

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



**Mgr. Jakub Červenka**

**Studium regulace neurálních signálních drah na úrovni proteinů**  
Neural signalling pathways regulation at protein level

Disertační práce

Vedoucí práce:

RNDr. Rita Suchá, Ph.D.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

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

V Praze, 3. června 2024

Mgr. Jakub Červenka

## Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Ritě Suché, Ph.D. za vedení, cenné rady a pomoc v průběhu celého doktorského studia a zejména při přípravě této disertační práce.

Vedoucímu Laboratoře aplikovaných proteomových analýz Mgr. Petrovi Vodičkovi, Ph.D. a Mgr. Heleně Kupcové Skalníkové, Ph.D. děkuji za cenné rady a pomoc, včetně zajištění financování pro řešené projekty, a za podnětné připomínky při psaní této disertační práce. Rovněž děkuji ostatním kolegům z Laboratoře aplikovaných proteomových analýz za přátelskou atmosféru a vzájemnou pomoc při experimentální práci.

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za kvalitní vědeckou průpravu v průběhu mého bakalářského a diplomového studia, bez které bych nemohl doktorské studium zvládnout.

Hlavní dík patří mé rodině, zejména rodičům, bratrovi, mé manželce a naší dceři za veškerou pomoc, pochopení a podporu v průběhu celého studia.

Výsledky popsané v této disertační práci byly získány při řešení projektů finančně podpořených Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy: Operační program výzkum, vývoj, vzdělávání (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000785), program InterCOST (LTC18079) – CellFit COST Action (CA16119), Národní program udržitelnosti I (LO1609) a program Next Generation EU v rámci Národního plánu obnovy (číslo projektu LX22NPO5102), dále pak Grantovou agenturou České republiky (projekty 19-01747S a 22-24983S), Akademií věd České republiky, v. v. i. (RVO67985904) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekty 1767518 a 1460217).

Figures 5 and 6 in this thesis and complete chapters *Proteomic Analysis of Human Neural Stem Cell Differentiation by SWATH-MS* and *Proteomics in Huntington's Disease Biomarker Discovery* were reproduced with permission from Springer Nature.

## 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

## Abstract

Neurodegenerative diseases are incurable disorders associated with the loss of cells in the central nervous system. The neural cell loss severely affects brain functions which ultimately results in a patient's death. Cell-based therapy using neural stem cells represents a promising strategy. These neural stem cells are expected to stimulate the regeneration of damaged tissue either by protein secretion or through the direct replacement by cells that differentiate into neurons or glial cells upon transplantation. However, current protocols for neural stem cell differentiation yield heterogeneous cell populations so a better understanding of regulatory mechanisms is required. It is crucial to determine the proliferation and differentiation potential to fully characterise the cells intended for transplantation. One of the key factors driving the efficacy of cell therapy is the timing of its administration to the patient. Thus, a search for suitable biomarkers that would assess the development of the disease is essential not only for the precise timing of transplantation but also for monitoring cell therapy outcomes. This dissertation thesis provides a detailed study of human neural stem cells during *in vitro* differentiation, aiming to uncover the pathways that regulate this process. The first part of the thesis describes the development of a targeted mass spectrometry method based on selected reaction monitoring (SRM) that allows the sensitive quantification of protein markers of specific cell populations. Due to the precise quantification of several markers for each analysed cell type, it is possible to monitor the differentiation of the entire cell population. This method can be used for routine cell characterisation or an assessment of the differentiation protocol. The second part of the thesis presents the results of a proteome study focused on the differentiation of neural stem cells. Using the mass spectrometry-based method called sequential window acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH-MS) together with a multiplex antibody method, a significant regulation of specific signalling pathways has been revealed during neural stem cell differentiation. In *in vitro* conditions, this regulation included the signalling pathways Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), Wnt, Interleukin-6 and Vascular endothelial growth factor (VEGF). Such pathways are highly interconnected and positively regulate the expression of the gene encoding the VEGF-A protein. Further experiments demonstrated that the proliferation and survival of spontaneously differentiating neural stem cells is specifically stimulated by the VEGF121 isoform. The supplementation with VEGF121 should be tested to verify its effect on cell replacement therapy. The last part of this thesis reviews published proteomic data obtained from analyses of samples from patients and experimental models with Huntington's disease, providing a list of new potential biomarkers for monitoring the progression of this neurodegenerative disease.

**Key words:** neural differentiation, neural stem cell, Huntington disease, proteomics, vascular endothelial growth factor

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	6
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	9
<b>Úvod</b> .....	14
1. Kmenové buňky .....	15
1.1 Embryonální kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky .....	15
1.2 Nervové kmenové buňky.....	16
1.2.1 Neuroepiteliální buňky .....	17
1.2.2 Radiální glie .....	18
1.2.3 NSC v dospělém mozku .....	19
1.3 Neurony .....	22
1.4 Astrocyty .....	23
1.5 Oligodendrocyty .....	24
1.6 Signální dráhy regulující osud nervových kmenových buněk.....	25
1.6.1 Mezibuněčná hmota.....	25
1.6.2 Epidermal growth factor a Fibroblast growth factor 2 .....	26
1.6.3 Signální dráha Wnt.....	28
1.6.4 Signální dráha Vascular endothelial growth factor .....	29
1.6.5 Další signální dráhy .....	31
1.7 Neurodegenerativní onemocnění.....	32
1.7.1 Huntingtonova choroba .....	33
1.8 Buněčná terapie .....	35
1.9 Proteomika.....	36
1.9.1 Protilátkové metody.....	37
1.9.1.1 Multiplexní protilátková analýza xMAP .....	38
1.9.2 Hmotnostní spektrometrie .....	38
1.9.2.1 Data-dependentní analýza .....	39
1.9.2.2 Analýza nezávislá na datech.....	41
1.9.2.3 Cílené analýzy založené na hmotnostní spektrometrii .....	42
1.10 Cíle práce.....	44
<b>Metody a výsledky</b> .....	45
2.1 Metody .....	45
2.1.1 Chemikálie a materiál.....	45

2.1.2 Práce s buněčnými kulturami .....	47
2.1.2.1 Kultivace lidských nervových kmenových buněk .....	47
2.1.2.2 Diferenciace lidských nervových kmenových buněk .....	47
2.1.2.3 Kultivace lidských astrocytů .....	48
2.1.2.4 Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk.....	49
2.1.2.5 Sledování vlivu růstových faktorů na buněčnou proliferaci.....	49
2.1.2.6 Sledování vlivu růstových faktorů na přežívání buněk .....	49
2.1.2.7 Sběr médií pro analýzu sekretovaných proteinů.....	50
2.1.2.8 Sběr buněk pro izolaci RNA.....	50
2.1.2.9 Sběr buněk pro izolaci proteinů.....	50
2.1.2.10 Kultivace buněk pro imunocytochemii.....	50
2.1.4 Práce s RNA .....	51
2.1.4.1 Izolace celkové RNA.....	51
2.1.4.2 Reverzní transkripce .....	51
2.1.4.3 Kvantitativní real-time PCR.....	52
2.1.5 Práce s proteiny .....	52
2.1.5.1 Imunocytochemie .....	52
2.1.5.3 Hmotnostní spektrometrie .....	54
2.1.5.3.1 Příprava buněčných vzorků .....	54
2.1.5.3.3 Hmotnostně-spektrometrické měření založené na technice DDA a DIA .....	55
2.1.5.3.5 Hmotnostně-spektrometrické měření založené na technice SRM .....	56
2.1.5.3.5.1 Výběr proteinů pro cílené analýzy.....	56
2.1.5.3.5.2 Vývoj SRM metod pro cílené měření proteinů .....	56
2.1.5.3.6 Analýza hmotnostně-spektrometrických dat .....	57
2.1.5.3.6.1 Vyhodnocení SWATH-MS dat .....	57
2.1.5.3.6.4 Vyhodnocení SRM dat .....	58
2.1.5.4 Imunoblot .....	58
2.1.6 Bioinformatické analýzy .....	59
2.2 Výsledky.....	60
2.2.1 Charakterizace experimentálního modelu .....	60
2.2.1.1 Genová exprese známých markerů diferenciace .....	60
2.2.1.2 Přítomnost a lokalizace známých markerů diferenciace .....	60
2.2.1.3 Hladina známých markerů proliferace a diferenciace na úrovni proteinů.....	63
2.2.2. Vývoj SRM metody pro cílenou analýzu NSC diferenciace .....	64

2.2.3 Analýza BG diferenciacie pomocí metody SRM .....	66
2.2.4 Korelace výsledků metody SRM.....	68
2.2.5 Monitorování neurálních markerů u NSC diferencujících za různých podmínek .....	69
2.2.6 Analýza buněčného proteomu v průběhu NSC diferenciacie .....	72
2.2.6.1 Identifikace proteinů s obdobnými změnami hladin v čase.....	73
2.2.6.2 Analýza buněčných procesů regulovaných v průběhu NSC diferenciacie .....	74
2.2.6.2.1 Analýza vybraných markerů buněčných procesů a signálních drah.....	77
2.2.7 Analýza sekretomu v průběhu NSC diferenciacie.....	79
2.2.8 Testování vlivu VEGF-A na proliferaci a přežívání NSC.....	81
2.2.9 Hledání kandidátních biomarkerů pro sledování rozvoje Huntingtonovy choroby.....	82
<b>Diskuze</b> .....	85
<b>Shrnutí</b> .....	101
<b>Publikace a prohlášení o podílu na jejich přípravě</b> .....	102
<b>Seznam použité literatury</b> .....	104
<b>Přílohy</b> .....	137
Příloha 1: Seznam primerů použitých pro RT-qPCR .....	137
Příloha 2: Protilátky použité pro imunocytochemii.....	138
Příloha 3: Protilátky použité pro imunoblot .....	139
<b>Publikace</b> Proteomic Characterization of Human Neural Stem Cells and Their Secretome During <i>in vitro</i> Differentiation.....	140
<b>Publikace</b> Targeted mass spectrometry for monitoring of neural differentiation.....	160
<b>Publikace</b> Proteomic Analysis of Human Neural Stem Cell Differentiation by SWATH-MS .....	173
<b>Publikace</b> Proteomics in Huntington's Disease Biomarker Discovery .....	199



## Seznam použitých zkratek

ALPL	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme
ALS	amyotrofická laterální skleróza
ATP5F1A	ATP synthase subunit alfa, mitochondrial
ATP5F1B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMP	bone morphogenetic proteins
BSA	bovine serum albumin
CAG	cytosin-adenin-guanin
CASP3	Caspase-3
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CD9	CD9 antigen
CNP	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CNS	centrální nervový systém
CRIPTO	Protein Cripto
CRP	C-reactive protein
CXCL1	Growth-regulated alpha protein
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DCX	Neuronal migration protein doublecortin
DDA	data-dependent acquisition (data-dependentní analýza)
DIA	data-independent acquisition (analýza nezávislá na datech)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B
DP	declustering potential (deklastrační potenciál)
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EP	entrance potential (vstupní potenciál)
ESC	embryonic stem cells (embryonální kmenové buňky)
FABP7	Fatty acid-binding protein, brain
FBS	fetal bovine serum

FDR	false discovery rate
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
FGFR1-4	Fibroblast growth factor receptor 1 až 4
GABA	gamma-aminobutyric acid
GABRB3	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3
GALC	Galactocerebrosidase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDF3	Growth/differentiation factor 3
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Excitatory amino acid transporter 1
GLUL	Glutamine synthetase
GO	gene ontology
GT	gestační týden
HBSS	Hank's balanced salt solution
HD	Huntington's disease (Huntingtonova choroba)
HIF-1	signální dráha Hypoxia-inducible factor 1
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HES1, 3 a 5	Transcription factor HES-1/HES-3/HES-5
HLA	HLA class I histocompatibility antigen
HTT	Huntingtin
IAA	iodoacetamid
ICM	inner cell mass (vnitřní buněčná hmota)
IL-6	Interleukin-6
INM	interkinetic nuclear migration (interkinetická migrace jádra)
IPC	intermediate progenitor cells (středně pokročilé progenitorové buňky)
iPSC	induced pluripotent stem cells (indukované pluripotentní kmenové buňky)
iRT	indexed retention time peptidy
ITGB1	Integrin beta-1
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantitation
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KLF4	Krueppel-like factor 4
knm	k-nearest neighbor
LAMA2	Laminin subunit alpha-2
LC	liquid chromatography (kapalinová chromatografie)

LFQ	label-free quantification (kvantifikace bez značení)
Limma	linear models for microarray analysis
LRP5 a 6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 a 6
LysC	Lysyl endopeptidase
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
MFI	median fluorescent intensity (medián fluorescence)
mHTT	mutovaný Huntingtin
MKI67	Proliferation marker protein Ki-67
MOG	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemový hmotnostní spektrometr
MSC	mesenchymal stem cells (mezenchymové kmenové buňky)
MSPP	multipotentní středně pokročilé progenitorové
mRNA	messenger ribonucleic acid
MYC	Proto-oncogene c-Myc
m/z	molekulová hmotnost/náboj
NANOG	Homeobox protein NANOG
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NES	Nestin
NF-L	Neurofilament light polypeptide
NIH	National Institutes of Health
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
NPC	neural progenitor/precursor cells (nervové progenitorové/prekurzorové buňky)
NSC	neural stem cells (nervové kmenové buňky)
NTC	no template control
OCLN	Occludin
OCT4	Octamer-binding protein 4
OLIG1 a 2	Oligodendrocyte transcription factor 1 a 2
PAX6	Paired box protein Pax-6
PBO	progenitorové buňky oligodendrocytů
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen

PDYN	Proenkephalin-B
PENK	Proenkephalin-A
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PLC <sub>γ</sub>	phospholipase C
PIGF	Placenta growth factor
POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1
PRM	parallel reaction monitoring
PROM1	Prominin-1
PSA-NCAM	Polysialylated neural cell adhesion molecule
PVDF	polyvinyliden difluoridová
RBFOX3	RNA binding protein fox-1 homolog 3
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
RT	room temperature
RTK	receptor tyrosine kinase
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
S100B	Protein S100-B
SCZ	subcallosal zone
SGZ	subgranulární zóna
SHH	Sonic hedgehog protein
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25
SOX2	Transcription factor SOX-2
SOX10	Transcription factor SOX-10
SRM	selected reaction monitoring
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SVZ	subventrikulární zóna
SWATH-MS	sequential window acquisition of all theoretical mass spectra
TCEP	tris(2-karboxyethyl)-fosfin hydrochlorid
TIC	total ion current (intenzita celkového signálu)
THY1	Thy-1 membrane glycoprotein
TMP	Tukey median polish
TMT	tandem mass tags
TTBS	tween-tris-buffered saline
TUBB3	Tubulin beta-3 chain

UHDRS	Unified Huntington's Disease Rating Scale
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VEGF121	Vascular endothelial growth factor, isoforma 121
VEGF165	Vascular endothelial growth factor, isoforma 165
VEGFR1-3	Vascular endothelial growth factor receptor 1 až 3
VIM	Vimentin
VZ	ventrikulární zóna
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
WT1	Wilms tumor protein
xMAP	multi-analyte profiling

## Úvod

Centrální nervová soustava (CNS), zahrnující mozek a míchu, zajišťuje kognitivní a behaviorální funkce, tedy vnímání vnějších i vnitřních podnětů (příjem signálů z periferního nervového systému), jejich zpracování (včetně vysoce komplexních dějů jako jsou paměť, učení či emoce) a reakce na ně (např. regulace svalstva vedoucí k pohybu – včetně řeči, hormonální regulace orgánů atd.).<sup>1</sup> S ohledem na tyto klíčové funkce představuje jakékoliv narušení CNS závažný, často i život ohrožující stav. Již v roce 2006 publikovala Světová zdravotnická organizace (WHO) souhrnnou zprávu, ve které uvádí, že téměř jedna miliarda světové populace byla postižena některou z neurologických poruch (např. epilepsií, mozkovou mrtvicí, mozkomíšním poraněním, infekcí CNS nebo Alzheimerovou či Parkinsonovou chorobou). Vzhledem ke stárnoucí populaci ve vyspělých zemích má podle statistických projekcí WHO počet osob s neurologickým onemocněním narůstat.<sup>2</sup> Studie zdravotních dat z let 1990–2021 poté prokázala, že neurologickým onemocněním trpí více než tři miliardy osob, tedy zhruba každý třetí člověk. Neurologické poruchy jsou tak celosvětově nejčastější příčinou nemoci a zdravotního postižení a protože počty pacientů a náklady na léčbu budou i nadále narůstat, představují zásadní zdravotní, sociální i ekonomický problém.<sup>3</sup>

Zcela nezbytné pro vývoj a funkce nervové soustavy jsou nervové kmenové buňky (NSC, z angl. neural stem cells) a jejich diferenciaci do neuronů a gliových buněk. Studium biologie NSC a jejich diferenciaci, zejména signálních drah a buněčných procesů, které regulují, je pro pochopení vývoje a onemocnění nervové soustavy klíčové. NSC a z nich odvozené buňky nachází uplatnění také v buněčné terapii neurologických onemocnění.<sup>4,5</sup> Cílem buněčné transplantace je regenerace poškozené tkáně sekrecí určitých proteinů nebo přímo nahrazením poškozených či odumřelých buněk.<sup>4</sup> Současné protokoly pro diferenciaci NSC *in vitro* však poskytují heterogenní populace buněk v různé fázi diferenciaci.<sup>6</sup> Velkou snahou je získat lépe definovanou buněčnou populaci s možností ovlivnit její proliferaci a diferenciacní potenciál, aby nedošlo k nekontrolovanému buněčnému dělení a vzniku nádoru.<sup>7,8</sup> Studium mechanismů regulujících diferenciaci NSC a podrobná charakterizace buněk jsou proto klíčové pro další krok vpřed ke klinickému využití těchto buněk v regenerativní terapii nejen neurodegenerativních onemocnění.

V rámci disertační práce jsem se zaměřil na vývoj vhodného postupu pro analýzu NSC, zejména optimalizaci měření pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a vyhodnocení získaných dat.<sup>9</sup> Tento postup jsem následně použil pro podrobnou charakterizaci a analýzu buněčného proteomu a sekretomu NSC v průběhu jejich diferenciaci v *in vitro* podmínkách.<sup>6,10</sup>

V závěrečné části mé disertační práce jsem se věnoval hledání potenciálních biomarkerů rozvoje HD pomocí metaanalýzy publikovaných proteomických analýz zaměřených na pochopení mechanismů rozvoje tohoto neurodegenerativního onemocnění u pacientů i experimentálních zvířecích modelů.<sup>11</sup>

## 1. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou zcela zásadní při vývoji jedince v embryonální a fetální fázi, ale svoji nepostradatelnou roli mají i postnatálně a v dospělém organismu. Jsou to nediferencované buňky, jejichž typickou vlastností je schopnost dvojího druhu buněčného dělení: 1) symetrické dělení, při kterém dochází k namnožení původních kmenových buněk (proliferace – sebeobnova) a 2) asymetrické dělení, při kterém vzniká dceřiná buňka, která bude dále diferencovat do určitého buněčného typu.<sup>12</sup>

Kmenové buňky můžeme rozlišit na základě toho, do kolika či jakých buněčných typů mohou dále diferencovat. Totipotentní kmenové buňky mohou diferencovat do jakéhokoliv buněčného typu. Příkladem totipotentní buňky je zygota, případně z ní vznikající blastomery. V průběhu embryonálního vývoje se totipotence buněk brzy změní na pluripotenci (cca 4. den vývoje embrya). Pluripotentní kmenové buňky mohou diferencovat do všech buněčných typů, s výjimkou buněk odvozených z trofoblastu. Multipotentní kmenové buňky mají menší diferenciační potenciál než pluripotentní kmenové buňky, přesto mohou dát vzniknout většině buněk určité zárodečné vrstvy/tkáně. Oligopotentní kmenové buňky mají svůj diferenciační potenciál omezený jen na několik buněčných typů. Nejvíce specializovaným typem jsou unipotentní kmenové buňky, které mohou diferencovat pouze do jediného buněčného typu. Jak je patrné, v průběhu vývoje se s přibývajícím specializací diferenciační potenciál snižuje.<sup>12</sup>

### 1.1 Embryonální kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (ESC, z angl. embryonic stem cells) jsou přítomny pouze během časného vývoje embrya, konkrétně ve stádiu blastocysty, kde tvoří vnitřní buněčnou hmotu (ICM, z angl. inner cell mass). ESC mohou diferencovat do buněk všech tří zárodečných vrstev (ektoderm, mezoderm a entoderm), ale nemohou dát vzniknout buňkám extraembryonálních tkání odvozeným z trofoektodermu (trofoblastu).<sup>12,13</sup> Izolace a kultivace ESC byla nejprve popsána u myši<sup>14,15</sup> a později i u člověka<sup>16,17</sup>. Zásadní byla práce Reubinoffa a kolektivu, kteří dokázali, že je možné ESC v *in vitro* podmínkách diferencovat do nervových buněk, včetně zralých neuronů.<sup>18</sup>

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC, z angl. induced pluripotent stem cells) jsou reprogramované (původně diferencované) buňky odvozené z fibroblastů, u kterých byla uměle navozena pluripotence indukovanou expresí čtyř transkripčních faktorů: KLF4 (Krueppel-like factor 4), OCT4 (Octamer-binding protein 4, známý také jako POU5F1 – POU domain, class 5, transcription factor 1), MYC (Proto-oncogene c-Myc) a SOX2 (Transcription factor SOX-2). Takto připravené iPSC mají obdobné vlastnosti jako ESC, např. morfologii, genovou expresi, buněčně-specifické markery, proliferaci a diferenciační potenciál – mohou diferencovat do všech tří zárodečných vrstev.<sup>19,20</sup>

Pro identifikaci ESC a iPSC se často sleduje přítomnost nebo zvýšená hladina proteinů: CD9 (CD9 antigen), THY1 (Thy-1 membrane glycoprotein), ALPL (Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme) a HLA (HLA class I histocompatibility antigen), případně zvýšená exprese genů kódujících proteiny: CRIPTO (Protein Cripto), DNMT3B (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B), GABRB3 (Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3), GDF3 (Growth/differentiation factor 3), NANOG (Homeobox protein NANOG) či OCT4.<sup>21</sup> Přestože exprese žádného z používaných markerů není přímým důkazem pluripotence, pro charakterizaci diferenciačního potenciálu ESC a iPSC se nejvíce používají transkripční faktory NANOG, OCT4 a SOX2. Problematická je specifita některých výše uvedených markerů (např. CRIPTO, CD9 či SOX2), jejichž hladina v buňkách diferencovaných z ESC sice obvykle klesá, přesto jsou však exprimované a detekovatelné i v jiných buněčných typech.<sup>22,23</sup>

## 1.2 Nervové kmenové buňky

Označení NSC je synonymem pro nervové progenitorové buňky (NPC, z angl. neural progenitor cells), někdy také označované jako nervové prekurzorové buňky (NPC, z angl. neural precursor cells). Jsou to multipotentní kmenové buňky CNS a jejich dělení může probíhat symetricky, s cílem namnožení buněk, nebo asymetricky, kdy vzniká dceřiná buňka, která bude dále diferencovat do určitého typu glií nebo neuronů.<sup>24</sup> V průběhu embryonálního vývoje rozlišujeme více typů NPC, a proto se v literatuře někdy používá označení NSC specificky pro NPC v mozku s ukončeným embryonálním vývojem, respektive v mozku dospělého jedince.<sup>25</sup> Zkratka NPC se také používá k označení neuronálních prekurzorových buněk (z angl. neuronal precursor cells), tedy buněk, které jsou již předurčeny k diferenciaci do neuronů, nikoliv do gliových buněk.<sup>26</sup> V rámci této práce jsou termíny NSC a NPC používány jako synonyma pro označení multipotentních buněk schopných proliferace a diferenciaci do různých typů astrocytů, oligodendrocytů či neuronů. Označení neuronální prekurzorové buňky je používáno v nezkrácené formě.



Proteinovým markerem, který je exprimován zřejmě ve všech NSC (během embryonálního vývoje i v dospělém mozku) je SOX2.<sup>27</sup> Jak bylo zjištěno na myším modelu, jeho přítomnost je charakteristická pro multipotentní NSC se schopností sebeobnovy.<sup>27</sup> Transkripční faktor SOX2 hraje významnou roli při udržování pluripotence v ESC<sup>28</sup> a iPSC<sup>19,20</sup>. V NSC jeho hladina klesá, zůstává ale klíčová pro regulaci transkripce přibližně 1300 genů. Asi u poloviny genů působí SOX2 jako aktivátor (zejména pro geny kódující další transkripční faktory), zatímco u druhé poloviny slouží jako represor transkripce (zejména pro geny kódující proteiny spojené s buněčným cyklem a mitózou).<sup>29</sup>

### 1.2.1 Neuroepiteliální buňky

V průběhu raného vývoje embrya obratlovců diferencují z ektodermu neuroepiteliální buňky, které během procesu neurulace vytvářejí neurální trubici – základ budoucí CNS. Tyto buňky jsou primární NSC, z nichž následně vznikají všechny neurony, astrocyty a oligodendrocyty v CNS. Neuroepiteliální buňky mají charakteristické rysy epiteliálních buněk, zejména polarizaci buňky na apikální a bazální (bazolaterální) části membrány oddělené těsnými spoji (angl. tight junctions) a adhezními spoji (angl. adherens junctions).<sup>30</sup> Apikální části neuroepiteliálních buněk ohraničují lumen neurální trubice (ventrikulární systém – budoucí mozkové komory naplněné mozkomíšním mokem) a bazální části membrány jsou v kontaktu s bazální laminou.<sup>31</sup> S polarizací buňky v rámci apikálně-bazální osy souvisí také interkinetická migrace jádra (INM, z angl. interkinetic nuclear migration). Při INM dochází v průběhu buněčného cyklu k periodickým pohybům jádra (a spolu s ním i velké části celkového objemu buňky – soma), kdy jádro putuje bazálním směrem během G1 fáze, v S fázi je poblíž bazální části membrány, následně putuje apikálně během G2 fáze a během mitózy je jádro lokalizováno vždy poblíž apikální membrány.<sup>32,33</sup> Tento pohyb jádra je zásadní pro regulaci neuronální diferenciace (neurogeneze).<sup>34</sup> První neurony v CNS vznikají již při asymetrickém dělení neuroepiteliálních buněk.<sup>35</sup>

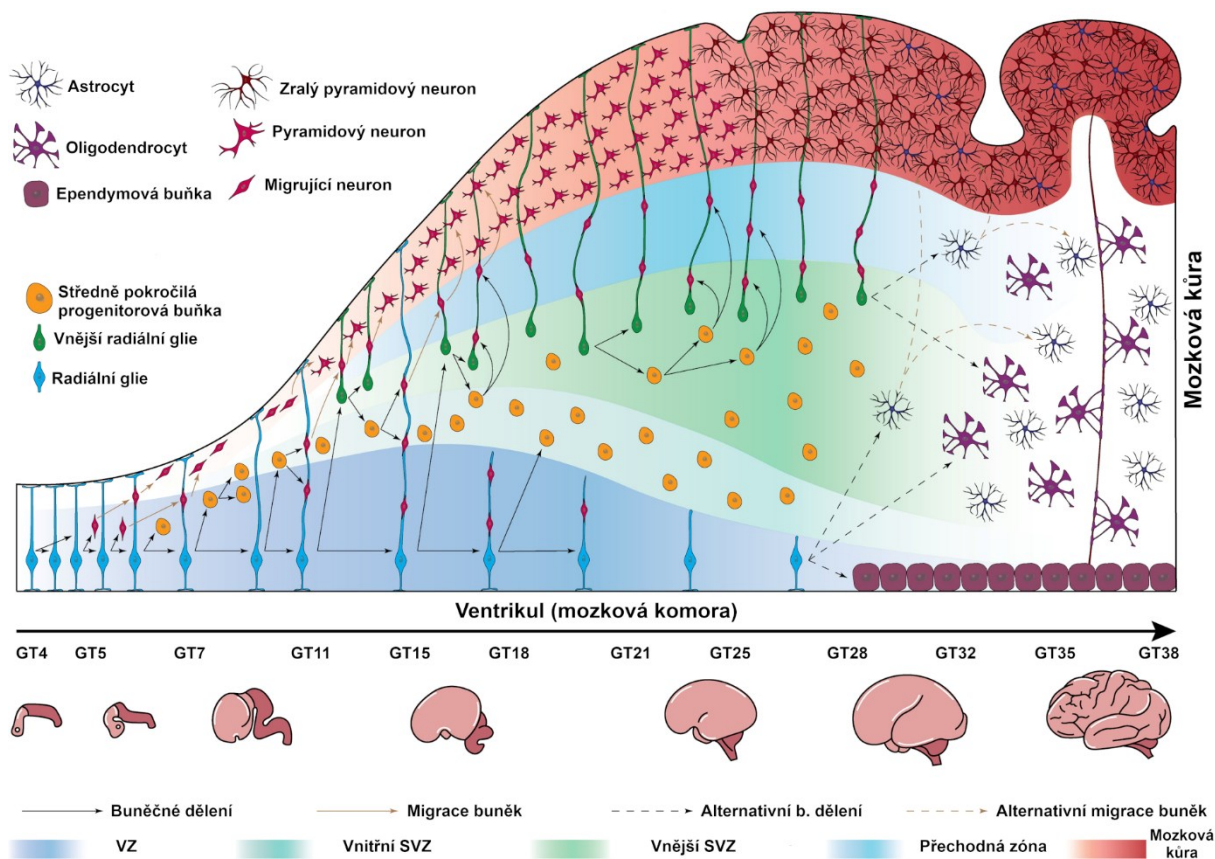
Neuroepiteliální buňky jsou (podobně jako ESC) snadno identifikovatelné podle jejich specifické lokalizace ve vyvíjejícím se embryu – tvoří jedinou vrstvu buněk okolo ventrikulu a mají charakteristickou morfologii epitelu (polarizace na apikální a bazolaterální část buňky).<sup>30</sup> Mezi proteinové markery neuroepiteliálních buněk patří NES (Nestin)<sup>30</sup>, PROM1 (Prominin-1, lokalizovaný do apikální membrány)<sup>30</sup>, HES1, HES3 a HES5 (Transcription factor HES-1/HES-3/HES-5)<sup>36</sup>, SOX2<sup>37</sup>, a proteiny vytvářející těsné spoje, např. OCLN (Occludin)<sup>38</sup>.

### 1.2.2 Radiální glie

S probíhající neurogenezí se z neuroepiteliálních buněk stávají radiální glie. Z původně jedné vrstvy neuroepiteliálních buněk okolo ventrikulu (tzv. ventrikulární zóna, VZ) se v průběhu embryonálního vývoje díky proliferaci a diferenciaci radiálních glií stane mozková kůra složená z mnoha buněčných vrstev (Obr. 1).<sup>30</sup> Některé radiální glie projdou asymetrickým buněčným dělením, při kterém vznikají tzv. středně pokročilé progenitorové buňky (IPC, z angl. intermediate progenitor cells).<sup>39</sup> Protože tyto IPC jsou lokalizovány bazálně vůči radiálním gliím (nemají již vlastní polarizovanou apikálně-bazální orientaci), jsou také označovány jako bazální progenitorové buňky.<sup>35</sup> Tyto neuronální prekurzorové buňky migrují bazálně od radiálních glií a vytváří tzv. subventrikulární zónu (SVZ), kde konečným symetrickým buněčným dělením každé IPC vzniknou dva neurony.<sup>35,39</sup> V průběhu vývoje mozkové kůry některé radiální glie ztrácí spojení apikální části s ventrikulem, avšak zůstávají dále spojené s bazální laminou.<sup>39</sup> Protože se tyto buňky zkracují, a tím se aktivně pohybují bazálním směrem (vnější část SVZ), označují se jako vnější radiální glie<sup>40</sup>, které dále diferencují do astrocytů či neuronů.<sup>41,42</sup> Radiální glie, které zůstávají v kontaktu svojí apikální membránou s ventrikulem, ale ztrácí spojení s bazální laminou, mohou dále diferencovat do astrocytů, oligodendrocytů či ependymových buněk (Obr. 1).<sup>43</sup>

Radiální glie vykazují některé typické znaky neuroepiteliálních buněk, např. buněčnou polarizaci a INM (na rozdíl od neuroepiteliálních buněk se však jádro nepohybuje po celé délce buňky). Nemají však těsné spoje a mimo neuronů jsou schopné diferenciaci také do astrocytů a oligodendrocytů. Oproti neuroepiteliálním buňkám je však jejich diferenciační potenciál zřejmě omezený a určité radiální glie jsou schopné diferenciaci pouze do neuronů, zatímco jiné diferencují do astrocytů či do oligodendrocytů.<sup>30</sup>

Pro identifikaci radiálních glií se používají některé markery shodné s neuroepiteliálními buňkami, například zvýšená hladina proteinů NES<sup>30,44</sup>, HES1, HES3 a HES5<sup>36</sup> či SOX2<sup>44</sup>. Odlišit radiální glie od neuroepiteliálních buněk je možné na základě snížené hladiny proteinů těsných spojů (např. OCLN)<sup>38</sup> a naopak zvýšené hladiny proteinů specifických pro astrocyty nebo oligodendrocyty, např. GLAST (Excitatory amino acid transporter 1)<sup>45</sup> a OLIG2 (Oligodendrocyte transcription factor 2)<sup>42</sup>. Mezi další proteiny se zvýšenou hladinou v radiálních gliích patří FABP7 (Fatty acid-binding protein, brain, dříve označovaný zkratkou BLBP)<sup>45,46</sup>, GFAP (Glial fibrillary acidic protein)<sup>47</sup>, GLUL (Glutamine synthetase)<sup>48</sup>, PAX6 (Paired box protein Pax-6)<sup>49</sup>, VIM (Vimentin)<sup>44</sup> a WT1 (Wilms tumor protein)<sup>44</sup>.



**Obr. 1: Embryonální vývoj lidského mozku a mozkové kůry mezi 4. a 38. gestačním týdnem.** Radiální glie nejprve svým symetrickým dělením okolo ventrikulu vytvoří ventrikulární zónu (VZ). Okolo pátého gestačního týdne (GT) se radiální glie začínají dělit nesymetricky a vznikají tak neurony, a také středně pokročilé progenitorové buňky, které migrují bazálně od radiálních glií a dávají vzniknout subventrikulární zóně (SVZ), kde nakonec diferencují do neuronů. S růstem mozkové kůry část radiálních glií ztrácí kontakt své apikální membrány s ventrikulem a stanou se z nich vnější radiální glie, které dále diferencují do astrocytů a oligodendrocytů. Radiální glie v oblasti VZ postupně všechny diferencují do neuronů, astrocytů, oligodendrocytů nebo ependymových buněk. Převzato a upraveno podle <sup>43</sup>.

### 1.2.3 NSC v dospělém mozku

CNS dospělých savců byla v minulosti obecně vnímána jako tkáň s minimální plasticitou či schopností sebeobnovy. Zatímco při embryonálním vývoji je vše do jisté míry synchronizováno v čase i prostoru (neuroepiteliální buňky i radiální glie jsou nejprve v jedné, respektive v několika málo vrstvách buněk), u NSC v dospělém mozku takováto synchronizace (regulace jejich buněčného dělení, respektive proliferace nebo diferenciaci) není možná.<sup>50</sup> Experimenty na potkanech (první byly publikovány již v roce 1912) však ukázaly, že i v dospělém mozku jsou přítomny dělicí se buňky.<sup>51,52</sup> Přítomnost NSC a schopnost jejich diferenciaci v dospělém mozku dále potvrdily experimenty na myších, které prokázaly

probíhající neurogenezi.<sup>53</sup> Další studie ukázaly, že neurogeneze v dospělém mozku není výjimkou pouze u savců, ale obecně probíhá u všech nižších (ryby a obojživelníci) i vyšších (plazi, ptáci a savci) obratlovců.<sup>54–57</sup>

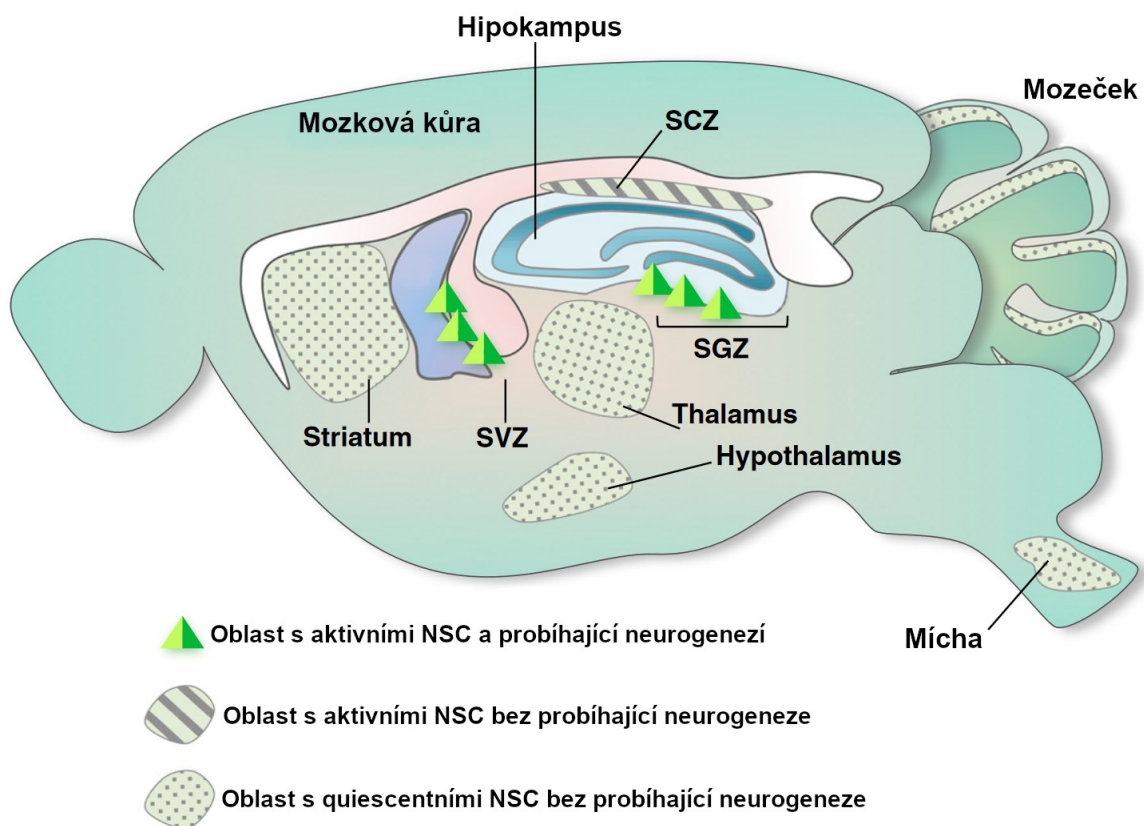
V dospělém mozku savců bylo popsáno několik oblastí, kde jsou přítomny NSC se schopností diferenciací. Prvním popsáním místem byla SVZ okolo laterálních stěn mozkových komor (ventrikulů), kde v průběhu života vznikají neuronální prekursorové buňky, které migrují do oblasti čichového bulbu (*bulbus olfactorius*), kde dále diferencují do neuronů (Obr. 2).<sup>58,59</sup> Mimo neuronálních prekursorových buněk můžeme na základě morfologie a exprese určitých proteinů rozlišit v SVZ další buněčné typy – NSC a dvě populace astrocytů (z toho pouze jedna je mitoticky aktivní).<sup>60</sup> Navazující studie ukázala, že astrocyty v oblasti SVZ dospělého mozku mají stále významný diferenciační potenciál. Tyto astrocyty jsou schopny další proliferace a návratu do stavu NSC, ale i diferenciací do neuronálních prekursorových buněk a neuronů.<sup>61</sup> Jiní autoři na základě metaanalýzy dostupných dat usuzují, že nejde o pravé astrocyty s vlastnostmi NSC, ale spíše o NSC, které sdílí některé společné rysy s astrocyty, podobně jako je tomu v případě astrocytů a radiálních glií.<sup>62</sup>

Johansson a kolektiv ukázali, že ependymové buňky tvořící stěnu mozkových komor pod SVZ jsou NSC, ze kterých vznikají neuronální prekursorové buňky (zřejmě při průchodu přes SVZ). Podle autorů jsou právě ependymové buňky, a ne buňky v SVZ, zdrojem neuronálních prekursorových buněk dále diferencujících do neuronů čichového bulbu. V případě poranění míchy navíc mohou tyto ependymové buňky diferencovat do astrocytů, které v místě poranění vytvoří gliovou jizvu.<sup>63</sup> Jak je patrné z výše uvedených prací, buňky v oblasti SVZ a jejím blízkém okolí mají významnou plasticitu a diferenciační potenciál, které jsou zřejmě rozdílně regulovány za fyziologických (např. neurogeneze v dospělém mozku) a patologických (např. míšní poranění) podmínkách.

Další oblastí, kde se v dospělém mozku nachází NSC, je hipokampus, přesněji subgranulární zóna (SGZ) v *gyrus dentatus* (Obr. 2). NSC v této oblasti diferencují preferenčně do neuronů, ale část zřejmě také do gliových buněk (astrocytů a oligodendrocytů).<sup>64–66</sup> Některé z těchto gliových buněk mají morfologii typickou pro radiální glie, ale exprimují proteiny specifické pro prekursorové buňky astrocytů i plně diferencované astrocyty.<sup>64</sup> Není tedy vyloučeno, že mají podobné vlastnosti (např. diferenciační potenciál) jako astrocyty (NSC) v SVZ dospělého mozku.

Kromě oblastí SVZ a SGZ, které jsou u savců zřejmě hlavními centry neurogeneze v dospělém mozku, byly NSC popsány i v dalších částech CNS: *hypothalamus*<sup>67</sup>; oblast pod *corpus callosum* (SCZ, z angl. subcallosal zone), kde NSC diferencují zejména do

oligodendrocytů<sup>68</sup>; kůra mozečku, kde NSC diferencují do neuronů i do glií, včetně Bergmannových buněk<sup>69</sup> (radiální glie v dospělém mozku<sup>70</sup>); sítnice oka, kde se nacházejí Müllerovy buňky<sup>71</sup> (rovněž radiální glie dospělého mozku<sup>70</sup>); mozkové komory a mícha. V oblasti mozkových komor a míchy se nachází buňky, které se po izolaci a kultivaci v přítomnosti proteinu EGF (Epidermal growth factor), v případě buněk izolovaných z míchy také s proteinem FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) chovají jako NSC – jsou schopné sebeobnovy a diferenciaci do neuronů i glií.<sup>72</sup> S ohledem na původní lokalizaci těchto buněk v CNS je pravděpodobné, že tyto indukované NSC byly původně ependymovými buňkami.<sup>63</sup>



**Obr. 2: Hlavní oblasti přítomnosti NSC a neurogenéze v dospělém mozku u savců.**

V dospělém mozku savců bylo popsáno více oblastí, kde se nachází aktivně se dělicí a diferencující nebo naopak quiescentní NSC, případně oblasti, kde probíhá neurogenéze. Aktivní NSC byly popsány v subventrikulární zóně (SVZ) a subgranulární zóně (SGZ). NSC byly také popsány v míše, mozečku, oblasti pod *corpus callosum* (SCZ, z angl. subcallosal zone) či pod hypothalamem. V některých oblastech byla pozorována indukovatelná neurogenéze (*striatum* a *thalamus*), ale není zatím jisté, jestli diferencující buňky jsou z NSC v dané oblasti, z neuronálních prekursorových buněk nebo jde o neurony, které do této oblasti migrují z jiné oblasti s NSC. Převzato a upraveno podle <sup>73</sup>.

Většina studií NSC v dospělém mozku a jejich diferenciaci byla provedena na hlodavcích, jako je myš nebo potkan, případně na buňkách v *in vitro* podmínkách. Není proto zatím jisté, jestli všechny popsané oblasti obsahující NSC jsou přítomny také v lidském dospělém mozku. Podobné je to s jednotlivými buněčnými typy diferencujícími z uvedených NSC a s jejich relevancí v *in vivo* podmínkách. Příkladem je významný rozdíl v neurogenезi v SVZ oblasti dospělého mozku mezi hlodavci (myš a potkan) a primáty (člověk). Zatímco u hlodavců většina neuronálních prekurzorových buněk z SVZ diferencuje do neuronů čichového bulbu<sup>58,59</sup>, u člověka jsou NSC v SVZ nejvíce aktivní v prvních měsících až letech po narození a hlavním cílem neuronálních prekurzorových buněk a z nich diferencovaných neuronů není čichový bulbus<sup>74,75</sup>, ale prefrontální mozková kůra<sup>76</sup> a striatum<sup>77</sup>. Podobné je to v případě Müllerových buněk, které jsou schopny *in vivo* diferenciaci do neuronů sítnice oka pouze u ryb, obojživelníků a ptáků, nikoliv však u savců.<sup>78</sup>

Pro charakterizaci NSC v dospělém mozku se využívají stejné markery jako pro NSC v průběhu embryonálního vývoje, ale hladiny a kombinace jednotlivých markerů se mohou lišit mezi NSC z různých částí dospělého mozku (např. SVZ a SGZ) i v rámci jednotlivých buněčných populací v daném místě. Nejčastěji jsou používány proteiny GFAP<sup>79</sup>, NES<sup>65</sup>, NOTCH1 (Neurogenic locus notch homolog protein 1)<sup>63</sup>, PAX6<sup>80</sup>, SOX2<sup>27</sup> a VIM<sup>79</sup>.

### 1.3 Neurony

Základními nervovými buňkami CNS jsou neurony, které jsou u savců lokalizovány zejména v mozkové kůře (přibližně 70 % neuronů CNS) a v koncovém mozku (*telencephalon*, přibližně 20 % neuronů CNS).<sup>81</sup> Zralé, plně diferencované neurony jsou nedělicími se buňkami, které aktivně blokují svůj buněčný cyklus.<sup>82</sup> Obecně lze morfologii neuronu popsat jako buňku s tělem (soma, ve kterém je buněčné jádro) s rozvětvenými výběžky (dendrity). Ze soma vybíhá jeden výrazný výběžek (axon), který je na konci opět rozvětvený do menších výběžků (axonální zakončení), které interagují s dalšími neurony prostřednictvím synapsí.<sup>83</sup> Odhaduje se, že v mozku dospělého člověka je přítomno až 5 000 různých druhů neuronů<sup>84</sup>, které je od sebe možné odlišit na základě jejich lokalizace ve tkáni, buněčné morfologie, fyziologie (např. různé akční potenciály) či genové exprese.<sup>83,85</sup>

Hlavní úlohou neuronů v CNS je přenos signálu. Tyto buňky pomocí transmembránových iontových kanálů aktivně vytvářejí koncentrační gradienty iontů (zejména Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup>) vně a uvnitř buněk (klidový membránový potenciál) a využívají je k šíření vzruchu (akčního potenciálu), při kterém dochází nejprve k prudkému zvýšení (tzv. depolarizaci), následovanému rychlým snížením (tzv. repolarizací) membránového potenciálu.<sup>86,87</sup> Jakmile

akční potenciál doputuje po membráně na konec axonu, dojde v synapsích k otevření iontových kanálů pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které způsobí splynutí váčků obsahujících neurotransmitery s presynaptickou membránou. To vede k uvolnění neurotransmiterů do synaptické štěrbině a následnému ovlivnění (předání signálu) postsynaptickému neuronu.<sup>88</sup>

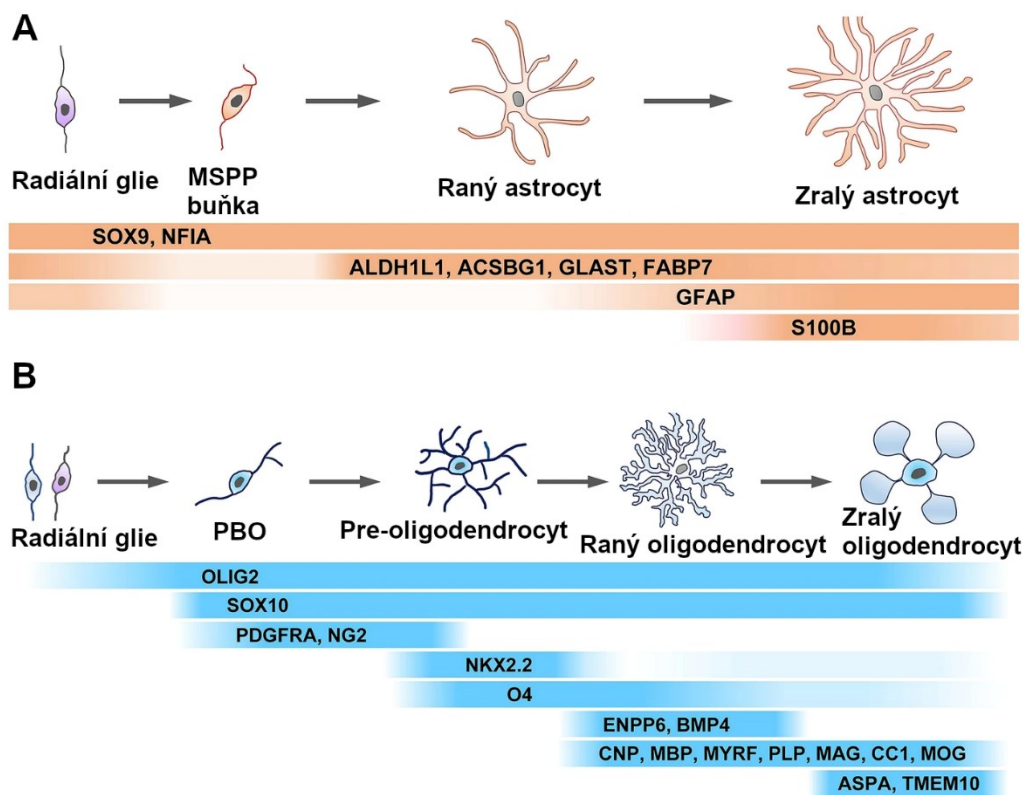
Neurony, respektive neuronální prekursorové buňky, jsou obvykle charakterizovány na základě zvýšené hladiny proteinů DCX (Neuronal migration protein doublecortin; exprimován zejména neuronálními prekursorovými buňkami, během zrání neuronů jeho hladina klesá)<sup>89</sup>, MAP2 (Microtubule-associated protein 2)<sup>90</sup>, RBFOX3 (RNA binding protein fox-1 homolog 3, známý také jako NeuN; exprimován ve zralých neuronech)<sup>91</sup>, PSA-NCAM (Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule; exprimován zejména neuronálními prekursorovými buňkami)<sup>92</sup> a TUBB3 (Tubulin beta-3 chain, známý také pod zkratkou TUJ1, kterou byla označována jeho detekční protilátka)<sup>93</sup>. Naopak hladina SOX2 při neuronální diferenciaci klesá.<sup>27</sup>

#### 1.4 Astrocyty

Astrocyty jsou, spolu s radiálními gliemi, z nichž jsou odvozeny, základním typem gliových buněk. Typická je jejich hvězdičková morfologie – tělo buňky obklopené výběžky (Obr. 3A), přestože i astrocyty jsou morfologicky heterogenní skupinou buněk. Za hlavní funkci astrocytů byla dlouho považována strukturální podpora neuronů (astrocyty obklopují neurony a produkují mezibuněčnou hmotu). Řada studií prokázala, že astrocyty hrají roli také v mnoha dalších procesech, které jsou často nezávislé na jejich strukturní funkci, např. výživa neuronů (energetický metabolismus CNS), produkce neurotransmiterů, udržování mikroprostředí CNS (např. hladiny glutamátu,  $\text{K}^+$  iontů či pH), přenos signálu přes synapse, migrace neuronů, ochrana před oxidativním poškozením, angiogeneze, regulace imunitní odpovědi a mnoho dalších (shrnutí v <sup>94,95</sup>). Mimo uvedené funkce zralých astrocytů jsou zřejmě určité skupiny astrocytů „zásobními“ NSC v dospělém mozku.<sup>61</sup>

Pro charakterizaci astrocytů a jejich prekursorů (Obr. 3A) jsou nejčastěji sledovány hladiny těchto proteinů: GLUL (exprimován také v radiálních gliích a oligodendrocytech)<sup>48,96,97</sup>, FABP7 (exprimován také v radiálních gliích a prekuzorech oligodendrocytů)<sup>45,96</sup>, GFAP (exprimován v radiálních gliích, poté je jeho exprese umlčena a znovu obnovena až v průběhu zrání astrocytů)<sup>47,96</sup>, GLAST (exprimován také v radiálních gliích)<sup>45,96</sup> a S100B (Protein S100-B; exprimován pouze astrocyty v šedé hmotě mozkové a v oligodendrocytech)<sup>96</sup>. Jak je patrné, odlišit astrocyty a radiální glie jen na základě markerů astrocytů je v průběhu embryonálního vývoje velmi komplikované, a je proto nutné analyzovat

paralelně hladiny dalších markerů, které jsou specifické pro radiální glie (NSC), např. NES, SOX2 či PAX6.



**Obr. 3: Diferenciace astrocytů a oligodendrocytů a jejich markery.** A) Diferenciace radiálních glií přes multipotentní středně pokročilé progenitorové (MSPP) buňky do raných astrocytů a poté zralých astrocytů se znázorněním proteinových markerů uvedených buněčných typů (oranžová barva). B) Diferenciace radiálních glií přes progenitorové buňky oligodendrocytů (PBO) a pre-oligodendrocyty do raných oligodendrocytů a poté zralých oligodendrocytů se znázorněním proteinových markerů uvedených buněčných typů (modrá barva). Převzato a upraveno podle <sup>96</sup>.

### 1.5 Oligodendrocyty

Dalším ze základních typů gliových buněk jsou oligodendrocyty. Jsou to buňky menší než astrocyty, a přestože na začátku svého vývoje mají podobnou morfologii jako astrocyty (Obr. 3B), zralé oligodendrocyty mají specifickou, nezaměnitelnou morfologii. Z těla buňky vybíhají jednotlivé výběžky membrány (až 50), které během procesu myelinizace obalují axony okolních neuronů.<sup>98</sup> Myelinizace axonů umožňuje rychlejší přenos vzruchu a byla zřejmě jednou z hlavních podmínek evoluce CNS.<sup>99</sup> Podobně jako v případě astrocytů se však ukazuje, že také oligodendrocyty hrají roli v řadě dalších procesů, například udržování integrity axonů,



vyživování neuronů (energetický metabolismus CNS), udržování mikroprostředí CNS (např. hladiny  $K^+$  iontů) a regulaci imunitní odpovědi.<sup>99–101</sup>

Prekurzory oligodendrocytů a plně diferencované (zralé) oligodendrocyty jsou často charakterizovány (Obr. 3B) na základě zvýšené hladiny těchto proteinů: CNP (2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase)<sup>98</sup>, GALC (Galactocerebrosidase)<sup>98</sup>, MAG (Myelin-associated glycoprotein)<sup>98</sup>, MBP (Myelin basic protein)<sup>98</sup>, MOG (Myelin-oligodendrocyte glycoprotein)<sup>98</sup>, OLIG1 a OLIG2 (Oligodendrocyte transcription factor 1 a 2; exprimován také v radiálních gliích)<sup>102,103</sup> a SOX10 (Transcription factor SOX-10)<sup>96</sup>.

## 1.6 Signální dráhy regulující osud nervových kmenových buněk

V průběhu diferenciaci NSC během embryonálního a fetálního vývoje i postnatálně a v dospělém mozku dochází k zásadním změnám na molekulární úrovni. Při diferenciaci NSC do glií či neuronů (či jejich prekurzorů) se významně mění genová exprese<sup>104–106</sup>, dochází k epigenetickým změnám<sup>106,107</sup> a k podstatným změnám metabolismu buněk (např. přechod z aerobní glykolýzy na oxidativní fosforylaci<sup>108</sup> či syntéza specifických lipidů a proteinů myelinu<sup>98</sup>). Buňky migrují a mění svoji morfologii, s čímž jsou spojeny významné změny v buněčném cytoskeletu.<sup>105</sup> Regulace těchto změn v čase a prostoru je nesmírně komplexní. Ve srovnání s adherentními buněčnými kulturami kultivovanými *in vitro* ve 2D, v *in vivo* prostředí jsou buňky uspořádány do 3D struktur tvořených mnoha vrstvami buněk (s výjimkou krátkého časového úseku vývoje embrya, kdy neuroepiteliální buňky tvoří jedinou buněčnou vrstvu budoucí CNS). V následujících kapitolách se zaměřím na popis základních buněčných drah a signalizace, které regulují další osud NSC ve vyvíjejícím se embryu, v dospělém mozku či v *in vitro* podmínkách, s důrazem na signální dráhy, které úzce souvisí s výsledky uvedenými v této disertační práci.

### 1.6.1 Mezibuněčná hmota

Mezibuněčná hmota (extracelulární matrix, ECM) vytváří specifické 3D mikroprostředí, čímž hraje významnou roli v regulaci (často aktivaci) řady signálních drah, a tím významně ovlivňuje vývoj NSC (jejich proliferaci či diferenciaci) a z nich odvozených nervových buněk (včetně jejich morfogeneze a migrace).<sup>109</sup>

Hlavními molekulami ECM v mozku jsou proteoglykany s chondroitin sulfátem nebo heparan sulfátem, které jsou schopny vázat na sebe řadu proteinů, zejména adhezní molekuly na povrchu buněk, atraktanty (např. pro růst axonu), chemokiny a růstové faktory.<sup>110</sup> Další důležitou složkou ECM v mozku jsou proteiny lamininy, které jsou rozpoznávány svými

receptory na buňkách – integriny.<sup>109</sup> Příkladem je LAMA2 (Laminin subunit alpha-2), který interaguje s receptorem ITGB1 (Integrin beta-1), čímž aktivuje signální dráhu MAPK (z angl. mitogen-activated protein kinase), která podporuje proliferaci (sebeobnovu) NSC.<sup>111</sup> Laminin je často používán k potahování kultivačního plastiku pro kultivace NSC *in vitro* (byl používán i v rámci řešení této disertační práce). Pokud jsou embryoidní tělíska odvozená z lidských ESC kultivována na miskách potažených lamininem, buňky preferenčně diferencují do NSC a následně do neuronů.<sup>112</sup>

ECM je zásadní pro vývoj CNS od samého počátku embryonálního vývoje. Neuroepiteliální buňky, a zpočátku také radiální glie, jsou vysoce polarizované (apikální a bazolaterální část) buňky<sup>30</sup>, a v této polarizaci hraje významnou roli ECM.<sup>109</sup> ECM se rovněž podílí na regulaci proliferace (sebeobnovy) a diferenciaci neuroepiteliálních buněk – interakce lamininu s receptorem ITGB1 aktivuje kanonickou signální dráhu Wnt, což vede k proliferaci buňky. Jedním z genů, jehož exprese je pozitivně regulována dráhou Wnt, je gen kódující protein Decorin, který je sekretován z buňky, kde autokrinně stimuluje neuronální diferenciaci NSC.<sup>113</sup> Další z ECM proteinů, Reelin, pozitivně reguluje (zřejmě přímo aktivuje) signální dráhu Notch, která reguluje migraci neuronů v SGZ.<sup>114</sup> Proteomická analýza dospělé mozkové tkáně myši ukázala, že ECM v neurogenních oblastech je produkována zejména quiescentními NSC a kromě jiného proteinové složení je rovněž pevnější než okolní tkáň.<sup>115</sup> Mimo regulace proliferace a diferenciaci NSC je ECM klíčová i pro vývoj struktury mozkové tkáně, například pro gyrifikaci, tedy vznik mozkových závitů na povrchu mozkové kůry.<sup>116</sup>

### 1.6.2 Epidermal growth factor a Fibroblast growth factor 2

Signální dráha založená na proteinu EGF a jeho interakci s receptorem EGFR (Epidermal growth factor receptor) je jedna ze základních buněčných drah regulujících proliferaci a diferenciaci buněk u savců. EGF je jedním z 15 proteinů, které se váží na tyrosinkinázové receptory (RTK, z angl. receptor tyrosine kinase) proteinové rodiny ErbB (patří do ní čtyři receptory, včetně EGFR). Vazba EGF na receptor vede k dimerizaci RTK a aktivaci dalších buněčných signálních drah, např. MAPK, PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) či PLC $\gamma$  (phospholipase C) (shrnutí v <sup>117</sup>).

Ne vždy je pro EGF signalizaci nutný samotný protein EGF. V průběhu pozdního embryonálního vývoje myšího mozku dochází k aktivaci EGFR přes protein SHH (Sonic hedgehog protein), což aktivuje dráhu MAPK v radiálních gliích mozkové kůry, a tím jejich proliferaci.<sup>118</sup> Experimenty provedené na mozcích dospělých myši ukázaly, že signální dráha

EGF může inhibovat dráhu Notch, a regulovat tak sebeobnovu NSC a migraci neuronálních prekurzorových buněk v SVZ.<sup>119</sup>

Buněčná signalizace prostřednictvím proteinu FGF-2 je v mnohém podobná signalizaci EGF přes EGFR. FGF-2 byl poprvé izolován z mozku a svůj název získal na základě schopnosti podporovat proliferaci myších fibroblastů. FGF-2 patří do proteinové rodiny FGF, která u savců zahrnuje 22 proteinů. Tyto proteiny jsou rozpoznávány proteiny FGFR1-4 (Fibroblast growth factor receptor 1 až 4; FGF-2 se váže na všechny čtyři receptory) z rodiny RTK. S EGF mají společné také další signální dráhy, které v buňce regulují (např. MAPK, PI3K a PLC $\gamma$ ). FGF proteiny a jejich receptory mají však oproti EGF a EGFR specifickou doménu, která je zodpovědná za interakci s proteoglykany s heparan sulfátem. Vazba proteoglykanů s heparan sulfátem na FGF zvyšuje jeho odolnost (vůči teplotní či enzymatické degradaci) a stabilizuje interakci FGF s jeho receptory (shrnuto v <sup>120,121</sup>).

Vedle zásadní role FGF-2 v regulaci proliferace (sebeobnovy) NSC je dnes tento růstový faktor spojován s mnoha dalšími procesy regulujícími osud NSC v CNS, např. regulace diferenciaci, růst axonu a jeho větvení, neuroprotektivní funkce (podporuje přežívání neuronů), migrace buněk, vytváření synapsí, ovlivnění citlivosti astrocytů k neurotransmiterům (např. dopaminu) a další (shrnuto v <sup>121,122</sup>).

Pro namnožení NSC v *in vitro* podmínkách (např. po jejich izolaci z odebrané tkáně) se používají růstové faktory, které stimulují proliferaci buněk. Obvykle se používá kombinace proteinů EGF a FGF-2, které zajišťují proliferaci (sebeobnovu) kultivovaných NSC a brání jejich spontánní diferenciaci.<sup>72,123,124</sup> Stabilní hladiny EGF a FGF-2 jsou zásadní pro přežívání NSC a udržování jejich diferenciacního potenciálu (multipotence) v *in vitro* podmínkách.<sup>125</sup> Při běžně používaných kultivačních protokolech pro NSC dochází ke změnám koncentrace FGF-2 v médiu, protože FGF-2 je nestabilní při 37 °C. Výkyvy koncentrace FGF-2 poté přímo ovlivňují sebeobnovu NSC a mohou vést k jejich spontánní diferenciaci.<sup>126</sup>

Experimenty s NSC kultivovanými *in vitro* ukázaly, že EGF s FGF-2 podporují přežívání transplantovaných buněk a stimulují jejich migraci a neuronální diferenciaci *in vivo*.<sup>127</sup> Studie provedené na myších<sup>72,128</sup> a potkanech<sup>129</sup> ukázaly, že v CNS jsou přítomny NSC, které mají různou citlivost a odpověď na signalizaci přes EGF a FGF-2. V průběhu rané embryogeneze jsou NSC v myším mozku citlivé nejprve na FGF-2, zatímco signalizace přes EGF hraje zřejmě roli až v pozdější fázi embryonálního vývoje CNS a je regulována v čase a prostoru. Bylo však prokázáno, že suplementace pomocí EGF či FGF-2 vede v obou případech k proliferaci NSC a k udržování jejich diferenciacního potenciálu.<sup>128</sup> V případě NSC

v dospělém mozku potkana vede suplementace pomocí EGF k preferenční diferenciaci NSC do astrocytů, zatímco FGF-2 stimuluje neuronální diferenciaci.<sup>129</sup>

Jedním z možných zdůvodnění rozdílného vlivu EGF a FGF-2 na NSC je přítomnost vazebné domény pro proteoglykany s heparan sulfátem v FGF proteinech a jejich receptorech. FGF-2 nemůže volně difundovat v prostoru, ale váže se na ECM a stimuluje proliferaci okolních NSC.<sup>130</sup> Vazba FGF-2 a jeho receptorů na proteoglykany s heparan sulfátem navíc nepřímou ovlivňuje také vazbu EGF na jeho receptory.<sup>131</sup> Mimo proteoglykanů s heparan sulfátem ovlivňují EGF a FGF-2 signalizaci také proteoglykany s chondroitin sulfátem, které tvoří hlavní složku ECM v CNS.<sup>132</sup> Proteoglykany s chondroitin sulfátem v přítomnosti FGF-2 podporují sebeobnovu NSC a zároveň brání jejich diferenciaci do glií v přítomnosti EGF.<sup>133</sup>

### 1.6.3 Signální dráha Wnt

Dráha Wnt/ $\beta$ -catenin je evolučně vysoce konzervovanou signální dráhou u mnohobuněčných organismů. Její název je odvozený od genu *wingless* u octomilky (*Drosophila*) a jeho myšího homologu *int-1*. Signální dráha Wnt/ $\beta$ -catenin má zásadní roli během embryonálního vývoje i v dospělých tkáních, kde se podílí na regulaci proliferace a diferenciaci (kmenových) buněk, regulaci buněčné polarity a migrace či tvorbě celé tkáně (shrnutí v <sup>134</sup>).

