH* /Rn01775763/.

Pro detekci PNN komponent byly použity následující TagMan eseje: *brevican* /Rn00563814/, *versican* /Rn01493755/, *agrecan* /Rn00573424/, *tenastin-R* /Rn00564869/, *neurocan* /Rn00581331/, *hapln 1* /Rn00569884/ a pro růstové faktory *ngf* /Rn01533872/, *igf-1* /Rn00710306/, *brnf* /Rn02531967/ a *ncam* /Rn00580526/ a s apoptózou spojené geny: *casp-3* /Rn00563802/, *casp-7* /Rn00573917/, *bcl-2* /Rn99999125/ a *bax* /Rn01480161/. Úroveň exprese genů asociovaných s PNN, geny růstových faktorů a geny spojené s apoptózou byly normalizovány ke dvěma referenčním genům *GAPDH* /Rn01775763/ a β -*aktin* /Rn00667896/. Data byla analyzována pomocí StepOnePlusTM Softwaru (verze 2.3). Každý vzorek cDNA byl vždy v duplikátu. Ke statistické analýze byl použit průměr dat $2^{-\Delta\Delta CT}$ duplikovaných vzorků pro každé experimentální zvíře.

4.6 Imunocytochemické barvení

NP-iPS byly fixovány 4% paraformaldehydem (PFA) v PBS po dobu 30 minut. Před imunocytochemickým značením (ICC) byly buňky promyty 3x PBS a permeabilizovány pomocí 0,3% roztokem Tween 20 po dobu 20 minut. K zabránění nespecifickému navázání protilátky byly buňky inkubovány ve směsi 10% ChemiBLOCKERTM a 0,1% Tween 20 po dobu 2 hodin (2170; Milipore) při pokojové teplotě. K zviditelnění primárních protilátek byly použity příslušné sekundární protilátky: Goat anti-rabbit IgG konjugována s Alexa-Fluor 488 (1:400; A-11029; Thermo Fisher Scientific). Jádra buněk byla zviditelněna fluorescenčním barvivem 4',6-diamidino-2-phenylindole, dichloride (DAPI, 1:1000, D1306, Life Technologies). Krycí sklíčka byla montována za použití Aqua-Poly Mount (18606-20; Polysciences Inc., Warrington, USA). NP-iPS byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 Duo (Carl Zeiss AG, Německo) a hESC byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem LSM700. Výsledky byly hodnoceny pomocí ImageJ.

ICC barvení hESC bylo popsáno v článku Krutá et al. 2013. Ve stručnosti, přibližně 1×10^5 hESC bylo nasazeno na destičky Ibidi (Ibidi, Mnichov, Německo). Buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin. hESC byly fixovány 4% PFA v PBS po dobu 20 minut. K zabránění nespecifickému navázání protilátky byly buňky inkubovány v 1% BSA (SigmaAldrich) a 0,1% Triton X-100 v PBS. K zviditelnění primárních protilátek byly použity příslušné sekundární protilátky: Donkey anti-goat nebo Goat anti-rabbit IgG konjugována s Alexa-Fluor 488 nebo s Alexa-Fluor 568 (Invitrogen). Buňky byly pozorovány buď konfokálním mikroskopem (Olympus FluoView 500) nebo invertovaným fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX71). Detailní přehled všech použitých primárních protilátek naleznete v tabulce 2.

4.7 Imunohistochemická analýza

Pro histologické zpracování tkáně je potřeba experimentální zvířata transkardiálně zperfundovat v hluboké narkóze vyvolané směsí ketaminu (Narketan 10%, 50mg/kg) a xylazinu (Rometar 2%, 6mg/kg). Transkardiální perfuze byla provedena 0,1 M PBS a následně vychlazeným 4% PFA. Pro histologickou analýzu studující efekt aplikace hMSC a NP-iPS na MN byly odebrány lumbální míšní segmenty (L1-L5) a pro sledování efektu aplikace hMSC ve svalu byl odebrán *quadriceps femoris*, zatímco pro histologickou analýzu studující efekt aplikace NP-iPS byly odebrány Th7-Th13 hrudní míšní segmenty, v místě implantace buněk.

Mícha z experimentálních potkanů a svaly *quadriceps femoris* byly postfixovány v PFA přes noc a poté mrazeny v sacharózovém gradientu (10-30% v 0,2 M PBS). Pro histologickou analýzu byly zmražené lumbální části míchy (L1-L6) a svaly rozřezány longitudinálně a transverzálně po 20 μ m na Leica CM1850 kryostatu (Leica Microsystems GmbH, Vídeň, Rakousko). Longitudinální řezy byly použity pro studium přežívání transplantovaných buněk v míše a svalech, nebo pro detekci přítomnosti NMJ. Pro detekci TUNEL pozitivních buněk a počítání MN ve ventrálních rozích míchy byly použity transverzální řezy o šířce 20 μ m. Zmražené řezy byly blokovány v 3% kozím séru, 3% BSA a v Tris pufru s 0,2% Triton-X100 (Sigma-Aldrich), poté inkubovány s příslušnou primární protilátkou přes noc následovanou inkubací s příslušnou sekundární protilátkou.

Celkové množství buněk bylo počítáno pomocí DAPI barvení a průměrný počet TUNEL pozitivních buněk byl kvantifikován pomocí TissueQuest 4.0.4.0154 (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko). Pro kvantifikaci intenzity fluorescence Chat protilátky

bylo nejprve kvantifikováno pozadí optické denzity z míšních řezu, které byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou. Tato denzita byla odečtena z Chat signálu a výsledky byly normalizovány k WT potkanům, použitím TissueQuest 4.0.4.0154 (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko). K vyhodnocení neuroprotektivního efektu NP-iPS byla kvantifikována intenzita fluorescence NeuN ve ventrálních rozích v lumbální a thorakální části míchy. Ve stručnosti, k této kvantifikaci byla použita primární protilátka NeuN a příslušná sekundární protilátka. Náhodně byly vybrány oblasti zájmu (ROI, $100 \mu\text{m}^2$) v blízkosti místa implantace buněk ve ventrálních rozích. Pozadí optické denzity bylo vypočítáno ze vzorků inkubovaných pouze s příslušnou sekundární protilátkou bez předchozího přidání primární protilátky. Detailní popis použitých primárních protilátek naleznete v tabulce 2.

4.8 Western blot

Způsob izolace proteinů z hESC a všechny kroky celé western analýzy jsou podrobně popsány v článku Krutá et al. 2013. V tomto článku byly použity následující sekundární protilátky Goat anti-rabbit IgG-horsedish peroxidáza (1:2500, 7074; Cell Signaling technology) a Goat anti-mouse IgG-horsedish peroxidáza (1:5000, PNIM0817; Backman Coulter, USA).

Pro vyhodnocení efektu transplantovaných buněk byly proteiny izolovány z míchy použitím AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu (kat.č. 80 004) od QIAGEN GmbH (Hilde, Německo) podle doporučení v návodu a proteiny ze svalu byly izolovány použitím RIPA lysis pufru (20mM Tris (pH 7,8), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 10% (w/v) glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol), který obsahoval proteázy (Thermo Scientific) a koktejl fosfatázových inhibitorů (Milipore). Koncentrace proteinů byla vyhodnocena použitím BCA eseje (Pierce). Vzorky s 30 μg proteinů z každé míchy byly separovány použitím 4-15% gradientu Mini-PROTEAN TGX Gely (Bio-Rad, kat.č. 456-1083) nebo 4-12% Nu-PAGE Bis-Tris gel. Proteiny ze svalů byly separovány pomocí 4-15% Mini-PROTEAN TGX Stain-FreeTM Protein gelů (Bio-Rad, kat.č. 456-8085). Po separaci byly proteiny přeneseny na PVDF membránu (Life Technologies) ve 4°C. Membrány byly blokovány 5% suchým mlékem (9999S, Cell Signaling Technology) a poté barveny primární a příslušnou sekundární protilátkou, zředěnou v blokovacím roztoku. Použité primární protilátky jsou uvedeny v tabulce 2. Proteinů z míchy a svalu byly zviditelněny použitím ClarifyTM Western ECL Substrate (170-5061, Bio-Rad). Chemiluminiscence na membráně byla detekována a zviditelněna pomocí Azur Biosystems c600. Relativní signál intenzity

jednotlivých proužků byl kvantifikován pomocí programu ImageJ a normalizován k myší monoklonální protilátce aktinu. Expres proteinů ze svalů byla normalizována k nebarveným proteinovým gelům použitím Image Lab™ Software 6.0.1.

Tabulka 2: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek

Primární protilátky				
Protein zájmu	katalogové číslo	imunizované zvíře	Ředění	Výrobce
53BP1	sc-22760	králík	1:250	Santa Cruz B.
Aggrecan	AB1031	králík	1:1000	Millipore
Bak	3814	králík	1:1000	CST
Bcl-2	2870	králík	1:1000	CST
Beclin	ab207612	králík	1.2000	Abcam
Brevican	ab111719	myš	1:100	Abcam
caspase 3	9665	králík	1:1000	CST
caspase 8	ab4052	králík	1:1000	Abcam
caspase 9	9508	myš	1:1000	CST
Connexin 43	ab11370	králík	1:8000	Abcam
Doublecortin	sc-8066	koza	1:500	Santa Cruz B.
GFAP	ab53554	koza	1:10 000	Abcam
GFAP	C-9205	myš	1:800	Sigma
Hu-Nu	MAB1281	myš	1:40	Millipore
Chat	AB144P	koza	1:1000 WB/1:100 IHC	Millipore
LC3B	ab192890	králík	1.2000	Abcam
Lig3	SAB2700263	králík	1:150	Sigma
Lig4	AV34122/HPA057325	králík	1:150	Sigma
MLKL antibody	sc-165025	koza	1:1000	Santa Cruz B.
MTC02	ab3298	myš	1:200	Abcam
NAR	ab10096	králík	1:1000	Abcam
Nestin	MAB5326	myš	1:100	Millipore
NeuN	MAB377	myš	1:100	Millipore
Neurocan	1F6	myš	1:100	DSHB
NF160	N-5264	myš	1:200	Sigma
p62	ab56416	myš	1:1000 WB/1:100 IHC	Abcam
Rad51	sc-8349	králík	1:500 WB/1:200 IHC	CST
RIP antibody	3493	králík	1:1000	CST
synaptophysin	ab32127	králík	1:1000 WB/1:100 IHC	Abcam
Tenascin-R		koza	1:1000	R&D Systém
Tyrosin hydroxyláza 3 (TH3)	ab137869	králík	1:1000	Millipore
Versican	12C5	myš	1:100	DSHB
α-bungarotoxin	B13423		1:500	Life technologies
α-tubulin	11-250-C100	myš	1:1000 (WB)	Exbio
β-actin	A2228	myš	1:10 000	Sigma

β -III-tubulin	T3952	myš	1:200	Millipore
γ H2AX	613402	myš	1:1000	BioLegend
Sekundární protilátky				
	Katalogové číslo		Ředění	Výrobce
anti -mouse (myš)	134560		1:15 000	Jackson ImmunoResearch
anti -rabbit (králík)	134658		1:20 000	Jackson ImmunoResearch
anti-goat (koza)	31402		1:20 000	Thermo Scientific

4.9 Analýza frekvence mutací (HPRT assay)

K vyhodnocení frekvence mutací byla použita HPRT mutační analýza (HPRT assay). Tato analýza využívá mutaci v HPRT genu (hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferáza), který je v jedné funkční kopii lokalizovaný na X chromozomu. Tento gen je zodpovědný za recyklaci hypoxantinu a guaninu, aby mohly být znovu využity pro syntézu nukleových kyselin. Prvních osm dní byly hESC kultivovány v médiu obsahující 2,5 μ g/ml 6-thioguaninu (6-TG, Sigma Aldrich) poté byla koncentrace zvýšena na 8 μ g/ml 6-TG. 6-TG je toxický analog guaninu, který je pro buňky s funkčním HPRT genem letální. Pokud nesou buňky mutaci v HPRT genu, toxický 6-TG nezpracují a přežijí. Frekvence mutací se stanovuje srovnáním počtu mutantních kolonií s počtem kolonií, které se vytvářejí přirozeně.

4.10 Pulzní gelová elektroforéza pro detekci DSB

Pulzní gelová elektroforéza (pulse field gel electrophoresis; PFGE) je elektroforetická metoda umožňující separaci molekul DNA o velikosti 15kbp až 10 Mbp. PFGE využívá periodických změn směru elektrického pole. Rychlost reorientace molekuly DNA při změně elektrického pole závisí na velikosti DNA molekuly. Ve studii zabývající se genomovou stabilitou hESC byla PFGE použita pro nepřímou kvantifikaci DSB a analýzu dynamiky oprav. PFGE byla nastavena pro akumulaci fragmentů DNA o velikosti 0,5-3 Mbp v úzkém pruhu, kdy akumulace fragmentů odpovídala množství DSB. PFGE byla provedena, jak již bylo dříve popsáno (Hanada et al., 2007; Toller et al., 2011), s následujícími modifikacemi. Buňky byly po dosažení 80% konfluency zpasážovány pomocí TrypLETM. Buněčná suspenze byla krátce inkubována se stejným objemem 2% LMP agarózy (nízko teplotně tající agaróza, Low Melting Temperature; Promega). Poté bylo 90 μ l vzorku s LMP agarózou odebráno do tvořítka na bločky (Bio-Rad) a ponecháno ztuhnout 10-15 minut v 4°C. Ztuhlé bločky byly

vloženy do lyzačního pufru (100nM EDTA pH8; 0,2 % sodium deoxycholát; 1% sodium laurylsarkosine; 2mg/ml proteinázy K) a inkubovány v 37°C po dobu 36-72 hodin. Bločky byly 3x promyty v 10 ml promývacího pufru (20mM Tris-HCl; 50 mM EDTA, pH8). Agarózové bločky byly vloženy na hřebínek a zality 0,9% agarózou pro PFGE. Elektroforéza probíhala 21h na 14°C v přístroji CHEF Mapper® XA (Bio-Rad). Gel byl inkubován v etidium bromidu (EtBr) a proužky byly zviditelněny pomocí systému MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems). Intenzita proužku obsahující nedotčenou a poškozenou DNA byla analyzována v programu ImageJ.

4.11 Hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Před samotným měřením vzorků pomocí analytické metody ICP-MS bylo nutné provést mineralizační rozklad jednotlivých vzorků. Tento rozklad v mikrovlnném mineralizátoru (Uniclever BMI-Z, Plazmatronika, Polsko) probíhal v teflonových nádobách za použití směsi 1 ml kyseliny fosforečné a 3 ml kyseliny dusičné. Vzniklý mineralizát byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrných baněk a před analýzou 10x zředěn. V rozložených vzorcích byly měřeny izotopy ^{59}Co , ^{57}Fe a ^{66}Zn pro stanovení množství kobaltu, železa a zinku. Kalibrační roztoky uvedených prvků a vnitřního standardu (Rh; rhodium) byly připraveny postupným ředěním roztoků o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Německo) v 2% HNO_3 (Suprapur; Merck). Roztoky byly ředěny výhradně Milli-Q vodou (Millipore, USA). Měření vzorků bylo provedeno na spektrometru Perkin Elmer Sciex Elan DRC-e (Concord, Kanada), který je vybaven jak cyklonickou mlžnou komorou a reakční/kolizní celou k potlačení spektrálních interferencí tak peristaltickým čerpadlem Gilson 212.

4.12 Elektronový mikroskop

Lokalizace nanočástic byla v nediferencovaných a diferencovaných NP-iPS sledována pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Nediferencované buňky byly inkubovány s nanočásticemi v koncentraci 15 $\mu\text{g Fe/ml}$ po dobu 72 hodin. NP-iPS byly fixovány 2,5% glutaraldehydem (ředěný v 0,1M Sorensově pufru) v 4°C po dobu 72 hodin a obarveny 1% osmium tetraoxidem, ředěným pomocí 0,1 M Sorensova pufru. Odvodnění buněk probíhalo v sérii vodných roztoků etanolu (zvyšující se koncentrace etanolu). Poté byly vzorky prosyceny ve směsi propylenoxidu a ED (Epon 812) za použití želatinových kapslí.

Polymerizace probíhala v termostatu při teplotě 60°C po dobu 72 hodin. Krycí sklíčko bylo odstraněno tekutým dusíkem. Ultratenké řezy 60 nm pro TEM byly pozorovány mikroskopem Philips Morgagni 268D (FEI Inc., Hillsboro, USA).

4.13 Zobrazení pomocí MR

Efekt nanočástic na kontrast obrazu lze odhadnout z relaxivity značených buněk. Hodnotili jsme označené NP-iPS a suspenzi nanočástic samotných bez buněk v 4% želatinovém fantomu. T_2 relaxační čas byl měřen Bruker Minispec MQ20 relaxometrem (Bruker, Německo; 30MHz, 21°C) pomocí CPMG sekvence s těmito parametry: 5s zpoždění recyklace, mezipulzní zpoždění 1ms, 8 skenů a 3000 bodů pro montáž. Relaxivita r_2 byla vypočítána jako intenzivní relaxační čas T_2 po odečtení podílu gelu a neznačených buněk a ve vztahu ke koncentraci buněk měřeného vzorku. Snímky T_2 váženého obrazu ze 4% želatinového fantomu s homogenně distribuovanými buňkami byl získán 4,7 T Bruker Biospec skenerem s použitím komerční rezonátorové cívky (Bruker, Biospin, Německo). Standardní dvojdimenzní akvizice s vylepšením relaxace multispin echo sekvence byla použita s následujícími parametry: doba opakování: 3000 ms, echo time= 14ms, prostorová resoluce =137x137 μm^2 , tloušťka řezu=0,5 mm, počet sejmutí=1 a čas snímání=9min 36s.

4.14 Statistická analýza

Studentský nepárový test a/nebo jednocestná ANOVA Newman-Keuls post hoc test pro více skupinové srovnání byly použity ke stanovení signifikantních rozdílů mezi experimentálními skupinami. Všechna data jsou prezentována jako průměr \pm standardní odchylka (SEM). Statisticky signifikantní rozdíly jsou označeny jako * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 Výsledky

Tato výsledková část práce vychází z následujících publikací:

Řehořová M., Vargová I., Forostyak S., Vacková I., Turnovcová K., Kupcová Skalníková H., Vodičková P., Kubínová Š., Syková E., Jendelová P: *A Combination of Intrathecal and Intramuscular Application of Human Mesenchymal Stem Cells Partly Reduces the Activation of Necroptosis in the Spinal Cord of SOD1^{G93A} Rats*. Stem Cells Translation Med. 2019 Jun;8(6):535-547.

Forostyak S., Forostyak O., Kwok C. F. J., Romanyuk N., Řehořová M., Dayanithi G., Raha-Chowdhury R., Jendelova P., Fawcett W. J. Sykova E: *Neural precursors derived from induced pluripotent cells preserve perineuronal nets and stimulate neural plasticity in ALS rats* (manuskript v recenzním řízení Stem Cells)

5.1 Behaviorální analýza progresu onemocnění ALS u potkanů po aplikaci buněk

Průběh progresu onemocnění ALS u potkanů byl hodnocen sledováním motorické aktivity použitím různých behaviorálních testů jako je BBB, rotarod a test svalové síly (GrSt) (Obrázek 7 a 9). Sledování probíhalo každý týden vždy ve stejnou denní dobu.

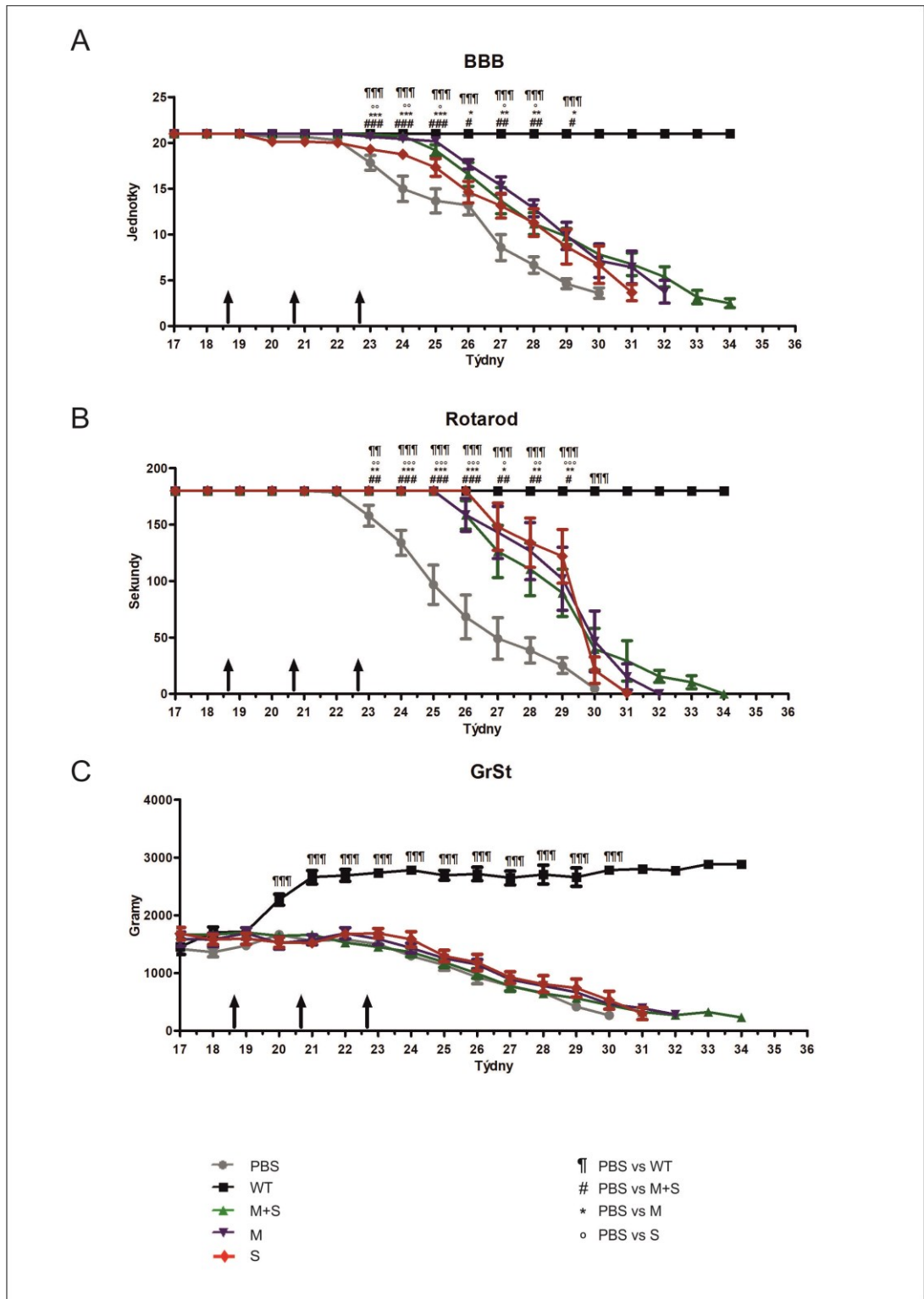
5.1.1 Aplikace hMSC

První aplikaci hMSC obdrželi SOD1 potkani ve věku osmnácti týdnů lumbální punkcí buďto pouze do míchy (M), nebo injekčním podáním pouze do svalu *quadriceps femoris* (S) nebo kombinaci těchto dvou způsobů aplikace (M+S). Druhá a třetí aplikace hMSC byla podána o 14 a 28 dní později.

Zjistili jsme, že samotné opakované intratekální podání hMSC a nebo v kombinaci s podáním do svalu významně zlepšilo motorické a lokomoční schopnosti potkanů. Zaznamenali jsme významné zlepšení v BBB skóre u potkanů s kombinovaným podáním hMSC (M+S) a dokonce i u skupiny potkanů s aplikací buněk pouze do M v porovnání s kontrolní skupinou SOD1 potkanů (PBS) (Obrázek 7 A). Zlepšení se projevilo během 23-29

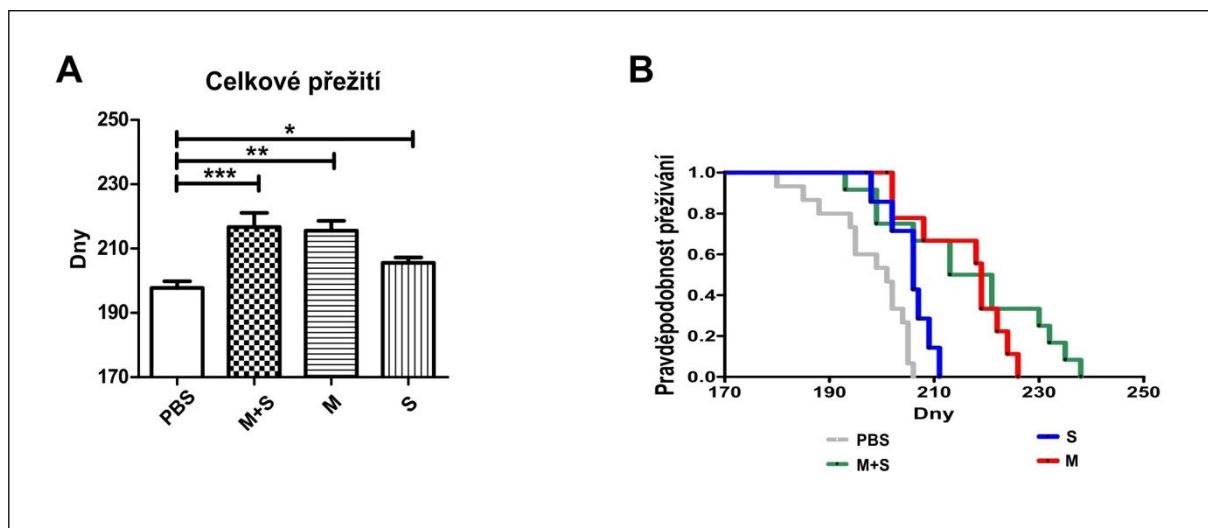
týdne. Je zajímavé, že rychlost progresu onemocnění byla zpomalena i u opakovaného podání hMSC pouze do S a to ve 23-25 týdnu a 27-28 týdnu.

K hodnocení motorické koordinace a rovnováhy, díky které je potkan schopen se udržet na rotujícím válci, byl použit rotarod. V tomto testu bylo ve všech léčených skupinách (M, S, M+S) prokázáno signifikantní zlepšení během 23-29 týdne v porovnání s kontrolní SOD1 skupinou potkanů (Obrázek 7 B). Motorická aktivita potkanů po kombinované aplikaci hMSC do M+S a dokonce i po aplikaci hMSC pouze do M byla podobná WT skupině do 25. týdne, zatímco aplikace pouze do S způsobila, že se motorická koordinace hodnocena pomocí rotarodu začala zhoršovat až 27. týden. Naproti tomu u kontrolní SOD1 skupiny docházelo k zhoršení motorické koordinace a tedy pádu z rotujícího válce už ve 23. týdnu. U žádné léčené skupiny nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve změně tělesné hmotnosti a testu svalové síly (GrSt) (Obrázek 7 C).



Obrázek 7: Kombinace intratekální a intramuskulární aplikace hMSC zpomaluje progresi onemocnění SOD1 potkanů. Motorická aktivita byla hodnocena pomocí (A) BBB, (B) rotarod a (C) GrSt. SOD1 potkani, kteří byli léčeni pomocí opakované aplikace hMSC do míchy v kombinaci s aplikací do svalu (M+S), ale také pouze opakovanou aplikací hMSC do míchy (M) a nebo pouze do svalu- *quadriceps femoris* (S), prokázali signifikantní zlepšení v BBB a rotarodu v porovnání se SOD1skupinou. (C) GrSt neodhalil žádnou signifikantní změnu mezi testovanými skupinami. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Statistické signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (v porovnání s PBS kontrolní skupinou).

Doba přežití SOD1 potkanů byla prodloužena jak opakovaným intratekálním podáním hMSC (M; 216 dní \pm 8 dní), tak opakovaným intramuskulárním podáním (S; 206 dní \pm 6 dní) v porovnání s kontrolní skupinou (PBS; 202 dní \pm 11 dní) (Obrázek 8 A, B). Po opakované aplikaci hMSC do M+S SOD1 potkani dosáhli nejen nejlepších výsledků v lokomočních a motorických testech, tak v porovnání s dalšími skupinami přežívali nejdéle (M+S; průměr 217 dní \pm 4 dny).



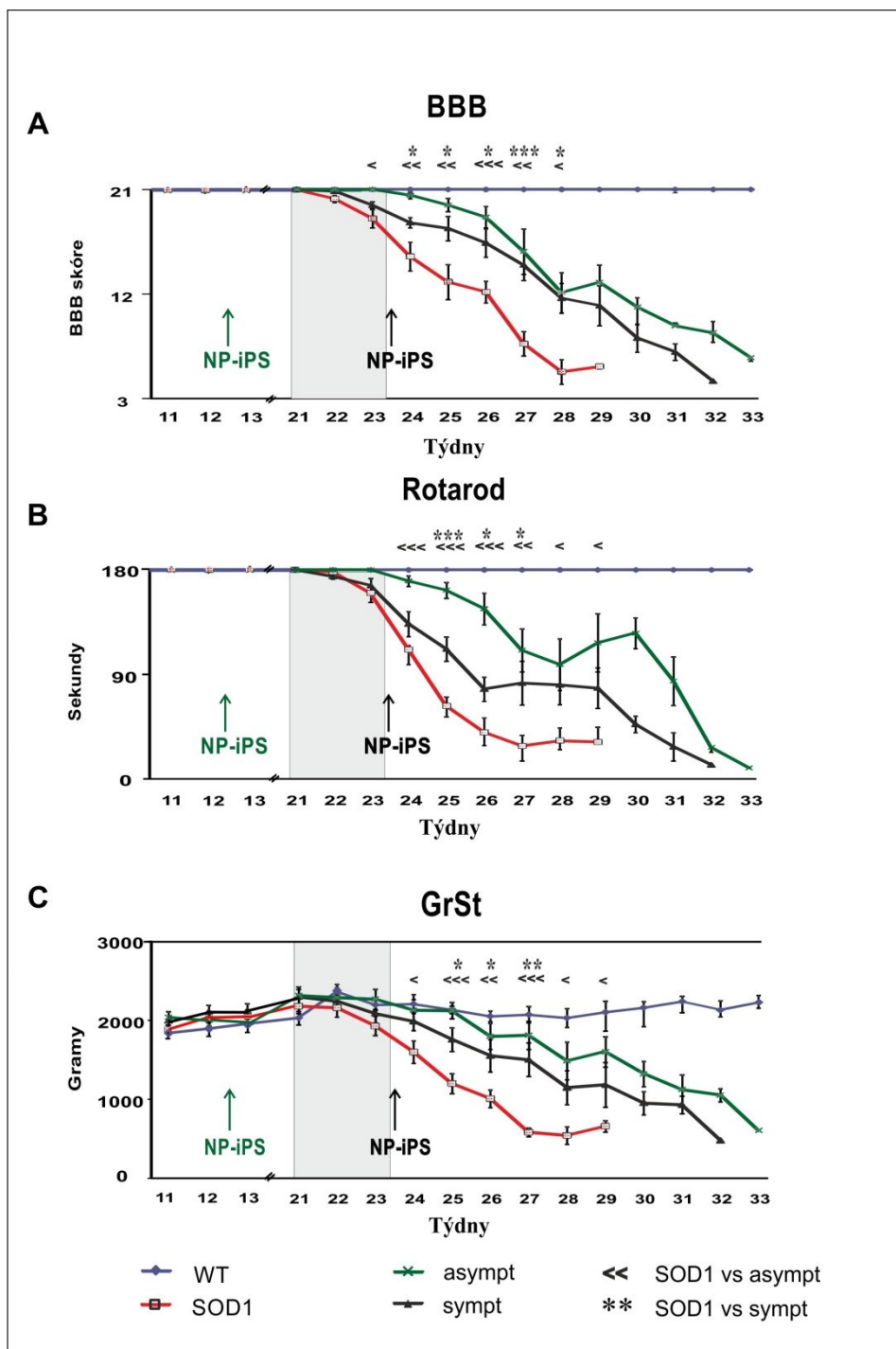
Obrázek 8: Kombinace intratekální a intramuskulární aplikace hMSC prodlužuje dobu přežívání SOD1 potkanů. (A) Doba přežití byla signifikantně prodloužena ve všech léčených skupinách (M, S, M+S) v porovnání s neléčenou kontrolou (PBS). (B) Kaplan Meierova analýza přežití. Statistické signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.1.2 Aplikace NP-iPS

NP-iPS byly aplikovány SOD1 tříměsíčním potkanům, neprojevujícím žádné známky onemocnění (asymptomatická skupina; asympt) a pěti-šestiměsíčním potkanům s prvotními příznaky onemocnění ALS (symptomatická skupina; sympt).

