

Abstrakt

Neurodegenerativní choroby jsou neléčitelná onemocnění, při kterých dochází k odumírání buněk centrální nervové soustavy, což vede k narušení správného fungování mozku a později i ke smrti pacienta. Jedním ze slibných terapeutických přístupů je buněčná terapie prostřednictvím transplantace nervových kmenových buněk. Tyto kmenové buňky sekrecí proteinů pozitivně ovlivňují regeneraci poškozené tkáně, případně mohou samy diferencovat do neuronů či gliových buněk, a funkčně tak nahradit odumřelé buňky. Protože současné protokoly pro diferenciaci nervových kmenových buněk poskytují heterogenní buněčné populace, je nutné lépe pochopit mechanismy, které celou diferenciaci nervových kmenových buněk regulují. Zcela zásadní je pak charakterizace buněk určených pro transplantaci, zejména určení jejich proliferačního a diferenciačního potenciálu. Jedním z faktorů ovlivňujících účinnost buněčné terapie je načasování jejího podání. Hledání vhodných biomarkerů, které by reflektovaly rozvoj choroby, je proto klíčové nejen pro správné načasování transplantace buněk, ale také pro sledování účinnosti terapie. Tato disertační práce se zaměřuje na podrobnou charakterizaci lidských nervových kmenových buněk v průběhu *in vitro* diferenciaci a na regulaci buněčných drah, která ji doprovází. V první části práce je popsán vývoj cílené metody založené na hmotnostní spektrometrii, tzv. selected reaction monitoring (SRM), pro citlivou detekci proteinových markerů vybraných buněčných typů. Díky přesné kvantifikaci několika markerů pro každý sledovaný buněčný typ je možné monitorovat diferenciaci celé buněčné populace. Tato metoda tak může najít uplatnění pro rutinní analýzy buněk či pro hodnocení efektivity diferenciačního protokolu. Ve druhé části práce je popsána analýza diferenciaci nervových kmenových buněk s využitím hmotnostně-spektrometrické metody sequential window acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH-MS). Výsledky této analýzy, doplněné o analýzu sekretomu pomocí multiplexní protilátkové metody, ukázaly na významnou regulaci specifických signálních drah během diferenciaci nervových kmenových buněk. V *in vitro* podmínkách byla potvrzena regulace signálních drah Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), Interleukin-6, Vascular endothelial growth factor (VEGF) a Wnt. Tyto vzájemně provázané dráhy pozitivně regulují expresi genu kódujícího protein VEGF-A. Navazující experimenty prokázaly, že proliferaci a přežívání diferencujících nervových kmenových buněk specificky stimuluje isoforma VEGF121. Přidání VEGF121 k transplantovaným buňkám by tak mohlo zvýšit efekt buněčné terapie. Poslední částí práce je přehledová studie publikovaných proteomických dat získaných analýzami vzorků pacientů a experimentálních modelů s Huntingtonovou chorobou, která umožnila identifikovat nové potenciální biomarkery pro sledování rozvoje této neurodegenerativní choroby.

Klíčová slova: neurální diferenciaci, nervová kmenová buňka, Huntingtonova choroba, proteomika, vaskulární endotelový růstový faktor