Signalizace přes Wnt/ $\beta$ -catenin začíná sekrecí glykoproteinů Wnt (u savců jich je 19), které jsou poté rozpoznávány receptory z proteinové rodiny Frizzled (u člověka je jich popsáno deset) a koreceptory, např. LRP5 a 6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 a 6). Aktivované receptory (po vazbě Wnt) jsou rozpoznány cytoplazmatickým proteinem Dishevelled a poté může dráha Wnt pokračovat kanonicky (dráha závislá na proteinu Catenin beta-1) nebo nekanonicky (nezávislá na Catenin beta-1). Při aktivaci kanonické dráhy Wnt je blokována polyubikvitinylace proteinu Catenin beta-1, který tak není degradován v proteasomu, ale hromadí se v cytoplazmě a poté přechází do jádra, kde reguluje expresi cílových genů. Nekanonická část dráhy Wnt se ještě dále větví na dráhu Wnt/planární buněčné polarita (regulace polymerizace aktinu a gastrulace) a dráhu Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  (uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z endoplazmatického retikula a aktivace proteinkináz závislých na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech) (shrnutí v <sup>134,135</sup>).

Během embryonálního vývoje CNS reguluje kanonická dráha Wnt/ $\beta$ -catenin proliferaci (sebeobnovu) NSC a zřejmě na základě vazby určitého proteinu Wnt brání nebo stimuluje jejich neuronální diferenciaci a zrání neuronů.<sup>136–138</sup> Konečný efekt signální dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin ovlivňují také interakce povrchových proteinů NSC s ECM, které stimulují dráhu Wnt a vedou

k proliferaci NSC.<sup>113,139</sup> Podobně přítomnost FGF-2 stimuluje dráhu Wnt/ $\beta$ -catenin a proliferaci NSC, zatímco aktivace dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin bez FGF-2 vede k diferenciaci NSC.<sup>140</sup> Rovněž dráha Wnt/planární buněčné polarity reguluje asymetrické buněčné dělení NSC v mozkové kůře (v oblasti VZ) během embryogeneze, a tím i jejich sebeobnovu a neuronální diferenciaci.<sup>141</sup> Zdá se, že právě přechod od kanonické k nekanonické dráze Wnt vede k přechodu od sebeobnovy NSC k jejich diferenciaci.<sup>142</sup> Na druhou stranu, během embryonálního vývoje mozku myši kanonická signální dráha Wnt/ $\beta$ -catenin stimuluje diferenciaci NSC do senzorických neuronů a tento efekt má i při *in vitro* diferenciaci NSC.<sup>143</sup> Signalizace pomocí Wnt je dále nezbytná pro růst a větvení axonů<sup>144,145</sup> či diferenciaci a přežívání dopaminergních neuronů<sup>146,147</sup>.

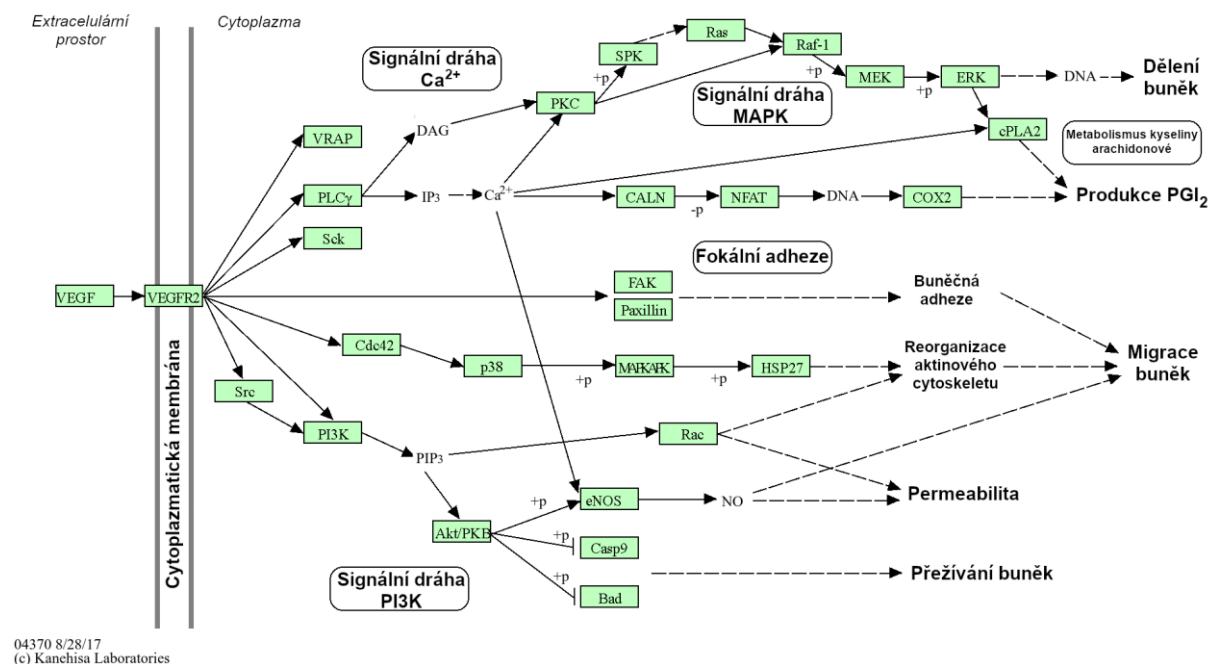
Funkce signální dráhy Wnt v dospělém mozku jsou obdobné jako při embryonálním vývoji CNS. Dráha Wnt/ $\beta$ -catenin stimuluje proliferaci NSC v SVZ a brání jejich neuronální diferenciaci<sup>148</sup> a u NSC v subependymové zóně stimuluje jejich proliferaci a preferenční diferenciaci do oligodendrocytů<sup>149</sup>. Nekanonická dráha Wnt/planární buněčné polarity udržuje NSC v SVZ v quiescentním stavu (zastavený buněčný cyklus).<sup>150</sup> Význam signalizace Wnt/ $\beta$ -catenin v dospělém mozku ale zůstává předmětem debat. Někteří autoři poukazují na to, že přestože dráha Wnt/ $\beta$ -catenin stimuluje proliferaci a neuronální diferenciaci či dokonce aktivaci quiescentních NSC v hipokampu, deplece proteinu  $\beta$ -catenin nemá vliv na aktivaci ani diferenciací potenciál NSC.<sup>151</sup>

#### 1.6.4 Signální dráha Vascular endothelial growth factor

Signalizace růstovými faktory z proteinové rodiny VEGF (Vascular endothelial growth factor) je další evolučně konzervovanou signální dráhou, která je společná pro všechny obratlovce. Homology těchto proteinů můžeme nalézt i u bezobratlých živočichů, kde se podílí na regulaci neurogeneze. Hlavní funkcí těchto proteinů u obratlovců je regulace vaskulogeneze a angiogeneze, tedy tvorby nových krevních kapilár *de novo* či z cév již existujících (shrnutí v<sup>152,153</sup>). Inaktivace exprese byť jen jedné alely *VEGFA* je v průběhu embryogeneze letální.<sup>154,155</sup>

Proteinová rodina VEGF zahrnuje pět růstových faktorů: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a PlGF (Placenta growth factor), které jsou biologicky aktivní ve formě dimerů.<sup>153</sup> Díky alternativnímu sestřihu či využití alternativního promotoru může z lidského genu *VEGFA* vzniknout 17 různých isoform proteinu VEGF-A.<sup>156</sup> Jednotlivé isoformy se označují názvem VEGF a číslem, které představuje délku aminokyselinové sekvence dané isoformy, např. VEGF121, VEGF165 či VEGF189.<sup>157</sup> Alternativní sestřih významně reguluje vlastnosti

a funkci jednotlivých isoform, např. jejich rozpustnost a interakci s ECM (přítomnost/absence vazebné domény pro proteoglykany s heparan sulfátem) či interakce s koreceptory typu Neuropilin.<sup>158</sup> Transkripce genu *VEGFA* je aktivována při hypoxii proteinem HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1)<sup>159</sup>, ale může být aktivována i řadou dalších proteinů, např. EGF<sup>160,161</sup>, FGF-2<sup>162</sup> či Interleukin-6<sup>163</sup> a signální dráhou Wnt<sup>164</sup>. VEGF-A je stejně jako ostatní proteiny z rodiny VEGF sekretován z buňky, váže se na RTK VEGFR1-3 (Vascular endothelial growth factor receptor 1 až 3) a/nebo koreceptory (Neuropilin-1 a 2 a integriny) a aktivuje další signální dráhy uvnitř buňky, např. MAPK, PI3K, PLC $\gamma$  a proteinkinázy závislé na Ca<sup>2+</sup> iontech (Obr. 4) (shrnuje v<sup>153</sup>).



**Obr. 4: Signální dráha VEGF v buňkách cévního endotelu.** Sekretovaný protein VEGF-A je rozpoznán receptorem VEGFR2 na cytoplazmatické membráně, což vede k aktivaci signálních drah uvnitř buňky, např. MAPK a PI3K. Další přenos signálu mezi jednotlivými proteiny je obvykle zprostředkován jejich fosforylací či defosforylací (+p/-p). Výsledkem VEGF signalizace je stimulace buněčného dělení, přežívání a migrace buněk, regulace permeability a produkce prostaglandinu prostacyklinu (PGI<sub>2</sub>), což společně vede k vaskulogenezi a angiogenezi. Převzato a upraveno z databáze KEGG<sup>165</sup>.

U myši bylo prokázáno, že v průběhu raného embryonálního vývoje sekretují NSC a z nich diferencované neurony protein VEGF-A, a stimulují tak angiogenezi ve vznikající mozkové kůře. Pokud je tato signalizace narušena, nedochází k prokrvení tkáně, nastává hypoxie a nervové buňky odumírají.<sup>166–168</sup> Zda jde čistě o parakrinní signalizaci (stimulaci

proliferace endotelových buněk) nebo i signalizaci autokrinní, při které by sekretující buňky regulovaly samy sebe, není zcela jasné. Zatímco Haigh a kolektiv zjistili, že deplece VEGFR2 v NSC nemá zásadní vliv na vývoj CNS, Ogunshola a kolektiv prokázali, že inaktivace VEGFR2 vede k apoptóze neuronů *in vitro*.<sup>166,167</sup> Signalizace VEGF-A přes VEGFR2 stimuluje v *in vitro* podmínkách apoptózu u NSC odvozených z ESC či neuroektodermu, naopak u radiálních glií podporuje jejich přežívání. VEGF-A by tedy mohl ovlivňovat diferenciaci (zrání) NSC v CNS během embryogeneze.<sup>169</sup> VEGF-A přes VEGFR2 aktivuje v primárních kulturách neuronů dráhu MAPK, čímž reguluje růst a zrání neuronů, včetně stimulace exprese genů pro TUBB3 a MAP2 (markery neuronů). Tento efekt není závislý na indukci hypoxií, ale probíhá při normální hladině kyslíku (normoxii).<sup>170,171</sup> Pozdější studie prokázaly, že v *in vivo* podmínkách působí VEGF-A (isoforma VEGF165) jako chemoatraktant, který stimuluje cílený růst axonu.<sup>172,173</sup>

Signální dráha VEGF hraje významnou roli také v dospělém mozku. Gen *VEGFA* u myši je exprimován v obou hlavních oblastech neurogeneze v dospělém mozku – SVZ a SGZ. Zejména v oblasti hipokampu je exprese *VEGFA* vysoká, protože VEGF-A je produkován NSC, neuronálními prekurzorovými buňkami i astrocyty. NSC izolované ze SGZ exprimují isoformy VEGF121 a VEGF165 a jejich sekrece je indukována přítomností EGF a FGF-2 v kultivačním médiu. V dospělém mozku produkují NSC a neuronální prekurzorové buňky přibližně třetinu sekretovaného VEGF-A v SGZ, zatímco jejich podíl na sekreci VEGF-A v SVZ je zanedbatelný. Sekretované VEGF-A působí autokrinně na NSC a pozitivně reguluje jejich sebeobnovu a diferenciací potenciál.<sup>174</sup> Významným zdrojem VEGF-A v SVZ jsou zřejmě endoteliální buňky, které sekreci VEGF-A stimuluji proliferaci a diferenciaci NSC.<sup>175</sup> Experimenty se suplementací VEGF-A do dospělého mozku myši a potkanů ukázaly, že výsledný efekt je závislý na množství podaného VEGF-A a sledované oblasti mozku (SVZ či SGZ) a zahrnuje proliferaci NSC, neuronů a astrocytů (včetně zralých neuronů a astrocytů), preferenční diferenciaci NSC do neuronů a stimulaci přežívání NSC.<sup>176–178</sup>

### 1.6.5 Další signální dráhy

Růst a vývoj nervových buněk v průběhu embryogeneze (tedy od ESC přes NSC až do plně diferencovaných neuronů a glií) či v dospělém mozku (aktivace a diferenciaci NSC do neuronů a glií) jsou regulovány mnoha dalšími signálními drahami a jejich efekt ovlivňuje řada faktorů. Jak je patrné z předchozích kapitol, mnoho signálních drah se vzájemně reguluje a doplňuje, což ještě zvyšuje komplexitu, a zároveň také specifitu regulace osudu konkrétní buňky v čase a prostoru.

Mezi další signální dráhy regulující sebeobnovu a diferenciaci NSC patří dráhy Notch, BMP (z angl. bone morphogenetic proteins) a Sonic hedgehog. Signální dráha Notch stimuluje (v součinnosti s dalšími signálními dráhami, např. FGF-2, Wnt či Sonic hedgehog) proliferaci (sebeobnovu) NSC a reguluje jejich diferenciaci – stimuluje diferenciaci do glií (regulováno rovněž dráhou BMP) a blokuje předčasnou neuronální diferenciaci (shrnutí v <sup>179</sup>). Signální dráha BMP pozitivně reguluje proliferaci a přežívání radiálních glií v mozkové kůře, blokuje jejich předčasnou neuronální diferenciaci a udržuje quiescentní stav NSC v SGZ (shrnutí v <sup>180</sup>). Signální dráha Sonic hedgehog stimuluje proliferaci a diferenciaci neuronálních prekursorových buněk, růst axonu a podporuje diferenciaci NSC do oligodendrocytů (shrnutí v <sup>181</sup>).

### 1.7 Neurodegenerativní onemocnění

Neurologické poruchy jsou nejčastější příčinou zdravotního postižení s celosvětově rostoucím trendem.<sup>3</sup> V této práci se zaměřuji na neurodegenerativní onemocnění, která jsou typem neurologických poruch s charakteristickou degradací (odumíráním) neuronů v CNS či periferním nervovém systému. Ztráta neuronů vede k omezené (či úplné ztrátě) funkčnosti postižené části nervové tkáně, což má za následek narušení vnímání, sensorických funkcí, paměti, chování či motoriky. Přestože neurodegenerativní onemocnění, např. amyotrofická laterální skleróza (ALS), Alzheimerova, Huntingtonova či Parkinsonova choroba, mozková mrtvice, prionové choroby, roztroušená skleróza, traumatická poranění mozku a míchy atd., jsou heterogenní skupinou nemocí, sdílejí osm typických rysů (angl. hallmarks) na buněčné a molekulární úrovni. Jsou to patologická agregace proteinů, narušení homeostázy proteinů (tzv. proteostázy), poruchy DNA a RNA, narušení energetické homeostáze, změny cytoskeletu, narušení přenosu signálu přes synapse a neuronové sítě, odumírání neuronů a zánět.<sup>182</sup>

Jedním z limitů léčby neurodegenerace je hematoencefalická bariéra, která brání volnému průchodu látek (v tomto případě léčiv) z krve do mozku.<sup>183</sup> Zásadní překážkou je však nedostupnost klinicky ověřené terapie, která by umožnila obnovu funkce poškozené nervové tkáně. Léčba neurodegenerace se proto omezuje na zastavení dalšího rozvoje onemocnění, častěji však jen na léčbu symptomů, případně paliativní péči.<sup>184</sup>

Hlavním rizikovým faktorem pro většinu neurodegenerativních onemocnění je věk, např. každý desátý člověk starší 65 let má Alzheimerovu chorobu.<sup>185</sup> Mezi další rizikové faktory vzniku či rozvoje neurodegenerativních chorob patří genetická predispozice (přenos mutací z rodičů na potomky či vznik nových mutací, včetně jednonukleotidových polymorfismů)<sup>186,187</sup>, otrava těžkými kovy<sup>188</sup>, střevní mikrobiom<sup>189</sup>, znečištění ovzduší<sup>190,191</sup>, nárůst teploty prostředí



v důsledku globálního oteplování<sup>192</sup>, virové infekce (např. virus Epstein-Barrové, chřipka či virová encefalitida)<sup>193</sup> a další. Podle odhadů WHO budou neurodegenerativní onemocnění nejpozději do roku 2040 druhou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích, hned po kardiovaskulárních onemocněních.<sup>194</sup>

### 1.7.1 Huntingtonova choroba

Ve své disertační práci jsem se věnoval zvířecímu modelu HD (publikace v přípravě) a hledání biomarkerů progresu tohoto onemocnění.<sup>11</sup> HD, někdy také označovaná jako Huntingtonova chorea, je neléčitelné, smrtelné neurodegenerativní onemocnění s autozomálně dominantní dědičností. Neurodegenerace postihuje zejména striatum, kde dochází k odumírání středních ostnatých neuronů (z angl. medium spiny neurons) využívajících jako neurotransmiter kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA, z angl. gamma-aminobutyric acid).<sup>195</sup> Klinický obraz zahrnuje poruchy spojené s Huntingtonovou triádou: chorea (mimovolní pohyby různých částí těla, snížení rozsahu a rychlosti pohybů – včetně chůze, pohybů očí a řeči), narušené vnímání (pomalejší uvažování a rozhodování) a neuropsychiatrické změny (úzkosti, deprese, podrážděnost či psychóza).<sup>196</sup> Mimo CNS jsou zasaženy i další tkáně, např. kosterní svalstvo (atrofie), srdce (častější srdeční selhání), kostra (osteoporóza), varlata (atrofie a snížená produkce testosteronu) nebo krevní buňky (narušení imunitního systému).<sup>197</sup>

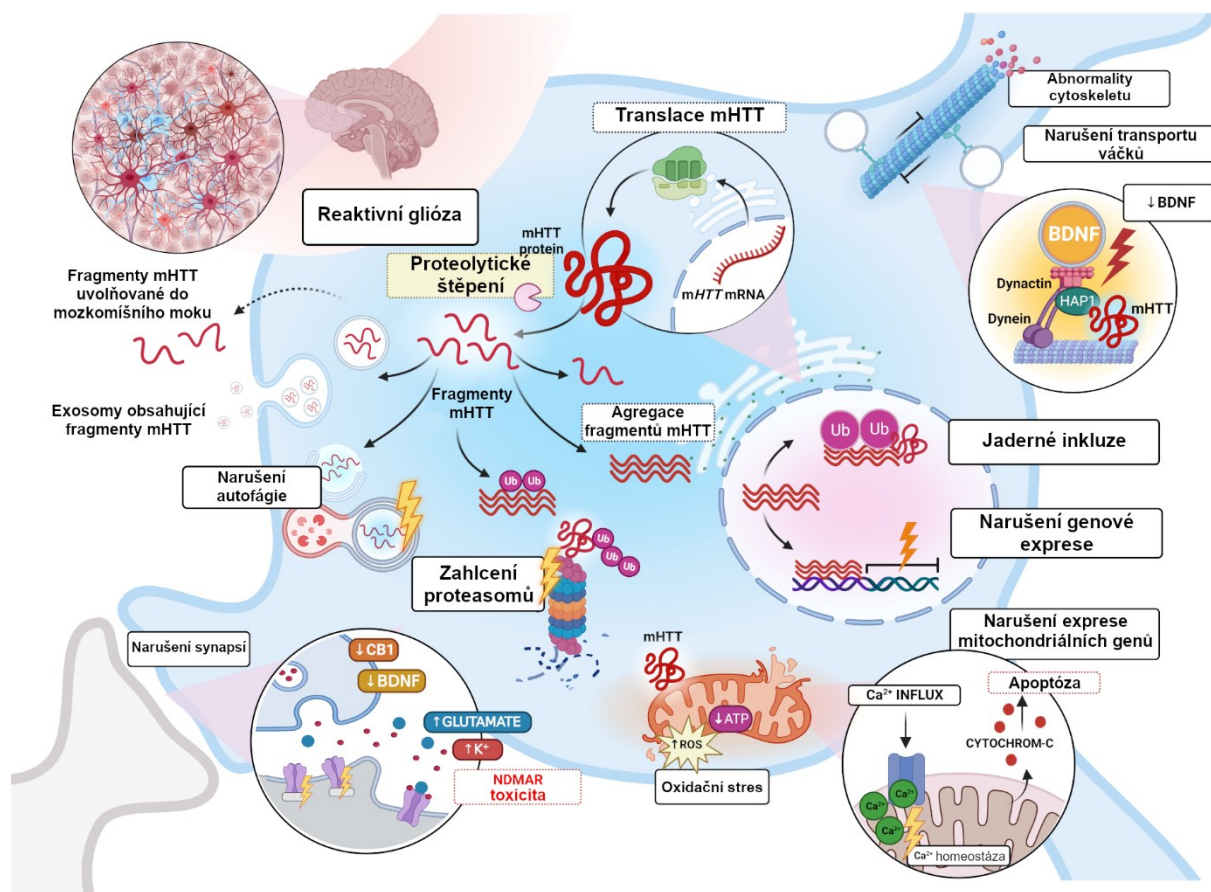
Celosvětová prevalence (počet osob s HD) je odhadována na ~5/100 000 osob, a celosvětová incidence (počet nově diagnostikovaných případů) je odhadována na ~0,5/100 000 osob. Z dostupných dat vyplývá, že v Evropě a Severní Americe je více případů HD než v Asii či Africe.<sup>198</sup> Údaje o prevalenci a incidenci jsou ovšem významně ovlivněné dostupností dat, metodami použitými při sběru dat a sledovanými populacemi. Skutečná prevalence v Evropě se podle dostupných dat pohybuje mezi ~1-22/100 000 osob.<sup>199</sup>

Příčinou HD na molekulární úrovni je zmožení repetice CAG (cytosin-adenin-guanin) v exonu 1 genu *HTT* (lokus 4p16.3), který kóduje protein Huntingtin (HTT). Mutovaný Huntingtin (mHTT) má na svém N-konci výrazně delší sekvenci glutaminů, a HD se tedy řadí mezi tzv. polyglutaminové choroby.<sup>200</sup> Zatímco zdraví jedinci mají v genu *HTT* méně než 36 repetice CAG (nejčastěji v rozsahu 9-34 repetice), osoby s mutovaným *HTT* mohou mít i více než 100 repetice CAG.<sup>200-203</sup> Množství repetice CAG negativně koreluje s nástupem prvních příznaků choroby i s délkou života.<sup>203,204</sup> Pacienti s HD, kteří jsou homozygoti, nemají oproti heterozygotům dřívější nástup choroby, avšak nemoc má u nich rychlejší průběh.<sup>204,205</sup> První viditelné příznaky se projevují nejčastěji mezi 30. a 50. rokem života, ale byla popsána také vzácnější juvenilní forma HD, která se projevuje již v dětství/dospívání (od dvou let života

dále), a HD s pozdním nástupem (po 60. roce života). Obvyklá doba přežití od nástupu prvních příznaků je 17–20 let, v případě juvenilní formy a formy HD s pozdním nástupem je doba přežití významně kratší.<sup>206–208</sup> Nejčastější příčinou úmrtí je zápal plic, druhou nejčastější příčinou smrti pacientů s HD je sebevražda.<sup>206</sup>

Přestože *HTT* je intenzivně studován více než 30 let, stále není jasné, které aspekty HD na buněčné úrovni jsou způsobené ztrátou funkce nemutovaného HTT, a co je efektem mHTT. Exprese *HTT* je fyziologicky aktivní ve většině tkání (nejvíce v CNS), ale jeho hladina na mRNA i proteinové úrovni se významně liší i mezi jednotlivými buňkami dané tkáně. HTT se vyskytuje v několika různých isoformách a je významně posttranslačně modifikován, včetně několika specifických proteolytických štěpení, fosforylace, acetylace, palmitoylace, ubikvitinylace a sumoylace, což reguluje jeho funkce a aktivitu. HTT interaguje s řadou buněčných proteinů, často ve funkci proteinového lešení (angl. scaffolding protein), na které se mohou vázat další interakční partneři. Takto následně ovlivňuje řadu buněčných procesů, např. apoptózu, autofágii, buněčné dělení, buněčnou polarizaci, přežívání buněk, transkripci či transport váčků. Deplece HTT v průběhu embryogeneze je letální (shrnuto v <sup>209</sup>). Studie provedené na experimentálních zvířecích modelech a vzorcích od pacientů s HD ukázaly, že mHTT a jeho fragmenty po proteolytickém štěpení vytvářejí agregáty v cytoplazmě i v jádře a narušují řadu buněčných procesů, např. autofágii, ciliogenezi, jaderný transport, přenos signálu přes synapse, transkripci a transport váčků (Obr. 5) (shrnuto v <sup>209–211</sup>).

Diagnostika HD se provádí pomocí genetického testování, při kterém se sleduje počet repetitivních CAG v obou alelách *HTT*. Průběh nemoci je možné vyhodnocovat pomocí sady klinických testů UHDRS (z angl. Unified Huntington's Disease Rating Scale), které ověřují pohybové schopnosti, vnímání, chování a celkový stav pacienta.<sup>212</sup> Tyto testy umožňují sledovat rozvoj HD až od prvních viditelných příznaků, mezitím však probíhá neurodegenerace bez viditelných vnějších projevů. Přesné pochopení molekulárních mechanismů rozvoje patologie HD pomůže identifikovat nové cíle léčby a vhodné biomarkery, které by umožnily sledovat rozvoj choroby ještě před prvními vnějšími projevy, případně umožnily sledovat účinnost terapie HD. Dosud však nejsou žádné biomarkery klinicky validovány. Hledání a validace takovýchto biomarkerů je proto v centru pozornosti mnoha výzkumných institucí.<sup>11</sup>



**Obr. 5: Mutovaný protein Huntingtin a jeho negativní vliv na buněčné dráhy a metabolismus neuronů.** Mutovaný Huntingtin (mHTT) je enzymaticky štěpen a jeho fragmenty vytvářejí v cytosolu a jádře buněk nerozpustné agregáty, které jsou také uvolňovány z buněk. Mezi hlavní buněčné dráhy narušené mHTT fragmenty patří transkripce genů (v jádře i v mitochondriích), autofágie, apoptóza, degradace proteinů přes proteasomy, odstraňování volných kyslíkových radikálů, přenos signálu přes synapse, sekrece proteinů (např. BDNF – Brain-derived neurotrophic factor), translace, transport váčků nebo výstavba cytoskeletu. Astrocyty a mikroglie v okolí postižených neuronů začnou proliferovat a spustí zánětlivou reakci. Převzato a upraveno podle <sup>11</sup>.

### 1.8 Buněčná terapie

Řada studií na experimentálních zvířecích modelech ukázala, že NSC mají významný potenciál v terapii neurologických onemocnění. Transplantace NSC vedla ke zlepšení zdravotního stavu u modelů Alzheimerovy choroby<sup>213</sup>, ALS<sup>214</sup>, HD<sup>215</sup>, mozkomíšního poranění<sup>216,217</sup>, mozkové mrtvice<sup>218</sup> či Parkinsonovy choroby<sup>219</sup>. Předpokládá se, že NSC po transplantaci ovlivňují CNS regulací imunitní odpovědi a regenerace okolní tkáně pomocí sekrece různých trofických faktorů a dalších proteinů a také přímým nahrazením poškozených nebo odumřelých buněk.<sup>4,5</sup> První fáze klinických studií na pacientech byly zaměřeny zejména

na ověření bezpečnosti transplantace NSC při daném onemocnění a způsobu jejich podání. Tyto studie poskytly důkazy o bezpečnosti transplantace NSC pacientům s ALS<sup>220,221</sup>, mozkovou obrnou<sup>222</sup>, mozkovou mrtvicí<sup>223,224</sup>, poraněním míchy<sup>225,226</sup> nebo roztroušenou sklerózou<sup>227,228</sup>. Další fáze klinických studií zaměřené na analýzu účinku transplantace NSC budou následovat.

## 1.9 Proteomika

Proteomika je vědní obor využívající řady přístupů a metod pro studium proteomu. Proteom zahrnuje všechny proteiny přítomné v určitém prostoru (např. buněčná organela/buňka/tkáň/organismus) v konkrétním čase. Genomika a epigenetika poskytují zásadní informace o genech, které mohou být v buňce/tkáni/organismu exprimovány, ale nelze na jejich základě s jistotou říci, které geny jsou v dané chvíli aktivně přepisovány. Transkriptomika přináší další úroveň informace, tedy které geny jsou v daný moment exprimovány na mRNA úrovni a mohou být překládány do proteinů. Protože regulace množství proteinů se většinou odehrává na úrovni translace, korelace mezi množstvím mRNA a určitého proteinu je omezená. U savců se předpokládá, že pozitivní korelace mezi množstvím určité mRNA a jejího proteinu platí přibližně ve 40 % případů.<sup>229</sup> Počet molekul určitého proteinu vzniklých během proteosyntézy je obvykle výrazně vyšší než počet molekul mRNA vzniklých během transkripce daného genu (jak v absolutním počtu, tak za určitý časový úsek) a proteiny jsou oproti mRNA stabilnější.<sup>230</sup> Obvykle spolu pozitivně korelují množství mRNA a proteinů spojených se základními metabolickými drahami, na druhou stranu nízká míra korelace je typická pro mRNA a proteiny spojené s ribosomy a sestřihem RNA.<sup>229</sup> Protože proteiny tvoří fenotyp buňky i celého organismu, pro komplexní studium signálních drah a buněčných procesů je vhodnější využít proteomiku.

Pokud uvážíme, že u člověka je popsáno 20 598 genů kódujících proteiny<sup>156</sup> a každý gen má průměrně sedm transkripčních variant (alternativní sestřih/začátek/konec mRNA)<sup>231</sup>, může takto vznikat více než 144 tisíc různých proteinů (průměrně sedm proteinů kódovaných stejným genem, ale lišících se svojí délkou, tzv. proteinové isoformy). V současné době je známo více než 400 posttranslačních modifikací (PTM), nejčastější jsou fosforylace, N-glykosylace a acetylace.<sup>232</sup> V každém proteinu může být PTM lokalizována jinde, případně jiná, a může se lišit i celkový počet modifikací na protein, což ještě dále zvyšuje komplexitu proteomu. Proteinové druhy kódované stejným genem, ale vzájemně se lišící svojí délkou, sekvencí (rozdílná nukleotidová sekvence mezi alelami) a PTM, se nazývají proteoformy<sup>233</sup> a představují reálný stav (fenotyp) buňky, tkáně či organismu. Podrobné studium jednotlivých proteoform a jejich biologie je zatím nedosažitelným cílem proteomiky.<sup>234</sup> Současné

proteomické metody nám však umožňují provést např. přesnou a citlivou identifikaci a kvantifikaci (i absolutní) proteinů a jejich PTM (včetně určení jejich přesné lokalizace)<sup>235</sup>, určení 3D struktury proteinů<sup>236</sup> nebo charakterizaci interakcí mezi proteiny, případně proteiny a malými molekulami (např. léčivky, včetně určení místa jejich vazby)<sup>237–239</sup>.

Proteomické techniky můžeme rozdělit na dvě základní skupiny podle toho, zda pro detekci (identifikaci) a kvantifikaci proteinů využívají protilátky, nebo MS. Zjednodušeně lze říci, že v případě protilátkových metod je protein rozpoznán protilátkou (detekce) a kvantifikován na základě intenzity signálu značky protilátky (obvykle fluorescence), zatímco v případě MS metod je protein identifikován na základě přesného změření molekulové hmotnosti (Mw) jeho peptidů a kvantifikace je provedena přímo na základě intenzity signálů detekovaných iontů. Existují také techniky, např. hmotnostní cytometrie<sup>240</sup> nebo zobrazovací hmotnostní cytometrie<sup>241</sup>, které kombinují protilátkové metody (pro detekci proteinů) a MS (pro jejich kvantifikaci).<sup>242</sup>

V následujících kapitolách jsou podrobněji popsány proteomické metody, které byly využity v rámci řešení této disertační práce. Podrobný popis dalších proteomických technik a jejich aplikace v biomedicinském výzkumu (neurodegenerativní a nádorová onemocnění) je obsažen v mých publikacích<sup>11,242–244</sup>, včetně kapitoly *Proteomics in Huntington's Disease Biomarker Discovery*, která je součástí této disertační práce (viz přílohy).

### 1.9.1 Protilátkové metody

Protilátkové metody (např. průtoková cytometrie a techniky multiplexních analýz využívající protilátky navázané na kuličkách) nejsou proteomické metody v pravém slova smyslu, protože neumožňují analyzovat celkový (globální) proteom, ale jen předem vybranou sadu proteinů. Biochemické protilátkové metody jako např. imunoblot a ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay) jsou základní metody analýzy proteinů využívané i v klinické praxi. Jejich hlavními výhodami jsou vysoká citlivost (protilátky vazbou antigenu provedou jeho nabohacení ze vzorku), relativně snadné provedení analýzy i vyhodnocení dat nebo komerční dostupnost protilátek a optimalizovaných kitů.<sup>242,244</sup> Nevýhodou může být specifita závislá na kvalitě protilátky (nedostatečná specifita protilátky<sup>245–247</sup>) a na prostředí, ve kterém probíhá reakce mezi antigenem a protilátkou (tzv. efekt matrice). Omezená kombinovatelnost protilátek kvůli jejich vzájemné reaktivitě (angl. cross-reactivity) obvykle neumožňuje simultánní analýzy více než desítek proteinů současně. Protilátkové metody jsou však v některých případech jedinou možností detekce a kvantifikace, zejména méně zastoupených proteinů ve složitých biologických vzorcích (např. krevní plazma).<sup>242,244</sup>

### 1.9.1.1 Multiplexní protilátková analýza xMAP

Multiplexní protilátková analýza xMAP (z angl. multi-analyte profiling) je obdobou proteinového (protilátkového) čipu, ovšem místo na sklíčko jsou protilátky navázané na kuličky (obvykle magnetické). Principiálně jde o ELISA měření a simultánní analýzu více proteinů. Každá kulička má navázané protilátky jen pro jeden konkrétní protein a obsahuje vlastní vnitřní fluorescenční značení, které je tak specifické pro každý ze sledovaných proteinů. Proteiny ve vzorku mohou být přímo značené (využívá se stejné fluorescenční značení pro všechny proteiny vzorku, protože odlišení antigenů probíhá na úrovni kuliček), nebo jsou detekovány značenou sekundární protilátkou. Samotné měření probíhá v analyzátoru Luminex nebo pomocí průtokového cytometru s červeným a zeleným laserem.<sup>242,244</sup>

Hlavními výhodami analýz typu xMAP jsou vysoká citlivost, dobrý dynamický rozsah měření, komerčně dostupné kity pro vybrané proteiny (otestované z hlediska sensitivity, specifity a vzájemné reaktivity protilátek) a nízká spotřeba vzorku. Nevýhodou představuje relativně nízký počet simultánně analyzovaných proteinů – kvůli omezené kombinovatelnosti protilátek (zejména při detekci pomocí sekundárních protilátek), efekt matrice a cena komerčních kitů.<sup>242,244</sup> S ohledem na reálný počet proteinových isoform a možnosti jejich PTM je zřejmé, že metody založené na protilátkách nemohou tak velkou komplexitu proteomu postihnout.

### 1.9.2 Hmotnostní spektrometrie

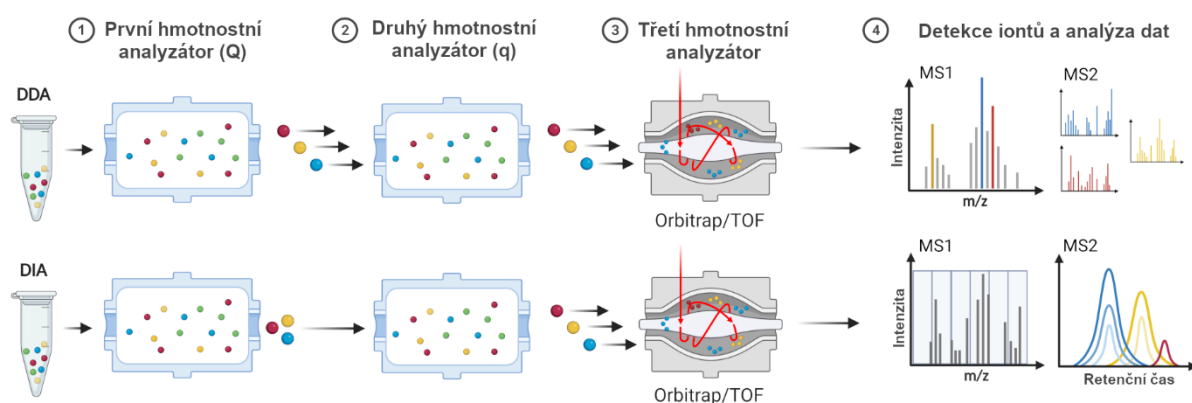
Moderní metody využívající MS poskytují kvantitativní informace o více než 10 000 proteinů během jediného měření.<sup>248,249</sup> Pomocí MS je možné analyzovat celé (intaktní) proteiny a studovat tak proteoformy (včetně jejich nativního stavu).<sup>250,251</sup> Častěji jsou však proteiny nejprve denaturovány, jejich disulfidické můstky jsou redukovány a thiolové skupiny cysteinů blokovány prostřednictvím vazby alkylačních činidel na cystein, a následně jsou proteiny štěpeny na peptidy specifickou proteázou, jako je trypsin. Směs peptidů je vysoce komplexní, a je proto nutné peptidy před měřením rozdělit. K tomu se obvykle využívá separace pomocí kapalinového chromatografu (LC, z angl. liquid chromatography) na reverzní fázi, kde stacionární fází jsou křemičité kuličky s povrchem modifikovaným řetězcí uhlíku (C18) a mobilní fází je gradient směsi vody a organického rozpouštědla acetonitrilu, s malým přídatkem kyseliny mravenčí pro pozitivní ionizaci peptidů. Peptidy interagují se stacionární fází na základě své hydrofobicity (se stoupající koncentrací acetonitrilu se postupně uvolňují více hydrofobní peptidy) a jsou přímo ionizovány a vstříkovány pomocí elektrospreje do hmotnostního spektrometru.

Tandemový hmotnostní spektrometr (MS/MS) jsou v podstatě vysoce přesné váhy (s přesností na tisíce Daltonu), které jsou složeny ze tří za sebou uspořádaných hmotnostních analyzátorů. V prvním je analyzována  $m/z$  ( $m$  je  $M_w$ ,  $z$  je celkový náboj – počet protonů) prekurzorového iontu (peptidu) a po jeho fragmentaci ve druhém hmotnostním analyzátoru (tzv. kolizní cely) jsou analyzovány ve třetím hmotnostním analyzátoru  $m/z$  fragmentových iontů (menší peptidy a aminokyseliny). Intenzita signálu prekurzorových a fragmentových iontů je přímo úměrná počtu iontů, které jsou zaznamenány detektorem. Pro identifikaci proteinů je nutné, aby byl znám proteom nebo alespoň genom daného organismu.

Hlavními výhodami MS jsou vysoká specifita měření (analyzuje se s vysokou přesností vždy několik peptidů daného proteinu), možnost globální i cílené analýzy, velké pokrytí proteomu a možnost paralelní analýzy PTM. Analýzy pomocí MS mají své limity, zejména v omezené ionizovatelnosti některých peptidů (peptidy musí být ve formě iontů, jinak nebudou detekovány) nebo v malém počtu unikátních peptidů pro malé proteiny. V běžném protokolu nedochází k nabohacení proteinů/peptidů – vše je analyzováno v poměru jako v původním vzorku, což znesnadňuje analýzu proteinů přítomných ve vzorcích ve velmi malém množství nebo analýzu vysoce komplexních vzorků (např. krevní plazma, kde je rozdíl koncentrací jednotlivých proteinů větší než 10 řádů<sup>252</sup>). Analýza dat je výpočetně náročná a s ohledem na množství dat poskytovaných MS je náročná i jejich biologická interpretace.<sup>11,242,244</sup>

#### 1.9.2.1 Data-dependentní analýza

Data-dependentní analýza (DDA, z angl. data-dependent acquisition, někdy též označované jako „shotgun proteomics“) umožňuje identifikaci a kvantifikaci celkového proteomu bez nutnosti předchozí znalosti vzorku. Separované peptidy jsou analyzovány pomocí MS/MS. Nejprve je změřeno spektrum MS1, tedy všechny prekurzorové ionty uvolňované z kolony v daný čas (tzv. retenční čas), a je zaznamenána jejich  $m/z$  a intenzita (Obr. 6). Poté začne první hmotnostní analyzátor postupně vybírat nejintenzivnější prekurzorové ionty ve spektru MS1 (obvykle 15-40 prekurzorů), které posílá do kolizní cely. V kolizní celi se vlivem napětí a srážek s molekulami inertního plynu (typicky  $N_2$ ) prekurzorové ionty rozpadnou na fragmentové ionty, které jsou následně měřeny ve třetím hmotnostním analyzátoru (spektrum MS2 –  $m/z$  a intenzita fragmentových iontů). Po změření přednastaveného počtu prekurzorových iontů začne další cyklus měření nového spektra MS1.<sup>11</sup> Na základě naměřených hodnot  $M_w$  je možné přímo určit sekvenci peptidu (tzv. *de novo* sekvenování) nebo jsou naměřené hodnoty porovnány s teoretickými hodnotami  $M_w$  peptidů (a jejich fragmentových iontů).



### Obr. 6: Princip data-dependentní analýzy (DDA) a analýzy nezávislé na datech (DIA).

Měření začíná stejně – proteiny jsou enzymaticky štěpeny na peptidy, separovány na koloně pomocí kapalinové chromatografie, ionizovány a sprejovány do tandemového hmotnostního spektrometru. Nejdříve je změřeno spektrum MS1, tedy hodnoty  $m/z$  (Mw/náboj) a intenzity signálu všech peptidů (prekurzorových iontů), které se uvolňují z kolony v daném retenčním čase. V případě DDA jsou prekurzorové ionty postupně vybírány podle intenzity signálu a následně posílány do kolizní cely k fragmentaci a do třetího hmotnostního analyzátoru ke změření spektra MS2 (hodnoty  $m/z$  a intenzity signálu fragmentových iontů). Po změření přednastaveného počtu prekurzorových iontů s nejvyšší intenzitou je zahájen další cyklus měření nového spektra MS1. U analýzy DIA je spektrum MS1 rozděleno na několik oken (např. 30) a všechny prekurzorové ionty v daném okně jsou posílány na fragmentaci do kolizní cely společně. Spektrum MS2 tak obsahuje fragmentové ionty patřící více prekurzorovým iontům. Po změření přednastaveného počtu oken je zahájen další cyklus měření nového spektra MS1. Převzato a upraveno podle <sup>11</sup>.

Princip výběru prekurzorových iontů v rámci DDA snižuje robustnost této metody, protože poskytuje nekompletní data. Pokud bychom porovnávali dva vzorky, a v prvním z nich by měl určitý peptid v daném retenčním čase vysokou intenzitu (bude vybrán k fragmentaci), zatímco ve druhém vzorku by nebyl kvůli nižší intenzitě mezi vybranými prekurzorovými ionty, budou u druhého vzorku data chybět. Tento problém se označuje jako stochasticita DDA a ovlivňuje tzv. kvantifikaci bez značení (LFQ, z angl. label-free quantification) mezi více měřeními, při které se sleduje intenzita signálu (plocha píku) nebo počet naměřených spekter daného peptidu.<sup>253</sup> Proto byla vyvinuta řada metod, při kterých jsou vzorky nějakým způsobem označeny a peptidy ze vzorků jsou předem smíchány a analyzovány v rámci jednoho měření. V současnosti jsou nejrozšířenějšími metodami značení TMT (z angl. tandem mass tags)<sup>254</sup> a iTRAQ (z angl. isobaric tags for relative and absolute quantitation)<sup>255</sup>, při kterých se značka (angl. tag) chemickou reakcí váže na volné aminové skupiny v peptidech po enzymatickém



štěpení. Všechny značky mají stejnou celkovou strukturu a Mw, liší se však v části molekuly zvané mass reporter, která obsahuje různé isotopy uhlíku a dusíku. Sledovaný peptid bude mít ve všech vzorcích ve spektru MS1 jednu konkrétní  $m/z$  (jediný prekurzorový iont), při fragmentaci se uvolní jednotlivé části značení a ve spektru MS2 bude mít každý mass reporter svůj fragmentový iont (konkrétní  $m/z$  a intenzita). Kvantifikace tedy probíhá na úrovni spekter MS2. Přestože je pomocí značení odstraněna stochastická DDA, stále jsou měřeny jen prekurzorové ionty s vysokou intenzitou.

#### 1.9.2.2 Analýza nezávislá na datech

Analýza nezávislá na datech (DIA, z angl. data-independent acquisition) byla vyvinuta s cílem překonat problémy spojené s DDA měřením (zejména stochasticitu DDA), a umožnit tak reprodukovatelnou analýzu celkového proteomu. První pokusy o DIA měření neposkytovaly zpočátku dostatečné pokrytí proteomu (kvantifikace pouze stovek proteinů).<sup>256</sup> První skutečně funkční metodou DIA byla SWATH-MS (z angl. sequential window acquisition of all theoretical mass spectra) popsána v roce 2012.<sup>257</sup>

Podobně jako v případě měření DDA je nejprve změřeno spektrum MS1 (Obr. 6) a následně je toto spektrum rozděleno do určitého počtu oken (např. 30 oken, která mohou mít vždy stejnou šířku  $m/z$ , např. 25 Da, nebo je šířka variabilní podle počtu prekurzorových iontů v daném okně). Všechny prekurzorové ionty v daném okně (např. 825-850  $m/z$ ) jsou poslány do kolizní cely najednou a jejich fragmentové ionty jsou změřeny v jediném spektru MS2. Postupně jsou proměřena všechna okna ze spektra MS1 a další cyklus začne změřením nového spektra MS1. Spektra MS2 obsahují fragmentové ionty různých prekurzorových iontů (peptidů), jejich interpretace je tak složitější než v případě DDA. Pro identifikaci a kvantifikaci proteinů pomocí DIA se obvykle využívají spektrální knihovny připravené pomocí DDA měření stejných vzorků (specifické spektrální knihovny) nebo měření vzorků z různých tkání, s různými způsoby přípravy, po frakcionaci apod., které umožní větší pokrytí proteomu. Druhým přístupem je přímá analýza DIA měření *in silico* s využitím databáze proteinových sekvencí studovaného organismu.<sup>9</sup>

Měření DIA nabízí výrazně vyšší reprodukovatelnost a přesnost LFQ (všechny detekovatelné prekurzorové ionty jsou fragmentovány a jejich fragmentační spektra změřena), větší dynamický rozsah měření a větší pokrytí proteomu než DDA.<sup>256</sup> DIA metody jsou robustní a spolehlivě porovnatelné i mezi různými laboratořemi.<sup>258</sup> Velkou výhodou DIA je, že kompletní data jsou získána během jediného měření vzorku. Naměřená data lze využít k analýze celkového proteomu, nebo je možné analýzu zacílit na konkrétní vybrané proteiny, případně

vyhodnotit zbývající data kdykoliv znovu, např. při řešení jiné biologické otázky. Přesnost kvantifikace pomocí DIA je srovnatelná s kvantifikací pomocí cílené metody typu SRM (z angl. selected reaction monitoring).<sup>257</sup> DDA metody jsou používány přibližně dvakrát déle než DIA a jejich nastavení, optimalizace jednotlivých parametrů a zejména vyhodnocení dat jsou proto výrazně jednodušší.<sup>256</sup>

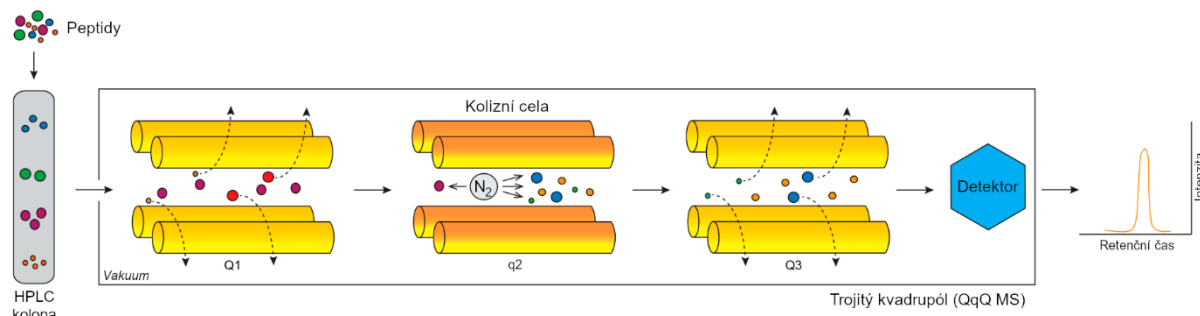
### 1.9.2.3 Cílené analýzy založené na hmotnostní spektrometrii

Pro analýzu vybraných proteinů na základě předem stanovené hypotézy se vedle analýzy DIA používají cílené metody SRM a PRM (z angl. parallel reaction monitoring). Zatímco PRM měření může být provedeno na stejném typu hmotnostního spektrometru jako DDA a DIA, SRM vyžaduje specifický typ MS/MS přístroje, tzv. trojitý kvadrupól (Obr. 7). SRM i PRM vyžadují znalost analyzovaného vzorku, respektive proteinů, které mají být měřeny. Pro každý protein, který má být kvantifikován, se obvykle sledují nejméně dva proteotypické (unikátní) peptidy, které nejsou přítomny v žádném jiném proteinu v celém proteomu daného organismu. K monitorování peptidů je nutné znát  $M_w$  prekurzorového iontu a v případě většího počtu peptidů také retenční časy, ve kterých se sledované peptidy uvolňují z chromatografické kolony. V případě SRM je nezbytné znát také  $M_w$  fragmentových iontů. Tyto informace mohou být získány předchozí analýzou vzorku pomocí DDA nebo DIA. Druhou možností je proměření vzorku v průběhu gradientové eluce peptidů s využitím vnitřních standardů (syntetické peptidy značené těžkými izotopy uhlíku a dusíku), které se uvolňují ve stejných retenčních časech jako sledované endogenní peptidy.<sup>11,243</sup>

SRM analýza probíhá na základě přednastavených hodnot  $m/z$  pro jednotlivé peptidy a jejich fragmentové ionty (Obr. 7). Prekurzorové ionty vstupují do prvního kvadrupólu a ionty, které neodpovídají přednastavené hodnotě  $m/z$  jsou odfiltrovány pryč – do kolizní cely je poslán pouze peptid definované  $m/z$ . Úzké okno měření (typicky 0,7 Daltonu) a menší počet monitorovaných fragmentových iontů uděluje SRM vysokou selektivitu a vyšší specifitu oproti měření DIA. Sledovaný peptid je v kolizní celi fragmentován a ve třetím kvadrupólu jsou odfiltrovány všechny fragmentové ionty, které nemají odpovídající  $m/z$ . Pouze fragmentový iont definované  $m/z$  je následně detekován.<sup>259</sup> Dvojice iontů, prekurzorový a jeho fragmentový iont, se označuje jako iontový přechod (angl. transition).

V případě PRM metody jsou sledovány prekurzorové ionty jednotlivě, ale je změřeno celé spektrum MS<sub>2</sub>, jako u metod DDA a DIA.<sup>243</sup> SRM a PRM jsou vhodné na validaci výsledků DDA a DIA analýz a na cílená měření předem vybraných proteinů (ověření hypotézy). Přitom se uplatní jejich hlavní výhody – vysoká specifita a citlivost měření a rovněž relativně

jednoduchá analýza dat. Nevýhodami jsou zejména nutnost vývoje a optimalizace metody měření pomocí LC-MS/MS.



**Obr. 7: Princip cílené analýzy pomocí metody SRM (selected reaction monitoring).**

Proteiny ve vzorku jsou enzymaticky štěpeny na peptidy, separovány na koloně pomocí kapalinové chromatografie, ionizovány a sprejovány do tandemového hmotnostního spektrometru typu trojitý kvadrupól. První kvadrupól (Q1) pošle do kolizní cely (q2) jen prekurzorový iont (peptid) s předem definovanou hodnotou  $m/z$  (Mw/náboj), ostatní ionty jsou odfiltrány pryč. V kolizní cele je tento prekurzorový iont fragmentován srážkami s molekulami inertního plynu při vysokém napětí a vzniklé fragmentové ionty jsou poslány do třetího kvadrupólu (Q3). Q3 odfiltruje fragmentové ionty s jinou než nastavenou hodnotou  $m/z$  a jen definovaný fragmentový iont je poté poslán na detektor, který zaznamená intenzitu signálu. Převzato a upraveno podle <sup>244</sup>.

### 1.10 Cíle práce

S ohledem na stárnoucí populaci a rostoucí prevalenci neurologických poruch ve vyspělých zemích jsem se ve své disertační práci zaměřil na vývoj metod pro charakterizaci diferenciaci NSC, které jsou klíčové pro správné fungování CNS. Tyto buňky poskytují biologický model pro studium (pato)fyziologických procesů a představují slibný prostředek v regenerativní medicíně. S využitím moderních proteomických metod jsem usiloval o zavedení přesných postupů pro analýzu NSC nejen v naší laboratoři.

Ve spolupráci s kolegy se mi podařilo optimalizované postupy publikovat, aplikovat na náš model *in vitro* diferenciaci NSC, a přinést tak nové důležité poznatky o signálních drahách a buněčných procesech, které jsou regulovány v průběhu spontánní diferenciaci NSC modulované kombinací růstových faktorů a jejich specifických isoform. Výsledky práce poukazují na důležitost komplementárních metodických přístupů, zejména na výhodnou kombinaci celoproteomové analýzy s vysokým pokrytím proteinů a cílené analýzy zaměřené na předem vybrané proteiny. Zájmové proteiny byly vybrány jak pro charakterizaci NSC, tak pro budoucí cílenou analýzu modelových organismů či vzorků pacientů s HD.

Specifické cíle této disertační práce spočívají v:

1. přípravě metod a podrobné charakterizaci NSC v průběhu diferenciaci
2. přípravě metod pro globální analýzu proteomu NSC v průběhu diferenciaci
3. přesné analýze proteomu a sekretomu NSC v průběhu diferenciaci
4. analýze proteomických studií zaměřených na Huntingtonovu chorobu

## Metody a výsledky

### 2.1 Metody

#### 2.1.1 Chemikálie a materiál

Chemikálie a speciální materiál používané při experimentech v rámci této disertační práce jsou uvedeny v Tab. 1.

**Tab. 1: Seznam chemikálií a speciálního materiálu.** V tabulce jsou uvedeny původní (anglické) názvy užívané výrobcí a jejich katalogová čísla.

Chemikálie/materiál	Výrobce	Katalogové číslo
Acclaim PepMap 100 C18 HPLC Columns	Thermo Scientific	164199
Accutase solution	Sigma-Aldrich	A6964-500ML
Acetonitrile, Optima LC/MS Grade	Fisher Chemical	A955-1
Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Unit, Ultracel-3 regenerated cellulose membrane	Millipore	UFC200324
Ammonium bicarbonate	Sigma-Aldrich	09830-500G
Axitinib	Absource Diagnostics GmbH	S1005
B-27 Supplement (50X), serum free	Gibco	17504044
Bovine Albumin Fraction V (7.5% solution)	Gibco	15260037
DMEM, high glucose, GlutaMAX Supplement	Gibco	10566016
Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate	Carl Roth GmbH	8043.2
Fetal Bovine Serum, certified, United States	Gibco	16000036
Formic acid	Honeywell	56302-50ML-GL
Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Gibco	A1413202
GlutaMAX Supplement	Gibco	35050061
Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific	78440
HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	Solis BioDyne	08-36-00020
Indexed Retention Time (iRT Kit)	Biognosys	Ki-3002-1
Iodoacetamide (IAA)	Sigma-Aldrich	I1149-5G
KnockOut Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (KnockOut DMEM/F-12)	Gibco	12660012

Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Sigma-Aldrich	L2020
Lysyl Endopeptidase from <i>Achromobacter lyticus</i>	FUJIFILM Wako Chemicals	129-02541
Macro SpinColumns C-18, 300Å	The Nest Group, Inc.	SMM SS18V
N-2 Supplement (100X)	Gibco	17502048
Novex Sharp Pre-stained Protein Standard	Invitrogen	LC5800
Nunc Lab-Tek II CC2 Chamber Slide System	Thermo Scientific	154941
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Scientific	26619
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco	15140148
Pierce 660nm Protein Assay Kit	Thermo Scientific	22662
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
Pierce Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set	Thermo Scientific	23208
Poly-L-ornithine solution	Sigma-Aldrich	P4957
ProLong Glass Antifade Mountant	Invitrogen	P36980
ProntoSIL 120-3-C18 AQ	Bischoff Chromatography	0010F184PS030
ProteaseMAX Surfactant, Trypsin Enhancer	Promega	V2072
QIAshredder (250)	QIAGEN	79656
QuantiTect Reverse Transcription Kit (200)	QIAGEN	205313
ReadyProbes Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green	Invitrogen	R37609
Recombinant Human/Murine/Rat BDNF	PeproTech	450-02
Recombinant Human FGF-basic (146 a.a.)	PeproTech	100-18C
Recombinant Human GDNF	PeproTech	450-10
Recombinant Human VEGF121	PeproTech	100-20A
Recombinant Human VEGF165	PeproTech	100-20
Recombinant Murine EGF	PeproTech	315-09
RNeasy Plus Mini Kit (250)	QIAGEN	74136
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega	V5111
Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco	11360070
Soybean Trypsin Inhibitor, powder	Gibco	17075029
StemPro Neural Supplement	Gibco	A1050801
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP)	Sigma-Aldrich	C4706-2G
Trypsin-EDTA (0.5%), no phenol red	Gibco	15400054
Urea	Sigma-Aldrich	U5378-500G
Water OPTIMA LC-MS Grade	Fisher Chemical	W6-212

## 2.1.2 Práce s buněčnými kulturami

### 2.1.2.1 Kultivace lidských nervových kmenových buněk

Potažení kultivačních misek pro NSC bylo provedeno přidáním poly-L-ornitinu a lamininu. Na misky bylo nejprve přidáno 20 µg/ml poly-L-ornitinu v ultračisté vodě a misky byly inkubovány 2-4 hodiny při 37 °C. Poté byl potahovací roztok odsán a misky třikrát opláchnuty ultračistou vodou. Následně byl přidán roztok lamininu v PBS (5 µg/ml) a misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Poté byl potahovací roztok bez oplachu odsán. Komerčně dostupná buněčná linie lidských NSC (Gibco, katalogové číslo: 510088, číslo výrobní šarže: 1402001), odvozená z buněčné linie ESC H9 (46, XX), byla kultivována při 37 °C, ve vlhké atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> a 15 % O<sub>2</sub>, s počáteční hustotou  $\geq 20\,000$  buněk/cm<sup>2</sup>. Pro expanzi NSC byl vyměňován celý objem média (médium pro proliferaci, Tab. 2) každý druhý den a buňky byly při dosažení buněčné konfluence  $\geq 90$  % pasážovány každých 3-5 dní pomocí 0,05% trypsinu s EDTA, nebo pomocí Accutase.

**Tab. 2: Složení používaných kultivačních médií pro NSC.**

Médium pro proliferaci	Médium pro diferenciaci	Médium pro diferenciaci do astrocytů
KnockOut DMEM/F-12		
2 mM GlutaMAX		
1 % penicilin-streptomycin		
2 % StemPro Neural Supplement		1 % N-2 Supplement
20 ng/ml EGF	10 ng/ml BDNF*	1 % fetal bovine serum (FBS)
20 ng/ml FGF-2	10 ng/ml GDNF*	

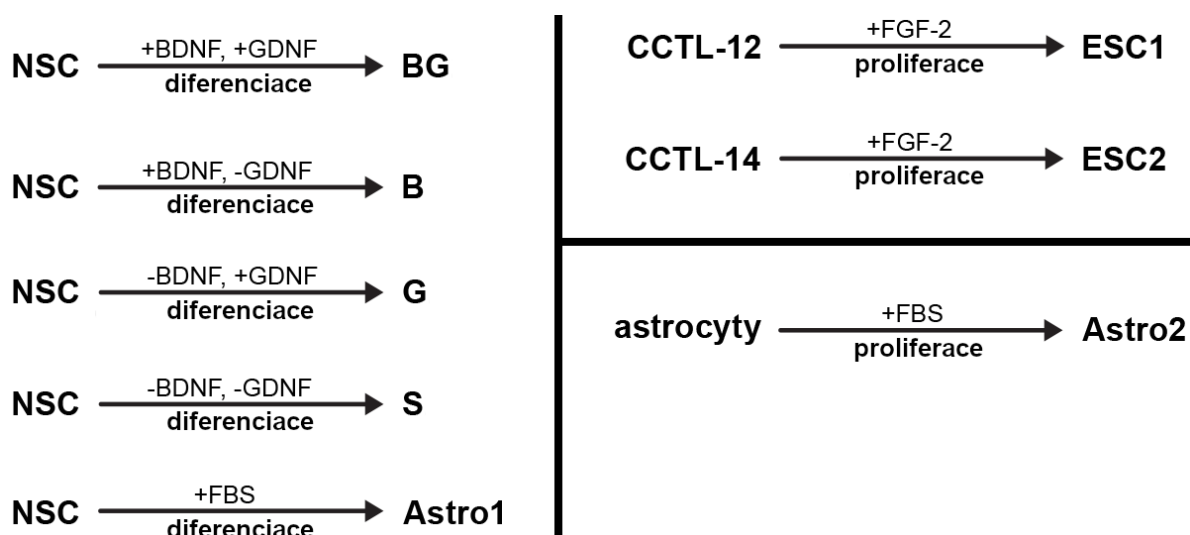
\* Médium pro spontánní (S) diferenciaci bylo bez přidávaných faktorů (BDNF a GDNF). Tyto faktory byly přidávány do média pro spontánní diferenciaci s trofickou podporou – diferenciaci BG (oba faktory), B (jen BDNF) a G (jen GDNF), viz Obr. 8.

### 2.1.2.2 Diferenciace lidských nervových kmenových buněk

Lidské NSC byly kultivovány, jak je uvedeno v kapitole 2.1.2.1, dokud nedosáhly buněčné konfluence  $>70$  %. Poté byl odebrán celý objem média pro proliferaci a nahrazen stejným objemem média pro spontánní diferenciaci bez růstových faktorů (Tab. 2, diferenciaci S), v případě spontánní diferenciaci s trofickou podporou byly přidávány také proteiny BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) a GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) (Tab. 2, diferenciaci BG, B a G). Diferenciace probíhala při 37 °C, ve vlhké atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 15% O<sub>2</sub> a polovina objemu média byla vyměněna každý druhý den. Buňky byly

diferenciovány po dobu 7, 14, 21 a 28 dní (S diferenciacie), 1-8, 14, 21 a 28 dní (BG diferenciacie) a 28 dní (B a G diferenciacie), viz Obr. 8.

Pro diferenciaci lidských NSC do astrocytů (diferenciacie Astro1) bylo potažení misek provedeno přidáním 1% Geltrex Basement Membrane Matrix (rozmrazen na ledu) v HBSS (Hank's Balanced Salt Solution: 0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O a 6 mM D-glukózy; 4 °C) s inkubací nejméně jednu hodinu při 37 °C. Poté byl potahovací roztok bez oplachu odsán. Po dosažení buněčné konfluencie >70 % byl odebrán celý objem média pro proliferaci a nahrazen stejným objemem média pro diferenciaci do astrocytů (Tab. 2, Obr. 8). Diferenciacie (28 dní) probíhala při 37 °C, ve vlhké atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 15% O<sub>2</sub> a celý objem média byl vyměněn každý třetí/čtvrtý den.



**Obr. 8: Schéma kultivačních podmínek a diferenciacie buněčných linií použitých v této disertační práci.**

### 2.1.2.3 Kultivace lidských astrocytů

Potažení kultivačních misek pro astrocyty (buňky Astro2, Obr. 8) bylo provedeno přidáním 1% Geltrex Basement Membrane Matrix. Komerčně dostupná buněčná linie lidských astrocytů (Gibco, katalogové číslo: N7805-200, číslo výrobní šarže: 1640797), odvozená z mozkových progenitorů gliových buněk, byla kultivována při 37 °C, ve vlhké atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> a 10 % O<sub>2</sub>, s počáteční hustotou  $\geq 40\,000$  buněk/cm<sup>2</sup>. Polovina média (DMEM, 4 mM GlutaMAX, 1 mM pyruvát sodný, 1 % N-2 supplement, 10 % FBS a 1 % penicilin-streptomycin) byla vyměněna každý druhý den. Buňky byly pasážovány pomocí Accutase každých 3-5 dní.