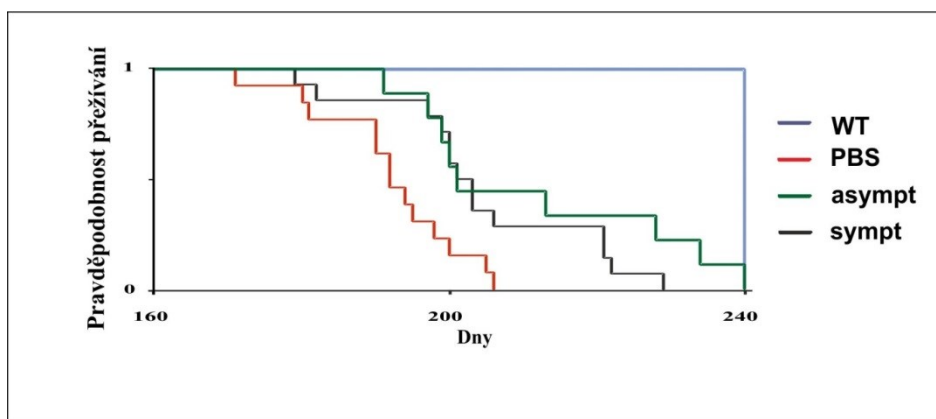
Zjistili jsme, že intraspinální aplikace NP-iPS významně zlepšila motorické a lokomoční schopnosti potkanů v porovnání s kontrolní skupinou (PBS) (Obrázek 9). Zaznamenali jsme významné zlepšení v BBB skóre u potkanů, kteří obdrželi aplikaci buněk s nástupem prvotních příznaků onemocnění ve 24.-28. týdnu (Obrázek 9 A). Zatímco u skupiny potkanů, kteří obdrželi NP-iPS před nástupem onemocnění bylo pozorováno zlepšení v BBB skóre už od 23.-28. týdne v porovnání s PBS skupinou.

Rotarod test a GrSt ukázaly zlepšení u symptomatické skupiny potkanů ve 25.-27. týdnu, zatímco u asymptomatické skupiny potkanů bylo zaznamenáno zlepšení už od 24.-29. týdne v porovnání s SOD1 skupinou (PBS) (Obrázek 9 B, C).



Obrázek 9: Intraspinalní aplikace NP-iPS zpomaluje progresi onemocnění ALS. Motorická aktivita byla hodnocena pomocí (A) BBB testu, (B) rotarodu a (C) testu svalové síly (GrSt). Aplikace NP-iPS zlepšila motorické schopnosti SOD1 potkanů. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ve všech léčených skupinách aplikace NP-iPS prodloužila dobu přežití v porovnání s potkany léčenými pouze PBS (Obrázek 10). Doba přežití SOD1 potkanů byla prodloužena o 35 dní u asymptomatické skupiny potkanů a o 19 dní u symptomatické skupiny v porovnání s kontrolní SOD1 skupinou (PBS). Tyto výsledky naznačují, že míšní podání NP-iPS zpomaluje progresi onemocnění a prodlouží dobu přežití SOD1 potkanům.



Obrázek 10: Kaplan-Meierova analýza přežití.

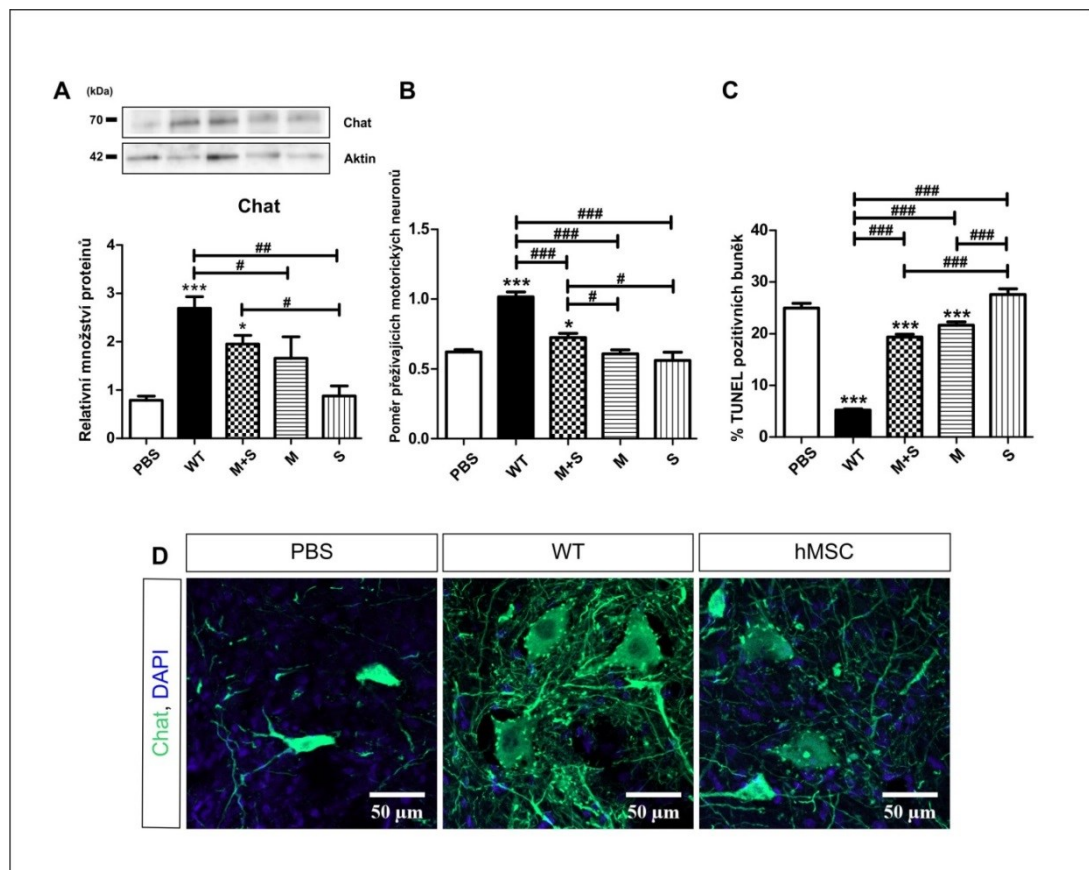
5.2 Neuroprotektivní efekt buněk

Vzhledem k tomu, že ALS je neurodegenerativní onemocnění charakteristické progresivní ztrátou MN, sledovali jsme efekt aplikovaných buněk na počet MN ve ventrálních rozích míchy SOD1 transgenních potkanů.

5.2.1 Mesenchymální kmenové buňky

Přežití MN jsme hodnotili kvantifikací hladiny cholin acetyl transferázy (Chat), která se považuje za specifický marker MN. Hodnocení bylo provedeno pomocí western blotu (WB) a barvením transversálních lumbálních řezů míchy touto protilátkou (Obrázek 11 A, B, D). Hladina Chat a stejně tak počet MN odráží výrazné ztráty MN ve ventrálních rozích v lumbální části míchy u SOD1 potkanů ve srovnání s WT skupinou. Nicméně, ztráta MN byla významně snížena po kombinované aplikaci hMSC (M+S). Samotné aplikace hMSC (pouze do M nebo pouze do S) nebyly dostačující pro záchranu MN v lumbální části ventrálních rohů míchy. Pro detekci fragmentované DNA ve ventrálních rozích míchy jsme použili metodu TUNEL (terminal deoxynukleotidy transferase dUTP nick end labeling) využívající fluorescenčně značené nukleotidy dUTP, které jsou pomocí enzymu terminální

deoxynukleotidyltrasferasy inkorporovány na 3' konce DNA zlomů (Obrázek 11 C). V souladu s výsledky barvení pomocí Chat protilátky a WB, WT skupina potkanů měla signifikantně snížený počet TUNEL-positivních buněk ve ventrálních rozích v porovnání se SOD1 skupinou. Snížení počtu TUNEL-positivních buněk bylo pozorováno nejen po kombinované aplikaci hMSC do M+S, ale i po samotné aplikaci hMSC do M. Zatímco po aplikaci hMSC pouze do S nebyly pozorovány rozdíly v počtu TUNEL pozitivních buněk v porovnání se SOD1 skupinou (PBS).

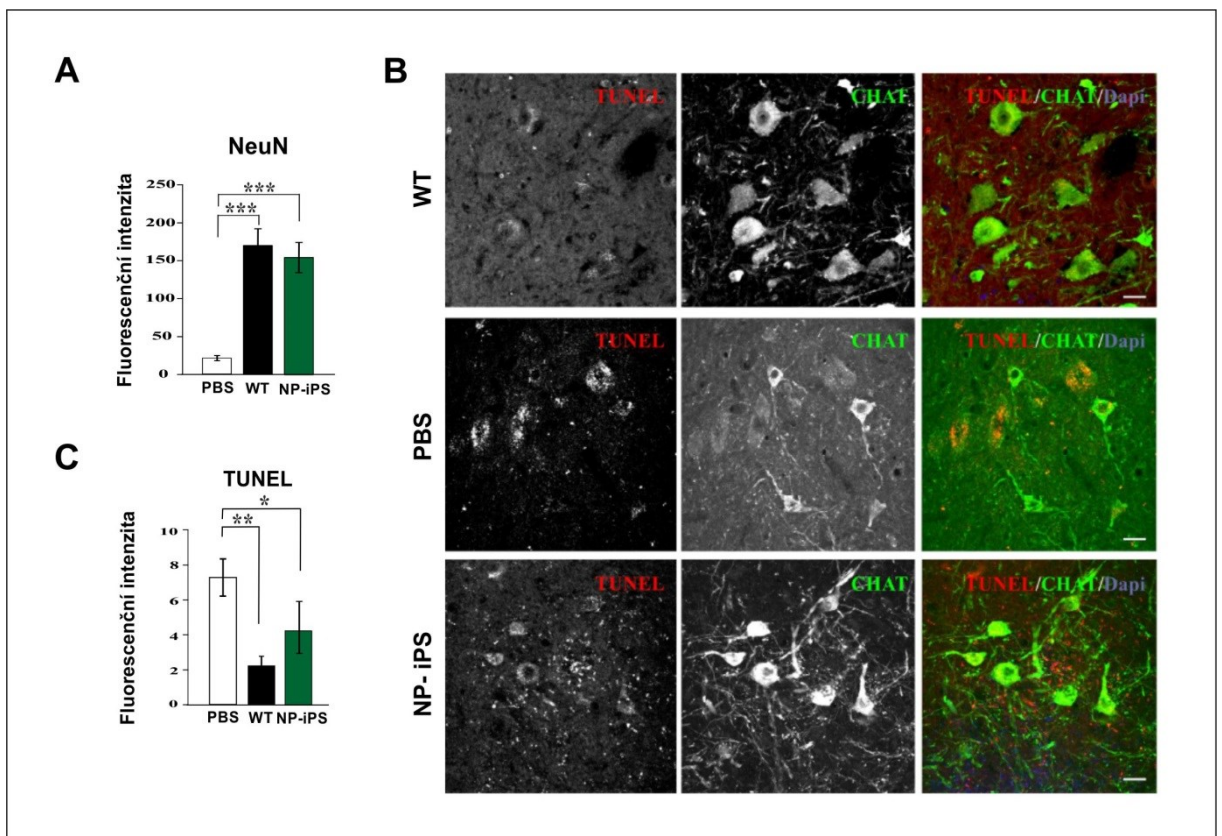


Obrázek 11: (A) Kvantitativní western blotová analýza detekovala signifikantní snížení exprese Chat proteinů v míše SOD1 potkanů, která byla signifikantně zvýšena po aplikaci hMSC do M+S. (B) Imunohistochemická analýza počtu Chat pozitivních MN ve ventrálních rozích míchy. Aplikace hMSC do M+S signifikantně zvýšila počet Chat pozitivních MN. (C) Aplikace hMSC do M+S, ale i aplikace hMSC pouze do M snížila množství TUNEL pozitivních buněk ve ventrálních rozích míchy SOD1 potkanů. (D) Reprezentativní snímky ukazují zvýšené množství neuronů pozitivních na Chat signál (zelená) ve ventrálních rozích míchy SOD1 potkanů po aplikaci hMSC do M+S. Buněčná jádra byla zviditelněna pomocí DAPI (modrá). Data jsou prezentována jako průměr ±SEM. Statistické signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (v porovnání s PBS kontrolní skupinou).

5.2.2 NP-iPS

Neuroprotektivní efekt aplikace NP-iPS byl hodnocen pomocí IHC analýzy neurálního markeru NeuN ve ventrálních rozích míchy SOD1 potkanů. Srovnání fluorescenční intenzity

NeuN ukázalo významné snížení signálu v kontrolní SOD1 skupině (PBS) v porovnání s WT skupinou (Obrázek 12 A). Intraspinální aplikace NP-iPS významně zvýšila fluorescenční signál NeuN, dokonce na srovnatelnou úroveň s WT skupinou. V souladu s těmito výsledky bylo pozorováno významné snížení TUNEL-pozitivních buněk po aplikaci NP-iPS ve ventrálních rozích míchy (Obrázek 12 B, C). Tyto výsledky naznačují, že aplikace NP-iPS podporuje přežití MN ve ventrálních rozích míchy.

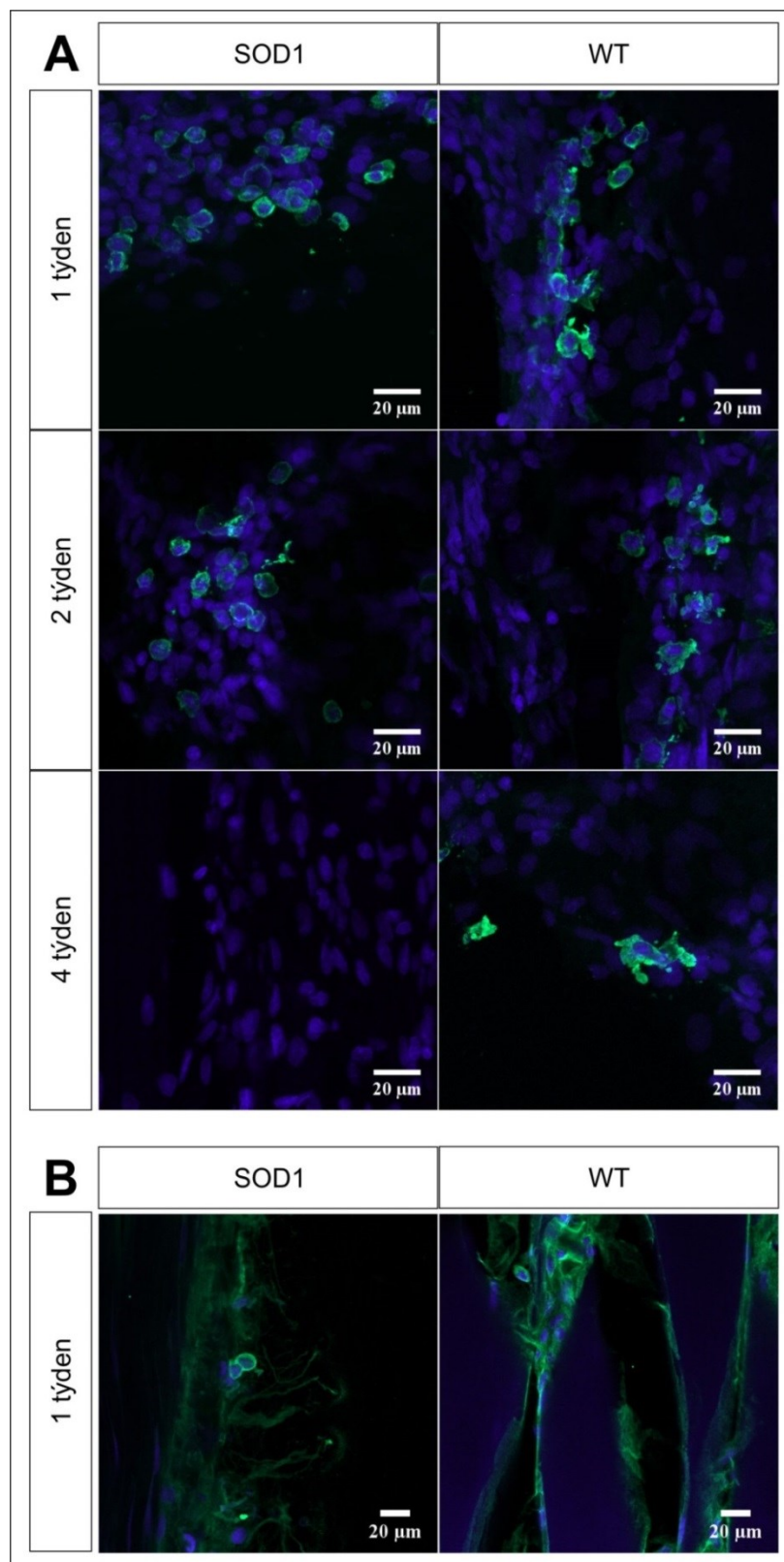


Obrázek 12: Neuroprotektivní efekt aplikace NP-iPS v míše SOD1 potkanů. (A) Signifikantně vyšší signál NeuN byl pozorován ve ventrálních rozích míchy SOD1 potkanů po aplikaci NP-iPS. (B) Reprezentativní snímky TUNEL (červená) a Chat (zelená) pozitivních buněk ve ventrálních rozích míchy. Buněčná jádra byla zviditelněna pomocí DAPI (modrá). Měřítka: 20 μ m. (C) Signifikantní snížení TUNEL pozitivních buněk bylo pozorováno po aplikaci NP-iPS. Statistické signifikance * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

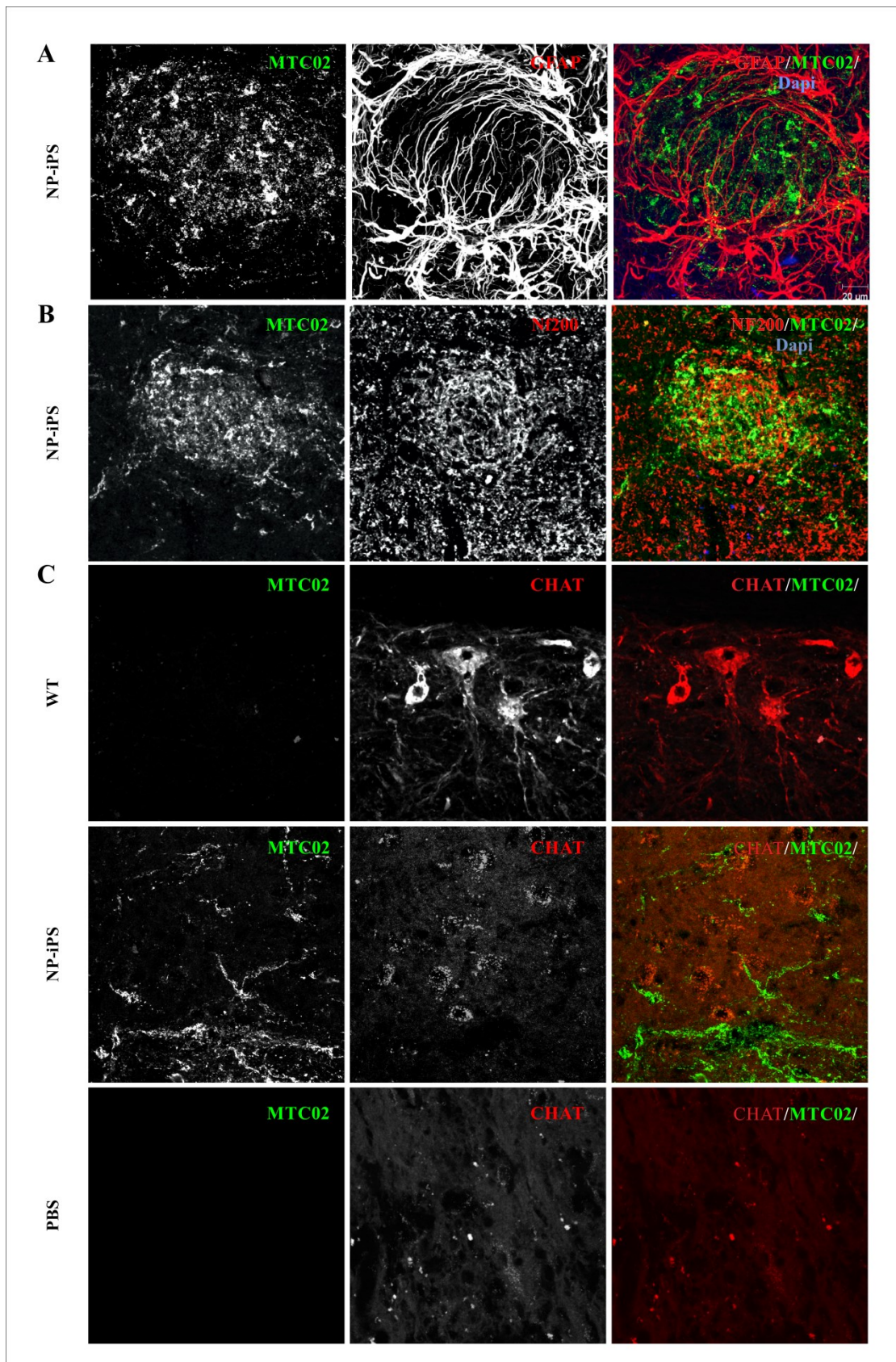
5.2.3 Osud transplantovaných buněk

Přežívání implantovaných buněk bylo ověřeno pomocí barvení longitudinálních řezů míchy na specifický jaderný marker (HuNu) nebo pomocí lidského mitochondriálního markeru (MTCO2). Přežívání intratekálně a intramuskulárně implantovaných hMSC bylo sledováno v prvním, druhém a čtvrtém týdnu po aplikaci (Obrázek 13 A, B). hMSC byly aplikovány jak do SOD1 potkanů, tak kontrolních zdravých potkanů (WT). hMSC byly nalezeny po 7 a 14 dnech, nicméně po 4 týdnech od poslední aplikace už jsme žádné buňky v SOD1 potkanech nenalezli (Obrázek 13 A). Na druhou stranu u WT potkanů hMSC po 4 týdnech přežívaly. Transplantované hMSC byly převážně detekovány v záhybech arachnoidé v cauda equina. Zatímco intramuskulárně aplikované hMSC ve svalech přežívaly pouze 7 dní jak u SOD1 skupiny, tak i u WT skupiny (Obrázek 13 B). Buňky byly nalezeny mezi svalovými vlákny v *quadriceps femoris*.

Přežívání NP-iPS bylo hodnoceno pouze v terminální fázi SOD1 potkanů, což znamená po 2 měsících po implantaci NP-iPS u symptomatické skupiny a po 4 měsících po implantaci NP-iPS u asymptomatické skupiny (Obrázek 14). Intraspinálně aplikované NP-iPS byly detekovány jako MTCO2 pozitivní buňky u symptomatické skupiny, což znamená, že dokázaly v SOD1 míše přežít déle než 2 měsíce, nicméně u asymptomatické skupiny už žádné buňky po 4 měsících od aplikace detekovány nebyly (Obrázek 14 A, B, C). Implantované NP-iPS byly nalezeny nejen v místech aplikace, ale částečně migrovaly v míše SOD1. Většina transplantovaných buněk byla pozitivní na astrocytární GFAP marker (Obrázek 14 A), přičemž některé z nich byly pozitivní na neurální marker β -III-tubulin a NF200 (Obrázek 14 B). Na druhou stranu, žádná z transplantovaných buněk nebyla pozitivní na Chat, což naznačuje, že implantované NP-iPS v SOD1 prostředí nediferencují do MN (Obrázek 14 C). Naše výsledky naznačují, že NP-iPS diferencují převážně do gliálních typů buněk a v menší míře do neurálních typů buněk, nicméně ne přímo do MN.



Obrázek 13: Přežívání hMSC v míše a *quadriceps femoris*. Protilátka HuNu (zelená) byla použita pro detekci přežívajících buněk v (A) míše a (B) *quadriceps femoris*. Jádra buněk byla zviditelněna pomocí DAPI (modrá). (A) HuNu pozitivní buňky byly nalezeny po 1 týdnu, 2 a 4 týdnech od poslední aplikace v míše zdravých kontrol (WT), zatímco v míše SOD1 potkanů přežily buňky pouze 2 týdny. (B) Transplantované hMSC přežily v *quadriceps femoris* pouze 1 týden jak ve WT tak SOD1 potkanech.



Obrázek 14: Přežívání a diferenciace NP-iPS v míše SOD1 potkanů. Intraspinálně aplikované NP-iPS (MTC02, zelená) byly pozitivní na (A) astrocytový marker GFAP (červená) a některé z transplantovaných buněk na (B) NF200 (červená), nicméně nebyly detekovány (C) Chat pozitivní buňky (červená). Buněčná jádra byla vizualizována pomocí DAPI nebo Draq5 barvení. Měřítka: 20µm.

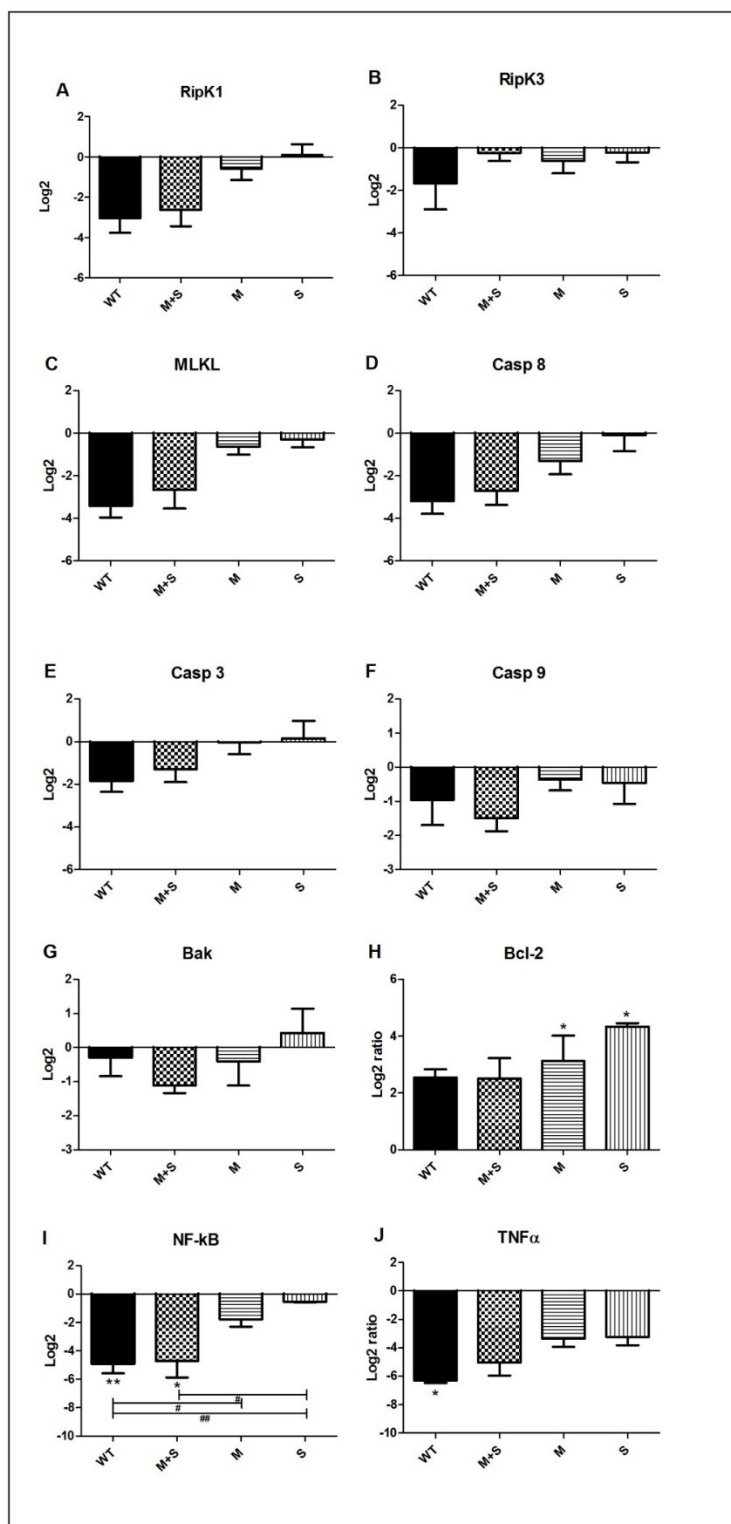
5.3 Analýza expresního profilu vybraných genů

Sledovali jsme vliv implantovaných hMSC na expresní profil apoptických, nekroptických a autofágických genů a vliv transplantovaných NP-iPS na expresní profil perineurálních, apoptických a neurotrofických genů. Všechny analýzy byly hodnoceny v lumbální části míchy v terminální fázi onemocnění.