#### 2.1.2.4 Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk

Lidské ESC linií CCTL-12 (46, XX, del(18)) a CCTL-14 (46, XX)<sup>21</sup> (buňky ESC1 a ESC2, Obr. 8) byly kultivovány na miskách potažených želatinou s podporou nedělicích se primárních embryonálních fibroblastů, izolovaných z 12,5denních embryí myši kmene CF1 (výsev v hustotě 24 000 buněk/cm<sup>2</sup>). Médium (DMEM/F-12, 15 % knockout serum replacement, 2 mM L-glutamin, 1× minimum essential medium non-essential amino acids, 0,5 % penicilin-streptomycin, 100 μM β-2 merkaptoethanol a 4 ng/ml FGF-2) bylo vyměňováno každý den, kolonie ESC byly pasážovány manuálně každý pátý až sedmý den.

#### 2.1.2.5 Sledování vlivu růstových faktorů na buněčnou proliferaci

NSC byly kultivovány ve 24-jamkových destičkách potažených poly-L-ornitinem a lamininem v inkubátoru s mikroskopem IncuCyte FLR (Essen BioScience Inc.) při 37 °C, ve vlhké atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> a 15 % O<sub>2</sub>, s počáteční hustotou 10 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Buňky byly kultivovány jako čtyři biologické replikáty v médiu pro proliferaci NSC, nebo v médiu pro spontánní diferenciaci NSC bez BDNF/GDNF (Tab. 2). Do média byly přidávány lidské rekombinantní proteiny VEGF121 (100 ng/ml), VEGF165 (100 ng/ml), VEGF121 + VEGF165 (100 + 100 ng/ml), nebo inhibitor Axitinib (10 μM). Čisté médium sloužilo jako kontrola. Buněčná konfluence byla sledována po dobu osmi dnů, polovina objemu média byla vyměněna každý druhý den. Data o změnách buněčné konfluence v čase (devět snímků na jamku každých 60 minut) byla analyzována v programu IncuCyte 2010A Rev2.

Pro statistickou analýzu v programu R<sup>260</sup>, pomocí balíčku emmeans<sup>261</sup>, byly využity lineární smíšené modely a jako faktory byly zadány typ diferenciaci a doba kultivace. Pro výpočet upravených p-hodnot s korekcí na vícenásobná testování byl pro jednotlivá párová porovnání použit Tukey HSD test implementovaný v programu R.

#### 2.1.2.6 Sledování vlivu růstových faktorů na přežívání buněk

Po ukončení sledování vlivu proteinů VEGF121 a VEGF165 na buněčnou proliferaci (kapitola 2.1.2.5) byly buňky obarveny fluorescenčními barvivy pro odlišení živých a mrtvých/poškozených buněk (ReadyProbes Cell Viability Imaging Kit) a snímány s využitím fluorescenčního mikroskopu. Od každé podmínky (čisté médium bez přidávaných růstových faktorů, VEGF121, VEGF165 a VEGF121 + VEGF165) byly analyzovány tři biologické replikáty (samostatné jamky 24-jamkové destičky), vždy tři snímky na jamku. Experiment byl proveden dvakrát při nezávislých kultivacích.

Analýza dat byla provedena v programu Fiji (ImageJ), verze 1.52n.<sup>262</sup> Jednotlivé snímky byly nejprve rozděleny na segmenty pomocí Auto thresholding plugin s využitím Otsuho metody.<sup>263</sup> Počty buněk se signálem barviva Hoechst 33342 (značení buněčného jádra) a SYTOX Green (barví buňky s narušenou cytoplazmatickou membránou) byly určeny pomocí Object Counter plugin.<sup>264</sup> Statistická analýza dat byla provedena jako v kapitole 2.1.2.5.

#### 2.1.2.7 Sběr médií pro analýzu sekretovaných proteinů

Kultivační médium bylo kondicionováno buňkami 48 hodin a poté odebráno během sklizení buněk – v den 0 (proliferující NSC) a v průběhu S a BG diferenciací ve dnech 7, 14, 21 a 28 (kapitola 2.1.2.2). Médium (čtyři biologické replikáty) bylo následně centrifugováno (1000 g, 5 minut při 4 °C) a filtrováno přes 0,22 $\mu$ m filtr. Po přidání inhibitorů proteáz bylo médium zamrazeno a uchováváno při -80 °C.

#### 2.1.2.8 Sběr buněk pro izolaci RNA

Buňky z diferenciaci Astro1 byly sklizeny 28. den diferenciaci, Astro2 byly sklizeny 7. den kultivace, NSC byly sklizeny v průběhu S a BG diferenciací v den 0, 7, 14, 21 a 28 (Obr. 8). Buňky na miskách byly opláchnuty PBS (25 °C) a poté byl přidán RLT Plus pufr (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) s  $\beta$ -merkaptoethanolem (67  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> misky). Po inkubaci (30 s při 25 °C) byl celý objem pufru přenesen do mikrozkušavky, důkladně promíchán a zamražen (-80 °C). Vzorky byly sbírány v biologických triplikátech.

#### 2.1.2.9 Sběr buněk pro izolaci proteinů

NSC byly sklizeny v průběhu diferenciací v den 0, 1-8, 14, 21 a 28 (kapitola 2.1.2.2, diferenciaci S, BG, B, G a Astro1), Astro2 byly sklizeny 7. den kultivace, ESC1 a ESC2 byly sklizeny po vytvoření kolonií. Buňky na miskách byly třikrát opláchnuty PBS (37 °C), poté bylo přidáno PBS (4 °C) a buňky byly mechanicky sklizeny škrabkou (ESC kolonie byly odebrány manuálně, aby nedošlo ke kontaminaci myšími fibroblasty). Buňky byly dvakrát centrifugovány (300 g, 4 minuty při 4 °C) a resuspendovány v PBS (4 °C), poslední centrifugace byla při 4 °C, 500 g, 4 minuty. Veškerý objem PBS byl poté odebrán a pelety buněk byly zamrazeny (-80 °C).

#### 2.1.2.10 Kultivace buněk pro imunocytochemii

Buňky byly kultivovány a diferencovány přímo na mikroskopických sklíčkách (LabTek II CC<sup>2</sup>). NSC byly připraveny v průběhu S a BG diferenciací v den 0, 7, 14, 21 a 28 (kapitola

2.1.2.2). Buňky v jednotlivých komůrkách byly opláchnuty PBS (25 °C) a ihned fixovány 4% paraformaldehydem v PBS po dobu 10 minut. Vzorky byly ihned dále zpracovány pro imunocytochemii, případně skladovány maximálně 14 dní při 4 °C.

## 2.1.4 Práce s RNA

### 2.1.4.1 Izolace celkové RNA

Celková buněčná RNA byla izolována z astrocytů (Astro1 a Astro2) a NSC v průběhu S a BG diferenciací (kapitola 2.1.2.8). Lyzáty byly nejprve homogenizovány pomocí centrifugačních kolonek QIAshredder (centrifugace 130 s, 8 000 g při 25 °C). Z eluátů byla poté odstraněna genomová DNA pomocí centrifugačních kolonek gDNA Eliminator (centrifugace 38 s, 8 000 g při 25 °C). K eluátům byl přidán 70% ethanol (v poměru 1:1 v/v), vzorky byly promíchány a naneseny na centrifugační kolonky RNeasy (centrifugace 23 s, 8 000 g při 25 °C), eluáty byly odstraněny. Na centrifugační kolonky RNeasy bylo naneseno 700 µl RW1 pufru, po centrifugaci (23 s, 8 000 g při 25 °C) byly eluáty odstraněny. Na centrifugační kolonky RNeasy bylo naneseno 500 µl RPE pufru, po centrifugaci (23 s, 8 000 g při 25 °C) byly eluáty odstraněny. Krok s RPE pufrem byl opakován, centrifugace byla prodloužena na 130 s (8 000 g při 25 °C) a eluáty byly opět odstraněny. Centrifugační kolonky RNeasy byly ještě jednou centrifugovány (70 s, 8 000 g při 25 °C) a poté ponechány odkryté po dobu 5 minut pro odpaření zbytků ethanolu. Centrifugační kolonky RNeasy byly následně vloženy do čistých mikrozkušavek a RNA byla uvolněna 30 µl vody (inkubace 60 s, poté centrifugace 70 s, 8 000 g při 25 °C). Tento krok byl zopakován s eluáty, aby bylo dosaženo vyšší koncentrace izolované RNA ve vzorcích. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky přístrojem NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.1.4.2 Reverzní transkripce

Pro přepis celkové buněčné RNA na cDNA byl použit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Nejprve byly odstraněny zbytky genomové DNA – ke 2 µg izolované RNA byly přidány 4 µl gDNA Wipeout Buffer (součást kitu) a voda (celkový objem reakce byl 28 µl). Následně byly vzorky inkubovány dvě minuty při 42 °C v termocykleru.

Pro samotnou reverzní transkripci byly do každého vzorku přidány 2 µl reverzní transkriptázy (Quantiscript Reverse Transcriptase), 8 µl reakčního pufru (Quantiscript RT Buffer, 5×) a 2 µl primerů (RT Primer Mix) a vzorky byly inkubovány v termocykleru 30 minut při 42 °C, s následnou inaktivací reverzní transkriptázy tři minuty při 95 °C.

### 2.1.4.3 Kvantitativní real-time PCR

Relativní genová exprese vybraných genů byla analyzována pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR). Složení reakce bylo: 4  $\mu$ l 5 $\times$  HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 0,25  $\mu$ l primeru forward a 0,25  $\mu$ l primeru reverse (množství každého primeru v reakci bylo 125 nM), 1  $\mu$ l cDNA (množství cDNA v reakci odpovídá 25 ng podle původní naměřené koncentrace RNA) a 14,5  $\mu$ l vody (celkový objem reakce byl 20  $\mu$ l). Každý vzorek byl analyzován v technickém duplikátu, tři biologické replikáty na podmínku. Jako negativní vzorek byla místo DNA přidána pouze voda (NTC, z angl. no template control).

Analýza byla provedena na přístroji CFX96 Touch Real-Time (Bio-Rad) s nastavením viz Tab. 3. Jednotlivé páry primerů byly nejprve otestovány z hlediska specifity s nastavením parametrů amplifikace, jak je uvedeno výše. Mimo sledování amplifikačních křivek byly rovněž sledovány křivky tání výsledných produktů pro vyloučení dimerizace primerů. Výsledné produkty (5  $\mu$ l produktu + 1  $\mu$ l nanášecí barvy) byly následně separovány pomocí 1,5% agarózové elektroforézy a byla sledována velikost produktu a specifita amplifikace. Produkt s odpovídající velikostí byl extrahován z gelu, DNA byla izolována (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) a odeslána na sekvenační analýzu.

**Tab. 3: Program RT-qPCR.**

Aktivace enzymu	95 °C, 12 minut	40 cyklů
Denaturace	95 °C, 15 s	
Nasedání primerů	57 °C, 30 s	
Elongace DNA	72 °C, 30 s	
Analýza tání produktů	72-95 °C, krok: 0,2 °C, 10 s	

Pro normalizaci byly využity geny *GAPDH* (kódující protein Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) a *ATP5F1B* (kódující protein ATP synthase subunit beta, mitochondrial). Statistická analýza dat byla provedena jako v kapitole 2.1.2.5. Seznam primerů použitých pro RT-qPCR je v Příloze 1.

## 2.1.5 Práce s proteiny

### 2.1.5.1 Imunocytochemie

Buňky určené k barvení (kapitola 2.1.2.10) byly permeabilizovány roztokem 0,1% Tritonu X-100 v PBS (10 minut při 22 °C), poté inkubovány v roztoku 50mM NH<sub>4</sub>Cl v PBS (10 minut při 22 °C) a blokovány 5% kozím sérem v PBS (1 h při 22 °C). Primární protilátky (seznam

protilátek a jejich ředění je uveden v Příloze 2) byly rozpuštěny v 1% BSA v PBS a inkubovány se vzorky 3 h při 22 °C. Následně byly buňky omývány třikrát roztokem 0,05% Tween 20 v PBS. Buňky byly dále inkubovány se sekundárními protilátkami (seznam protilátek a jejich ředění je uveden v Příloze 2) a buněčná jádra byla obarvena pomocí DAPI (1 µg/ml) po dobu 45 minut ve tmě při 22 °C. Buňky byly poté třikrát omývány roztokem 0,05% Tween 20 v PBS a inkubovány v PBS 5 minut při 22 °C. Preparáty byly překryty roztokem ProLong Glass Antifade Mountant a překryty krycími skly. Preparáty byly nasnímány pomocí konfokálního mikroskopu TCS SP5 (Leica) a obrazová data byla analyzována v programu Fiji (ImageJ).<sup>262</sup>

#### 2.1.5.2 Analýza sekretomu

Kondiciovaná média (kapitola 2.1.2.7) byla rozmrazena na ledu a zakoncentrována filtrací přes filtr 3 kDa (Amicon Ultra) s výsledným faktorem zakoncentrování 10×. Pro analýzu vybraných sekretovaných proteinů byla zvolena protilátková metoda s detekcí na kuličkách využívající technologii xMAP. Použili jsme komerčně dostupný kit pro analýzu 30 lidských chemokinů, cytokinů a růstových faktorů (Cytokine 30-Plex Human Panel, Invitrogen, Tab. 4). Standardy pro přípravu kalibračních křivek a slepé vzorky (blank) byly připraveny s použitím média pro proliferaci NSC (Tab. 2), ve kterém nebyly kultivovány buňky (nekondiciované médium). Všechny vzorky (čtyři biologické replikáty na podmínku) byly měřeny v technickém duplikátu pomocí přístroje Luminex 200 s akvizičním programem xPonent verze 3.1.871.0 (Luminex Corp.). Minimální počet měřených kuliček byl pro všechny analyty nastaven na 100.

**Tab. 4: Seznam analyzovaných sekretovaných proteinů.**

Pro-epidermal growth factor (EGF)	Fibroblast growth factor 2 (FGF-2)	Hepatocyte growth factor (HGF)	Vascular endothelial growth factor (VEGF)
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Interferon $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )	Interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )
Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1RN)	Interleukin-2 (IL-2)	Interleukin-2 receptor (IL-2R)
Interleukin-4 (IL-4)	Interleukin-5 (IL-5)	Interleukin-6 (IL-6)	Interleukin-7 (IL-7)
Interleukin-8 (IL-8)	Interleukin-10 (IL-10)	Interleukin-12 p40/p70 (IL-12 p40/p70)	Interleukin-13 (IL-13)
Interleukin-15 (IL-15)	Interleukin-17 (IL-17)	Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )	
Eotaxin (CCL11)	C-C motif chemokine 2 (HC11)	C-C motif chemokine 3 (MIP-1 $\alpha$ )	C-C motif chemokine 4 (HC21)
C-C motif chemokine 5 (EoCP)	C-X-C motif chemokine 9 (MIG)	C-X-C motif chemokine 10 (Gamma-IP10)	

Žlutá barva – růstové faktory, modrá barva – cytokiny a zelená barva – chemokiny.

Analýza dat byla provedena pomocí balíčku drLumi<sup>265</sup> v programu R verze 3.6<sup>260</sup>, jako vstupní data byly použity naměřené hodnoty mediánu fluorescence (MFI, z angl. median fluorescent intensity). Hodnoty MFI byly normalizovány na koncentrace proteinů v buněčných lyzátech. Proteiny EGF a FGF-2 byly z analýz vyřazeny, protože byly součástí kultivačního média pro proliferaci NSC, a tedy i nekondiciovaného média. Statistická analýza dat byla provedena jako v kapitole 2.1.2.5.

### 2.1.5.3 Hmotnostní spektrometrie

#### 2.1.5.3.1 Příprava buněčných vzorků

Buněčné pelety (kapitola 2.1.2.9) byly rozmrazeny na ledu, rozpuštěny v lyzačním pufru (8 M močoviny a 5 mM EDTA v 50mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného) a homogenizovány pomocí kombinované mikrocentrifugy a vortexu (MultiSpin, Grant Instruments Ltd., 10 cyklů: 1 minuta centrifugace při 6 000 RPM následovaná 20 s silného třepání). Poté byly vzorky sonikovány na ledu v ultrazvukové lázni (Bandelin; 15 minut při frekvenci 35 kHz), centrifugovány (15 minut, 20 000 g při 4 °C) a supernatanty byly uschovány. Koncentrace proteinů v lyzátech byla určena pomocí Pierce 660nm Protein Assay Kit.

Ke každému vzorku byl přidán lyzační pufr (8 M močoviny a 5 mM EDTA v 50mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného) se surfaktantem (1% ProteaseMAX v 50mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného) tak, aby finální koncentrace surfaktantu byla 0,1 % (w/v). Disulfidické můstky byly redukovány přidáním tris(2-karboxyethyl)-fosfin hydrochloridu (TCEP; 100 mM TCEP ve vodě) na finální koncentraci 10 mM (inkubace 30 minut při 32 °C). Redukované cysteiny byly alkylovány přidáním iodoacetamidu (IAA; 400 mM IAA ve vodě) na finální koncentraci 40 mM (inkubace 45 minut ve tmě při 22 °C). Vzorky byly poté naředěny 50mM roztokem hydrogenuhličitanu amonného se surfaktantem na finální koncentraci 1 M močoviny a 0,02 % (w/v) surfaktantu a proteiny byly štěpeny na peptidy přidáním enzymu LysC (inkubace 2 h při 37 °C) s následným přidáním trypsinu (inkubace přes noc při 37 °C). Oba enzymy byly přidávány ke vzorku v poměru substrát:enzym 100:1. Štěpení bylo zastaveno přidáním kyseliny mravenčí na finální koncentraci 2 % (v/v). Vzorky byly poté centrifugovány (15 minut, 20 000 g při 4 °C) a supernatanty byly následně přečištěny.

Peptidy byly přečištěny pomocí extrakce na pevné fázi s využitím centrifugačních kolonek s kuličkami pokrytými C18 – podle počátečního množství proteinů ve vzorku byly zvoleny MacroSpin, nebo MicroSpin columns (Nest Group). Pomocí centrifugačních kroků (1 minuta, 100 g při 22 °C) a reagensů v čistotě pro LC-MS byly kolonky nejprve kondicionovány acetonitrilem a poté dvakrát propláchnuty (ekvilibrovány) vodou. Následně byly naneseny

vzorky a po centrifugaci byly eluáty nanoseny znovu. Soli a vysoce polární látky byly odmyty vodou a peptidy byly uvolněny dvakrát 80% acetonitrilem s 0,1 % kyseliny mravenčí. Eluáty byly vysušeny na vakuové odparce (Labconco; 30-60 minut při 45 °C) a poté rozpuštěny v zaváděcím pufru (2% acetonitril s 0,5 % kyseliny mravenčí). Koncentrace peptidů byla určena pomocí spektrofotometru Synergy HTX (BioTek) na základě absorbance při vlnové délce 280 nm. Vzorky byly naředěny na koncentraci peptidů 0,5 nebo 1,0 µg/µl a pro normalizaci retenčních časů byly do každého vzorku přidány standardní peptidy (iRT, z angl. indexed Retention Time, Biognosys) v poměru 30:1 (v/v).

#### 2.1.5.3.3 Hmotnostně-spektrometrické měření založené na technice DDA a DIA

Vzorky peptidů (1 µg od každého vzorku) byly separovány pomocí gradientové eluce na kapalinovém chromatografu Eksigent nano-LC 425 (Sciex) přímo napojeném na LC-MS/MS 5600+ TripleTOF (Sciex). Jako předkolona byla použita Acclaim PepMap 100 C18 (5 µm, 0,1×20 mm), vlastní separace proběhla na analytické koloně (vnitřní průměr 75 µm, délka fáze v koloně 25 cm) naplněné stacionární fází ProntoSIL 120 Å 3 µm C18 AQ.

Po zakoncentrování vzorku na předkoloně po dobu 10 minut při průtoku 2 µl/min (2% acetonitril s 0,5 % kyseliny mravenčí) byla směs peptidů separována na analytické koloně pomocí lineárního gradientu 5-35 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravenčí při průtoku 200 nl/min po dobu 120 minut, s následným navýšením acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravenčí z 35 % na 50 % během 10 minut.

V rámci měření DDA bylo v každém cyklu sledováno 30 prekurzorů s nejvyšší intenzitou signálu (doba akumulace prekurzorových iontů byla 300 ms v rozsahu 400-1250 m/z, se zapnutým režimem vysoké citlivosti), které byly následně fragmentovány (doba akumulace fragmentových iontů byla 150 ms v rozsahu 170-1500 m/z). Již fragmentované prekurzorové ionty byly z dalšího měření vyloučeny po dobu 13 s.

V rámci analýz DIA byly vzorky měřeny metodou SWATH-MS. Vhodné nastavení variabilních oken bylo určeno pomocí nástroje SWATH Variable window calculator (Sciex) na základě analýzy buněčných vzorků pomocí DDA (viz výše). Celkem bylo monitorováno 35 variabilních oken s časem cyklu 3,5 s. Prekurzorové ionty byly akumulovány po dobu 150 ms v rozsahu 400-1250 m/z, fragmentové ionty po dobu 100 ms v rozsahu 170-2000 m/z.

Pro sledování stavu LC-MS/MS systému v průběhu měření a k optimalizaci parametrů měření byl použit směsný vzorek peptidů (angl. pooled sample) z náhodných vzorků z S a BG diferenciací (7. až 28. den diferenciací).

### 2.1.5.3.5 Hmotnostně-spektrometrické měření založené na technice SRM

#### 2.1.5.3.5.1 Výběr proteinů pro cílené analýzy

Pro měření vybraných proteinů jsme zvolili analýzu SRM. Na základě literární rešerše jsme zvolili markery pro ESC (NANOG, OCT4 a SOX2), NSC (SOX2, NES, PAX6, S100B a MKI67 – Proliferation marker protein Ki-67), neurony (DCX, TUBB3, MAP2, VEGF-A a CXCL1 – Growth-regulated alpha protein), astrocyty (S100B a GFAP) a oligodendrocyty (GALC a OLIG1). Pro uvedené proteiny byly pomocí databáze SRM Atlas<sup>266</sup> vybrány unikátní (proteotypické) peptidy, pro které byly následně objednány jejich syntetické varianty značené těžkými izotopy uhlíku a dusíku (Thermo Scientific Biopolymers).

#### 2.1.5.3.5.2 Vývoj SRM metod pro cílené měření proteinů

Selektivitu metody SRM zajišťuje monitorování předem určených  $m/z$  prekurzorového iontu (peptidu) a jeho fragmentu. Sledují se iontové přechody, které jsou definovány jako páry hodnot  $m/z$  prekurzorových iontů a hodnot  $m/z$  jejich produktových iontů. Měření SRM bylo provedeno na přístroji QTRAP 5500 (Sciex) s nanoelektrosprejovou ionizací a předřazenou chromatografickou separací vzorku přístrojem Eksigent nano-LC 425 (Sciex). Peptidy byly separovány pomocí gradientové eluce na analytické koloně (vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , délka fáze v koloně 20 cm) naplněné stacionární fází ProntoSIL 120 Å 3  $\mu\text{m}$  C18 AQ. Separace probíhala v lineárním gradientu 5-35 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravenčí, při průtoku 350 nl/min po dobu 30 minut.

MS měření na Q1 a Q3 probíhalo při rozlišení 0,7  $m/z$  v polovině maximální šířky píku. Nejprve byly měřeny samotné syntetické peptidy rozpuštěné ve vodě s iRT peptidy v poměru 30:1 (v/v). Vzorky peptidů získané přípravou buněčných vzorků (kapitola 2.1.5.3.1) byly poté smíchány se syntetickými značenými peptidy a v programu Skyline verze 3.1.1.7490<sup>267</sup> byly sledovány koeluce značených syntetických peptidů a peptidů endogenních, tvary píků a intenzita signálu. Peptidy byly v průběhu celého gradientu testovány s časem prodlevy (angl. dwell time) 10 ms pro jednotlivé přechody a s celkovým časem cyklu 3,5 s. K výběru peptidů, iontových přechodů a optimalizaci parametrů měření byl použit směsný vzorek. S přihlédnutím ke kvalitě získaných dat byly vybrány peptidy pro časově specifické (angl. scheduled) SRM měření, při kterém byly zaznamenávány přechody pouze v době experimentálně zjištěné eluce (retenční čas). Metoda scheduled SRM měřila 10 proteinů (DCX, GALC, GFAP, MAP2, NES, OCT4, OLIG1, S100B, SOX2 a TUBB3). Pro každý protein byly sledovány nejméně dva peptidy a pro každý peptid nejméně čtyři přechody. Celkem bylo monitorováno 258 přechodů a okno retenčního času bylo nastaveno na 4 minuty, s dobou cyklu 1,7 s.



### 2.1.5.3.6 Analýza hmotnostně-spektrometrických dat

#### 2.1.5.3.6.1 Vyhodnocení SWATH-MS dat

Data získaná měřením pomocí DDA metody (kapitola 2.1.5.3.3, směsný vzorek a biologické kvadruplikáty z S a BG diferenciací, s výjimkou dne 0, pro který bylo připraveno osm biologických replikátů) byla nejprve zpracována v programu Mascot Distiller verze 2.7.1 (Matrix Science Ltd.), který provedl výběr píků a převod profilových dat na data centroidní. Takto zpracovaná data byla přímo prohledávána pomocí programu Mascot Server verze 2.6.2 (Matrix Science Ltd.), s využitím databáze lidských proteinů Swiss-Prot (20 245 proteinů, UniProtKB, staženo 6. 2. 2018)<sup>268</sup> doplněné o sekvence známých kontaminantů. Pro identifikaci proteinů byla nastavena povolená tolerance přesnosti určení hmoty prekurzorových i fragmentových iontů na  $\pm 20$  ppm. Fixní modifikace byla nastavena na karbamidometylaci cysteinu (po alkylaci pomocí IAA), jako variabilní modifikace byly nastaveny oxidace metioninu a N-koncová acetylace proteinů. Specifita štěpení proteinů byla s ohledem na štěpení vzorků enzymy LysC a trypsinem definována jako štěpení za každým lysinem, a za argininem – pokud následující aminokyselina není prolin, s povoleným jedním opomenutím místa štěpení. Takto prohledaná data byla následně použita ve formě souborů .dat pro přípravu spektrální knihovny.

Spektrální knihovna byla vytvořena v programu Skyline-daily verze 4.1.1.18179<sup>269</sup> s 1% FDR (z angl. false discovery rate). Povolená tolerance přesnosti určení hmoty byla nastavena na 0,05 m/z. Normalizace retenčních časů byla provedena s využitím iRT peptidů. Naměřená SWATH-MS data byla zpracována v režimu vysoké selektivity s nastaveným rozlišením 23 000. Výběr píků v rozsahu okna  $\pm 5$  minut od predikovaného retenčního času byl proveden nástrojem mProphet<sup>270</sup> s využitím náhodně poskládaných sekvencí arteficiálních (tzv. decoy) peptidů. Peptidy byly poté filtrovány na proteotypické peptidy. Pro kvantifikaci byly dále uvažovány pouze proteiny s nejméně dvěma kvantifikovatelnými peptidy, každý peptid musel mít nejméně tři různé přechody. U těchto proteinů byla pro každý přechod exportována data zahrnující plochu píku, retenční čas a statistickou pravděpodobnost výběru správného píku (tzv. q-value), která byla dále vyhodnocena v programu R pomocí balíčku MSstats<sup>271</sup>. Z analýzy byly předem odstraněny iRT peptidy, peptidy s variabilní modifikací (oxidovaný metionin) a peptidy s q-value  $> 0,01$ . Normalizace dat byla provedena na úrovni jednotlivých přechodů na základě poměru mediánu intenzity celkového signálu (TIC, z angl. total ion current) všech měření děleného mediánem intenzity celkového signálu (TIC) daného měření. Množství proteinů bylo následně určeno z transformovaných ( $\log_2$ ) ploch píků jednotlivých přechodů sloučených pomocí metody TMP (z angl. Tukey median polish). Jeden z osmi

biologických replikátů proliferujících NSC (den 0) měl nízký celkový signál (TIC) a počet identifikací (ve srovnání s ostatními vzorky) a byl proto vyloučen z kvantifikace.

Pro analýzu diferenčně exprimovaných proteinů byly vybrány pouze proteiny, které byly kvantifikovatelné nejméně ve 30 % vzorků. Chybějící hodnoty těchto proteinů byly v případě <50 % chybějících hodnot dopočteny pomocí algoritmu knn (z angl. k-nearest neighbor ( $k = 4$ ), v případě >50 % chybějících hodnot byla použita 1/3 nejnižší naměřené hodnoty proteinu. Takto připravená data byla analyzována pomocí balíčku limma (z angl. linear models for microarray analysis)<sup>272</sup> v programu R.

#### 2.1.5.3.6.4 Vyhodnocení SRM dat

Naměřená data (kapitola 2.1.5.3.5.2) byla zkontrolována v programu Skyline verze 3.1.1.7490 a pouze peptidy, které měly intenzitu signálu nejintenzivnějšího přechodu vyšší než trojnásobek signálu pozadí (poměr signál:šum >3) byly použity pro kvantifikaci. Přechodům, které měly signál pod úrovní pozadí (šumu), byla přiřazena hodnota odpovídající jedné třetině signálu pozadí. Data (plochy píků jednotlivých přechodů) byla exportována ze Skyline a dále vyhodnocena v programu R verze 4.0.2 pomocí balíčku MSstats verze 3.20.1. Pro relativní kvantifikaci bylo množství proteinu určeno z transformovaných ( $\log_2$ ) ploch píků jednotlivých přechodů a s využitím lineárního modelu se smíšenými efekty porovnáno s množstvím daného proteinu v NSC. Upravená p-hodnota byla vypočtena na základě korekce vícenásobných analýz, hranice pro p-hodnotu upravenou podle FDR byla nastavena na 0,05.

#### 2.1.5.4 Imunoblot

Pelety buněk (S a BG diference, kapitola 2.1.2.9) byly lyzovány pomocí RIPA pufru s inhibitory proteáz a fosfatáz (Halt). Vzorky byly sonikovány na ledu v ultrazvukové lázni SONOPULS (Bandelin; 10 s, 50% výkon), poté centrifugovány (10 minut, 16 000 g při 4 °C) a supernatanty byly uschovány. Koncentrace proteinů v lyzátech byly určeny pomocí BCA Protein Assay Kit.

Proteinové lyzáty byly separovány v redukčních podmínkách v komerčně předpřipraveném 3-8% Tris-acetátovém nebo ve 4-12% Bis-Tris gradientovém gelu (NuPAGE). Po separaci byly proteiny pomocí přístroje Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) přeneseny na nitrocelulósovou, případně polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu (v případě detekce protilátkou proti lidskému proteinu VEGF121). Membrány byly poté inkubovány s blokačním činidlem (Příloha 3) a následně s primární protilátkou přes noc při 4 °C. Druhý den byly membrány omývány třikrát pomocí TTBS (Tween-Tris-buffered saline: 0,14 M NaCl,

0,05 % (v/v) Tween 20, 20 mM Tris pH 7,6; 10 minut při 22 °C) a dále inkubovány se sekundární protilátkou rozpuštěnou v 5% sušeném odtučněném mléku v TTBS (1 h při 22 °C). Poté byly membrány omývány v TTBS a inkubovány s chemiluminiscenčním substrátem (ECL Prime reagent). Pro detekci chemiluminiscence byl použit přístroj Chemidoc XRS+ s programem Image Lab verze 5.2.1 (Bio-Rad). Imunoblot analýza byla provedena na třech biologických replikátech s nanáškou tři µg buněčného lyzátu (respektive šest µg pro detekci proteinů VEGF-A a HIF1A). Jako pozitivní kontrola detekce protilátkami proti VEGF121 a VEGF165 byly použity rekombinantní lidské proteiny VEGF121 a VEGF165 (nanáška 1 ng). Pro normalizaci nanášky byly použity proteiny GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) a ATP5F1A (ATP synthase subunit alfa, mitochondrial). Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek je uveden v Příloze 3.

#### 2.1.6 Bioinformatické analýzy

Funkční analýza dat z měření celkového proteomu buněčných vzorků (kapitola 2.1.5.3.6.1) byla provedena pomocí balíčku EGSEA<sup>273</sup> v programu R, s využitím databází Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a Gene Ontology (GO).

Identifikace skupin proteinů (tzv. clusters), které sdílí obdobné změny svého množství v buňce v čase (v průběhu S a BG diferenciaci), byla pro data z měření celkového proteomu buněčných vzorků (kapitola 2.1.5.3.6.1) provedena pomocí balíčku Mfuzz<sup>274</sup> v programu R.

## 2.2 Výsledky

### 2.2.1 Charakterizace experimentálního modelu

Pro analýzu diferenciaci NSC v *in vitro* podmínkách jsme zvolili jako model komerčně dostupné lidské NSC odvozené z linie ESC H9. Tyto NSC jsme nechali spontánně diferencovat buď pouhým odebráním růstových faktorů EGF a FGF-2 z kultivačního média (S diferenciaci), nebo odebráním EGF a FGF-2 a přidáním neurotrofických faktorů BDNF a GDNF (BG diferenciaci). Proliferační a diferenciací potenciál NSC v průběhu S diferenciaci a BG diferenciaci jsme hodnotili na základě exprese genů na úrovni mRNA (pomocí RT-qPCR) a také podle přítomnosti (imunocytochemie) a hladiny proteinů (imunoblot).

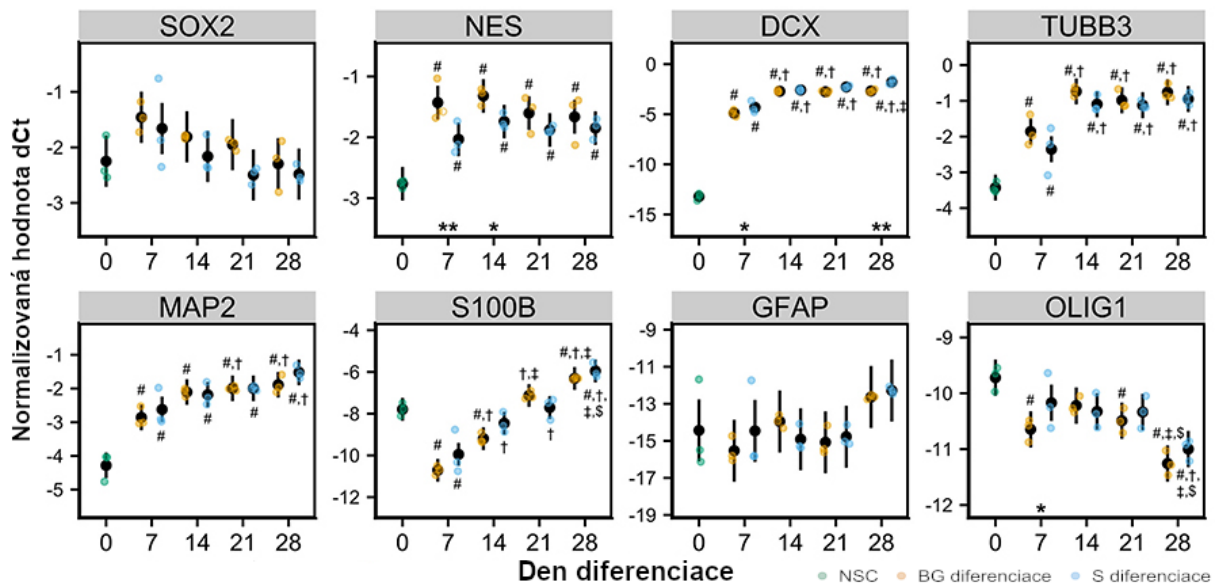
#### 2.2.1.1 Genová exprese známých markerů diferenciaci

Analýza genové exprese na úrovni mRNA potvrdila, že S diferenciaci a BG diferenciaci vykazují podobnou expresi markerů NSC (*NES* a *SOX2*), neuronálních prekurzorových buněk a neuronů (*DCX*, *MAP2* a *TUBB3*), astrocytů (*GFAP* a *SI00B*) a oligodendrocytů (*GALC* a *OLIG1*). Ani u jednoho z markerů NSC genová exprese neklesla pod úroveň NSC v den 0 (Obr. 9). *NES* byl více exprimován při BG diferenciaci ve dnech 7 a 14, s klesajícím trendem ve dnech 21 a 28, který však nebyl statisticky významný. U markerů neuronálních prekurzorových buněk a neuronů byl patrný významný nárůst exprese od 7. dne diferenciaci a exprese všech tří markerů se zvyšovala s pokračující diferenciací. Exprese markeru astrocytů *SI00B* výrazně klesla po zahájení diferenciaci (7. den) a poté rostla až do 28. dne, kdy byla vyšší než u NSC v den 0. Exprese *GFAP* byla velmi nízká a zůstala prakticky nezměněná až po 21. den diferenciaci a poté mírně vzrostla 28. den diferenciaci. Exprese markeru oligodendrocytů *OLIG1* byla nejvyšší v NSC a významně klesala s časem diferenciaci, zejména v den 28. Významný pokles exprese *GALC* ve dnech 7 a 14 je zobrazen v publikaci v příloze, viz strana 164.

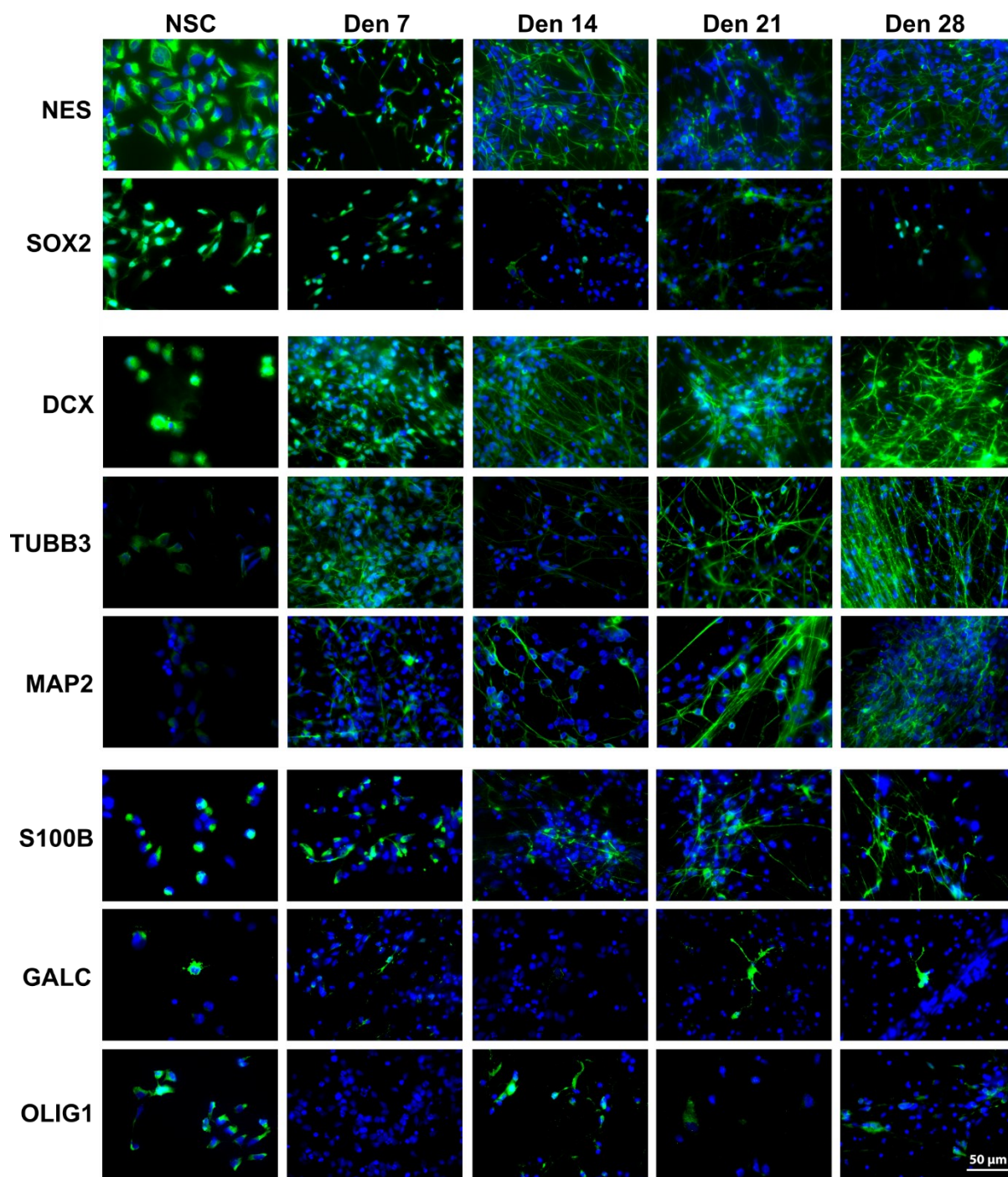
#### 2.2.1.2 Přítomnost a lokalizace známých markerů diferenciaci

Pomocí imunocytochemie (imunofluorescenční mikroskopie) jsme analyzovali přítomnost a lokalizaci vybraných buněčných markerů v NSC během diferenciaci (Obr. 10). Mezi S diferenciací a BG diferenciací jsme nepozorovali rozdíly v morfologii buněk ani v přítomnosti nebo lokalizaci signálu sledovaných proteinů. Charakteristická morfologie NSC v den 0 se měnila na morfologii připomínající neurony (malé buněčné tělo a dlouhý výběžek) mezi dnem 7 a 14. Většina buněk byla pozitivních na *NES*, a některé buňky rovněž na *SOX2*,

po celou dobu diferenciacie. Pozitivita buněk na markery neuronálních prekurzorových buněk a neuronů s časem diferenciacie významně rostla. V případě markerů astrocytů byla většina NSC pozitivní na protein S100B a pozitivita části buněk přetrvávala po celou dobu diferenciacie, zatímco protein GFAP nebyl detekován v NSC ani v průběhu jejich diferenciacie (nevyobrazeno). Pro markery oligodendrocytů jsme u proteinu GALC zaznamenali jen sporadickou pozitivitu buněk, na protein OLIG1 byla pozitivní většina NSC, ale počet pozitivních buněk klesal s diferenciací. Marker pluripotentních buněk OCT4 nebyl detekován v NSC ani v diferencujících buňkách (nevyobrazeno). Pozorovaný signál odpovídal u všech proteinů jejich předpokládané lokalizaci v buňce podle databáze UniProtKB<sup>156</sup> (DCX – cytosol; GALC – lysosomy; MAP2 – cytosol; NES – cytosol; OLIG1 – jádro; S100B – cytosol a jádro; SOX2 – jádro a cytosol; TUBB3 – cytosol).



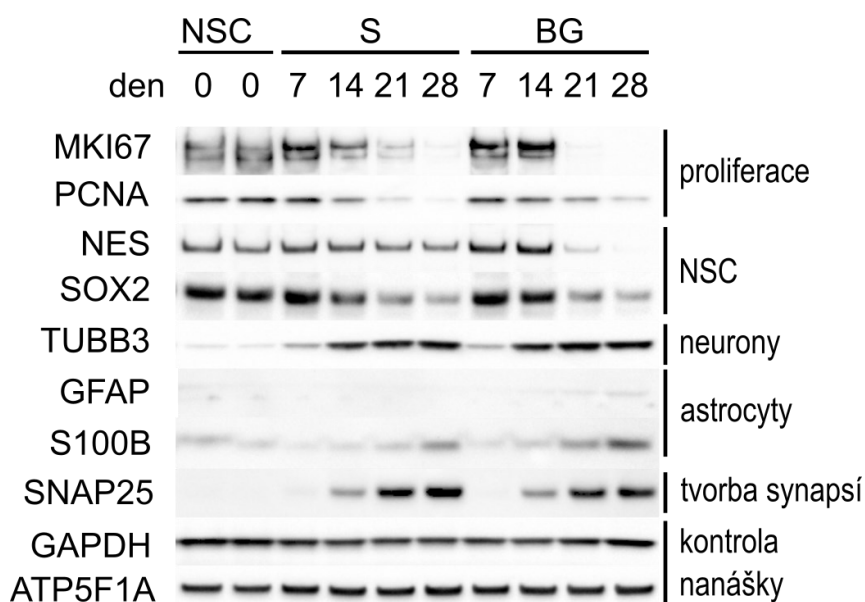
**Obr. 9: Charakterizace *in vitro* diferenciacie NSC pomocí vybraných buněčných markerů na úrovni mRNA.** Hodnoty dCt naměřené pomocí RT-qPCR pro jednotlivé markery byly normalizovány průměrnou hodnotou endogenních kontrol *GAPDH* a *ATP5F1B*. Pro každý časový interval byly analyzovány tři biologické replikáty, černá tečka a černá čára značí průměr a interval 95% spolehlivosti. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednotlivými dny diferenciacie jsou značeny: # (srovnání se dnem 0), † (srovnání se dnem 7), ‡ (srovnání se dnem 14) a § (srovnání se dnem 21). Statisticky významné rozdíly mezi S diferenciací a BG diferenciací jsou značeny \* ( $p < 0,05$ ) a \*\* ( $p < 0,01$ ).



**Obr. 10: Analýza přítomnosti a lokalizace vybraných buněčných markerů v průběhu *in vitro* diferenciace NSC.** Fluorescenční mikroskopie potvrdila očekávanou lokalizaci pozitivního signálu vybraných markerů v průběhu diferenciace. Vyobrazeny jsou snímky z analýzy BG diferenciace, které odpovídají S diferenciaci. Zelená barva – sledovaný buněčný marker, modrá barva – jádro barvené DAPI. Měřítko bylo 50 µm.

### 2.2.1.3 Hladina známých markerů proliferace a diferenciaci na úrovni proteinů

Proliferační a diferenciací potenciál jsme rovněž analyzovali na úrovni proteinů pomocí imunoblotu (Obr. 11). Pozorované trendy nárůstu či poklesu hladiny sledovaných proteinů byly srovnatelné mezi S diferenciací a BG diferenciací. Proteiny MKI67 a PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), které jsou považovány za markery proliferace, byly přítomné zejména v NSC v den 0 a v počátečních fázích diferenciaci do dne 14. Podobné trendy byly patrné u proteinů NES a SOX2, které jsou markery NSC (hladina proteinu NES byla vyšší v den 7 než v den 0, stejně jako hladina jeho mRNA). Hladiny neuronálních markerů TUBB3 (marker neuronů) a SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25) rostly s diferenciací (SNAP25 nebyl u NSC detekovatelný), stejně jako hladina markeru astrocytů S100B. Protein GFAP byl detekovatelný až v pozdější fázi BG diferenciaci.



**Obr. 11: Charakterizace *in vitro* diferenciaci NSC pomocí vybraných buněčných markerů na úrovni proteinů.** Výsledky imunoblotu ukázaly, že v průběhu S diferenciaci i BG diferenciaci dochází k poklesu hladin markerů proliferace a NSC, a naopak k nárůstu hladin markerů neuronů a astrocytů. GAPDH a ATP5F1A byly použity jako endogenní normalizátory nanášky.

Charakterizace NSC diferenciaci na úrovni mRNA a proteinů potvrdila, že buňky se v průběhu diferenciaci přestávají dělit (pokles markerů proliferace MKI67 a PCNA) a začínají měnit svoji morfologii a proteinové složení. Hladiny markerů NSC (NES a SOX2) byly v prvních fázích diferenciaci vyšší než v NSC a poté mírně klesaly (více na proteinové než mRNA úrovni). S diferenciaci i BG diferenciaci vedly k preferenční diferenciaci do neuronů

(nárůst markerů neuronálních progenitorových buněk a neuronů – DCX, MAP2, TUBB3 a SNAP25) a v pozdějších fázích diferenciaci v malé míře i do astrocytů (nárůst markerů S100B a GFAP), ne však do oligodendrocytů (pokles markerů GALC a OLIG1). Imunofluorescenční mikroskopie prokázala, že zatímco většina buněk diferencuje neuronálně, v kultuře se ojediněle nachází buňky pozitivní na markery astrocytů či oligodendrocytů.

### 2.2.2. Vývoj SRM metody pro cílenou analýzu NSC diferenciaci

Pro charakterizaci NSC a z nich diferencujících buněk se často používají protilátkové metody, případně RT-qPCR. Přestože mají své neopomenutelné výhody, jejich použití zahrnuje také řadu nevýhod, jako jsou omezené množství současně sledovaných proteinů nebo omezená korelace mezi hladinou mRNA a proteinu. Proto jsme se zaměřili na vývoj cílené analýzy MS využívající metodu SRM pro kvantifikaci buněčných markerů (proteinů) rutinně používaných pro charakterizaci neurální diferenciaci.

Na základě výsledků literární rešerše publikované naší laboratoří<sup>26</sup> jsme zvolili markery pro ESC (OCT4, NANOG a SOX2, které jsou obvykle používané jako markery pluripotence), NSC (NES, PAX6 a SOX2), neuronální prekurzorové buňky a neurony (DCX, MAP2, S100B a TUBB3), astrocyty (GFAP a S100B) a oligodendrocyty (GALC a OLIG1). Tyto markery buněčných typů jsme doplnili o marker dělících se buněk (MKI67) a sekretované proteiny CXCL1 a VEGF-A, u kterých jsme pozorovali v předchozích experimentech změny jejich hladiny v průběhu neurální diferenciaci v *in vitro* podmínkách (nepublikovaná data naší laboratoře a<sup>26</sup>).

Pro vývoj metody SRM jsme každý z uvedených proteinů vyhledali v databázi SRM Atlas a pro jeho unikátní (proteotypické) peptidy jsme nechali nasyntetizovat interní standardy značené těžkými izotopy uhlíku a dusíku. Protein NANOG neposkytoval žádný unikátní tryptický peptid (peptid vzniklý po štěpení proteinu trypsinem), a byl proto z dalších analýz vyloučen. Vývoj metody SRM jsme provedli na vzorcích z BG diferenciaci, ve kterých jsme sledovali detekovatelnost jednotlivých proteinů a vhodnost jejich unikátních peptidů pro kvantifikaci. Endogenní peptidy proteinů CXCL1, MKI67, PAX6 a VEGF-A zůstaly pod limitem detekce, a byly proto z metody vyloučeny. Protože některé sledované markery nebyly v NSC ani v diferencovaných buňkách očekávatelné, analyzovali jsme rovněž buněčné linie ESC (ESC1 a ESC2), NSC diferencované do astrocytů v přítomnosti FBS (Astro1) a komerční linii astrocytů (Astro2) (Obr. 12). Podařilo se nám vyvinout metodu SRM pro monitorování 10 vybraných markerů ESC, NSC, astrocytů, neuronů a oligodendrocytů (DCX, GALC, GFAP, MAP2, NES, OLIG1, OCT4, S100B, SOX2 a TUBB3).



		ESC1	ESC2	NSC	BG	B	G	S	Astro1	Astro2
ESC	OCT4	Green	Green	White	White	White	White	White	Yellow	White
	NES	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
NSC	SOX2	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow
	DCX	Yellow	Yellow	White	Green	Green	Green	Green	Green	White
NEURONY	TUBB3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	MAP2	White	White	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White
	GFAP	White	White	White	Yellow	White	White	White	White	Green
ASTRO	S100B	White	White	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	GALC	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	White
OLIGO	OLIG1	White	White	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	White

**Obr. 12: Vývoj metody SRM pro analýzu neurální diferenciace.** Každá podmínka (buněčný typ či diferenciace) byla analyzována ve čtyřech biologických replikátech a naměřená data byla manuálně kontrolována ve Skyline. Bílá barva – žádný peptid sledovaného markeru nebyl detekovatelný. Žlutá barva – jeden peptid sledovaného markeru byl detekovatelný nejméně ve třech biologických replikátech určité podmínky (protein byl detekovatelný). Zelená barva – nejméně dva peptidy sledovaného markeru byly detekovatelné v dané podmínce (protein byl kvantifikovatelný).

Naše výsledky ukázaly, že markery NSC jsou detekovatelné ve všech analyzovaných buňkách, včetně linií ESC a komerčních astrocytů (Astro2). Marker neuronálních prekurzorových buněk DCX byl hojně zastoupen ve všech buňkách diferencovaných z NSC (S, BG, B, G a Astro1 diferenciace), nebyl však detekovatelný v NSC. Markery neuronů TUBB3 a MAP2 byly ve všech diferencovaných buňkách i v původních NSC. TUBB3 byl rovněž v obou liniích ESC a v Astro2, což ukazuje, že jeho přítomnost není specifická pro neurony.

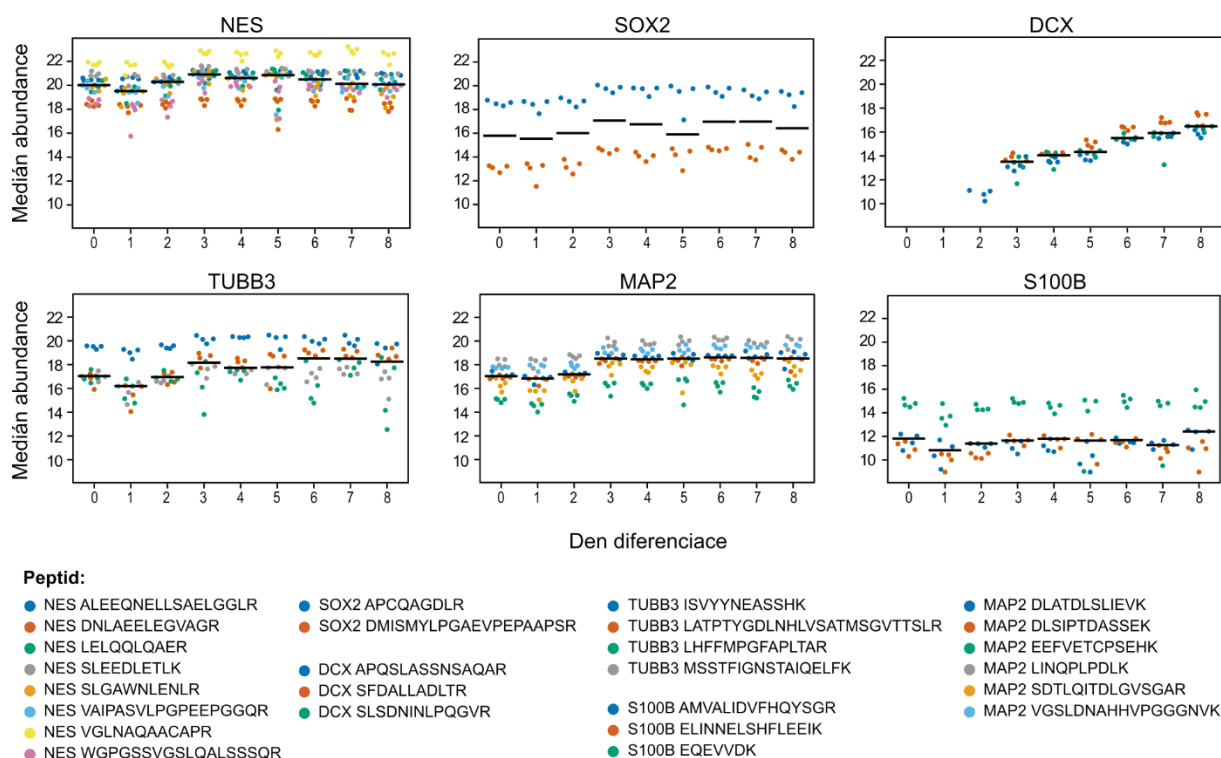
S100B, marker astrocytů, byl kvantifikovatelný ve všech buňkách diferencovaných z NSC a také v Astro2, ne však v NSC. Oproti tomu GFAP měl výrazný signál pouze v buňkách Astro2 a detekovatelný byl také v buňkách po BG diferenciaci. Markery oligodendrocytů GALC a OLIG1 byly detekovatelné v NSC a ve všech z nich diferencovaných buňkách. Výraznější signál měl GALC u obou linií ESC a u buněk Astro1, což pozitivně korelovalo s výsledky pro marker pluripotence OCT4. Protein OLIG1 neměl výraznější signál v žádné z testovaných podmínek.

Jak je patrné z našich výsledků (Obr. 12), všechny spontánní diferenciaci NSC *in vitro* (S, BG, B a G diferenciaci) vedly k neuronální diferenciaci, což je v souladu s výsledky charakterizace S diferenciaci a BG diferenciaci pomocí RT-qPCR, fluorescenční mikroskopie a imunoblotu. Diferenciaci s FBS (Astro1) v případě NSC odvozených z linie ESC H9 také směřovala buňky k neuronální populaci místo do populace astrocytů a vzhledem k méně definovanému složení FBS oproti sérovým suplementům vedl tento druh modulace NSC pravděpodobně také k jejich dediferenciaci.

### 2.2.3 Analýza BG diferenciaci pomocí metody SRM

Zajímalo nás, jak se mění hladiny sledovaných markerů v průběhu BG diferenciaci. Nejprve jsme se zaměřili na časnou fázi diferenciaci, a to den 0 až den 8. Naše výsledky ukázaly, že změna média (odebrání EGF a FGF-2) spojená s přechodem od proliferace ke spontánní diferenciaci měla významný, byť krátkodobý, vliv na buněčnou proteostázi. Hladina všech kvantifikovatelných markerů, s výjimkou DCX, totiž klesla první den diferenciaci, ale již druhý den se vrátila na původní hladiny (Obr. 13). DCX se stal detekovatelným až druhý den diferenciaci a od třetího dne také kvantifikovatelným, s výrazným nárůstem hladiny v diferenciujících buňkách. Hladiny MAP2 a TUBB3 vzrostly 3. den diferenciaci a zůstaly bez výraznější změny až do dne 8. Hladiny markerů NSC (NES a SOX2) nejprve stouply a od 4. dne začaly mírně klesat. Hladina markeru astrocytů S100B se v průběhu této fáze diferenciaci výrazně neměnila. Markery oligodendrocytů (GALC, OLIG1) vykazovaly pouze slabý signál bez možnosti kvantifikace, proteiny GFAP (marker astrocytů) a OCT4 (marker ESC) nebyly v této fázi diferenciaci detekovány vůbec (nevyobrazeno).

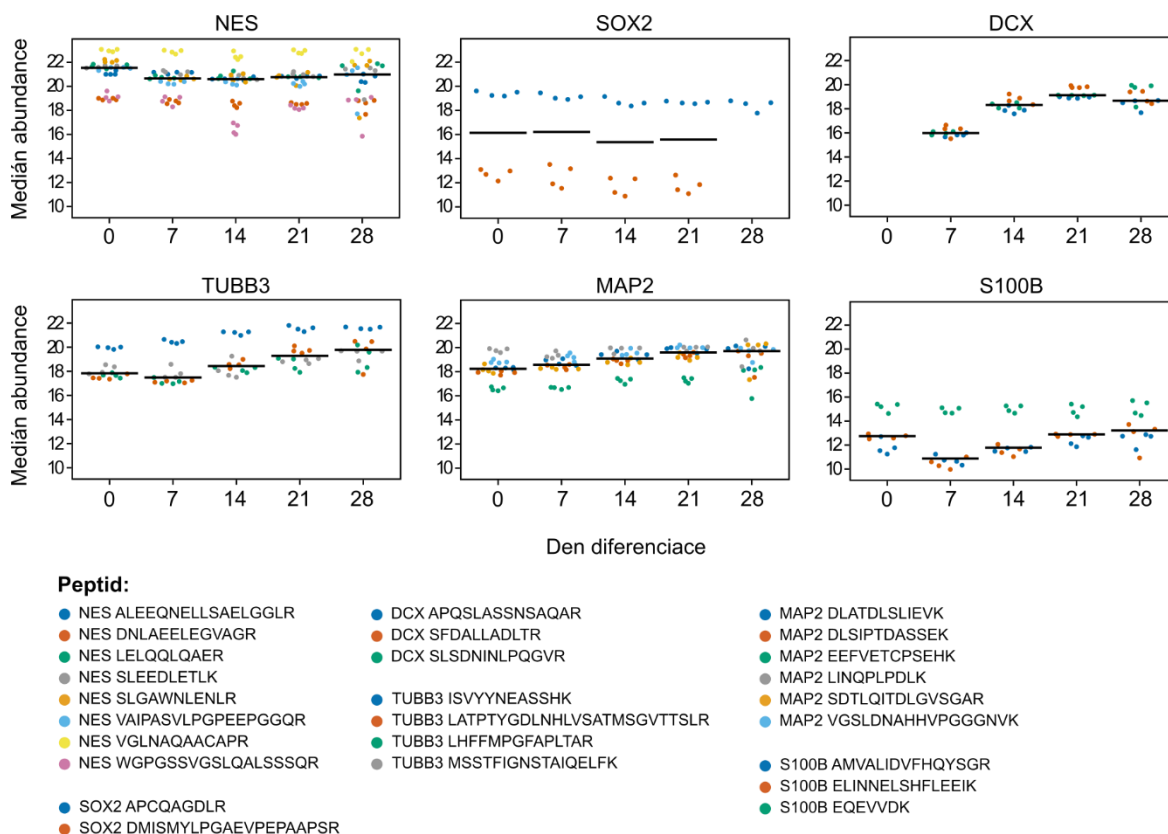
Dále jsme se zaměřili na monitorování BG diferenciaci v den 0 (NSC), 7, 14, 21 a 28 (Obr. 14). Pokles hladin markerů NSC byl patrný ode dne 7 (NES), respektive ode dne 14 (SOX2). Zatímco hladina NES se s další diferenciaci příliš neměnila, hladina proteinu SOX2 klesala v průběhu celé diferenciaci a 28. den byl detekovatelný již pouze jeden peptid tohoto proteinu. Od 7. do 21. dne BG diferenciaci prudce rostla hladina markeru neuronálních prekursorových buněk DCX a mírně rostla také hladina neuronálního markeru MAP2. Neuronální marker TUBB3 narůstal od 14. dne. Hladina markeru astrocytů S100B byla 7. den BG diferenciaci nižší než v NSC a v průběhu 28 dnů se vrátila na původní úroveň. Marker astrocytů GFAP byl při BG diferenciaci detekovatelný pouze ve dni 28 (nevyobrazeno). Markery oligodendrocytů nebyly pro nízkou hladinu kvantifikovatelné a marker pluripotentních buněk (ESC) OCT4 nebyl detekován v žádném z měřených vzorků (nevyobrazeno).



**Obr. 13: Hladiny kvantifikovatelných buněčných markerů v rané fázi BG diferenciace.**

Analýza SRM ukázala nárůst hladin neuronálních markerů a tedy zahájení diferenciace NSC 3.–4. den. Pro každý časový interval byly analyzovány čtyři biologické replikáty (jednotlivé tečky stejné barvy), barvy odpovídají konkrétním peptidům sledovaného markeru. Medián abundance (černá čára) odpovídá mediánu abundance všech transic zobrazených peptidů.

Výsledky měření časné fáze diferenciace (den 0-8) odpovídají naměřeným výsledkům dne 0 a 7 z 28denní diferenciace. Analýza průběhu BG diferenciace (den 0 až 28) ukázala statisticky významnou pozitivní korelaci mezi hladinou proteinu MAP2 s TUBB3 a DCX a rovněž mezi TUBB3 a S100B. Statisticky významná negativní korelace byla mezi hladinou proteinu SOX2 a DCX, což může ukazovat na vliv SOX2 na přechod z NSC do neuronálních prekursorových buněk.