5.3.1 Mesenchymální kmenové buňky

Zejména po kombinované aplikaci hMSC (M+S) byl pozorován silný trend snížení exprese v nekroptických genech konkrétně v *RipK1*, *MLKL* a *casp-8* (Obrázek 15 A, C, D). Dokonce jejich hladina exprese byla podobná expresi naměřené ve WT skupině potkanů. Zatímco aplikace hMSC pouze do M a aplikace buněk pouze do S nevyvolala žádné významné změny v genové expresi *RipK1*, *MLKL* a *casp-8*. Na druhou stranu, exprese *RipK3* zůstala nezměněna ve všech léčených skupinách (Obrázek 15 B). Dokonce i ve WT skupině potkanů nebylo detekováno významné snížení exprese v tomto genu. Současně jsme sledovali změny hladiny exprese genů zapojených do apoptózy. Pozorovali jsme trend snížení hladiny RNA *casp-3*, *casp-9* a *Bak* v míše po kombinované aplikaci hMSC (M+S) (Obrázek E, F, G). Naopak exprese *Bcl-2* genu byla zvýšena ve všech léčených skupinách, zejména v M+S, ve srovnání s PBS skupinou (Obrázek 15 H).

Navíc jsme analyzovali expresi *NF-κB* a *TNF-α*, protože tyto geny jsou jedny z nejdůležitějších faktorů v zánětlivých reakcích. Exprese *NF-κB* a *TNF-α* byla redukována po aplikaci hMSC do M+S a dokonce toto snížení bylo podobné expresi ve WT skupině (Obrázek 15 I, J).



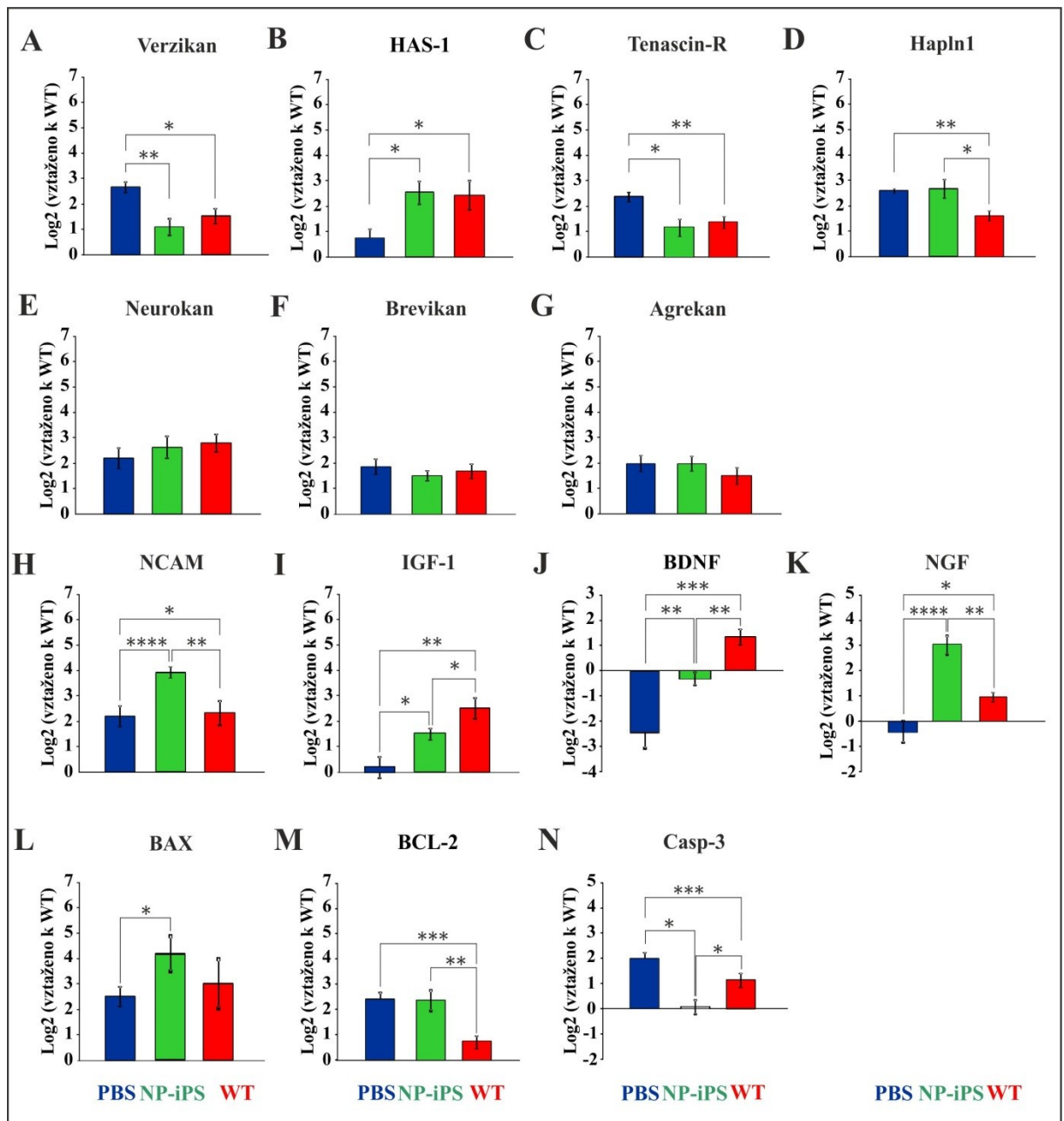
Obrázek 15: Analýza RNA exprese genů zapojených v nekroptóze a apoptóze. Relativní exprese genů zapojených do (A-D) nekroptózy (*RipK1*, *RipK3*, *MLKL*, *casp-8*) a genů zapojených do (E-H) apoptózy (*casp-3*, *casp-9*, *Bak* a *Bcl-2*) a genů zapojených do (I, J) zánětlivých procesů (*NFkB*, *TNFα*) byla sledována po aplikaci hMSC do M+S nebo jen M nebo jen S. Pozorovali jsme trend ve snížení RNA exprese *RipK1*, *MLKL*, *casp8*, *casp3*, *casp9* a *Bak* u WT skupiny a M+S. Regulace anti-apoptického genu *Bcl-2* byla zvýšená po aplikaci M+S. Hladina RNA *NF-kB* a *TNFα* byla snížena u WT a M+S, nicméně u *TNFα* bylo snížení nesignifikantní. Data jsou prezentována jako průměr ±SEM. Statistická signifikance: *p<0,05; **p<0,01 (srovnání ke kontrolní PBS skupině).

5.3.2 NP-iPS

Vzhledem k našim předchozím výsledkům, kde jsme pozorovali, že v terminální fázi onemocnění ALS dochází k dezorganizaci struktury PNN (Forostyak et al., 2014), jsme sledovali expresní profil chondroitin sulfátových proteoglykanů (CSPG) po aplikaci NP-iPS. RNA exprese *versikanu* a *tenascin-R* byla signifikantně snížena po aplikaci NP-iPS a byla srovnatelná s WT skupinou (Obrázek 16 A, C). Naopak, exprese *HAS-1* byla signifikantně zvýšená po aplikaci NP-iPS (Obrázek 16 B). Zatímco exprese *Hapln-1* nebyla změněna v porovnání s kontrolní SOD1 skupinou (Obrázek 16 D) a stejně tak exprese *neurokanu*, *brevikanu* a *agrekanu* se po aplikaci NP-iPS nezměnila (Obrázek 16 E, F, G). Dále jsme pozorovali signifikantní zvýšení exprese *NCAM* po aplikaci NP-iPS v porovnání jak s PBS skupinou tak WT skupinou (Obrázek 16 H).

Současně jsme sledovali změny hladiny exprese genů neurotrofických faktorů. Pozorovali jsme signifikantní zvýšení hladiny RNA ve všech třech studovaných genech *IGF-1*, *BDNF* a *NGF* po aplikaci NP-iPS v porovnání s kontrolní SOD1 skupinou (Obrázek 16 I, J, K). Exprese *NGF* byla zvýšená po aplikaci buněk i v porovnání s WT skupinou.

Dále jsme analyzovali expresi apoptických genů *Bax*, *Bcl-2* a *casp-3* (Obrázek 16 L, M, N). Exprese *Bax* byla signifikantně zvýšená po aplikaci NP-iPS (Obrázek 16 L), zatímco exprese *Bcl-2* nebyla změněna v porovnání s kontrolní PBS skupinou (Obrázek 16 M). Rovněž jsme pozorovali, že aplikace NP-iPS signifikantně redukuje expresi *casp-3* i v porovnání s WT skupinou (Obrázek 16 N).



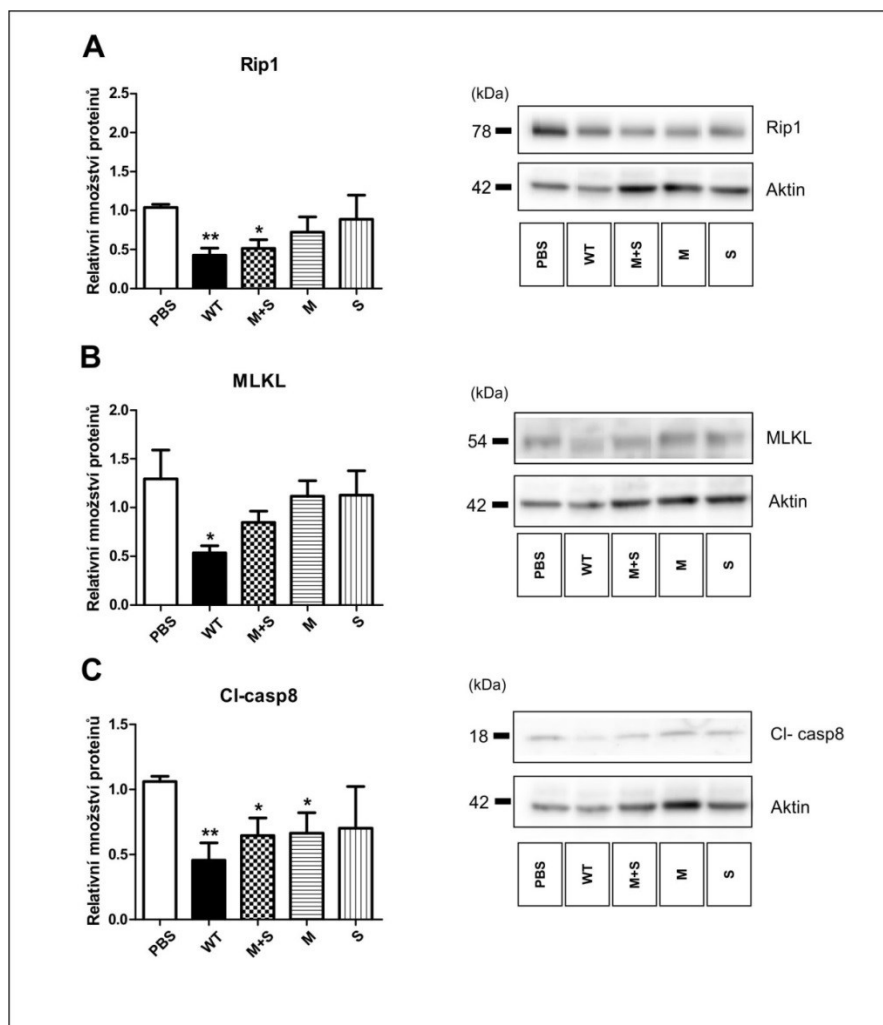
Obrázek 16: Analýza RNA exprese genů PNN. Sledovali jsme expresi genu chondroitin sulfátových proteoglykanů (A) *verzikan*, (B) *HAS-1*, (C) *tenascin-R*, (D) *hapln-1*, (E) *neurokan*, (F) *brevikan*, (G) *agrekan*, (H) *NCAM* a neurotrofních genů (I) *IGF-1*, (J) *BDNF* a (K) *NGF* a apoptických genů (L) *BAX*, (M) *Bcl-2* a (N) *casp-3*. Data jsou prezentována jako průměr ±SEM. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4 Analýza exprese vybraných proteinů

Za účelem dalšího zkoumání účinku transplantovaných hMSC na signalizaci programované buněčné smrti jsme hodnotili hladinu relevantních proteinů souvisejících s apoptózou, nekroptózou a autofagií, zatímco v případě transplantovaných NP-iPS jsme zkoumali účinek na PNN komponenty.

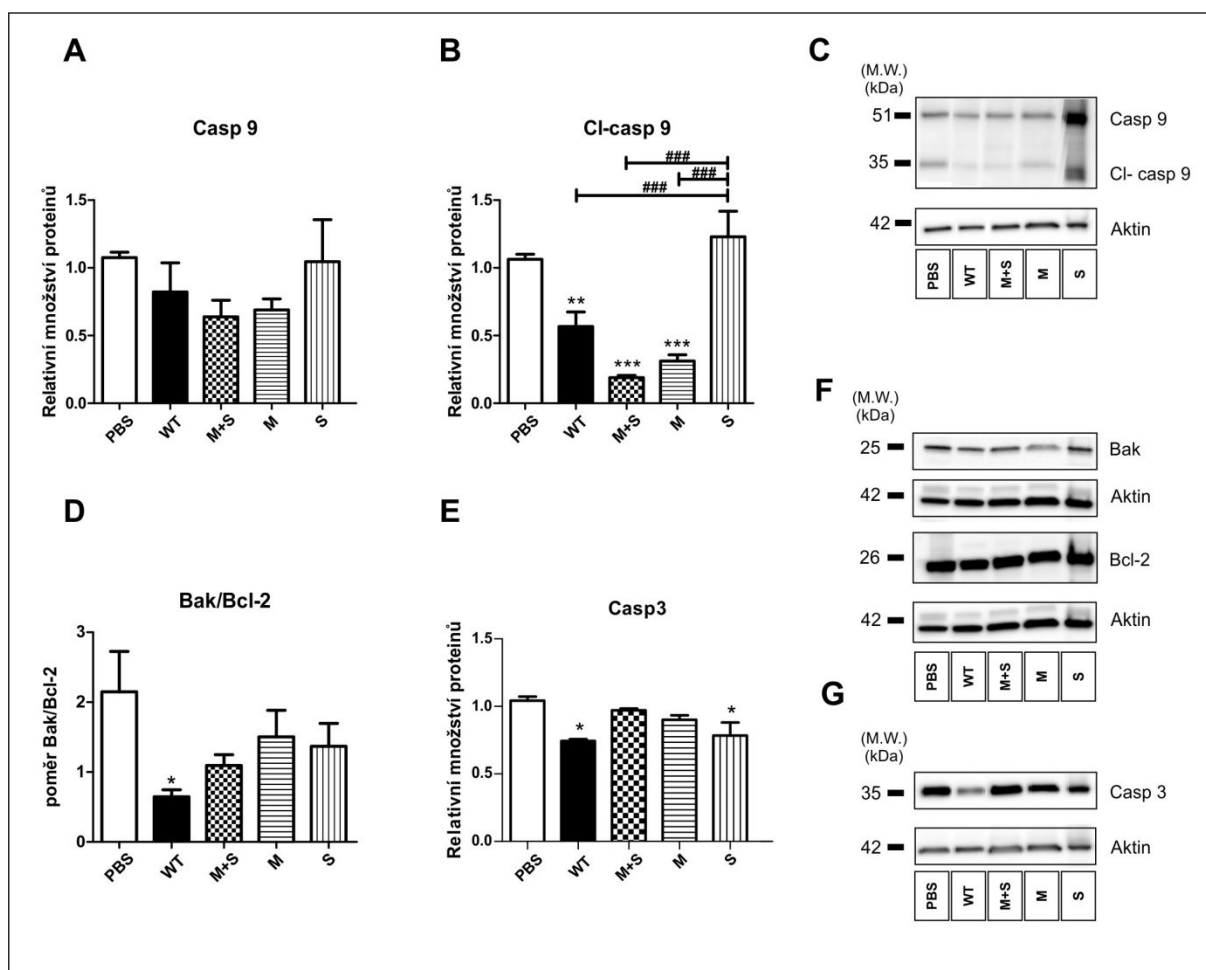
5.4.1 Mesenchymální kmenové buňky

Vliv transplantovaných hMSC na nekroptózu jsme hodnotili studiem relevantních proteinů souvisejících s nekroptózou jako jsou RIP, MLKL a rozštěpenou kaspázu 8 (cl-casp 8) pomocí WB. Pozorovali jsme signifikantní rozdíly mezi kontrolní SOD1 a zdravou WT skupinou v proteinu RIP1, MLKL a cl-casp 8 (Obrázek 17 A, B, C). Množství RIP1 a cl-casp 8 bylo signifikantně sníženo po aplikaci hMSC do M+S v porovnání s PBS skupinou (Obrázek 17 A, C), avšak u proteinu MLKL jsme sice pozorovali snížení po aplikaci hMSC do M+S, nicméně nebylo signifikantní (Obrázek 17 B). Signifikantní snížení cl-casp 8 bylo pozorované i po opakovaných intratekálních aplikacích hMSC (M), zatímco opakované intramuskulární injekce hMSC (S) neměly vliv na RNA expresi cl-casp 8.



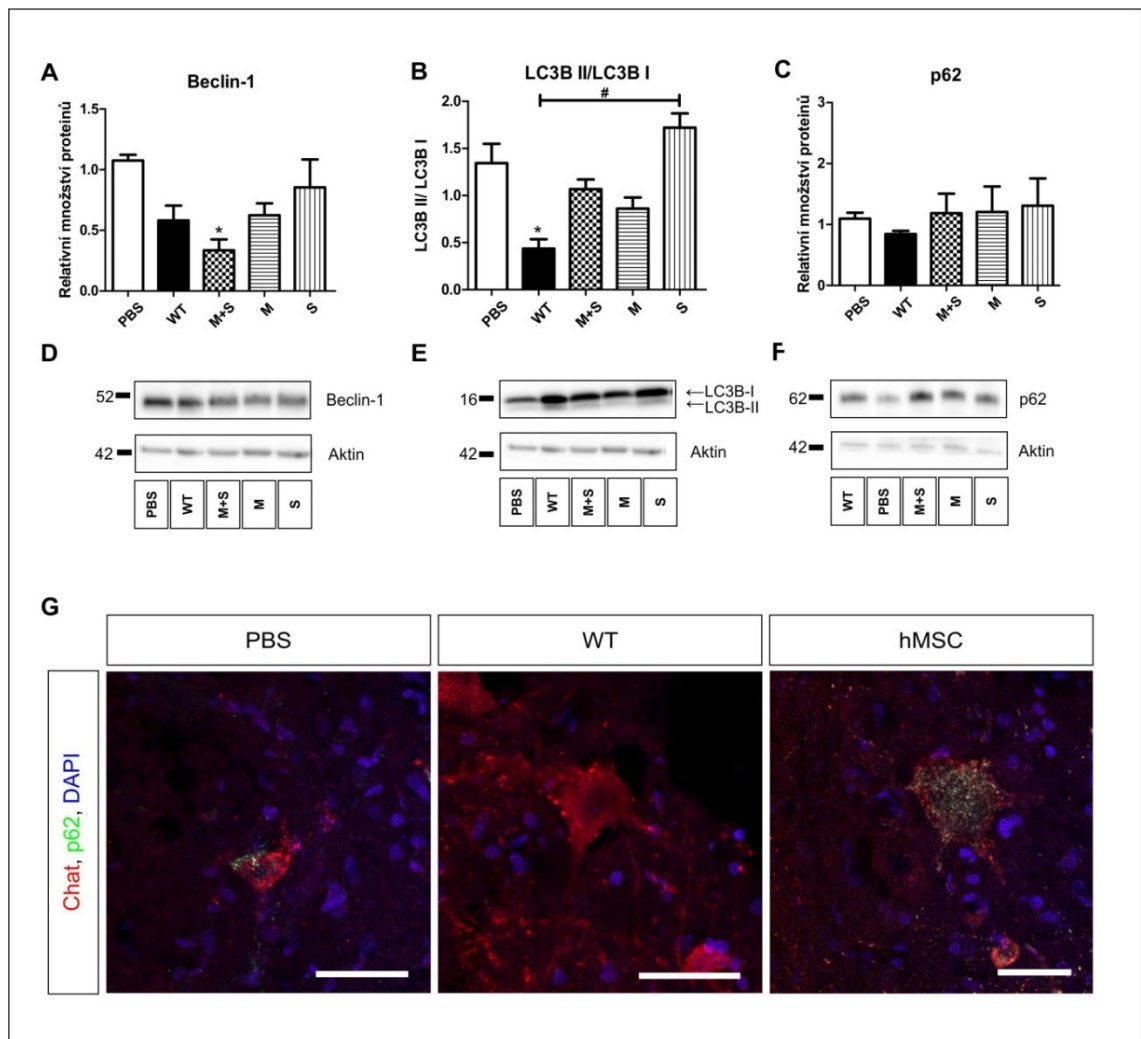
Obrázek 17: Kvantitativní analýza exprese proteinů zapojených do nekroptické dráhy. Western blot analýza ukázala signifikantní snížení exprese (A) Rip1 a (C) cl-casp 8 v míše SOD1 potkanů po léčbě hMSC do M+S, zatímco exprese (B) MLKL byla snížena nesignifikantně. Aplikace hMSC pouze do míchy (M) snížila expresi proteinu cl-casp 8. Po aplikaci hMSC do svalu (S) jsme nepozorovali žádné významné změny v expresi sledovaných proteinů. Aktin byl použit jako kontrola nanášky. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (srovnání ke kontrolní PBS skupině).

Současně jsme testovali profil exprese několika proteinů podílejících se v apoptické dráze, jako je například casp 3, casp 9, Bak a Bcl-2 (Obrázek 18 A - G). WT skupina měla nižší množství casp 3 a rozštěpené kaspázy 9 (cl-casp 9) než jejich SOD1 sourozenci (Obrázek 18 B, E). Pozorovali jsme trend ve snížení množství casp 9 po opakované aplikaci hMSC do M a v kombinaci do M+S v porovnání s kontrolní PBS skupinou (Obrázek 18 A). Zatímco cl-casp 9 byly signifikantně snížena po opakované intratekální aplikaci hMSC samotné (M) a v kombinaci s intramuskulární aplikací hMSC (M+S) (Obrázek 18 B). Poměr proteinů Bak/Bcl-2 byl >1 v kontrolní PBS skupině, nicméně byl mírně redukován po aplikaci hMSC do M+S (Obrázek 18 D). Signifikantní snížení casp 3 bylo pozorované pouze po opakované intramuskulární aplikaci hMSC (Obrázek 18 E).



Obrázek 18: Kvantitativní analýza proteinů zapojených do apoptózy. Sledovali jsme změny proteinů (A) casp 9, (B) cl-casp 9, (D) poměr Bak/Bcl-2 a (E) casp 3 pomocí WB. (C, F, G) Repräsentativní proužky z western blotové analýzy pro každý protein jsou k nalezení vždy u příslušného grafu. Aktin byl použit jako kontrola nánášky. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (srovnání ke kontrolní PBS skupině).

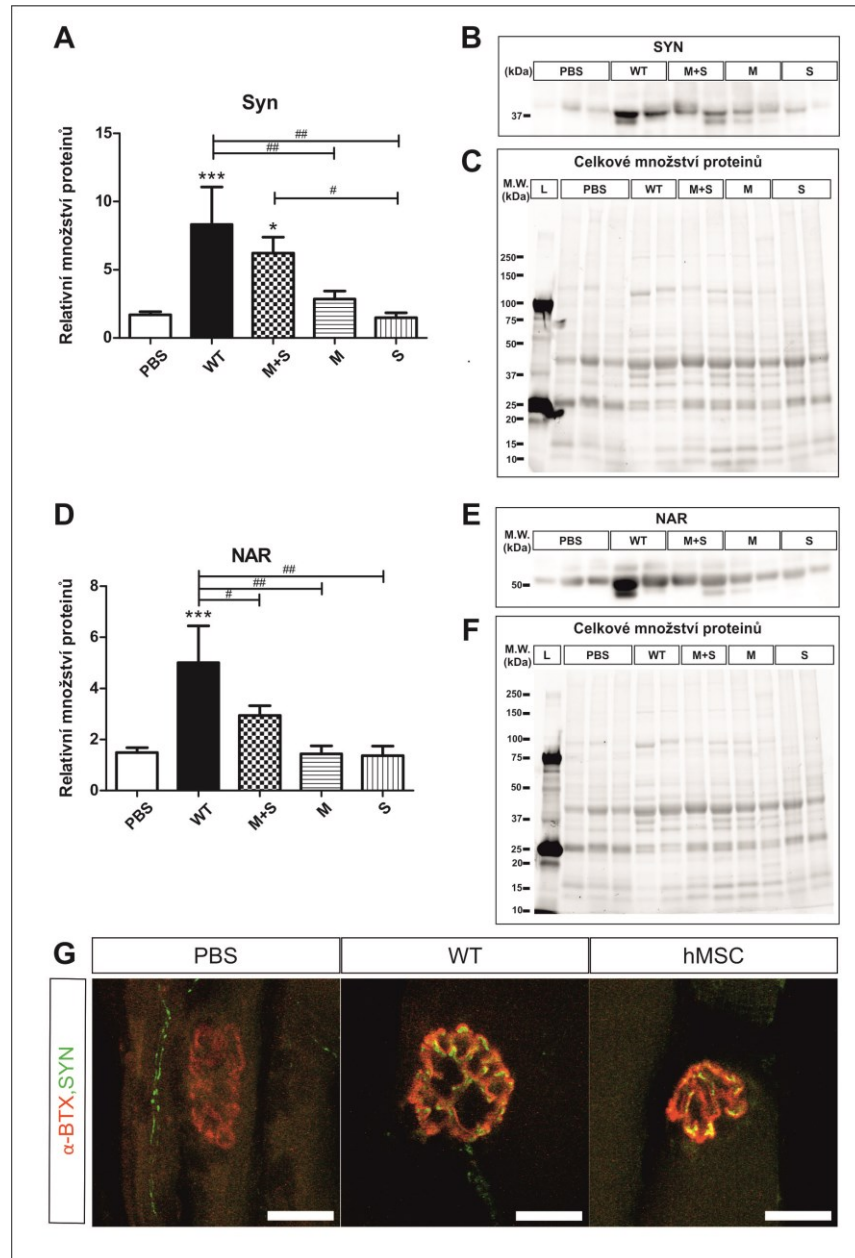
Kvantitativní analýzou jsme sledovali hladinu proteinů zapojených do autofagie Beclin-1, LC3B I a II a p62 (Obrázek 19 A, B, C). Zjistili jsme, že množství proteinu Beclin-1 bylo nižší u WT skupiny než u PBS skupiny (Obrázek 19 A, D). Signifikantní snížení jsme ale pozorovali pouze po aplikaci hMSC do M+S. Poměr proteinů LC3B II/I byl u všech SOD1 skupin zvýšený v porovnání s WT skupinou (Obrázek 19 B, E). Nejnižší hodnotu poměru proteinů LC3B II/I jsme zaznamenali po aplikaci hMSC do M a nejvyšší zas po aplikaci hMSC do S. Kvantitativní analýza proteinu p62 nezaznamenala žádný rozdíl mezi skupinami (Obrázek 19 C, F). Nejnižší hladina proteinu p62 byla detekována u WT skupiny.



Obrázek 19: Analýza proteinů zapojených do autofagie. (A) Kvantitativní analýza proteinů ukázala signifikantní snížení exprese Beclin-1 v míše po léčbě hMSC do M+S. (B) Poměr proteinů LC3BII/LC3BI byl u všech SOD1 skupin vyšší v porovnání s WT skupinou, nicméně signifikantní zvýšení bylo pozorováno pouze po aplikaci hMSC do svalu. (C) Kvantitativní analýza proteinu p62 nezaznamenala žádný rozdíl mezi skupinami. (D, E, F) Repräsentativní proužky z western blotové analýzy pro každý protein jsou k nalezení vždy u příslušného grafu. Aktin byl použit jako kontrola nanášky. (G) Repräsentativní snímky kolokalizace p62 (zelený) a Chat (červený). Jádra buněk byly vizualizovány pomocí DAPI (modrá). Měřítka: 50 μ m. Statistická signifikance: * $p < 0,05$ (srovnání ke kontrolní PBS skupině).

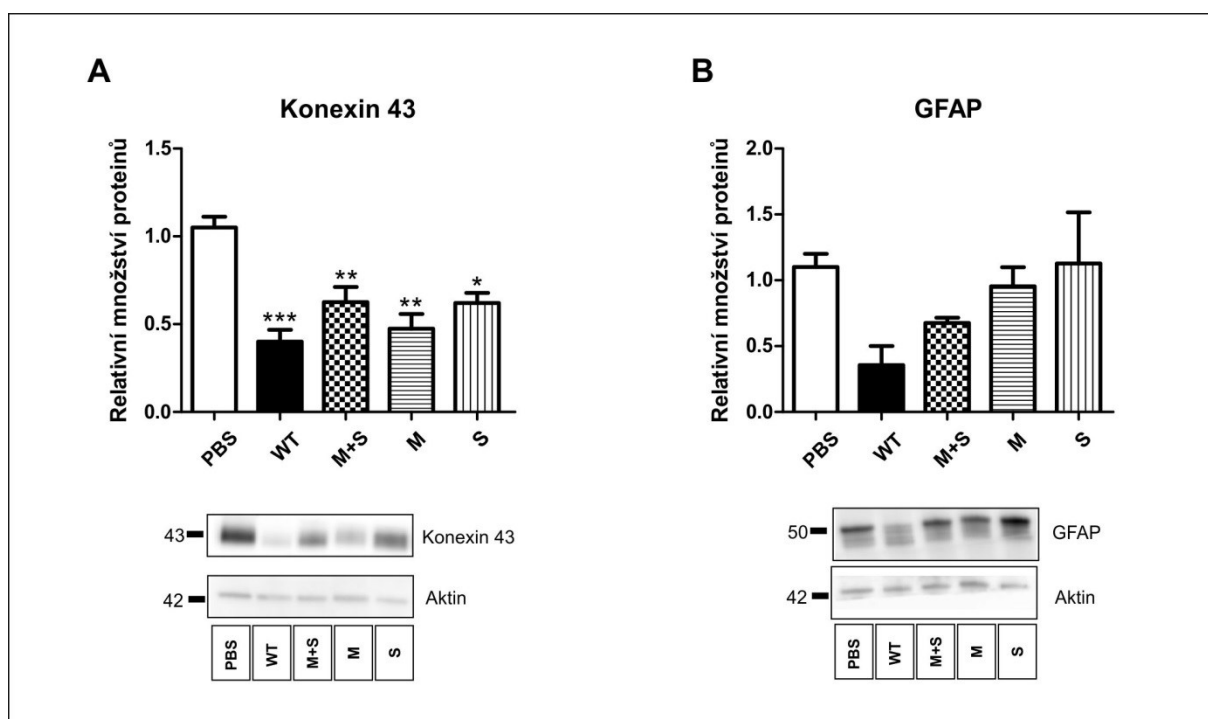
Dále jsme studovali NMJ v oblasti aplikace buněk pro stanovení, zda hMSC poskytují přídavný efekt na inervaci postsynaptických receptorů nervových zakončení. Stupeň denervace NMJ byl hodnocen pomocí WB. WT skupina měla signifikantně vyšší hladinu synaptofyzinu (Syn) a nikotin acetylcholinového receptoru α -7 (NAR) v porovnání s dalšími skupinami (Obrázek 20 A, D). Hladina proteinu Syn byla signifikantně vyšší a trend v zachování NAR byl u skupiny po kombinované aplikaci hMSC do M+S ve srovnání s kontrolní SOD1 skupinou. Na druhou stranu, léčba hMSC do S nevykazovala pozitivní efekt na hladinu proteinu Syn a NAR. Tyto výsledky naznačují, že intratekální aplikace hMSC je důležitá pro zachování nervosvalového spojení v *quadriceps femoris*. Nervosvalové ploténky

byly zviditelněny pomocí barvení na α -bungarotoxin, který se váže na podjednotku α NAR v kombinaci s protilátkou proti Syn (Obrázek 20 G). Velmi slabý signál protilátky Syn byl detekován v kontrolní PBS skupině. Kombinovaná aplikace hMSC do M+S částečně zachovala NMJ, jak je vidět na obrázku (Obrázek 20 G).