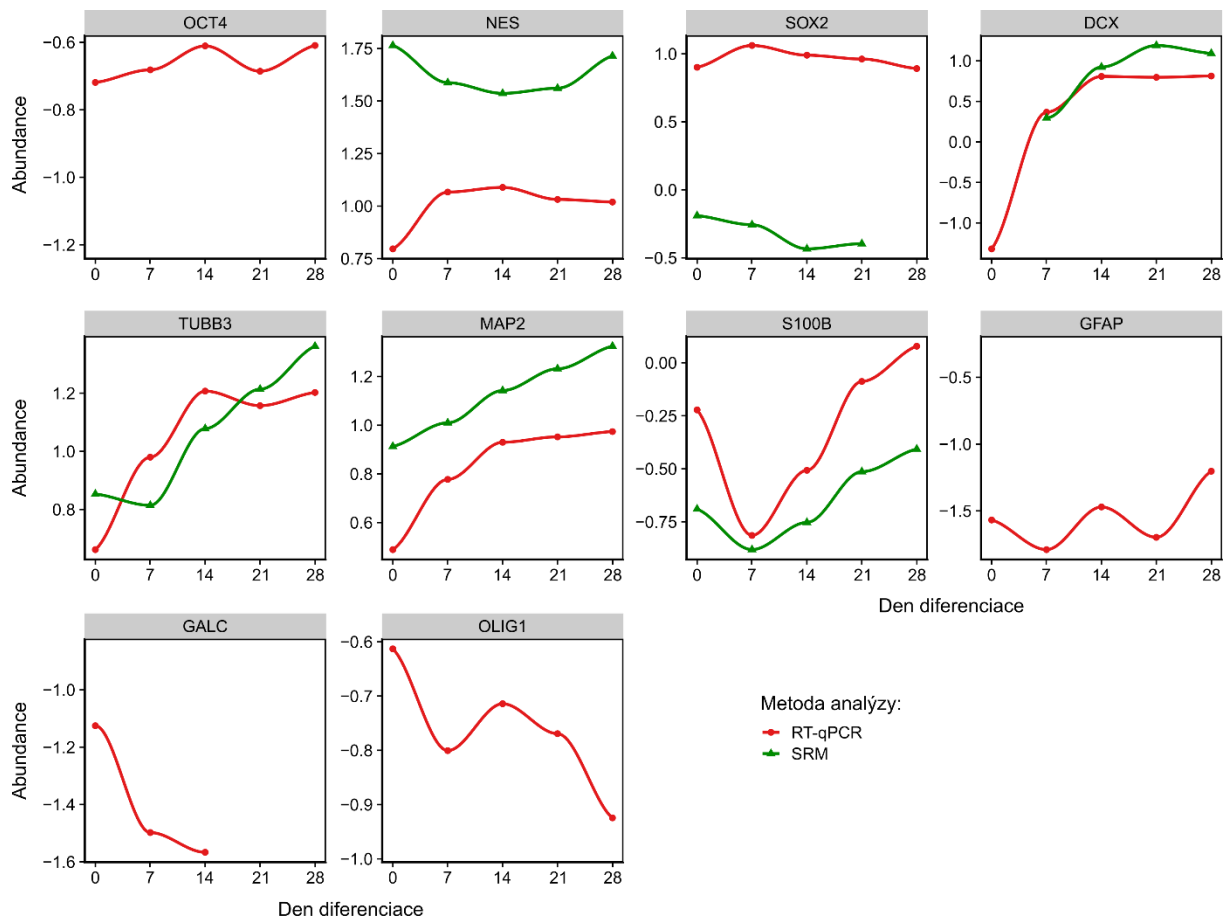


**Obr. 14: Hladiny kvantifikovatelných buněčných markerů v průběhu 28denní BG diferenciace.** Analýza SRM ukázala v průběhu diferenciace pokračující nárůst hladin neuronálních markerů a mírný pokles markerů NSC od 7.-14. dne. Pro každý časový interval byly analyzovány čtyři biologické replikáty (jednotlivé tečky stejné barvy), barvy odpovídají konkrétním peptidům sledovaného markeru. Medián abundance (černá čára) odpovídá mediánu abundance všech transic zobrazených peptidů.

#### 2.2.4 Korelace výsledků metody SRM

Výsledky získané metodou SRM (Obr. 14) odpovídají výsledkům fluorescenční mikroskopie (Obr. 10) a imunoblotu (Obr. 11). Rozptyl hladin některých proteinů mezi jednotlivými biologickými replikáty potvrzuje výsledky fluorescenční mikroskopie ukazující rozdíly mezi jednotlivými buňkami – buňky nediferencují homogenně. Zajímalo nás také, jak spolu korelují výsledky genové exprese sledovaných markerů na úrovni mRNA (analyzované pomocí RT-qPCR) s daty na úrovni proteinů (měřené metodou SRM). U neuronálních markerů DCX a MAP2 a markeru astrocytů S100B byla statisticky významná pozitivní korelace ( $r > 0,94$ ) mezi výsledky RT-qPCR a SRM měřením (Obr. 15). Pozitivní korelace byla také u markeru TUBB3 ( $r > 0,8$ ), nebyla však statisticky významná. Negativní korelace byla pozorována u markerů NSC, NES ( $r < -0,67$ ) a SOX2 ( $r < -0,23$ ), ani tyto korelace však nebyly statisticky významné. Čtyři sledované markery (GALC, GFAP, OCT4 a OLIG1) nebylo možné

kvantifikovat ve všech časových intervalech na úrovni mRNA a proteinů, a nebyly proto zahrnuty do analýz korelace.



**Obr. 15: Korelace hladin vybraných buněčných markerů v průběhu BG diferenciaci na úrovni mRNA a proteinu.** Výsledky analýz RT-qPCR (hodnoty dCt) a SRM (hodnoty log2 transformované abundance) ukázaly u sledovaných markerů omezenou korelaci mezi mRNA a kódovaným proteinem.

### 2.2.5 Monitorování neurálních markerů u NSC diferenciaci za různých podmínek

Pro validaci metody SRM jsme použili referenční linie ESC (ESC1 a ESC2) i referenční astrocyty (Astro2) a sledovali jsme hladiny markerů během 28denní diferenciaci NSC. Porovnávali jsme spontánní S diferenciaci, spontánní diferenciaci s trofickou podporou (BG, B a G diferenciaci) a diferenciaci do astrocytů s přidáním FBS (Astro1).

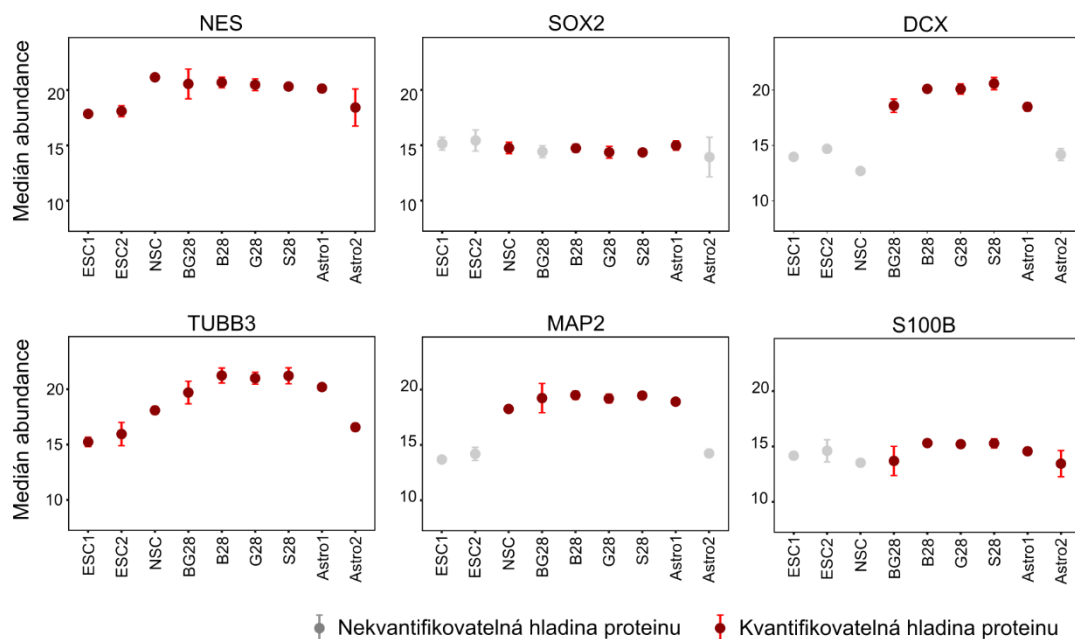
Marker pluripotence (ESC) OCT4 byl kvantifikovatelný pouze v referenčních ESC1 a ESC2 (srovnatelné hladiny v obou liniích, viz přílohy strana 168), jeden jeho peptid byl detekovatelný také při NSC diferenciaci s FBS (Astro1). Marker astrocytů GFAP byl

kvantifikovatelný pouze v referenčních astrocytech Astro2 (viz přílohy strana 168), hladina markeru astrocytů S100B rostla s diferenciací NSC (Obr. 16), kde byla 28. den vyšší než v referenčních Astro2 (viz přílohy strana 168). NES, marker NSC, měl nejvyšší hladinu v NSC a nejnižší v referenčních liniích ESC1, ESC2 a Astro2. U buněk diferencovaných z NSC jeho hladina klesla a tento pokles vykazoval větší rozptyl mezi biologickými replikáty u BG diferenciaci. Hladina druhého markeru NSC, SOX2, mírně klesla ve všech diferenciacích protokolech a hladiny markerů neuronálních prekurzorových buněk a neuronů výrazně rostly s každým diferenciacím protokolem (Obr. 16). Protein TUBB3 byl v nízké hladině přítomný v NSC, Astro2 a v obou liniích ESC, není tedy dostatečně specifickým markerem pro neurony. GALC, marker oligodendrocytů, byl kvantifikovatelný pouze v obou liniích ESC a v Astro1, s vyšší hladinou v ESC. Druhý marker oligodendrocytů, OLIG1, nebyl kvantifikovatelný v žádných buňkách, pouze detekovatelný v NSC a v jejich diferenciacích (nevyobrazeno).

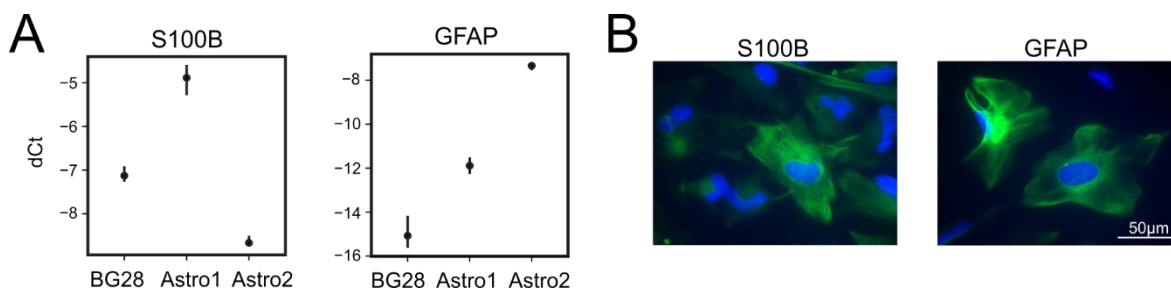
Neurotrofická podpora v případě BG diferenciaci vedla u řady sledovaných markerů (NES, MAP2, TUBB3 či S100B) k vyšší variabilitě mezi biologickými replikáty, s mírně nižší hladinou neuronálních markerů (např. DCX, TUBB3 a S100B) než v případě S, B a G diferenciaci (Obr. 16). BG diferenciaci tak byla více podobná diferenciaci Astro1 než ostatním NSC diferenciacím. Oproti tomu S diferenciaci měla nejnižší hladiny markerů NSC a naopak nejvyšší hladiny neuronálních markerů a S100B.

Významné rozdíly byly patrné mezi diferenciací NSC do astrocytů (Astro1) a komerčními liniemi astrocytů (Astro2). V obou liniích byl kvantifikovatelný marker astrocytů S100B, zatímco GFAP byl pouze v Astro2. Rozdílům mezi Astro1 a Astro2 na úrovni proteinů odpovídaly také rozdíly markerů astrocytů na úrovni mRNA (Obr. 17A). Přítomnost těchto proteinů a jejich lokalizace u Astro2 byla ještě ověřena pomocí imunofluorescenční mikroskopie (Obr. 17B). Buňky Astro1 měly podobné hladiny sledovaných markerů NSC a neuronů jako ostatní NSC diferenciaci. U Astro1 byl navíc detekovatelný marker ESC OCT4 a marker oligodendrocytů GALC. Tyto výsledky potvrdily, že diferenciaci NSC pomocí FBS nevedla k očekávanému vzniku populace astrocytů. Buňky modulované pomocí FBS vykazovaly znaky neuronální diferenciaci a zároveň možné dediferenciaci (přítomnost OCT4).

Prokázali jsme, že naše metoda SRM je vhodná pro charakterizaci NSC a umožňuje přesnou analýzu jejich diferenciaci.



**Obr. 16: Analýza hladiny vybraných buněčných markerů v průběhu diferenciace NSC a u referenčních buněk.** Analýza SRM potvrdila preferenční neuronální diferenciaci bez ohledu na použitý diferenciální protokol. Pro každý buněčný typ či diferenciaci byly analyzovány čtyři biologické replikáty, tečka a čára značí průměr a interval 95% spolehlivosti. Šedá barva – protein nebyl kvantifikovatelný ve sledované podmínce. Červená barva – protein byl kvantifikovatelný (nejméně dva peptidy sledovaného markeru byly detekovatelné v dané podmínce).

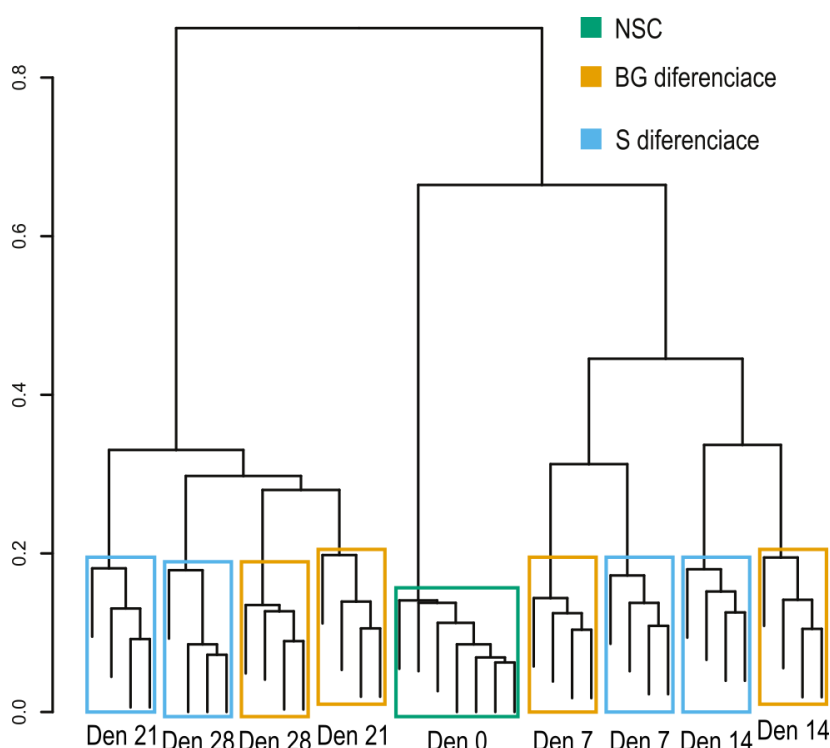


**Obr. 17: Analýza hladiny markerů astrocytů u diferenciace NSC a u komerční linie astrocytů.** **A)** Výsledky RT-qPCR potvrdily významné rozdíly mezi diferenciací NSC Astro1 a referenčními astrocyty (Astro2) v expresi *S100B* a *GFAP*, které byly pozorovány na úrovni proteinů (nevyobrazeno). Hodnoty dCt naměřené pomocí RT-qPCR pro jednotlivé markery byly normalizovány průměrnou hodnotou endogenních kontrol *GAPDH* a *ATP5F1B*. Pro každý časový interval byly analyzovány tři biologické replikáty, černá tečka a černá čára značí průměr a interval 95% spolehlivosti. **B)** Imunofluorescenční mikroskopie potvrdila očekávanou lokalizaci signálu *S100B* a *GFAP* v Astro2. Zelená barva – sledovaný buněčný marker, modrá barva – jádro barvené DAPI. Měřítko bylo 50  $\mu\text{m}$ .

## 2.2.6 Analýza buněčného proteomu v průběhu NSC diferenciaci

Charakterizace neurálních markerů pomocí metody SRM ukázala u diferencujících NSC významné rozdíly mezi S diferenciací a BG diferenciací. Zaměřili jsme se proto na 28denní S diferenciaci a BG diferenciaci a analýzu jejich buněčného proteomu metodou DIA (SWATH-MS). Pomocí měření DDA jsme nejprve připravili specifickou spektrální knihovnu, která nám v datech z DIA měření umožnila kvantifikaci 2 804 proteinů na základě jejich unikátních peptidů.

Hladiny jednotlivých proteinů jsme podrobili shlukové analýze (angl. cluster analysis) (Obr. 18). Výsledky prokázaly výrazné rozdíly mezi NSC (den 0), časnou fází diferenciaci (dny 7 a 14) a pozdní fází diferenciaci (dny 21 a 28). Zatímco v časné fázi nebyl významný rozdíl mezi S diferenciací a BG diferenciací, v pozdní fázi diferenciaci byla hlavní příčinou rozdílů modulace diferenciaci pomocí neurotrofických faktorů BDNF a GDNF.



**Obr. 18: Shluková analýza na základě změn hladin proteinů v průběhu diferenciaci NSC.** Výsledky shlukové analýzy ukázaly, že zatímco v první polovině 28denní diferenciaci NSC není významný rozdíl mezi S diferenciací a BG diferenciací, ve druhé polovině diferenciaci má přítomnost BDNF a GDNF významnější vliv než celková doba diferenciaci.



Změna hladiny v průběhu diferenciaci se týkala více než 60 % kvantifikovaných proteinů (nejméně dvojnásobná změna hladiny 1698 proteinů při S diferenciaci a 1803 proteinů při BG diferenciaci). Největší změny proběhly již v rané fázi diferenciaci (den 7), kdy se ve srovnání s NSC (den 0) změnila hladina více než 1000 proteinů, z toho u >85 % těchto proteinů jsme pozorovali nárůst jejich hladiny (Tab. 5). Celkový počet proteinů se změněnou hladinou dále mírně narůstal s dobou diferenciaci, výraznější rozdíly byly patrné při BG diferenciaci. Rozdíly v počtu proteinů se změněnou hladinou byly podle očekávání výrazně menší mezi S diferenciací a BG diferenciací než při porovnání jednotlivých časů diferenciaci, mírně však narůstaly s délkou diferenciaci, což je v souladu s výsledky shlukové analýzy (Tab. 5, Obr. 18).

**Tab. 5: Počty proteinů se změněnou hladinou v průběhu diferenciaci NSC.**

	NSC (den 0)				Den 7	Den 14	Den 7	Den 14	Den 21	Den 28
	Den 7	Den 14	Den 21	Den 28	Den 21	Den 28	Den 7	Den 14	Den 21	Den 28
<b>S diferenciaci</b>	1024	1145	1279	1359	450	242	71	87	125	107
<b>BG diferenciaci</b>	1057	1197	1336	1446	546	254				

Proteiny byly započítány, pokud byla statisticky významná ( $p < 0,05$ ) změna jejich hladiny (nárůst či pokles)  $\geq 2$ , podle balíčku limma v programu R.

#### 2.2.6.1 Identifikace proteinů s obdobnými změnami hladin v čase

Pro identifikaci proteinů, které sdílí obdobné změny své hladiny v buňce v průběhu diferenciaci, jsme provedli shlukovou analýzu pomocí balíčku Mfuzz<sup>274</sup>. U S diferenciaci (Obr. 19A) i BG diferenciaci (Obr. 19B) tato analýza vytvořila 28 shluků (angl. clusters), které lze dále rozdělit do čtyř základních skupin: I) hladina proteinů po zahájení diferenciaci stoupá a v průběhu diferenciaci dále roste nebo se výrazně nemění, II) hladina proteinů po zahájení diferenciaci klesá a v průběhu diferenciaci dále klesá nebo se výrazně nemění, III) hladina proteinů po zahájení diferenciaci stoupá a poté klesá a IV) hladina proteinů po zahájení diferenciaci klesá a poté stoupá.

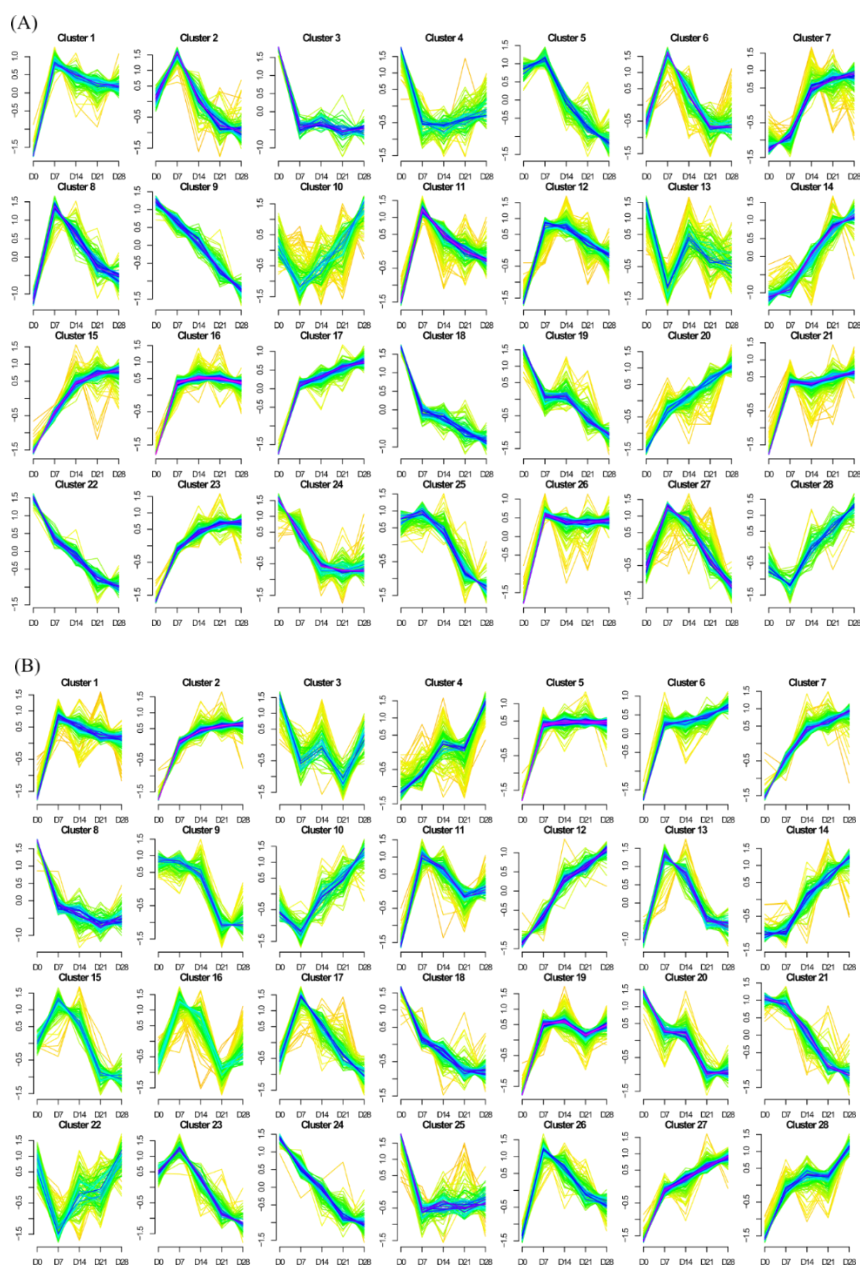
Funkce proteinů přiřazených do jednotlivých skupin jsme identifikovali na základě jejich anotace a funkcí GO (z angl. Gene Ontology terms) podle databáze UniProtKB<sup>156</sup>. Skupina I (růst hladiny s diferenciací) zahrnuje u S diferenciaci 172 proteinů a u BG diferenciaci 169 proteinů, které jsou spojeny s buněčnými procesy a jejich regulací, např. vývoj nervové soustavy, diferenciaci a migrace neuronů, růst axonu, transport proteinů a váčků (souvisí s transportem v axonu), apoptóza, autofágie, metabolismus mastných kyselin, odpověď

na poškození DNA nebo signální dráha Wnt. Do skupiny II (pokles hladiny v průběhu diferenciaci) patří u S diferenciaci 74 proteinů, a u BG diferenciaci 75 proteinů. Tyto proteiny jsou spojeny s buněčnými procesy, jako je buněčné dělení (mitóza), odpověď na poškození DNA, organizace chromatinu, replikace DNA, přepis DNA do RNA, sestřih RNA, translace či regulace apoptózy. Skupina III (růst hladiny po zahájení diferenciaci a poté pokles) je tvořena 107 proteiny u S diferenciaci a 60 proteiny u BG diferenciaci. Tyto proteiny jsou spojeny s buněčnými procesy, jako je buněčné dělení, oprava DNA, replikace DNA, přepis DNA do RNA, sestřih RNA, translace, proliferace a diferenciaci kmenových buněk, signální dráha Wnt nebo regulace apoptózy. Do skupiny IV (pokles hladiny po zahájení diferenciaci a poté růst) patří u S diferenciaci 21 proteinů, a u BG diferenciaci 26 proteinů. Tyto proteiny jsou spojeny s buněčnými procesy, jako je metabolismus mastných kyselin a lipidů a reorganizace aktinového cytoskeletu.

Výsledky shlukové analýzy Mfuzz jsou v souladu s pozorovanými změnami hladin proteinů v průběhu diferenciaci (Tab. 5). S délkou diferenciaci pozitivně korelují hladiny proteinů spojených s vývojem mozku a neurogenezi (skupina I) a naopak negativně korelují hladiny proteinů spojených s buněčným růstem a dělením (skupina II a III). Největší změny probíhají v časně fázi diferenciaci, což souhlasí s nárůstem hladin proteinů spojených s transkripcí, sestřihem RNA a translací na počátku diferenciaci a s jejich poklesem v průběhu diferenciaci (skupina II a III). Proteiny spojené s metabolismem mastných kyselin a reorganizací aktinového cytoskeletu, jejichž hladiny nejprve klesají po zahájení diferenciaci a poté rostou (skupina IV), mohou souviset se změnami morfologie při neurogenezi (růst axonu a migrace buněk). Do skupiny I byly rovněž zařazeny některé známé markery neurálních prekursorových buněk a neuronů, např. DCX, MAP2 či NCAM1 (Neural cell adhesion molecule 1). Výsledky získané shlukovou analýzou Mfuzz tak mohou být využity i pro hledání nových markerů diferenciaci NSC.

#### 2.2.6.2 Analýza buněčných procesů regulovaných v průběhu NSC diferenciaci

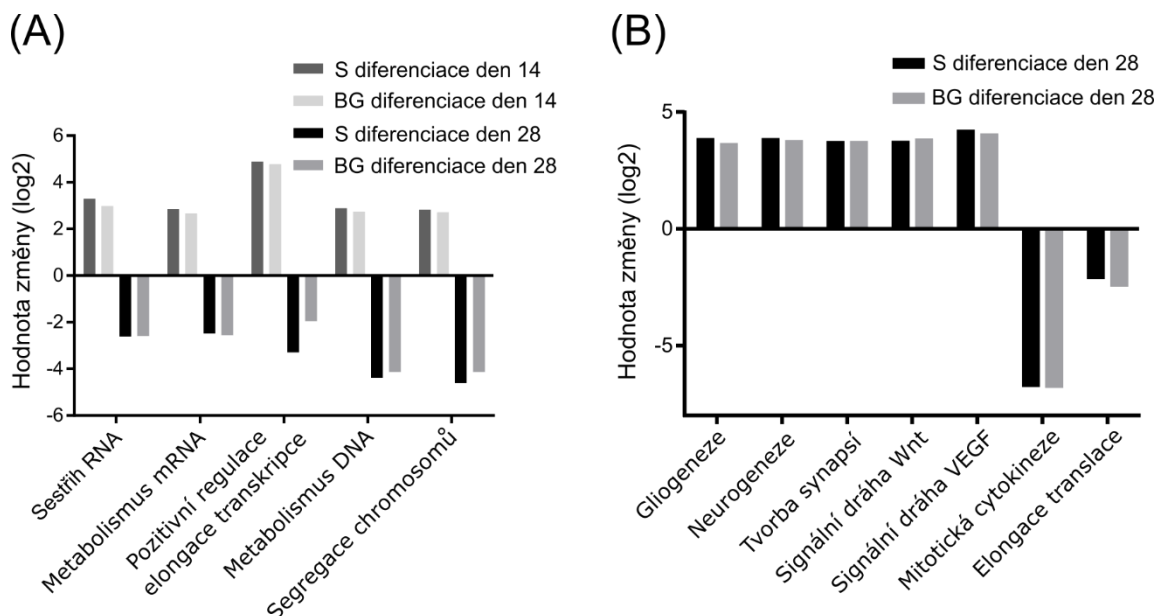
Shlukové analýzy nám poskytly základní informace o vlivu délky a typu diferenciaci na buněčný proteom, a rovněž o regulovaných buněčných procesech. Pro podrobnější analýzu buněčných procesů a signálních drah jsme použili funkční analýzy pomocí balíčku EGSEA<sup>273</sup> s databázemi KEGG a GO. Výsledky těchto analýz byly v souladu mezi sebou i s výsledky získanými shlukovou analýzou pomocí Mfuzz.



**Obr. 19: Shluková analýza proteinů s obdobnými změnami hladin v čase.** Analýza Mfuzz vedla k identifikaci 28 shluků (clusters) u (A) S diferenciace i (B) BG diferenciace, které je možné podle obdobných trendů změny hladin sdílených proteinů rozdělit do čtyř skupin. Skupina I – hladina proteinů po zahájení diferenciace stoupá a v průběhu diferenciace dále roste nebo se výrazně nemění (S diferenciace – cluster 7, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 23 a 26, BG diferenciace – cluster 2, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 19, 27 a 28), skupina II – hladina proteinů po zahájení diferenciace klesá a v průběhu diferenciace dále klesá nebo se výrazně nemění (S diferenciace – cluster 3, 9, 18, 19, 22 a 24, BG diferenciace – cluster 8, 9, 18, 20, 21 a 24), skupina III – hladina proteinů po zahájení diferenciace stoupá a poté klesá (S diferenciace – cluster 1, 2, 5, 6, 8, 11, 12, 25 a 27, BG diferenciace – cluster 1, 11, 13, 15, 16, 17, 23 a 26) a skupina IV – hladina proteinů po zahájení diferenciace klesá a poté stoupá (S diferenciace – cluster 4, 10, 13 a 28, BG diferenciace – cluster 3, 10, 22 a 25).

Analýza s využitím databáze KEGG ukázala, že v první fázi diferenciaci (den 14) byly sestřih RNA a tvorba ribosomů zvýšené, zatímco 28. den diferenciaci byly sniženy. V této pozdní fázi BG diferenciaci rovněž klesala replikace DNA, zatímco u S diferenciaci byla zvýšená. Tento výsledek je v kontrastu s výsledky imunoblotu na markery proliferace, proteiny MKI67 a PCNA, které u S diferenciaci významně klesají od 14. dne dále (Obr. 11). Dále byla pozorována pozitivní korelace s délkou diferenciaci u vybraných metabolických procesů (např. metabolismus mastných kyselin a glykolýza), regulace aktinového cytoskeletu, růstu axonu, transportu proteinů nebo degradace RNA. Rovněž při diferenciaci docházelo k nárůstu hladin proteinů spojených se signálními dráhami HIF-1 (den 14 a 28) a VEGF (den 28).

Analýza dat s použitím databáze GO, která pokrývá větší množství buněčných procesů než KEGG, ukázala, že procesy spojené s aktivním růstem a dělením buněk (např. metabolismus DNA, segregace chromosomů, metabolismus RNA, transkripce a sestřih RNA) byly zvýšené 14. den a výrazně sniženy 28. den (Obr. 20A). Mitotické buněčné dělení bylo sniženo v den 14 i 28, naopak procesy spojené s vývojem CNS (např. neurogeneze, tvorba synapsí a gliogeneze) a signální dráhy Wnt a VEGF byly významně navýšeny v den 28 (Obr. 20B).

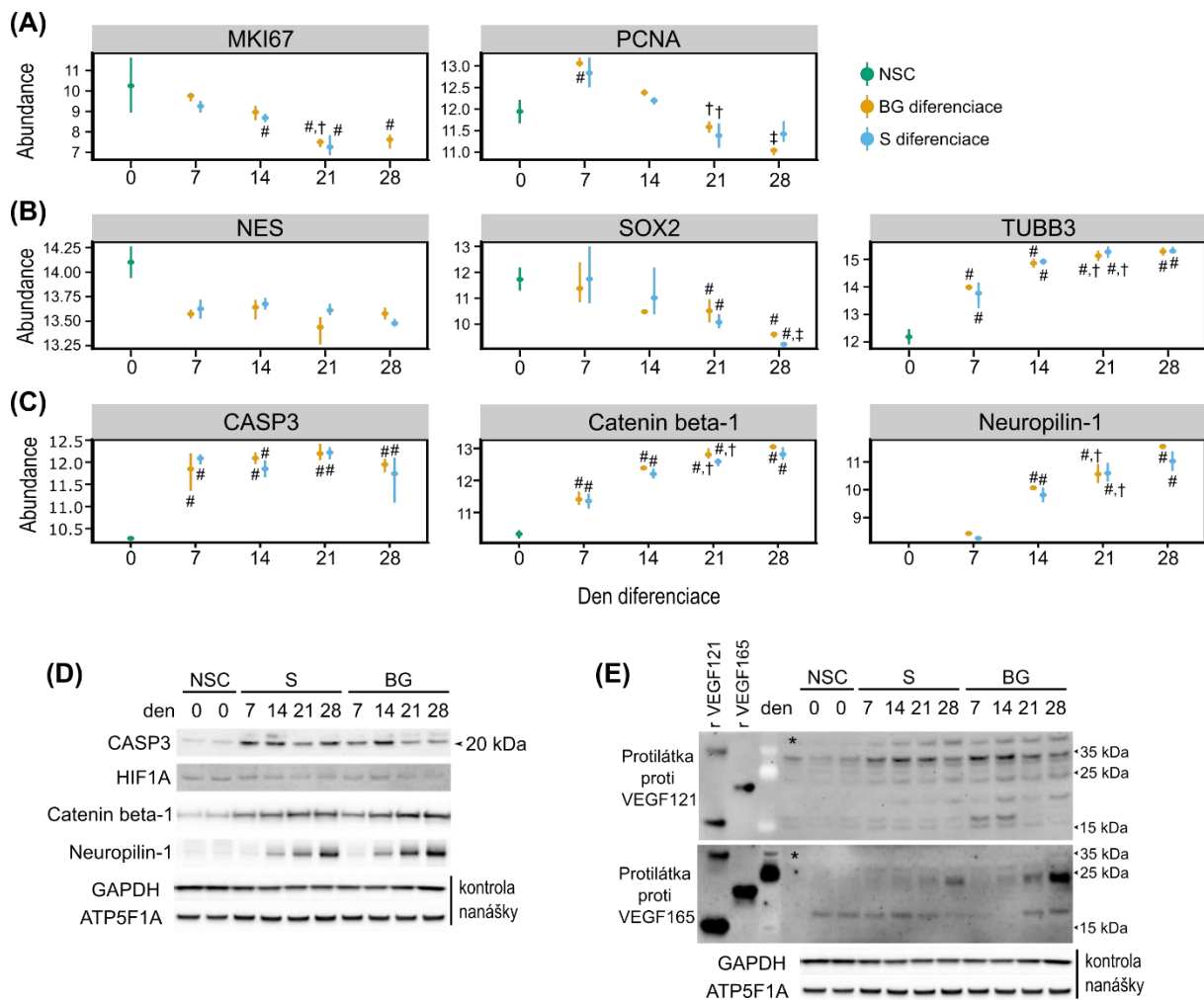


**Obr. 20: Vybrané buněčné procesy a signální dráhy regulované v průběhu diferenciaci NSC. A)** Analýza dat SWATH-MS pomocí GO ukázala významné rozdíly v regulaci buněčných procesů spojených s růstem a dělením buněk 14. a 28. den diferenciaci. **B)** Analýza GO potvrdila aktivaci buněčných a signálních drah spojených s vývojem CNS, a naopak inhibici růstu a dělení buněk 28. den diferenciaci.

#### 2.2.6.2.1 Analýza vybraných markerů buněčných procesů a signálních drah

Výsledky měření SWATH-MS a imunoblotu potvrdily pokles hladiny markerů proliferace MKI67 a PCNA v průběhu diferenciaci (Obr. 11 a 21A), což je v souladu s identifikovaným poklesem buněčného dělení a replikace DNA (Obr. 20). Regulace procesů spojených s vývojem nervové soustavy (např. neurogeneze a gliogeneze) byla potvrzena pomocí SWATH-MS, SRM a imunoblotu na základě poklesu hladin markerů NSC a nárůstu hladin neuronálních markerů a markerů gliových buněk (Obr. 11, 14 a 21B). Analýza Mfuzz ukázala změny hladin proteinů spojených s apoptózou a její regulací, včetně markeru apoptózy, proteinu CASP3 (Caspase-3). Na úrovni SWATH-MS jsme zaznamenali významný nárůst hladiny tohoto proteinu 7. den diferenciaci, jeho hladina se poté výrazně neměnila (Obr. 21C). Imunoblot však ukázal nárůst hladiny aktivované formy CASP3 (20kDA fragment) v časně fázi diferenciaci, následovaný poklesem v den 21, a s růstem hladiny 28. den S diferenciaci (Obr. 21D).

Analýza buněčných procesů identifikovala regulaci hladin proteinů signálních drah HIF-1, VEGF a Wnt v průběhu diferenciaci NSC. SWATH-MS a imunoblot ukázaly aktivaci kanonické signální dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin na základě nárůstu hladiny proteinu Catenin beta-1 (Obr. 21C, D). Proteiny z rodiny HIF-1 byly pod limitem detekce pomocí MS, avšak podle imunoblotu byla hladina proteinu HIF1A (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) nejvyšší v NSC a v časně fázi diferenciaci a poté klesala (Obr. 21D). Pomocí MS (SRM a SWATH-MS) nebylo možné kvantifikovat žádné proteiny z VEGF rodiny ani jejich receptory, s výjimkou koreceptoru Neuropilin-1. SWATH-MS a imunoblot ukázaly pozitivní korelaci hladiny proteinu Neuropilin-1 s dobou diferenciaci, zatímco u NSC nebyl tento koreceptor vůbec detekován (Obr. 21C, D).



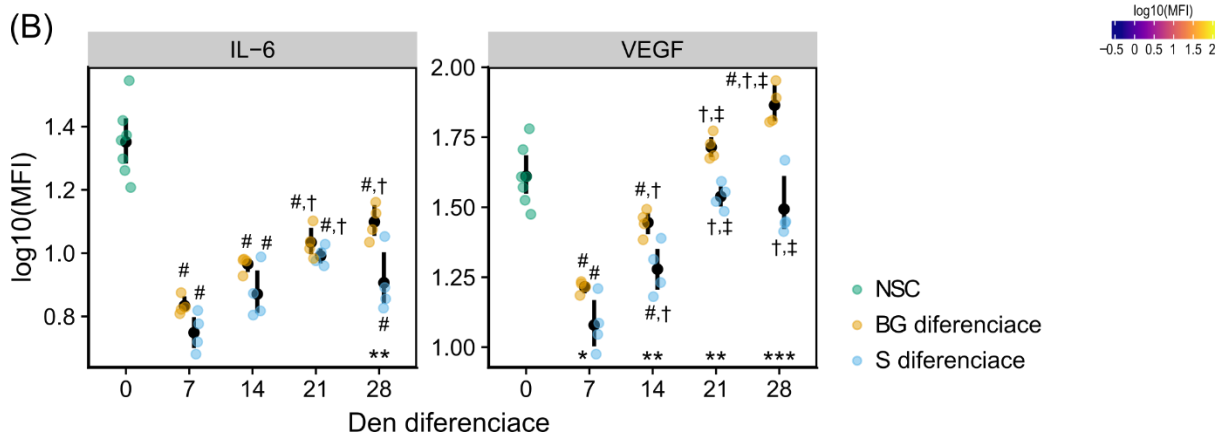
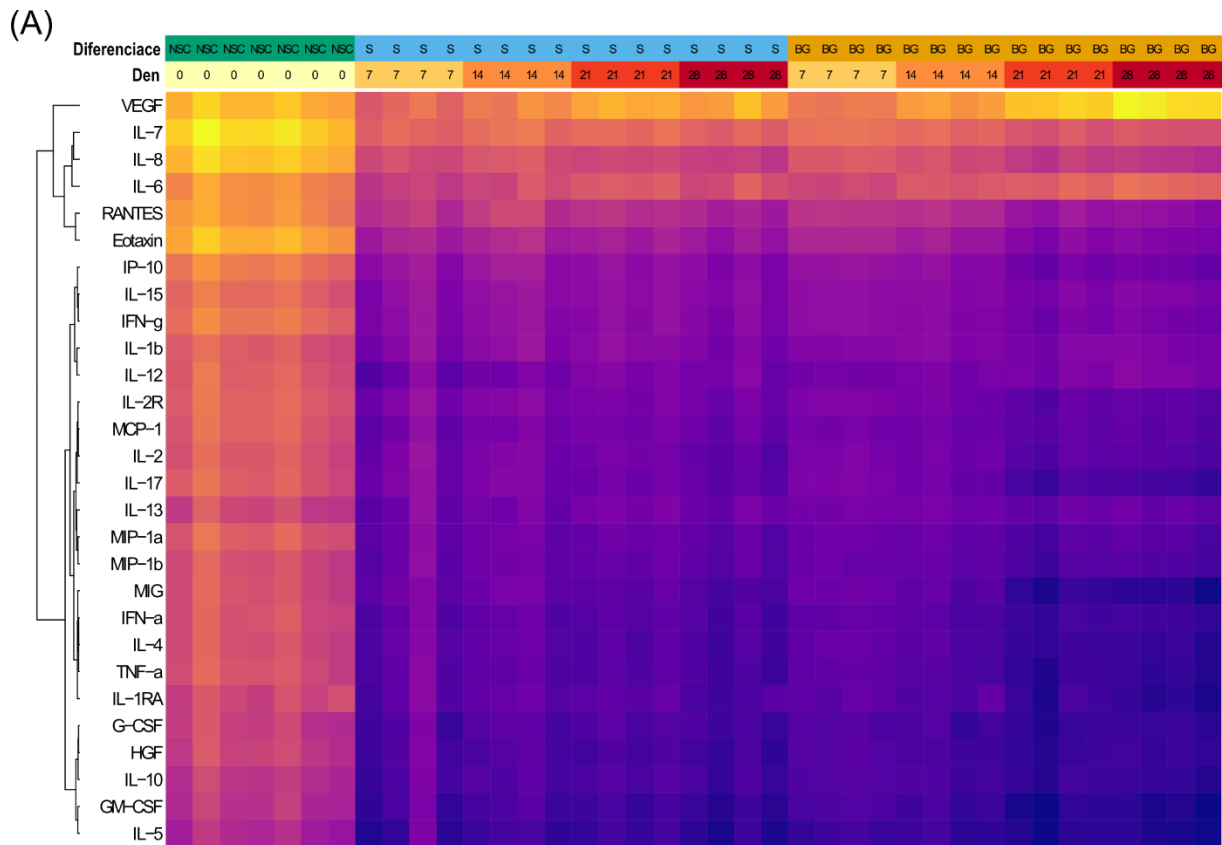
**Obr. 21: Analýza vybraných markerů buněčných procesů a signálních drah v průběhu diferenciace NSC.** Výsledky měření SWATH-MS potvrdily na proteinové úrovni změnu hladin **(A)** pokles markerů proliferace (MKI67 a PCNA), **(B)** pokles markerů NSC (NES a SOX2) a nárůst neuronálního markeru TUBB3 a **(C)** nárůst proteinů spojených s apoptózou (CASP3), signální dráhou Wnt (Catenin beta-1) a signální dráhou VEGF (Neuropilin-1). Pro každý časový interval byly analyzovány čtyři biologické replikáty, tečka a čára značí průměr a interval 95% spolehlivosti. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednotlivými dny diferenciace jsou značeny: # (srovnání se dnem 0), † (srovnání se dnem 7), ‡ (srovnání se dnem 14) a § (srovnání se dnem 21). **D)** Výsledky imunoblotu prokázaly nárůst aktivované formy CASP3 a potvrdily také pokles HIF1A a nárůst Catenin beta-1 a Neuropilin-1. **E)** Detekce VEGF-A v NSC v průběhu diferenciace pomocí imunoblotu prokázala nárůst hladiny VEGF121 (Mw ~15 kDa) a jeho potencionální glykosylované formy (Mw ~17 kDa) v časné fázi diferenciace. V pozdní fázi byl patrný signál, který by mohl patřit glykosylované formě VEGF165 (Mw ~24 kDa). rVEGF121 a rVEGF165 – rekombinantní lidské VEGF121 a VEGF165. \* – směsný vzorek proliferujících NSC a diferencujících buněk. Endogenní normalizátory nanášky GAPDH a ATP5F1A byly u **D** a **E** stejné jako v případě Obr. 11.

### 2.2.7 Analýza sekretomu v průběhu NSC diferenciaci

Modulace okolního prostředí sekrecí růstových faktorů, cytokinů a dalších proteinů je považována za hlavní efekt transplantace buněk při terapii.<sup>4</sup> Naše analýzy buněčného proteomu ukázaly v průběhu diferenciaci nárůst hladin proteinů spojených se signální dráhou VEGF, konkrétně pak nárůst hladiny koreceptoru VEGF Neuropilin-1. Protože ve výsledcích SWATH-MS měření nebyly kvantifikovatelné další proteiny z VEGF rodiny (VEGF-A, B, C, D a PlGF) ani receptory VEGFR1, 2 a 3 nebo koreceptor Neuropilin-2, přistoupili jsme k protilátkové analýze sekretomu NSC.

Pomocí multiplexní protilátkové metody xMAP jsme analyzovali hladiny cytokinů, chemokinů a růstových faktorů sekretovaných do kultivačního média v průběhu S diferenciaci a BG diferenciaci, včetně hladiny VEGF. Hladiny všech analyzovaných proteinů klesly 7. den diferenciaci (Obr. 22A), a dále klesaly s diferenciací, nebo se již významně neměnily. Pouze u proteinů Interleukin-6 (IL-6) a VEGF jsme pozorovali nárůst jejich sekrece od 14. dne diferenciaci (Obr. 22B). Tyto proteiny byly více sekretovány v průběhu BG diferenciaci, avšak pouze 28. den BG diferenciaci byla hladina VEGF vyšší než v den 0. Pozitivní korelace sekrece VEGF s dobou diferenciaci je v souladu s výsledky analýz KEGG a GO.

Pro identifikaci isoformy VEGF-A, která je zodpovědná za aktivaci VEGF dráhy, jsme analyzovali přítomnost VEGF121 a VEGF165 pomocí imunoblotu s využitím rekombinantních lidských proteinů VEGF121 a VEGF165 jako standardů. Při pohledu pouze na hladinu VEGF121 nebo VEGF165, výsledky imunoblotu neodpovídaly pozorovanému nárůstu sekrece VEGF-A. Tomuto nárůstu ale odpovídal součet signálů VEGF121 a VEGF165. Na imunoblotu jsme pozorovali dva signály endogenního VEGF121 s Mw ~15 a ~17 kDa, zatímco rekombinantní VEGF121 byl pouze ve formě ~15 kDa (teoretická Mw ~14 kDa). Tento posun Mw odpovídá očekávané N-glykosylaci VEGF121, která je klíčová pro jeho sekreci.<sup>275</sup> Rekombinantní VEGF121 i VEGF165 produkované v expresním systému bakterie *Escherichia coli* tuto PTM postrádají. Hladina VEGF121 byla nejvyšší v časné fázi diferenciaci (den 7 a 14) a poté klesala, zůstala však nad úroveň NSC (Obr. 21E). VEGF165 nebyl detekovatelný (Obr. 21E). S ohledem na minimální rozdíly v sekvencích isoform VEGF-A však použité protilátky musely čelit omezené specifitě. Díky použití rekombinantních standardů jsme vyvodili hypotézu, že pokud by signál pozorovaný při Mw ~24 kDa patřil endogennímu VEGF165 (např. popsané N-glykosylované formě VEGF165<sup>275,276</sup>), znamenalo by to, že VEGF165 byl produkován zejména v pozdější fázi diferenciaci NSC (den 21 a 28), s vyšší hladinou u BG diferenciaci.



**Obr. 22: Analýza sekretomu v průběhu diferenciaci NSC pomocí xMAP. A) Grafické znázornění hladiny (hodnoty  $\log_{10}$  MFI) vybraných proteinů sekretovaných do kulturačního média během *in vitro* diferenciaci NSC. B) Hladina IL-6 a VEGF v médiu. Pro každý časový interval byly analyzovány čtyři biologické replikáty, černá tečka a černá čára značí průměr a interval 95% spolehlivosti. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednotlivými dny diferenciaci jsou značeny: # (srovnání se dnem 0), † (srovnání se dnem 7) a ‡ (srovnání se dnem 14). Statisticky významné rozdíly mezi S diferenciací a BG diferenciací jsou značeny \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) a \*\*\* ( $p < 0,001$ ).**

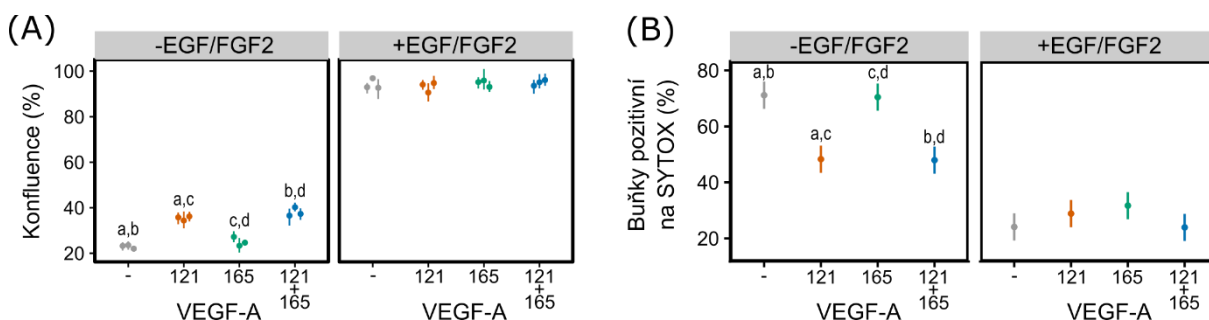


### 2.2.8 Testování vlivu VEGF-A na proliferaci a přežívání NSC

Naše výsledky identifikovaly signální dráhu VEGF jako jeden z buněčných procesů významně regulovaných v průběhu NSC diferenciaci, což podpořil pozorovaný nárůst hladiny koreceptoru VEGF – Neuropilin-1 a změny hladiny VEGF121, a možná také VEGF165, v diferencujících buňkách (Obr. 21C-E). Zaměřili jsme se proto na funkční studii vlivu VEGF-A na proliferaci a přežívání NSC v *in vitro* podmínkách.

NSC jsme kultivovali v médiu pro proliferaci s EGF a FGF-2 a v médiu pro spontánní diferenciaci bez EGF a FGF-2 a bez přidání neurotrofických faktorů BDNF a GDNF (S diferenciaci). Do média jsme přidávali VEGF121, VEGF165, VEGF121 + VEGF165, nebo Axitinib (inhibitor VEGFR1, 2 a 3<sup>277</sup>) a na základě buněčné konfluence jsme sledovali proliferaci buněk po dobu osmi dnů. Poté jsme analyzovali životaschopnost takto kultivovaných buněk pomocí fluorescenčního barvení mrtvých a poškozených buněk.

V případě kultivace NSC v přítomnosti EGF a FGF-2 nemělo přidání VEGF121 nebo VEGF165, případně jejich kombinace, pozorovatelný vliv na proliferaci buněk (Obr. 23A). V podmínkách S diferenciaci však vedlo přidání VEGF121 nebo VEGF121 v kombinaci s VEGF165 k ~1,5× zvýšení proliferace NSC. Samotné VEGF165 nemělo žádný vliv na buněčnou proliferaci (Obr. 23A). Přidání inhibitoru Axitinibu do média bylo pro buňky toxické bez ohledu na přítomnost EGF a FGF-2 (nevyobrazeno).



**Obr. 23: Sledování vlivu VEGF-A na dělení a přežívání NSC.** A) Buněčná konfluence po osmi dnech kultivace NSC bez růstových faktorů (spontánní diferenciaci) nebo v přítomnosti EGF a FGF2. Při spontánní diferenciaci podporuje VEGF121 proliferaci buněk, zatímco VEGF165 nikoliv. EGF/FGF2 potlačuje vliv VEGF-A. Analýza byla provedena na čtyřech biologických replikátech při třech nezávislých kultivacích. B) Pozitivita buněk na fluorescenční barvivo SYTOX Green, které značí poškozené a mrtvé buňky. VEGF121 stimuluje přežívání buněk v podmínkách spontánní diferenciaci, ale ne v přítomnosti EGF/FGF2. VEGF165 nemá vliv na přežívání buněk. Analýza byla provedena na třech biologických replikátech při dvou nezávislých kultivacích. Statisticky vysoce významné rozdíly ( $p < 0,001$ ) v A a B platí pro párová porovnání se stejným písmenem (a – a, b – b, c – c, d – d).

Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme analyzovali NSC po kultivaci (viz výše) s vitálním značením buněčných jader a barvením poškozených a mrtvých buněk. Podobně jako v případě buněčné proliferace jsme nepozorovali žádný vliv VEGF121 nebo VEGF165 na přežívání buněk v přítomnosti EGF a FGF-2 (Obr. 23B). Oproti tomu v podmínkách S diferenciaci vedlo přidání VEGF121 nebo VEGF165 v kombinaci s VEGF165 k ~1,5× snížení počtu poškozených a mrtvých buněk. Samotné VEGF165 opět nemělo významný vliv na přežívání buněk.

Tyto výsledky prokázaly, že přidání VEGF121, ne však VEGF165, do média bez růstových faktorů EGF a FGF-2 podporuje proliferaci a přežívání NSC v *in vitro* podmínkách. Tento efekt je v přítomnosti EGF a FGF-2 potlačen.

### 2.2.9 Hledání kandidátních biomarkerů pro sledování rozvoje Huntingtonovy choroby

Přestože diagnostikovat HD je možné na základě genetického vyšetření, nemáme v současnosti vhodné biomarkery, které by bylo možné použít pro sledování rozvoje HD před projevem prvních symptomů. Přitom právě presymptomatická fáze by byla nejvhodnější pro efektivní terapeutický zásah. Analýza spolehlivých biomarkerů rozvoje HD by rovněž významně usnadnila sledování efektu testované terapie, nejen v presymptomatické fázi. Zaměřili jsme se proto na hledání možných biomarkerů rozvoje HD na základě již publikovaných proteomických studií. Naše analýza byla publikována v rámci přehledové kapitoly, která je součástí této disertační práce.

Studie zkoumající proteom pacientů a experimentálních zvířecích či *in vitro* modelů HD jsme hledali v databázích PubMed a Web of Science s využitím klíčových slov: „Huntington“, „Huntingtin“, „proteom“ a „mass spectrometry“, a na základě relevantních referencí v takto vybraných publikacích. Pro analýzu jsme zvolili studie, které použily pro studium proteomu MS metody DDA, DIA, PRM a SRM. Většina studií usilovala o odhalení mechanismů působení mHTT v buňkách či tkáni, nikoliv o hledání biomarkerů HD. Jakožto neurodegenerativní onemocnění, HD nejvíce postihuje mozkovou tkáň, konkrétně *striatum*. Změny, ke kterým dochází vlivem mHTT na úrovni proteomu mozku, by však mohly být v důsledku narušení hematoencefalické bariéry detekovatelné rovněž v krevní plazmě nebo mozkomíšním moku. Právě tyto tělní tekutiny by byly díky minimální invazivitě jejich odběru ideálním zdrojem biomarkerů pro sledování rozvoje HD.<sup>278</sup>

Zatímco krevní plazma a mozkomíšní mok byly u pacientů s HD studovány poměrně podrobně, proteomických studií mozku byly provedeny pouze jednotky. To je způsobeno zejména omezenou dostupností lidské mozkové tkáně. Obvykle jsou používány vzorky získané

*post mortem* a určitou komplikaci představuje též výběr vhodných zdravých kontrol. Proto je HD podrobněji studována na zvířecích experimentálních modelech, které rozdělujeme na transgenní a knock-in modely.

V případě transgenních modelů je gen kódující lidský mHTT nebo jeho N-koncový fragment, náhodně vložen do genomu modelového organismu, který si tak ponechává své dvě nemutované alely *HTT*. U knock-in modelů je mutace přímo součástí jejich endogenního genu kódujícího *HTT*. Knock-in modely tak lépe reprezentují skutečnou patologii HD.<sup>279</sup> Nejrozšířenějším modelovým organismem pro studium HD, včetně testování možných léčiv a preklinického výzkumu, je myš. Zásadní výhodou tohoto modelového organismu jsou zavedené postupy pro jeho studium, spolu s jednoduchou manipulací a také relativně nízkými náklady na chov.<sup>11</sup> Dalším rozšířeným experimentálním modelem nejen pro studium HD je potkan. Oproti myši má větší velikost těla a váhu, tedy i velikost vnitřních orgánů, což umožňuje vyšší rozlišení při zobrazování CNS a lepší manipulaci při náročnějších zákrocích (např. neurochirurgické operace). Potkan má navíc odlišně regulovanou genovou expresi, odlišnou neurogenezi v dospělém mozku, rozdílnou lokalizaci receptorů pro serotonin v mozku a jiné vnímání a chování, čímž je podobnější člověku než myší modely (shrnutí v <sup>280</sup>). Je však zřejmé, že tyto malé zvířecí modely nemohou postihnout skutečnou komplexitu HD u člověka, zvláště z důvodů rozdílné anatomie (velikost těla a orgánů), fyziologie (např. délka života) či rychlosti rozvoje HD.

Proto byly v posledních letech vytvořeny velké zvířecí modely HD, které lépe reflektují patologii HD u člověka, a umožňují tak snazší přenos získaných výsledků preklinické testování potenciální terapie. Mezi tyto modelové organismy patří zejména makak rhesus<sup>281</sup>, ovce<sup>282</sup> či miniprase<sup>283</sup>. Model transgenního miniprasete s HD byl vytvořen na našem pracovišti a je předmětem mnoha výzkumných projektů, včetně testování terapie zaměřené na snižování hladiny mHTT.<sup>284,285</sup> Pro sledování vlivu mHTT na molekulární úrovni se také používají *in vitro* modely odvozené z buněk izolovaných z pacientů či zvířecích modelů HD.

Nejprve jsme se zaměřili na proteiny, u kterých byla pomocí proteomických metod detekována změna jejich hladiny v důsledku rozvoje fenotypu HD, a tato změna byla také potvrzena nezávislou metodou na úrovni proteinu (ELISA, imunoblot nebo imunocytochemie) či mRNA (sekvenace RNA, RNA čipy nebo RT-qPCR), případně byla pozorovaná změna validována na jiné sadě vzorků. V rámci 22 proteomických studií HD bylo takto identifikováno a ověřeno celkem 69 proteinů, z toho u 24 proteinů dochází k nárůstu hladiny, u 43 proteinů naopak k poklesu hladiny a u dvou proteinů byl pozorován nárůst i pokles hladiny v závislosti na analyzovaném modelu HD. Mezi identifikovanými proteiny byly například známé markery

radiálních glií a astrocytů – GFAP (nárůst hladiny), GLUL (pokles hladiny) a VIM (nárůst i pokles hladiny), proteiny zapojené do zvládnání oxidačního stresu – Peroxiredoxin-1/2/3/5/6 a Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (nárůst hladiny), proteiny spojené se skládáním proteinů – Clusterin (nárůst hladiny), Alpha-crystallin B chain a Endoplasmic reticulum chaperone BiP (pokles hladiny) nebo proteiny buněčného metabolismu – Serine/threonine-protein kinase mTOR a Pyruvate kinase PKM (nárůst hladiny), či Fatty acid synthase a Gamma-enolase (pokles hladiny).<sup>11</sup>

Dále jsme provedli analýzu proteomických dat publikovaných v 38 studiích vzorků tkání a tělních tekutin (krevní plazma, kůže, mozek, mozkomíšní mok, svalstvo a tuková tkáň) získaných od pacientů a zvířecích modelů HD s cílem nalézt proteiny sdílené mezi jednotlivými studiemi. Celkem jsme identifikovali 39 takovýchto proteinů, z toho u 32 proteinů jejich hladina stoupala a u sedmi proteinů naopak klesala. Podobně jako v předchozí analýze byla zaznamenána zvýšená hladina proteinů spojených se zvládnáním oxidačního stresu – Peroxiredoxin-1/-2/-6, a také proteinů spojených se skládáním proteinů – Clusterin (CLU) a Alpha-crystallin B chain. Ve shodě s předchozí analýzou je rovněž detekce zvýšené hladiny GFAP popsána u všech čtyř studií zaměřených na analýzu proteomu mozku s HD.<sup>11</sup>

## Diskuze

NSC a jejich diferenciaci do neuronů a gliových buněk jsou nepostradatelné pro embryonální vývoj CNS a zajištění všech jejích fyziologických funkcí i po narození a v dospělosti. Pochopení biologických procesů stojících v pozadí proliferace a diferenciaci NSC je nejen cílem základního neurobiologického výzkumu, ale také možnou cestou k účinné terapii neurologických onemocnění. Tato onemocnění, včetně neurodegenerativních chorob, při kterých dochází k odumírání nervových buněk, negativně ovlivňují život přibližně jedné třetiny světové populace a toto číslo bude v příštích letech dále narůstat.<sup>2,3</sup> Představují proto zásadní zdravotní, ekonomický a sociální problém. Jednou z možností léčby neurodegenerativních onemocnění je buněčná terapie, při které jsou do CNS transplantovány buňky, obvykle NSC. Transplantované buňky sekrecí proteinů modulují imunitní odpověď a stimulují přežívání či dělení buněk v místě poškození, případně samy diferencují a funkčně nahrazují odumřelé buňky.<sup>4,5</sup> Obnovení všech funkcí CNS je však u neurodegenerace zatím nedosažitelným cílem buněčné terapie.

Podle databáze PubMed bylo v letech 2013–2023 publikováno 4 960 publikací, včetně 53 klinických studií, zaměřených na transplantace nervových kmenových buněk, což je o 1/3 publikací a 200 % klinických studií více oproti letům 2002–2012. Jak je patrné z tohoto výrazného nárůstu, v uplynulé dekádě se buněčná terapie pomocí NSC dostala do středu zájmu mnoha výzkumných institucí. NSC pro transplantaci mohou být získány izolací přímo z CNS, diferenciací z ESC, iPSC či mezenchymových kmenových buněk (MSC, z angl. mesenchymal stem cells), případně transdiferenciací somatických buněk (např. fibroblastů).<sup>286,287</sup>

S ohledem na fetální původ s sebou nese použití ESC k diferenciaci do NSC významné etické problémy a zákonná omezení, což dále snižuje dostupnost zdroje ESC.<sup>288</sup> Použití NSC diferencovaných z ESC pro transplantaci terapii by navíc vyžadovalo imunitní kompatibilitu mezi dárcem a příjemcem, včetně stejného pohlaví, případně imunosupresivní terapii nebo genetické modifikace bránící odhojení vnesených buněk.<sup>289–291</sup> V případě iPSC odpadají etické problémy a díky možnosti použití somatických buněk od příjemce léčby nehrozí ani imunitní reakce.<sup>292</sup> Nevýhodou iPSC při porovnání s ESC je nutnost reprogramování somatických buněk, jehož účinnost závisí na použitém protokolu a původu buněk, a nemůže zcela odstranit epigenetické změny z původních somatických buněk.<sup>293</sup> Protože je příprava iPSC časově náročná (vytvoření iPSC linie trvá ~3 měsíce), diferenciaci NSC z iPSC není vhodným řešením pro akutní léčbu, např. mozkomíšního poranění.<sup>294</sup> Možnost diferenciaci MSC do NSC je zatím málo prozkoumána, existují však obavy o bezpečnost takovéto metody z důvodu možné

diferenciace MSC do buněk mesodermu.<sup>287</sup> Vnesení nediferencovaných ESC nebo iPSC je z důvodu značného rizika vzniku nádoru (teratomu) vyloučené, přičemž iPSC mají vyšší schopnost nádorové transformace než ESC.<sup>295</sup>

Přímá izolace NSC z CNS odstraňuje nutnost jejich diferenciace z ESC, iPSC či MSC a některé problémy s tím spojené. Bohužel, dostupnost takto získaných NSC pro základní výzkum je omezená a v současnosti neexistuje univerzální protokol, který by zaručil izolaci těchto NSC v kvalitě vhodné pro klinické využití.<sup>286</sup>

Transdiferenciace somatických buněk do NSC je rychlejší než jejich diferenciace z ESC nebo iPSC a nevyžaduje reprogramování do stavu pluripotence, což snižuje některá bezpečnostní rizika. Přítomnost buněk, které nejsou (plně) transdiferencované, nebo nezamýšlené genomové změny způsobené použitým protokolem, by však mohly vést k nechtěné proliferaci či diferenciaci buněk po transplantaci.<sup>287</sup> Otázkou rovněž zůstává, jaký vliv na transdiferenciaci má epigenetické pozadí původních buněk, což je riziko popsané u iPSC. Na základě výše uvedených vlastností jednotlivých zdrojů NSC jsme se rozhodli použít jako modelový systém komerčně dostupné NSC odvozené z linie ESC H9.

Lidská buněčná linie ESC H9 (46, XX) je schopná neomezené proliferace a v *in vitro* podmínkách může diferencovat do všech tří zárodečných vrstev, případně i trofoblastu.<sup>16</sup> Tato linie je schválená americkou vládní agenturou NIH (angl. National Institutes of Health Human Embryonic Stem Cell Registry) a na její výzkum lze získat finanční podporu od NIH. Také proto je linie H9 spolu s linií H1 nejčastěji používanou linií lidských ESC.<sup>296</sup> V nedávné době bylo publikováno mnoho protokolů popisujících neurální diferenciaci linie ESC H9 či z nich odvozených NSC, např. do buněk neuroektodermu<sup>297</sup>, NSC míchy<sup>298</sup>, astrocytů<sup>299</sup>, populace neuronů a astrocytů<sup>300</sup>, dopaminergních neuronů<sup>301,302</sup>, motorických neuronů<sup>303</sup>, neuronů sympatiku<sup>304,305</sup>, středních ostnatých neuronů<sup>306</sup>, nebo mozkových organoidů rekapitulujících vývoj mozku<sup>307,308</sup>.

NSC odvozené z linie ESC H9 byly využity pro řadu studií, například vlivu mikroRNA na neurální diferenciaci<sup>309</sup>, role gliomových kmenových buněk v glioblastomu<sup>310</sup>, srovnání regulace buněčných procesů odpovědi na poškození DNA, opravy DNA a buněčné smrti u zvířecích modelů a člověka<sup>311</sup>, testování materiálu pro tkáňové inženýrství při míšním poškození<sup>312</sup> nebo vlivu pohlaví na NSC a jejich diferenciaci<sup>313</sup>. Buňky linie ESC H9 byly také použity k vytvoření modelu HD, kdy jim pomocí genetických modifikací byly uměle přidány různé počty CAG repetice v genu *HTT*, což umožnilo sledovat vliv délky CAG repetice na diferenciaci těchto HD ESC do neuronů, buněk kosterního svalstva nebo hepatocytů.<sup>314</sup> Naše pracoviště se podílelo na vývoji protokolu pro izolaci NSC z linie ESC H9 v kvalitě

vhodné pro klinické využití, včetně buněčné terapie.<sup>315</sup> Výsledky této disertační práce pomáhají lépe pochopit a podrobně popsat mechanismy diferenciaci H9 NSC na úrovni proteinů a ukazují ověřenou metodiku, která posouvá tyto buňky ještě blíže ke klinickému testování.

NSC odvozené z linie ESC H9 jsme kultivovali v přítomnosti růstových faktorů EGF a FGF-2. Sledovali jsme jejich diferenciaci v *in vitro* podmínkách, která probíhala bez EGF a FGF-2 spontánně (S diferenciaci), případně jsme tuto spontánní diferenciaci podpořili neurotrofickým faktorem BDNF, GDNF či jejich kombinací (B, G a BG diferenciaci), nebo jsme přidáním FBS stimulovali NSC k diferenciaci do astrocytů (Astro1). EGF a FGF-2 jsou klíčové pro proliferaci a udržování multipotence NSC. Odebrání těchto faktorů vede ke spontánní diferenciaci NSC do neuronů a gliových buněk.<sup>72,124,316</sup> BDNF podporuje přežívání a neuronální diferenciaci buněk odvozených z neurální lišty<sup>317</sup>, stimuluje neurální diferenciaci MSC do buněk podobných neuronům a podporuje jejich přežívání<sup>318</sup>, indukuje neuronální diferenciaci u NSC *in vitro*<sup>319,320</sup> a *in vivo* v dospělém mozku, včetně zrání neuronů<sup>321</sup> a stimuluje růst axonu<sup>322</sup>. Přidání BDNF k NSC před jejich transplantací do myšího modelu mozkové mrtvice zvyšuje přežívání vnesených buněk a účinnost terapie.<sup>323</sup> GDNF inhibuje apoptózu v průběhu NSC diferenciaci<sup>324</sup> a stimuluje jejich neuronální diferenciaci *in vitro*<sup>325</sup> a *in vivo*<sup>326</sup>. Přidání GDNF k NSC před transplantací do zvířecího modelu potkana s Parkinsonovou chorobou inhibuje apoptózu a stimuluje přežívání vnesených buněk.<sup>327</sup> Geneticky modifikované NSC stabilně produkující GDNF byly úspěšně transplantovány pacientům s ALS v rámci první fáze klinické studie, kdy následně diferencovaly do astrocytů.<sup>328</sup>

Pomocí kvantitativní analýzy proteinů založené na měření MS (SRM, SWATH-MS) jsme usilovali o ověření hypotézy, že NSC v přítomnosti BDNF a/nebo GDNF budou preferenčně diferencovat do neuronů a jejich přežívání bude zvýšené oproti S diferenciaci. Pro charakterizaci NSC a jejich diferenciaci jsme využili i další metody, jako je kvantitativní analýza pro sledování změn genové exprese na úrovni mRNA (RT-qPCR) nebo semi-quantitativní a kvalitativní analýzy proteinů (imunoblot a imunocytochemie). Kombinace těchto přístupů umožnila prokázat, že NSC diferencují bez EGF a FGF-2 preferenčně do neuronů, což je již od 3. dne diferenciaci možné spolehlivě a přesně monitorovat pomocí metody SRM na základě hladin proteinových markerů jednotlivých buněčných typů. Přestože S diferenciaci i BG diferenciaci vedou k obdobným změnám sledovaných markerů, zjistili jsme, že navzdory očekávanému posílení neuronální diferenciaci po přidání BDNF a GDNF<sup>319,320,325</sup> dochází v časně fázi diferenciaci k vyšší expresi *NES* (marker NSC), která

podle imunoblotu koreluje s vyšší hladinou proteinu NES. Exprese *DCX* (marker neuronálních prekurzorů) je naopak nižší a podle SRM koreluje v pozdější fázi diferenciaci s nižší hladinou proteinu *DCX*. Je možné, že BDNF a GDNF podporou přežívání a sebeobnovy NSC zpomalují jejich diferenciaci. Očekávané indukci neuronální diferenciaci neodpovídá ani nárůst hladiny GFAP u BG diferenciaci. Ačkoliv je v pozdější fázi diferenciaci patrný pokles signálu markerů NSC, i 28. den diferenciaci je mnoho buněk pozitivních na NES a některé na SOX2, bez ohledu na přidání BDNF a GDNF. Patrná je u S diferenciaci i BG diferenciaci přetrvávající pozitivita části buněk na S100B a pokles pozitivitu buněk na OLIG1 a GALC. S diferenciaci ani BG diferenciaci nevede k detekci markeru pluripotence OCT4, který se ale objevuje u buněk stimulovaných pomocí FBS. Tato modulace v případě H9 NSC nediferencuje buňky do astrocytů, silnější se jeví účinek odebrání EGF a FGF-2, který buňky směřuje do neuronů. FBS s velkou pravděpodobností způsobuje částečnou dediferenciaci H9 NSC.

Imunocytochemie poskytla zásadní informace o heterogenitě buněčné populace v průběhu diferenciaci NSC, kdy část buněk je již do určité míry diferencována, ale část buněk stále exprimuje markery NSC nebo diferencuje do glií. Tyto výsledky není možné získat analýzou na úrovni celkové mRNA nebo proteinů. Pro takovéto rozlišení bychom museli využít některou z analýz na úrovni jednotlivých buněk (angl. single-cell analysis), např. průtokovou cytometrii, single-cell RNA sekvenování nebo single-cell MS. V této práci jsme ověřili, že bez ohledu na určitou heterogenitu buněčné populace je možné pomocí cíleného měření proteinů metodou SRM rychle a reprodukovatelně charakterizovat NSC v průběhu jejich diferenciaci. Naše metoda pokrývá 10 validovaných buněčných markerů používaných pro identifikaci ESC, NSC, astrocytů, neuronů a oligodendrocytů, a poskytuje dostatek prostoru pro navýšení počtu sledovaných relevantních markerů, které však vyžadují validaci obdobným způsobem.

Příkladem rozšíření metody SRM je měření vhodnějších peptidů proteinového markeru proliferace MKI67, které se podařilo najít díky měření SWATH-MS. Je velmi pravděpodobné, že při výběru vhodnějších peptidů a další optimalizaci metody SRM, například hodnot deklustračního potenciálu (DP, z angl. declustering potential), vstupního potenciálu (EP, z angl. entrance potential), kolizní energie atd. bude možné dosáhnout úspěšnější detekce a možné kvantifikace MKI67, který se i v měření SWATH-MS pohyboval blízko limitu detekce. Jeden z peptidů MKI67 nedetekovaných pomocí metody SRM je podle SWATH-MS součástí většího peptidu s opomenutým štěpným místem pro trypsin, zatímco kompletně štěpený peptid nebyl vůbec detekován. Takovéto informace nemohly být získány metodou SRM, která analyzuje pouze předem definované peptidy. Výhodou cíleného měření metodou SRM je ale vyšší citlivost, což umožnilo detekci proteinů GALC, OLIG1 a S100B, které nebylo možné v datech



SWATH-MS nalézt. GFAP je pak možné kvantifikovat pouze v referenční linii astrocytů (Astro2). Tyto výsledky ukazují na možnost využití připravené spektrální knihovny a dat z měření SWATH-MS pro výběr vhodných peptidů k analýze pomocí metody SRM či PRM a také k využití těchto dat pro predikci retenčního času. Všechna naše data jsou dostupná v rámci repozitáře proteomických dat.

Metoda SRM umožnila zaznamenat výrazný pokles hladiny všech sledovaných markerů 1. den BG diferenciaci. Usuzujeme, že tento negativní vliv na buněčnou proteostázi není ještě způsoben přechodem z proliferace NSC ke spontánní diferenciaci, ale je důsledkem výměny média (např. mechanický stres). Ke skutečnému začátku diferenciaci NSC dochází podle hladiny sledovaných markerů mezi 3. a 4. dnem po odebrání EGF a FGF-2. Trendy změn pokračují i v další fázi diferenciaci, kdy dochází zejména k nárůstu a stabilizaci hladin markerů neuronů a jejich prekurzorů. Významná je negativní korelace mezi SOX2 (marker NSC) a DCX (marker neuronálních prekurzorů). Transkripční faktor SOX2 podporuje sebeobnovu NSC a brání jejich diferenciaci.<sup>29</sup> Mohl by tedy přímo ovlivňovat množství DCX v buňce regulací přepisu *DCX*. Deplece SOX2 v myších ESC vede k významnému snížení exprese *DCX*<sup>329</sup>, v případě lidských ESC se snížená exprese *DCX* při depleci SOX2 nepotvrdila, ale nárůst DCX byl pozorován při depleci OCT4<sup>330</sup>. V NSC se zvýšenou expresí *SOX2* nebyla pozorována změna exprese *DCX*.<sup>29</sup> Na myším modelu však bylo prokázáno, že uměle navozená exprese *SOX2* v gliových buňkách v oblasti poranění mozku vede k diferenciaci do neuronů pozitivních na DCX.<sup>331</sup> Zdá se tedy, že hladina SOX2 opravdu ovlivňuje hladinu DCX, ale výsledný efekt je závislý i na dalších faktorech.

Výsledky analýzy hladin neurálních markerů na proteinové úrovni získané metodou SRM jsou ve shodě s výsledky imunoblotu, imunocytochemie a měření SWATH-MS. Pozitivní korelaci mezi hladinou proteinu (SRM) a jeho mRNA (RT-qPCR) jsme pozorovali u čtyř z devíti sledovaných markerů, což je v souladu s popsanou nízkou mírou korelace (~40 %) mezi hladinou mRNA a proteinu<sup>229</sup>. Fathi a kolektiv analyzovali genovou expresi a změny na úrovni proteomu v průběhu *in vitro* diferenciaci ESC do NSC a poté do neuronů, a pozorovali pokles korelace mezi hladinou mRNA a jejího proteinu z 51 % ve stádiu NSC na 30 % u neuronů.<sup>332</sup> Podobně byla omezená míra pozitivní korelace mezi mRNA a jejím proteinem popsána při *in vitro* diferenciaci ESC v embryoidních tělíčkách<sup>333</sup> a u NSC diferencovaných z HD ESC<sup>314</sup>. V našich výsledcích byla pozitivní korelace patrná u neuronálních markerů a S100B, zatímco negativní korelace byla u markerů NSC. Je možné, že neuronální diferenciaci je regulována obdobně na úrovni mRNA i proteinů, ale regulace sebeobnovy (udržování multipotence) NSC

se na úrovni mRNA a proteinů liší. Výsledky mohou být ovlivněny také rozdílnou normalizací dat mezi oběma metodami.

Zásadním faktorem ovlivňujícím kvantitativní analýzy je normalizace dat, jejímž cílem je odstranit variabilitu dat, která není biologickou vlastností vzorků, ale vznikla během jejich přípravy nebo analýzy.<sup>334</sup> Normalizace dat mezi vzorky byla u RT-qPCR provedena na základě hladin předem zvolených normalizátorů (endogenní kontroly, angl. housekeeping genes/proteins). Obvykle jsou využívány proteiny cytoskeletu a enzymy spojené s glykolýzou<sup>335</sup>, avšak při diferenciaci NSC dochází k významným změnám morfologie a metabolismu buněk, které ovlivňují výpočetní hodnotu takovýchto normalizátorů. Pro normalizaci jsme použili expresi genů *GAPDH* (kóduje cytosolický enzym glykolýzy) a *ATP5F1B* (kóduje podjednotku mitochondriální ATP syntázy). V průběhu diferenciaci NSC byl však již dříve popsán přechod z oxidativní glykolýzy na oxidativní fosforylaci, který je nezbytný pro neuronální diferenciaci. V časně fázi diferenciaci NSC do neuronů tak dochází k výraznému poklesu exprese *GAPDH* na úrovni hladiny mRNA i proteinu, zatímco v pozdějších fázích se již jeho hladina výrazně nemění. Naopak u genu *ATP5F1B* byl po mírném poklesu v počáteční fázi diferenciaci pozorován nárůst jeho exprese.<sup>108</sup> Je proto možné, že hladina mRNA odpovídá reálnému stavu až po zahájení diferenciaci (dny 7–28). Podobná otázka vyvstává u semi-kvantitativního imunoblotu, kde se pro relativní kontrolu proteinové nanášky používají proteiny GAPDH a ATP5F1A, které jsme také použili v naší studii.

V případě analýzy kondicionovaných médií pomocí metody xMAP se nabízela možnost normalizace na množství celkového proteinu v buněčných extraktech. Vzhledem k pokračující proliferaci v časně fázi diferenciaci a velkým rozdílům v množství buněk/proteinů mezi jednotlivými intervaly diferenciaci (přibližně 6× vyšší koncentrace proteinů v diferencujících buňkách oproti NSC) tak zůstává otázka, jak tato normalizace ovlivnila výslednou kvantifikaci, a zda nemohly být hodnoty v NSC nadhodnoceny. S jistotou lze však konstatovat, že nárůst hladin VEGF a IL-6 v průběhu diferenciaci překonal možný vliv normalizace a umožnil identifikovat významný vliv VEGF.

Data z měření metodou SRM nebylo nutné ani vhodné normalizovat, protože globální normalizace v případě sledování menšího množství proteinů s očekávanou významnou jednostrannou změnou by způsobila arteficiální odchylky. Nevýhody využití normalizace podle vybraných metabolických nebo cytoskeletálních proteinů pro sledování diferenciaci NSC byly popsány výše. Vše tedy bylo normalizováno na úrovni vzorků (stejně vstupní množství proteinů, paralelní příprava vzorků apod.). Navzdory rostoucímu počtu buněk během BG diferenciaci a zvyšujícímu se množství proteinů ve vzorku jsme v případě SRM nezaznamenali

pokles všech analytů v časné fázi diferenciaci, který jsme pozorovali při analýze sekretomu. To mohlo být způsobeno řádově vyšším množstvím proteinů, které se nachází v buňce oproti proteinům, které jsou buňkami sekretovány.

Pro normalizaci dat z měření DDA a DIA se využívají globální metody normalizace.<sup>336</sup> Obvykle používaná mediánová normalizace vyrovná hladiny jednotlivých proteinů mezi vzorky na základě sjednocení mediánů. V průběhu NSC diferenciaci však dochází ke změnám hladin většiny kvantifikovatelných proteinů, a proto nebylo možné tuto metodu aplikovat, neboť vedla k podhodnocení pozorovaných biologických rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Zatímco data z měření SRM bylo z důvodu malého počtu měřených analytů nejvhodnější prezentovat bez normalizace, data z měření SWATH-MS jsme normalizovali na základě poměru mediánu intenzity celkového signálu TIC všech měření děleného mediánem intenzity signálu TIC daného měření. Tato normalizační metoda nám umožnila realistické srovnání všech analyzovaných vzorků.

Naši metodu SRM jsme úspěšně validovali s využitím referenčních ESC a astrocytů při charakterizaci NSC diferenciaci. Všechny testované diferenciací protokoly (S, B, G, BG a Astro1) vedly k preferenční diferenciaci do neuronů. DCX byl detekovatelný také v ESC, ale ne v NSC, což je v souladu s expresí *DCX* zaznamenanou v ESC, včetně linie H9.<sup>337</sup> Zjistili jsme, že i když NES a TBB3 mají omezenou specifitu k nervové línii, v kombinaci s dalšími markery spolehlivě informují o diferenciacím stavu NSC. Přestože TUBB3 byl dlouho považován za specifický marker neuronů<sup>93</sup>, v průběhu vývoje mozkové kůry se jeho hladina a lokalizace mezi různými druhy neuronů liší a byl detekován také v NSC, ne však v gliových buňkách<sup>338</sup>. To je v souladu s našimi výsledky, že TUBB3 není specifickým markerem neuronů.

Nebylo možné potvrdit ani specifitu S100B čistě pro populaci referenčních astrocytů, které ale specificky produkují GFAP, jež byl v malé míře detekován také při BG diferenciaci. GFAP je produkován v radiálních gliích<sup>47</sup>, poté jeho hladina klesá a znovu se zvyšuje až během zrání astrocytů, spolu s nárůstem hladiny S100B<sup>96</sup>. V průběhu lidského embryonálního vývoje mozkové kůry (11. gestační týden) jsou přítomny buňky pozitivní na S100B, ale ještě ne zralé astrocyty (absence buněk pozitivních na GFAP).<sup>44</sup> V NSC dospělého mozku je exprese S100B blokována a přechod těchto NSC od proliferace k diferenciaci je spojen s nárůstem hladiny S100B.<sup>339</sup> Řada studií ukázala, že S100B je produkován také ependymovými buňkami, neurony a oligodendrocyty.<sup>340–342</sup> S ohledem na námi pozorovanou preferenční diferenciaci NSC do neuronů, korelaci hladiny S100B s TUBB3 během BG diferenciaci a rovněž minimální změny

hladin markerů oligodendrocytů, je pravděpodobné, že S100B byl produkován buňkami diferencujícími do neuronů.

Absence GFAP v buňkách při S, B, a G diferenciaci neznamená, že neprobíhá diferenciaci do astrocytů. Experimenty s NSC odvozenými z lidských ESC (včetně linie H9) ukázaly, že i po šesti týdnech diferenciaci do astrocytů indukované 10% FBS byly jen vzácně přítomny buňky pozitivní na GFAP. Po transplantaci do experimentálního zvířecího modelu potkana s ALS ale došlo během 2–6 měsíců k jejich diferenciaci do astrocytů.<sup>315</sup> Podobně u mozkových organoidů odvozených z iPSC byla hladina GFAP detekovatelná na proteinové úrovni až 76. den kultivace a dále rostla v průběhu kultivace až do 160. dne.<sup>343</sup> Alisch a kolektiv provedli studii vlivu předchozích pasáží NSC odvozených z linie ESC H9 na diferenciaci do astrocytů a pozorovali významnou pozitivní korelaci mezi počtem pasáží NSC a expresí markerů astrocytů. Zjistili, že vyšší počty pasáží NSC (10 a více) vedou k poklesu exprese *NES*, *SOX2* a *MKI67* a naopak k nárůstu exprese *GFAP* a *S100B*. Vyšší počet pasáží také významně zkracoval dobu diferenciaci (ze 70 na 28 dní) a zvyšoval počet buněk pozitivních na GFAP. Za zvýšenou diferenciací astrocytů mohou podle autorů stát pozorované změny v expresi receptorů pro EGF a FGF-2.<sup>299</sup> Alisch a kolektiv však ve své studii neuvedli, jak často bylo vyměňováno kultivační médium s EGF a FGF-2. S ohledem na popsanou nestabilitu FGF-2 a s ní spojené výkyvy jeho hladiny<sup>126</sup> je možné, že pozorované změny byly ovlivněny také postupnou spontánní diferenciací kultivovaných NSC. Omezená míra diferenciaci NSC do astrocytů pozorovaná v našich experimentech může souviset s používáním nízkých pasáží NSC.

Hladiny markerů NSC monitorované metodou SRM v průběhu diferenciaci mírně klesly, nedošlo však k jejich úplné depleci. Tyto výsledky mohou být důsledkem heterogenity buněčné populace v průběhu diferenciaci, kterou jsme pozorovali na úrovni jednotlivých buněk pomocí fluorescenční mikroskopie (malé procento buněk s vysokou hladinou NES či SOX2 ovlivní kvantifikaci těchto markerů v celé populaci buněk). Liu a kolektiv sledovali přítomnost NES a TUBB3 u NSC odvozených z linie ESC H9 v průběhu jejich neuronální diferenciaci. Zatímco NSC pozitivní na TUBB3 byly detekovány jen vzácně, NES byl produkován všemi NSC, avšak jeho hladina s diferenciací klesala, a naopak hladina TUBB3 rostla. U diferencujících buněk a neuronů NES a TUBB3 kolokalizovaly do oblasti výběžků a oproti TUBB3 nebyl NES prakticky detekovatelný v oblasti soma neuronu. NES spolu s TUBB3 tedy zřejmě hrají roli při tvorbě buněčných výběžků u neuronálních prekurzorových buněk a neuronů.<sup>344</sup> Tyto výsledky jsou v souladu s námi pozorovanou lokalizací NES v diferencujících buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie.

Studie z posledních let dále ukázaly, že NES je zapojen do řady buněčných procesů nejen v NSC (obvykle je produkován aktivně se dělícími buňkami), ale rovněž v časných i zralých neuronech. NES slouží jako proteinové lešení pro další proteiny, a reguluje tak například buněčný cyklus a dělení, organizaci mitochondrií, růst a cílení axonů pro tvorbu synapsí a rovněž chrání buňky před oxidačním stresem a inhibuje apoptózu (shrnutí v <sup>345</sup>). Jeho přítomnost v diferencujících buňkách tedy může být fyziologická, ne důsledkem heterogenní diferenciace. Kvůli své nízké specifitě však NES není vhodným samostatným markerem NSC a pro spolehlivou identifikaci NSC by měl být kombinován s dalšími markery.

Oproti tomu hladina SOX2 v průběhu diferenciace mírně klesala a imunofluorescenční mikroskopie potvrdila pouze sporadickou přítomnost buněk pozitivních na SOX2. Zatímco marker pluripotence OCT4 byl kvantifikovatelný u obou linií ESC, SOX2 byl v ESC pouze detekovatelný (jen jeden peptid byl měřitelný metodou SRM v těchto vzorcích), což nemusí znamenat nízkou hladinu SOX2 v ESC, ale také nižší ionizovatelnost dostupných tryptických peptidů SOX2. Tento marker byl sledován na základě dvou peptidů a pokud by byl SOX2 v ESC posttranslačně modifikován v oblasti sledovaného peptidu, nemohl by být peptid s PTM detekován metodou SRM kvůli změně jeho *m/z*. Pro tento protein by tak bylo vhodné přidat další peptidy, například na základě měření SWATH-MS. Transkripční faktory OCT4 a SOX2 regulují mimo jiné expresi genů pluripotence – *NANOG*, *OCT4* a *SOX2*, a právě SOX2 je nezbytný pro udržování hladiny OCT4 v ESC.<sup>329</sup>

Překvapivá byla přítomnost markeru oligodendrocytů GALC v ESC. GALC je lysosomální enzym zajišťující katabolismus galactosylceramidu, který je hlavní lipidickou složkou myelinu, ale je zastoupen i v jiných tkáních.<sup>346</sup> Studie diferenciace lidských ESC (včetně linie H9) a iPSC do hepatocytů ukázala, že GALC je produkován i v ESC a iPSC a s diferenciací jeho exprese dále roste.<sup>337</sup> GALC a jeho úloha v metabolismu lipidů je rovněž zásadní pro funkci a přežívání hematopoetických kmenových buněk.<sup>347</sup> Tyto výsledky naznačují, že GALC hraje roli v udržování diferenciačního potenciálu kmenových buněk. Mimo ESC byly proteiny OCT4 a GALC detekovatelné, respektive kvantifikovatelné, také v NSC diferencovaných do astrocytů v přítomnosti FBS (Astro1). Buňky po Astro1 diferenciaci měly rovněž kvantifikovatelné hladiny markerů NSC, neuronů a S100B. Zdá se tedy, že přítomnost FBS, přinejmenším u části takto diferencovaných buněk, podporuje udržování diferenciačního potenciálu, případně vede k částečné dediferenciaci.

Další neočekávané zjištění bylo, že BG diferenciace poskytuje buněčné populace, které mají v případě markerů NES, SOX2, MAP2, TUBB3 a S100B nejvyšší pozorovanou variabilitu ze všech testovaných diferenciací, včetně Astro1. Hladiny DCX, TUBB3 a S100B jsou navíc

u BG diferenciaci nižší než u S, B a G diferenciaci. Protože samotné BDNF nebo GDNF stimuluje neuronální diferenciaci obdobně jako S diferenciaci (srovnatelné hladiny neuronálních markerů a S100B), rozdíl je pravděpodobně způsoben kombinací BDNF a GDNF. BG diferenciaci navíc jako jediná vedla k produkci GFAP v detekovatelném množství. De Leeuw a kolektiv studovali diferenciaci NSC odvozených z linie ESC H9 v přítomnosti BDNF a GDNF a po 28 dnech pozorovali malý počet buněk pozitivních na GFAP.<sup>300</sup> Geneticky modifikované NSC se stabilní expresí *GDNF* diferencují ve vyšší míře do astrocytů *in vivo*.<sup>328</sup> Je tedy možné, že vyšší variabilita hladin sledovaných markerů u BG diferenciaci je způsobena diferenciací části NSC do astrocytů vlivem GDNF. Není však jasné, proč jsme podobný efekt nepozorovali také v případě G diferenciaci.

Prokázali jsme, že námi vyvinutá metoda SRM je vhodná pro rychlou a citlivou charakterizaci buněčné populace, například při testování vlivu různých diferenciacních protokolů. Velkou výhodou měření SRM oproti SWATH-MS je jednodušší a rychlejší analýza a interpretace dat, protože jsou sledovány jen předem zvolené proteiny. To mluví ve prospěch využití metody SRM pro rutinní analýzy sloužící k charakterizaci buněk. Pro (pre)klinické využití této metody bude nutné optimalizovat způsob normalizace dat. Rovněž by bylo výhodné zajistit další pozitivní kontroly (referenční buněčné populace) pro proteiny, jejichž hladina byla v našich experimentech pod limitem detekce. Dostupnost referenčních buněk je však omezená, protože neurony a oligodendrocyty jsou nedělicí se buňky a lidská mozková tkáň pro přímou izolaci a analýzu buněk je pro základní výzkum obtížně dosažitelná. V současné době pracujeme na rozšíření naší metody SRM o další markery jednotlivých buněčných typů CNS, a také o markery vybraných buněčných procesů, např. apoptózy, buněčného cyklu a buněčné odpovědi na stres, abychom kromě charakterizace diferenciaci získali také informaci o stavu analyzované buněčné populace.

Pro komplexní analýzu buněčného proteomu v průběhu diferenciaci NSC jsme použili metodu SWATH-MS. Provedli jsme optimalizaci celého postupu od přípravy a měření vzorků metodami DDA a DIA, přes přípravu specifické spektrální knihovny s využitím DDA dat a analýzu měření DIA po statistické vyhodnocení získaných dat. Tento postup jsme publikovali jako podrobný protokol.<sup>9</sup> Díky analýze SWATH-MS jsme potvrdili, že zásadní změny proteomu probíhají již v rané fázi diferenciaci NSC. Prokázali jsme, že diferenciaci NSC je odpovědí na odebrání růstových faktorů EGF a FGF-2 a v souladu s očekávanou funkcí BDNF a GDNF v podobě stimulace neuronální diferenciaci a přežívání buněk<sup>317,319,320,323,325,327</sup> se vliv těchto faktorů projevuje až v pozdější fázi diferenciaci.

Použití specifické spektrální knihovny připravené měřením DDA stejných vzorků, které jsou následně analyzovány pomocí DIA, snižuje možnost falešně pozitivní identifikace a kvantifikace proteinu, který ve skutečnosti ve vzorku není přítomen.<sup>348</sup> Nevýhodou tohoto typu spektrální knihovny je, že nevyužívá plný potenciál metody DIA, protože umožní jen kvantifikaci proteinů, jejichž peptidy byly detekovány a identifikovány pomocí měření DDA. V posledních letech se proto dostávají do popředí přístupy analýzy dat DIA, které využívají teoretické spektrální knihovny vytvořené *in silico*.<sup>349</sup> Námi použitá kvantifikace proteinů pouze na základě hladin unikátních (proteotypických) peptidů vede k vysoké přesnosti analýzy srovnatelné s metodou SRM. Na druhou stranu, odebráním neunikátních peptidů z analýzy dochází ke ztrátě informace o velkém množství proteinů, které spolu sdílí stejné peptidy. Proto se stále více využívají kvantitativní analýzy na úrovni proteinových skupin, kdy každá skupina obsahuje více proteinů, které jsou kvantifikovány společně na základě sdílených peptidů.<sup>349</sup> Takovéto metody v kombinaci s moderními LC-MS/MS systémy umožňují kvantifikaci >11 000 proteinů v komplexním vzorku.<sup>249</sup>

Výsledky funkční analýzy buněčných procesů regulovaných v průběhu diferenciaci NSC pomohly identifikovat signální dráhy, které hrají roli při diferenciaci NSC. V časně fázi diferenciaci jsme potvrdili pokračující buněčné dělení a zvýšenou transkripci a translaci umožňující buňkám provést zásadní změny proteomu. Utlumení těchto procesů je v souladu s pokračující diferenciací buněk, což ukázal nárůst hladin proteinů spojených s vývojem CNS, např. gliogeneze a neurogeneze.

Přestože řada studií<sup>229,332,333</sup> i naše vlastní analýzy ukázaly, že korelace mezi mRNA a proteiny není vysoká, buněčné procesy identifikované jako regulované na úrovni transkriptomu (např. metabolismus sacharidů či reorganizace cytoskeletu)<sup>105,350</sup> jsou v souladu s procesy, u kterých jsme pozorovali regulaci na úrovni proteomu. Song a kolektiv provedli charakterizaci proteomu a fosforylace proteinů lidských imortalizovaných NSC v průběhu spontánní diferenciaci *in vitro*, a zjistili, že tento proces lze podle shlukové analýzy rozdělit do tří časových intervalů – dny 0-1, dny 2-4 a dny 7-15.<sup>351</sup> Tyto výsledky jsou v souladu s našimi výsledky SRM při monitorování časně fáze BG diferenciaci a pozorovaným poklesem hladiny proteinů po výměně média (1. den BG) a při přechodu NSC z proliferace na diferenciaci (3.-4. den) a s regulací buněčných procesů pozorovanou ve výsledcích SWATH-MS. Autoři dále zaznamenali pokles hladin proteinů spojených s regulací buněčného cyklu a proliferace a naopak nárůst hladin proteinů nebo jejich fosforylace spojené s neuronální diferenciací, organizací cytoskeletu, růstem axonu, tvorbou synapsí, gliogenezí a signálními dráhami MAPK a Wnt/ $\beta$ -catenin v průběhu diferenciaci NSC.<sup>351</sup>

Měření SWATH-MS i imunoblot potvrdily pokles hladin markerů proliferace (MKI67 a PCNA) v průběhu diferenciaci, který pozitivně koreluje s pozorovaným snížením buněčného dělení. Přesto je pokles hladiny obou proteinů jen mírný a v případě PCNA jeho hladina neklesla pod úroveň dne 0. Může to být způsobeno probíhajícím asymetrickým dělením NSC. MKI67 je navíc produkován i v buňkách, které se aktivně nedělí<sup>352</sup> a hraje roli v replikaci DNA (jeho deplece vede k opožděné replikaci a poškození DNA)<sup>353</sup>, separaci chromosomů<sup>354</sup>, udržování stability genomu<sup>353,355</sup>, regulaci genové exprese organizací heterochromatinu<sup>356</sup> a u nádorových buněk pozitivně ovlivňuje expresi genů, které vedou k adaptaci buněk na změny okolního mikroprostředí<sup>357</sup>. PCNA se účastní nejen replikace DNA, ale také oprav poškozené DNA.<sup>358</sup> Nelze rovněž vyloučit, že hladiny MKI67 a PCNA se významně liší mezi jednotlivými buňkami z důvodu heterogenity populace diferencujících buněk, jak jsme pozorovali v případě markerů NSC pomocí imunofluorescenční mikroskopie.

Analýza fosforylace proteinů během dvoudenní diferenciaci NSC izolovaných z mozku embrya potkana odhalila významnou roli proteinu STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) a signální dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin v pozitivní regulaci diferenciaci NSC.<sup>359</sup> Signální dráha Wnt/ $\beta$ -catenin je jednou ze základních signálních drah regulujících sebeobnovu a diferenciaci NSC.<sup>136–138</sup> Aktivaci kanonické signální dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin jsme v naší studii pozorovali na základě setrvalého nárůstu hladiny Catenin beta-1 od 7. dne diferenciaci. Naše výsledky pozitivní korelace aktivace kanonické signální dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin s neuronální diferenciací jsou v souladu s dalšími studii diferenciaci NSC.<sup>143,359</sup> Studie provedené na nádorových tkáních potvrdily, že signální dráha Wnt stimuluje aktivaci signální dráhy HIF-1 (např. přes STAT3) bez vlivu hladiny O<sub>2</sub>, a zvyšuje tak expresi *VEGFA* (shrnutí v <sup>360</sup>).

Naše analýza SWATH-MS prokázala, že v průběhu diferenciaci NSC dochází nejen k regulaci signální dráhy Wnt, ale také HIF-1 a VEGF. Navazující experimenty pak ukázaly nejvyšší hladinu proteinu HIF1A v NSC a v časně fázi diferenciaci. Hlavní úlohou signální dráhy HIF-1 je aktivace buněčné odpovědi na hypoxii pomocí regulace genové exprese, včetně zvýšení exprese *VEGFA*.<sup>159</sup> Studie provedená na myších NSC odvozených z ESC a na myších neuroepiteliálních buňkách *in vitro* a *in vivo* ukázala, že HIF1A je nezbytný pro sebeobnovu NSC a jeho deplece vede k předčasné neuronální diferenciaci. S postupující diferenciací NSC v průběhu embryonálního vývoje hladina HIF1A klesá.<sup>361</sup> Podobně u lidských iPSC byl popsán pozitivní vliv HIF1A na sebeobnovu a udržování pluripotence. Deplece HIF1A vedla ke změnám metabolismu mitochondrií, jejich fúzování a k aktivaci signální dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin, což stimulovalo diferenciaci iPSC do NSC.<sup>362</sup> Námi pozorovaná vyšší hladina HIF1A v NSC s následným poklesem v průběhu diferenciaci odpovídá popsané funkci HIF1A v regulaci



sebeobnovy a diferenciaci NSC. S ohledem na kultivaci a diferenciaci NSC v podmínkách normoxie není pravděpodobné, že by vyšší hladina HIF1A v NSC byla způsobena hypoxií.

Validační experimenty rozšířily výsledky SWATH-MS a ukázaly, že hladina aktivované formy CASP3 je vyšší v časně fázi diferenciaci. Výraznější pokles zaznamenaný v pozdější fázi BG diferenciaci může být způsoben stimulací přežívání buněk a inhibicí apoptózy popsány dříve u BDNF a GDNF.<sup>317,318,323,324,327</sup> Rovněž může souviset se zvýšenou sekrecí VEGF-A, kterou jsme pozorovali u BG diferenciaci. Sekretované VEGF-A by mohlo inhibovat apoptózu, jak bylo popsáno v případě VEGF165 u NSC potkana v *in vitro* i *in vivo* podmínkách.<sup>177</sup> Další studie provedená na potkanech ale ukázala, že suplementace VEGF-A do dospělého mozku potkana nevede ke snížení hladiny aktivované formy CASP3 *in vivo*.<sup>176</sup>

Nárůst hladiny proteinů spojených se signální dráhou VEGF je v souladu s pozorovanou aktivací signální dráhy HIF-1 a s nárůstem hladiny sekretovaného VEGF v průběhu diferenciaci. V naší práci jsme prokázali významný nárůst koreceptoru VEGF Neuropilin-1 od 14. dne diferenciaci. Na základě identifikovaných drah spojených s proteiny dráhy VEGF<sup>165</sup> lze předpokládat, že její hlavní role v průběhu diferenciaci NSC je spojená s podporou proliferace a přežívání buněk a s reorganizací aktinového cytoskeletu vedoucí k růstu axonu. Tyto výsledky odpovídají popisu funkce VEGF-A v regulaci diferenciaci neuronů, včetně *in vitro* kultivace v podmínkách normoxie.<sup>170,171</sup>

V navazujících experimentech jsme se zaměřili na sledování hladiny VEGF v sekretomu NSC v průběhu diferenciaci. Nejen samotná náhrada poškozených buněk, ale zejména modulace mikroprostředí pomocí růstových faktorů při regeneraci poškozené tkáně je totiž považována za klíčový efekt úspěšné transplantace.<sup>4</sup> Například vnesení sekretomu NSC stimuluje proliferaci a diferenciaci NSC v dospělém mozku a pozitivně reguluje signální dráhu Wnt/ $\beta$ -catenin, což vede ke zlepšení zdravotního stavu myšího modelu Alzheimerovy choroby.<sup>363</sup> Potenciál pro terapeutické použití má sekretom nejen nervových buněk, ale také například MSC. Proteiny sekretované MSC stimulují přežívání NSC a růst axonů neuronálních buněk (zejména sekrecí BDNF).<sup>322,364</sup> Klinická studie dlouhodobé suplementace GDNF do mozku pacientů s Parkinsonovou chorobou ukázala nejen bezpečnost této terapie, ale také významné zlepšení klinického stavu pacientů.<sup>365,366</sup> Rovněž se nabízí možnost terapeutického využití extracelulárních váček (exosomů). Deng a kolektiv ukázali, že extracelulární váčky produkované NSC, astrocyty a neurony odvozenými z linie ESC H9 inhibují zánětlivou buněčnou odpověď a apoptózu buněk při ischemii.<sup>367</sup> Dosavadní studie sekretomu NSC se však

obvykle zaměřovaly na jeho aplikaci v *in vitro* a *in vivo* modelech, nikoliv na jeho charakterizaci.

V naší práci jsme analyzovali sekretom NSC odvozených z linie ESC H9 v průběhu jejich diferenciaci *in vitro*. Prokázali jsme nárůst sekrece VEGF korelující s nárůstem hladiny koreceptoru VEGF Neuropilin-1 v průběhu diferenciaci NSC. Dále jsme popsali nárůst sekrece IL-6, který je nezbytný pro proliferaci (sebeobnovu) NSC v dospělém mozku myši.<sup>368</sup> V dospělém mozku potkana je IL-6 sekretován astrocyty a stimuluje neuronální diferenciaci NSC.<sup>369</sup> IL-6 rovněž sekretují oligodendrocyty připravené z imortalizovaných lidských NSC transdukci pro stálou expresi *OLIG2*, zde se IL-6 zřejmě podílí na regulaci diferenciaci a přežívání oligodendrocytů.<sup>370</sup> Tyto výsledky jsou v souladu s námi pozorovanou pozitivní korelací hladiny IL-6 s neuronální diferenciací NSC. IL-6 také reguluje pomocí proteinu STAT3 aktivitu dalších signálních drah, například HIF-1 a VEGF, včetně zvýšení exprese *VEGFA* v myších astrocytech *in vivo*.<sup>163,371,372</sup>

V současnosti je popsáno 17 isoform VEGF-A<sup>156</sup>, přičemž nejčastěji se vyskytují VEGF111, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 a VEGF206.<sup>158</sup> Proteiny VEGF189 a VEGF206 jsou pevně vázány na heparan sulfáty na povrchu buněk a v ECM, a pro jejich uvolnění do média je nutná přítomnost heparinu nebo Plasminu, zatímco VEGF165 se na heparan sulfáty váže významně méně a VEGF121 je volně difuzibilní.<sup>373,374</sup> Vzhledem k absenci heparinu a Plasminu v médiu během námi sledované diferenciaci NSC lze předpokládat, že VEGF189 a VEGF206 nemohly být metodou xMAP kvantifikovány. Proto jsme další analýzy zaměřili na VEGF121 a VEGF165. Zjistili jsme, že při pohledu pouze na hladinu VEGF121 nebo VEGF165 na imunoblotu neodpovídá jejich nárůst v buňce nárůstu sekrece VEGF-A. Pokud bychom však uvažovali VEGF121 a VEGF165 společně, rostla by hladina VEGF-A s diferenciací NSC podle očekávání. Je však možné, že hladina VEGF-A v buňce nekoreluje s hladinou sekretovaného VEGF-A. Dále jsme ukázali nárůst hladiny koreceptoru VEGF Neuropilin-1. Pan a kolektiv v *in vitro* podmínkách prokázali, že v lidských endoteliálních buňkách se na Neuropilin-1 váže i VEGF121, ale oproti VEGF165 nevytvoří komplex VEGF-A/Neuropilin-1/VEGFR2.<sup>375</sup> Zda VEGF121 interaguje s koreceptorem Neuropilin-1 v případě lidských NSC nebo neuronů není známo.

Dále jsme sledovali vliv VEGF121 a VEGF165 na proliferaci a přežívání NSC. Zjistili jsme, že přítomnost EGF a FGF-2 v médiu zcela potlačuje možný efekt suplementace pomocí VEGF121 a/nebo VEGF165. V případě S diferenciaci jsme pozorovali, že proliferaci a přežívání buněk významně stimuluje VEGF121, ne však VEGF165. To je v souladu s výsledky transplantace geneticky modifikovaných NSC se stabilní expresí *VEGF121* do

mozku potkana s mozkovou mrtvicí, která vedla k významnému zlepšení jeho zdravotního stavu.<sup>376</sup> Oproti tomu analýza imortalizovaných myších neuronů ukázala, že VEGF121 nemá vliv na jejich přežívání *in vitro*.<sup>377</sup>

Naše výsledky ukazující absenci vlivu VEGF165 na buněčnou proliferaci a přežívání NSC jsou v rozporu s řadou studií provedených na zvířecích experimentálních modelech *in vitro* a *in vivo*.<sup>177,377–379</sup> Interpretace studií suplementace VEGF165 v *in vitro* nebo *in vivo* podmínkách je však poměrně komplikovaná, protože jednotlivé studie používají nejen různé experimentální modely (různé organismy, různé buněčné typy a linie), ale také různé metody pro sledování vlivu VEGF165. Otázkou je také optimální dávka VEGF165. Zatímco *in vitro* experimenty ukázaly pozitivní korelaci mezi množstvím přidaného VEGF165 a indukcí proliferace či přežívání buněk s maximem 100 ng/ml<sup>177,378</sup>, *in vivo* experimenty ukázaly negativní vliv vysoké dávky VEGF165, vedoucí případně až k neurotoxicitě.<sup>380–382</sup> VEGF165 oproti VEGF121 není zcela difuzibilní, ale váže se na heparan sulfát<sup>373,374</sup> a přidání heparinu do média zvyšuje jeho schopnost vazby na receptory VEGF.<sup>383,384</sup> Většina studií ukazujících pozitivní vliv suplementace VEGF165 však heparin v kultivačním médiu nepoužila.<sup>377–379</sup> Nami použitá koncentrace VEGF165 (100 ng/ml) a absence heparinu v médiu by tedy neměly bránit efektu této isoformy na lidské NSC. Je také možné, že roli hrála chybějící N-glykosylace rekombinantního VEGF165, která za normálních podmínek vede ke stabilizaci jeho struktury po interakci s heparan sulfáty.<sup>385</sup> Na druhou stranu, mnoho studií ukázalo vliv rekombinantního VEGF165, který byl produkován stejným expresním systémem jako v našem případě.

Naše výsledky jsou první analýzou vlivu VEGF121 na lidské NSC a ukazují pozitivní vliv VEGF121, nikoliv VEGF165, na proliferaci a přežívání buněk při spontánní diferenciaci NSC odvozených z linie ESC H9. Další práce by se měly zaměřit na studium vlivu VEGF121 na jiné buněčné linie lidských NSC, neuronů a gliových buněk, na analýzu vlivu množství přidávaného VEGF121 a na podrobnou charakterizaci buněčných procesů regulovaných touto isoformou. Vysoká difuzibilita VEGF121 by mohla být výhodná při terapii, neboť by umožnila ovlivnit větší oblast tkáně. Tuto hypotézu by bylo vhodné ověřit s využitím zvířecích modelů.

Absence klinicky validovaných biomarkerů rozvoje HD představuje významnou komplikaci pro sledování rozvoje HD před objevením prvních příznaků. Ideální biomarker musí splňovat tři základní podmínky: jeho hladina musí spolehlivě odpovídat rozvoji choroby, musí vykazovat minimální variabilitu mezi testovanými osobami, a rovněž musí být detekovatelný ve vzorcích získaných s co nejmenší invazivitou pro testovanou osobu.<sup>386</sup> V současnosti jsou obvykle sledovány hladiny proteinů mHTT a Neurofilament light

polypeptide (NF-L).<sup>387</sup> Hladina proteinu NF-L je změněna u mnoha neurodegenerativních onemocnění, včetně ALS, Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby, ale také například v důsledku anestezie či operačního zákroku.<sup>388,389</sup> Interpretace pozorované změny hladiny NF-L bez doplňujících informací z pozorování dalších biomarkerů tak může být zavádějící. Vhodná by mohla být kombinace například s proteiny Proenkephalin-A (PENK) a Proenkephalin-B (PDYN), neboť pokles jejich hladin byl pozorován ve vzorcích mozkomíšního moku pacientů s HD.<sup>390–393</sup> PENK byl jedním z proteinů identifikovaných v naší analýze. Slibným kandidátním biomarkerem je také protein GFAP, jehož zvýšení hladiny byla nalezena v obou našich analýzách a byla již prokázána korelace hladiny GFAP se stádiem HD a s hladinou NF-L v krvi.<sup>394</sup>

Významnou limitací dosud provedených studií zaměřených na hledání biomarkerů rozvoje HD jsou relativně malé sledované skupiny pacientů či zvířecích modelů. Příkladem mohou být studie zaměřené na detekci proteinu CLU v krevní plazmě pacientů s HD v presymptomatické a symptomatické fázi. Zatímco prvotní studie ukazovala na jeho potenciál pro sledování rozvoje HD<sup>395</sup>, navazující analýza neprokázala významné změny hladiny CLU v průběhu rozvoje HD, ale ukázala na protein CRP (C-reactive protein) jako vhodný biomarker pro sledování rozvoje HD v časně fázi onemocnění.<sup>396</sup> Pozdější studie však nepotvrdila dříve pozorované změny hladiny CRP v souvislosti s rozvojem HD.<sup>397</sup> Větší experimentální skupiny by pomohly lépe analyzovat biologickou variabilitu mezi jedinci téže skupiny (zdraví, nebo nemocní), a určit tak skutečný potenciál testovaného kandidátního biomarkeru.

Námi analyzované proteomické studie se zaměřovaly zejména na vzorky pacientů a zvířecích modelů HD až po prvním projevu klinických příznaků choroby, a informace o presymptomatické fázi tak obvykle chybí. Většina studií se navíc věnovala nejvíce zasažené tkáni – mozku, a je proto otázkou, nakolik se pozorované změny proteomu v mozku projeví na proteomu tělních tekutin. Ověření nalezených kandidátních biomarkerů je klíčové nejen z hlediska jejich schopnosti charakterizovat rozvoj HD, ale také relevanci jejich detekce v krvi či mozkomíšním moku.

## Shrnutí

Hlavním cílem této disertační práce bylo zavedení přesných postupů pro analýzu diferenciaci lidských NSC v *in vitro* podmínkách na úrovni proteinů. Zvolili jsme moderní proteomické metody využívající MS (SRM a SWATH-MS), které bylo nejprve nutné optimalizovat a validovat. Podařilo se nám dosáhnout splnění těchto dílčích cílů:

- 1) Vyvinuli jsme přesnou a rychlou metodu SRM pro charakterizaci NSC v průběhu neurální diferenciaci. Na základě hladin 10 sledovaných markerů buněčných typů (ESC, NSC, astrocyty, oligodendrocyty a neurony) je tak možné sledovat diferenciační potenciál buněčné populace a využít tuto metodu pro optimalizaci diferenciačního protokolu.
- 2) Zavedli jsme postup pro analýzu proteomu NSC v průběhu diferenciaci pomocí metody SWATH-MS. Tento postup umožňuje přesnou kvantitativní analýzu proteomu NSC pomocí volně dostupných nástrojů.
- 3) Optimalizovaný postup analýzy proteomu metodou SWATH-MS jsme v kombinaci s analýzou sekretomu protilátkovou metodou xMAP aplikovali na model diferenciaci NSC. Podařilo se nám identifikovat klíčové signální dráhy regulující *in vitro* diferenciaci NSC – HIF-1, IL-6, VEGF a Wnt, které se navzájem pozitivně ovlivňují. Provedli jsme funkční studii vlivu VEGF-A na spontánní diferenciaci NSC a prokázali jsme, že VEGF121, avšak nikoliv VEGF165, stimuluje proliferaci a přežívání diferencujících buněk.
- 4) Podařilo se nám shromáždit seznam 97 proteinových markerů s velkým potenciálem najít uplatnění při monitorování rozvoje a léčby HD.

Výsledky této práce pomohly lépe pochopit molekulární mechanismy diferenciaci lidských NSC. Přinesly nové poznatky o vlivu signální dráhy VEGF na proliferaci a přežívání buněk a ukázaly příklad výhodného využití kombinace celoproteomové analýzy a cílené analýzy zaměřené na předem vybrané proteiny. Byly také vybrány zájmové proteiny pro budoucí monitorování pacientů s HD.

## Publikace a prohlášení o podílu na jejich přípravě

Předkládaná disertační práce je založena na jedné prvoautorské a jedné spoluautorské publikaci v recenzovaných časopisech indexovaných ve Web of Science s impakt faktorem a na dvou kapitolách v zahraničních knihách (jedna prvoautorská a jedna spoluautorská). U každé publikace je uveden podíl na její přípravě.

ČERVENKA, J., TYLEČKOVÁ, J., KUPCOVÁ SKALNÍKOVÁ, H., VODIČKOVÁ KEPKOVÁ, K., POLIAKH, I., VALEKOVÁ, I., PFEIFEROVÁ, L., KOLÁŘ, M., VAŠKOVIČOVÁ, M., PÁNKOVÁ, T., VODIČKA, P. Proteomic Characterization of Human Neural Stem Cells and Their Secretome During in vitro Differentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021, **14** (JAN 28), 612560. E-ISSN 1662-5102. Dostupné z: [doi: 10.3389/fncel.2020.612560](https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612560). IF<sub>2021</sub> = 6,147.

- prvoautorská publikace
- podíl na experimentální činnosti: kultivace a diferenciací buněk, analýza proteomu pomocí LC-MS, analýza sekretomu pomocí xMAP, analýza genové exprese pomocí RT-qPCR, sledování vlivu VEGF na proliferaci a přežívání buněk
- podíl na psaní publikace: sepsání a revize manuskriptu, příprava obrazové dokumentace a příloh

SUCHÁ, R., KUBÍČKOVÁ, M., ČERVENKA, J., HRUŠKA-PLOCHÁŇ, M., BOHAČIAKOVÁ, D., VODIČKOVÁ KEPKOVÁ, K., NOVÁKOVÁ, T., BUDKOVÁ, K., ŠUŠOR, A., MARŠALA, M., MOTLÍK, J., KOVÁŘOVÁ, H., VODIČKA, P. Targeted mass spectrometry for monitoring of neural differentiation. *Biology Open*. 2021, **10**(8), bio058727. ISSN 2046-6390. E-ISSN 2046-6390. Dostupné z: [doi: 10.1242/bio.058727](https://doi.org/10.1242/bio.058727). IF<sub>2021</sub> = 2,643.

- spoluautorská publikace
- podíl na experimentální činnosti: kultivace a diferenciací buněk, analýzy genové exprese pomocí RT-qPCR
- podíl na psaní publikace: účast na sepsání a revizi manuskriptu (zejména kapitola Diskuze), příprava obrazové dokumentace a příloh

TYLEČKOVÁ, J., ČERVENKA, J., POLIAKH, I., NOVÁK, J., VODIČKOVÁ KEPKOVÁ, K., KUPCOVÁ SKALNÍKOVÁ, H., VODIČKA, P. Proteomic Analysis of Human Neural Stem Cell Differentiation by SWATH-MS. In: TURKSEN, Kursad, ed. *Embryonic Stem Cell Protocols*. New York: Springer Link, 2022, s. 335-360. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-0716-2436-4. Dostupné z: [doi: 10.1007/7651\\_2022\\_462](https://doi.org/10.1007/7651_2022_462).

- spoluautorská publikace (kapitola v knize)
- podíl na experimentální činnosti: kapitola je podrobným metodickým protokolem vycházejícím z mé prvoautorské publikace
- podíl na psaní publikace: účast na sepsání a revizi manuskriptu, ověření protokolu na reálných datech, příprava obrazové dokumentace a příloh

ČERVENKA, J., BUDKOVÁ, K., SUCHÁ, R., VODIČKA, P., VOUKALI, E. Proteomics in Huntington's Disease Biomarker Discovery. In: THOMAS, E. A., PARKIN, G. M., eds. *Biomarkers for Huntington's Disease*. Cham: Springer, 2023, s. 209-247. Contemporary Clinical Neuroscience. ISBN 978-3-031-32814-5. Dostupné z: [doi: 10.1007/978-3-031-32815-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2_9).

- prvoautorská publikace (kapitola v knize)
- podíl na experimentální činnosti: kapitola je přehledová, bez experimentálních výsledků
- podíl na psaní publikace: účast na sepsání a revizi manuskriptu (zejména části zaměřené na proteomické techniky a výsledky na *in vitro* buněčných kulturách a potkanech), zkompletování informací pro validované biomarkery, příprava příloh

**Publikace, které vznikly v průběhu doktorského studia, ale nejsou zahrnuty do předkládané disertační práce:**

KUPCOVÁ SKALNÍKOVÁ, H., ČÍŽKOVÁ, J., ČERVENKA, J., VODIČKA, P. Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(12), 2697. E-ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi: 10.3390/ijms18122697](https://doi.org/10.3390/ijms18122697). IF<sub>2017</sub> = 3,687.

KONČICKÁ, M., ČERVENKA, J., JAHN, D., SUCHÁ, R., VODIČKA, P., GAD, A., ALSHEIMER, M., ŠUŠOR, A. Expression of lamin C2 in mammalian oocytes. *PLoS ONE*. 2020, **15**(4), e0229781. ISSN 1932-6203. E-ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi: 10.1371/journal.pone.0229781](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229781). IF<sub>2020</sub> = 3,240.

SZTACHO, M., ŠALOVSKÁ, B., ČERVENKA, J., BALABAN, C., HOBOTH, P., HOZÁK, P. Limited Proteolysis-Coupled Mass Spectrometry Identifies Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Effectors in Human Nuclear Proteome. *Cells*. 2021, **10**(1), 68. E-ISSN 2073-4409. Dostupné z: [doi: 10.3390/cells10010068](https://doi.org/10.3390/cells10010068). IF<sub>2021</sub> = 7,666.

ČERVENKA, J. System wide proteomic approaches - methods and applications in neurodegeneration research. In: KELLO, M., STRNADEL, J., KLEMPÍR, J., ROTH, J., MYSLIVCOVÁ-FUČÍKOVÁ, A., HANSÍKOVÁ, H., KOZÁK, I., eds. *Translational Research in Serious Human Diseases*. Praha: Academia, 2020, s. 92-101. ISBN 978-80-200-3158-7.

TYLEČKOVÁ, J., ČERVENKA, J., VODIČKA, P. Targeted proteomics in translational research of neurodegenerative diseases. In: KELLO, M., STRNADEL, J., KLEMPÍR, J., ROTH, J., MYSLIVCOVÁ-FUČÍKOVÁ, A., HANSÍKOVÁ, H., KOZÁK, I., eds. *Translational Research in Serious Human Diseases*. Praha: Academia, 2020, s. 112-122. ISBN 978-80-200-3158-7.

ČERVENKA, J., KUPCOVÁ SKALNÍKOVÁ, H., NOVÁK, J., TYLEČKOVÁ, J., VODIČKA, P. *Extrakce proteinů extracelulárních váčků pro proteomické analýzy*. Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., 2020. Ověřená technologie Extrakce proteinů.

## Seznam použité literatury

1. Ludwig, P.E., Reddy, V., and Varacallo, M. (2024). Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). In StatPearls (StatPearls Publishing).
2. Neurological Disorders: Public Health Challenges (2006). (World Health Organization).
3. Steinmetz, J.D., Seeher, K.M., Schiess, N., Nichols, E., Cao, B., Servili, C., Cavallera, V., Cousin, E., Hagins, H., Moberg, M.E., et al. (2024). Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Neurology* 23, 344–381. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(24\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(24)00038-3).
4. Madhavan, L., and Collier, T.J. (2010). A synergistic approach for neural repair: Cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity. *Neuropharmacology* 58, 835–844. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.10.005>.
5. Ottoboni, L., von Wunster, B., and Martino, G. (2020). Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Front. Neurol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00148>.
6. Sucha, R., Kubickova, M., Cervenka, J., Hruska-Plochan, M., Bohaciakova, D., Vodickova Kepkova, K., Novakova, T., Budkova, K., Susor, A., Marsala, M., et al. (2021). Targeted mass spectrometry for monitoring of neural differentiation. *Biol Open* 10, bio058727. <https://doi.org/10.1242/bio.058727>.
7. Uchida, K., Mukai, M., Okano, H., and Kawase, T. (2004). Possible oncogenicity of subventricular zone neural stem cells: case report. *Neurosurgery* 55, 977–978. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000137891.99542.43>.
8. Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., et al. (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6, e1000029. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000029>.
9. Tyleckova, J., Cervenka, J., Poliakh, I., Novak, J., Kepkova, K.V., Skalnikova, H.K., and Vodicka, P. (2022). Proteomic Analysis of Human Neural Stem Cell Differentiation by SWATH-MS. In *Embryonic Stem Cell Protocols*, K. Turksen, ed. (Springer US), pp. 335–360. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2022\\_462](https://doi.org/10.1007/7651_2022_462).
10. Červenka, J., Tylečková, J., Kupcová Skalníková, H., Vodičková Kepková, K., Poliakh, I., Valeková, I., Pfeiferová, L., Kolář, M., Vaškovičová, M., Pánková, T., et al. (2021). Proteomic Characterization of Human Neural Stem Cells and Their Secretome During in vitro Differentiation. *Front. Cell. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612560>.
11. Červenka, J., Budková, K., Suchá, R., Vodička, P., and Voukali, E. (2023). Proteomics in Huntington’s Disease Biomarker Discovery. In *Biomarkers for Huntington’s Disease: Improving Clinical Outcomes*, E. A. Thomas and G. M. Parkin, eds. (Springer International Publishing), pp. 209–246. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2_9).
12. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., and Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.



13. Vazin, T., and Freed, W.J. (2010). Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restor Neurol Neurosci* 28, 589–603. <https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0543>.
14. Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
15. Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>.
16. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
17. Shambloott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13726–13731.
18. Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.-Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399–404. <https://doi.org/10.1038/74447>.
19. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
20. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
21. International Stem Cell Initiative, Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803–816. <https://doi.org/10.1038/nbt1318>.
22. Zhang, S., and Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells* 6, 305–311. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>.
23. Andrews, P.W., and Gokhale, P.J. (2024). A short history of pluripotent stem cells markers. *Stem Cell Reports* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2023.11.012>.
24. Martínez-Cerdeño, V., and Noctor, S.C. (2018). Neural Progenitor Cell Terminology. *Front. Neuroanat.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00104>.
25. Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R., and Francis, F. (2019). Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00381>.
26. Zizkova, M., Sucha, R., Tyleckova, J., Jarkovska, K., Mairychova, K., Kotrcova, E., Marsala, M., Gadher, S.J., and Kovarova, H. (2015). Proteome-wide analysis of neural stem cell differentiation to facilitate transition to cell replacement therapies. *Expert Review of Proteomics* 12, 83–95. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.977381>.

27. Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., and Pevny, L. (2005). SOX2, a Persistent Marker for Multipotential Neural Stem Cells Derived from Embryonic Stem Cells, the Embryo or the Adult. *Developmental Neuroscience* 26, 148–165. <https://doi.org/10.1159/000082134>.
28. Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S., Nakatsuji, N., and Kawase, E. (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells* 15, 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01400.x>.
29. Liu, Y.-R., Laghari, Z.A., Novoa, C.A., Hughes, J., Webster, J.R., Goodwin, P.E., Wheatley, S.P., and Scotting, P.J. (2014). Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. *BMC Neuroscience* 15, 95. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-95>.
30. Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>.
31. Kosodo, Y., Toida, K., Dubreuil, V., Alexandre, P., Schenk, J., Kiyokage, E., Attardo, A., Mora-Bermúdez, F., Arii, T., Clarke, J.D.W., et al. (2008). Cytokinesis of neuroepithelial cells can divide their basal process before anaphase. *EMBO J* 27, 3151–3163. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.227>.
32. Sauer, F.C. (1934). Mitosis in the neural tube.
33. Del Bene, F. (2011). Interkinetic nuclear migration: cell cycle on the move. *The EMBO Journal* 30, 1676–1677. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.114>.
34. Murciano, A., Zamora, J., López-Sánchez, J., and Frade, J.M. (2002). Interkinetic Nuclear Movement May Provide Spatial Clues to the Regulation of Neurogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21, 285–300. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1174>.
35. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>.
36. Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539–5550. <https://doi.org/10.1242/dev.01436>.
37. Papanayotou, C., Mey, A., Birot, A.-M., Saka, Y., Boast, S., Smith, J.C., Samarut, J., and Stern, C.D. (2008). A Mechanism Regulating the Onset of Sox2 Expression in the Embryonic Neural Plate. *PLOS Biology* 6, e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060002>.
38. Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol* 180, 664–679. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0336>.
39. Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7, 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn1172>.

40. Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R.L., and Kriegstein, A.R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561. <https://doi.org/10.1038/nature08845>.
41. Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., and Kriegstein, A.R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci* 14, 555–561. <https://doi.org/10.1038/nn.2807>.
42. Martínez-Cerdeño, V., Cunningham, C.L., Camacho, J., Antczak, J.L., Prakash, A.N., Cziep, M.E., Walker, A.I., and Noctor, S.C. (2012). Comparative Analysis of the Subventricular Zone in Rat, Ferret and Macaque: Evidence for an Outer Subventricular Zone in Rodents. *PLOS ONE* 7, e30178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030178>.
43. Zarzor, M.S., Blumcke, I., and Budday, S. (2023). Exploring the role of the outer subventricular zone during cortical folding through a physics-based model. *eLife* 12, e82925. <https://doi.org/10.7554/eLife.82925>.
44. Vinci, L., Ravarino, A., Fanos, V., Naccarato, A.G., Senes, G., Gerosa, C., Bevilacqua, G., Faa, G., and Ambu, R. (2016). Immunohistochemical Markers of Neural Progenitor Cells in the Early Embryonic Human Cerebral Cortex. *Eur J Histochem* 60, 2563. <https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2563>.
45. Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Developmental Biology* 229, 15–30. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9962>.
46. Feng, L., Hatten, M.E., and Heintz, N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895–908. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90341-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90341-7).
47. Levitt, P., and Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *Journal of Comparative Neurology* 193, 815–840. <https://doi.org/10.1002/cne.901930316>.
48. Akimoto, J., Itoh, H., Miwa, T., and Ikeda, K. (1993). Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development. *Developmental Brain Research* 72, 9–14. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90154-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90154-3).
49. Götz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 Controls Radial Glia Differentiation in the Cerebral Cortex. *Neuron* 21, 1031–1044. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80621-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80621-2).
50. Zhang, J., and Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int* 2015, 727542. <https://doi.org/10.1155/2015/727542>.
51. Allen, E. (1912). The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. Waverley Press 19.
52. Bryans, W.A. (1959). Mitotic activity in the brain of the adult rat. *The Anatomical Record* 133, 65–73. <https://doi.org/10.1002/ar.1091330108>.
53. Smart, I. (1961). The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *Journal of Comparative Neurology* 116, 325–347. <https://doi.org/10.1002/cne.901160306>.