Obrázek 20: Denervace nervosvalového spojení (NMJ). Denervace NMJ v *quadriceps femoris* byla vyhodnocena pomocí WB použitím protilátky proti (A) synaptofyzinu (Syn) a protilátky proti (D) nikotín acetylcholinovému receptoru α -7 (NAR). Hladina proteinů Syn a NAR byla signifikantně vyšší u WT skupiny v porovnání s SOD1 skupinou (PBS). Aplikace hMSC M+S zvýšila hladinu proteinů Syn a NAR v porovnání s kontrolní SOD1 skupinou. (B, E) Snímky ukazují reprezentativní proužky z WB Syn a NAR. (G) Reprezentativní snímky znázorňují denervaci NMJ ve svazech SOD1 potkanů a její částečné zachování po aplikaci hMSC do M+S (NAR zviditelněný α -BTX, červený; Syn zelený). Měřítka: 20 μ m. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (srovnání ke kontrolní PBS skupině).

Za předpokladu, že aktivované gliové buňky mohou ovlivnit přežití nebo aktivaci nekroptózy nemocných neuronů v ALS, jsme analyzovali fenotyp astrocytů ve všech experimentálních skupinách. WB odhalil významné zvýšení exprese konexinu 43 u SOD1 potkanů, v porovnání s WT skupinou. Nicméně ve všech léčených skupinách bylo pozorované snížení jeho exprese (Obrázek 21 A). Podobně zvýšená hladina proteinů GFAP byla pozorována u PBS skupiny v porovnání s WT skupinou a toto zvýšení bylo sníženo ve skupině M+S (Obrázek 21 B). Tyto změny však nebyly signifikantní.

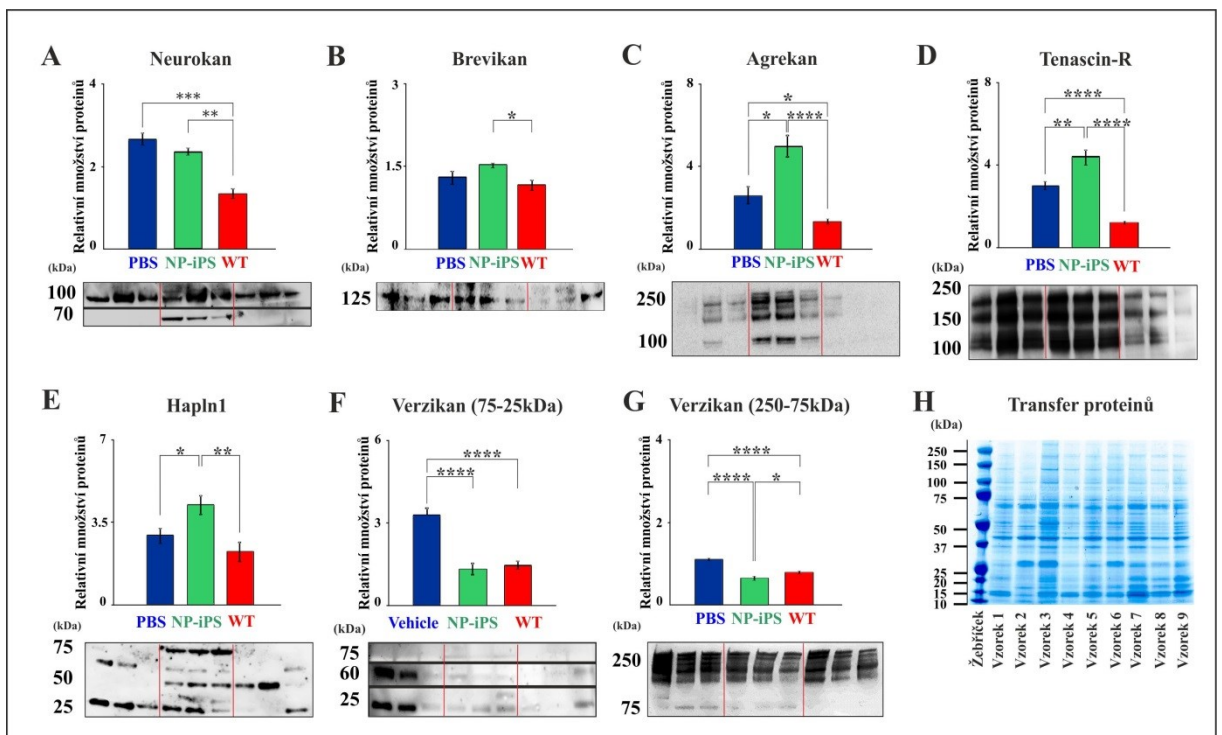


Obrázek 21: Kvantitativní analýza proteinu konexinu 43 a GFAP. Kvantitativní analýza proteinů ukázala zvýšenou expresi proteinů (A) konexin 43 a (B) GFAP v míše SOD1 potkanů v porovnání s WT skupinou. (A) Všechny léčené skupiny pomocí hMSC měly snížené množství proteinů konexin 43, (B) zatímco pouze aplikace hMSC do M+S dokázala snížit hladinu GFAP. Podání hMSC pouze do M nebo pouze do S bylo bez významného efektu. Aktin byl použit jako kontrola nanášky. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (srovnání ke kontrolní PBS skupině).

5.4.2 NP-iPS

Za účelem dalšího zkoumání účinku transplantovaných NP-iPS na PNN jsme hodnotili hladinu relevantních proteinů (neurokan, brevikan, agrekan, versikan, tenascin-R a hapln1) pomocí WB (Obrázek 22 A - G). Zatímco hladina proteinů neurokanu a brevikanu byla podobná u NP-iPS skupiny v porovnání se SOD1 skupinou (Obrázek 22 A, B), tak aplikace NP-iPS vedla k signifikantnímu zvýšení hladiny proteinů agrekan, tenascin-R (Obrázek 22 C, D). Dále jsme sledovali změnu hladiny proteinů různých štěpných forem versikanu

250-75kDa a 75-25kDa (Obrázek 22 F, G). Zjistili jsme, že aplikace NP-iPS vede k signifikantnímu snížení exprese proteinů jak versikanu 250-75kDa a tak versikanu 75-25kDa. Je zajímavé, že vyšší signifikance byla pozorovaná u proteinů versikanu 75-25kDa po aplikaci NP-iPS v porovnání se SOD1 skupinou (Obrázek 22 F). Zatímco hladina proteinů Hapln1 byla srovnatelná v SOD1 skupině s WT skupinou, tak po aplikaci NP-iPS došlo k signifikantnímu zvýšení (Obrázek 22 E). Tato data naznačují, že hladina některých proteinů extracelulární matrix je zachována po aplikaci NP-iPS v míše SOD1 potkanů.



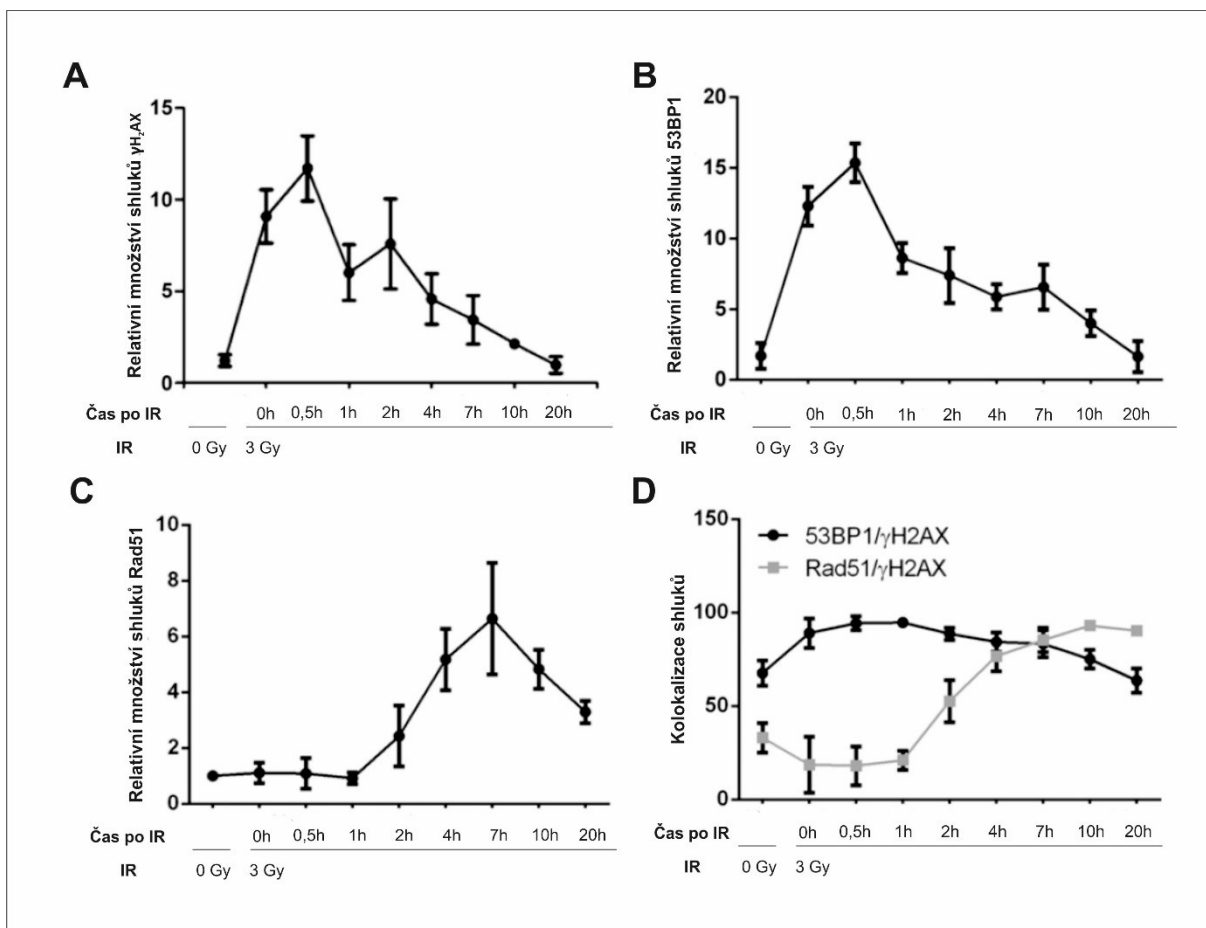
Obrázek 22: Kvantitativní analýza PNN proteinů. Sledovali jsme expresi proteinů (A) neurokanu, (B) brevikanu, (C) agrekanu, (D) tenascin-R, (E) hapln1, (F) verzikanu 75-25kDa a (G) 250-75kDa. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tato výsledková část práce vychází z následující publikace:

Kohutová A., Raška J., Krutá M., Šeneklová M., Bárta T., Fojtík P., Juráková T., Walter CA, Hampl A., Dvořák P., Rotrekl V: *Ligase 3-mediated end-joining maintains genome stability of human embryonic stem cells*. FASEB J. 2019 Jun;33(6):6778-6788.

5.5 Analýza inducibility DSB a analýza inducibility proteinu Rad51 a 53BP1

Ke zjištění, jak rychle se tvoří a opravují DSB, byly hESC ozářeny (IR) a následně sledovány po dobu 20 hodin. Pro sledování DSB byl zvolen protein $\gamma\text{H}_2\text{AX}$. K akumulaci $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ došlo 30 minut po indukci IR, nicméně po 1 hodině po indukci IR už většina $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ nebyla přítomná (Obrázek 23 A). Za hlavní dráhy opravy DSB se považují HR, využívající homologní sekvence, a NHEJ. Vzhledem k tomu, že 53BP1 je jedním z klíčových proteinů, který se účastní volby, jakým způsobem bude DSB opravena, podporuje NHEJ a inhibuje HR, byl tento protein zvolen pro sledování NHEJ. Pro sledování HR byl zvolen Rad51. Detekce počtu shluků 53BP1 ukázala, že vykazuje podobnou dynamiku jako počet shluků $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ (Obrázek 23 B), zatímco k hlavnímu shromáždění shluků Rad51 došlo 7 hodin po indukci IR (Obrázek 23 C). Detekcí kolokalizace bylo zjištěno, že 53BP1 kolokalizuje s $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ 30 minut po indukci IR, zatímco Rad51 kolokalizovala s $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ až v 90% po 10 hodinách po indukci IR (Obrázek 23 D). V případě přirozené hladiny DSB, kolokalizace $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ s 53BP1 byla dvakrát vyšší než kolokalizace s Rad51. Tato data naznačují, že většina indukovaných DSB jsou okamžitě asociovány s 53BP1 a že hlavní DSB jsou rychle opraveny pravděpodobně některým z mechanismů spojování konců (EJ) a ne HR.



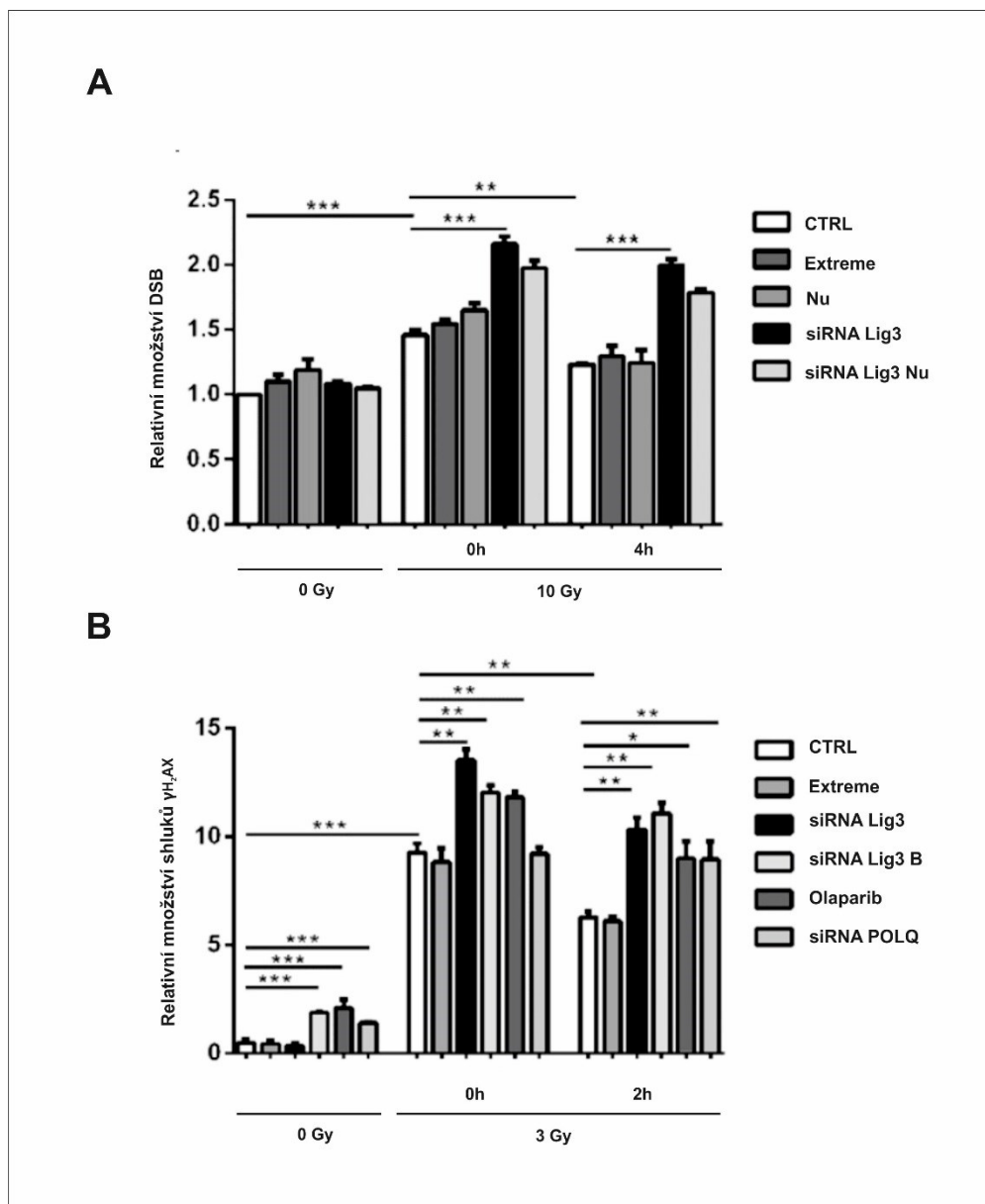
Obrázek 23: Imunocytochemická analýza dynamiky tvorby shluků proteinů γ H₂AX, 53BP1 a Rad51 po indukci IR. Grafy zobrazují porovnání relativního množství shluků (A) γ H₂AX, (B) 53BP1 a (C) Rad51 v časových intervalech (0-20h) po indukci IR (3Gy) u hESC. (D) Porovnání kolokalizace shluků 53BP1/ γ H₂AX a Rad51/ γ H₂AX v časových intervalech (0-20h) po indukci IR (3Gy) u hESC. Imunocytochemická analýza odhalila, že 53BP1 se podílí na časně opravě DNA (0,5 h po indukci IR), zatímco Rad51 se účastní pozdější opravy poškozené DNA (7h po indukci IR).

5.6 Detekce hlavní opravné dráhy DSB v hESC

Dále jsme studovali, jaký typ EJ opravného mechanismu se podílí na opravě DSB pomocí různých inhibitorů. Inhibice NHEJ jsme dosáhli potlačením katalytické podjednotky PKcs pomocí Nu7026 nebo Nu7441. Za účelem inhibice MMEJ byla snížena exprese Lig3. Vzhledem k tomu, že snížení exprese Lig3 a ani inhibice PKcs nevedla k detekovatelným změnám v množství DSB (Obrázek 24 A), vystavili jsme hESC IR za účelem zvýšení pravděpodobnosti vytvoření seskupeného oxidačního poškození. Inhibice NHEJ nevedla k signifikantním změnám v množství DSB, zatímco snížení exprese Lig3 signifikantně zvýšilo množství DSB po indukci IR. Toto zvýšení bylo detekováno i po 4 hodinách po indukci IR. Je zajímavé, že současná inhibice PKcs a snížení exprese Lig3 vedlo sice ke zvýšení množství DSB, nicméně tato změna nebyla signifikantní.

Po snížení exprese Lig3 jsme pozorovali až 40% nárůst počtu shluků $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ po indukci IR (Obrázek 24 B). Tyto výsledky byly potvrzeny dvěma nezávislými siRNA anti-Lig3. Snížení exprese Lig3 vedlo k narušení opravy DSB ve všech testovaných liniích hESC. Vzhledem k tomu, že Lig3 je zapojena jak do EJ tak BER opravného mechanismu, dalším krokem bylo zjistit, kterého opravného mechanismu je součástí Lig3, způsobující po snížení exprese narušení opravy DSB.

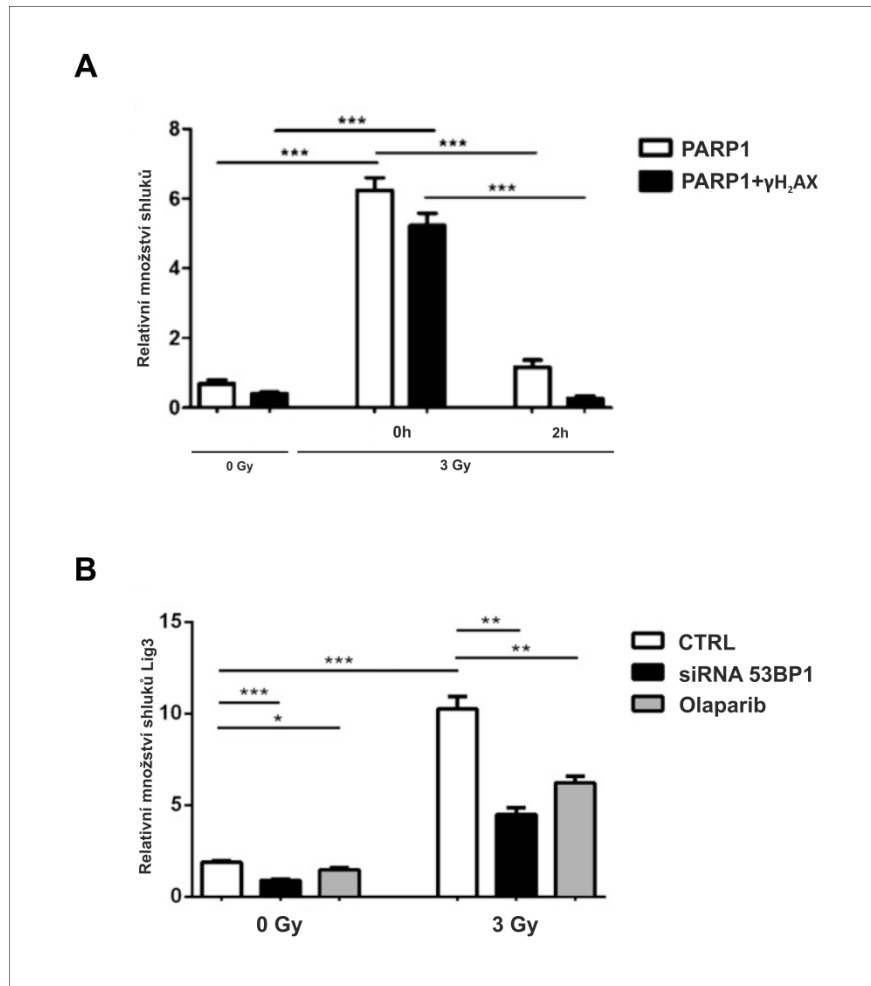
K tomuto účelu jsme inhibovali PARP1 pomocí olaparibu nebo snížili expresi POLQ. PARP1 a POLQ hrají důležitou roli v MMEJ (Dutta et al., 2017; Z. Wang et al., 2019). Signifikantně vyšší počet shluků $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ byl pozorován jak spontánně po snížení exprese Lig3, PARP, tak po indukci IR (Obrázek 24 B). Snížení exprese PolQ vedlo k zvýšení tvorby $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ shluků v buňkách nevystavených indukci IR. Nicméně snížení exprese PolQ v buňkách po indukci IR nevedlo k okamžitému zvýšení tvorby $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ shluků. Naopak se zdá, že PolQ je zapojený do pozdější opravy DSB, protože absence PolQ vedla ke zvýšení množství $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ shluků v buňkách po 2 hodinách po indukci IR.



Obrázek 24: Analýza dynamiky oprav DSB pomocí (A) pulzní gelové elektroforézy a (B) imunocytochemické analýzy. (A) Po působení IR byl pozorován nárůst velkého množství DSB (IR 0h), které ale byly rychle odstraněny. PFGE odhalila, že snížení regulace Lig3 (pomocí siRNA Lig3) vede k významnému zvýšení množství DSB, kterou můžeme pozorovat i 4 hodiny po indukci IR. (B) Inhibice Lig3 (siRNA Lig3, siRNA Lig3 B) a PARP1 (Olaparib) vedla ke zvýšené tvorbě shluků γ H₂AX po indukci IR a toto zvýšení bylo pozorované i 2h po IR. Inhibice PolQ (siRNA POLQ) vedla k významnému zvýšení tvorby shluků γ H₂AX spontánně a i 2h po indukci IR. Transfekce byla provedena pomocí reagentu Extreme, který neovlivnil množství shluků γ H₂AX. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dále jsme analyzovali kolokalizaci PARP1 shluků s γ H₂AX shluky (Obrázek 25 A). Analýza ukázala, že více než 50% spontánně lokalizovaných PARP1 shluků a více než 80% PARP1 shluků po indukci IR bylo kolokalizováno s γ H₂AX shluky. Dále jsme pozorovali, že po snížení exprese PARP1 pomocí inhibitoru olaparib došlo ke spontánnímu snížení tvorby shluků Lig3 a toto snížení bylo pozorováno i po indukci IR (Obrázek 25 B).

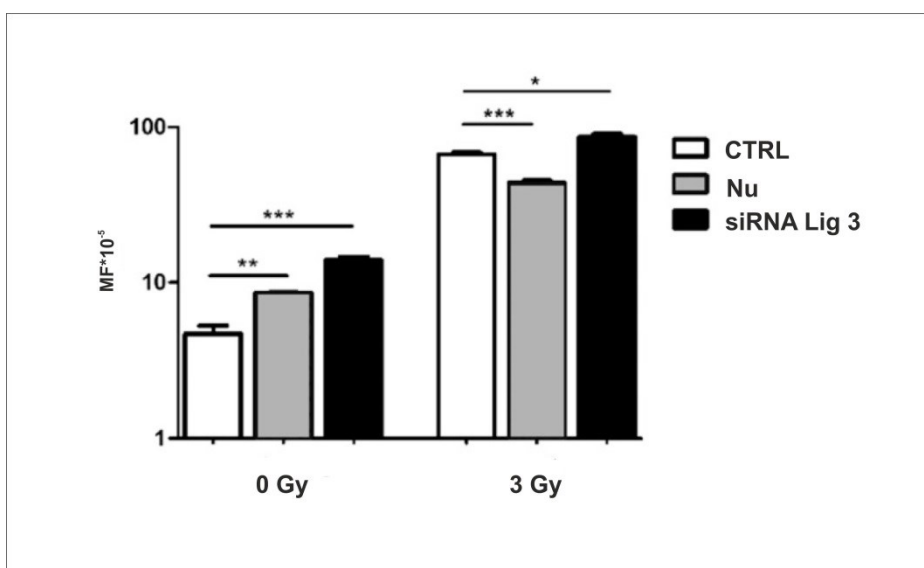
K určení, zda je nutná koncová ochrana 53BP1 pro EJ zprostředkované Lig3 v hESC, jsme použili specifický inhibitor siRNA 53BP1. Po snížení exprese 53BP1 se spontánně snížila tvorba shluků Lig3 (více než 40%) a tento pokles byl detekovatelný i po indukci IR (více než 50%) v porovnání s kontrolními buňkami s normální expresí 53BP1 (Obrázek 25 B).



Obrázek 25: 53BP1 a PARP1 participují v MMEJ opravném mechanismu, který udržuje genomovou stabilitu hESC. (A) PARP1 je součástí jak spontánní opravy DSB, tak po indukci IR (3Gy). IR indukce vede ke zvýšení množství shluků PARP1 a zvýšení je vidět i na množství buněk, ve kterých shluky PARP1 kolokalizují s γ H₂AX shluky. (B) Inhibice 53BP1 nebo PARP1 (siRNA 53BP1 nebo olaparib) brání tvorbě shluků Lig3. Podobný efekt byl pozorován i v buňkách, které nebyly vystaveny působení IR. Lig3 je přítomna také v mitochondriích, ale v analýze byly zohledněny pouze ohniska tvořená v jádru buňky. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.7 Analýza frekvence mutací

Poté, co bylo zjištěno, že velký počet DSB byl opravený pomocí Lig3 zapojené s velkou pravděpodobností do MMEJ v hESC, chtěli jsme posoudit dopad aktivity MMEJ na stabilitu genomu hESC. Analyzovali jsme spontánně a IR indukovanou frekvenci mutací u hESC (Obrázek 26). V souladu s předchozími výsledky měla inhibice Lig3 za následek signifikantně zvýšenou MF jak u ozářených, tak i u neozářených hESC, což naznačuje, že Lig3 je součástí upřednostňované opravného mechanismu DSB v hESC. Za účelem potvrzení efektu NHEJ na genomickou integritu hESC jsme tento opravný mechanismus inhibovali pomocí Nu7026. V kontrolních buňkách došlo k významnému zvýšení MF po inhibici NHEJ (Nu). Na druhou stranu, v ozářených buňkách po inhibici NHEJ došlo k významnému poklesu MF, dokonce i pod hladinou úrovně ozářených kontrolních hESC (CTRL).