54. Johns, P.R. (1977). Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J Comp Neurol* 176, 343–357. <https://doi.org/10.1002/cne.901760304>.
55. Bernocchi, G., Scherini, E., Giacometti, S., and Mares, V. (1990). Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta* L.): an autoradiographic 3H-thymidine study. *Anat Rec* 228, 461–470. <https://doi.org/10.1002/ar.1092280413>.
56. Font, E., Desfilis, E., Pérez-Cañellas, M.M., and García-Verdugo, J.M. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol* 58, 276–295. <https://doi.org/10.1159/000057570>.
57. Sadananda, M. (2004). Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: implications of the paradigm shift. *Current Science* 87, 297–307.
58. Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173–189. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90281-u](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90281-u).
59. Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14895–14900. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895>.
60. Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J. Neurosci.* 17, 5046–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>.
61. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80783-7).
62. Velloso, F.J., Shankar, S., Parpura, V., Rakic, P., and Levison, S.W. (2022). Neural Stem Cells in Adult Mammals are not Astrocytes. *ASN Neuro* 14, 17590914221134739. <https://doi.org/10.1177/17590914221134739>.
63. Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisén, J. (1999). Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Cell* 96, 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80956-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80956-3).
64. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337–344. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90335-D](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90335-D).
65. Palmer, T.D., Takahashi, J., and Gage, F.H. (1997). The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8, 389–404. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0595>.
66. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>.
67. Pellegrino, G., Trubert, C., Terrien, J., Pifferi, F., Leroy, D., Loyens, A., Migaud, M., Baroncini, M., Maurice, C.-A., Fontaine, C., et al. (2018). A comparative study of the neural stem cell niche in

- the adult hypothalamus of human, mouse, rat and gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *J Comp Neurol* 526, 1419–1443. <https://doi.org/10.1002/cne.24376>.
68. Seri, B., Herrera, D.G., Gritti, A., Ferron, S., Collado, L., Vescovi, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16 *Suppl 1*, i103–111. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhk027>.
  69. Ponti, G., Peretto, P., and Bonfanti, L. (2008). Genesis of Neuronal and Glial Progenitors in the Cerebellar Cortex of Peripuberal and Adult Rabbits. *PLOS ONE* 3, e2366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002366>.
  70. Barry, D.S., Pakan, J.M.P., and McDermott, K.W. (2014). Radial glial cells: Key organisers in CNS development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 46, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.013>.
  71. Lawrence, J.M., Singhal, S., Bhatia, B., Keegan, D.J., Reh, T.A., Luthert, P.J., Khaw, P.T., and Limb, G.A. (2007). MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells* 25, 2033–2043. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0724>.
  72. Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599–7609. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07599.1996>.
  73. Ryu, J.R., Hong, C.J., Kim, J.Y., Kim, E.-K., Sun, W., and Yu, S.-W. (2016). Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Molecular Brain* 9, 43. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0224-4>.
  74. Wang, C., Liu, F., Liu, Y.-Y., Zhao, C.-H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., et al. (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res* 21, 1534–1550. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.83>.
  75. Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S.Y., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., et al. (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.030>.
  76. Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.-H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.-M., et al. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382–386. <https://doi.org/10.1038/nature10487>.
  77. Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* 156, 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>.
  78. Salman, A., McClements, M.E., and MacLaren, R.E. (2021). Insights on the Regeneration Potential of Müller Glia in the Mammalian Retina. *Cells* 10, 1957. <https://doi.org/10.3390/cells10081957>.

79. Schwartz, P.H., Bryant, P.J., Fuja, T.J., Su, H., O'Dowd, D.K., and Klassen, H. (2003). Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *Journal of Neuroscience Research* 74, 838–851. <https://doi.org/10.1002/jnr.10854>.
80. Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S., and Osumi, N. (2005). Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to Cells* 10, 1001–1014. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00893.x>.
81. Kverková, K., Marhounová, L., Polonyiová, A., Kocourek, M., Zhang, Y., Olkowicz, S., Straková, B., Pavelková, Z., Vodička, R., Frynta, D., et al. (2022). The evolution of brain neuron numbers in amniotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119, e2121624119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121624119>.
82. Herrup, K., and Yang, Y. (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 8, 368–378. <https://doi.org/10.1038/nrn2124>.
83. Zeng, H., and Sanes, J.R. (2017). Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nat Rev Neurosci* 18, 530–546. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85>.
84. Bota, M., Dong, H.-W., and Swanson, L.W. (2003). From gene networks to brain networks. *Nat Neurosci* 6, 795–799. <https://doi.org/10.1038/nn1096>.
85. Bota, M., and Swanson, L.W. (2007). The neuron classification problem. *Brain Research Reviews* 56, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.005>.
86. Barnett, M.W., and Larkman, P.M. (2007). The action potential. *Practical Neurology* 7, 192–197.
87. Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8, 451–465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>.
88. Südhof, T.C. (2013). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* 80, 10.1016/j.neuron.2013.10.022. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>.
89. Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., and Kuhn, H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467, 1–10. <https://doi.org/10.1002/cne.10874>.
90. Caceres, A., Binder, L.I., Payne, M.R., Bender, P., Rebhun, L., and Steward, O. (1984). Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* 4, 394–410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-02-00394.1984>.
91. Gusel'nikova, V.V., and Korzhevskiy, D.E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7, 42–47.
92. Seki, T., and Arai, Y. (1991). Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat Embryol (Berl)* 184, 395–401. <https://doi.org/10.1007/BF00957900>.

93. Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W., and Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific  $\beta$ -tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motility* 17, 118–132. <https://doi.org/10.1002/cm.970170207>.
94. Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics* 7, 338–353. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.006>.
95. Gradisnik, L., and Velnar, T. (2023). Astrocytes in the central nervous system and their functions in health and disease: A review. *World J Clin Cases* 11, 3385–3394. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i15.3385>.
96. Huang, H., He, W., Tang, T., and Qiu, M. (2023). Immunological Markers for Central Nervous System Glia. *Neurosci. Bull.* 39, 379–392. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00938-2>.
97. D'Amelio, F., Eng, L.F., and Gibbs, M.A. (1990). Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia* 3, 335–341. <https://doi.org/10.1002/glia.440030504>.
98. Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews* 81, 871–927. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>.
99. Nave, K.-A., Asadollahi, E., and Sasmita, A. (2023). Expanding the function of oligodendrocytes to brain energy metabolism. *Current Opinion in Neurobiology* 83, 102782. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102782>.
100. Larson, V.A., Mironova, Y., Vanderpool, K.G., Waisman, A., Rash, J.E., Agarwal, A., and Bergles, D.E. (2018). Oligodendrocytes control potassium accumulation in white matter and seizure susceptibility. *Elife* 7, e34829. <https://doi.org/10.7554/eLife.34829>.
101. Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., and Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8, 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>.
102. Lu, Q.R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D., and Rowitch, D.H. (2002). Common Developmental Requirement for Olig Function Indicates a Motor Neuron/Oligodendrocyte Connection. *Cell* 109, 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00678-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00678-5).
103. Zhou, Q., and Anderson, D.J. (2002). The bHLH Transcription Factors OLIG2 and OLIG1 Couple Neuronal and Glial Subtype Specification. *Cell* 109, 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00677-3).
104. Karsten, S.L., Kudo, L.C., Jackson, R., Sabatti, C., Kornblum, H.I., and Geschwind, D.H. (2003). Global analysis of gene expression in neural progenitors reveals specific cell-cycle, signaling, and metabolic networks. *Developmental Biology* 261, 165–182. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00274-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00274-4).
105. Gurok, U., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Ropers, H.-H., Scharff, C., and Nuber, U.A. (2004). Gene Expression Changes in the Course of Neural Progenitor Cell Differentiation. *J Neurosci* 24, 5982–6002. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0809-04.2004>.
106. Lattke, M., Goldstone, R., Ellis, J.K., Boeing, S., Jurado-Arjona, J., Marichal, N., MacRae, J.I., Berninger, B., and Guillemot, F. (2021). Extensive transcriptional and chromatin changes

- underlie astrocyte maturation in vivo and in culture. *Nat Commun* 12, 4335.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24624-5>.
107. Singh, R.P., Shiue, K., Schomberg, D., and Zhou, F.C. (2009). Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation. *Cell Transplant* 18, 1197–1211.  
<https://doi.org/10.3727/096368909X12483162197204>.
108. Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Mertens, J., Kim, Y., Ma, L., Ma, L., Hamm, M., Gage, F.H., and Hunter, T. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* 5, e13374.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.13374>.
109. Long, K.R., and Huttner, W.B. (2019). How the extracellular matrix shapes neural development. *Open Biology* 9, 180216. <https://doi.org/10.1098/rsob.180216>.
110. Maeda, N. (2015). Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00098>.
111. Campos, L.S., Leone, D.P., Relvas, J.B., Brakebusch, C., Fässler, R., Suter, U., and French-Constant, C. (2004). Beta1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* 131, 3433–3444.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01199>.
112. Ma, W., Tavakoli, T., Derby, E., Serebryakova, Y., Rao, M.S., and Mattson, M.P. (2008). Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Developmental Biology* 8, 90. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-90>.
113. Long, K., Moss, L., Laursen, L., Boulter, L., and French-Constant, C. (2016). Integrin signalling regulates the expansion of neuroepithelial progenitors and neurogenesis via Wnt7a and Decorin. *Nat Commun* 7, 10354. <https://doi.org/10.1038/ncomms10354>.
114. Sibbe, M., Förster, E., Basak, O., Taylor, V., and Frotscher, M. (2009). Reelin and Notch1 Cooperate in the Development of the Dentate Gyrus. *J. Neurosci.* 29, 8578–8585.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0958-09.2009>.
115. Kjell, J., Fischer-Sternjak, J., Thompson, A.J., Friess, C., Sticco, M.J., Salinas, F., Cox, J., Martinelli, D.C., Ninkovic, J., Franze, K., et al. (2020). Defining the Adult Neural Stem Cell Niche Proteome Identifies Key Regulators of Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 26, 277-293.e8.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.002>.
116. Long, K.R., Newland, B., Florio, M., Kalebic, N., Langen, B., Kolterer, A., Wimberger, P., and Huttner, W.B. (2018). Extracellular Matrix Components HAPLN1, Lumican, and Collagen I Cause Hyaluronic Acid-Dependent Folding of the Developing Human Neocortex. *Neuron* 99, 702-719.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.013>.
117. Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1, 2005.0010.  
<https://doi.org/10.1038/msb4100014>.
118. Palma, V.A., Reinchisi, G., Parada, M., Oyanadel, C., Shaughnessy, R., Lois, P., and Gonzalez, A. (2013). Sonic Hedgehog modulates EGFR dependent proliferation of neural stem cells during late mouse embryogenesis through EGFR transactivation. *Front. Cell. Neurosci.* 7.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00166>.



119. Aguirre, A., Rubio, M.E., and Gallo, V. (2010). Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 467, 323–327. <https://doi.org/10.1038/nature09347>.
120. Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2, reviews3005.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005>.
121. Guillemot, F., and Zimmer, C. (2011). From Cradle to Grave: The Multiple Roles of Fibroblast Growth Factors in Neural Development. *Neuron* 71, 574–588. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.002>.
122. Reuss, B., and von Bohlen und Halbach, O. (2003). Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313, 139–157. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0756-7>.
123. Svendsen, C.N., ter Borg, M.G., Armstrong, R.J., Rosser, A.E., Chandran, S., Ostenfeld, T., and Caldwell, M.A. (1998). A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* 85, 141–152. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(98\)00126-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(98)00126-5).
124. Vescovi, A.L., Parati, E.A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frölichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., et al. (1999). Isolation and Cloning of Multipotential Stem Cells from the Embryonic Human CNS and Establishment of Transplantable Human Neural Stem Cell Lines by Epigenetic Stimulation. *Experimental Neurology* 156, 71–83. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6998>.
125. Nieto-Estévez, V., Pignatelli, J., Araúzo-Bravo, M.J., Hurtado-Chong, A., and Vicario-Abejón, C. (2013). A Global Transcriptome Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Neural Stem Cell Death, Survival, and Differentiation in Response to Partial FGF-2 and EGF Deprivation. *PLOS ONE* 8, e53594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053594>.
126. Lotz, S., Goderie, S., Tokas, N., Hirsch, S.E., Ahmad, F., Corneo, B., Le, S., Banerjee, A., Kane, R.S., Stern, J.H., et al. (2013). Sustained Levels of FGF2 Maintain Undifferentiated Stem Cell Cultures with Biweekly Feeding. *PLOS ONE* 8, e56289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056289>.
127. Li, H., Gan, X., Pan, L., Zhang, Y., Hu, X., and Wang, Z. (2022). EGF/bFGF promotes survival, migration and differentiation into neurons of GFP-labeled rhesus monkey neural stem cells xenografted into the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 620, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.06.077>.
128. Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., and van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208, 166–188. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9192>.
129. Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., and Gage, F.H. (1997). Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2 Have Different Effects on Neural Progenitors in the Adult Rat Brain. *J Neurosci* 17, 5820–5829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05820.1997>.
130. Kerever, A., Schnack, J., Vellinga, D., Ichikawa, N., Moon, C., Arikawa-Hirasawa, E., Efird, J.T., and Mercier, F. (2007). Novel Extracellular Matrix Structures in the Neural Stem Cell Niche Capture the Neurogenic Factor Fibroblast Growth Factor 2 from the Extracellular Milieu. *STEM CELLS* 25, 2146–2157. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0082>.

131. Forsten-Williams, K., Chu, C.L., Fannon, M., Buczek-Thomas, J.A., and Nugent, M.A. (2008). Control of Growth Factor Networks by Heparan Sulfate Proteoglycans. *Ann Biomed Eng* 36, 2134–2148. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9575-z>.
132. Djerbal, L., Lortat-Jacob, H., and Kwok, J. (2017). Chondroitin sulfates and their binding molecules in the central nervous system. *Glycoconj J* 34, 363–376. <https://doi.org/10.1007/s10719-017-9761-z>.
133. Sirko, S., von Holst, A., Weber, A., Wizenmann, A., Theocharidis, U., Götz, M., and Faissner, A. (2010). Chondroitin Sulfates Are Required for Fibroblast Growth Factor-2-Dependent Proliferation and Maintenance in Neural Stem Cells and for Epidermal Growth Factor-Dependent Migration of Their Progeny. *Stem Cells* 28, 775–787. <https://doi.org/10.1002/stem.309>.
134. Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75.
135. MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.
136. Zechner, D., Fujita, Y., Hülsken, J., Müller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Bryan Crenshaw, E., Birchmeier, W., and Birchmeier, C. (2003).  $\beta$ -Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental Biology* 258, 406–418. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00123-4).
137. Pöschl, J., Grammel, D., Dorostkar, M.M., Kretschmar, H.A., and Schüller, U. (2013). Constitutive activation of  $\beta$ -catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system. *Dev Biol* 374, 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.001>.
138. Qu, Q., Sun, G., Murai, K., Ye, P., Li, W., Asuelime, G., Cheung, Y.-T., and Shi, Y. (2013). Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis. *Mol Cell Biol* 33, 2551–2559. <https://doi.org/10.1128/MCB.00325-13>.
139. Wang, Q., Yang, L., Alexander, C., and Temple, S. (2012). The Niche Factor Syndecan-1 Regulates the Maintenance and Proliferation of Neural Progenitor Cells during Mammalian Cortical Development. *PLOS ONE* 7, e42883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042883>.
140. Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L., and Kessler, J.A. (2004). The presence of FGF2 signaling determines whether  $\beta$ -catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Developmental Biology* 268, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.024>.
141. Delaunay, D., Cortay, V., Patti, D., Knoblauch, K., and Dehay, C. (2014). Mitotic Spindle Asymmetry: A Wnt/PCP-Regulated Mechanism Generating Asymmetrical Division in Cortical Precursors. *Cell Reports* 6, 400–414. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.026>.
142. Bengoa-Vergniory, N., Gorroño-Etxebarria, I., González-Salazar, I., and Kypta, R.M. (2014). A Switch From Canonical to Noncanonical Wnt Signaling Mediates Early Differentiation of Human Neural Stem Cells. *Stem Cells* 32, 3196–3208. <https://doi.org/10.1002/stem.1807>.
143. Lee, H.-Y., Kléber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M.M., Kemler, R., and Sommer, L. (2004). Instructive Role of Wnt/ $\beta$ -Catenin in Sensory Fate Specification in Neural Crest Stem Cells. *Science* 303, 1020–1023. <https://doi.org/10.1126/science.1091611>.

144. Krylova, O., Herreros, J., Cleverley, K.E., Ehler, E., Henriquez, J.P., Hughes, S.M., and Salinas, P.C. (2002). WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* 35, 1043–1056. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00860-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00860-7).
145. Wang, Y., Thekdi, N., Smallwood, P.M., Macke, J.P., and Nathans, J. (2002). Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J Neurosci* 22, 8563–8573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08563.2002>.
146. L'Episcopo, F., Serapide, M.F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Pluchino, S., and Marchetti, B. (2011). A Wnt1 regulated Frizzled-1/ $\beta$ -Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. *Mol Neurodegener* 6, 49. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-49>.
147. Andersson, E.R., Saltó, C., Villaescusa, J.C., Cajanek, L., Yang, S., Bryjova, L., Nagy, I.I., Vainio, S.J., Ramirez, C., Bryja, V., et al. (2013). Wnt5a cooperates with canonical Wnts to generate midbrain dopaminergic neurons in vivo and in stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E602–E610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208524110>.
148. Adachi, K., Mirzadeh, Z., Sakaguchi, M., Yamashita, T., Nikolcheva, T., Gotoh, Y., Peltz, G., Gong, L., Kawase, T., Alvarez-Buylla, A., et al. (2007). Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25, 2827–2836. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0177>.
149. Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T., and Berninger, B. (2013). Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 15, 602–613. <https://doi.org/10.1038/ncb2736>.
150. Chavali, M., Klingener, M., Kokkosis, A.G., Garkun, Y., Felong, S., Maffei, A., and Aguirre, A. (2018). Non-canonical Wnt signaling regulates neural stem cell quiescence during homeostasis and after demyelination. *Nat Commun* 9, 36. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02440-0>.
151. Austin, S.H.L., Gabarró-Solanas, R., Rigo, P., Paun, O., Harris, L., Guillemot, F., and Urbán, N. (2021). Wnt/ $\beta$ -catenin signalling is dispensable for adult neural stem cell homeostasis and activation. *Development* 148, dev199629. <https://doi.org/10.1242/dev.199629>.
152. Holmes, D.I., and Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* 6, 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>.
153. Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012). Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006502. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>.
154. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439. <https://doi.org/10.1038/380435a0>.

155. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439–442. <https://doi.org/10.1038/380439a0>.
156. The UniProt Consortium (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* *51*, D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
157. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* *266*, 11947–11954.
158. Peach, C.J., Mignone, V.W., Arruda, M.A., Alcobia, D.C., Hill, S.J., Kilpatrick, L.E., and Woolard, J. (2018). Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *International Journal of Molecular Sciences* *19*, 1264. <https://doi.org/10.3390/ijms19041264>.
159. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* *16*, 4604–4613. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4604>.
160. Frank, S., Hübner, G., Breier, G., Longaker, M.T., Greenhalgh, D.G., and Werner, S. (1995). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cultured Keratinocytes.: IMPLICATIONS FOR NORMAL AND IMPAIRED WOUND HEALING (\*). *Journal of Biological Chemistry* *270*, 12607–12613. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12607>.
161. Saryeddine, L., Zibara, K., Kassem, N., Badran, B., and El-Zein, N. (2016). EGF-Induced VEGF Exerts a PI3K-Dependent Positive Feedback on ERK and AKT through VEGFR2 in Hematological In Vitro Models. *PLoS One* *11*, e0165876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165876>.
162. Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C.J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E.S., Shapiro, R.L., Galloway, A.C., Rifkin, D.B., and Mignatti, P. (1998). Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in the Endothelial Cells of Forming Capillaries: An Autocrine Mechanism Contributing to Angiogenesis. *J Cell Biol* *141*, 1659–1673.
163. Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L.W., Neufeld, G., and Levi, B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* *271*, 736–741. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.736>.
164. Zhang, X., Gaspard, J.P., and Chung, D.C. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* *61*, 6050–6054.
165. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., and Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res* *51*, D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>.
166. Ogunshola, O.O., Antic, A., Donoghue, M.J., Fan, S.-Y., Kim, H., Stewart, W.B., Madri, J.A., and Ment, L.R. (2002). Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* *277*, 11410–11415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111085200>.
167. Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., et al. (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev Biol* *262*, 225–241. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00356-7](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00356-7).

168. Raab, S., Beck, H., Gaumann, A., Yüce, A., Gerber, H.-P., Plate, K., Hammes, H.-P., Ferrara, N., and Breier, G. (2004). Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 91, 595–605. <https://doi.org/10.1160/TH03-09-0582>.
169. Wada, T., Haigh, J.J., Ema, M., Hitoshi, S., Chaddah, R., Rossant, J., Nagy, A., and Kooy, D. van der (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Directly Inhibits Primitive Neural Stem Cell Survival But Promotes Definitive Neural Stem Cell Survival. *J. Neurosci.* 26, 6803–6812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0526-06.2006>.
170. Rosenstein, J.M., Mani, N., Khaibullina, A., and Krum, J.M. (2003). Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci* 23, 11036–11044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11036.2003>.
171. Khaibullina, A.A., Rosenstein, J.M., and Krum, J.M. (2004). Vascular endothelial growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 148, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.09.022>.
172. Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., and Ruhrberg, C. (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. *Neuron* 70, 951–965. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.052>.
173. Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P.J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P.C.G., Aerts, L., Delattin, N., Strasser, G., Oh, W.-J., et al. (2011). VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. *Neuron* 70, 966–978. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.014>.
174. Kirby, E.D., Kuwahara, A.A., Messer, R.L., and Wyss-Coray, T. (2015). Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 4128–4133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422448112>.
175. Sun, J., Zhou, W., Ma, D., and Yang, Y. (2010). Endothelial cells promote neural stem cell proliferation and differentiation associated with VEGF activated Notch and Pten signaling. *Developmental Dynamics* 239, 2345–2353. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22377>.
176. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946–11950. <https://doi.org/10.1073/pnas.182296499>.
177. Schänzer, A., Wachs, F.-P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K.H., and Kuhn, H.G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14, 237–248. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00060.x>.
178. Meng, H., Zhang, Z., Zhang, R., Liu, X., Wang, L., Robin, A.M., and Chopp, M. (2006). Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors. *Neurosci Lett* 393, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.09.044>.
179. Zhou, Z.-D., Kumari, U., Xiao, Z.-C., and Tan, E.-K. (2010). Notch as a molecular switch in neural stem cells. *IUBMB Life* 62, 618–623. <https://doi.org/10.1002/iub.362>.

180. Le Dréau, G. (2022). BuMPing Into Neurogenesis: How the Canonical BMP Pathway Regulates Neural Stem Cell Divisions Throughout Space and Time. *Front. Neurosci.* *15*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.819990>.
181. Yang, C., Qi, Y., and Sun, Z. (2021). The Role of Sonic Hedgehog Pathway in the Development of the Central Nervous System and Aging-Related Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.* *8*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.711710>.
182. Wilson, D.M., Cookson, M.R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D.M., and Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell* *186*, 693–714. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.032>.
183. Lamptey, R.N.L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., and Singh, J. (2022). A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* *23*, 1851. <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>.
184. Durães, F., Pinto, M., and Sousa, E. (2018). Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* *11*, 44. <https://doi.org/10.3390/ph11020044>.
185. Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* *15*, 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>.
186. Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* *115*, 1449–1457. <https://doi.org/10.1172/JCI24761>.
187. Koretsky, M.J., Alvarado, C., Makarious, M.B., Vitale, D., Levine, K., Bandres-Ciga, S., Dadu, A., Scholz, S.W., Sargent, L., Faghri, F., et al. (2023). Genetic risk factor clustering within and across neurodegenerative diseases. *Brain* *146*, 4486–4494. <https://doi.org/10.1093/brain/awad161>.
188. Kawahara, M., Kato-Negishi, M., and Tanaka, K. (2017). Cross talk between neurometals and amyloidogenic proteins at the synapse and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Metalomics* *9*, 619–633. <https://doi.org/10.1039/c7mt00046d>.
189. Jain, A., Madkan, S., and Patil, P. (2023). The Role of Gut Microbiota in Neurodegenerative Diseases: Current Insights and Therapeutic Implications. *Cureus* *15*, e47861. <https://doi.org/10.7759/cureus.47861>.
190. Calderón-Garcidueñas, L., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Kulesza, R.J., Mukherjee, P.S., Torres-Jardón, R., Rönkkö, T., and Doty, R.L. (2018). Alzheimer’s disease and alpha-synuclein pathology in the olfactory bulbs of infants, children, teens and adults  $\leq$  40 years in Metropolitan Mexico City. APOE4 carriers at higher risk of suicide accelerate their olfactory bulb pathology. *Environmental Research* *166*, 348–362. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.027>.
191. Shi, L., Wu, X., Yazdi, M.D., Braun, D., Awad, Y.A., Wei, Y., Liu, P., Di, Q., Wang, Y., Schwartz, J., et al. (2020). Long-term effects of PM<sub>2.5</sub> on neurological disorders in the American Medicare population: a longitudinal cohort study. *The Lancet Planetary Health* *4*, e557–e565. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(20\)30227-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(20)30227-8).

192. Tewari, K., Tewari, M., and Niyogi, D. (2023). Need for considering urban climate change factors on stroke, neurodegenerative diseases, and mood disorders studies. *Comput.Urban Sci.* 3, 4. <https://doi.org/10.1007/s43762-023-00079-w>.
193. Levine, K.S., Leonard, H.L., Blauwendraat, C., Iwaki, H., Johnson, N., Bandres-Ciga, S., Ferrucci, L., Faghri, F., Singleton, A.B., and Nalls, M.A. (2023). Virus exposure and neurodegenerative disease risk across national biobanks. *Neuron* 111, 1086-1093.e2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.029>.
194. Gammon, K. (2014). Neurodegenerative disease: Brain windfall. *Nature* 515, 299–300. <https://doi.org/10.1038/nj7526-299a>.
195. Graveland, G.A., Williams, R.S., and DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington’s disease. *Science* 227, 770–773. <https://doi.org/10.1126/science.3155875>.
196. McColgan, P., and Tabrizi, S.J. (2018). Huntington’s disease: a clinical review. *European Journal of Neurology* 25, 24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>.
197. van der Burg, J.M., Björkqvist, M., and Brundin, P. (2009). Beyond the brain: widespread pathology in Huntington’s disease. *The Lancet Neurology* 8, 765–774. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70178-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70178-4).
198. Medina, A., Mahjoub, Y., Shaver, L., and Pringsheim, T. (2022). Prevalence and Incidence of Huntington’s Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov Disord* 37, 2327–2335. <https://doi.org/10.1002/mds.29228>.
199. Strong, M., and Quarrell, O.W. (2023). Prevalence and Incidence of Huntington’s Disease. *Movement Disorders* 38, 1570–1572. <https://doi.org/10.1002/mds.29532>.
200. MacDonald, M.E., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Myers, R.H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S.A., James, M., Groot, N., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington’s disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E).
201. Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., and Abbott, M. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington’s disease. *Nat Genet* 4, 387–392. <https://doi.org/10.1038/ng0893-387>.
202. Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S., and Shaw, D.J. (1993). Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington’s disease. *Nat Genet* 4, 393–397. <https://doi.org/10.1038/ng0893-393>.
203. Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S.E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., and Almqvist, E. (1994). A worldwide study of the Huntington’s disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 330, 1401–1406. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405193302001>.
204. Lee, J.-M., Ramos, E.M., Lee, J.-H., Gillis, T., Mysore, J.S., Hayden, M.R., Warby, S.C., Morrison, P., Nance, M., Ross, C.A., et al. (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78, 690–695. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318249f683>.

205. Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Mariotti, C., Cislighi, G., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Turner, D., Bachoud-Lévi, A.-C., Simpson, S.A., et al. (2003). Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 126, 946–955. <https://doi.org/10.1093/brain/awg077>.
206. Roos, R.A. (2010). Huntington’s disease: a clinical review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5, 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>.
207. Fusilli, C., Migliore, S., Mazza, T., Consoli, F., Luca, A.D., Barbagallo, G., Ciammola, A., Gatto, E.M., Cesarini, M., Etcheverry, J.L., et al. (2018). Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington’s disease: a retrospective analysis. *The Lancet Neurology* 17, 986–993. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30294-1).
208. Lipe, H., and Bird, T. (2009). Late onset Huntington Disease: Clinical and genetic characteristics of 34 cases. *Journal of the Neurological Sciences* 276, 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.09.029>.
209. Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>.
210. Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* 1, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>.
211. Tabrizi, S.J., Flower, M.D., Ross, C.A., and Wild, E.J. (2020). Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurol* 16, 529–546. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0389-4>.
212. Huntington Study Group (1996). Unified Huntington’s Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Mov Disord* 11, 136–142. <https://doi.org/10.1002/mds.870110204>.
213. Ager, R.R., Davis, J.L., Agazaryan, A., Benavente, F., Poon, W.W., LaFerla, F.M., and Blurton-Jones, M. (2015). Human neural stem cells improve cognition and promote synaptic growth in two complementary transgenic models of Alzheimer’s disease and neuronal loss. *Hippocampus* 25, 813–826. <https://doi.org/10.1002/hipo.22405>.
214. Xu, L., Yan, J., Chen, D., Welsh, A.M., Hazel, T., Johe, K., Hatfield, G., and Koliatsos, V.E. (2006). Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation* 82, 865–875. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000235532.00920.7a>.
215. Lee, S.-T., Chu, K., Park, J.-E., Lee, K., Kang, L., Kim, S.U., and Kim, M. (2005). Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington’s disease rat model. *Neurosci Res* 52, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.03.016>.
216. Skardelly, M., Gaber, K., Burdack, S., Scheidt, F., Hilbig, H., Boltze, J., Förschler, A., Schwarz, S., Schwarz, J., Meixensberger, J., et al. (2011). Long-term benefit of human fetal neuronal progenitor cell transplantation in a clinically adapted model after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 28, 401–414. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1526>.
217. Cheng, I., Mayle, R.E., Cox, C.A., Park, D.Y., Smith, R.L., Corcoran-Schwartz, I., Ponnusamy, K.E., Oshtory, R., Smuck, M.W., Mitra, R., et al. (2012). Functional assessment of the acute local and distal transplantation of human neural stem cells after spinal cord injury. *Spine J* 12, 1040–1044. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2012.09.005>.



218. Pollock, K., Stroemer, P., Patel, S., Stevanato, L., Hope, A., Miljan, E., Dong, Z., Hodges, H., Price, J., and Sinden, J.D. (2006). A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 199, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.12.011>.
219. Doi, D., Morizane, A., Kikuchi, T., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Motono, M., Sasai, Y., Saiki, H., Gomi, M., et al. (2012). Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 30, 935–945. <https://doi.org/10.1002/stem.1060>.
220. Feldman, E.L., Boulis, N.M., Hur, J., Johe, K., Rutkove, S.B., Federici, T., Polak, M., Bordeau, J., Sakowski, S.A., and Glass, J.D. (2014). Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: Phase 1 trial outcomes: ALS Stem Cell Transplantation. *Annals of Neurology* 75, 363–373. <https://doi.org/10.1002/ana.24113>.
221. Mazzini, L., Gelati, M., Profico, D.C., Sgaravizzi, G., Progetti Pensi, M., Muzi, G., Ricciolini, C., Rota Nodari, L., Carletti, S., Giorgi, C., et al. (2015). Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. *J Transl Med* 13, 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0371-2>.
222. Lv, Z., Li, Y., Wang, Y., Cong, F., Li, X., Cui, W., Han, C., Wei, Y., Hong, X., Liu, Y., et al. (2023). Safety and efficacy outcomes after intranasal administration of neural stem cells in cerebral palsy: a randomized phase 1/2 controlled trial. *Stem Cell Research & Therapy* 14, 23. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03234-y>.
223. Kalladka, D., Sinden, J., Pollock, K., Haig, C., McLean, J., Smith, W., McConnachie, A., Santosh, C., Bath, P.M., Dunn, L., et al. (2016). Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study. *Lancet* 388, 787–796. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30513-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30513-X).
224. Muir, K.W., Bulters, D., Willmot, M., Sprigg, N., Dixit, A., Ward, N., Tyrrell, P., Majid, A., Dunn, L., Bath, P., et al. (2020). Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 396–401. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322515>.
225. Curtis, E., Martin, J.R., Gabel, B., Sidhu, N., Rzesiewicz, T.K., Mandeville, R., Van Gorp, S., Leerink, M., Tadokoro, T., Marsala, S., et al. (2018). A First-in-Human, Phase I Study of Neural Stem Cell Transplantation for Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Stem Cell* 22, 941-950.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.014>.
226. Shin, J.C., Kim, K.N., Yoo, J., Kim, I.-S., Yun, S., Lee, H., Jung, K., Hwang, K., Kim, M., Lee, I.-S., et al. (2015). Clinical Trial of Human Fetal Brain-Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in Patients with Traumatic Cervical Spinal Cord Injury. *Neural Plasticity* 2015, e630932. <https://doi.org/10.1155/2015/630932>.
227. Genchi, A., Brambilla, E., Sangalli, F., Radaelli, M., Bacigaluppi, M., Furlan, R., Andolfo, A., Drago, D., Magagnotti, C., Scotti, G.M., et al. (2023). Neural stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis: an open-label, phase 1 study. *Nat Med* 29, 75–85. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02097-3>.
228. Leone, M.A., Gelati, M., Profico, D.C., Gobbi, C., Pravatà, E., Copetti, M., Conti, C., Abate, L., Amoroso, L., Apollo, F., et al. (2023). Phase I clinical trial of intracerebroventricular

- transplantation of allogeneic neural stem cells in people with progressive multiple sclerosis. *Cell Stem Cell* 30, 1597-1609.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.11.001>.
229. Buccitelli, C., and Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* 21, 630–644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>.
230. Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>.
231. Jiang, W., and Chen, L. (2020). Alternative splicing: Human disease and quantitative analysis from high-throughput sequencing. *Comput Struct Biotechnol J* 19, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.009>.
232. Khoury, G.A., Baliban, R.C., and Floudas, C.A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 1, 90. <https://doi.org/10.1038/srep00090>.
233. Smith, L.M., and Kelleher, N.L. (2013). Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods* 10, 186–187. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2369>.
234. Coorsen, J.R., and Padula, M.P. (2024). Proteomics—The State of the Field: The Definition and Analysis of Proteomes Should Be Based in Reality, Not Convenience. *Proteomes* 12, 14. <https://doi.org/10.3390/proteomes12020014>.
235. Doll, S., and Burlingame, A.L. (2015). Mass Spectrometry-Based Detection and Assignment of Protein Posttranslational Modifications. *ACS Chem. Biol.* 10, 63–71. <https://doi.org/10.1021/cb500904b>.
236. Vandermarliere, E., Stes, E., Gevaert, K., and Martens, L. (2016). Resolution of protein structure by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 35, 653–665. <https://doi.org/10.1002/mas.21450>.
237. Richards, A.L., Eckhardt, M., and Krogan, N.J. (2021). Mass spectrometry-based protein–protein interaction networks for the study of human diseases. *Molecular Systems Biology* 17, e8792. <https://doi.org/10.15252/msb.20188792>.
238. Malinowska, L., Cappelletti, V., Kohler, D., Piazza, I., Tsai, T.-H., Pepelnjak, M., Stalder, P., Dörig, C., Sesterhenn, F., Elsässer, F., et al. (2023). Proteome-wide structural changes measured with limited proteolysis-mass spectrometry: an advanced protocol for high-throughput applications. *Nat Protoc* 18, 659–682. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00771-x>.
239. Bennett, J.L., Nguyen, G.T.H., and Donald, W.A. (2022). Protein–Small Molecule Interactions in Native Mass Spectrometry. *Chem. Rev.* 122, 7327–7385. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00293>.
240. Bandura, D.R., Baranov, V.I., Ornatsky, O.I., Antonov, A., Kinach, R., Lou, X., Pavlov, S., Vorobiev, S., Dick, J.E., and Tanner, S.D. (2009). Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 6813–6822. <https://doi.org/10.1021/ac901049w>.
241. Giesen, C., Wang, H.A.O., Schapiro, D., Zivanovic, N., Jacobs, A., Hattendorf, B., Schöffler, P.J., Grolimund, D., Buhmann, J.M., Brandt, S., et al. (2014). Highly multiplexed imaging of tumor

- tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 11, 417–422. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2869>.
242. Cervenka, J. (2020). System wide proteomic approaches – methods and applications in neurodegeneration research. In *Translational Research in Serious Human Diseases (Academia)*, pp. 92–101.
243. Tyleckova, J., Cervenka, J., and Vodicka, P. (2020). Targeted proteomics in translational research of neurodegenerative diseases. In *Translational Research in Serious Human Diseases (Academia)*, pp. 112–122.
244. Kupcova Skalnikova, H., Cizkova, J., Cervenka, J., and Vodicka, P. (2017). Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2697. <https://doi.org/10.3390/ijms18122697>.
245. Hafko, R., Villapol, S., Nostramo, R., Symes, A., Sabban, E.L., Inagami, T., and Saavedra, J.M. (2013). Commercially Available Angiotensin II At2 Receptor Antibodies Are Nonspecific. *PLOS ONE* 8, e69234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069234>.
246. Mahmood, N., and Xie, J. (2014). An endogenous ‘non-specific’ protein detected by a His-tag antibody is human transcription regulator YY1. *Data Brief* 2, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2014.12.002>.
247. Frohner, I.E., Mudrak, I., Schüchner, S., Anrather, D., Hartl, M., Sontag, J.-M., Sontag, E., Wadzinski, B.E., Preglej, T., Ellmeier, W., et al. (2020). PP2AC Phospho-Tyr307 Antibodies Are Not Specific for this Modification but Are Sensitive to Other PP2AC Modifications Including Leu309 Methylation. *Cell Reports* 30, 3171-3182.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.035>.
248. Meier, F., Geyer, P.E., Virreira Winter, S., Cox, J., and Mann, M. (2018). BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes. *Nat Methods* 15, 440–448. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0003-5>.
249. Muntel, J., Gandhi, T., Verbeke, L., Bernhardt, O.M., Treiber, T., Bruderer, R., and Reiter, L. (2019). Surpassing 10 000 identified and quantified proteins in a single run by optimizing current LC-MS instrumentation and data analysis strategy. *Mol. Omics* 15, 348–360. <https://doi.org/10.1039/C9MO00082H>.
250. Reid, D.J., Thibert, S., and Zhou, M. (2023). Dissecting the structural heterogeneity of proteins by native mass spectrometry. *Protein Science* 32, e4612. <https://doi.org/10.1002/pro.4612>.
251. Po, A., and Eyers, C.E. (2023). Top-Down Proteomics and the Challenges of True Proteoform Characterization. *J. Proteome Res.* 22, 3663–3675. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00416>.
252. Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1, 845–867. <https://doi.org/10.1074/mcp.r200007-mcp200>.
253. Podwojski, K., Eisenacher, M., Kohl, M., Turewicz, M., Meyer, H.E., Rahnenführer, J., and Stephan, C. (2010). Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics. *Expert Rev Proteomics* 7, 249–261. <https://doi.org/10.1586/epr.09.107>.

254. Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A.K.A., and Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* *75*, 1895–1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>.
255. Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* *3*, 1154–1169. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200>.
256. Kitata, R.B., Yang, J.-C., and Chen, Y.-J. (2023). Advances in data-independent acquisition mass spectrometry towards comprehensive digital proteome landscape. *Mass Spectrometry Reviews* *42*, 2324–2348. <https://doi.org/10.1002/mas.21781>.
257. Gillet, L.C., Navarro, P., Tate, S., Röst, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012). Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* *11*, O111.016717. <https://doi.org/10.1074/mcp.O111.016717>.
258. Collins, B.C., Hunter, C.L., Liu, Y., Schilling, B., Rosenberger, G., Bader, S.L., Chan, D.W., Gibson, B.W., Gingras, A.-C., Held, J.M., et al. (2017). Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nat Commun* *8*, 291. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00249-5>.
259. Lange, V., Picotti, P., Domon, B., and Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* *4*, 222. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>.
260. R: The R Project for Statistical Computing <https://www.r-project.org/>.
261. Lenth, R.V., Bolker, B., Buerkner, P., Giné-Vázquez, I., Herve, M., Jung, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., and Singmann, H. (2024). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Version 1.10.1.
262. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* *9*, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
263. Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* *9*, 62–66. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>.
264. Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* *224*, 213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>.
265. Sanz, H., Aponte, J.J., Harezlak, J., Dong, Y., Ayestaran, A., Nhabomba, A., Mpina, M., Maurin, O.R., Díez-Padrisa, N., Aguilar, R., et al. (2017). drLumi: An open-source package to manage data, calibrate, and conduct quality control of multiplex bead-based immunoassays data analysis. *PLOS ONE* *12*, e0187901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187901>.
266. SRMATlas Home <https://srmatlas.org/>.
267. MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., and MacCoss, M.J. (2010). Skyline: an open source document editor for

- creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966–968. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>.
268. UniProt Consortium, T. (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 46, 2699. <https://doi.org/10.1093/nar/gky092>.
269. Pino, L.K., Searle, B.C., Bollinger, J.G., Nunn, B., MacLean, B., and MacCoss, M.J. (2020). The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. *Mass Spectrom Rev* 39, 229–244. <https://doi.org/10.1002/mas.21540>.
270. Reiter, L., Rinner, O., Picotti, P., Hüttenhain, R., Beck, M., Brusniak, M.-Y., Hengartner, M.O., and Aebersold, R. (2011). mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments. *Nat Methods* 8, 430–435. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1584>.
271. Choi, M., Chang, C.-Y., Clough, T., Broudy, D., Killeen, T., MacLean, B., and Vitek, O. (2014). MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *Bioinformatics* 30, 2524–2526. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu305>.
272. Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
273. Alhamdoosh, M., Ng, M., Wilson, N.J., Sheridan, J.M., Huynh, H., Wilson, M.J., and Ritchie, M.E. (2017). Combining multiple tools outperforms individual methods in gene set enrichment analyses. *Bioinformatics* 33, 414–424. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw623>.
274. Kumar, L., and E Futschik, M. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* 2, 5–7. <https://doi.org/10.6026/97320630002005>.
275. Yeo, T.K., Senger, D.R., Dvorak, H.F., Freter, L., and Yeo, K.T. (1991). Glycosylation is essential for efficient secretion but not for permeability-enhancing activity of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor). *Biochem Biophys Res Commun* 179, 1568–1575. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91752-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91752-x).
276. Keck, R.G., Berleau, L., Harris, R., and Keyt, B.A. (1997). Disulfide Structure of the Heparin Binding Domain in Vascular Endothelial Growth Factor: Characterization of Posttranslational Modifications in VEGF. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344, 103–113. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0145>.
277. Hu-Lowe, D.D., Zou, H.Y., Grazzini, M.L., Hallin, M.E., Wickman, G.R., Amundson, K., Chen, J.H., Rewolinski, D.A., Yamazaki, S., Wu, E.Y., et al. (2008). Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3. *Clin Cancer Res* 14, 7272–7283. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0652>.
278. Rifai, N., Gillette, M.A., and Carr, S.A. (2006). Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 24, 971–983. <https://doi.org/10.1038/nbt1235>.
279. Menalled, L.B. (2005). Knock-in mouse models of Huntington’s disease. *Neurotherapeutics* 2, 465–470. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.465>.

280. Ellenbroek, B., and Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech* 9, 1079–1087. <https://doi.org/10.1242/dmm.026120>.
281. Yang, S.-H., Cheng, P.-H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.-J., Cheng, E.C.H., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., et al. (2008). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453, 921–924. <https://doi.org/10.1038/nature06975>.
282. Jacobsen, J.C., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan, C.J., Reid, S.J., Waldvogel, H.J., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Walker, S.K., Kelly, J.M., et al. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics* 19, 1873–1882. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq063>.
283. Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanohara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., et al. (2013). A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease* 2, 47–68. <https://doi.org/10.3233/JHD-130001>.
284. Evers, M.M., Miniarikova, J., Juhas, S., Vallès, A., Bohuslavova, B., Juhasova, J., Skalnikova, H.K., Vodicka, P., Valekova, I., Brouwers, C., et al. (2018). AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model. *Molecular Therapy* 26, 2163–2177. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.06.021>.
285. Vallès, A., Evers, M.M., Stam, A., Sogorb-Gonzalez, M., Brouwers, C., Vendrell-Tornero, C., Acar-Broekmans, S., Paerels, L., Klima, J., Bohuslavova, B., et al. (2021). Widespread and sustained target engagement in Huntington's disease minipigs upon intrastriatal microRNA-based gene therapy. *Science Translational Medicine* 13, eabb8920. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb8920>.
286. Tang, Y., Yu, P., and Cheng, L. (2017). Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis* 8, e3108–e3108. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.504>.
287. Nicaise, A.M., D'Angelo, A., Ionescu, R.-B., Krzak, G., Willis, C.M., and Pluchino, S. (2022). The role of neural stem cells in regulating glial scar formation and repair. *Cell Tissue Res* 387, 399–414. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03554-0>.
288. Robertson, J.A. (2001). Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat Rev Genet* 2, 74–78. <https://doi.org/10.1038/35047594>.
289. Swijnenburg, R.-J., Schrepfer, S., Cao, F., Pearl, J.I., Xie, X., Connolly, A.J., Robbins, R.C., and Wu, J.C. (2008). In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation. *Stem Cells Dev* 17, 1023–1029. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0091>.
290. Rong, Z., Wang, M., Hu, Z., Stradner, M., Zhu, S., Kong, H., Yi, H., Goldrath, A., Yang, Y.-G., Xu, Y., et al. (2014). An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell* 14, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.014>.
291. Pitonak, M., Aceves, M., Kumar, P.A., Dampf, G., Green, P., Tucker, A., Dietz, V., Miranda, D., Letchuman, S., Jonika, M.M., et al. (2022). Effects of biological sex mismatch on neural progenitor cell transplantation for spinal cord injury in mice. *Nat Commun* 13, 5380. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33134-x>.

292. Liu, J. (2013). Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells: new hope for stroke? *Stem Cell Research & Therapy* 4, 115. <https://doi.org/10.1186/scrt326>.
293. Scesa, G., Adami, R., and Bottai, D. (2021). iPSC Preparation and Epigenetic Memory: Does the Tissue Origin Matter? *Cells* 10, 1470. <https://doi.org/10.3390/cells10061470>.
294. Ohnuki, M., and Takahashi, K. (2015). Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 20140367. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0367>.
295. Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P.J., Mácia, A., Sanchez, L., Ligeró, G., Garcia-Parez, J.L., and Menendez, P. (2010). Human Induced Pluripotent Stem Cells Develop Teratoma More Efficiently and Faster Than Human Embryonic Stem Cells Regardless the Site of Injection. *Stem Cells* 28, 1568–1570. <https://doi.org/10.1002/stem.471>.
296. Chen, Y.-T., DeJozey, M., Zwaka, T.P., and Behringer, R.R. (2008). H1 and H9 Human Embryonic Stem Cell Lines Are Heterozygous for the ABO Locus. *Stem Cells Dev* 17, 853–855. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0226>.
297. Liu, A., Zhang, D., Liu, L., Gong, J., and Liu, C. (2015). A simple method for differentiation of H9 cells into neuroectoderm. *Tissue Cell* 47, 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.07.006>.
298. Chen, X., Zhao, T., Ke, N., Qian, Y., Wang, W., Liu, L., and Liu, C. (2022). In-vitro differentiation of human embryonic stem cells into spinal cord neural stem cells. *Neuroreport* 33, 518–525. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001812>.
299. Alisch, M., Kerkering, J., Crowley, T., Rosiewicz, K., Paul, F., and Siffrin, V. (2021). Identification of the gliogenic state of human neural stem cells to optimize in vitro astrocyte differentiation. *J Neurosci Methods* 361, 109284. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109284>.
300. de Leeuw, V.C., van Oostrom, C.T.M., Westerink, R.H.S., Piersma, A.H., Heusinkveld, H.J., and Hessel, E.V.S. (2020). An efficient neuron-astrocyte differentiation protocol from human embryonic stem cell-derived neural progenitors to assess chemical-induced developmental neurotoxicity. *Reproductive Toxicology* 98, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.09.003>.
301. Iacovitti, L., Donaldson, A.E., Marshall, C.E., Suon, S., and Yang, M. (2007). A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: Studies in vitro and in vivo. *Brain Research* 1127, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.022>.
302. Liao, M.-C., Diaconu, M., Monecke, S., Collombat, P., Timaeus, C., Kuhlmann, T., Paulus, W., Trenkwalder, C., Dressel, R., and Mansouri, A. (2014). Embryonic stem cell-derived neural progenitors as non-tumorigenic source for dopaminergic neurons. *World J Stem Cells* 6, 248–255. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.248>.
303. Lu, D., Chen, E.Y.T., Lee, P., Wang, Y.-C., Ching, W., Markey, C., Gulstrom, C., Chen, L.-C., Nguyen, T., and Chin, W.-C. (2015). Accelerated Neuronal Differentiation Toward Motor Neuron Lineage from Human Embryonic Stem Cell Line (H9). *Tissue Eng Part C Methods* 21, 242–252. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0725>.
304. Carr-Wilkinson, J., Prathalingam, N., Pal, D., Moad, M., Lee, N., Sundaresh, A., Forgham, H., James, P., Herbert, M., Lako, M., et al. (2018). Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

- to Sympathetic Neurons: A Potential Model for Understanding Neuroblastoma Pathogenesis. *Stem Cells Int* 2018, 4391641. <https://doi.org/10.1155/2018/4391641>.
305. Wu, H.-F., Art, J., Saini, T., and Zeltner, N. (2024). Protocol for generating postganglionic sympathetic neurons using human pluripotent stem cells for electrophysiological and functional assessments. *STAR Protocols* 5, 102970. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.102970>.
306. Tam, R.W., and Keung, A.J. (2023). Profiling transcriptomic responses of human stem cell-derived medium spiny neuron-like cells to exogenous phasic and tonic neurotransmitters. *Mol Cell Neurosci* 126, 103876. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2023.103876>.
307. Matsui, T.K., Matsubayashi, M., Sakaguchi, Y.M., Hayashi, R.K., Zheng, C., Sugie, K., Hasegawa, M., Nakagawa, T., and Mori, E. (2018). Six-month cultured cerebral organoids from human ES cells contain matured neural cells. *Neurosci Lett* 670, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.040>.
308. De Kleijn, K.M.A., Zuure, W.A., Straasheijm, K.R., Martens, M.B., Avramut, M.C., Koning, R.I., and Martens, G.J.M. (2023). Human cortical spheroids with a high diversity of innately developing brain cell types. *Stem Cell Res Ther* 14, 50. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03261-3>.
309. Nguyen, L.S., Fregeac, J., Bole-Feysot, C., Cagnard, N., Iyer, A., Anink, J., Aronica, E., Alibeu, O., Nitschke, P., and Colleaux, L. (2018). Role of miR-146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: relevance for neurodevelopmental disorders. *Mol Autism* 9, 38. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0219-3>.
310. Balbous, A., Cortes, U., Guilloteau, K., Villalva, C., Flamant, S., Gaillard, A., Milin, S., Wager, M., Sorel, N., Guilhot, J., et al. (2014). A mesenchymal glioma stem cell profile is related to clinical outcome. *Oncogenesis* 3, e91. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.5>.
311. Martin, L.J., and Chang, Q. (2018). DNA Damage Response and Repair, DNA Methylation, and Cell Death in Human Neurons and Experimental Animal Neurons Are Different. *J Neuropathol Exp Neurol* 77, 636–655. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly040>.
312. Revkova, V.A., Grebenik, E.A., Kalsin, V.A., Demina, T.S., Bardakova, K.N., Shavkuta, B.S., Melnikov, P.A., Samoilova, E.M., Konoplyannikov, M.A., Efremov, Y.M., et al. (2020). Chitosan-g-oligo(L,L-lactide) Copolymer Hydrogel Potential for Neural Stem Cell Differentiation. *Tissue Eng Part A* 26, 953–963. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2019.0265>.
313. Pottmeier, P., Doszyn, O., Peuckert, C., and Jazin, E. (2020). Increased Expression of Y-Encoded Demethylases During Differentiation of Human Male Neural Stem Cells. *Stem Cells Dev* 29, 1497–1509. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0138>.
314. Ooi, J., Langley, S.R., Xu, X., Utami, K.H., Sim, B., Huang, Y., Harmston, N.P., Tay, Y.L., Ziaei, A., Zeng, R., et al. (2019). Unbiased Profiling of Isogenic Huntington Disease hPSC-Derived CNS and Peripheral Cells Reveals Strong Cell-Type Specificity of CAG Length Effects. *Cell Reports* 26, 2494–2508.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.008>.
315. Bohaciakova, D., Hruska-Plochan, M., Tsunemoto, R., Gifford, W.D., Driscoll, S.P., Glenn, T.D., Wu, S., Marsala, S., Navarro, M., Tadokoro, T., et al. (2019). A scalable solution for isolating human multipotent clinical-grade neural stem cells from ES precursors. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 83. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1163-7>.



316. Schwindt, T.T., Motta, F.L., Gabriela F, B., Cristina G, M., Guimarães, A.O., Calcagnotto, M.E., Pesquero, J.B., and Mello, L.E. (2009). Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. *An Acad Bras Cienc* 81, 443–452. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300009>.
317. Kalcheim, C., and Gendreau, M. (1988). Brain-derived neurotrophic factor stimulates survival and neuronal differentiation in cultured avian neural crest. *Brain Res* 469, 79–86. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(88\)90171-x](https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90171-x).
318. Lim, J.Y., Park, S.I., Oh, J.H., Kim, S.M., Jeong, C.H., Jun, J.A., Lee, K.-S., Oh, W., Lee, J.-K., and Jeun, S.-S. (2008). Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res* 86, 2168–2178. <https://doi.org/10.1002/jnr.21669>.
319. Ahmed, S., Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1995). BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci* 15, 5765–5778. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-08-05765.1995>.
320. Liu, F., Xuan, A., Chen, Y., Zhang, J., Xu, L., Yan, Q., and Long, D. (2014). Combined effect of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on neuronal differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms. *Molecular Medicine Reports* 10, 1739–1745. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2393>.
321. Waterhouse, E.G., An, J.J., Orefice, L.L., Baydyuk, M., Liao, G.-Y., Zheng, K., Lu, B., and Xu, B. (2012). BDNF Promotes Differentiation and Maturation of Adult-born Neurons through GABAergic Transmission. *J. Neurosci.* 32, 14318–14330. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0709-12.2012>.
322. Martins, L.F., Costa, R.O., Pedro, J.R., Aguiar, P., Serra, S.C., Teixeira, F.G., Sousa, N., Salgado, A.J., and Almeida, R.D. (2017). Mesenchymal stem cells secretome-induced axonal outgrowth is mediated by BDNF. *Sci Rep* 7, 4153. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03592-1>.
323. Rosenblum, S., Smith, T.N., Wang, N., Chua, J.Y., Westbroek, E., Wang, K., and Guzman, R. (2015). BDNF Pretreatment of Human Embryonic-Derived Neural Stem Cells Improves Cell Survival and Functional Recovery After Transplantation in Hypoxic-Ischemic Stroke. *Cell Transplant* 24, 2449–2461. <https://doi.org/10.3727/096368914X679354>.
324. Ko, J.-Y., Lee, H.-S., Park, C.-H., Koh, H.-C., Lee, Y.-S., and Lee, S.-H. (2009). Conditions for Tumor-free and Dopamine Neuron-enriched Grafts After Transplanting Human ES Cell-derived Neural Precursor Cells. *Molecular Therapy* 17, 1761–1770. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.148>.
325. Roussa, E., and Kriegstein, K. (2004). GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres. *Neurosci Lett* 361, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.106>.
326. Pozas, E., and Ibáñez, C.F. (2005). GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* 45, 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.043>.
327. Wang, F., Kameda, M., Yasuhara, T., Tajiri, N., Kikuchi, Y., Liang, H.B., Tayra, J.T., Shinko, A., Wakamori, T., Agari, T., et al. (2011). GDNF-pretreatment enhances the survival of neural stem

- cells following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 71, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.05.019>.
328. Baloh, R.H., Johnson, J.P., Avalos, P., Allred, P., Svendsen, S., Gowing, G., Roxas, K., Wu, A., Donahue, B., Osborne, S., et al. (2022). Transplantation of human neural progenitor cells secreting GDNF into the spinal cord of patients with ALS: a phase 1/2a trial. *Nat Med* 28, 1813–1822. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01956-3>.
  329. Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 625–635. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>.
  330. Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC Developmental Biology* 7, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-46>.
  331. Heinrich, C., Bergami, M., Gascón, S., Lepier, A., Viganò, F., Dimou, L., Sutor, B., Berninger, B., and Götz, M. (2014). Sox2-Mediated Conversion of NG2 Glia into Induced Neurons in the Injured Adult Cerebral Cortex. *Stem Cell Reports* 3, 1000–1014. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.007>.
  332. Fathi, A., Hatami, M., Vakilian, H., Han, C.-L., Chen, Y.-J., Baharvand, H., and Salekdeh, G.H. (2014). Quantitative proteomics analysis highlights the role of redox hemostasis and energy metabolism in human embryonic stem cell differentiation to neural cells. *Journal of Proteomics* 101, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.002>.
  333. Fathi, A., Pakzad, M., Taei, A., Brink, T.C., Pirhaji, L., Ruiz, G., Sharif Tabe Bordbar, M., Gourabi, H., Adjaye, J., Baharvand, H., et al. (2009). Comparative proteome and transcriptome analyses of embryonic stem cells during embryoid body-based differentiation. *PROTEOMICS* 9, 4859–4870. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900003>.
  334. Karpievitch, Y.V., Dabney, A.R., and Smith, R.D. (2012). Normalization and missing value imputation for label-free LC-MS analysis. *BMC Bioinformatics* 13, S5. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S16-S5>.
  335. Moritz, C.P. (2017). Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *PROTEOMICS* 17, 1600189. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600189>.
  336. Välikangas, T., Suomi, T., and Elo, L.L. (2018). A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Briefings in Bioinformatics* 19, 1–11. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw095>.
  337. Godoy, P., Schmidt-Heck, W., Natarajan, K., Lucendo-Villarin, B., Szkolnicka, D., Asplund, A., Björquist, P., Widera, A., Stöber, R., Campos, G., et al. (2015). Gene networks and transcription factor motifs defining the differentiation of stem cells into hepatocyte-like cells. *Journal of Hepatology* 63, 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.05.013>.
  338. Katsetos, C.D., Frankfurter, A., Christakos, S., Mancall, E.L., Vlachos, I.N., and Urich, H. (1993). Differential localization of class III, beta-tubulin isotype and calbindin-D28k defines distinct neuronal types in the developing human cerebellar cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 52, 655–666. <https://doi.org/10.1097/00005072-199311000-00013>.

339. Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., and Deloulme, J.-C. (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165–177. <https://doi.org/10.1002/glia.20445>.
340. Vives, V., Alonso, G., Solal, A.C., Joubert, D., and Legraverend, C. (2003). Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 457, 404–419. <https://doi.org/10.1002/cne.10552>.
341. Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., and Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* 51, 81–97. <https://doi.org/10.1002/glia.20184>.
342. Du, J., Yi, M., Zhou, F., He, W., Yang, A., Qiu, M., and Huang, H. (2021). S100B is selectively expressed by gray matter protoplasmic astrocytes and myelinating oligodendrocytes in the developing CNS. *Molecular Brain* 14, 154. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00865-9>.
343. Nezvedová, M., Jha, D., Váňová, T., Gadara, D., Klímová, H., Raška, J., Opálka, L., Bohačiková, D., and Spáčil, Z. (2023). Single Cerebral Organoid Mass Spectrometry of Cell-Specific Protein and Glycosphingolipid Traits. *Anal. Chem.* 95, 3160–3167. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00981>.
344. Liu, C., Zhong, Y., Apostolou, A., and Fang, S. (2013). Neural differentiation of human embryonic stem cells as an *in vitro* tool for the study of the expression patterns of the neuronal cytoskeleton during neurogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 439, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.130>.
345. Bott, C.J., and Winckler, B. (2020). Intermediate filaments in developing neurons: Beyond structure. *Cytoskeleton* 77, 110–128. <https://doi.org/10.1002/cm.21597>.
346. Chen, Y.Q., Rafi, M.A., de Gala, G., and Wenger, D.A. (1993). Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy. *Hum Mol Genet* 2, 1841–1845. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.11.1841>.
347. Visigalli, I., Ungari, S., Martino, S., Park, H., Cesani, M., Gentner, B., Sergi Sergi, L., Orlacchio, A., Naldini, L., and Biffi, A. (2010). The galactocerebrosidase enzyme contributes to the maintenance of a functional hematopoietic stem cell niche. *Blood* 116, 1857–1866. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-256461>.
348. Fröhlich, K., Brombacher, E., Fahrner, M., Vogele, D., Kook, L., Pinter, N., Bronsert, P., Timme-Bronsert, S., Schmidt, A., Bärenfaller, K., et al. (2022). Benchmarking of analysis strategies for data-independent acquisition proteomics using a large-scale dataset comprising inter-patient heterogeneity. *Nat Commun* 13, 2622. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30094-0>.
349. Yang, Y., Liu, X., Shen, C., Lin, Y., Yang, P., and Qiao, L. (2020). In silico spectral libraries by deep learning facilitate data-independent acquisition proteomics. *Nat Commun* 11, 146. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13866-z>.
350. Cai, Y., Wu, P., Ozen, M., Yu, Y., Wang, J., Ittmann, M., and Liu, M. (2006). Gene expression profiling and analysis of signaling pathways involved in priming and differentiation of human neural stem cells. *Neuroscience* 138, 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.041>.

351. Song, Y., Subramanian, K., Berberich, M.J., Rodriguez, S., Latorre, I.J., Luria, C.M., Everley, R., Albers, M.W., Mitchison, T.J., and Sorger, P.K. (2019). A dynamic view of the proteomic landscape during differentiation of ReNcell VM cells, an immortalized human neural progenitor line. *Sci Data* 6, 190016. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.16>.
352. van Oijen, M.G., Medema, R.H., Slootweg, P.J., and Rijksen, G. (1998). Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 110, 24–31. <https://doi.org/10.1093/ajcp/110.1.24>.
353. Stamatiou, K., Huguet, F., Serapinas, L.V., Spanos, C., Rappsilber, J., and Vagnarelli, P. (2024). Ki-67 is necessary during DNA replication for fork protection and genome stability. *Genome Biology* 25, 105. <https://doi.org/10.1186/s13059-024-03243-5>.
354. Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., and Gerlich, D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535, 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature18610>.
355. Garwain, O., Sun, X., Iyer, D.R., Li, R., Zhu, L.J., and Kaufman, P.D. (2021). The chromatin-binding domain of Ki-67 together with p53 protects human chromosomes from mitotic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2021998118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021998118>.
356. Sobecki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisis, N., Nicolas, E., Llères, D., Gerbe, F., Prieto, S., Krasinska, L., David, A., et al. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife* 5, e13722. <https://doi.org/10.7554/eLife.13722>.
357. Mrouj, K., Andrés-Sánchez, N., Dubra, G., Singh, P., Sobecki, M., Chahar, D., Al Ghoul, E., Aznar, A.B., Prieto, S., Pirot, N., et al. (2021). Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2026507118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2026507118>.
358. Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., and Vermeulen, W. (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* 25, 9350–9359. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9350-9359.2005>.
359. Wang, S., Li, Z., Shen, H., Zhang, Z., Yin, Y., Wang, Q., Zhao, X., and Ji, J. (2016). Quantitative Phosphoproteomic Study Reveals that Protein Kinase A Regulates Neural Stem Cell Differentiation Through Phosphorylation of Catenin Beta-1 and Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ . *Stem Cells* 34, 2090–2101. <https://doi.org/10.1002/stem.2387>.
360. Vallée, A., Guillevin, R., and Vallée, J.-N. (2018). Vasculogenesis and angiogenesis initiation under normoxic conditions through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gliomas. *Rev Neurosci* 29, 71–91. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0032>.
361. Večeřa, J., Procházková, J., Šumberová, V., Pánská, V., Paculová, H., Lánová, M.K., Mašek, J., Boháčiková, D., Andersson, E.R., and Pacherník, J. (2020). Hypoxia/Hif1 $\alpha$  prevents premature neuronal differentiation of neural stem cells through the activation of Hes1. *Stem Cell Research* 45, 101770. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101770>.
362. Cui, P., Zhang, P., Yuan, L., Wang, L., Guo, X., Cui, G., Zhang, Y., Li, M., Zhang, X., Li, X., et al. (2021). HIF-1 $\alpha$  Affects the Neural Stem Cell Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells via MFN2-Mediated Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.671704>.

363. Hijroudi, F., Rahbarghazi, R., Sadigh-Eteghad, S., Bahlakeh, G., Hassanpour, M., Shimia, M., and Karimipour, M. (2022). Neural Stem Cells Secretome Increased Neurogenesis and Behavioral Performance and the Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuromol Med* 24, 424–436. <https://doi.org/10.1007/s12017-022-08708-z>.
364. Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., Kupcova Skalnikova, H., Vodicka, P., and Kubinova, S. (2020). A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Sci Rep* 10, 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>.
365. Gill, S.S., Patel, N.K., Hotton, G.R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., Brooks, D.J., Svendsen, C.N., and Heywood, P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9, 589–595. <https://doi.org/10.1038/nm850>.
366. Patel, N.K., Bunnage, M., Plaha, P., Svendsen, C.N., Heywood, P., and Gill, S.S. (2005). Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* 57, 298–302. <https://doi.org/10.1002/ana.20374>.
367. Deng, M., Xiao, H., Peng, H., Yuan, H., Xu, Y., Zhang, G., Tang, J., and Hu, Z. (2018). Preservation of neuronal functions by exosomes derived from different human neural cell types under ischemic conditions. *Eur J Neurosci* 47, 150–157. <https://doi.org/10.1111/ejn.13784>.
368. Storer, M.A., Gallagher, D., Fatt, M.P., Simonetta, J.V., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2018). Interleukin-6 Regulates Adult Neural Stem Cell Numbers during Normal and Abnormal Postnatal Development. *Stem Cell Reports* 10, 1464–1480. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.008>.
369. Oh, J., McCloskey, M.A., Blong, C.C., Bendickson, L., Nilsen-Hamilton, M., and Sakaguchi, D.S. (2010). Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. *J Neurosci Res* 88, 2798–2809. <https://doi.org/10.1002/jnr.22447>.
370. Kim, W.K., Kim, D., Cui, J., Jang, H.H., Kim, K.S., Lee, H.J., Kim, S.U., and Ahn, S.-M. (2014). Secretome analysis of human oligodendrocytes derived from neural stem cells. *PLoS One* 9, e84292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084292>.
371. Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J., and Weissenberger, J. (2005). Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* 115, 202–213. <https://doi.org/10.1002/ijc.20871>.
372. Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S., Gritsko, T., Turkson, J., Kay, H., Semenza, G.L., et al. (2005). Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 24, 5552–5560. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208719>.
373. Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D.W. (1991). The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 5, 1806–1814. <https://doi.org/10.1210/mend-5-12-1806>.