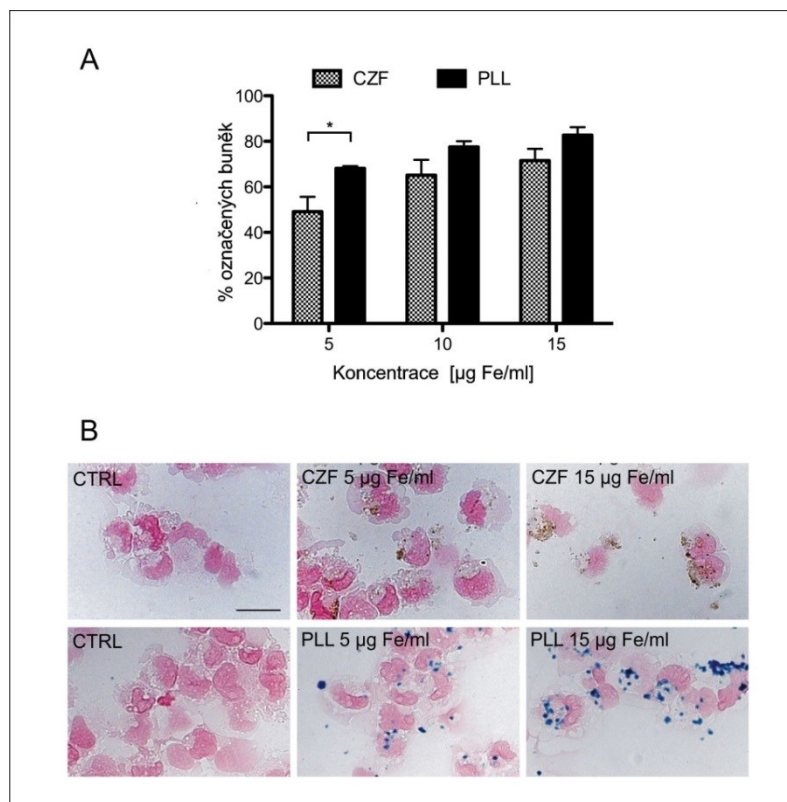
Obrázek 26: Analýza frekvence mutací. Inhibice NHEJ (Nu) vedla k poklesu frekvence mutací (MF) v hESC po indukci IR. Zatímco inhibice Lig3 vedla ke zvýšení jak spontánní MF, tak po indukci IR. Grafy reprezentují výsledky ze tří biologických replikátů \pm SEM. Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tato výsledková část práce vychází z následující publikace:

Jiráková K., Šeneklová M., Jiráček D., Turnovcová K., Vosmanská M., Babič M., Horák D., Veverka P., Jendelová P: *The effect of magnetic nanoparticles on neuronal differentiation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors*. Int J Nanomedicine. 2016 Nov 24; 11:6267-6281

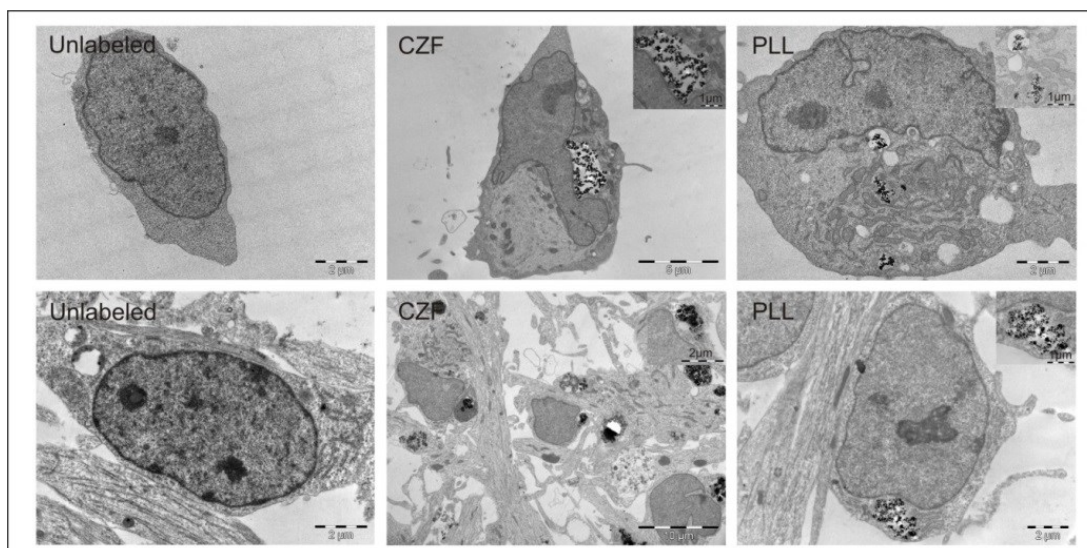
5.8 Účinnost značení NP-iPS pomocí magnetických nanočástic

NP-iPS byly značeny pomocí dvou typů nanočástic na bázi železa, CZF a PLL- γ -Fe₂O₃. Úspěšnost intracelulárního značení se hodnotila po 72 hodinové kultivaci NP-iPS s nanočásticemi CZF nebo PLL- γ -Fe₂O₃. Ke značení jsme použili tři odlišné koncentrace nanočástic (5 μ g Fe/ml, 10 μ g Fe/ml a 15 μ g Fe/ml). Značení pomocí PLL- γ -Fe₂O₃ bylo vyhodnoceno jako úspěšnější v porovnání s CZF (82,7% \pm 3,5% a 71,6% \pm 5,1%), nicméně signifikantní rozdíl v počtu značených buněk byl viditelný pouze za použití nejnižší koncentrace železa (5 μ g Fe/ml; Obrázek 27 A). Obrázek 27 B zobrazuje reprezentativní fotky magneticky značených buněk po 72 hodinové kultivaci. Železo bylo zobrazeno pomocí barvení berlínskou modří jako modrá zrnka v buňkách značených PLL- γ -Fe₂O₃. V buňkách značených CZF odpovídají nanočásticím hnědá zrníčka, protože CZF má obal z oxidu křemičitého, který neumožňuje přímé barvení železa. Na obrázku 27 B je možné vidět, že neoznačené buňky neobsahují žádná zrnka, a zvyšující se úspěšnost endocytózy koresponduje se zvyšující se koncentrací nanočástic jak v CZF, tak PLL- γ -Fe₂O₃ označených buňkách.



Obrázek 27: Účinnost značení NP-iPS pomocí nanočástic na bázi železa. (A) Graf znázorňuje procentuální zastoupení úspěšně označených NP-iPS pomocí dvou typů nanočástic (CZF a PLL- γ - Fe_2O_3) o třech různých koncentracích (5 $\mu\text{g Fe/ml}$, 10 $\mu\text{g Fe/ml}$ a 15 $\mu\text{g Fe/ml}$). Statistická signifikance: $*p < 0,05$. (B) Reprezentativní snímky označených NP-iPS pomocí CZF a PLL- γ - Fe_2O_3 nanočástic. Měřítko: 20 μm .

Internalizace nanočástic do buněk byla potvrzena použitím TEM v označených buňkách před a během diferenciaci. Diferencující buňky mají menší buněčná těla v porovnání s nediferencovanými buňkami a nápadná neurofilamenta korespondující s vývojovým procesem. Nanočástice byly pozorované jako klastry uvnitř endo/lyzozomu v cytoplazmě nediferencovaných buněk a diferencovaných buněk označených CZF a PLL- γ - Fe_2O_3 (Obrázek 28).



Obrázek 28: Lokalizace nanočástic zobrazena pomocí TEM. Nanočástice CZF a PLL- γ -Fe₂O₃ byly pozorovány jako klastry v cytoplasmě nediferencovaných (horní řada) a diferencovaných (dolní řada) buněk.

Chemická analýza železa, kobaltu a zinku použitím ICP-MS odhalila vyšší množství intracelulárního železa v buňkách označených PLL- γ -Fe₂O₃ v porovnání s buňkami označenými CZF (Tabulka 3). Průměrné množství železa bylo 3,21; 2,24 a 2,82 pg Fe na buňku použitím různých koncentrací CZF (5, 10 a 15 μ g Fe/ml) a 7,57; 18,04 a 22,63 pg Fe na buňku použitím 5, 10 a 15 μ g Fe/ml PLL- γ -Fe₂O₃. V neznačených buňkách bylo naměřeno nepatrné množství železa (0,13 pg Fe na buňku). Intracelulární množství železa bylo přímo úměrné použité koncentraci PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástic, zatímco v případě CZF nanočástic neměla koncentrace vliv na množství železa ani na množství kobaltu a zinku.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty kobaltu, zinku a železa ve značených NP-iPS

Nanočástice	Kobalt (pg/buňka)	Zinek (pg/buňka)	Železo (pg/buňka)
Neznačená kontrola	0	0,13±0,18	0,13±0,18
PLL- γ -Fe ₂ O ₃ 5 μ g Fe/ml	-	-	7,57±1,90
PLL- γ -Fe ₂ O ₃ 10 μ g Fe/ml	-	-	18,04±5,26
PLL- γ -Fe ₂ O ₃ 15 μ g Fe/ml	-	-	22,23±10,93
CZF 5 μ g Fe/ml	0,93±0,45	0,88±0,83	3,21±1,49
CZF 10 μ g Fe/ml	0,61±0,10	0,69±0,02	2,24±0,43
CZF 15 μ g Fe/ml	0,71±0,14	0,79±0,02	2,82±0,87

Za účelem zobrazení magneticky značených buněk pomocí magnetické rezonance byla použita různá koncentrace nanočástic buďto samotných, nebo v kombinaci s NP-iPS, které byly imobilizovány v 4% želatinovém fantomu a měřeny pomocí MR (Obrázek 29).

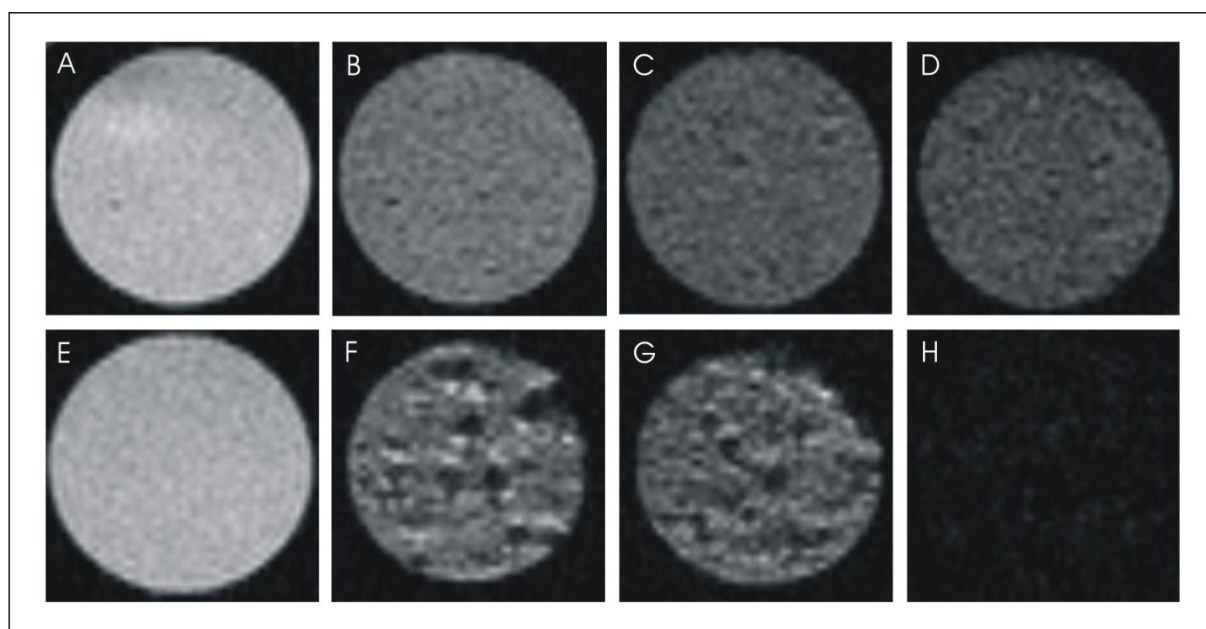
Relaxivita obou typů nanočástic byla srovnatelná (Tabulka 4). Na druhou stranu, hodnota relaxivity byla přibližně dvakrát větší u PLL- γ -Fe₂O₃ značených buňkách v porovnání s CZF značenými buňkami (Tabulka 5). Hodnota relaxivity značených NP-iPS během diferenciaci klesá (Tabulka 5). Hodnoty relaxivity korelují dobře s vizualizací buněk v 4% genolových fantomech (Obrázek 29). Snížení intenzity signálu (tmavé oblasti) ve fantomech odpovídalo přítomnosti magnetických nanočástic v buňkách a bylo závislé na koncentraci, kterou byly buňky označeny. Více tmavých oblastí bylo u fantomů obsahujících buňky značené PLL- γ -Fe₂O₃ než u CZF.

Tabulka 4: Relaxivita r_2 nanočástic *in vitro*

$r_2 \pm SD$ (s ⁻¹)			
Nanočástice	5 $\mu\text{g Fe/ml}$	10 $\mu\text{g Fe/ml}$	15 $\mu\text{g Fe/ml}$
CZF	7,22 \pm 0,07	7,91 \pm 0,21	16,75 \pm 0,21
PLL- γ -Fe ₂ O ₃	6,52 \pm 0,24	11,48 \pm 0,05	17,63 \pm 0,04

Tabulka 5: Relaxivita r_2 značených buněk *in vitro*

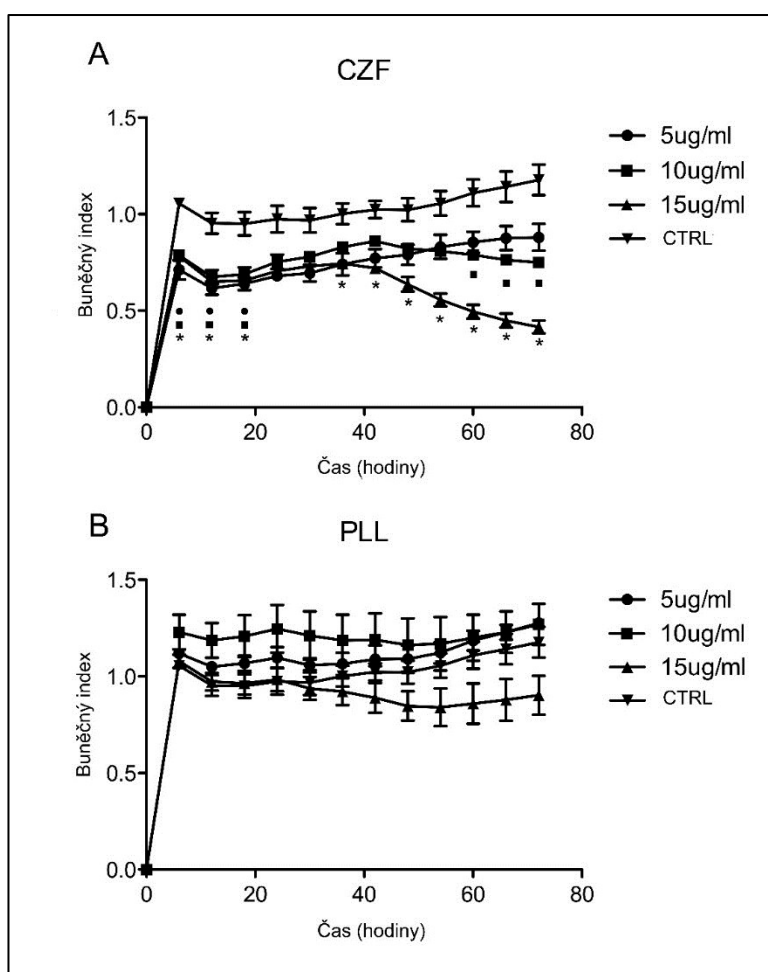
r_2 [s ⁻¹ /ml buněk/ml] \pm SD				
Nanočástice	5 $\mu\text{g Fe/ml}$	10 $\mu\text{g Fe/ml}$	15 $\mu\text{g Fe/ml}$	1 týden diferenciaci
CZF	0,585 \pm 0,182	0,788 \pm 0,079	1,23 \pm 0,013	0,158 \pm 0,012
PLL- γ -Fe ₂ O ₃	0,965 \pm 0,139	1,5 \pm 0,098	3,316 \pm 0,824	0,128 \pm 0,002



Obrázek 29: Vizualizace suspenze NP-iPS pomocí MR v želatinovém fantomu. Želatinový fantom (A) bez buněk a € se suspenzí neznačených NP-iPS. Želatinové fantomy s CZF značenými NP-iPS o koncentraci (B) 5 $\mu\text{g Fe/ml}$; (C) 10 $\mu\text{g Fe/ml}$; (D) 15 $\mu\text{g Fe/ml}$. Želatinové fantomy se suspenzí NP-iPS značenými PLL- γ -Fe₂O₃ nanočásticemi o koncentraci (F) 5 $\mu\text{g Fe/ml}$; (G) 10 $\mu\text{g Fe/ml}$; (H) 15 $\mu\text{g Fe/ml}$. Snížení intenzity signálu koresponduje s množstvím železitých iontů v buňce.

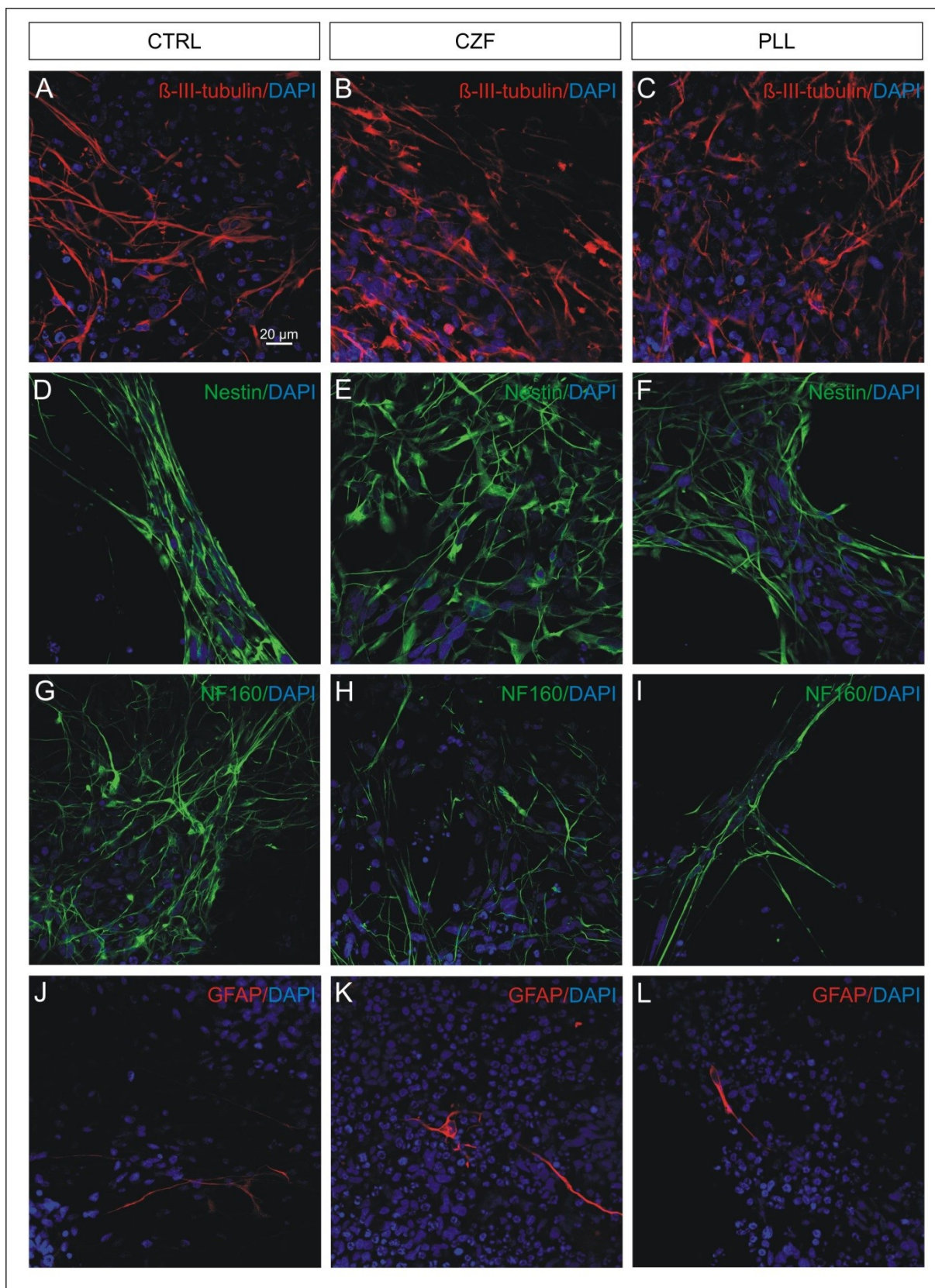
5.9 Efekt magnetických nanočástic na proliferaci a neuronální diferenciaci NP-iPS

Růst NP-iPS s nanočásticemi byl sledován pomocí systému xCELLigence, který hodnotí buněčnou proliferační aktivitu na E-destičce se zlatými elektrodami. Přisedlé, živé buňky působí jako izolátory a zvyšují impedanci. Míra impedance byla zaznamenávána jako buněčný index (Cell index; CI). Z výsledků je patrné, že CZF nanočástice už během prvních hodin inkubace snižují viabilitu NP-iPS ve všech třech testovaných koncentracích (5 μg Fe/ml, 10 μg Fe/ml, 15 μg Fe/ml; Obrázek 30 A). Negativní efekt nanočástic CZF na buněčnou aktivitu přetrval déle než 40 hodin za použití koncentrace 15 μg Fe/ml, zatímco značení NP-iPS pomocí PLL- γ -Fe₂O₃ nemělo viditelný negativní dopad na buněčnou aktivitu v žádné z uvedených koncentrací (5 μg Fe/ml, 10 μg Fe/ml, 15 μg Fe/ml; Obrázek 30 B). Tyto výsledky naznačují, že CZF nanočástice působí na NP-iPS mnohem více cytotoxicky než PLL- γ -Fe₂O₃.



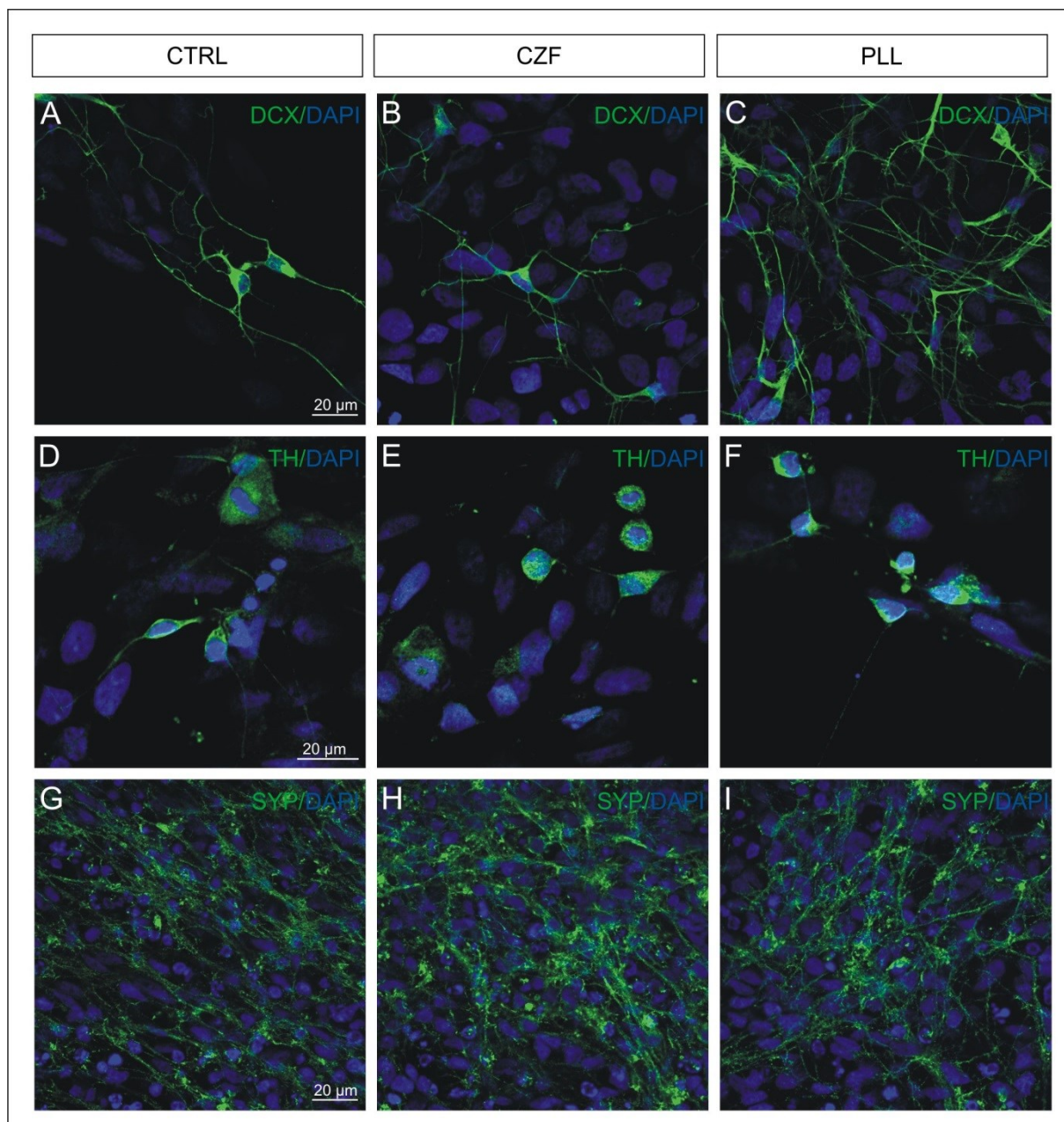
Obrázek 30: Efekt magnetických nanočástic na NP-iPS proliferaci v reálném čase. Proliferační křivka NP-iPS neznačených buněk a značených třemi různými koncentracemi (A) CZF nebo (B) PLL- γ -Fe₂O₃ nanočásticemi. Buněčný index zahrnuje buněčnou viabilitu, morfologii a stupeň adheze. Statistická signifikance: * $p < 0,05$ ● 5 μg Fe/ml; ■ 10 μg Fe/ml; ▲ 15 μg Fe/ml.

Imunocytochemická analýza neodhalila žádný významný rozdíl v expresi sledovaných markerů u diferencujících NP-iPS v přítomnosti CZF nebo PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástic (Obrázek 31 a 32). Diferenciace probíhala 2 týdny, během kterých NP-iPS začaly tvořit rozety a převážná část buněk vykazovala známky nezralých neuronů, sférická buněčná těla a dlouhé výběžky. Většina buněk s touto morfologií byla pozitivní na β -III-tubulin (Obrázek 31 A, B, C), zatímco GFAP byl přítomný jen v nepatrném množství buněk (Obrázek 31 J, K, L). Po dvou týdnech diferenciaci NP-iPS bylo 87% neznačených buněk pozitivních na NF160, v přítomnosti nanočástic CZF bylo 72% pozitivních buněk a v přítomnosti PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástic 70% pozitivních buněk (Obrázek 31 G, H, I).



Obrázek 31: Imunocytochemická charakterizace diferencujících NP-iPS po označení magnetickými nanočásticemi (A, D, G, J). První sloupec reprezentuje neoznačené NP-iPS. (B, E, H a K) Druhý sloupec reprezentuje NP-iPS inkubované s CZF nanočásticemi o koncentraci 15 $\mu\text{g Fe/ml}$. (C, F, I a L) Třetí sloupec reprezentuje NP-iPS inkubované s PLL- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočásticemi o koncentraci 15 $\mu\text{g Fe/ml}$. Buňky byly barveny na (A-C) β -III-tubulin, (D-F) nestin, (G-I) NF160, (J-L) GFAP. Jádra studovaných buněk byla vizualizována pomocí DAPI.

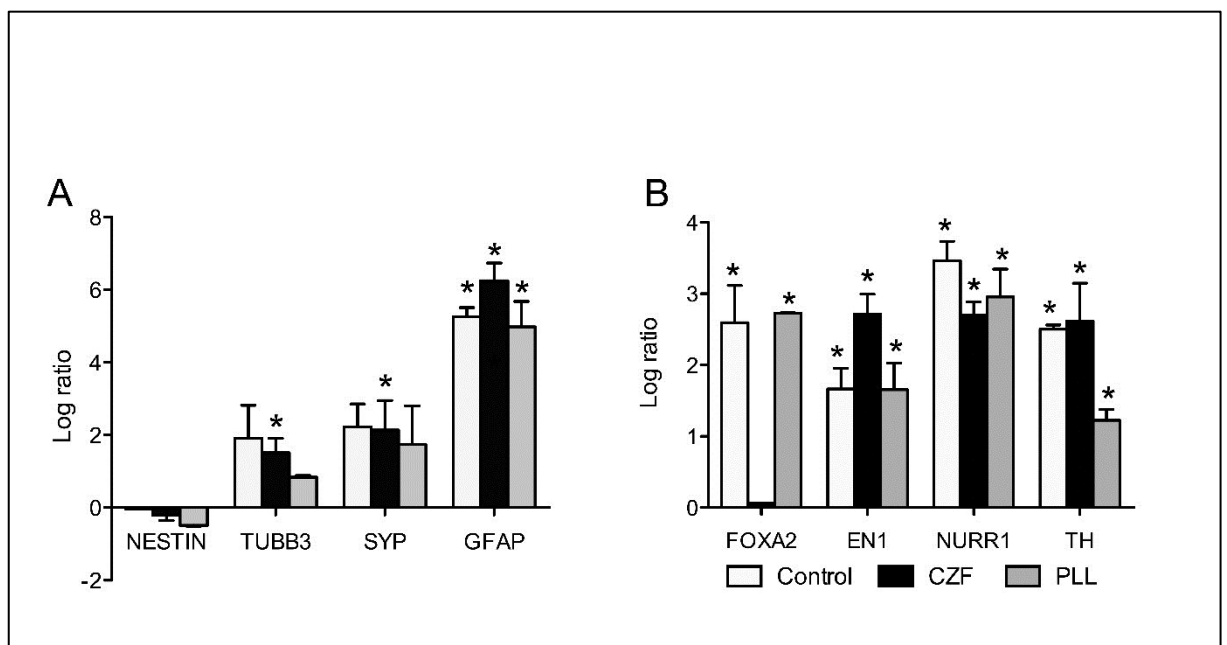
Dále jsme zaznamenali buňky pozitivní na doublecortin a synaptofyzin, nicméně pouze <8% buněk bylo pozitivních na tyrozinhydroxylázu (TH), specifický marker dopaminergních neuronů (Obrázek 32). Přítomnost nanočástic v diferencovaných buňkách byla potvrzena na světelném mikroskopu.



Obrázek 32: Imunocytochemická charakterizace diferencujících NP-iPS po označení magnetickými nanočásticemi. (A, D, G) První sloupec reprezentuje neoznačené NP-iPS (CTRL). (B, E, H) Druhý sloupec reprezentuje NP-iPS inkubované s CZF nanočásticemi o koncentraci 15 $\mu\text{g Fe/ml}$. (C, F,) Třetí sloupec reprezentuje NP-iPS inkubované s PLL- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočásticemi o koncentraci 15 $\mu\text{g Fe/ml}$. Buňky byly barveny na (A-C) doublecortin, (D-F) TH, (G-I) synaptofyzin. Jádra studovaných buněk byla vizualizována pomocí DAPI.

Pro další vyhodnocení vlivu nanočástic na diferenciaci NP-iPS jsme dále analyzovali expresi specifických markerů dopaminergních neuronů a markerů neurálních kmenových

buněk pomocí qPCR. Expres *nestinu* (marker neurálních kmenových buněk) byla snížena během diferenciaci jak v neznačených, tak označených buňkách (Obrázek 33 A). Naopak expres *GFAP* byla signifikantně zvýšená v neznačených i značených buňkách (CZF nebo PLL- γ -Fe₂O₃). Stejně tak expres neurálních specifických markerů *β -III-tubulinu* a *synaptofyzinu* byla signifikantně zvýšená v diferencujících NP-iPS po označení nanočásticemi PLL- γ -Fe₂O₃. Expres genu *FOXA2*, který reguluje tvorbu a diferenciaci dopaminergních neuronů byla signifikantně zvýšena jak v neznačených, tak PLL- γ -Fe₂O₃ označených buňkách, zatímco CZF nanočástice působily na expresi *FOXA2* genu negativně (Obrázek 33 B). Dokonce expres genu *FOXA2* po označení CZF nanočásticemi byla podobná expresi v nediferencovaných NP-iPS. Dále jsme sledovali vliv nanočástic na expresi tyrosinhydroxylázy (*TH*), což je jeden z nejdůležitějších markerů dopaminergních neuronů. Profil expres *TH* byl signifikantně zvýšen jak v neznačených, tak označených buňkách (CZF nebo PLL- γ -Fe₂O₃). Zvýšenou expresi jsme pozorovali i u dalších transkripčních faktorů (*EN1* a *NURRI*) zúčastňujících se vývoje dopaminergních neuronů jak v neznačených, tak označených buňkách. Analýza qPCR nedetekovala signifikantní rozdíly v expresi vybraných markerů dopaminergních neuronů po označení nanočásticemi PLL- γ -Fe₂O₃, zatímco CZF nanočástice ovlivnily expresi genu *FOXA2*.



Obrázek 33: Analýza RNA expres markerů neurálních kmenových buněk a markerů dopaminergních neuronů. (A) Hladina RNA expres neurálních genů *NESTIN*, *TUBB3*, *SYP* a *GFAP* a (D) dopaminergních genů *FOXA2*, *EN1*, *NURRI* a *TH* byla sledována v neznačených NP-iPS a označených NP-iPS pomocí CZF a PLL- γ -Fe₂O₃ po dvou týdnech diferenciaci. Průměrná expres studovaných markerů v neznačené nediferencované kontrole byla stanovena jako 0. Statistická signifikance: *p<0,05.

6 Diskuze

ALS je fatální neurodegenerativní onemocnění projevující se v dospělosti degenerací centrálních a periferních MN. V současné době jsou FDA schválené pouze dvě farmaceutické léčby ALS, nicméně užívání Riluzolu nebo Edaravone přináší pacientům s ALS jen mírné zlepšení. Vzhledem k tomu, že ALS je komplexní onemocnění, na jehož progresi se podílí různé patogenní mechanismy, tak se zdá, že tyto léky jsou nedostatečné, protože cílí jen na jeden z mnoha degenerujících mechanismů zapojených do progresu ALS. V tomto ohledu se zdají být kmenové buňky ideální pro léčbu řady neurodegenerativních onemocnění včetně ALS. Jejich regenerační/neuroprotektivní efekt se přisuzuje především schopnosti uvolňovat různé růstové faktory a cytokiny, které mohou vytvářet mikroprostředí, které podporuje neuroprotektci. Navíc některé práce naznačují i schopnost kmenových buněk diferencovat do gliových a neurálních buněk.

Několik preklinických studií již ukázalo slibné terapeutické výsledky za pomoci aplikace těchto buněk, projevující se zpožděním nástupu onemocnění, zpomalením progresu onemocnění a zpomalením degenerace MN (Boido et al., 2014; Forostyak et al., 2014; H. Kim et al., 2010; Rando et al., 2018). Klinické studie sice prokázaly bezpečnost aplikace některých typů kmenových buněk, ale jejich účinek je u lidí diskutabilní (H. Y. Kim et al., 2014; Oh et al., 2015; Staff et al., 2016; Syková et al., 2017). Z tohoto důvodu je zapotřebí více preklinických studií detailněji vysvětlujících efekt kmenových buněk u ALS.

6.1 Pozitivní vliv aplikace kmenových buněk na patologii ALS

V prvních dvou studiích zahrnutých do této práce jsme se snažili objasnit potenciální terapeutický efekt hMSC a NP-iPS v experimentálním modelu ALS s mutací SOD1^{G93A}. V případě hMSC jsme zvolili intratekální podání prostřednictvím lumbální punkce, které je více vhodné pro opakované podání, zatímco NP-iPS byly aplikovány intraspínálně v různých fázích onemocnění. Porovnávali jsme účinek opakované intratekální aplikace hMSC s opakovanou intramuskulární aplikací hMSC a kombinaci těchto dvou způsobů aplikace.

Pro vyhodnocení terapeutického potenciálu implantovaných buněk je mimo jiné zásadní délka jejich přežívání. Zvláště v případě NP-iPS je délka přežívání důležitá pro jejich diferenciaci a integraci do degenerované míšní tkáně a sekreci neuroprotektivních faktorů. V případě intraspínální aplikace NP-iPS jsme pozorovali, že buňky přežívaly déle než 2 měsíce, nicméně po 4 měsících už nebyly nalezeny. Buňky měly tendenci diferencovat spíše

do gliálního fenotypu než neurálního. Po intratekální aplikaci hMSC SOD1^{G93A} potkanům jsme detekovali buňky po 14 dnech od implantace, zatímco ve zdravé potkaní tkáni hMSC přežily až 1 měsíc. Krátká doba přežívání hMSC po intratekální aplikaci byla pozorována i v jiných studiích (H. Kim et al., 2010; Vercelli et al., 2008). Z těchto výsledků vyplývá, že ALS prostředí je toxické pro transplantované buňky a zřejmě zhoršuje diferenciaci do neurálních typů buněk. Zvláště v případě MSC se neurální diferenciace zdá velmi nepravděpodobná a terapeutický efekt se připisuje jejich parakrinním vlastnostem. MSC vylučují celou řadu chemokinů, cytokinů a růstových faktorů, které mají imunomodulační, neurotrofní a neuroprotektivní účinek.

Jelikož neuromuskulární denervace předchází smrti MN a klinickým symptomům, zaměřili jsme se i na terapeutický efekt hMSC ve svalech, za účelem ochrany NMJ a snížení degenerace MN retrogradní neuroprotektivní projekcí přes axon. V případě intramuskulární aplikace však buňky přežily mezi svalovými vlákny pouze 7 dní, a to jak v ALS tkáni, tak i zdravé tkáni.

Navzdory krátkému přežívání hMSC v míše a svalech symptomatických SOD1^{G93A} potkanů jsme pozorovali jejich neuroprotektivní účinek jednak po samotné aplikaci do M tak v kombinaci s intramuskulární aplikací (M+S). Samotné opakované intramuskulární podání (S) nevedlo k významnému zpomalení degenerace MN, nicméně i přesto jsme pozorovali výrazné zlepšení motorické aktivity na testu rotarod a potkani po aplikaci déle přežívali. Nejlepší výsledky však vykazovala skupina potkanů po kombinaci opakovaného podání hMSC do M+S. V naší studii jsme pozorovali prodloužení životaschopnosti o 18 až 19 dní po kombinované aplikaci. Zatímco v přechodí studii, kde jsme aplikovali suspenzi buněk pouze jednou, jsme pozorovali prodloužení průměrné doby přežití zvířat přibližně o 13 dní (Forostyak et al., 2014). Tyto výsledky podporují hypotézu, že účinek zprostředkovaný buňkami je přechodný a opakovaná aplikace ho může prodloužit.

Neuroprotektivní účinek jsme pozorovali i po intraspinální aplikaci NP-iPS. Podání NP-iPS v případě symptomatické skupiny prodloužilo průměrnou dobu přežití o 19 dní, zatímco v případě aplikace buněk před projevem symptomů přežívala skupina až o 35 dní déle. Tyto výsledky naznačují, že dřívější podání buněk je mnohem efektivnější. Nicméně v tuto chvíli neexistuje žádný specifický marker pro diagnostiku ALS pacientů před projevem prvních příznaků a omezuje tak schopnost lékařů a vědců objektivně ohodnotit účinnost nových léčebných postupů (Ganesalingam & Bowser, 2010; Turner et al., 2009). Jedním z možných biomarkerů k diagnostice motoneuronové choroby by mohli být komponenty perineurálních sítí (PNN).

PNN jsou specializované struktury extracelulární matrix (ECM) obklopující těla určitých neuronů a proximálních dendritů v centrálním nervovém systému. Byl prokázán vysoký podíl míšních MN, zejména α -MN ve ventrálních rozích, obklopených PNN (Irvine & Kwok, 2018). PNN obklopující MN jsou složeny zejména z agrekanu, ale i brevikanu, neurokanu, verzikanu a fosfakanu (Matthews et al., 2002; Vitellaro-Zuccarello et al., 2007). Předchozí studie ukazují, že degradace PNN pozorovaná během progresu ALS může přispět k degeneraci MN a progresi onemocnění (Forostyak et al., 2014; Lemarchant et al., 2016). Nicméně naše výsledky ukazují, že v konečném stádiu ALS dochází ke zvýšení exprese specifických proteinů PNN jako je agrekan a tenascin R u $SOD1^{G93A}$ transgenních potkanů v porovnání s WT kontrolou. Dále jsme pozorovali zvýšení neurokanu, brevikanu, versikanu a Hapln1. Stejně tak byla pozorována snížená aktivita metaloproteinázy ADAMTS-4, která je specializována k degradaci CSPG v $SOD1^{G93A}$ experimentálním modelu (Lemarchant et al., 2016). Z těchto výsledků se zdá, že zvýšení exprese PNN složek a snížení aktivity specifického PNN degradačního enzymu by mohly být obranné mechanismy k zachování integrity PNN v ALS. Forostyak a kolegové prokázali, že intratekální aplikace MSC stabilizuje PNN v $SOD1^{G93A}$ míše transgenních potkanů (Forostyak et al., 2014). V návaznosti na tuto studii jsme sledovali efekt intraspinální aplikace NP-iPS na složky PNN. Pozorovali jsme, že po aplikaci NP-iPS dochází k zvýšení proteinů agrekanu, tenascin R, hapln1, zatímco versican je signifikantně snížen. Nicméně je potřeba více mnohem detailnějších studií k pochopení úlohy jednotlivých komponent PNN obklopujících MN u ALS.

Dalším modifikujícím enzymem ECM je MMP-9, který byl nedávno identifikován jako další determinanta selektivní neuronální zranitelnosti u $SOD1^{G93A}$ myši (Kaplan et al., 2014). MMP-9 je silně exprimovaný zranitelnými MN v porovnání s rezistentními. Podobně v další studii ukázali, že snížení exprese MMP-9 zpomalilo neuromuskulární degeneraci u myši s cytoplazmatickými agregáty TDP-43 v neuronech (Spiller et al., 2019). Všechny tyto důkazy ukazují, že ECM hraje důležitou roli v ALS a zřejmě i v selektivní zranitelnosti MN u tohoto onemocnění. Cirillo a jeho kolegové navrhují, že reaktivní glióza spustí aktivaci MMP a poté maladaptivní plasticitu zřejmě kvůli zvýšené degradaci neurotrofinu jako je NGF (Cirillo et al., 2016; De Luca et al., 2016). V naší studii jsme pozorovali snížení exprese nejen *NGF*, ale i *GDNF*, *IGF-1* a *NCAM* u $SOD1^{G93A}$ potkanů. Po aplikaci NP-iPS jsme pozorovali zvýšenou expresi *NGF* a *NCAM*. Můžeme spekulovat, že zvýšení exprese *NGF* může mít vliv na aktivaci MMP a tím stabilizaci ECM složek. Exprese *IGF-1* a *GDNF* byla normalizována aplikací NP-iPS. Dřívější studie poukazují na důležitou neuroprotektivní úlohu *GDNF* u ALS

(Suzuki et al., 2007). Lun a kolektiv zase prokázali, že zvýšená exprese *IGF-1* indukuje účinnější ochranu MN proti excitotoxicitě (Lunn et al., 2015). Nicméně zda snížení exprese některého z těchto faktorů pozměňuje expresi PNN je stále třeba prozkoumat.

Neuroprotektivní účinek aplikace NP-iPS může být způsoben jejich vlivem nejen na extracelulární PNN ale i ovlivněním buněčných signálních drah jako je apoptóza. V naší práci jsme pozorovali snížení exprese proapoptické *casp-3*. Nicméně se zdá, že tento antiapoptický efekt je pouze přechodný vzhledem k zvýšené expresi dalšího proapoptického genu *Bax*. V případě aplikace hMSC jsme studovali mnohem detailněji vliv buněk na signální dráhy buněčné smrti MN u ALS. Zaměřili jsme se na apoptózu, nekroptózu a autofágii.

Vnitřní dráha apoptózy je regulována proteiny tzv. Bcl-2 rodiny (Czabotar et al., 2014). Vzájemný poměr proapoptických (*Bax*, *Bak*) a antiapoptických proteinů (*Bcl-2*) navozuje a kontroluje permeabilizaci mitochondriální membrány. Převažující expresí proteinů *Bax* a *Bak* dochází k nevratnému spuštění apoptózy prostřednictvím jejich oligomerizace do mitochondriální membrány, což způsobí její permeabilizaci a uvolnění cytochromu c (*cyt c*) do cytoplazmy. *Cyt c* aktivuje *casp 9* a prostřednictvím aktivace různých kaspáz je aktivována *casp 3*. Vnější dráha apoptózy je závislá na aktivované *casp 8*, která poté aktivuje kaspázovou kaskádu (Morrice et al., 2017). Některé studie naznačují, že apoptóza je hlavní mechanismus smrti MN u *SOD1^{G93A}* ALS (Li et al., 2000; Cédric Raoul et al., 2002; Sathasivam & Shaw, 2005). Bylo prokázáno, že delece *Bax* a *Bak* zabránila axonální degeneraci a prodloužila přežití myši s ALS (Reyes et al., 2010). Zatímco nadměrná exprese antiapoptického *Bcl-2* zpomalila nástup onemocnění ALS, ale nezměnila délku průběhu onemocnění (čas od počátku do smrti) (Kostic et al., 1997). Na druhou stranu, inhibitor *casp-9* zpomalil progresi onemocnění bez zpoždění nástupu (Inoue et al., 2003). Ve studii po aplikaci hMSC jsme pozorovali pouze trend ve snížení exprese mRNA *casp 3*, *casp 9* a *Bak*. Zatímco na proteinové úrovni jsme po aplikaci hMSC pozorovali výrazné snížení *casp 9* u všech léčených skupin (M, S a M+S). Poměr *Bak/Bcl-2* >1 naznačuje indukci apoptózy. Poměr *Bak/Bcl-2* byl blízký 1 pouze po kombinované aplikaci hMSC, což podporuje hypotézu, že u *SOD1^{G93A}* potkanů dochází k indukci apoptózy, které může kombinovaná aplikace hMSC částečně zamezit.

Autofagie je důležitý homeostatický proces, který je zodpovědný za odstranění chybně složených a agregovaných proteinů. Zdá se, že na počátku onemocnění ALS má autofagie spíše pozitivní roli, zatímco v pozdějších fázích může působit negativně. *Beklin 1* je nezbytný regulátor autofagie a snížení jeho exprese vede k prodloužení životaschopnosti myši exprimujících mutantní *SOD1* (Nassif et al., 2014). Pozorovali jsme snížení exprese *beklinu-1*

a snížený poměr LC3BII/LC3BI ve skupině M+S v porovnání s PBS skupinou. Vzhledem k tomu, že beclin 1 je iniciátor autofágie a hladina LC3BII koreluje s tvorbou autofagosomu (Mizushima & Yoshimori, 2007), tak naše výsledky naznačují, že kombinovaná aplikace hMSC snižuje proces autofágie u symptomatických potkanů. Naopak, relativně vysoká hladina beclinu 1 a poměru LC3BII/LC3BI v S skupině by mohla odpovídat aktivní autofágii, což by mohlo být pro zvířata škodlivé. Na histologických vzorcích sice byla detekována akumulace p62 v MN jak v SOD1 skupině a i ve skupině po aplikaci MSC do M+S. Nicméně pomocí WB jsme nepozorovali výrazné změny v proteinové expresi p62 mezi PBS a WT skupinou, což naznačuje, že autofágie není defektní a to ani v SOD1 skupině po aplikaci PBS.

Na rozdíl od apoptózy nebo autofágie, nekroptóza je charakterizována zvětšením objemu buňky, poškozením plazmatické membrány, nabobtnanými organelami, narušenou plazmatickou membránou a není pozorována kondenzace chromatinu (Vandenabeele et al., 2010). Aktivace RIP1 a RIP3 kinázy vede k tvorbě nekrosomu a fosforylaci MLKL. Nekroptóza je iniciována fosforylací MLKL a jeho translokací do plazmatické membrány. Avšak casp 8 je schopna rozštěpit RIP1 a RIP3, čímž účinně ukončuje nekroptózu (L. Sun et al., 2012). Nízké hladiny casp 8 v kombinaci s dostatečnou hladinou RIP3 a MLKL umožňují aktivaci nekroptózy. Po kombinované aplikaci hMSC bylo pozorováno snížení hladiny mRNA nekroptických genů (RIPK1, MLKL a casp-8), nicméně nebylo signifikantní. Na rozdíl od exprese mRNA, kombinovaná aplikace hMSC signifikantně snížila hladinu proteinů jak cI-casp 8 tak RIP1. Re naznačuje, že aktivaci komponent zapojených do nekroptózy u MN zprostředkovávají mutované astrocyty exprimující SOD1^{G93A} (Re et al., 2014). Nedávná studie však zpochybňuje nekroptózu jakožto primární buněčnou smrt MN (Dermentzaki et al., 2019). Zjistili, že navzdory změnám v expresi klíčových determinant nekroptózy v ALS míše, cílení na RIPK3 sice zabraňuje smrti MN *in vitro* modelech nikoliv však *in vivo*. Je potřeba více studií, které by vysvětlily roli nekroptózy v neurodegeneraci ALS.

Dále jsme sledovali úroveň exprese mRNA NF-kB. Zánětlivý faktor NF-kB zprostředkovává zánět prostřednictvím TNF- α a dalších zánětlivých cytokinů (J.-F. Liu et al., 2017). Jeho aktivace určuje zánětlivý fenotyp mikroglíí u ALS (Frakes et al., 2014), zatímco jeho inhibice může zpomalit progresi onemocnění (Gowing et al., 2006). Exprese mRNA NF-kB a TNF- α byly sníženy po aplikaci hMSC do M+S. Naše výsledky jsou v souladu s dřívějšími zveřejněnými studiemi, které ukazují, že hMSC mohou bránit aktivaci mikroglíí (Boido et al., 2014; Boucherie et al., 2009; Vercelli et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že astrocyty hrají klíčovou roli v patogenezi ALS, chtěli jsme zjistit, jestli aplikace MSC ovlivňuje nejen MN, ale i astrocyty. Je známo, že astrocyty mění

svůj expresní profil a morfologii u ALS (Parpura et al., 2012). Takovéto astrocyty nazýváme reaktivní, vyznačují se zvýšenou expresí GFAP (Yamanaka & Komine, 2018) a stávají se toxické pro MN u ALS. V souladu s tímto faktem jsme pozorovali u PBS skupiny zvýšenou expresi GFAP. Kombinovaná aplikace hMSC snížila expresi GFAP, nicméně snížení nebylo signifikantní. Dalším z charakteristických znaků škodlivých astrocytů je vysoká exprese konexinu 43 (Cx43). Astrocyty jsou vzájemně propojeny Cx43 a zajišťují zásadní homeostatickou funkci v CNS. Zvýšená hladina Cx43 v ALS astrocytech je částečně toxická pro MN prostřednictvím zvýšení intracelulárního vápníku (Almad et al., 2016). Aplikace hMSC do M+S signifikantně snížila expresi Cx43, což naznačuje, že neuroprotektivní účinek buněčné terapie může být zprostředkovaný prostřednictvím gliálních buněk. Na plné pochopení mechanismů účinku buněčné terapie je potřeba podrobnější analýza role astrocytů a mikroglíí.

Závěrem lze říci, že opakovaná aplikace hMSC způsobila zlepšení hned v několika parametrech. Změny jsme pozorovali i v expresi proteinu synaptofyzinu ve svalech, kde opakovaná aplikace MSC do M+S způsobila jeho zvýšení a částečně pozastavila degeneraci NMJ. Je překvapivé, že samotná intramuskulární aplikace nevykazovala žádný pozitivní efekt na NMJ. Na rozdíl od naší studie, Rando a kolegové pozorovali, že samotná aplikace MSC vedla k delšímu přežívání léčené skupiny, zlepšení motorických funkcí a pomalejší degeneraci MN pravděpodobně díky zvýšené expresi neurotrofních faktorů jako je GDNF a NT4 v kosterním svalu (Rando et al., 2018). Jedním z důvodů těchto odlišných výsledků může být přežití buněk ve svalech pouze 1 týden, zatímco Rando a jeho kolegové detekovali buňky i po 5 týdnech (Rando et al., 2018). Pokud budeme brát v potaz, že axonální degenerace a ztráta buněčných těl MN jsou dvě odlišné události, je pak racionální, že nejlepší výsledky jsme pozorovali po kombinované aplikaci do M+S.

6.2 MMEJ přispívá ke zvýšení genomické stability u nízkých pasáží hESC v *in vitro* podmínkách

Potenciální použití hESC v klinické praxi pro léčbu neurodegenerativních onemocnění je spojováno nejen s etickými otázkami týkajícími se původu a izolací hESC, ale i s rizikem maligní transformace. Během dlouhodobé kultivace se hESC adaptují na kultivační podmínky, což přináší řadu chromozomových abnormalit, které mohou mít onkogenní charakter. Prokázalo se, že hPSC mají zvýšenou bazální hladinu γ H₂AX (marker DSB) v porovnání s diferencovanými buňkami (Vallabhaneni et al., 2018). Zdá se, že zvýšená

rychlost proliferace PSC může být příčinou zvýšené hladiny $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, které mohou být potenciálním zdrojem chromozomových přestaveb pozorovaných u vyšších pasáží PSC. O mechanismech přispívajících k vnitřnímu poškození DNA v PSC a jakým způsobem PSC reagují na toto poškození je zatím známo jen málo. Pro jejich bezpečné využití je důležité pochopit, jakým způsobem reagují na poškození DNA jak na počátku, tak i po delší kultivaci v podmínkách *in vitro*.

Předmětem našeho výzkumu bylo zjistit, jakým způsobem se hESC vyrovnávají s poškozením DNA právě na počátku kultivace. V předchozí studii bylo zjištěno, že v průběhu opravy pomocí BER u nízkých pasáží hESC vznikají jako meziprodukt DSB (Krutá et al., 2013). Avšak nezdá se, že by hESC při zvýšeném množství vzniku tohoto typu DSB podléhaly apoptóze, což zdůrazňuje význam opravných mechanismů vzhledem k pozorované nízké frekvenci mutací u PSC na počátku kultivace (Adams et al., 2010; Luo et al., 2012; Momcilovic et al., 2010).

Řada publikací naznačuje vyšší účinnost opravných mechanismů u hESC, což je spojeno s vyšší expresí proteinů zapojených do reparačních mechanismů (Adams et al., 2010; Luo et al., 2012; Momcilovic et al., 2010). Ke sledování, jaký opravný mechanismus buňky volí, jsme nejprve hESC vystavili ionizujícímu záření (IR). Bylo zjištěno, že IR vytváří seskupené oxidační poškození (Sutherland et al., 2000), které je rychle přeměněno na DSB buď spontánně (Gulston, 2004) a nebo BER (Chan et al., 2007; Krutá et al., 2013). Naše výsledky ukazují, že nejvyšší množství DSB je 30 minut po indukci IR, z toho 60% je meziprodukt BER (Krutá et al., 2013). Vzhledem k tomu, že po 1 hodině už nejsou DSB detekovány, zdá se nepravděpodobné, že by byly opraveny pomocí časově náročné HR. Jedním z klíčových proteinů účastnících se volby, jakým způsobem budou DSB opraveny je 53BP1, který inhibuje HR a podporuje NHEJ. Zjistili jsme, že nejvyšší množství shluků 53BP1 v kolokalizaci s $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ bylo detekováno 30 minut po indukci IR, zatímco Rad51 začal kolokalizovat s $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ později po 7-10 hodinách po indukci IR. Tyto výsledky potvrzují naši původní hypotézu, že převážná většina časně vytvořených DSB není opravena HR. 53BP1 podporuje opravu poškozené DNA nejen kanonickou NHEJ ale i jeho alternativní dráhou, mikrohomologií zprostředkované spojení konců (MMEJ) (Xiong et al., 2015). Pomocí různých inhibitorů jsme sledovali, který z mechanismů je první volbou hESC k opravě DSB. Naše výsledky ukázaly, že většina DSB byla opravena za pomoci PARP1 a ligazy 3, která je součástí opravné dráhy MMEJ. Zatímco po inhibici PKcs, které se účastní NHEJ, jsme nepozorovali zvýšené množství $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, což naznačuje, že se na časně opravě těchto DSB nepodílí. Tyto výsledky jsou v souladu se studií, ve které ukazují, že k aktivaci NHEJ u hESC

došlo až po 2 hodinách po indukci IR (Asaithamby & Chen, 2009). Analýzou frekvence mutací jsme zjistili, že v případě spontánního poškození inhibice NHEJ zvyšuje frekvenci mutací, zatímco po indukci IR došlo inhibicí NHEJ ke snížení MF. Inhibicí MMEJ pomocí siRNA Lig3 jsme pozorovali zvýšení frekvence mutací jak u spontánního poškození, tak indukovaného. Zdá se, že MMEJ je méně mutagenní, vezmeme-li v úvahu strukturu DSB zlomů uvolněných mechanismem BER z nahloučeného oxidativního poškození. Apurinní endonukleáza vytváří zlomy 8-10 párů bází od sebe (Nakamura & Swenberg, 1999). MMEJ je závislý na mikrohomologii 5-25pb, použitím tohoto mechanismu nedojde tedy ke ztrátě genetické informace na rozdíl od NHEJ, u kterého dochází k otupení jednořetězcových přesahů a tedy k delecím. Překvapivým zjištěním této práce tedy je, že MMEJ je u hESC za daných podmínek (vysoká efektivita BER; majoritní poškození je oxidace bází) méně mutagenní mechanismus než NHEJ.

6.3 Magnetické nanočástice PLL- γ -Fe₂O₃ jsou vhodné ke značení NP-iPS a sledování pomocí MR

Ke zhodnocení účinné aplikace a terapeutického potenciálu kmenových buněk je nutné sledovat jejich chování v *in vivo* podmínkách. Takovéto monitorování v reálném čase nám poskytne cenné informace o jejich přežití, migraci, dělení, diferenciaci a regenerativním potenciálu transplantovaných buněk v příjemci.

Sledování pomocí MR se zdá být optimální metodou ke studiu osudu transplantovaných buněk. Velkou předností MR je, že se jedná o metodu neinvazivní a ve své podstatě nabízí vysoké prostorové rozlišení a nevyžaduje k detekci ionizující záření. Nicméně jedná se o metodu detekce s relativně nízkou citlivostí, proto je nutné buňky označit kontrastními látkami. Superparamagnetické nanočástice na bázi oxidu železa jsou jedny z nejčastěji používaných kontrastních látek při zobrazování buněk pomocí MR. Tyto nanočástice se vyznačují vysokou magnetizací, relaxivitou a biokompatibilitou. Feromagnetické nanočástice mohou mít až třikrát vyšší relaxivitu a magnetizaci než superparamagnetické nanočástice (Pollert et al., 2010), nicméně přidání dalších kovových iontů jako kobaltu, zinku a manganu může ovlivnit jejich biokompatibilitu a zvýšit toxicitu (Kaman et al., 2017; Veverka et al., 2007, 2014). Je nutné, aby magnetické nanočástice použité ke zvýšení kontrastu během monitorování MR splňovaly nejen vysokou magnetizaci a relaxivitu, ale aby byly biokompatibilní a netoxické, jak pro samotné transplantované buňky, tak i pro příjemce.

V této studii jsme testovali účinek dvou typů magnetických nanočástic, superparamagnetických PLL- γ -Fe₂O₃ a feromagnetických CZF a jejich vliv na viabilitu NP-iPS a jejich proliferační a diferenciační potenciál do dopaminergních neuronů. V předchozích studiích byl testován efekt těchto nanočástic hlavně na potkaních nebo lidských MSC *in vitro* a *in vivo* či nádorových buňkách *in vitro* (Babic et al., 2008; Horák et al., 2009; Novotna et al., 2012).

Prokázali jsme, že CZF nanočástice signifikantně zhoršují buněčnou proliferaci NP-iPS i v případě použití nejnižší koncentrace (5 μ g Fe/ml). Negativní efekt CZF nanočástic na buněčnou proliferaci NP-iPS byl pozorován už během prvních pár hodin inkubace a přetrval více než 40 hodin. Je zajímavé, že u potkanních MSC (rMSC), buněk nádoru prostaty a glioblastomů bylo potřeba použít mnohem vyšší koncentraci nanočástic (0,55mM a 0,9mM), aby došlo k negativnímu ovlivnění buněčného růstu (Herynek et al., 2019; Novotna et al., 2016). Naše výsledky naznačují vyšší citlivost NP-iPS k CZF nanočásticím v porovnání s odlišnými buněčnými typy. Tento rozdíl by mohl být způsobený odlišnou citlivostí buněk na oxidační poškození. Bylo prokázáno, že nanočástice oxidu železa zvyšují riziko oxidačního poškození lipidů, proteinů a DNA (Novotna et al., 2012) a přidání dalších kovových iontů může způsobit další problémy. Na druhou stranu PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástice zpomalily proliferaci NP-iPS pouze v případě použití nejvyšší koncentrace (15 μ g Fe/ml). Nižší koncentrace PLL- γ -Fe₂O₃ neměly vliv na buněčnou proliferaci NP-iPS.

K vyhodnocení internalizace magnetických nanočástic byla použita TEM, která prokázala přítomnost nanočástic uvnitř endozomů nebo lysozomů v cytoplazmě, jak v nediferencovaných NP-iPS, tak v diferencovaných buňkách značených jak CZF, tak PLL- γ -Fe₂O₃. Správná internalizace nanočástic je velmi důležitá, protože mohou ulpívat na buněčném povrchu a mít tak vliv na buněčné prostředí (Sykova & Jendelova, 2007). Naše výsledky ukazují, že téměř 88% buněk bylo označeno pomocí PLL- γ -Fe₂O₃, zatímco pomocí CZF pouze necelých 72% při použití nejnižší koncentrace (5 μ g Fe/ml). Vyšší účinnost internalizace nanočástic může být způsobena PLL povrchem (Babic et al., 2008; Pongrac et al., 2016) a vysoká účinnost značení těmito nanočásticemi byla pozorována i u jiných buněčných typů např. rMSC, hMSC a neurálních kmenových buněk (NSC) (Novotna et al., 2012; Pongrac et al., 2016).

Účinnost značení korelovala s množstvím železa v buňkách. Chemická analýza obsahu železa pomocí ICP-MS odhalila vyšší intracelulární koncentraci železa v buňkách označených PLL- γ -Fe₂O₃ než v CZF značených buňkách. Množství železa se zvyšovalo v závislosti na použité koncentraci nanočástic PLL- γ -Fe₂O₃ v rozmezí od 7-22 pg Fe na buňku, zatímco

v případě CZF nanočástic se množství železa pohybovalo kolem 3 pg Fe na buňku. Ani při zvyšování koncentrace nanočástic CZF nebyly pozorovány rozdíly v množství železa, kobaltu a zinku. Bylo zjištěno, že minimální koncentrace železa, jež je vyžadována pro detekci nanočástic pomocí MR, je 1,4-3 pg Fe na buňku (Heyn et al., 2005). Z tohoto důvodu je toto množství stále relativně vysoké pro detekci *in vivo*, ačkoliv obsah železa byl u CZF značených NP-iPS nižší ve srovnání PLL- γ -Fe₂O₃.