374. Park, J.E., Keller, G.A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *MBoc* 4, 1317–1326. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.12.1317>.
375. Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R.K., Peale, F., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Koch, A.W., and Watts, R.J. (2007). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 282, 24049–24056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703554200>.
376. Zhu, W., Mao, Y., Zhao, Y., Zhou, L.-F., Wang, Y., Zhu, J.-H., Zhu, Y., and Yang, G.-Y. (2005). Transplantation of vascular endothelial growth factor-transfected neural stem cells into the rat brain provides neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 57, 325–333; discussion 325-333. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000166682.50272.bc>.
377. Tillo, M., Erskine, L., Cariboni, A., Fantin, A., Joyce, A., Denti, L., and Ruhrberg, C. (2015). VEGF189 binds NRP1 and is sufficient for VEGF/NRP1-dependent neuronal patterning in the developing brain. *Development* 142, 314–319. <https://doi.org/10.1242/dev.115998>.
378. Hashimoto, T., Zhang, X.-M., Chen, B.Y., and Yang, X.-J. (2006). VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development* 133, 2201–2210. <https://doi.org/10.1242/dev.02385>.
379. Hao, T., and Rockwell, P. (2013). Signaling through the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 protects hippocampal neurons from mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 63, 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.036>.
380. Manoonkitiwongsa, P.S., Schultz, R.L., McCreery, D.B., Whitter, E.F., and Lyden, P.D. (2004). Neuroprotection of Ischemic Brain by Vascular Endothelial Growth Factor is Critically Dependent on Proper Dosage and May Be Compromised by Angiogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000126236.54306.21>.
381. Yasuhara, T., Shingo, T., Muraoka, K., wen ji, Y., Kameda, M., Takeuchi, A., Yano, A., Nishio, S., Matsui, T., Miyoshi, Y., et al. (2005). The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of in vitro and in vivo Parkinson's disease model. *Brain Research* 1038, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.055>.
382. Ellison, S.M., Trabalza, A., Tisato, V., Pazarentzos, E., Lee, S., Papadaki, V., Goniotaki, D., Morgan, S., Mirzaei, N., and Mazarakis, N.D. (2013). Dose-dependent Neuroprotection of VEGF165 in Huntington's Disease Striatum. *Molecular Therapy* 21, 1862–1875. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.132>.
383. Tessler, S., Rockwell, P., Hicklin, D., Cohen, T., Levi, B.Z., Witte, L., Lemischka, I.R., and Neufeld, G. (1994). Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J Biol Chem* 269, 12456–12461.
384. Gitay-Goren, H., Cohen, T., Tessler, S., Soker, S., Gengrinovitch, S., Rockwell, P., Klagsbrun, M., Levi, B.-Z., and Neufeld, G. (1996). Selective Binding of VEGF121 to One of the Three Vascular Endothelial Growth Factor Receptors of Vascular Endothelial Cells (\*). *Journal of Biological Chemistry* 271, 5519–5523. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5519>.
385. Brandner, B., Kurkela, R., Vihko, P., and Kungl, A.J. (2006). Investigating the effect of VEGF glycosylation on glycosaminoglycan binding and protein unfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 836–839. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.079>.

386. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework (2001). *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 69, 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
387. Byrne, L.M., Rodrigues, F.B., Johnson, E.B., Wijeratne, P.A., De Vita, E., Alexander, D.C., Palermo, G., Czech, C., Schobel, S., Scahill, R.I., et al. (2018). Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington’s disease. *Science Translational Medicine* 10, eaat7108. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat7108>.
388. Evered, L., Silbert, B., Scott, D.A., Zetterberg, H., and Blennow, K. (2018). Association of Changes in Plasma Neurofilament Light and Tau Levels With Anesthesia and Surgery: Results From the CAPACITY and ARCADIAN Studies. *JAMA Neurol* 75, 542–547. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4913>.
389. Olsson, B., Portelius, E., Cullen, N.C., Sandelius, Å., Zetterberg, H., Andreasson, U., Höglund, K., Irwin, D.J., Grossman, M., Weintraub, D., et al. (2019). Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein Levels With Cognition in Patients With Dementia, Motor Neuron Disease, and Movement Disorders. *JAMA Neurol* 76, 318–325. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.3746>.
390. Niemela, V., Landtblom, A.-M., Nyholm, D., Kneider, M., Constantinescu, R., Paucar, M., Svenningsson, P., Abujrais, S., Burman, J., Shevchenko, G., et al. (2021). Proenkephalin Decreases in Cerebrospinal Fluid with Symptom Progression of Huntington’s Disease. *Mov Disord* 36, 481–491. <https://doi.org/10.1002/mds.28391>.
391. Al Shweiki, M.R., Oeckl, P., Pachollek, A., Steinacker, P., Barschke, P., Halbgebauer, S., Anderl-Straub, S., Lewerenz, J., Ludolph, A.C., Bernhard Landwehrmeyer, G., et al. (2021). Cerebrospinal Fluid Levels of Prodynorphin-Derived Peptides are Decreased in Huntington’s Disease. *Mov Disord* 36, 492–497. <https://doi.org/10.1002/mds.28300>.
392. Barschke, P., Abu-Rumeileh, S., Al Shweiki, M.H.D.R., Barba, L., Paolini Paoletti, F., Oeckl, P., Steinacker, P., Halbgebauer, S., Gaetani, L., Lewerenz, J., et al. (2022). Cerebrospinal fluid levels of proenkephalin and prodynorphin are differentially altered in Huntington’s and Parkinson’s disease. *J Neurol* 269, 5136–5143. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11187-8>.
393. Caron, N.S., Haqqani, A.S., Sandhu, A., Aly, A.E., Findlay Black, H., Bone, J.N., McBride, J.L., Abulrob, A., Stanimirovic, D., Leavitt, B.R., et al. (2022). Cerebrospinal fluid biomarkers for assessing Huntington disease onset and severity. *Brain Commun* 4, fcac309. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac309>.
394. You, H., Wu, T., Du, G., Huang, Y., Zeng, Y., Lin, L., Chen, D., Wu, C., Li, X., Burgunder, J., et al. (2021). Evaluation of Blood Glial Fibrillary Acidic Protein as a Potential Marker in Huntington’s Disease. *Front. Neurol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.779890>.
395. Dalrymple, A., Wild, E.J., Joubert, R., Sathasivam, K., Björkqvist, M., Petersén, A., Jackson, G.S., Isaacs, J.D., Kristiansen, M., Bates, G.P., et al. (2007). Proteomic profiling of plasma in Huntington’s disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *J Proteome Res* 6, 2833–2840. <https://doi.org/10.1021/pr0700753>.
396. Silajdžić, E., Rezeli, M., Végvári, Á., Lahiri, N., Andre, R., Magnusson-Lind, A., Nambron, R., Kalliolia, E., Marko-Varga, G., Warner, T.T., et al. (2013). A critical evaluation of inflammatory markers in Huntington’s Disease plasma. *J Huntingtons Dis* 2, 125–134. <https://doi.org/10.3233/JHD-130049>.

397. Rezeli, M., Végvári, Á., Silajdžić, E., Björkqvist, M., Tabrizi, S.J., Laurell, T., and Marko-Varga, G. (2014). Inflammatory markers in Huntington's disease plasma—A robust nanoLC–MRM-MS assay development. *EuPA Open Proteomics* 3, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.02.003>.
398. Oikari, L.E., Okolicsanyi, R.K., Griffiths, L.R., and Haupt, L.M. (2016). Data defining markers of human neural stem cell lineage potential. *Data Brief* 7, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.02.030>.
399. Wu, Y., Richard, J., Wang, S.D., Rath, P., Lattera, J., and Xia, S. (2012). Regulation of glioblastoma multiforme stem-like cells by inhibitor of DNA binding proteins and oligodendroglial lineage-associated transcription factors. *Cancer Sci* 103, 1028–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02260.x>.
400. Page, R.L., Ambady, S., Holmes, W.F., Vilner, L., Kole, D., Kashpur, O., Huntress, V., Vojtic, I., Whitton, H., and Dominko, T. (2009). Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning Stem Cells* 11, 417–426. <https://doi.org/10.1089/clo.2009.0015>.
401. Shahbazi, E., Moradi, S., Nemati, S., Satarian, L., Basiri, M., Gourabi, H., Zare Mehrjardi, N., Günther, P., Lampert, A., Händler, K., et al. (2016). Conversion of Human Fibroblasts to Stably Self-Renewing Neural Stem Cells with a Single Zinc-Finger Transcription Factor. *Stem Cell Reports* 6, 539–551. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.02.013>.



## Přílohy

Příloha 1: Seznam primerů použitých pro RT-qPCR

Gen	Primery	Velikost produktu	Referenční sekvence	Reference
<i>ATP5F1B</i>	TGCTCCCATTCATGCTGAGG	140	NM_001686.4	10
	CTCCAGCACCACCAAAAAGC			
<i>DCX</i>	TATGCGCCGAAGCAAGTCTC	150	NM_178152.2	398
	TACAGGTCCTTGTGCTTCCG			
<i>GALC</i>	GCCAAGCGTTACCATGATTT	123	NM_001201402.1	399
	TTTCACTCGCTGGAGACCTT			
<i>GAPDH</i>	ATCACCATCTTCCAGGAGCGA	101	NM_001357943.2	400
	TTCTCCATGGTGGTGAAGACG			
<i>GFAP</i>	GAGGTTGAGAGGGACAATCTGG	128	NM_002055.4	398
	GTGGCTTCATCTGCTTCTGTC			
<i>MAP2</i>	GACTGCAGCTCTGCCTTTAG	106	NM_002374.3	398
	AAGTAAATCTTCTCCACTGTGAC			
<i>NES</i>	CTCAGCTTTCAGGACCCCAA	128	NM_006617.1	398
	GTCTCAAGGGTAGCAGGCAA			
<i>OLIG1</i>	TGTCGCAGAGAGTTTTCGCT	146	NM_138983.3	10
	ATGCAAGGCGGTTGGTTTTTC			
<i>POU5F1</i>	TCGAGAACCGAGTGAGAGG	125	NM_002701.5	400
	GAACCACACTCGGACCACA			
<i>S100B</i>	TTCTGGAAGGGAGGGAGACA	103	NM_006272.2	398
	CTCCTGCTCTTTGATTCCTCT			
<i>SOX2</i>	ACCTCTTCCCTCCCACTCCAG	134	NM_003106.4	401
	CTCTGGTAGTGCTGGGACATG			
<i>TUBB3</i>	GGCCAAGTTCTGGGAAGTCAT	137	NM_006086.3	398
	CTCGAGGCACGTACTIONTGTGA			

Příloha 2: Protilátky použité pro imunocytochemii

<b>Antigen</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Katalogové číslo</b>	<b>Organismus</b>	<b>Ředění</b>
Nestin	Abcam	ab22035	myš	1:1000
Transcription factor SOX-2	Life Technologies	A24339	králík	1:300
Neuronal migration protein doublecortin	Abcam	ab135349	myš	1:200
Tubulin beta-3 chain	Sigma-Aldrich	T4026	myš	1:100
Microtubule-associated protein 2	Abcam	ab7756	myš	1:200
Glial fibrillary acidic protein	Abcam	ab10062	myš	1:100
Protein S100-B	Abcam	ab52642	králík	1:100
Galactocerebrosidase	Merck Millipore	MAB342	myš	1:100
Oligodendrocyte transcription factor 1	Chemicon International, Inc.	MAB5540	myš	1:500

### Příloha 3: Protilátky použité pro imunoblot

#### Primární protilátky

Antigen	Výrobce	Katalogové číslo	Organismus	Blokace	Ředění
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Abcam	ab14748	myš	5% mléko	1:4000
Caspase-3 - activated	Origene	AP06504PU-N	králík	5% mléko	1:1000
Catenin beta-1	Sigma-Aldrich	C2206	králík	5% mléko	1:4000
Glial fibrillary acidic protein	Sigma-Aldrich	G3893	myš	5% mléko	1:3000
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Sigma-Aldrich	G9545	králík	5% mléko	1:5000
Hypoxia-inducible factor 1-alpha	Novus Biologicals	NB100-123	myš	5% mléko	1:1000
Proliferation marker protein Ki-67	Abcam	ab16667	králík	5% mléko	1:1000
Nestin	Abcam	ab22035	myš	5% mléko	1:1000
Neuropilin-1	R&D	AF3870-SP	ovce	5% Amicase	1:200
Proliferating cell nuclear antigen	Abcam	ab92552	králík	5% mléko	1:2500
Protein S100-B	Abcam	ab52642	králík	5% BSA	1:500
Transcription factor SOX-2	Cell Signaling Techn.	#3579S	králík	5% mléko	1:1000
Synaptosomal-associated protein 25	Abcam	ab109105	králík	5% mléko	1:1000
Tubulin beta-3	Exbio	11-264-C100	myš	5% mléko	1:4000
VEGF121	Abxexa	abx128591	králík	5% mléko	1:1000
VEGF165	R&D	AF-293-SP	koza	5% Amicase	1:60

#### Sekundární protilátky

Peroxidase-conjugated anti-myš IgG	Jackson Immuno.	715-035-151	osel	5% mléko	1:10000
Peroxidase-conjugated anti-králík IgG	Jackson Immuno.	711-035-152	osel	5% mléko	1:10000
Peroxidase-conjugated anti-ovce IgG	Jackson Immuno.	713-035-147	osel	5% mléko	1:10000



# Proteomic Characterization of Human Neural Stem Cells and Their Secretome During *in vitro* Differentiation

Jakub Červenka<sup>1,2</sup>, Jiřina Tylečková<sup>1</sup>, Helena Kupcová Skalníková<sup>1</sup>, Kateřina Vodičková Kepková<sup>1</sup>, Ievgeniia Poliakh<sup>1,2</sup>, Ivona Valeková<sup>3</sup>, Lucie Pfeiferová<sup>4,5</sup>, Michal Kolář<sup>4</sup>, Michaela Vaškovičová<sup>2,6</sup>, Tereza Pánková<sup>1,2</sup> and Petr Vodička<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Proteome Analyses, Research Center PIGMOD, Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czechia, <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia, <sup>3</sup>Laboratory of Cell Regeneration and Plasticity, Research Center PIGMOD, Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czechia, <sup>4</sup>Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czechia, <sup>5</sup>Department of Informatics and Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czechia, <sup>6</sup>Laboratory of DNA Integrity, Research Center PIGMOD, Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czechia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Antonio Salgado,  
University of Minho, Portugal

### Reviewed by:

Nunzio Vicario,  
University of Catania, Italy  
Hugo Guerrero-Cazares,  
Mayo Clinic, United States

### \*Correspondence:

Petr Vodička  
vodicka@iapg.cas.cz

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Neuropathology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular Neuroscience

**Received:** 30 September 2020

**Accepted:** 14 December 2020

**Published:** 28 January 2021

### Citation:

Červenka J, Tylečková J, Kupcová Skalníková H, Vodičková Kepková K, Poliakh I, Valeková I, Pfeiferová L, Kolář M, Vaškovičová M, Pánková T and Vodička P (2021) Proteomic Characterization of Human Neural Stem Cells and Their Secretome During *in vitro* Differentiation. *Front. Cell. Neurosci.* 14:612560. doi: 10.3389/fncel.2020.612560

Cell therapies represent a promising approach to slow down the progression of currently untreatable neurodegenerative diseases (e.g., Alzheimer's and Parkinson's disease or amyotrophic lateral sclerosis), as well as to support the reconstruction of functional neural circuits after spinal cord injuries. In such therapies, the grafted cells could either functionally integrate into the damaged tissue, partially replacing dead or damaged cells, modulate inflammatory reaction, reduce tissue damage, or support neuronal survival by secretion of cytokines, growth, and trophic factors. Comprehensive characterization of cells and their proliferative potential, differentiation status, and population purity before transplantation is crucial to preventing safety risks, e.g., a tumorous growth due to the proliferation of undifferentiated stem cells. We characterized changes in the proteome and secretome of human neural stem cells (NSCs) during their spontaneous (EGF/FGF2 withdrawal) differentiation and differentiation with trophic support by BDNF/GDNF supplementation. We used LC-MS/MS in SWATH-MS mode for global cellular proteome profiling and quantified almost three thousand cellular proteins. Our analysis identified substantial protein differences in the early stages of NSC differentiation with more than a third of all the proteins regulated (including known neuronal and NSC multipotency markers) and revealed that the BDNF/GDNF support affected more the later stages of the NSC differentiation. Among the pathways identified as activated during both spontaneous and BDNF/GDNF differentiation were the HIF-1 signaling pathway, Wnt signaling pathway, and VEGF signaling pathway. Our follow-up secretome analysis using Luminex multiplex immunoassay revealed significant changes in the secretion of VEGF and IL-6 during NSC differentiation. Our results further demonstrated an increased expression of neuropilin-1 as well as catenin  $\beta$ -1, both known to participate in the regulation of VEGF signaling, and showed that VEGF-A isoform 121 (VEGF121), in particular, induces proliferation and supports survival of differentiating cells.

**Keywords:** neural stem cell, proliferation, neural differentiation, secretome, proteome, VEGF, SWATH-MS

## INTRODUCTION

The neural stem cells (NSCs) are undifferentiated cells capable of reproducing themselves and giving rise to progenitors that may further differentiate into neuronal and glial (astrocyte and oligodendrocyte) lineages. Establishment of techniques to isolate, *in vitro* propagate, and differentiate stem/progenitor cells from the fetal and adult central nervous system (CNS) and, more recently, to derive such NSCs or neural progenitor cells (NPCs) from embryonic stem cells (ESCs) or induced pluripotent stem cells (iPSCs) opened new avenues toward our understanding of nervous system development, enabled modeling of selected diseases, neurotoxicity, drug testing, and importantly, opened the research of regenerative potential of such cells [see Gage and Temple (2013) for review].

NSCs/NPCs are among cell sources considered or already used in clinical trials for cell-based therapies in neurological conditions including neurodegenerative diseases, e.g., Alzheimer's disease (Oliver and Reddy, 2019; Hayashi et al., 2020; Liu et al., 2020), Parkinson's disease (Diaz, 2019; Oliver and Reddy, 2019; Harris et al., 2020), amyotrophic lateral sclerosis (Abati et al., 2019), spinal cord injuries (Ahuja et al., 2020), stroke (Suda et al., 2020), or multiple sclerosis (Cuascut and Hutton, 2019; Pluchino et al., 2020). Currently, 40 studies employing NSCs/NPCs are Active or Completed according to ClinicalTrials.gov.

The transplanted cells are expected to influence local microenvironment, reduce cellular stress *in situ*, promote cell survival, modulate inflammation, enhance remyelination, and maintain neuronal circuits (de Gioia et al., 2020; Fischer et al., 2020; Ottoboni et al., 2020). Some of these effects are mediated by a direct cell-to-cell contact, others by release of simple metabolites. However, a significant part of the effects is expected to come from secreted proteins including cytokines, growth factors, and other proteins essential for cellular communication and signaling (Kupcova Skalnikova, 2013), leading to, e.g., anti-inflammatory effects (Einstein et al., 2007) or inhibition of apoptosis (Petrenko et al., 2020).

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is essential for CNS vascularization and development, as its depletion leads to reduced vascularity and consequently to decreased neuronal proliferation and increased neuronal death in mice (Haigh et al., 2003). Depletion of VEGF-A by inactivation of one of its alleles causes failure of vasculogenesis and embryonal lethality in mouse, suggesting very strict regulation of VEGF-A abundance (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). In mammals, the VEGF protein family is represented by five factors: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and placenta growth factor (PlGF), all acting as homodimers *in vivo* (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Tischer et al. (1991) provided evidence that three different protein isoforms can be produced from the VEGF-A gene through alternative exon splicing, which are composed of 121 (VEGF121), 165 (VEGF165), or 189 (VEGF189) amino acid residues in human. In the last decade, evidence of VEGF-A pleiotropic functions in the nervous system was uncovered (see Mackenzie and Ruhrberg (2012) for review).

Characterization of stem/progenitor cell populations on the molecular level helps us to understand key processes

involved in cell proliferation and differentiation and also identify markers of cells on certain differentiation stages or lineage commitment for potential sorting of highly purified cell populations (Zizkova et al., 2015). Current proteomic techniques based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) can identify and quantify thousands of proteins in biological samples (Shoemaker and Kornblum, 2016). In addition, antibody-based techniques allow highly sensitive quantification of low abundant proteins, such as secreted growth and trophic or chemotactic factors (Skalnikova et al., 2011; Valekova et al., 2015). Using such techniques, we have previously characterized changes in cellular and signaling proteins during differentiation of porcine NSCs (Skalnikova et al., 2007, 2008) and in cell surface N-glycoproteins of human NSCs (Tyleckova et al., 2016).

In this study, we performed quantitative proteomic analysis of *in vitro* cultured human NSCs derived from the H9 ESC line. We have compared cellular and secreted protein levels between proliferating NSCs and cells differentiated for 7, 14, 21, and 28 days. Two differentiation protocols were compared, i.e., spontaneous differentiation by withdrawal of growth factors (epidermal growth factor, EGF; fibroblast growth factor 2, FGF2) and differentiation by withdrawal of EGF/FGF2 with trophic support by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) supplementation. Our results extend the knowledge of the regulatory networks behind NSC proliferation, survival, migration, and differentiation. Elucidation of these molecular mechanisms helps us to understand the stem cell behavior in nervous system development, tissue regeneration, and cancer.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

Unless stated otherwise, cell culture reagents were obtained from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific). Cell cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere.

### Neural Stem Cells (NSCs)

Human NSCs (Thermo Fisher Scientific) derived from the NIH-approved H9 (WA09) human ESCs were cultivated according to the supplier's instructions. Briefly, NSCs were incubated on plates coated with 20 µg/mL poly-L-ornithine and 5 µg/mL laminin (both Sigma-Aldrich) in the basal NSC medium comprising KnockOut Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12, 2 mM GlutaMAX, 1% penicillin-streptomycin, and 2% StemPro Neural Supplement and supplemented with 20 ng/mL human recombinant EGF (PeproTech) and 20 ng/mL human recombinant FGF2 (PeproTech) (proliferation medium). The medium was changed completely every other day, and cells were passaged every 3–5 days using Accutase (Sigma-Aldrich) or 0.05% trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

### NSC Differentiations

NSCs were grown in the proliferation medium until they reached ~70% confluency. To induce spontaneous (S) differentiation by growth factor withdrawal, the medium was switched to the

basal NSC medium. For spontaneous differentiation with trophic support (BG differentiation), cells were cultured in basal NSC medium supplemented by 10 ng/mL human recombinant BDNF and 10 ng/mL human recombinant GDNF (both PeprroTech). During the differentiation, half of the medium was changed every other day. Cells in four replicates for MS analyses or in three replicates for immunoblotting and RT-qPCR were detached manually at day 0 (proliferating NSCs) and at days 7, 14, 21, and 28 during both NSC differentiations.

### VEGF Induction

To analyze the influence of VEGF on NSC proliferation and survival, NSCs were cultivated in an IncuCyte FLR (Essen BioScience Inc.) incubator microscope. Cells were seeded into 24-well plates in either NSC proliferation medium or NSC basal medium. Both media were either left as is (control) or were further supplemented with 100 ng/mL human VEGF121, 100 ng/mL human VEGF165 (both PeprroTech; 100–20A and 100–20), or their combination. Half of the medium was changed every other day. Cell growth was followed for 8 days, with 9 images acquired per well in hourly intervals and six replicates (wells) per condition. Data were analyzed for confluence in IncuCyte 2010A Rev2 software. The experiment was repeated three times from independent NSC cultivations.

### Cell Viability Analysis

Cell viability was assessed by ReadyProbes Cell Viability Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions after 8 days of cultivation (VEGF induction, see above) within three bioreplicates and three scans per bioreplicate. The experiment was repeated two times. The image analysis was done in Fiji, version 1.52n (Schindelin et al., 2012). Images were segmented by Auto thresholding plugin using the Otsu method (Otsu, 1979). The number of Hoechst 33342-positive and SYTOX Green-positive cells was measured by 3D Object Counter plugin (Bolte and Cordelières, 2006).

### Sample Preparation for Secretome and MS Analyses

A cell culture medium (4 biological replicates, i.e., 4 culture dishes per condition) conditioned for 2 days was collected at days 0, 7, 14, 21, and 28 of both differentiation protocols, centrifuged (1,000 g at 4°C for 5 min), and filtered through a 0.22- $\mu$ m syringe filter to remove cells and debris. Inhibitors of proteases (Roche) were added, and the medium was kept at –80°C until secretome analysis.

Cells on culture dishes used for medium collection were washed with PBS and harvested mechanically. Cells were then lysed with 8 M urea and 5 mM EDTA in 50 mM ammonium bicarbonate and homogenized by MultiSpin (Grant Instruments Ltd.) for 10 cycles, 1 min at 6,000 RPM, 20 s hard, and sonicated for 15 min in an ice-cold sonication bath (Bandelin electronic GmbH & Co. KG) with ultrasonic frequency 35 kHz. The protein concentration was determined by Pierce 660 nm protein assay (Thermo Fisher Scientific). Each cell lysate sample was then treated with ProteaseMAX surfactant (Promega) to

a final concentration of 0.1% (w/v), reduced with tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride to a final concentration of 10 mM for 30 min at 32°C and alkylated with iodoacetamide to a final concentration of 40 mM for 45 min at room temperature in the dark. Samples were diluted with 50 mM ammonium bicarbonate to a final concentration of 1 M urea and 0.02% ProteaseMAX, followed by enzymatic digestion with endoproteinase LysC for 2 h at 37°C and trypsin overnight at 37°C, both at a 1:100 enzyme:substrate ratio. The digestion was stopped with formic acid (FA) at a final concentration of 2%. The resulting peptide mixtures were centrifuged at 20,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were desalted on C18 spin columns (MacroSpin or MicroSpin columns, Nestgroup). The size of the spin column was selected based on the initial protein sample load. The eluted peptides were vacuum centrifuged to dryness and resuspended in aqueous solution with 2% acetonitrile (ACN) and 0.5% FA. The peptide concentration was determined from absorbance at 280 nm (Synergy HTX, BioTek). The peptide samples were diluted to a final concentration of 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L with 1:30 (v/v) of spiked-in indexed Retention Time (iRT) peptides (Biognosys AG). The pooled sample was prepared as a mix of randomly chosen peptide samples from S and BG differentiation (from day 7 to 28), one sample per time point and differentiation (4 to 9  $\mu$ g of each sample). The pooled sample was measured in between the other samples as a quality control and was also used for library development.

### LC-MS/MS Analyses

Individual samples were analyzed in randomized order. The peptide mixtures in 2% ACN in 0.5% FA were loaded for 10 min at 2  $\mu$ L/min on Acclaim PepMap 100 C18 (5  $\mu$ m, 0.1  $\times$  20 mm; Thermo Fisher Scientific) trap column. The separation was performed on an in-house-packed 25-cm fused-silica column (75- $\mu$ m inner diameter) with ProntoSIL 120  $\text{\AA}$  3  $\mu$ m C18 AQ beads (Bischoff Analysentechnik GmbH) in a trap-elute mode, using the Eksigent nano-LC 425 (Sciex) on-line connected to 5600+ TripleTOF (Sciex). A linear gradient was set to 5–35% ACN in 0.1% FA over 120 min and 35–50% ACN in 0.1% FA over 10 min at a flow rate of 200 nL/min. For data-dependent acquisition (DDA) mode, the top 30 precursors with accumulation time 300 ms and mass range 400–1,250 in high-sensitivity mode were fragmented (MS/MS accumulation time 150 ms and mass range 170–1,500 Da) in each cycle (exclusion time 13 s). For Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra (SWATH-MS), 35 variable windows calculated with a SWATH Variable window calculator (Sciex) were monitored with 150 ms accumulation time in MS and 100 ms accumulation time in MS/MS with mass ranges of 400–1,250 Da and 170–2,000 Da, respectively, and a cycle time of 3.5 s.

### MS Data Processing

The MS/MS spectra from DDA for each condition (NSCs, S7, S14, S21, S28, BG7, BG14, BG21, BG28) were merged and processed in Mascot Distiller 2.7.1 (Matrix Science Ltd.) and searched for protein identification and data export for spectral library building in Mascot Server 2.6.2 (Matrix Science Ltd.), using the Swiss-Prot human database (version from 6.2.2018,

20,245 proteins) with a list of common contaminants and  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*. Mass tolerances of peptides and fragments were set to 20 ppm, carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification, and protein N-terminal acetylation and methionine oxidation were set as variable modifications. One missed cleavage was allowed, and specificity of digestion was set as cleavage after arginine, unless proline proceed, and always cleavage after lysine. The peptide-centric SWATH-MS data analysis was performed in Skyline-daily (version 4.1.1.18179) (MacLean et al., 2010). The sample-specific spectral library was built from 37 DDA runs. At least three samples were measured in DDA mode per time point and condition for sample library development including four pool sample measurements for library enrichment. The library cutoff score was set to 0.99. Ion mass tolerance was 0.05 m/z. Peptide retention times were calibrated and aligned between individual runs using the iRT peptides as standards. Raw SWATH-MS data were extracted in high-selectivity extraction mode with 23,000 resolving power. mProphet (Reiter et al., 2011) was used for peak picking in a range of scans within 10 min of predicted retention time. Decoy peptides for the mProphet model were generated with a shuffle sequence method. Repeated and duplicated peptides were removed from the dataset. A minimum number of two peptides (each with three transitions) per protein were used for final data export. The quantitative information for each transition (transition intensity defined as an area under the curve, information about retention time, and detection q-value) was exported from Skyline and further processed in MSstats R package (Choi et al., 2014) to obtain individual protein abundances. The iRT peptides, peptides with oxidized methionine, and peptides with  $q > 0.01$  were removed from the data using Skyline to MSstats function. For between-run normalization, all intensity values were scaled by a factor calculated as global median total ion current (TIC) divided by run-specific median TIC. Protein abundances for each run were calculated from log<sub>2</sub>-transformed transition intensities using MSstats dataProcess function, with Tukey median polish (TMP) set as a summary method, followed by quantification (type = Sample).

### Secretome Analysis

The secretome of NSCs during both differentiations was analyzed by multiplex xMAP technology using the Cytokine 30-Plex Human Panel kit (Thermo Fisher Scientific, LHC6003M, full list of analytes in **Supplementary Figure 1**). The frozen conditioned medium was thawed on ice, 10 times concentrated using 3-kDa Amicon Ultra 2-mL centrifugal filters (Merck) at 4°C, and immediately analyzed to avoid repeated freeze-thaw cycles. An unconditioned basal NSC medium supplemented with EGF/FGF2 was used to dissolve and dilute calibration standards and as a background sample to an identical matrix between standards and samples. As this medium contained an external source of EGF and FGF2, data for these growth factors were excluded from further analysis. Each biological replicate was analyzed in 2 technical replicates. The assay was prepared according to the 30-plex kit manufacturer's instructions, and data were acquired on a Luminex 200 analyzer with xPonent software build 3.1.871.0 (Luminex Corp.) adequately calibrated according

to the manufacturer's instructions. Fluorescence intensities of at least 100 beads per analyte were recorded. Raw median fluorescent intensity (MFI) values were exported from xPonent software, analyzed in R statistical environment (R Core Team, 2020), version 3.6. MFI values were normalized to cellular protein concentrations in corresponding culture dishes to minimize variability of cell counts in individual samples.

### Analysis of Differentially Expressed Proteins

Protein abundances from MSstats preprocessed SWATH-MS data were filtered to remove proteins with more than 28 missing values across all experimental conditions. In the remaining list of proteins, missing values were imputed before analysis as follows: for more than 50% missing values per condition, values were replaced by 1/3 of the lowest abundance of a given protein; for <50% missing values per condition, values were imputed using the k-nearest neighbor (knn) algorithm with  $k = 4$ . Linear models for microarray analysis (limma) R package (Smyth et al., 2020) were used to identify differentially expressed proteins. R package EGSEA (Alhamdoosh et al., 2017) was used to identify functional and pathway enrichment in the resulting list of differentially expressed proteins, according to the Gene Ontology (GO) vocabulary and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway list.

### Protein Co-expression Network Analysis

The protein co-expression network was constructed using weighted gene correlation network analysis as implemented in R package WGCNA (Langfelder and Horvath, 2008), using all quantifiable proteins from the SWATH-MS analysis as input data. We set the soft-thresholding power to 5 for adjacency matrix calculation. The protein expression dendrogram was cut into protein co-expression modules with 30 members set as the minimum module size. Module eigengenes (ME) were calculated as the principal component of each module, and modules were further simplified by merging based on the 0.25 cut height threshold (0.75 correlation of ME). To discover the possible relationships between protein expression profiles and observed phenotypes, we computed the correlation of ME with selected traits. *P*-values were derived by the Fisher transformation of each correlation. R package ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) was used for data visualization, and package clusterProfiler (Yu et al., 2012) was used to identify module association with cell markers.

### Identification of Proteins With Similar Temporal Expression Pattern

The soft clustering method implemented in Mfuzz (Kumar and Futschik, 2007) R package was used to identify temporal protein expression patterns separately in spontaneously differentiated cells, and cells grown in BG differentiation conditions.

### RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA from cultured cells was harvested using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) with cell homogenization with QIAshredder (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of eluted RNA were determined with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Two  $\mu\text{g}$  of RNA per sample were converted into cDNA with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Samples were then diluted to 25 ng/ $\mu\text{L}$  based on the previous concentration of RNA.

### Quantitative Real-Time PCR

Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to analyze the relative gene expression of selected markers. The volume of each reaction was 20  $\mu\text{L}$  containing 4  $\mu\text{L}$  of 5 $\times$  HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 125 nM of each primer (**Supplementary Table 1A**), and 25 ng of cDNA template and PCR water. The CFX96 Touch Real-Time detection system (Bio-Rad) was used to monitor amplification with the following settings: 12 min at 95°C for enzyme activation, then 15 s at 95°C for template denaturation followed by 40 cycles of 30 s at 57°C for primer annealing and 30 s at 72°C for an extension. Endogenous control (housekeeping markers), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5F1B), were used for normalization of cycle threshold (Ct) values.

### Immunocytochemistry

NSCs were cultivated on LabTek II CC<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific) coated with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  poly-L-ornithine and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  laminin and differentiated as described above. Cells were collected at day 0 (proliferating NSCs) and at days 7, 14, 21, and 28 from both S and BG differentiation protocols.

Cells were briefly rinsed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Cells were incubated for 10 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS to remove the free aldehyde groups, blocked in 5% goat serum in PBS for 1 h, and incubated with primary antibodies (rabbit monoclonal anti-SOX2, Cell Signaling, 3579S, 1:400; mouse monoclonal anti-Nestin, Cell Signaling, 33475S, 1:800; rabbit monoclonal anti-S100B Abcam, ab52642, 1:400; mouse monoclonal anti-TUBB3, Exbio, 11-264-C100, 1:500) diluted in PBS/0.01% BSA for 3 h. After incubation with primary antibodies, cells were washed 3 times in PBS/0.05% Tween. Secondary antibodies labeled with AlexaFluor488 (goat anti-mouse IgG, A28175, 1:500) and AlexaFluor647 (goat anti-rabbit IgG, A32733, 1:1,000) were mixed with DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to mark nuclei. Cells were incubated in secondary antibodies for 45 min in the dark. Subsequently, cells were washed 3 times in PBS/0.05% Tween and 5 min in PBS. All incubations were performed at room temperature. Cells were coverslipped in ProLong Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, P36980). Images were acquired on a Leica TCS SP5 confocal microscope and processed and analyzed in Fiji.

### Immunoblotting

Cells were lysed in ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl; 5 mM EDTA, pH 8; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.5% NP-40; 1% sodium deoxycholate; 1% Triton X-100 and 0.1% SDS) with 1 $\times$  Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). Lysates were sonicated in an ice bath, and unlysed debris was pelleted by centrifugation for 10 min at 16,000 g at 4°C. The protein concentration in supernatants was determined

by BCA assay (Thermo Fisher Scientific). Recombinant human VEGF121 and VEGF165 proteins (same as in the case of VEGF induction; 1 ng) were used as positive controls for the VEGF121 antibody.

Three  $\mu\text{g}$  of cellular proteins (6  $\mu\text{g}$  for VEGF and HIF1- $\alpha$  detection) were separated in 4–12% Bis-Tris or 3–8% Tris-acetate gradient NuPAGE gels (Invitrogen) under reducing conditions according to the manufacturer's instructions. Proteins were transferred by the Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad) to the nitrocellulose (or PVDF for VEGF121 antibody) membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with a primary antibody (see **Supplementary Table 1B** for details). Membranes were washed 3 times for 10 min in Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TTBS) and incubated for 60 min at room temperature with the appropriate secondary antibody diluted 1:10,000 in 5% dry skim milk in TTBS. Membranes were washed in TTBS and incubated in ECL Prime reagent (Amersham). The Chemidoc XRS+ detection system with Image Lab (version 5.2.1 build 11) software (Bio-Rad) was used to detect the chemiluminescent signal.

### Statistical Analysis

All statistical analyses were performed in the R statistical environment (R Core Team, 2020). Statistical analysis of proteomic data is described separately in the previous paragraphs. For qPCR data, Luminex secretome analysis and influence of VEGF stimulation on growth and survival of NSCs in culture, linear mixed models with differentiation protocol vs. time in culture as factors were fitted to the data; marginal means and confidence intervals were estimated using emmeans R package (Lenth, 2020); and multiple-testing adjusted *p*-values for individual pairwise comparisons were derived using the Tukey HSD test.

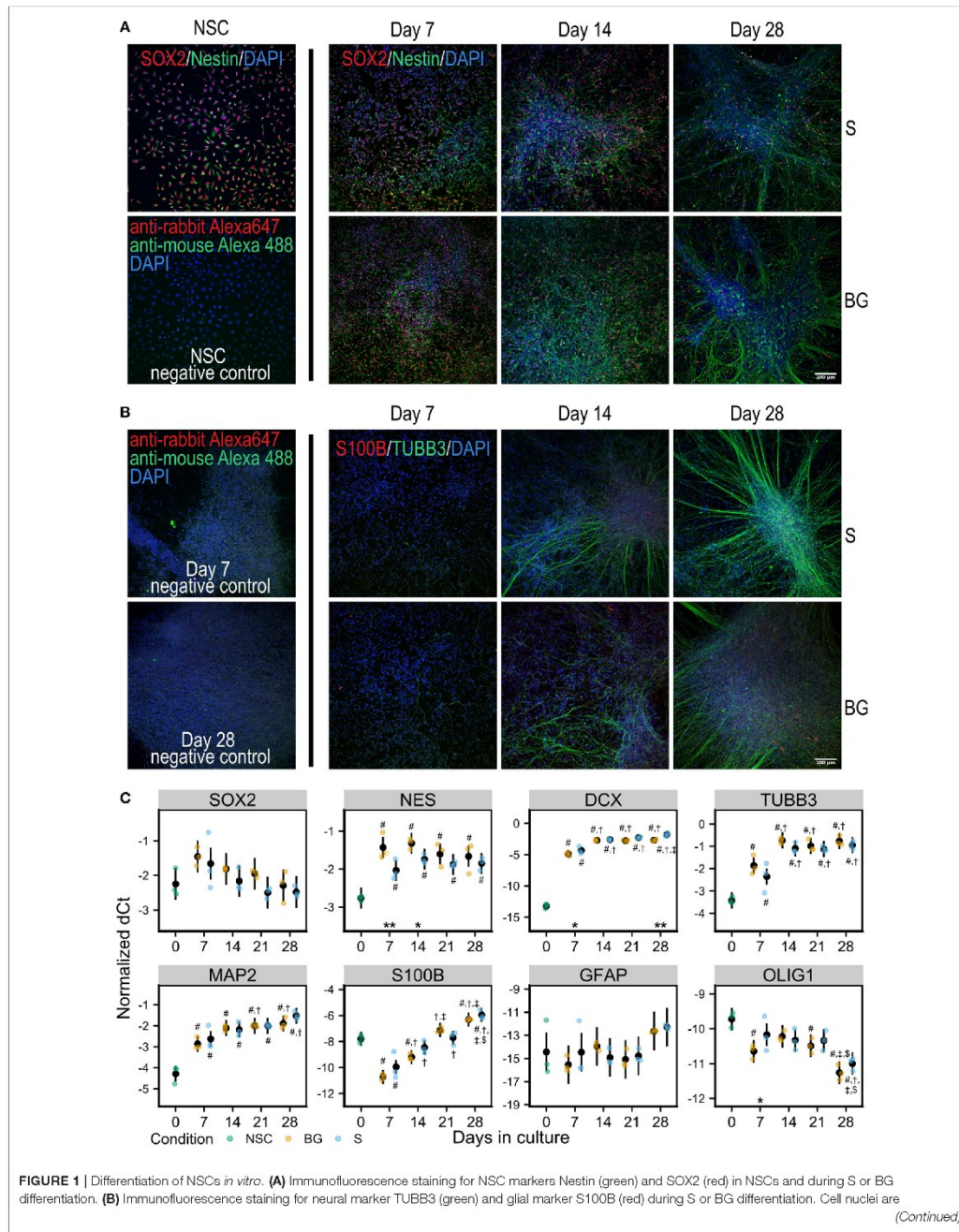
## RESULTS

### Neural Stem Cell Differentiation

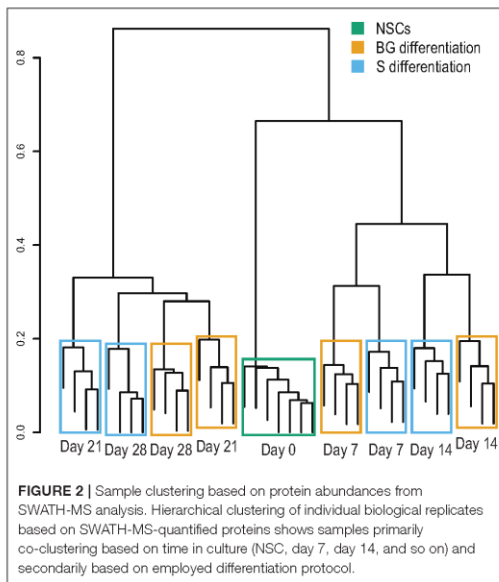
Human H9 NSCs were differentiated spontaneously by the withdrawal of EGF and FGF2 from the cell culture media (S differentiation) or spontaneously with trophic support by a combination of neurotrophic factors BDNF and GDNF (BG differentiation) for 28 days *in vitro* (**Figures 1A,B**).

At the level of mRNA, both types of differentiation showed similar trends of expression of selected markers of NSCs or differentiated neural cells (**Figure 1C**). NSC marker transcription factor SOX-2 (SOX2) was not significantly changed during differentiation, and NSC marker Nestin (NES) was increased during differentiation, compared to day 0, showing a trend for decrease from day 7 to day 28. The expression of neuronal markers neuronal migration protein doublecortin (DCX), tubulin  $\beta$ -3 chain (TUBB3), and microtubule-associated protein 2 (MAP2) was strongly increased at day 7, compared to day 0, and was rising during the whole differentiation. Glial marker protein S100-B (S100B) sharply decreased at day 7 compared to day 0 and then continuously increased with time in culture. Astrocyte-specific marker glial fibrillary acidic protein (GFAP)





**FIGURE 1** | counterstained by DAPI (blue) in both panels. Negative controls (omitted primary antibodies) for NSCs are shown in **(A)** and for days 7 and 28 of S differentiation in **(B)**. **(C)** Expression of transcripts of selected cell type markers during S and BG differentiation by RT-qPCR. dCt values for individual transcripts normalized to the average of two housekeeping controls (GAPDH and ATP5F1B) from three independent experiments are shown as individual points, estimated model mean  $\pm$  95% confidence intervals shown as black points and lines. Statistical significance was calculated from the linear mixed model of differentiation protocol (BG vs. S) and day in culture (0, 7, 14, 21, 28) within each experiment, with Tukey adjusted *p*-values for all pairwise comparisons. Asterisks above the x axis denote significant difference between BG and S protocol at given day (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01). Symbols above (BG) and below (S) data points denote significant difference (*p* < 0.05) of given group vs. day 0 (#), or day 7 (†), day 14 (‡), and day 21 (§) of the same differentiation protocol.



was detected at very low levels and was not significantly changing. The marker of oligodendrocytes oligodendrocyte transcription factor 1 (OLIG1) was decreasing through the differentiation.

### Proteome Analysis

The cellular proteome during S and BG differentiation at days 0, 7, 14, 21, and 28 was analyzed using the SWATH-MS method. The sample-specific library resulted in the identification of 23,645 unique peptides assigned to 2,870 human proteins with minimal two peptides and three transitions per peptide. In total, abundances of 2,804 proteins were obtained by SWATH-MS data summarization in MSstats (**Supplementary Table 1C**). We performed cluster analysis of SWATH-MS data based on abundances of quantified proteins, which revealed the co-clustering of samples from S and BG differentiation at days 7 and 14 and divergence between both differentiations at days 21 and 28 (**Figure 2**). These results show that differences between samples in the early stages of NSC differentiation are caused mostly by the differentiation time course rather than the type of differentiation itself. However, differentiation type influences the later stages of NSC differentiation.

*In vitro* NSC differentiation was accompanied by large-scale changes in the global cellular proteome (1,359 and 1,446 proteins changed between day 0 and day 28 of S and BG differentiation, respectively) (**Table 1**). Major changes in protein expression occurred between day 0 and day 7 of both differentiations—1,024 and 1,057 changed proteins in case of S and BG differentiation, respectively. In contrast, 242 and 254 proteins were differentially expressed between day 14 and day 28 of S or BG differentiation, respectively. Numbers of differentially expressed proteins between both types of differentiation were relatively low (e.g., 107 proteins at day 28).

### Secretome Analysis

We analyzed levels of 28 secreted growth factors, chemokines, and cytokines in a medium conditioned for 48 hours in the presence of NSCs during the differentiation time course. **Figure 3A** shows a heatmap of median fluorescence intensities (MFI) from xMAP analysis of the conditioned medium. IL-6 and VEGF concentrations were consistently growing with time in culture, in both differentiation protocols used (**Figures 3A,B**). At day 28, both IL-6 and VEGF levels were significantly higher in the medium from cells differentiated by BG protocol compared to S protocol. The other analytes were detected at the background levels. Due to normalization to cellular protein concentrations (~6 times higher in differentiating cell samples), the MFI values of analytes secreted by proliferating NSCs (day 0) may be overestimated. The complete MFI data for all analyzed cytokines are provided in **Supplementary Table 1E** and graphs of log<sub>10</sub> (MFI) values in **Supplementary Figure 1**.

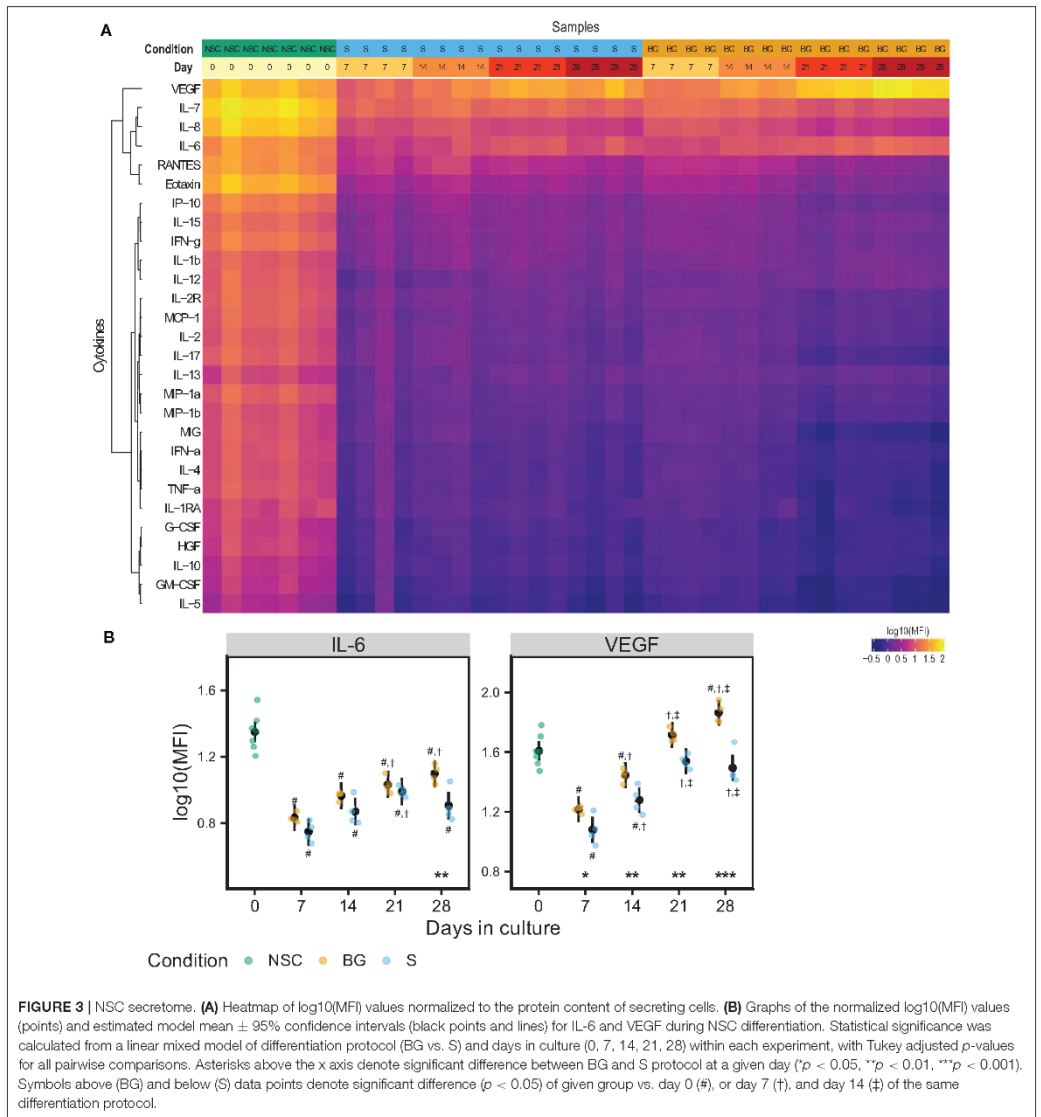
### Protein Co-expression Network Analysis

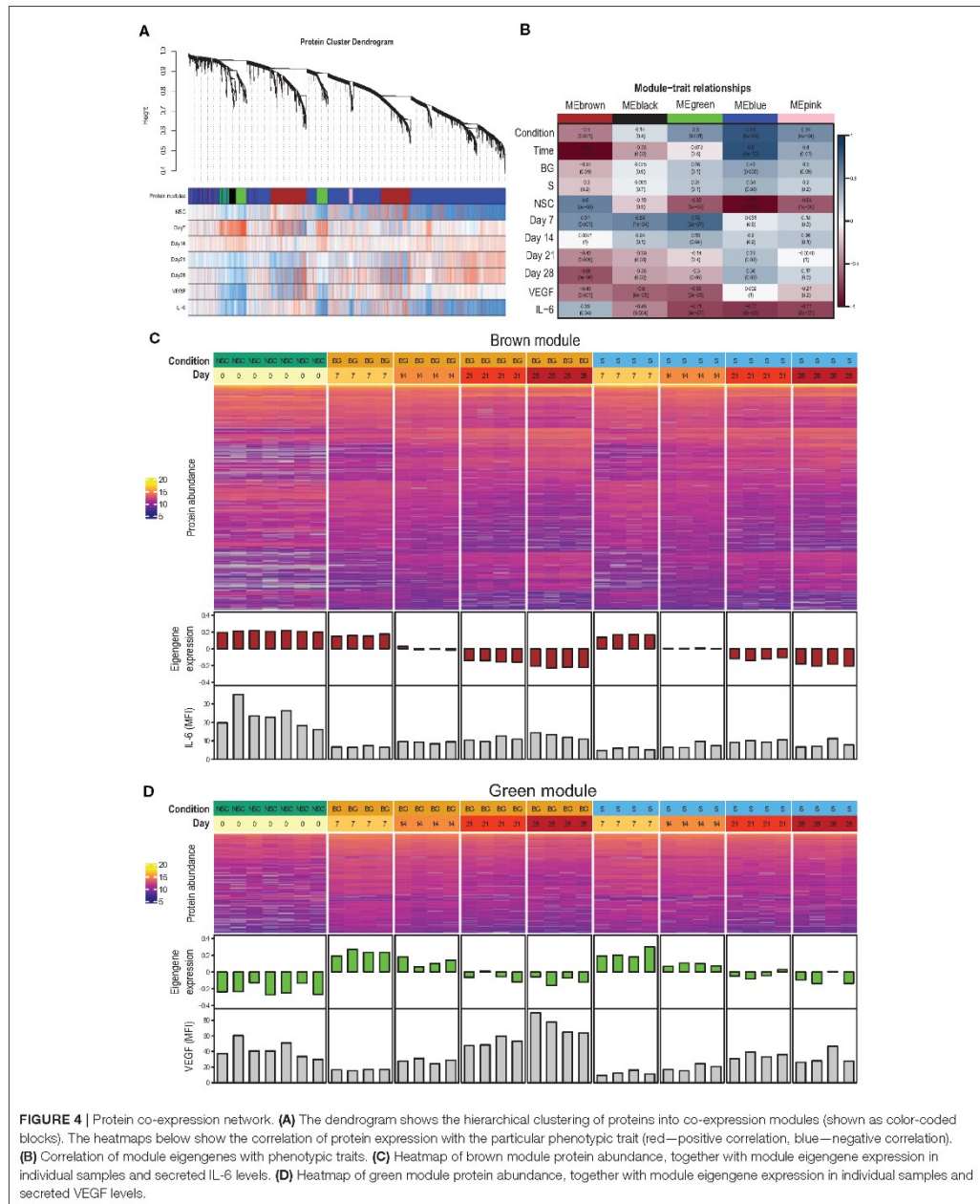
To identify proteins with similar expression patterns and relate these patterns to observed phenotypes, we constructed a protein co-expression network using the WGCNA method. The largest of the identified co-expression modules (blue) consisted of proteins with low expression at the NSC stage and increasing over the time course of differentiation (**Figures 4A,B; Supplementary Figure 2**). The brown module contained proteins expressed at the NSC stage and decreasing over time (**Figures 4A–C**). This module also correlated with IL-6 secretion. The green module contained proteins with low expression at the NSC stage, increasing at an early stage of *in vitro* differentiation (day 7–day 14) and declining expression at later stages (day 21–day 28) (**Figures 4A,B,D**). This module also had a strong negative correlation with VEGF secretion, as this was at its lowest at day 7 (**Figures 3B, 4D**). Complete data for protein membership in identified co-expression modules and their correlation with traits is provided as **Supplementary Table 1F**.

**TABLE 1 |** Numbers of differentially expressed proteins between differentiation time-points from total number of 2,515 proteins subjected to analysis.

Differentiation	Day 0				Day 7	Day 14	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 21	Day 28	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
S	1,024	1,145	1,279	1,359	450	242	71	87	125	107
BG	1,057	1,197	1,336	1,446	546	254				

Only proteins with fold change  $\geq 2$  and multiple-testing adjusted  $p \leq 0.05$  as analyzed in limma R package were counted. The list of all differentially expressed proteins across the conditions examined is provided as **Supplementary Table 1D**.





**FIGURE 4 |** Protein co-expression network. **(A)** The dendrogram shows the hierarchical clustering of proteins into co-expression modules (shown as color-coded blocks). The heatmaps below show the correlation of protein expression with the particular phenotypic trait (red—positive correlation, blue—negative correlation). **(B)** Correlation of module eigengenes with phenotypic traits. **(C)** Heatmap of brown module protein abundance, together with module eigengene expression in individual samples and secreted IL-6 levels. **(D)** Heatmap of green module protein abundance, together with module eigengene expression in individual samples and secreted VEGF levels.

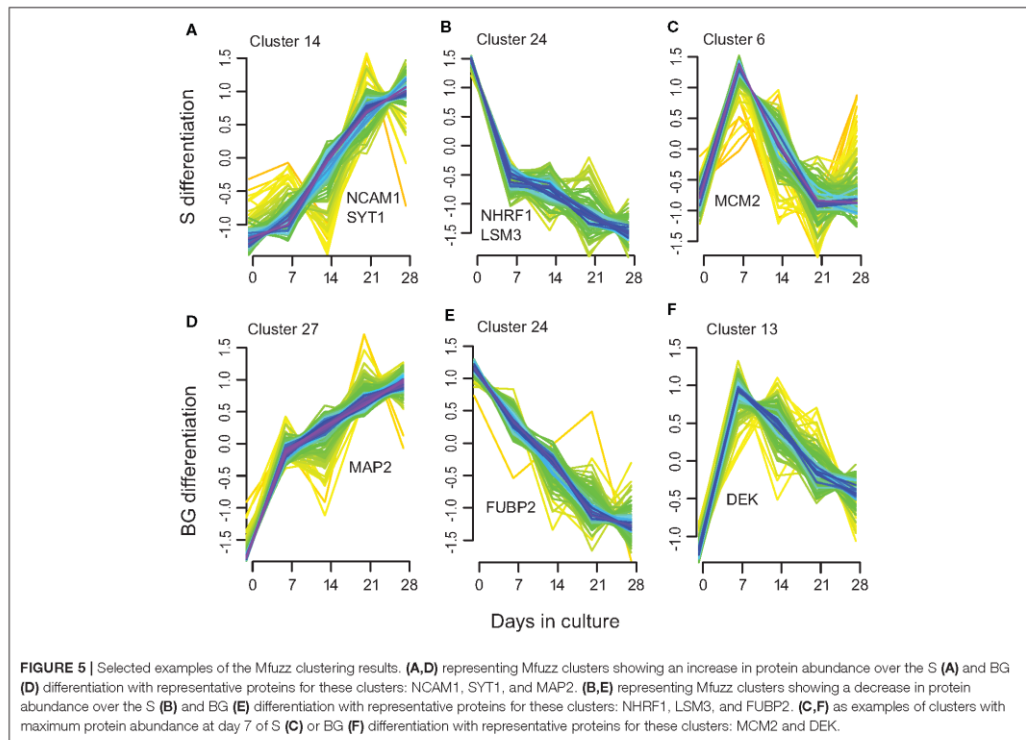
Next, we used R package clusterProfiler to analyze whether proteins positively correlated with particular phenotypic traits within a given module correspond to known markers of selected cell types and lineages. We found that proteins with expression upregulated at day 7 within green and brown modules and downregulated at day 28 within the brown module best correspond to the “Embryonic pre-frontal cortex, Normal, Neural progenitor cell” type, while proteins upregulated at day 28 within blue and brown modules best correspond to the “Embryonic prefrontal cortex, Normal, Astrocyte” cell type. This finding is surprising, given that only limited signs of differentiation into glial cells were observed in H9 NSCs in our other experiments.

### Identification of Proteins With a Similar Temporal Expression Pattern

Next, we used soft clustering of proteins into groups with similar temporal expression profiles implemented in Mfuzz R package to further explore regulation of protein expression in time. By clustering separately proteins quantified in S or BG differentiation, we obtained 28 clusters for each condition (**Supplementary Table 1G, Supplementary Figure 3**).

Among these clusters, clusters 7, 14, 15, 17, 20, and 23 showed an increase in protein abundance over time in the S differentiation and clusters 2, 5, 7, 12, 14, and 27 in BG differentiation. In total, 126 proteins were assigned to these BG differentiation clusters, respectively, 100 proteins to S differentiation clusters. Among them are represented proteins involved in brain/nervous system development including synaptotagmin-1 (**Figure 5A**), neuronal membrane glycoprotein M6-a, serine/threonine-protein kinase DCLK1, dihydropyrimidinase-related protein 2, MAP2 (BG differentiation only) (**Figure 5D**), or DCX (S differentiation only); axon guidance/axonogenesis proteins like neural cell adhesion molecule 1 or microtubule-associated protein 6; proteins involved in apoptosis-like macrophage migration inhibitory factor, cathepsin D, or caspase-3 (BG differentiation only); transport proteins like sideroflexin-3, alpha-centractin, cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1, or endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1; and proteins involved in Wnt signaling like catenin  $\beta$ -1 (S differentiation only) or protein wnt less homolog (BG differentiation only).

Another group of clusters, 9, 18, 19, 22, and 24 in S differentiation (60 proteins) and clusters 8, 18, 20, 21, and 24 in BG differentiation (69 proteins) showed a decrease



in protein abundance over time. Proteins decreasing over the differentiation time course included proteins involved in mRNA processing/splicing, including far upstream element-binding protein 2 (Figure 5E) or U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3, and regulation of translation like SAP domain-containing ribonucleoprotein and apoptotic signaling (Wnt signaling) like Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 (Figure 5B).

Clusters with maximum protein abundance at day 7; clusters 2, 6, 8, 11, and 27 in S differentiation (72 proteins); and clusters 11, 13, 17, 23, and 26 (44 proteins) in BG differentiation overlap with the green module in WGCNA analysis (32 proteins in S differentiation and 21 proteins in BG differentiation). These proteins are again mainly involved in regulation of mRNA binding or cell cycle and interestingly DNA repair (e.g., DNA replication licensing factor MCM2, protein DEK, DNA ligase 3) (Figures 5C,F).

### Functional Annotation of Differentially Expressed Proteins Using KEGG and GO

Lists of proteins quantified by SWATH-MS and detected as significantly differentially expressed between particular time points or differentiation protocols were subjected to functional analysis using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways and Gene Ontology (GO) biological processes.

Analysis of KEGG pathways revealed downregulation of spliceosome and ribosome biogenesis in eukaryotes at day 28 of both differentiations, compared to day 0. Interestingly, these processes were upregulated at day 14, compared to both days 0 and 28. We also observed the downregulation of DNA replication in the case of BG differentiation, compared to both days 0 and 14, whereas it was upregulated in S differentiation at day 28, compared to day 0. On the other hand, global metabolism (e.g., glycolysis or fatty acid metabolism pathways), RNA degradation, regulation of actin cytoskeleton, axon guidance, protein processing in endoplasmic reticulum, protein export, synaptic vesicle cycle, and HIF-1 signaling pathway were upregulated at both days 14 and 28, and the VEGF signaling pathway was upregulated at day 28 of both differentiations, compared to day 0 (Figure 6A). A complete list of identified KEGG pathways is in Supplementary Table 1H.

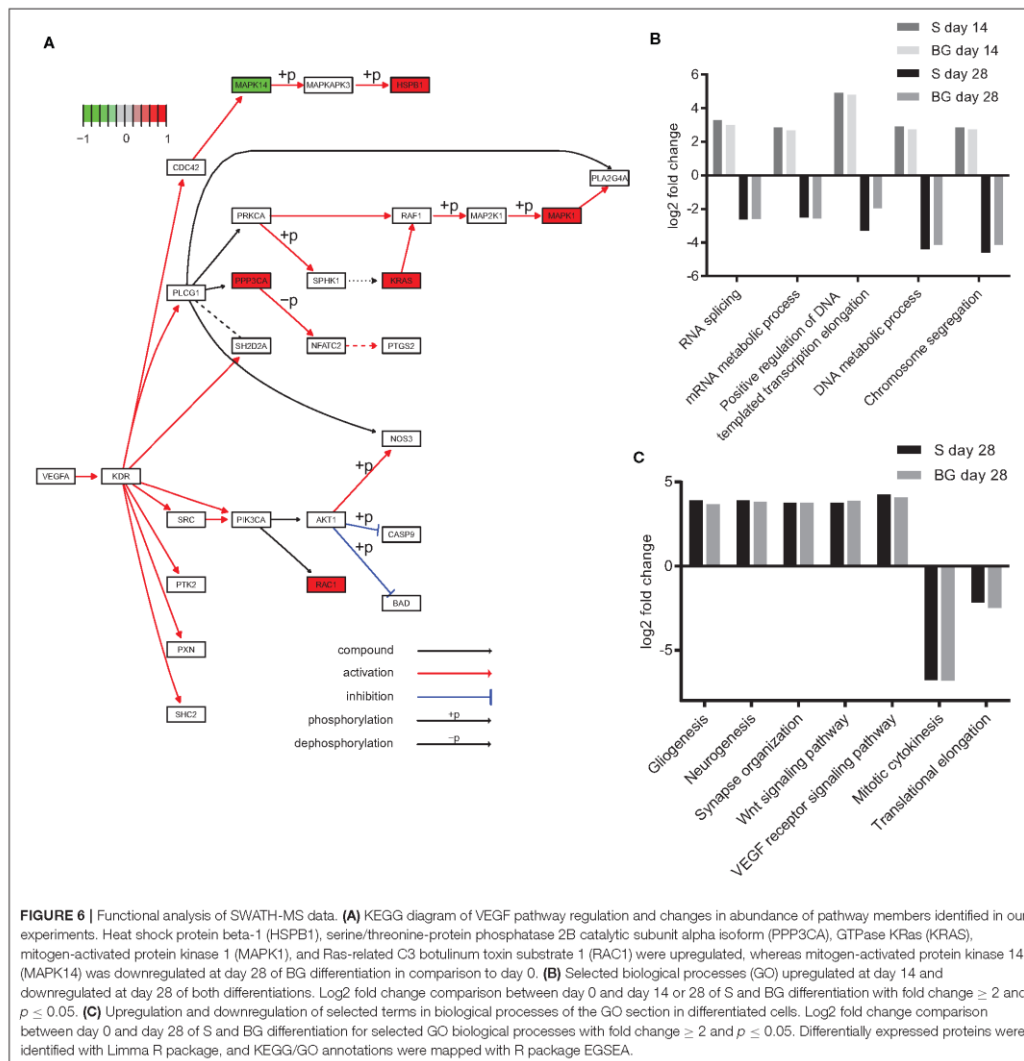
Our GO analysis of biological processes supported results from the KEGG pathways and Mfuzz clustering analysis. Similarly to KEGG results, processes of RNA splicing, mRNA metabolic process, chromosome segregation, and DNA metabolic process were upregulated at the day 14 but downregulated at day 28, compared to day 0 (Figure 6B). Mitotic cytokinesis was downregulated at both days 14 and 28, compared to day 0. In contrast, at days 14 and 28, lipid metabolic process, regulation of cytoskeleton organization, response to oxidative stress, regulation of synaptic vesicle transport, Wnt signaling pathway, VEGF receptor signaling pathway, regulation of neuron death, gliogenesis, and neurogenesis were upregulated (Figure 6C). A complete list of identified GO biological processes is in Supplementary Table 1I.