Kromě účinnosti značení a množství intracelulárního železa je pro detekci buněk pomocí MR důležitá efektivita kontrastních látek vyjádřena hodnotami relaxivity r_1 a r_2 , které popisují schopnost snížit T_1 a T_2 relaxační časy protonů vody, což se projeví změnou intenzity signálu na MR skenu. K ověření vizualizace označených buněk pomocí MR byly NP-iPS imobilizovány ve 4% želatinovém gelu. Naše data ukazují, že použité nanočástice dosáhly srovnatelné hodnoty relaxivity v 4% želatinovém gelu v závislosti na koncentraci nanočástic. Buňky označené PLL- γ -Fe₂O₃ dosáhly přibližně dvojnásobné hodnoty relaxivity v porovnání s CZF označenými buňkami, což odpovídá vyšší účinnosti značení a vyššímu intracelulárnímu množství železa v PLL- γ -Fe₂O₃ označených NP-iPS. Nicméně i přesto naměřená hodnota relaxivity u NP-iPS s PLL- γ -Fe₂O₃ nanočásticemi byla nižší než u označených rMSC a hMSC, což by odpovídalo vyšší schopnosti endocytózy nanočástic MSC (Babic et al., 2008; Novotna et al., 2012). Během diferenciaci docházelo ke snížení MR signálu, což může být způsobeno asymetrickým dělením buněk, a tudíž nerovnoměrné distribuci nanočástic. Toto rozředování přijatých nanočástic se projevuje nejen u diferencujících buněčných linií, ale setkáme se s ním i u linií, které velmi rychle proliferují. Nicméně v *in vivo* podmínkách se může buněčný replikační potenciál snížit a částečně redukovat zředování nanočástic (Park et al., 2002; Pluchino et al., 2003).

Dalším cílem studie bylo vyhodnotit efekt nanočástic na diferenciaci potenciál NP-iPS do dopaminergních neuronů *in vitro*. Riziko potenciální karcinogeneze iPS může být sníženo diferenciací těchto buněk. Jedním z cílů buněčné terapie je transplantace dopaminergních neuronů u pacientů s Parkinsonovou chorobou (Hawkes et al., 2010; Yan et al., 2005). Existuje celá řada diferenciaci protokolů s použitím různých specifických induktorů.

V tomto případě jsme NP-iPS diferencovali do dopaminergních neuronů podle čtrnáctidenního protokolu. Po 2 týdnech *in vitro* diferenciaci buňky vykazovaly neurální morfologii, převážná většina buněk byla pozitivních na časný neurální marker β -III-tubulin a méně než 2% buněk byla pozitivní na astrocytový marker GFAP. Nicméně pouze 8% buněk bylo pozitivních na dopaminergní neurální marker TH a na synaptofyzin, membránový

glykoprotein, který je nezbytný pro tvorbu synapsí. Zdá se, že nízké procento terminálně diferencovaných buněk může být způsobeno pomalou diferenciací dopaminergních neuronů v podmínkách *in vitro* (Hartfield et al., 2014; Yan et al., 2005).

Pomocí qPCR jsme sledovali vliv nanočástic na expresi neuronálních markerů a transkripčních faktorů regulujících diferenciaci do dopaminergních neuronů (*FOXA2*, *EN1*, *NURR1*). *FOXA2* má důležitý vliv nejen na specifikaci a časný vývoj dopaminergních neuronů, ale hraje důležitou roli i v pozdějších fázích dozrávání/udržování dopaminergních neuronů (Ferri et al., 2007; Lin et al., 2009; Stott et al., 2013). *EN1* a *EN2* jsou nezbytné pro přežití a udržení zralých DA neuronů (Simon et al., 2001). Transkripční faktor *NURR1* je důležitý pro transkripční aktivaci genů nezbytných pro signalizaci dopaminu, jako je např. *TH* (Saucedo-Cardenas et al., 1998; Zetterström, 1997). Expresie transkripčních faktorů *EN1*, *NURR1* a enzymu *TH* byla zvýšena v neznačených diferencovaných buňkách a použité PLL- γ -Fe₂O₃ nebo CZF nanočástice neměly vliv na expresi těchto genů v diferencovaných buňkách. Nicméně CZF nanočástice negativně ovlivnily expresi genu *FOXA2*. Vzhledem k tomu, že *FOXA2* je regulátor SHH signalizace (Mavromatakis et al., 2011), je možné, že CZF nanočástice mohou tuto cestu ovlivňovat.

Celkově naše výsledky ukazují, že nanočástice PLL- γ -Fe₂O₃ se zdají být vhodnější než CZF nanočástice. Vzhledem k tomu, že neovlivňují viabilitu, proliferační a diferenciací potenciál NP-iPS a značení se zdá být dostatečné pro detekci *in vivo* pomocí MR. Nicméně jsou potřeba další experimenty s těmito nanočásticemi na experimentálních modelech neurodegenerativních chorob *in vivo*.

7 Závěr

Hypotéza 1: Předpokládáme, že opakovaná aplikace MSC do míchy v kombinaci s opakovanou aplikací hMSC do svalu zvýší neuroprotektivní účinek těchto buněk u SOD1^{G93A} potkanů. Zesílení tohoto efektu by mohlo být způsobeno modifikací jednou ze tří signálních drah buněčné smrti v míše SOD1^{G93A} potkanů.

Cíl 1: Prokázali jsme, že kombinace opakovaného intraspinálního a intramuskulárního podání hMSC zlepšila motorické a lokomoční schopnosti, prodloužila přežívání, zpomalila degeneraci MN, NMJ, expresi reaktivních astrocytů a konexinu 43. Dále jsme pozorovali snížení exprese některých proteinů apoptózy (cl-casp 9), nekroptózy (Rip1, cl-casp 8) a autofágie (beklin 1).

Hypotéza 2: Předpokládáme, že NP-iPS mohou integrovat do hostitelské tkáně ve větším měřítku než MSC, což by mohlo vést k zesílení regenerace přímým kontaktem a stabilizaci PNN chránících MN před toxickým ALS prostředím.

Cíl 2: Prokázali jsme, že intraspinální aplikace NP-iPS má neuroprotektivní a antiapoptický efekt, zlepšuje motorické a lokomoční schopnosti, prodlužuje přežití a ovlivňuje expresi PNN v míše SOD1^{G93A} potkanů.

Hypotéza 3: Předpokládáme, že opravné mechanismy hrají důležitou roli v potenciální malignitě hESC. Detailnější pochopení, jak se hESC vyrovnávají s poškozením DNA, může přispět k jejich budoucímu bezpečnému využití v regenerativní medicíně.

Cíl 3: Zjistili jsme, že nízké pasáže hESC opravují DSB pomocí ligázy 3, která by mohla být součástí MMEJ opravného mechanismu a tím zvyšuje stabilitu genomu hESC.

Hypotéza 4: Magnetické nanočástice CZF a PLL- γ -Fe₂O₃ užívané jako kontrastní látky pro monitorování buněk pomocí MR mohou ovlivnit buněčnou aktivitu NP-iPS a jejich diferenciační potenciál.

Cíl 4: Prokázali jsme, že PLL- γ -Fe₂O₃ jsou vhodnější pro značení NP-iPS než CZF nanočástice. Neovlivňují jejich proliferaci a diferenciaci do dopaminergních neuronů. Zároveň

po značení vykazovali dostatečnou schopnost detekce pomocí MR. Nicméně je potřeba dalších experimentů ke zhodnocení jejich chování v podmínkách in vivo.

8 Souhrn

Naše výsledky ukazují, že opakované intratekální podání hMSC v kombinaci s opakovanou aplikací hMSC do svalů zpomalí degeneraci MN v míše a NMJ u SOD1^{G93A} potkanů nejen snížením exprese některých proteinů podílejících se na signalizaci apoptózy a autofágie, ale i redukcí exprese proteinů zapojených do další programované buněčné smrti jako je nekroptóza. Pozorovali jsme zlepšení motorických a lokomočních schopností potkanů a kombinovaná aplikace hMSC vedla k prodloužení průměrné doby přežití SOD1^{G93A} potkanů. Zlepšení klinických projevů SOD1^{G93A} potkanů a prodloužení jejich průměrné doby přežití bylo zaznamenáno i po samotném opakovaném intratekálním podání hMSC a nebo jen po opakované intramuskulární aplikaci buněk do *quadriceps femoris*, nicméně na buněčné a molekulární úrovni jsme nedetekovali žádné významné zlepšení. Kombinovaná aplikace hMSC vedla i ke snížení reaktivity astrocytů a snížení exprese astrocytového konexinu 43, který zajišťuje hlavní homeostatické funkce a jeho zvýšení je spojeno s degenerací MN u ALS. Nicméně pro lepší pochopení působení hMSC na aktivitu gliálních buněk u ALS je potřeba více studií s detailnější analýzou.

V další studii potvrzujeme, že jedním z patogenních mechanismů u ALS je dezorganizace PNN v míše SOD1^{G93A} potkanů. Pomocí intraspinální aplikace NP-iPS dochází k změně exprese některých komponent v PNN. Nicméně úlohu jednotlivých složek PNN u ALS je potřeba ještě vysvětlit. Intraspinální aplikace NP-iPS prodloužila přežití potkanů a zlepšila jejich motorické schopnosti. Toto zlepšení přisuzujeme antiapoptickému efektu NP-iPS a jejich sekreci neurotrofních faktorů.

Lidské embryonální kmenové buňky (hESC) se zdají být také vhodní kandidáti v buněčné terapii neurodegenerativních onemocnění. Nicméně genomová nestabilita těchto buněk je významnou překážkou pro bezpečné potenciální využití hESC v klinické praxi. Ve třetí studii jsme sledovali, jakým způsobem se hESC vyrovnávají s poškozením DNA v podmínkách *in vitro*. Zjistili jsme, že na počátku kultivace hESC jsou nebezpečné dvouřetězcové zlomy opravovány pomocí ligázy 3 zapojené do MMEJ a ne NHEJ nebo HR, která na opravu vyžaduje více času. Dalším našim zjištěním bylo, že s aktivací MMEJ klesá frekvence mutací u hESC a je tak jedním z dominantních opravných mechanismů v udržování jejich počáteční genomové stability.

Dlouhodobé sledování biologického chování aplikovaných kmenových buněk je nezbytné pro vyhodnocení jejich potenciálního terapeutického účinku. V poslední studii jsme zjistili, že nanočástice PLL- γ -Fe₂O₃ jsou vhodné pro značení NP-iPS a pro neinvazivní

sledování těchto buněk pomocí MR Nízké koncentrace PLL- γ -Fe₂O₃ neovlivnily proliferační a diferenciační potenciál NP-iPS, zatímco na CZF nanočástice reagovaly buňky citlivěji. Nicméně pro potvrzení bezpečného použití PLL- γ -Fe₂O₃ nanočástic jsou nutné další studie sledující jejich efekt v podmínkách *in vivo*.

9 Summary

Our results show that repeated intrathecal administration of hMSC in combination with repeated administration of hMSC into muscle rescues spinal cord MN and NMJ in SOD1^{G93A} rats not only by reducing the expression of some proteins involved in signaling apoptosis and autophagy pathway, but also by reducing the expression of proteins involved in another programmed cell death pathway such as necroptosis. We observed an improvement in the motor and locomotor abilities of the rats and the combined administration of hMSC resulted in an increase in the mean survival time of the SOD1^{G93A} rats. Improvements in clinical manifestations of SOD1^{G93A} rats and prolongation of their mean survival were noted even after repeated intrathecal administration of hMSC alone or after repeated intramuscular administration of cells to quadriceps femoris, however, we did not detect any significant improvement at the cellular and molecular levels. Our results confirm the hypothesis that the beneficial effect of hMSC administration is only transient and can be amplified after repeated administration. The combined administration of hMSC also resulted in a decrease in astrogliosis and a decrease in the expression of astrocytic connexin 43, which provides major homeostatic functions and is associated with MN degeneration in ALS. However, more studies with more detailed analysis are needed to better understand the effect of MSC on glial cell activity in ALS.

In another study, we confirm that one of the pathogenic mechanisms in ALS is the disorganization of PNN in the spinal cord of SOD1^{G93A} rats. Intraspinal application of NP-iPS changes the expression of some components in PNN. However, the role of the individual PNN components in ALS remains to be explained. Intraspinal administration of NP-iPS prolonged rat survival and improved motor skills. This improvement is attributed to the anti-apoptotic effect of NP-iPS and their secretion of neurotrophic factors.

Human embryonic stem cells (hESC) could be promising candidates for cell therapy in neurodegenerative diseases. However, the genomic instability of these cells is a significant obstacle to the safe potential use of PSC in clinical practice. In the third study, we assessed how hESC repair DNA damage in vitro. We found that at the beginning of hESC cultivation, double-stranded breaks with MMEJ and NHEJ and not HR are dangerous, requiring more time for repair. Another finding was that with the activation of MMEJ, the frequency of mutations in hESC decreased and is thus one of the dominant repair mechanisms in maintaining their genomic stability.

Long-term monitoring of the fate of the applied stem cells is necessary to evaluate their potential therapeutic effect. In our last study, we found that PLL- γ -Fe₂O₃ nanoparticles are suitable for NP-iPS labeling and non-invasive magnetic resonance imaging of these cells. Low concentrations of PLL- γ -Fe₂O₃ did not affect the proliferation and differentiation potential of NP-iPS, whereas cells responded more sensitively to CZF nanoparticles. However, the suitability of PLL- γ -Fe₂O₃ nanoparticles for long-term non-invasive cell monitoring needs to be confirmed under in vivo conditions.

10 Publikace autorky

Publikace, které jsou podkladem práce:

Řehořová M., Vargová I., Forostyak S., Vacková I., Turnovcová K., Kupcová Skalníková H., Vodička P., Kubinová Š., Syková E., Jendelová P.: A Combination of Intrathecal and Intramuscular Application of Human Mesenchymal Stem Cells Partly Reduces the Activation of Necroptosis in the Spinal Cord of SOD1^{G93A} Rats. *Stem Cells Transl Med.* 2019 Jun;8 (6):535-547. **IF 5.962**

Podíl autorky: operace a implantace, behaviorální testy, mikroskopie, histologické a imunohistochemické analýzy, PCR, western blot, analýzy dat a statistika, psaní článku

Forostyak S., Forostyak O., Kwok J., Romanyuk N., **Řehořová M.**, Dayanithi G., Raha-Chowdhury R., Jendelová P., Syková E., Fawcett J.: Grafting of human iPS-derived neural precursors preserve perineuronal nets and stimulate adult neural plasticity. **Submitted**

Podíl autorky: operace a implantace, behaviorální testy, kultivace a diferenciaci NP-iPS

Jiráková K., **Šeneklová M.**, Jiráček D., Turnovcová K., Vosmanová M., Babič M., Horák D., Veverka P., Jendelová P.: The effect of magnetic nanoparticles on neuronal differentiation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors. *Int J Nanomedicine.* 2016 Nov 24; 11:6267-6281. **IF 4.471**

Podíl autorky: kultivace, diferenciaci a značení NP-iPS, PCR, analýza dat a statistika

Kohutová A., Raška J., Krutá M., **Šeneklová M.**, Bárta T., Fojtík P., Juráková T., Walter CA, Hampl A., Dvořák P., Rotrekl V.: Ligase 3-mediated end-joining maintains genome stability of human embryonic stem cells. *FASEB J.* 2019 Jun;33(6):6778-6788. **IF 5.391**

Podíl autorky: kultivace hES, imunocytochemické barvení (částečně), analýza frekvence mutací, průtoková cytometrie

Další publikace autorky:

Krutá M., **Šeneklová M.**, Raška J., Salykin A., Zerzánková L., Pešl M., Bártová E., Franek M., Baumeisterová A., Košková S., Neelsen KJ, Hampl A., Dvořák P., Rotrekl V.: Mutation frequency dynamics in HPRT locus in culture-adapted human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells correspond to their differentiated counterparts. *Stem Cells Dev.* 2014 Oct 15; 23(20):2443-54. **IF 3.147**

Chudičková M., Vacková I., Machová Urzíková L., Jančová P., Kekulová K., **Řehořová M.**, Turnovcová K., Jendelová P., Kubíková Š.: The Effect of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in the Treatment of a Rat Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 12; 20(18). **IF 4.183**

11 Literatura

1. Abyzov, A., Mariani, J., Palejev, D., Zhang, Y., Haney, M. S., Tomasini, L., ... Vaccarino, F. M. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*. (2012), 492(7429), 438–442.
2. Adams, B. R., Golding, S. E., Rao, R. R., & Valerie, K. Dynamic dependence on ATR and ATM for double-Strand break repair in human embryonic stem cells and neural descendants. *PLoS ONE*. (2010), 5(4) doi:10.1371/journal.pone.0010001.
3. Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., ... Zhang, W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology*. (2007), 25(7), 803–16.
4. Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. XLF interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*. (2006), 124(2), 301–313.
5. Alami, N. H., Smith, R. B., Carrasco, M. A., Williams, L. A., Winborn, C. S., Han, S. S. W., ... Taylor, J. P. Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations. *Neuron*. (2014), 81(3), 536–543.
6. Almad, A. A., Doreswamy, A., Gross, S. K., Richard, J.-P., Huo, Y., Haughey, N., & Maragakis, N. J. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*. (2016), 64(7), 1154–1169.
7. Amps, K., Andrews, P., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., ... Dalton, A. Screening a large, ethnically diverse population of human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon that confers a growth advantage. *Nature Biotechnology*. (2012), 29(12), 1132–1144.
8. Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., ... Oda, T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2006), 351(3), 602–611.
9. Asaithamby, A., & Chen, D. J. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose γ -irradiation. *Nucleic Acids Research*. (2009), 37(12), 3912–3923.
10. Babic, M., Horák, D., Trchová, M., Jendelová, P., Glogarová, K., Lesný, P., ... Syková, E. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate Chemistry*. (2008), 19(3), 740–50.
11. Baleriola, J., & Hengst, U. Targeting Axonal Protein Synthesis in Neuroregeneration and Degeneration. *Neurotherapeutics*. (2015), 12(1), 57–65.
12. Becker, K. A., Ghule, P. N., Therrien, J. A., Lian, J. B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of Cellular Physiology*. (2006), 209(3), 883–893.
13. Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. (1994), 330(9), 585–591.
14. Bhandari, R., Kuhad, A., & Kuhad, A. Edaravone: a new hope for deadly amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs of Today*. (2018), 54(6), 349.
15. Bleicken, S., Landeta, O., Landajuela, A., Basañez, G., & García-Sáez, A. J. Proapoptotic Bax and Bak Proteins Form Stable Protein-permeable Pores of Tunable Size. *Journal of Biological Chemistry*. (2013), 288(46), 33241–33252.
16. Boido, M., Piras, A., Valsecchi, V., Spigolon, G., Mareschi, K., Ferrero, I., ... Vercelli, A. Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.

- Cytotherapy*. (2014), 16(8), 1059–72.
17. Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., ... Cleveland, D. W. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. (2006), 312(5778), 1389–1392.
 18. Boucherie, C., Schäfer, S., Lavand'homme, P., Maloteaux, J.-M., & Hermans, E. Chimerization of astroglial population in the lumbar spinal cord after mesenchymal stem cell transplantation prolongs survival in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*. (2009), 87(9), 2034–2046.
 19. Brady, N., Gaymes, T. J., Cheung, M., Mufti, G. J., & Rassool, F. V. Increased error-prone NHEJ activity in myeloid leukemias is associated with DNA damage at sites that recruit key nonhomologous end-joining proteins. *Cancer Research*. (2003), 63(8), 1798–1805.
 20. Brockington, A., Ning, K., Heath, P. R., Wood, E., Kirby, J., Fusi, N., ... Shaw, P. J. Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: Motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta Neuropathologica*. (2013), 125(1), 95–109.
 21. Bruijn, L. I. Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. *Science*. (1998), 281(5384), 1851–1854.
 22. Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., ... Cleveland, D. W. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*. (1997), 18(2), 327–338.
 23. Bulte, J. W. M., & Kraitchman, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine*. (2004), 17(7), 484–499.
 24. Buratti, E., & Baralle, F. E. Characterization and Functional Implications of the RNA Binding Properties of Nuclear Factor TDP-43, a Novel Splicing Regulator of CFTR Exon 9. *Journal of Biological Chemistry*. (2001), 276(39), 36337–36343.
 25. Callen, E., Di Virgilio, M., Kruhlak, M. J., Nieto-Soler, M., Wong, N., Chen, H. T., ... Nussenzweig, A. 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell*. (2013), 153(6), 1266–1280.
 26. Catalina, P., Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., de la Cueva, T., Bueno, C., ... Menendez, P. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Molecular Cancer*. (2008), 7, 1–9.
 27. Chan, C. Y., Kiechle, M., Manivasakam, P., & Schiestl, R. H. Ionizing radiation and restriction enzymes induce microhomology-mediated illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. (2007), 35(15), 5051–5059.
 28. Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J. B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., ... Boulton, S. J. RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*. (2013), 49(5), 858–871.
 29. Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., ... Zhang, S. C. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell*. (2014), 14(6), 796–809.
 30. Cho, G.-W., Noh, M.-Y., Kim, H. Y., Koh, S.-H., Kim, K.-S., & Kim, S. H. Bone Marrow-Derived Stromal Cells from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Have Diminished Stem Cell Capacity. *Stem Cells and Development*. (2010), 19(7), 1035–1042.
 31. Cho, M.-S., Hwang, D.-Y., & Kim, D.-W. Efficient derivation of functional

- dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale. *Nature Protocols*. (2008), 3(12), 1888–94.
32. Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K.-M. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*. (2009), 137(6), 1112–1123.
 33. Choi, M. R., Kim, H. Y., Park, J.-Y., Lee, T. Y., Baik, C. S., Chai, Y. G., ... Kim, S. H. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*. (2010), 472(2), 94–98.
 34. Cirillo, G., Colangelo, A. M., De Luca, C., Savarese, L., Barillari, M. R., Alberghina, L., & Papa, M. Modulation of Matrix Metalloproteinases Activity in the Ventral Horn of the Spinal Cord Re-stores Neuroglial Synaptic Homeostasis and Neurotrophic Support following Peripheral Nerve Injury. *PLoS One*. (2016), 11(3), e0152750.
 35. Clark, J. A., Southam, K. A., Blizzard, C. A., King, A. E., & Dickson, T. C. Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. (2016), 76, 35–47.
 36. Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2018), 115(8), E1896–E1905.
 37. Colombrita, C., Onesto, E., Megiorni, F., Pizzuti, A., Baralle, F. E., Buratti, E., ... Ratti, A. TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *Journal of Biological Chemistry*. (2012), 287(19), 15635–15647.
 38. Comley, L., Allodi, I., Nichterwitz, S., Nizzardo, M., Simone, C., Corti, S., & Hedlund, E. Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS. *Neuroscience*. (2015), 291, 216–229.
 39. Corchero, J. L., & Villaverde, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. (2009), 27(8), 468–476.
 40. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. (2014), 15(1), 49–63.
 41. Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., ... Talbot, K. C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Stem Cells*. (2016), 34(8), 2063–2078.
 42. Daube, J. R. Electrodiagnostic studies in amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders. *Muscle & Nerve*. (2000), 23(10), 1488–1502.
 43. de Almagro, M. C., & Vucic, D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. (2015), 39, 56–62.
 44. De Luca, C., Savarese, L., Colangelo, A. M., Bianco, M. R., Cirillo, G., Alberghina, L., & Papa, M. Astrocytes and Microglia-Mediated Immune Response in Maladaptive Plasticity is Differently Modulated by NGF in the Ventral Horn of the Spinal Cord Following Peripheral Nerve Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*. (2016), 36(1), 37–46.
 45. De vos, K. J., Chapman, A. L., Tennant, M. E., Manser, C., Tudor, E. L., Lau, K. F., ... Grierson, A. J. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb

- fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics*. (2007), *16*(22), 2720–2728.
46. Delacôte, F., & Lopez, B. S. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: The trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle*. (2008), *7*(1), 33–38.
 47. Deng, H., Hentati, A., Tainer, J., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W., ... Et, A. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. (1993), *261*(5124), 1047–1051.
 48. Dermentzaki, G., Politi, K. A., Lu, L., Mishra, V., Pérez-Torres, E. J., Sosunov, A. A., ... Przedborski, S. Deletion of Ripk3 Prevents Motor Neuron Death In Vitro but not In Vivo . *Eneuro*. (2019), *6*(1), ENEURO.0308-18.2018.
 49. Desmarais, J. A., Hoffmann, M. J., Bingham, G., Gagou, M. E., Meuth, M., & Andrews, P. W. Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem Cells*. (2012), *30*(7), 1385–1393.
 50. Devoy, A., Kalmar, B., Stewart, M., Park, H., Burke, B., Noy, S. J., ... Fisher, E. M. C. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in ‘FUSDelta14’ knockin mice. *Brain*. (2017), *140*(11), 2797–2805.
 51. Di Giorgio, F. P., Boulting, G. L., Bobrowicz, S., & Eggan, K. C. Human Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation. *Cell Stem Cell*. (2008), *3*(6), 637–648.
 52. Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T., & Eggan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature Neuroscience*. (2007), *10*(5), 608–614.
 53. Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., ... Barbeito, L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2011), *108*(44), 18126–18131.
 54. Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., ... Andrews, P. W. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. (2004), *22*(1), 53–54.
 55. Du, Z. W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C. T. L., ... Zhang, S. C. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nature Communications*. (2015), *6*, 1–9.
 56. Dutta, A., Eckelmann, B., Adhikari, S., Ahmed, K. M., Sengupta, S., Pandey, A., ... Mitra, S. Microhomology-mediated end joining is activated in irradiated human cells due to phosphorylation-dependent formation of the XRCC1 repair complex. *Nucleic Acids Research*. (2017), *45*(5), 2585–2599.
 57. Dvorak, P., Dvorakova, D., Koskova, S., & Vodinska, M. O riginal A rticle. (2005) doi:10.1634/stemcells.2004-0303.
 58. Elamin, M., Phukan, J., Bede, P., Jordan, N., Byrne, S., Pender, N., & Hardiman, O. Executive dysfunction is a negative prognostic indicator in patients with ALS without dementia. *Neurology*. (2011), *76*(14), 1263–1269.
 59. Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., ... Durocher, D. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*. (2013), *49*(5), 872–883.
 60. Farg, M. A., Soo, K. Y., Walker, A. K., Pham, H., Orian, J., Horne, M. K., ... Atkin, J. D. Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis

- and interacts with protein disulfide-isomerase. *Neurobiology of Aging*. (2012), 33(12), 2855–2868.
61. Fatima, H., & Kim, K.-S. Iron-based magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Advanced Powder Technology*. (2018), 29(11), 2678–2685.
 62. Ferrero, I., Mazzini, L., Rustichelli, D., Gunetti, M., Mareschi, K., Testa, L., ... Fagioli, F. Bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cell Transplantation*. (2008), 17(3), 255–266.
 63. Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., & Ang, S.-L. Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*. (2007), 134(15), 2761–2769.
 64. Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., ... Glass, J. D. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Experimental Neurology*. (2004), 185(2), 232–240.
 65. Forostyak, S., Homola, A., Turnovcova, K., Svitil, P., Jendelova, P., & Sykova, E. Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS. *Stem Cells*. (2014), 32(12), 3163–3172.
 66. Forostyak, S., Jendelova, P., Kapcalova, M., Arboleda, D., & Sykova, E. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. (2011), 13(9), 1036–1046.
 67. Frakes, A. E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A. M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C. J., ... Kaspar, B. K. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. (2014), 81(5), 1009–1023.
 68. Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H. M., Ray, P. C., & Yu, H. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*. (2014), 22(1), 64–75.
 69. Fujita, K., Yamauchi, M., Shibayama, K., Ando, M., Honda, M., & Nagata, Y. Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*. (1996), 45(3), 276–281.
 70. Gallardo, G., Barowski, J., Ravits, J., Siddique, T., Lingrel, J. B., Robertson, J., ... Bonni, A. An α 2-Na/K ATPase/ α -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. *Nature Neuroscience*. (2014), 17(12), 1710–1719.
 71. Ganesalingam, J., & Bowser, R. The application of biomarkers in clinical trials for motor neuron disease. *Biomarkers in Medicine*. (2010), 4(2), 281–297.
 72. Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Zhang, Y. J., Jansen-West, K., Ash, P. E. A., Caulfield, T., ... Petrucelli, L. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathologica*. (2013), 126(6), 829–844.
 73. Gershoni-Emek, N., Chein, M., Gluska, S., & Perlson, E. Amyotrophic Lateral Sclerosis as a Spatiotemporal Mislocalization Disease: Location, Location, Location. (2015) (pp. 23–71).
 74. Gertow, K., Cedervall, J., Unger, C., Szöke, K., Blennow, E., Imreh, M. P., & Ährlund-Richter, L. Trisomy 12 in HESC leads to no selective in vivo growth advantage in teratomas, but induces an increased abundance of renal development. *Journal of Cellular Biochemistry*. (2007), 100(6), 1518–1525.
 75. Gill, C., Phelan, J. P., Hatzipetros, T., Kidd, J. D., Tassinari, V. R., Levine, B., ... Vieira, F. G. SOD1-positive aggregate accumulation in the CNS predicts slower disease progression and increased longevity in a mutant SOD1 mouse model of ALS.

- Scientific Reports*. (2019), 9(1), 1–13.
76. Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., ... Zhang, K. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. (2011), 471(7336), 63–67.
 77. Gould, T. W., Buss, R. R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C. M., ... Oppenheim, R. W. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *Journal of Neuroscience*. (2006), 26(34), 8774–8786.
 78. Gowing, G., Dequen, F., Soucy, G., & Julien, J.-P. Absence of tumor necrosis factor- α does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. (2006), 26(44), 11397–402.
 79. Guégan, C., & Przedborski, S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. (2003), 111(2), 153–161.
 80. Gulston, M. Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Research*. (2004), 32(4), 1602–1609.
 81. Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., ... Siddique, T. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. (1994), 264(5166), 1772–1775.
 82. Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., ... Kaspar, B. K. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*. (2011), 29(9), 824–828.
 83. Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S. L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H. B., ... Kanaar, R. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*. (2007), 14(11), 1096–104.
 84. Hartfield, E. M., Yamasaki-Mann, M., Ribeiro Fernandes, H. J., Vowles, J., James, W. S., Cowley, S. A., & Wade-Martins, R. Physiological Characterisation of Human iPS-Derived Dopaminergic Neurons. *PLoS ONE*. (2014), 9(2), e87388.
 85. Hawkes, C. H., Del Tredici, K., & Braak, H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. (2010), 16(2), 79–84.
 86. He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell*. (2009), 137(6), 1100–1111.
 87. Herynek, V., Turnovcová, K., Gálisová, A., Kaman, O., Mareková, D., Koktan, J., ... Jendelová, P. Manganese-Zinc Ferrites: Safe and Efficient Nanolabels for Cell Imaging and Tracking In Vivo. *ChemistryOpen*. (2019), 8(2), 155–165.
 88. Heyn, C., Bowen, C. V., Rutt, B. K., & Foster, P. J. Detection threshold of single SPIO-labeled cells with FIESTA. *Magnetic Resonance in Medicine*. (2005), 53(2), 312–320.
 89. Hicks, G. G., Singh, N., Nashabi, A., Mai, S., Bozek, G., Klewes, L., ... Ruley, H. E. Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nature Genetics*. (2000), 24(2), 175–179.
 90. Holland, G. ., Bottomley, P. ., & Hinshaw, W. . 19F magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. (1977), 28(1), 133–136.
 91. Horák, D., Babič, M., Jendelová, P., Herynek, V., Trchová, M., Likavčanová, K., ... Syková, E. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. (2009), 321(10), 1539–

- 1547.
92. Ilieva, E. V., Ayala, V., Jové, M., Dalfó, E., Cacabelos, D., Povedano, M., ... Portero-Otín, M. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. (2007), *130*(12), 3111–3123.
 93. Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., ... Takahashi, R. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *The EMBO Journal*. (2003), *22*(24), 6665–74.
 94. Irvine, S. F., & Kwok, J. C. F. Perineuronal nets in spinal motoneurons: Chondroitin sulphate proteoglycan around alpha motoneurons. *International Journal of Molecular Sciences*. (2018), *19*(4) doi:10.3390/ijms19041172.
 95. Ito, Y., Ofengeim, D., Najafov, A., Das, S., Saberi, S., Li, Y., ... Yuan, J. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science*. (2016), *353*(6299), 603–608.
 96. Izrael, M., Slutsky, S. G., Admoni, T., Cohen, L., Granit, A., Hasson, A., ... Revel, M. Safety and efficacy of human embryonic stem cell-derived astrocytes following intrathecal transplantation in SOD1 G93A and NSG animal models. *Stem Cell Research and Therapy*. (2018), *9*(1), 1–17.
 97. Jackson, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. (2002), *23*(5), 687–696.
 98. Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L., & Labhasetwar, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular Pharmaceutics*. (2008), *5*(2), 316–327.
 99. Jaiswal, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews*. (2019), *39*(2), 733–748.
 100. Javorkova, E., Matejkova, N., Zajicova, A., Hermankova, B., Hajkova, M., Bohacova, P., ... Holan, V. Immunomodulatory Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Healthy Donors. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. (2019), *14*(2), 215–225.
 101. Jiang, T., Handley, E., Brizuela, M., Dawkins, E., Lewis, K. E. A., Clark, R. M., ... Blizzard, C. A. Amyotrophic lateral sclerosis mutant TDP-43 may cause synaptic dysfunction through altered dendritic spine function. *DMM Disease Models and Mechanisms*. (2019), *12*(5) doi:10.1242/dmm.038109.
 102. Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., ... Beyer, C. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia*. (2015), *63*(12), 2260–2273.
 103. Kaman, O., Kuličková, J., Herynek, V., Koktan, J., Maryško, M., Dědourková, T., ... Jiráček, Z. Preparation of Mn-Zn ferrite nanoparticles and their silica-coated clusters: Magnetic properties and transverse relaxivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. (2017), *427*(June 2016), 251–257.
 104. Kang, S. H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D. W., Ostrow, L. W., ... Bergles, D. E. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*. (2013), *16*(5), 571–579.
 105. Kaplan, A., Spiller, K. J., Towne, C., Kanning, K. C., Choe, G. T., Geber, A., ... Henderson, C. E. Neuronal matrix Metalloproteinase-9 is a determinant of selective Neurodegeneration. *Neuron*. (2014), *81*(2), 333–348.
 106. Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J. M., Kassis, I., ... Slavin, S. Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology*. (2011), *67*(10), 1187–1194.

107. Khalfallah, Y., Kuta, R., Grasmuck, C., Prat, A., Durham, H. D., & Vande Velde, C. TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types /631/80/304 /631/378/87 /13/1 /13/31 /13/51 /13/109 /13/106 /13/89 /14/19 /14/32 /82/80 article. *Scientific Reports*. (2018), 8(1), 1–13.
108. Kim, H., Kim, H. Y., Choi, M. R., Hwang, S., Nam, K.-H., Kim, H.-C., ... Kim, S. H. Dose-dependent efficacy of ALS-human mesenchymal stem cells transplantation into cisterna magna in SOD1-G93A ALS mice. *Neuroscience Letters*. (2010), 468(3), 190–4.
109. Kim, H. Y., Kim, H., Oh, K.-W., Oh, S.-I., Koh, S.-H., Baik, W., ... Kim, S. H. Biological markers of mesenchymal stromal cells as predictors of response to autologous stem cell transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: an investigator-initiated trial and in vivo study. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. (2014), 32(10), 2724–31.
110. Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L. A., Boulting, G. L., Moccia, R., Wainger, B. J., ... Eggan, K. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell*. (2014), 14(6), 781–795.
111. Koh, S.-H., Baik, W., Noh, M. Y., Cho, G. W., Kim, H. Y., Kim, K. S., & Kim, S. H. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate. *Experimental Neurology*. (2012), 233(1), 472–480.
112. Kong, J., & Xu, Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *Journal of Neuroscience*. (1998), 18(9), 3241–3250.
113. Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M., & Przedborski, S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*. (1997), 277(5325), 559–62.
114. Kropp, C., Massai, D., & Zweigerdt, R. Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochemistry*. (2017), 59, 244–254.
115. Krutá, M., Bálek, L., Hejnová, R., Dobšáková, Z., Eiselleová, L., Matulka, K., ... Rotrekl, V. Decrease in abundance of apurinic/apyrimidinic endonuclease causes failure of base excision repair in culture-adapted human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. (2013), 31(4), 693–702.
116. Kwiatkowski, T. J., Bosco, D. A., LeClerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., ... Brown, R. H. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. (2009), 323(5918), 1205–1208.
117. Lacomblez, L., Bensimon, G., Meininger, V., Leigh, P. ., & Guillet, P. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*. (1996), 347(9013), 1425–1431.
118. Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., ... Yeo, G. W. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nature Neuroscience*. (2012), 15(11), 1488–1497.
119. Lanfranconi, F., Ferri, A., Corna, G., Bonazzi, R., Lunetta, C., Silani, V., ... Tremolizzo, L. Inefficient skeletal muscle oxidative function flanks impaired motor neuron recruitment in Amyotrophic Lateral Sclerosis during exercise. *Scientific Reports*. (2017), 7(1), 1–9.
120. Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., ... Loring, J. F. Reprogramming and Time in Culture. *Cell*. (2012), 8(1), 106–118.
121. Lautenschläger, J., Prell, T., Ruhmer, J., Weidemann, L., Witte, O. W., &

- Grosskreutz, J. Overexpression of human mutated G93A SOD1 changes dynamics of the ER mitochondria calcium cycle specifically in mouse embryonic motor neurons. *Experimental Neurology*. (2013), 247, 91–100.
122. Lee, J. K., Shin, J. H., Lee, J. E., & Choi, E. J. Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. (2015), 1852(11), 2517–2524.
 123. Lemarchant, S., Pomeschchik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., ... Koistinaho, J. ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*. (2016), 11(1), 1–24.
 124. Li, M., Ona, V. O., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L. J., ... Friedlander, R. M. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science (New York, N.Y.)*. (2000), 288(5464), 335–9.
 125. Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. (2017), 541(7638), 481–487.
 126. Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y. E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., ... Ang, S.-L. Foxa1 and Foxa2 function both upstream of and cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Developmental Biology*. (2009), 333(2), 386–396.
 127. Liu, J.-F., Zheng, O.-X., Xin, J.-G., Chen, H. H., & Xin, J. J. How are necroptosis, immune dysfunction, and motoneuron death connected in amyotrophic lateral sclerosis? *Neuroimmunology and Neuroinflammation*. (2017), 4(6), 109.
 128. Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Velde, C. Vande, Ward, C. M., Miller, T. M., ... Cleveland, D. W. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*. (2004), 43(1), 5–17.
 129. Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D. R., ... Ranum, L. P. W. C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron*. (2016), 90(3), 521–534.
 130. Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., ... Hu, R. Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer Cell*. (2014), 26(1), 106–120.
 131. Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chio, A., Mitchell, D., Swingler, R. J., ... Beghi, E. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. (2010), 81(4), 385–390.
 132. Lu, L., Wang, S., Zheng, L., Li, X., Suswam, E. A., Zhang, X., ... King, P. H. Amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 sequesters Hu antigen R (HuR) and TIA-1-related protein (TIAR). Implications for impaired post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. (2009), 284(49), 33989–33998.
 133. Lunn, J. S., Sakowski, S. A., McGinley, L. M., Pacut, C., Hazel, T. G., Johe, K., & Feldman, E. L. Autocrine Production of IGF-I Increases Stem Cell-Mediated Neuroprotection. *STEM CELLS*. (2015), 33(5), 1480–1489.
 134. Luo, L. Z., Gopalakrishna-Pillai, S., Nay, S. L., Park, S. W., Bates, S. E., Zeng, X., ... O'Connor, T. R. DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS ONE*. (2012), 7(3) doi:10.1371/journal.pone.0030541.
 135. Lutz, C. Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Research*. (2018), 1693, 1–10.
 136. Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous

- end joining and V(D)J recombination. *Cell*. (2002), *108*(6), 781–794.
137. Mackenzie, I. R. A., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., ... Trojanowski, J. Q. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*. (2007), *61*(5), 427–434.
 138. Magrané, J., Cortez, C., Gan, W. B., & Manfredi, G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Human Molecular Genetics*. (2014), *23*(6), 1413–1424.
 139. Maimon, R., Ionescu, A., Bonnie, A., Sweetat, S., Wald-Altman, S., Inbar, S., ... Perlson, E. Mir126-5p downregulation facilitates axon degeneration and nmj disruption via a non-cell-autonomous mechanism in ALS. *Journal of Neuroscience*. (2018), *38*(24), 5478–5494.
 140. Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*. (2013), *2013* doi:10.1155/2013/942916.
 141. Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G., & Gage, F. H. Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. (2008), *3*(6), 649–657.
 142. Markouli, C., De Deckersberg, E. C., Regin, M., Nguyen, H. T., Zambelli, F., Keller, A., ... Spits, C. Gain of 20q11.21 in Human Pluripotent Stem Cells Impairs TGF- β -Dependent Neuroectodermal Commitment. *Stem Cell Reports*. (2019), *13*(1), 163–176.
 143. Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., ... Kawakami, H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. (2010), *465*(7295), 223–226.
 144. Matejckova, N., Zajicova, A., Hermankova, B., Kossel, J., Bohacova, P., Holan, V., & Javorkova, E. Characterisation of mesenchymal stem cells from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Clinical Pathology*. (2018), *71*(8), 735–742.
 145. Matthews, R. T., Kelly, G. M., Zerillo, C. A., Gray, G., Tiemeyer, M., & Hockfield, S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *Journal of Neuroscience*. (2002), *22*(17), 7536–7547.
 146. Mavromatakis, Y. E., Lin, W., Metzakopian, E., Ferri, A. L. M., Yan, C. H., Sasaki, H., ... Ang, S.-L. Foxa1 and Foxa2 positively and negatively regulate Shh signalling to specify ventral midbrain progenitor identity. *Mechanisms of Development*. (2011), *128*(1–2), 90–103.
 147. Mehta, P., Kaye, W., Bryan, L., Larson, T., Copeland, T., Wu, J., ... Horton, K. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis — United States, 2012–2013. *MMWR. Surveillance Summaries*. (2016), *65*(8), 1–12.
 148. Melkov, A., Baskar, R., Alcalay, Y., & Abdu, U. A new mode of mitochondrial transport and polarized sorting regulated by Dynein, Milton and Miro. *Development (Cambridge)*. (2016), *143*(22), 4203–4213.
 149. Mizushima, N., & Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. (2007), *3*(6), 542–545.
 150. Moloney, E. B., de Winter, F., & Verhaagen, J. ALS as a distal axonopathy: Molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Frontiers in Neuroscience*. (2014), *8*(8 JUL), 1–18.
 151. Moloney, E. B., Hobo, B., De Winter, F., & Verhaagen, J. Expression of a mutant SEMA3A protein with diminished signalling capacity does not alter ALS-related motor decline, or confer changes in NMJ plasticity after BotoxA-induced paralysis of

- male gastrocnemius muscle. *PLoS ONE*. (2017), *12*(1), 1–19.
152. Momcilovic, O., Knobloch, L., Fornasaglio, J., Varum, S., Easley, C., & Schatten, G. DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS ONE*. (2010), *5*(10) doi:10.1371/journal.pone.0013410.
 153. Morrice, J. R., Gregory-evans, C. Y., & Shaw, C. A. Biochimica et Biophysica Acta Necroptosis in amyotrophic lateral sclerosis and other neurological disorders. *BBA - Molecular Basis of Disease*. (2017), *1863*(2), 347–353.
 154. Muja, N., & Bulte, J. W. M. Magnetic resonance imaging of cells in experimental disease models. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. (2009), *55*(1), 61–77.
 155. Nagai, M., Re, D. B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T. M., Wichterle, H., & Przedborski, S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience*. (2007), *10*(5), 615–622.
 156. Nagley, P., Higgins, G. C., Atkin, J. D., & Beart, P. M. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. (2010), *1802*(1), 167–185.
 157. Nakamura, J., & Swenberg, J. A. Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Research*. (1999), *59*(11), 2522–6.
 158. Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F. D., ... Kharbanda, S. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (1999), *96*(14), 8144–8149.
 159. Nassif, M., Valenzuela, V., Rojas-Rivera, D., Vidal, R., Matus, S., Castillo, K., ... Hetz, C. Pathogenic role of BECN1/Beclin 1 in the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*. (2014), *10*(7), 1256–1271.
 160. Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., ... Lee, V. M.-Y. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. (2006), *314*(5796), 130–133.
 161. Nguyen, P. K., Riegler, J., & Wu, J. C. Stem cell imaging: From bench to bedside. *Cell Stem Cell*. (2014), *14*(4), 431–444.
 162. Nimchinsky, E. A., Young, W. G., Yeung, G., Shah, R. A., Gordon, J. W., Bloom, F. E., ... Hof, P. R. Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *The Journal of Comparative Neurology*. (2000), *416*(1), 112–125.
 163. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., ... Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes and Development*. (2008), *22*(11), 1451–1464.
 164. Nolan, M., Talbot, K., & Ansorge, O. Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. *Acta Neuropathologica Communications*. (2016), *4*(1), 99.
 165. Novotna, B., Jendelova, P., Kapcalova, M., Rossner, P., Turnovcova, K., Bagryantseva, Y., ... Sykova, E. Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*. (2012), *210*(1), 53–63.
 166. Novotna, B., Turnovcova, K., Veverka, P., Rössner, P., Bagryantseva, Y., Herynek, V., ... Jendelova, P. The impact of silica encapsulated cobalt zinc ferrite nanoparticles on DNA, lipids and proteins of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Nanotoxicology*. (2016), *10*(6), 662–70.
 167. Oh, K.-W., Moon, C., Kim, H. Y., Oh, S.-I., Park, J., Lee, J. H., ... Kim, S. H. Phase I

- trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Translational Medicine*. (2015), 4(6), 590–7.
168. Osking, Z., Ayers, J. I., Hildebrandt, R., Skruber, K., Brown, H., Ryu, D., ... Vitriol, E. A. ALS-Linked SOD1 Mutants Enhance Neurite Outgrowth and Branching in Adult Motor Neurons. *IScience*. (2019), 11, 294–304.
 169. Palecek, J., Lips, M. B., & Keller, B. U. Calcium dynamics and lowering in motoneurons of the mouse spinal cord. *Journal of Physiology*. (1999), 520(2), 485–502.
 170. Papadeas, S. T., Kraig, S. E., O'Banion, C., Lepore, A. C., & Maragakis, N. J. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1 G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2011), 108(43), 17803–17808.
 171. Park, K. I., Ourednik, J., Ourednik, V., Taylor, R. M., Aboody, K. S., Augustine, K. I., ... Snyder, E. Y. Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Therapy*. (2002), 9(10), 613–624.
 172. Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H. R., Schousboe, A., Haydon, P. G., ... Verkhratsky, A. Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry*. (2012), 121(1), 4–27.
 173. Partlow, K. C., Chen, J., Brant, J. A., Neubauer, A. M., Meyerrose, T. E., Creer, M. H., ... Wickline, S. A. 19 F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *The FASEB Journal*. (2007), 21(8), 1647–1654.
 174. Philips, T., & Rothstein, J. D. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*. (2015), 2015(June), 5.67.1-5.67.21.
 175. Phukan, J., Pender, N. P., & Hardiman, O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*. (2007), 6(11), 994–1003.
 176. Picher-Martel, V., Valdmanis, P. N., Gould, P. V., Julien, J. P., & Dupré, N. From animal models to human disease: A genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathologica Communications*. (2016), 4(1), 1–29.
 177. Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., ... Martino, G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*. (2003), 422(6933), 688–694.
 178. Polentes, J., Jendelova, P., Cailleret, M., Braun, H., Romanyuk, N., Tropel, P., ... Onteniente, B. Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. *Cell Transplantation*. (2012), 21(12), 2587–602.
 179. Pollert, E., Kaman, O., Veverka, P., Veverka, M., Maryško, M., Zavěta, K., ... Herynek, V. Core-shell La1-xSrxMnO3 nanoparticles as colloidal mediators for magnetic fluid hyperthermia. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. (2010), 368(1927), 4389–4405.
 180. Pongrac, I. M., Dobrivojević, M., Ahmed, L. B., Babić, M., Šlouf, M., Horák, D., & Gajović, S. Improved biocompatibility and efficient labeling of neural stem cells with poly(L-lysine)-coated maghemite nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. (2016), 7(1), 926–936.
 181. Prabhakar, S., Rajan, R., Sharma, R., Khandelwal, N., Lal, V., & Marwaha, N. Autologous bone marrow-derived stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Neurology India*. (2012), 60(5), 465.
 182. Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., & Caroni, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF.

- Nature Neuroscience*. (2006), 9(3), 408–419.
183. Rando, A., Pastor, D., Viso-León, M. C., Martínez, A., Manzano, R., Navarro, X., ... Martínez, S. Intramuscular transplantation of bone marrow cells prolongs the lifespan of SOD1 G93A mice and modulates expression of prognosis biomarkers of the disease. *Stem Cell Research and Therapy*. (2018), 9(1), 1–12.
 184. Raoul, Cedric, Barthelemy, C., Couzinet, A., Hancock, D., Pettmann, B., & Hueber, A. O. Expression of a dominant negative form of Daxx In Vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death. *Journal of Neurobiology*. (2005), 62(2), 178–188.
 185. Raoul, Cédric, Estévez, A. G., Nishimune, H., Cleveland, D. W., DeLapeyrière, O., Henderson, C. E., ... Pettmann, B. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*. (2002), 35(6), 1067–83.
 186. Rathmell, W. K., & Chu, G. A DNA end-binding factor involved in double-strand break repair and V(D)J recombination. *Molecular and Cellular Biology*. (1994), 14(7), 4741–4748.
 187. Re, D. B., Verche, V. Le, Yu, C., Amoroso, M. W., Politi, K. A., Phani, S., ... Henderson, C. E. Report Necroptosis Drives Motor Neuron Death in Models of Both Sporadic and Familial ALS. (2014), 1001–1008.
 188. Reyes, N. A., Fisher, J. K., Austgen, K., VandenBerg, S., Huang, E. J., & Oakes, S. A. Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. (2010), 120(10), 3673–9.
 189. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., & Gordon, J. W. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (1995), 92(3), 689–693.
 190. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... Brown, R. H. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. (1993), 362(6415), 59–62.
 191. Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., ... Volterra, A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death and Differentiation*. (2008), 15(11), 1691–1700.
 192. Rotem, N., Magen, I., Ionescu, A., Gershoni-Emek, N., Altman, T., Costa, C. J., ... Perlson, E. ALS along the Axons - Expression of coding and noncoding RNA differs in axons of ALS models. *Scientific Reports*. (2017), 7, 1–17.
 193. Rouaux, C., Panteleeva, I., René, F., De Aguilar, J. L. G., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., ... Loeffler, J. P. Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Journal of Neuroscience*. (2007), 27(21), 5535–5545.
 194. Rudnick, N. D., Griffey, C. J., Guarnieri, P., Gerbino, V., Wang, X., Piersaint, J. A., ... Maniatis, T. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2017), 114(39), E8294–E8303.
 195. Rügenapp, C., Gleich, B., & Haase, A. Magnetic Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging and Diagnostics. *Pharmaceutical Research*. (2012), 29(5), 1165–1179.
 196. Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*. (2005), 2, 1–11.

197. Saito, S., Tsugeno, M., Koto, D., Mori, Y., Yoshioka, Y., Nohara, S., & Murase, K. Impact of surface coating and particle size on the uptake of small and ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles by macrophages. *International Journal of Nanomedicine*. (2012), 7, 5415–5421.
198. Sallmyr, A., & Tomkinson, A. E. Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *Journal of Biological Chemistry*. (2018), 293(27), 10536–10549.
199. Sasaki, S., & Iwata, M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. (2007), 66(1), 10–16.
200. Sathasivam, S., & Shaw, P. J. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis--what is the evidence? *Lancet Neurology*. (2005), 4(8), 500–509.
201. Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W.-D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., ... Conneely, O. M. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (1998), 95(7), 4013–4018.
202. Saxena, S., Cabuy, E., & Caroni, P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neuroscience*. (2009), 12(5), 627–636.
203. Schaefer, A. M., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Comparative Neurology*. (2005), 490(3), 209–219.
204. Seifert, G., Schilling, K., & Steinhäuser, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience*. (2006), 7(3), 194–206.
205. Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynet, I., Oulad-Abdelghani, M., ... Charlet-Berguerand, N. Loss of C9 ORF 72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death . *The EMBO Journal*. (2016), 35(12), 1276–1297.
206. Seol, H. W., Oh, S. K., Park, Y. Bin, Kim, H. S., Baek, J. A., Seo, J., ... Moon, S. Y. Separation and maintenance of normal cells from human embryonic stem cells with trisomy 12 mosaicism. *Chromosome Research*. (2008), 16(8), 1075–1084.
207. Sephton, C. F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E. B., Cenik, B., Han, Y., ... Yu, G. Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *Journal of Biological Chemistry*. (2011), 286(2), 1204–1215.
208. Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J. Q., ... Holt, C. E. Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell*. (2016), 166(1), 181–192.
209. Shin, S., Dalton, S., & Stice, S. L. Human Motor Neuron Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*. (2005), 14(3), 266–269.
210. Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., & Cantley, L. C. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development (Cambridge)*. (2013), 140(12), 2535–2547.
211. Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D., & O’Leary, D. D. Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. (2001), 21(9), 3126–34.
212. Sotelo-Silveira, J. R., Lepanto, P., Elizondo, V., Horjales, S., Palacios, F., Martinez-Palma, L., ... Barbeito, L. Axonal mitochondrial clusters containing mutant SOD1 in transgenic models of ALS. *Antioxidants and Redox Signaling*. (2009), 11(7), 1535–1545.

213. Spiller, K. J., Khan, T., Dominique, M. A., Restrepo, C. R., Cotton-Samuel, D., Levitan, M., ... Lee, V. M.-Y. Reduction of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protects motor neurons from TDP-43-triggered death in rNLS8 mice. *Neurobiology of Disease*. (2019), *124*, 133–140.
214. Srinivas, M., Morel, P. A., Ernst, L. A., Laidlaw, D. H., & Ahrens, E. T. Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model. *Magnetic Resonance in Medicine*. (2007), *58*(4), 725–734.
215. Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. Induced pluripotency: History, mechanisms, and applications. *Genes and Development*. (2010), *24*(20), 2239–2263.
216. Staff, N. P., Madigan, N. N., Morris, J., Jentoft, M., Sorenson, E. J., Butler, G., ... Windebank, A. J. Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS. *Neurology*. (2016), *87*(21), 2230–2234.
217. Stallings, N. R., Puttaparthi, K., Luther, C. M., Burns, D. K., & Elliott, J. L. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of Disease*. (2010), *40*(2), 404–414.
218. Stott, S. R. W., Metzakopian, E., Lin, W., Kaestner, K. H., Hen, R., & Ang, S. L. Foxa1 and Foxa2 are required for the maintenance of dopaminergic properties in ventral midbrain neurons at late embryonic stages. *Journal of Neuroscience*. (2013), *33*(18), 8022–8034.
219. Strong, M. J., Grace, G. M., Freedman, M., Lomen-Hoerth, C., Woolley, S., Goldstein, L. H., ... Figlewicz, D. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. (2009), *10*(3), 131–46.
220. Sullivan, P. M., Zhou, X., Robins, A. M., Paushter, D. H., Kim, D., Smolka, M. B., & Hu, F. The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathologica Communications*. (2016), *4*(1), 51.
221. Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., ... Wang, X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. (2012), *148*(1–2), 213–27.
222. Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M. P., Chesi, A., Shorter, J., & Gitler, A. D. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the als disease protein fus/tls. *PLoS Biology*. (2011), *9*(4) doi:10.1371/journal.pbio.1000614.
223. Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sidorkina, O., & Laval, J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2000), *97*(1), 103–108.
224. Suttikus, A., Morawski, M., & Arendt, T. Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Molecular Neurobiology*. (2016), *53*(1), 73–82.
225. Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Klein, S. M., Aebischer, P., & Svendsen, C. N. GDNF Secreting Human Neural Progenitor Cells Protect Dying Motor Neurons, but Not Their Projection to Muscle, in a Rat Model of Familial ALS. *PLoS ONE*. (2007), *2*(8), e689.
226. Sykova, E., & Jendelova, P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. (2007) (pp. 367–383).
227. Syková, E., Rychmach, P., Drahorádová, I., Konrádová, Š., Růžicková, K., Voříšek, I., ... Bojar, M. Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplantation*. (2017), *26*(4), 647–658.

228. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. (2007), *131*(5), 861–872.
229. Thomson, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. (1998), *282*(5391), 1145–1147.
230. Toller, I. M., Neelsen, K. J., Steger, M., Hartung, M. L., Hottiger, M. O., Stucki, M., ... Müller, A. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2011), *108*(36), 14944–9.
231. Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Liu, X., ... Xia, X. G. Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO Journal*. (2013), *32*(13), 1917–1926.
232. Trias, E., Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Isasi, E., Drechsel, D. A., Lopez, N., ... Barbeito, L. Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. (2013), *7*(DEC), 1–8.
233. Tripathi, P., Rodriguez-Muela, N., Klim, J. R., de Boer, A. S., Agrawal, S., Sandoe, J., ... Zhou, Q. Reactive Astrocytes Promote ALS-like Degeneration and Intracellular Protein Aggregation in Human Motor Neurons by Disrupting Autophagy through TGF- β 1. *Stem Cell Reports*. (2017), *9*(2), 667–680.
234. Tsitkanou, S., Gatta, P. A. D., & Russell, A. P. Skeletal muscle satellite cells, mitochondria, and MicroRNAs: Their involvement in the pathogenesis of ALS. *Frontiers in Physiology*. (2016), *7*(SEP), 1–9.
235. Turner, M. R., Kiernan, M. C., Leigh, P. N., & Talbot, K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*. (2009), *8*(1), 94–109.
236. Turnovcova, K., Ruzickova, K., Vanecek, V., Sykova, E., & Jendelova, P. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy*. (2009), *11*(7), 874–885.
237. Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M. C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., ... Bonanno, G. Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. (2012), *18*, 794–804.
238. Vallabhaneni, H., Lynch, P. J., Chen, G., Park, K., Liu, Y., Goehle, R., ... Hursh, D. A. High Basal Levels of γ H2AX in Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Linked to Replication-Associated DNA Damage and Repair. *Stem Cells*. (2018), *36*(10), 1501–1513.
239. Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., ... Shaw, C. E. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science*. (2009), *323*(5918), 1208–1211.
240. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. (2010), *11*(10), 700–14.
241. Vanselow, B. K., & Keller, B. U. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *Journal of Physiology*. (2000), *525*(2), 433–445.
242. Vercelli, A., Mereuta, O. M., Garbossa, D., Muraca, G., Mareschi, K., Rustichelli, D., ... Fagioli, F. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of

- amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*. (2008), 31(3), 395–405.
243. Veverka, M., Veverka, P., Kaman, O., Lančok, A., Závěta, K., Pollert, E., ... Vasseur, S. Magnetic heating by cobalt ferrite nanoparticles. *Nanotechnology*. (2007), 18(34), 345704.
 244. Veverka, M., Závěta, K., Kaman, O., Veverka, P., Knížek, K., Pollert, E., ... Kašpar, P. Magnetic heating by silica-coated Co–Zn ferrite particles. *Journal of Physics D: Applied Physics*. (2014), 47(6), 065503.
 245. Vitellaro-Zuccarello, L., Bosisio, P., Mazzetti, S., Monti, C., & De Biasi, S. Differential expression of several molecules of the extracellular matrix in functionally and developmentally distinct regions of rat spinal cord. *Cell and Tissue Research*. (2007), 327(3), 433–447.
 246. Walker, A. K., Soo, K. Y., Sundaramoorthy, V., Parakh, S., Ma, Y., Farg, M. A., ... Atkin, J. D. ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation. *PLoS ONE*. (2013), 8(11), 1–12.
 247. Wang, L., Gutmann, D. H., & Roos, R. P. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics*. (2011), 20(2), 286–293.
 248. Wang, L., Sharma, K., Grisotti, G., & Roos, R. P. The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*. (2009), 35(2), 234–240.
 249. Wang, Z., Song, Y., Li, S., Kurian, S., Xiang, R., Chiba, T., & Wu, X. DNA polymerase θ (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *The Journal of Biological Chemistry*. (2019), 294(11), 3909–3919.
 250. Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M., & Baloh, R. H. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2009), 106(44), 18809–18814.
 251. Winton, M. J., Deerlin, V. M. Van, Kwong, L. K., Yuan, W., Wood, E. M., Yu, C., ... Lee, M. NIH Public Access. (2009), 582(15), 2252–2256.
 252. Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., ... Price, D. L. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. (1995), 14(6), 1105–1116.
 253. Wyatt, T. J., Rossi, S. L., Siegenthaler, M. M., Frame, J., Robles, R., Nistor, G., & Keirstead, H. S. Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss. *Stem Cells International*. (2011), 2011 doi:10.4061/2011/207230.
 254. Xiong, X., Du, Z., Wang, Y., Feng, Z., Fan, P., Yan, C., ... Zhang, J. 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells. *Nucleic Acids Research*. (2015), 43(3), 1659–1670.
 255. Xu, Y. F., Gendron, T. F., Zhang, Y. J., Lin, W. L., D’Alton, S., Sheng, H., ... Petrucelli, L. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. (2010), 30(32), 10851–10859.
 256. Xu, Y. F., Zhang, Y. J., Lin, W. L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D. W., ... Petrucelli, L. Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*. (2011), 6(1), 1–14.
 257. Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., ... Cleveland, D. W. Astrocytes as determinants of disease progression in

- inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*. (2008), *11*(3), 251–253.
258. Yamanaka, K., & Komine, O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research*. (2018), *126*, 31–38.
259. Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E. D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., ... Zhang, S.-C. Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. (2005), *23*(6), 781–790.
260. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*. (2007), *318*(5858), 1917–20.
261. Zetterström, R. H. Dopamine Neuron Agenesis in Nurr1-Deficient Mice. *Science*. (1997), *276*(5310), 248–250.
262. Zhang, M., Cheng, L., Jia, Y., Liu, G., Li, C., Song, S., ... Huang, Y. Aneuploid embryonic stem cells exhibit impaired differentiation and increased neoplastic potential. *The EMBO Journal*. (2016), *35*(21), 2285–2300.
263. Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., & Liu, Z.-G. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2012), *109*(14), 5322–5327.
264. Zhou, C., Zhang, C., Zhao, R., Chi, S., Ge, P., & Zhang, C. Human marrow stromal cells reduce microglial activation to protect motor neurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*. (2013), *10*, 1–11.
265. Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L., & Huang, H. P. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. (2017), *88*(7), 540–549.