### Validation of SWATH-MS Protein Quantification by Immunoblotting for Selected Markers of NSCs and of Neural Differentiation

To validate quantitative SWATH-MS data (Figure 7A) and to confirm the differentiation state of cells during S and BG differentiation, levels of selected proteins were analyzed by immunoblotting. Specifically, markers of NSCs (NES and SOX2), neuronal progenitor cells (NPCs)/neurons (TUBB3), or glial cells (S100B and GFAP), and markers of cellular proliferation proteins Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were monitored during the time course of both differentiation protocols at days 0, 7, 14, 21, and 28. Abundances of markers of proliferating cells (Ki-67 and PCNA) as well as markers of NSCs (NES and SOX2) were decreasing over time in both S and BG differentiations (Figure 7B), similarly to SWATH-MS data. On the other hand, the expression of TUBB3, a marker of NPCs and neurons, was increasing from day 7. Ongoing neuronal differentiation was further supported by increased expression of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) from day 14 of both differentiations (Figure 7B), which is in agreement with upregulation of synapse organization identified by GO analyses (Figure 6C) at day 28 of both differentiations. Typical markers of glial cell lineages, including GFAP, S100B, and OLIG1, were not among proteins quantified by SWATH-MS, confirming our observation from immunofluorescence (Figure 1B; no signal was detected for GFAP and OLIG1, data not shown) and RT-qPCR analyses (Figure 1C) of limited differentiation potential of H9 NSCs into glial cells. For this reason, we aimed to confirm or rule out the expression of GFAP and S100B by immunoblotting. While levels of S100B were detectable and growing over time, expression of a marker of astrocytes, GFAP, was detectable only in BG differentiation from day 14 (Figure 7B, Supplementary Figure 4). Based on these results, both differentiations led to differentiation into NPCs or neurons, while some cells were still expressing NSC markers.

### Role of the VEGF Pathway in Cellular Proliferation, Differentiation, and Survival of NSCs During *in vitro* Culture

As the secretome analysis showed an increase in VEGF secretion with ongoing cell differentiation, we decided to focus on a deeper analysis of the role of the VEGF pathway in the survival, proliferation, and differentiation of H9 NSCs. The VEGF antibody used in the xMAP multiplex assay detects VEGF-A isoforms 121 (VEGF121) and 165 (VEGF165), but binding to other VEGF proteins was not verified by the manufacturer. Thus, we attempted to analyze VEGF-A production by NSCs and differentiating cells also by immunoblotting, which should allow distinguishing isoforms based on their molecular weight. However, post-translational modifications (N-glycosylation and dimerization via disulfide bonds) together with many possible isoforms of VEGF-A (Woolard et al., 2009) may affect proper identification of VEGF121 and VEGF165. Therefore, we employed recombinant proteins VEGF121 and VEGF165, which were detected at expected molecular weights, showing that the

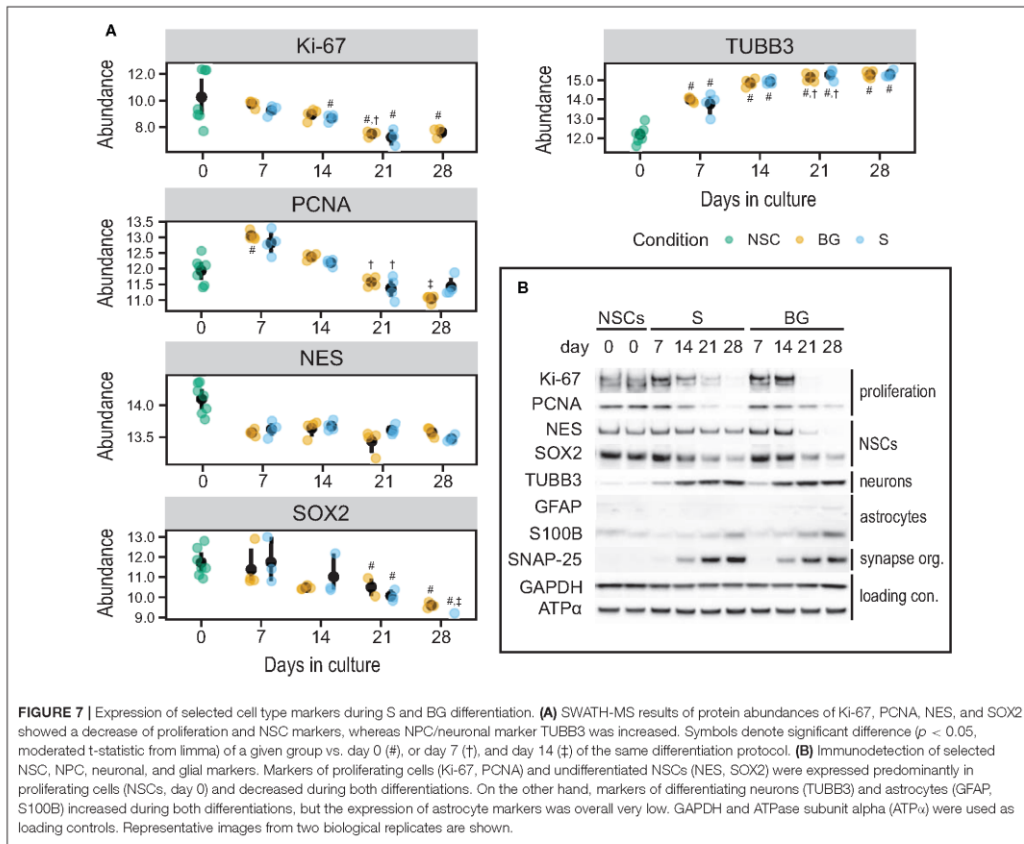


VEGF121 antibody is not specific for VEGF121 only. VEGF121 protein (likely N-glycosylated according to a slight mass shift in comparison to recombinant VEGF121) was detected in all samples with the highest expression at days 7 and 14 (Figure 8B). Surprisingly, VEGF121 expression in cells was decreased at days 21 and 28, even though it was still higher than at day 0, suggesting that either cellular and secreted VEGF121 levels do not directly correspond, or other VEGF-A isoforms were quantified together during secretome analysis. Moreover, we did

not detect any expression of VEGF165 at any time point of both types of differentiation.

Increased expression of neuropilin-1, known as a receptor for VEGF-A in neurons (Tillo et al., 2015), was observed from day 14 in SWATH-MS data as well as on immunoblot in both types of differentiation (Figures 8A,B).

Increased abundance of catenin  $\beta$ -1 from day 7 of both differentiations (Figure 8B) confirmed results from SWATH-MS quantification (Figure 8A) and is in agreement with the



upregulation of the Wnt signaling pathway (Figure 6C), which may also be involved in VEGF expression regulation. Activation of the HIF-1 signaling pathway was supported by the presence of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) at both differentiations. However, abundance of HIF1- $\alpha$  was decreased at days 21 and 28 of both differentiations, suggesting its role mainly in early stages of NSC differentiation (Figure 8B).

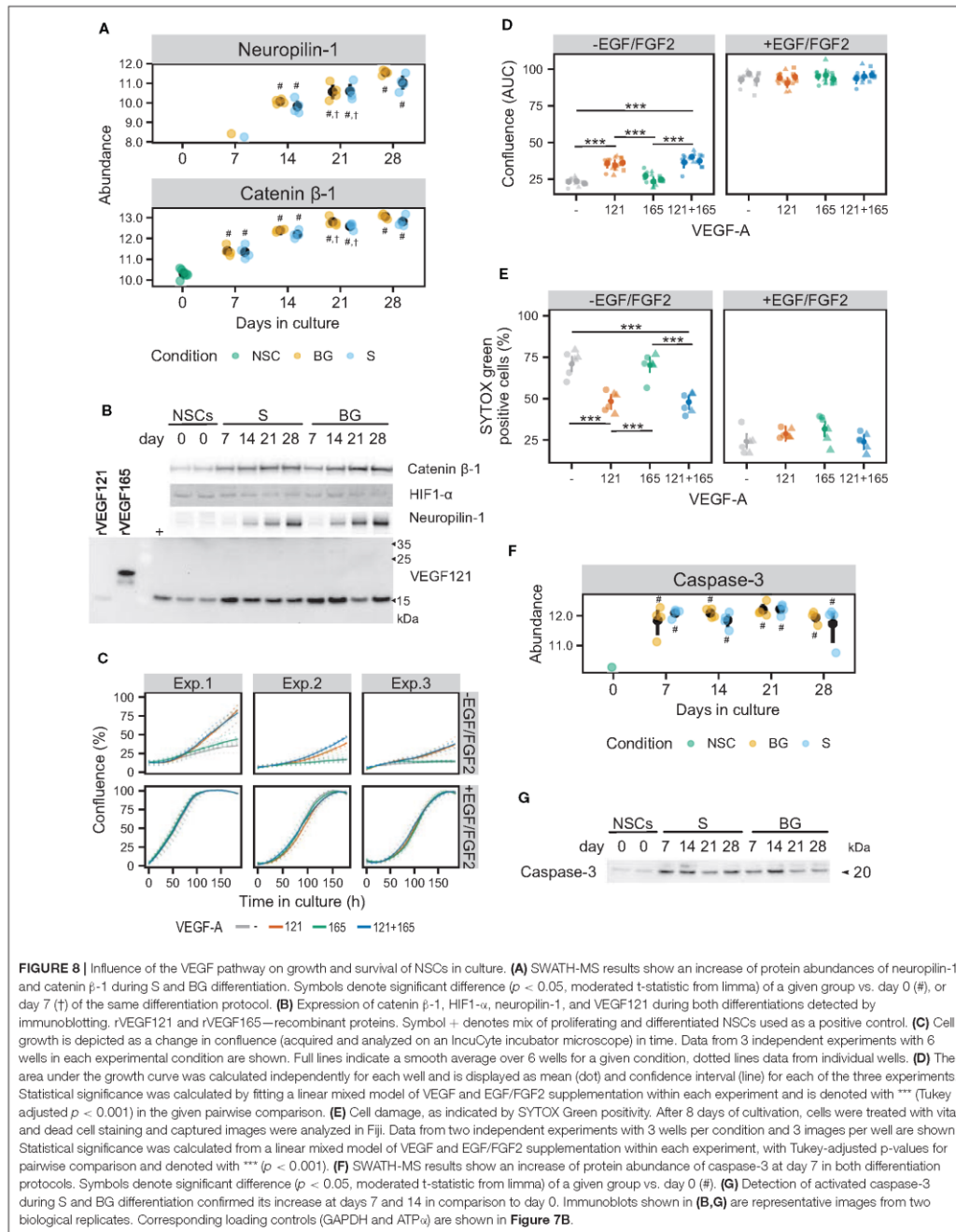
To analyze the effect of VEGF-A isoforms 121 and 165 on neural cells directly, we cultivated NSCs in the proliferation medium with EGF and FGF2 or in the medium for S differentiation with supplementation of VEGF121 and/or VEGF165. Cell proliferation potential was analyzed by monitoring of cell confluency using time-lapse live cell microscopy for 8 days *in vitro*. At the experiment end point, cell viability was analyzed by staining for damaged and dead cells.

Cell confluency analysis revealed that in a condition of S differentiation, VEGF121 itself or in combination with VEGF165 significantly induced cellular proliferation (~1.5-fold change

based on area under the growth curve), compared to control and VEGF165 (Figures 8C,D). VEGF165 supplementation alone had no significant effect (Figures 8C,D). On the contrary, we did not observe any beneficial effect of VEGF121 and/or VEGF165 on NSC proliferation in the presence of EGF/FGF2.

To assess the effect of VEGF121 and VEGF165 on cell viability, we stained cells with SYTOX Green dye, which enters the cells with compromised plasma membrane integrity and labels cell nuclei. To obtain total cell counts, vital dye Hoechst 33342 was used to counterstain all nuclei. VEGF121 itself or in combination with VEGF165 significantly suppressed cell death/damage in the condition of S differentiation ( $48.31 \pm 10.23\%$  and  $47.52 \pm 12.23\%$ , respectively, compared to  $71.83 \pm 10.66\%$  SYTOX Green-positive cells in control) (Figure 8E). In contrast, VEGF165 itself did not affect cellular viability ( $70.14 \pm 9.91\%$  SYTOX Green-positive cells). We did not find any benefit of VEGF121 and/or VEGF165 to cell survival in the case of NSC cultivation in the medium with EGF/FGF2. These results





show that VEGF121 can induce cellular proliferation and reduce cell damage or death of human NSCs in the absence of other growth factors, whereas VEGF165 has no such effect, at least in *in vitro* conditions.

Increased abundance of activated caspase-3 (marker of apoptosis) was identified in SWATH-MS data (Figure 8F) and validated by immunoblotting in both differentiation protocols from day 7 but more pronounced in S differentiation (Figure 8G). This result suggests that trophic support (BDNF and GDNF) is important for cellular viability after the change of environment, i.e., withdrawal of growth factors from the proliferation medium and VEGF secretion by differentiating cells might act as an additional pro-survival stimulus, counteracting activation of programmed cell death.

## DISCUSSION

In the present study, we differentiated human H9 NSCs by withdrawal of growth factors (EGF/FGF2) to simulate dramatic change of the microenvironment after cell grafting or with neurotrophic support of BDNF/GDNF, which were previously shown to support survival of transplanted cells (Wang et al., 2011; Rosenblum et al., 2015). Immunocytochemistry and gene expression analyses revealed that both S and BG differentiations led mainly to cells of neuronal lineage, with only very limited differentiation into cells expressing glial markers, which was further confirmed by immunoblotting. These results are in agreement with data from Bohaciakova et al. who observed a very low expression of GFAP in H9 ESC-derived NSC differentiated to astrocytes for up to 6 weeks (Bohaciakova et al., 2019). We did not identify significant changes in expression of selected neuronal markers between S and BG differentiation.

We then focused on temporal changes in the cellular proteome during both differentiations. SWATH-MS analysis proved that global changes in the cellular proteome occur at the very early stage of both differentiation protocols likely as a response to a dramatic change of the microenvironment. Interestingly, hierarchical clustering of samples based on protein abundances suggested divergence in protein expression profiles at the later stages of S and BG differentiation. The number of significantly differentially expressed proteins at the same time point between the two protocols was low but mildly growing over time.

Proteomic and transcriptomic data are not fully comparable, because the expression of a specific protein may be regulated differentially at the mRNA and protein levels. A study of gene expression control in mouse fibroblasts revealed that abundances of cellular proteins are mostly regulated at the translational level, as the average protein has about five times longer half-life than the average mRNA and its translation rate is in general ~70 times higher than the transcription rate (Schwanhäusser et al., 2011). This biological phenomenon was further confirmed in studies comparing the transcriptome and proteome of differentiating human ESCs during the formation of embryoid bodies (Fathi et al., 2009) and during neural differentiation of human ESCs (Fathi et al., 2014). In our experiments, we noted a discrepancy in expression of NSC markers NES and SOX2

as assayed by RT-qPCR vs. protein-based methods. According to our results from immunocytochemistry, SWATH-MS, and immunoblotting, both NES and SOX2 were clearly detectable at high levels in NSCs, and although their expression had a decreasing trend, it persisted at all stages of both S and BG differentiations. Whereas, results of RT-qPCR, SWATH-MS, and immunoblotting reflect an expression in the whole population, immunocytochemistry revealed that some strongly NES- or SOX2-positive cells remain in culture till day 28, but there are also many cells completely negative for these proteins. On the contrary, most NSCs have a uniform NES- or SOX2-positive staining pattern. Although NES is broadly used as a marker of NSCs, it also affects the proliferation and cell death of NPCs or axonogenesis in immature neurons [reviewed in (Bott and Winckler, 2020)]. Therefore, its presence during the whole differentiation is biologically relevant. The discrepancies between our transcriptomic and proteomic data may be further accentuated by different kinds of data normalization for each method. Global normalization was used for SWATH-MS data, and we observed that majority of quantified proteins changed its abundance during differentiation, mainly between days 0 and 7, including proteins of metabolic pathways. Zheng et al. previously reported transition from glycolysis in NPCs to oxidative phosphorylation in differentiating cells during neuronal differentiation of human NPCs (Zheng et al., 2016). This makes selection of housekeeping genes for RT-qPCR experiments challenging, as highly expressed cytoskeletal or metabolic genes are usually employed and both of these classes can change during cell differentiation. In the end, we selected two housekeeping genes, GAPDH (enzyme of glycolysis) and ATP5F1B (subunit of ATP synthase—oxidative phosphorylation), as our RT-qPCR normalizers. Based on observed large differences in the cell proteome profile between days 0 and 7 together with the abovementioned published switch in metabolic pathways, it is possible that normalization based only on two selected genes influences the apparent expression of NES and SOX2, especially when comparing day 0 (NSC stage) to later stages with differentiating cells. On the other hand, for comparisons among day 7–day 28, we see an overall good agreement of proteomic and transcriptomic data.

The secretome of transplanted cells plays an important role in autocrine and paracrine signaling within the recipient tissue microenvironment. Even though several recent studies were focused on the secretome of NSCs, one may assume that the secretome will be significantly affected by cell origin and cultivation conditions; thus, results obtained by secretome analysis of Olig2-transduced human NSCs (Kim et al., 2014) or human NSCs derived from glioblastoma (Okawa et al., 2017) might not be fully transferable to other NSCs. Therefore, we analyzed the secretome of H9 NSCs during S and BG differentiation. Most of the 28 analyzed secreted growth factors, cytokines and chemokines, were detected at levels close to the lower limit of detection. However, consistently for all factors, the highest concentrations were secreted by proliferating NSCs. Eminent downregulation of secretion was detectable at the beginning of both differentiations (day 7), likely associated with abrupt microenvironment change after growth factor withdrawal. It is possible that levels of factors secreted by NSCs

may be overestimated in our experiments due to the lower cell numbers in culture at the start of the differentiation (NSC condition) and subsequent normalization to the cellular protein concentrations. However, this normalization should not affect trends in differentiating cells. We detected increasing secretion of IL-6 and VEGF in both differentiations, but again there was growing difference between protocols over time, with cells grown in BG differentiation protocol secreting significantly more IL-6 and VEGF at day 28. IL-6 is known to stimulate proliferation and thus self-renewal of NSCs in murine brain (Storer et al., 2018). Another study provided evidence that murine NSCs do not express a functional receptor for IL-6 and do not secrete IL-6 at the detectable level. However, treatment of these NSCs with fusion protein consisting of IL-6 and its receptor resulted in NSC differentiation into neurons and astrocytes (Islam et al., 2008). Nevertheless, Oh et al. showed that IL-6 secreted by astrocytes stimulates differentiation of NPCs to neurons in rat brain (Oh et al., 2010). Secretion of IL-6 by human NSCs transduced with Olig2 suggests that IL-6 may also play a role in differentiation into oligodendrocytes (Kim et al., 2014). Interestingly, secreted IL-6 induces VEGF expression (Cohen et al., 1996). The effect of VEGF on NSCs will be discussed in detail below.

KEGG, GO, and Mfuzz analyses confirmed high similarity between S and BG differentiation and revealed downregulation of mRNA splicing and mitotic cytokinesis during both differentiations as expected for differentiating cells. On the other hand, neurogenesis, gliogenesis, synaptic vesicle cycle, Wnt pathway, fatty acid metabolism, and regulation of cytoskeleton organization were upregulated during both differentiations, and such processes may correspond to changes in cellular morphology and metabolism of differentiated cells (NPCs and neurons). The discrepancy in expression of proliferation markers Ki-67 and PCNA that we observed at the early stage of NSC differentiation is likely caused by additional functions of these proteins. Ki-67 plays roles in the regulation of the cell cycle, perichromosomal layer assembly during mitosis, or maintenance and localization of heterochromatin [reviewed in Sun and Kaufman (2018)]. PCNA plays essential roles in DNA replication and repair (Essers et al., 2005). This is in agreement with our results from Mfuzz clustering, which revealed that proteins with the highest abundance at day 7 of both differentiations are connected to DNA repair processes. Indeed, published results of gene expression analyses of abovementioned processes and pathways during NSC/NPC differentiation support our data, e.g., inhibition of proliferation, downregulation of RNA transcription, and activation of the Wnt pathway in differentiating cells (Gurok et al., 2004; Cai et al., 2006). Although several proteomic studies of neural differentiation from ESCs or NSCs exist, these studies were mainly focused on identification of novel differentiation markers [reviewed in Melo-Braga et al. (2015)]. Fathi et al. analyzed proteome changes during neural differentiation of human ESCs and observed an increased expression of proteins connected to transport (of vesicles, proteins, and neurotransmitters), redox homeostasis, and glycolysis in differentiated cells, whereas proteins connected to mRNA processing were decreased (Fathi et al., 2014). A study of proteome and phosphoproteome during differentiation of

immortalized human NSCs showed downregulation of proteins involved in cell cycle and proliferation, while proteins involved in gliogenesis, neurogenesis, synaptogenesis, and Wnt signaling pathway were upregulated (Song et al., 2019). Wang et al. analyzed phosphoproteome during rat NSC differentiation and identified changes of phosphorylation status of 20 proteins participating in Wnt signaling (canonical and non-canonical pathways) and confirmed the Wnt signaling pathway as a key regulator of NSC differentiation (Wang S. et al., 2016). All these data agree with our results from KEGG and GO analyses.

Among the pathways identified as activated during both S and BG differentiations in our SWATH-MS data were the HIF-1 signaling pathway, Wnt signaling pathway, and VEGF signaling pathway. HIF1- $\alpha$  activates gene expression in response to hypoxia including gene for VEGF (Forsythe et al., 1996). However, our cultivations were performed in normoxic conditions, suggesting that the HIF1- $\alpha$  signaling pathway plays another role(s) in NSC differentiation. Recently, HIF1- $\alpha$  was shown to regulate neurogenesis by blocking premature differentiation of NSCs to neurons (Večera et al., 2020). Our immunoblotting results show decrease of HIF1- $\alpha$  abundance during both differentiations, which may correspond to increase in neuronal differentiation. Interestingly, expression of both HIF1- $\alpha$  and VEGF may be regulated by IL-6 via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Loeffler et al., 2005; Xu et al., 2005). Moreover, activation of the Wnt signaling pathway in glioblastoma under normoxic conditions leads to an activation of the VEGF signaling pathway via HIF1- $\alpha$  signaling (Vallée et al., 2018). We observed a positive correlation between secretion of IL-6 and VEGF, as well as between abundance of catenin  $\beta$ -1 and VEGF secretion during both S and BG differentiations. Therefore, one can assume that these three signaling pathways—HIF-1, Wnt, and VEGF—play important and coordinated roles in NSC differentiation *in vitro*, which are independent on oxygen level.

As secretome analysis revealed elevated secretion of VEGF-A during both differentiation protocols, we wanted to know which VEGF-A isoform is secreted. Using immunoblotting, we detected increased abundance of VEGF121 during both NSC differentiations compared to NSCs. However, the highest expression of VEGF121 in cells was at the early stage of differentiations, whereas VEGF-A secretion was highest at the end of the differentiations. Surprisingly, we did not detect any protein expression of VEGF165, although this is the most expressed isoform in rat NSCs (Schänzer et al., 2004). We also detected increased abundance of VEGF-A receptor neuropilin-1 during both differentiations. Neuropilin-1 was initially identified as a receptor for VEGF165 (Soker et al., 1998) but later was shown to bind also VEGF189, but not VEGF121 in mouse neurons *in vivo* (Tillo et al., 2015). However, neuropilin-1 binds VEGF121 in human endothelial cells *in vitro* (Pan et al., 2007). Although expression of neuropilin-1 is induced by VEGF165 in rat NSCs (Maurer et al., 2003), our results suggest that increased abundance of neuropilin-1 during both differentiations may not be connected to VEGF165 expression and secretion in H9 NSCs.

VEGF165 is the most studied VEGF-A isoform. It was shown that VEGF165 stimulates proliferation of chicken retinal

progenitor cells and inhibits their differentiation to retinal ganglion cells both *in vitro* and *in vivo* (Hashimoto et al., 2006), suppresses apoptosis and induces proliferation of rat NSCs in both the presence or absence of EGF/FGF2 *in vitro* (Schänzer et al., 2004), and supports survival of rat neurons *in vitro* (Hao and Rockwell, 2013). Moreover, supplementation with exogenous VEGF165 or transplantation of genetically engineered cells expressing VEGF165 provides neuroprotection and decreases histopathological changes in a rat model of brain ischemia (Manoonkitiwongsa et al., 2004; Yao et al., 2016), alleviates neuronal death in rat models of Huntington's (Ellison et al., 2013) and Parkinson's (Yasuhara et al., 2005) disease, and prolongs the lifespan of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (Wang Y. et al., 2016). In contrast, we did not observe any effect of VEGF165 supplementation on proliferation and survival of NSCs, independently on the presence or absence of EGF/FGF2. This might be caused by a different regulation or sensitivity of the VEGF-A pathway in H9 NSCs or possibly by a too high dose of VEGF165 in our experiment. Several studies showed that VEGF165-induced proliferation and apoptosis inhibition are dose-dependent, i.e., higher concentration of VEGF165 (up to 100 ng/mL) has higher impact (Schänzer et al., 2004; Hashimoto et al., 2006), while other studies provided evidence that higher doses of VEGF165 (100 ng/mL and more) have lower or even opposite effects and may be neurotoxic (Manoonkitiwongsa et al., 2004; Yasuhara et al., 2005; Ellison et al., 2013).

We found that VEGF121 supplementation induced proliferation and enhanced the survival of H9 NSCs in the absence of other growth factors but had no additional effect in the presence of EGF/FGF2. Herrera et al. showed that VEGF-A expression is decreased in the spinal cord injury region for up to 1 month, but VEGF165 supplementation has no effect on neuronal survival. However, antibody inhibition of all VEGF-A isoforms led to an even lower number of surviving neurons, suggesting that other VEGF-A isoform(s) than VEGF165 may play a neuroprotective role (Herrera et al., 2009). Indeed, rat NSCs transfected with VEGF121 gene survived, migrated after transplantation to ischemic brain, and improved the Neurological Severity Scale score earlier when compared to control NSCs (Zhu et al., 2005). Furthermore, secreted VEGF121 is highly diffusible as it lacks the heparin-binding domain, VEGF165 contains one heparin-binding domain and thus is partially diffusible and partially bound to extracellular matrix, and VEGF189 with its two heparin-binding domains is tightly bound to the extracellular matrix (Park et al., 1993). Thus, VEGF121 secreted by transplanted cells or infused during medical treatment could possibly affect a larger region of tissue than the other two isoforms, which could be beneficial for therapy.

Based on the results of VEGF121 supplementation and increased abundance of VEGF121 during both differentiations, it is possible that VEGF121 is secreted during NSC differentiations to support survival of neuronal cells. In fact, we observed increased activation of caspase-3 (apoptotic marker) at the early stage of NSC differentiation, which can be assigned to a change of the microenvironment, but activation of Caspase-3

was decreased at a later stage of both differentiations, which may correlate with increased secretion of VEGF-A.

## CONCLUDING REMARKS

Previous studies showed that cell lines of the same cell type may differ in their gene expression and differentiation potential, thus making generalization of results complicated [reviewed in Melo-Braga et al. (2015)]. Although our results in global are supported by previously published data, we observed preferential differentiation of H9 NSCs into neurons, which is not typical for NSCs in general. This represents a limitation of the H9 NSC line as a model of true multipotent NSCs. However, NSCs derived from H9 ESCs are broadly used for both *in vitro* and *in vivo* (cell transplantations to animal models) studies related to CNS pathologies, including autism spectrum disorders (Nguyen et al., 2018), brain ischemia (Green et al., 2018), glioblastoma (Balbous et al., 2014), neuroblastoma (Carr-Wilkinson et al., 2018), or Parkinson's disease (Iacovitti et al., 2007). Moreover, protocol for isolation of the clinical grade NSCs from H9 ESCs was recently established (Bohaciakova et al., 2019). Thus, we believe that our comprehensive proteome and secretome analyses provide additional information applicable in future H9 NSC studies. In potential clinical settings, commitment into NPCs and neural lineage could be beneficial. In a pro-inflammatory, pro-glial microenvironment in spinal cord injury, leading to glial scar formation (Bradbury and Burnside, 2019), neurally committed cells might be a better option for supporting restoration of neuronal connections. A case study of tumorigenesis via glioneuronal tumor formation after NSC transplantation in human (Amariglio et al., 2009) shows yet another risk of multipotent stem cell transplantation, which could be potentially diminished by use of only neurally committed cells.

Overall, our results show large-scale proteome changes in human H9 NSCs differentiating *in vitro*, consistent with the program of committed neural differentiation. Key pathways identified as regulated during this process were VEGF, Wnt, and HIF-1 signaling pathways. We proved that VEGF121 induces proliferation and support survival of differentiating cells, which is accompanied by the increased expression of the VEGF-A receptor neuropilin-1, by the increased expression of regulators of VEGF expression IL-6 and catenin  $\beta$ -1 (and also HIF1- $\alpha$  in the early stages of NSC differentiation), and by the fluctuating levels of the apoptotic marker caspase-3. H9 NSCs on their own secreted increasing levels of IL-6 and VEGF-A over the differentiation time course. This secretory phenotype could be potentially beneficial as part of neuroprotective and modulatory effect of transplanted cells in cell-based therapies.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets from the SWATH-MS measurements for this study can be found in the Panorama Public repository (<https://panoramaweb.org/NSCsdifferentiation.url>) and on ProteomeXchange under ID PXD021860.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JČ, JT, PV, and HK designed the study. JČ, JT, HK, KV, IP, IV, TP, and PV performed the experiments. JČ, JT, KV, HK, LP, MK, MV, and PV analyzed and interpreted the data. JČ, JT, HK, and PV wrote the paper with input from all authors. JČ, HK, and PV received the funding. All authors have seen and approved the manuscript.

## FUNDING

This research was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports projects InterCOST (LTC18079) under CellFit COST Action (CA16119), National Sustainability Programme I (LO1609), Operational Programme Research, Development and Education (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000785), and Charles University project GA UK (1767518).

## REFERENCES

- Abati, E., Bresolin, N., Comi, G., and Corti, S. (2019). Advances, challenges, and perspectives in translational stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 56, 6703–6715. doi: 10.1007/s12035-019-1554-x
- Ahuja, C. S., Mothe, A., Khazaei, M., Badhiwala, J. H., Gilbert, E. A., van der Kooy, D., et al. (2020). The leading edge: emerging neuroprotective and neuroregenerative cell-based therapies for spinal cord injury. *Stem Cells Transl. Med.* 9, 1509–1530. doi: 10.1002/sctm.19-0135
- Alhamdoosh, M., Ng, M., Wilson, N. J., Sheridan, J. M., Huynh, H., Wilson, M. J., et al. (2017). Combining multiple tools outperforms individual methods in gene set enrichment analyses. *Bioinformatics* 33, 414–424. doi: 10.1101/042580
- Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B. W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., et al. (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* 6:e1000029. doi: 10.1371/journal.pmed.1000029
- Balbus, A., Cortes, U., Guilloteau, K., Villalva, C., Flamant, S., Gaillard, A., et al. (2014). A mesenchymal glioma stem cell profile is related to clinical outcome. *Oncogenesis* 3:e91. doi: 10.1038/oncsis.2014.5
- Bohaciakova, D., Hruska-Plochan, M., Tsunemoto, R., Gifford, W. D., Driscoll, S. P., Glenn, T. D., et al. (2019). A scalable solution for isolating human multipotent clinical-grade neural stem cells from ES precursors. *Stem Cell Res. Ther.* 10:83. doi: 10.1186/s13287-019-1163-7
- Bolte, S., and Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224 (Pt 3), 213–232. doi: 10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x
- Bott, C. J., and Winckler, B. (2020). Intermediate filaments in developing neurons: beyond structure. *Cytoskeleton* 77, 110–128. doi: 10.1002/cm.21597
- Bradbury, E. J., and Burnside, E. R. (2019). Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nat. Commun.* 10:3879. doi: 10.1038/s41467-019-11707-7
- Cai, Y., Wu, P., Ozen, M., Yu, Y., Wang, J., Ittmann, M., et al. (2006). Gene expression profiling and analysis of signaling pathways involved in priming and differentiation of human neural stem cells. *Neuroscience* 138, 133–148. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.041
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439. doi: 10.1038/380435a0
- Carr-Wilkinson, J., Prathalingam, N., Pal, D., Moad, M., Lee, N., Sundaresh, A., et al. (2018). Differentiation of human embryonic stem cells to sympathetic neurons: a potential model for understanding neuroblastoma pathogenesis. *Stem Cells Int.* 2018:e4391641. doi: 10.1155/2018/4391641
- Choi, M., Chang, C.-Y., Clough, T., Broudy, D., Killeen, T., MacLean, B., et al. (2014). MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank our colleagues from the Laboratory of Applied Proteome Analyses, Hana Kovarova, Ph.D., for her support and advice for study design, and Michaela Mullerova for help with cell cultures. We also thank our colleagues from the Laboratory of Cell Regeneration and Plasticity, Stefan Juhas, Ph.D., for providing pig brain samples, Zdenka Ellederova, Ph.D., for providing selected antibodies used in this study, and prof. Jan Motlik, Ph.D., for his continuous support and obtaining the NSP I funding.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.612560/full#supplementary-material>

- spectrometry-based proteomic experiments. *Bioinformatics* 30, 2524–2526. doi: 10.1093/bioinformatics/btu305
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G., and Levi, B. Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 271, 736–741. doi: 10.1074/jbc.271.2.736
- Cuascut, F. X., and Hutton, G. J. (2019). Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: current perspectives. *Biomedicines* 7:26. doi: 10.3390/biomedicines7020026
- de Gioia, R., Biella, F., Citterio, G., Rizzo, F., Abati, E., Nizzardo, M., et al. (2020). Neural stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3103. doi: 10.3390/ijms21093103
- Diaz, M. L. (2019). Regenerative medicine: could Parkinson's be the first neurodegenerative disease to be cured? *Future Sci. OA* 5:FSO418. doi: 10.2144/foa-2019-0035
- Einstein, O., Fainstein, N., Vaknin, I., Mizrahi-Kol, R., Reihartz, E., Grigoriadis, N., et al. (2007). Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann. Neurol.* 61, 209–218. doi: 10.1002/ana.21033
- Ellison, S. M., Trabalza, A., Tisato, V., Pazarentzos, E., Lee, S., Papadaki, V., et al. (2013). Dose-dependent neuroprotection of VEGF165 in Huntington's disease striatum. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1862–1875. doi: 10.1038/mt.2013.132
- Essers, J., Theil, A. F., Baldeyron, C., Cappellen, W. A., van Houtsmuller, A. B., Kanaar, R., et al. (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol. Cell Biol.* 25, 9350–9359. doi: 10.1128/MCB.25.21.9350-9359.2005
- Fathi, A., Hatami, M., Vakilian, H., Han, C.-L., Chen, Y.-J., Baharvand, H., et al. (2014). Quantitative proteomics analysis highlights the role of redox hemostasis and energy metabolism in human embryonic stem cell differentiation to neural cells. *J. Proteomics* 101, 1–16. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.002
- Fathi, A., Pakzad, M., Taei, A., Brink, T. C., Pirhaji, L., Ruiz, G., et al. (2009). Comparative proteome and transcriptome analyses of embryonic stem cells during embryoid body-based differentiation. *Proteomics* 9, 4859–4870. doi: 10.1002/pmic.200900003
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., et al. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442. doi: 10.1038/380439a0
- Fischer, I., Dulin, J. N., and Lane, M. A. (2020). Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 366–383. doi: 10.1038/s41583-020-0314-2
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., et al. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 16, 4604–4613. doi: 10.1128/MCB.16.9.4604

- Gage, F. H., and Temple, S. (2013). Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* 80, 588–601. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.037
- Green, C., Minassian, A., Vogel, S., Diedenhofen, M., Beyrau, A., Wiedermann, D., et al. (2018). Sensorimotor functional and structural networks after intracerebral stem cell grafts in the ischemic mouse brain. *J. Neurosci.* 38, 1648–1661. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2715-17.2018
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Gurok, U., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Ropers, H.-H., Scharff, C., and Nuber, U. A. (2004). Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *J. Neurosci.* 24, 5982–6002. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0809-04.2004
- Haigh, J. J., Morelli, P. I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., et al. (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* 262, 225–241. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00356-7
- Hao, T., and Rockwell, P. (2013). Signaling through the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 protects hippocampal neurons from mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 421–431. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.036
- Harris, J. P., Burrell, J. C., Struzyna, L. A., Chen, H. I., Serruya, M. D., Wolf, J. A., et al. (2020). Emerging regenerative medicine and tissue engineering strategies for Parkinson's disease. *NPJ Park Dis.* 6. doi: 10.1038/s41531-019-0105-5
- Hashimoto, T., Zhang, X.-M., Chen, B. Y., and Yang, X.-J. (2006). VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development* 133, 2201–2210. doi: 10.1242/dev.02385
- Hayashi, Y., Lin, H.-T., Lee, C.-C., and Tsai, K.-J. (2020). Effects of neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease models. *J. Biomed. Sci.* 27:29. doi: 10.1186/s12929-020-0622-x
- Herrera, J. J., Nesic, O., and Narayana, P. A. (2009). Reduced vascular endothelial growth factor expression in contusive spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 26, 995–1003. doi: 10.1089/neu.2008.0779
- Iacovitti, L., Donaldson, A. E., Marshall, C. E., Suon, S., and Yang, M. (2007). A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: studies *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res.* 1127, 19–25. doi: 10.1016/j.brainres.2006.10.022
- Islam, O., Gong, X., Rose-John, S., and Heese, K. (2008). Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 20, 188–199. doi: 10.1091/mbc.e08-05-0463
- Kim, W. K., Kim, D., Cui, J., Jang, H. H., Kim, K. S., Lee, H. J., et al. (2014). Secretome analysis of human oligodendrocytes derived from neural stem cells. *PLoS ONE* 9:e84292. doi: 10.1371/journal.pone.0084292
- Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2:a006502. doi: 10.1101/cshperspect.a006502
- Kumar, L., and Futschik, M. E. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* 2, 5–7. doi: 10.6026/97320630002005
- Kupcova Skalnikova, H. (2013). Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 95, 2196–2211. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.015
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559
- Lenth, R. (2020). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. Available online at: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> (accessed December 10, 2020).
- Liu, X.-Y., Yang, L.-P., and Zhao, L. (2020). Stem cell therapy for Alzheimer's disease. *World J. Stem Cells* 12, 787–802. doi: 10.4252/wjsc.v12.i8.787
- Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J., and Weissenberger, J. (2005). Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes *in vivo* and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int. J. Cancer* 115, 202–213. doi: 10.1002/ijc.20871
- Mackenzie, F., and Ruhrberg, C. (2012). Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 139, 1371–1380. doi: 10.1242/dev.072348
- MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., et al. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966–968. doi: 10.1093/bioinformatics/btq054
- Manoonkitiwongsa, P. S., Schultz, R. L., McCreery, D. B., Whitter, E. F., and Lyden, P. D. (2004). Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 693–702. doi: 10.1097/01.WCB.0000126236.54306.21
- Maurer, M. H., Tripps, W. K. C., Feldmann, R. E., and Kuschinsky, W. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci. Lett.* 344, 165–168. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00407-5
- Melo-Braga, M. N., Meyer, M., Zeng, X., and Larsen, M. R. (2015). Characterization of human neural differentiation from pluripotent stem cells using proteomics/PTMomics—current state-of-the-art and challenges. *Proteomics* 15, 656–674. doi: 10.1002/pmic.201400388
- Nguyen, L. S., Fregeat, J., Bole-Feysot, C., Cagnard, N., Iyer, A., Anink, J., et al. (2018). Role of miR-146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: relevance for neurodevelopmental disorders. *Mol Autism* 9:38. doi: 10.1186/s13229-018-0219-3
- Oh, J., McCloskey, M. A., Blong, C. C., Bendickson, L., Nilsen-Hamilton, M., and Sakaguchi, D. S. (2010). Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 88, 2798–2809. doi: 10.1002/jnr.22447
- Okawa, S., Gargica, S., Blin, C., Ender, C., Pollard, S. M., and Krijgsveld, J. (2017). Proteome and secretome characterization of glioblastoma-derived neural stem cells. *Stem Cells* 35, 967–980. doi: 10.1002/stem.2542
- Oliver, D., and Reddy, P. H. (2019). Dynamics of dynamin-related protein 1 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Cells* 8:961. doi: 10.3390/cells8090961
- Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.* 9, 62–66. doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076
- Ottoboni, L., von Wunster, B., and Martino, G. (2020). Therapeutic plasticity of neural stem cells. *Front. Neurol.* 11:148. doi: 10.3389/fneur.2020.00148
- Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R. K., Peale, F., et al. (2007). Neupilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J. Biol. Chem.* 282, 24049–24056. doi: 10.1074/jbc.M703554200
- Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* 4, 1317–1326. doi: 10.1091/mbc.4.12.1317
- Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., et al. (2020). A comparative analysis of multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources, with a focus on neuroregenerative potential. *Sci. Rep.* 10:4290. doi: 10.1038/s41598-020-61167-z
- Pluchino, S., Smith, J. A., and Peruzzotti-Jametti, L. (2020). Promises and limitations of neural stem cell therapies for progressive multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* 26, 898–912. doi: 10.1016/j.molmed.2020.04.005
- R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: <https://www.R-project.org/> (accessed December 10, 2020).
- Reiter, L., Rinner, O., Picotti, P., Hüttenhain, R., Beck, M., Brusniak, M.-Y., et al. (2011). mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments. *Nat. Methods* 8, 430–435. doi: 10.1038/nmeth.1584
- Rosenblum, S., Smith, T. N., Wang, N., Chua, J. Y., Westbroek, E., Wang, K., et al. (2015). BDNF pretreatment of human embryonic-derived neural stem cells improves cell survival and functional recovery after transplantation in hypoxic-ischemic stroke. *Cell Transplant.* 24, 2449–2461. doi: 10.3727/096368914X679354
- Schänzer, A., Wachs, F.-P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., et al. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells *in vitro* and neurogenesis *in vivo* by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.* 14, 237–248. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00060.x
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019

- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., et al. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. doi: 10.1038/nature10098
- Shoemaker, L. D., and Kornblum, H. I. (2016). Neural stem cells (NSCs) and proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 15, 344–354. doi: 10.1074/mcp.O115.052704
- Skalnikova, H., Halada, P., Vodicka, P., Motlik, J., Rehulka, P., Hörning, O., et al. (2007). A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells. *Proteomics* 7, 1825–1838. doi: 10.1002/prot.200600867
- Skalnikova, H., Motlik, J., Gadher, S. J., and Kovarova, H. (2011). Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics* 11, 691–708. doi: 10.1002/prot.201000402
- Skalnikova, H., Vodicka, P., Pelech, S., Motlik, J., Gadher, S. J., and Kovarova, H. (2008). Protein signaling pathways in differentiation of neural stem cells. *Proteomics* 8, 4547–4559. doi: 10.1002/prot.200800096
- Smyth, G., Hu, Y., Ritchie, M., Silver, J., Wettenhall, J., McCarthy, D., et al. (2020). *limma: Linear Models for Microarray Data [Internet]*. *Bioconductor version: Release (3.10)*. Available online at: <https://bioconductor.org/packages/limma/> (accessed February 13, 2020).
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735–745. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81402-6
- Song, Y., Subramanian, K., Berberich, M. J., Rodriguez, S., Latorre, I. J., Luria, C. M., et al. (2019). A dynamic view of the proteomic landscape during differentiation of ReNcell VM cells, an immortalized human neural progenitor line. *Sci. Data* 6:190016. doi: 10.1038/sdata.2019.16
- Storer, M. A., Gallagher, D., Fatt, M. P., Simonetta, J. V., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2018). Interleukin-6 regulates adult neural stem cell numbers during normal and abnormal post-natal development. *Stem Cell Rep.* 10, 1464–1480. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.03.008
- Suda, S., Nito, C., Yokobori, S., Sakamoto, Y., Nakajima, M., Sowa, K., et al. (2020). Recent advances in cell-based therapies for ischemic stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 21:6781. doi: 10.3390/ijms21186718
- Sun, X., and Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 127, 175–186. doi: 10.1007/s00412-018-0659-8
- Tillo, M., Erskine, L., Cariboni, A., Fantin, A., Joyce, A., Denti, L., et al. (2015). VEGF189 binds NRP1 and is sufficient for VEGF/NRP1-dependent neuronal patterning in the developing brain. *Development* 142, 314–319. doi: 10.1242/dev.115998
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., et al. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947–11954.
- Tyleckova, J., Valekova, I., Zizkova, M., Rakocycova, M., Marsala, S., Marsala, M., et al. (2016). Surface N-glycoproteome patterns reveal key proteins of neuronal differentiation. *J. Proteomics* 132, 13–20. doi: 10.1016/j.jprot.2015.11.008
- Valekova, J., Skalnikova, H. K., Jarkovska, K., Motlik, J., and Kovarova, H. (2015). Multiplex immunoassays for quantification of cytokines, growth factors, and other proteins in stem cell communication. *Methods Mol. Biol.* 1212, 39–63. doi: 10.1007/978-1-4939-9494-9\_4
- Vallée, A., Guillevin, R., and Vallée, J.-N. (2018). Vasculogenesis and angiogenesis initiation under normoxic conditions through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gliomas. *Rev. Neurosci.* 29, 71–91. doi: 10.1515/revneuro-2017-0032
- Večera, J., Procházková, J., Šumberová, V., Pánská, V., Paculová, H., Lánová, M. K., et al. (2020). Hypoxia/Hif1 $\alpha$  prevents premature neuronal differentiation of neural stem cells through the activation of Hes1. *Stem Cell Res.* 45:101770. doi: 10.1016/j.scr.2020.101770
- Wang, F., Kameda, M., Yasuhara, T., Tajiri, N., Kikuchi, Y., Liang, H. B., et al. (2011). GDNF-pretreatment enhances the survival of neural stem cells following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* 71, 92–98. doi: 10.1016/j.neures.2011.05.019
- Wang, S., Li, Z., Shen, H., Zhang, Z., Yin, Y., Wang, Q., et al. (2016). Quantitative phosphoproteomic study reveals that protein kinase A regulates neural stem cell differentiation through phosphorylation of catenin beta-1 and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Stem Cells* 34, 2090–2101. doi: 10.1002/stem.2387
- Wang, Y., Duan, W., Wang, W., Di, W., Liu, Y., Liu, Y., et al. (2016). scAAV9-VEGF prolongs the survival of transgenic ALS mice by promoting activation of M2 microglia and the PI3K/Akt pathway. *Brain Res.* 1648, 1–10. doi: 10.1016/j.brainres.2016.06.043
- Woolard, J., Bevan, H. S., Harper, S. J., and Bates, D. O. (2009). Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation* 16, 572–592. doi: 10.1080/10739680902997333
- Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S., et al. (2005). Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 24, 5552–5560. doi: 10.1038/sj.onc.1208719
- Yao, Y., Zheng, X.-R., Zhang, S.-S., Wang, X., Yu, X.-H., Tan, J.-L., et al. (2016). Transplantation of vascular endothelial growth factor-modified neural stem/progenitor cells promotes the recovery of neurological function following hypoxic-ischemic brain damage. *Neural Regen. Res.* 11, 1456–1463. doi: 10.4103/1673-5374.191220
- Yasuhara, T., Shingo, T., Muraoka, K., wen Ji, Y., Kameda, M., Takeuchi, A., et al. (2005). The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of *in vitro* and *in vivo* Parkinson's disease model. *Brain Res.* 1038, 1–10. doi: 10.1016/j.brainres.2004.12.055
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., and He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS J. Integr. Biol.* 16, 284–287. doi: 10.1089/omi.2011.0118
- Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Mertens, J., Kim, Y., Ma, L., et al. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife* 5:e13374. doi: 10.7554/eLife.13374
- Zhu, W., Mao, Y., Zhao, Y., Zhou, L.-F., Wang, Y., Zhu, J.-H., et al. (2005). Transplantation of vascular endothelial growth factor-transfected neural stem cells into the rat brain provides neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 57, 325–333, discussion 325–333. doi: 10.1227/01.NEU.0000166682.50272.BC
- Zizkova, M., Sucha, R., Tyleckova, J., Jarkovska, K., Mairychova, K., Kotrcova, E., et al. (2015). Proteome-wide analysis of neural stem cell differentiation to facilitate transition to cell replacement therapies. *Expert Rev. Proteomics* 12, 83–95. doi: 10.1586/14789450.2015.977381

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Červenka, Tylečková, Kupcová Skalniková, Vodičková Kepková, Poliak, Valeková, Pfeiferová, Kolář, Vaškovičová, Pánková and Vodička. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## METHODS & TECHNIQUES

# Targeted mass spectrometry for monitoring of neural differentiation

Rita Sucha<sup>\*1</sup>, Martina Kubickova<sup>\*1,2</sup>, Jakub Cervenka<sup>1,2</sup>, Marian Hruska-Plochan<sup>3</sup>, Dasa Bohaciakova<sup>4</sup>, Katerina Vodickova Kepkova<sup>1</sup>, Tereza Novakova<sup>1,2</sup>, Katerina Budkova<sup>1,2</sup>, Andrej Susor<sup>5</sup>, Martin Marsala<sup>6</sup>, Jan Motlik<sup>7</sup>, Hana Kovarova<sup>1</sup> and Petr Vodicka<sup>1,‡</sup>

### ABSTRACT

Human multipotent neural stem cells could effectively be used for the treatment of a variety of neurological disorders. However, a defining signature of neural stem cell lines that would be expandable, non-tumorigenic, and differentiate into desirable neuronal/glial phenotype after *in vivo* grafting is not yet defined. Employing a mass spectrometry approach, based on selected reaction monitoring, we tested a panel of well-described culture conditions, and measured levels of protein markers routinely used to probe neural differentiation, i.e. POU5F1 (OCT4), SOX2, NES, DCX, TUBB3, MAP2, S100B, GFAP, GALC, and OLIG1. Our multiplexed assay enabled us to simultaneously identify the presence of pluripotent, multipotent, and lineage-committed neural cells, thus representing a powerful tool to optimize novel and highly specific propagation and differentiation protocols. The multiplexing capacity of this method permits the addition of other newly identified cell type-specific markers to further increase the specificity and quantitative accuracy in detecting targeted cell populations. Such an expandable assay may gain the advantage over traditional antibody-based assays, and represents a method of choice for quality control of neural stem cell lines intended for clinical use.

**KEY WORDS:** Neural stem cell, Neural differentiation, Selected reaction monitoring, Mass spectrometry, Cell line characterization, Protein marker

### INTRODUCTION

Neurological disorders affect approximately one-sixth of the human population (United Nations. Nearly 1 in 6 of world's population suffer from neurological disorders – UN report, 2007), and represent a major economic burden for society (United Nations. Nearly 1 in 6 of world's population suffer from neurological disorders – UN report, 2007; Wittehen et al., 2011; World Health Organization. Neurological disorders: public health challenges, 2006). Since the figures are expected to grow (World Health Organization. Neurological disorders: public health challenges, 2006), it is of utmost importance to develop an effective therapy, as currently this is mostly limited to symptomatic treatment, physiotherapy, and occasional surgical interventions. The adult central nervous system (CNS) was long considered a relatively static tissue with very limited regenerative capacity. Nevertheless, ground-breaking discoveries throughout the past two decades demonstrated that in humans, new neurons were produced continuously from neural stem cells (NSCs) residing mainly in the subventricular zone, in the dentate gyrus of the hippocampus (Doetsch et al., 1999; Eriksson et al., 1998; Johansson et al., 1999), and possibly in the striatum (Ernst et al., 2014). Human NSCs can be derived from the fetal CNS, embryonic stem cells (ESCs), or induced pluripotent stem cells (iPSCs), and such *in vitro*-propagated cells survive, divide, migrate, and differentiate into neurons and glial cells in host CNS tissues upon transplantation (Carpenter et al., 1999; Flax et al., 1998; Kobayashi et al., 2012; Svendsen et al., 1997; Vescovi et al., 1999; Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2001).

*In vitro*-propagated NSCs cultured in monolayer require fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and/or epidermal growth factor (EGF) to survive, retain multipotentiality, and neurogenic efficiency (Carpenter et al., 1999; Conti and Cattaneo, 2010; Flax et al., 1998; Vescovi et al., 1999). Simple withdrawal of the mitogens leads to a spontaneous differentiation mainly into neurons, then astrocytes, and oligodendrocytes (Cattaneo and McKay, 1991; Vescovi et al., 1999; Zhang et al., 2001). Differentiated cells die in the absence of FGF-2 (Vescovi et al., 1999), which can be prevented by using either low levels of FGF-2 (Vescovi et al., 1999) or supplements such as N-2 or serum (Carpenter et al., 1999; Flax et al., 1998), trophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor or signalling molecules such as dibutyl cyclic AMP (Lee et al., 2007; Yuan et al., 2011). Other protocols were developed to direct the NSC differentiation towards particular neural cell types, such as using fetal bovine serum (FBS) together with the N-2 supplement for astrocytes (Meyer et al., 2014). NSCs can also be 'primed' or 'pre-differentiated' to enrich for cells of particular interest (Yuan et al., 2011), or genetically modified to overexpress relevant proteins (Klein et al., 2005), and this self-production and/or secretion of protein(s) may significantly affect the uniformity of such cell lines.

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Proteome Analyses and Research Center PIGMOD, Institute of Animal Physiology and Genetics of The Czech Academy of Sciences, Rumburska 89, Libechov CZ-27721, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Albertov 6, Prague CZ-12843, Czech Republic. <sup>3</sup>Department of Quantitative Biomedicine, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, Zurich CH-8057, Switzerland. <sup>4</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 753/5, Brno CZ-62500, Czech Republic. <sup>5</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Germ Cells, Institute of Animal Physiology and Genetics of The Czech Academy of Sciences, Rumburska 89, Libechov CZ-27721, Czech Republic. <sup>6</sup>Neuroregeneration Laboratory, Sanford Consortium for Regenerative Medicine, Department of Anesthesiology, University of California, San Diego, 2880 Torrey Pines Scenic Dr., La Jolla, CA 92037, USA. <sup>7</sup>Laboratory of Cell Regeneration and Plasticity and Research Center PIGMOD, Institute of Animal Physiology and Genetics of The Czech Academy of Sciences, Rumburska 89, Libechov CZ-27721, Czech Republic.

\*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (vodicka@iapg.cas.cz)

© R.S., 0000-0002-2808-4870; J.C., 0000-0002-9947-2045; M.H.P., 0000-0002-9253-4362; D.B., 0000-0002-9538-6668; K.V.K., 0000-0002-6848-7826; A.S., 0000-0003-2926-4096; M.M., 0000-0001-5048-6422; H.K., 0000-0002-1705-4035; P.V., 0000-0002-6605-9158

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 26 March 2021; Accepted 28 June 2021



NSCs can be derived from multiple sources, and properties of such NSC lines differ (Conti and Cattaneo, 2010). Many protocols generate a rather heterogeneous population containing NSCs, committed neuronal and glial cells, or neural crest cells. In the case of ESC- or iPSC-derived NSCs, residual undifferentiated pluripotent stem cells can also be present in cultures, which may cause tumour formation after *in vivo* transplantation (Yabut and Pleasure, 2016). Thus, both differentiation potential and purity of human NSC lines should be periodically screened during the production period, and only a population of NSCs that fulfils the release criteria used for *in vivo* grafting assays.

To develop a potent, specific, and predictable screening assay that defines the NSCs clones of high purity, several criteria need to be met, including the ability to (i) define the NSCs population by the presence of specific markers, (ii) identify the presence of pluripotent stem cells or other cell type contaminants, including the mesoderm and endoderm derivatives, and (iii) offer a quick turnaround from data analysis to interpretation.

Morphology of live cells in culture is regularly checked as a part of good laboratory practice. Next-generation (deep) RNA sequencing offers the potential for a detailed characterization of human NSC lines and for the discovery of novel NSC markers (Bohaciakova et al., 2019). Deep RNA sequencing, however, is currently not fast enough to serve as a screening method, and protein effector levels can be predicted from the RNA levels only with limited accuracy. Although traditional antibody-based screenings such as immunofluorescence (IF) imaging, western blotting, or microarrays are well established for the detection of proteins, their throughput potential is relatively low. Immunoassays such as ELISA or flow cytometry may increase the throughput, but their multiplexing capacity is limited (Kupcova Skalnikova et al., 2017). Mass cytometry, flow cytometry augmented by mass spectrometry (MS)-based detection improves multiplexing potential. Imaging mass cytometry, a technique combining IF and mass cytometry (Bodenmiller, 2016), allows for simultaneous and spatially-resolved quantification, but cannot ensure rapid read-out and analysis.

The application of quantitative proteomics provided essential insights into NSC biology, generating a number of differential protein maps and partial functional networks (Shoemaker and Kornblum, 2016; Zizkova et al., 2015). MS-based quantifications following enrichment strategies for capturing candidate markers of NSCs were performed (Melo-Braga et al., 2014; Song et al., 2019; Tyleckova et al., 2016) using a conventional shotgun approach, where a subset of peptides was automatically and in part stochastically measured in the process of data-dependent precursor selection (Aebersold and Mann, 2003). Recently, we applied the data-independent acquisition MS method that combined global feature detection with targeted data extraction to simultaneously quantify thousands of proteins in the course of NSC differentiation (Červenka et al., 2021). This altogether helped to improve our understanding of the NSC differentiation and to identify potential protein markers of distinct steps in this process. However, such studies are not suitable for routine cell line characterization due to time requirements for data processing.

We aimed to develop an assay that would allow fast, efficient, and accurate monitoring of human NSC cultures using a targeted MS approach based on selected reaction monitoring (SRM). The essence of the SRM is the generation of specific, quantitative MS assays for each protein of interest and their subsequent application to multiple samples (Lange et al., 2008). To achieve this, several independent proteotypic (detectable and unique) peptides of the same protein are targeted, substantially increasing the confidence in the specific detection. The endogenous peptides are measured

together with isotopically labelled reference peptides, and their quality can be verified by a fragment ion spectrum. Multiple data points are integrated to quantify proteins of interest, increasing the method statistical power and the precision of determined abundance changes. All this offers higher data reliability compared to the antibody-based methods routinely used for protein quantification. Samples can be processed in a single 30-min multiplexed MS method which makes it possible to collect and analyse the data about a cellular state in a matter of hours without the computational overhead (Soste et al., 2014).

Here we present a novel SRM assay to measure qualitatively and quantitatively the levels of protein markers broadly used to probe neural differentiation, i.e. POU domain, class 5, transcription factor 1 (POU5F1; also known as octamer-binding transcription factor 4, OCT4), transcription factor SOX-2 (SOX2), nestin (NES), doublecortin (DCX), tubulin beta-3 chain (TUBB3), microtubule-associated protein 2 (MAP2), protein S100-B (S100B), glial fibrillary acidic protein (GFAP), galactocerebrosidase (GALC), and oligodendrocyte transcription factor 1 (OLIG1). Such assay can be used to monitor the purity and the differentiation potential of human NSCs, and to identify their optimal culture conditions.

## RESULTS

### Markers selection and SRM method development

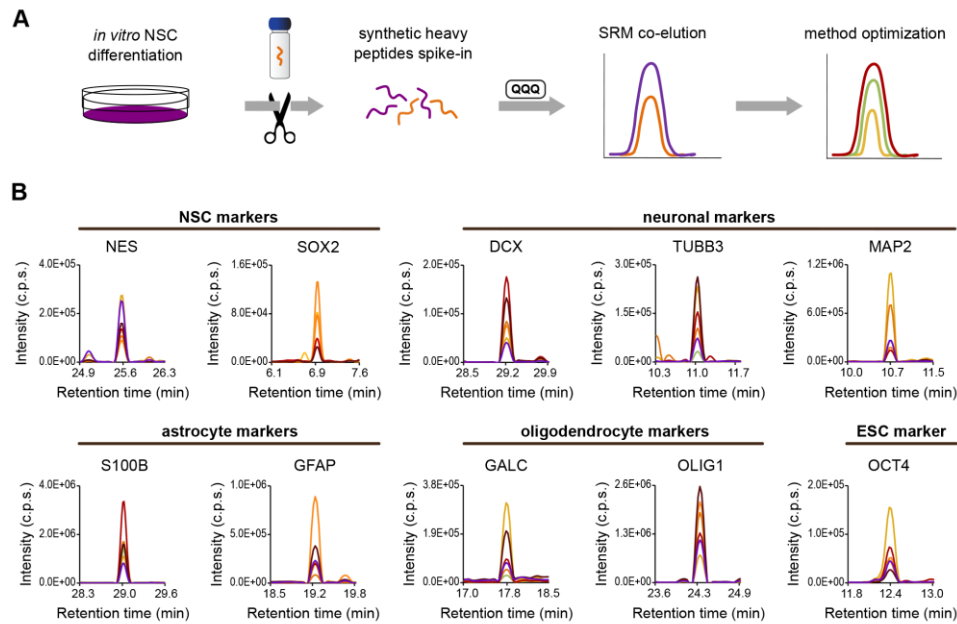
We aimed to target a set of protein markers routinely used in NSC differentiation studies (Table S1), including ESC markers (homeobox protein NANOG, NANOG; OCT4), NSC markers (SOX2; NES; paired box protein Pax-6, PAX6; proliferation marker protein Ki-67, MKI67), neuronal markers (DCX, TUBB3, MAP2), astrocyte markers (GFAP, S100B), and oligodendrocyte markers (GALC, OLIG1). We also intended to test the ability to detect low-abundant proteins previously found in our differentiation experiments, namely vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (Červenka et al., 2021) and growth-regulated alpha protein (CXCL1) (unpublished work, Institute of Animal Physiology and Genetics of The Czech Academy of Sciences).

The level of endogenous peptides is typically stoichiometric to the level of proteins (quantotypic). We developed SRM assays using heavy-labelled synthetic reference peptides (Table S2) that do not recapitulate the complexity of post-translational or translational modifications. Incomplete digestion during sample processing may also impact the quantotypic properties, so we performed preliminary measurements of NSCs differentiated with BDNF and GDNF for 21 days. This allowed us to spot discrepancies, exclude outlier peptides (if present), and ensure accurate quantification of protein levels.

For quantitative measurements, we had selected proteins successfully detected by SRM in our conditions (Fig. 1), and evaluated their capability to provide a read-out for NSCs and their differentiated counterparts by immunocytochemistry (Fig. 2; Table S3), and by gene expression analysis (Fig. 3; Table S4). Then, we assembled optimal coordinates of specific assays for ten markers (OCT4, SOX2, NES, DCX, TUBB3, MAP2, GFAP, S100B, GALC, OLIG1) into a multiplexed SRM method (Table S5). Proteins were represented by two to eight proteotypic peptides with good quantotypic properties, accurately representing the abundance level, and their four to ten most suitable transitions.

### BDNF and GDNF differentiation defined by immunocytochemistry and gene expression analysis

NSCs generated from the NIH approved human ESCs line H9 were cultured in the NSC proliferation medium with EGF and FGF-2.



**Fig. 1. Design of multiplexed SRM method.** (A) Synthesized peptides (orange string in the vial) containing a heavy-isotope label were spiked into peptide mixtures extracted from differentiating NSCs after trypsin cleavage (purple strings). These samples were measured by SRM on a triple quadrupole to monitor the chromatographic co-elution of endogenous peptides (purple peak) and spiked-in heavy surrogates (orange peak), and a match in relative intensities of fragment ions. Multiple coloured traces in the method optimization graph represent the detection of different fragment ions from common peptide precursor (SRM transitions). (B) Optimal coordinates were assembled into a multiplexed method, and representative heavy peptides of protein markers are displayed.

The cells were directed into neurons using the differentiation medium without EGF and FGF-2, and supplemented by BDNF and GDNF (BG) to support cell survival for 7, 14, 21, and 28 days (Fig. 2A). To evaluate the cellular identity of proliferating NSCs and differentiating cells at protein and transcript levels, we applied antibody-based IF imaging and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).

All protein markers analysed, excluding OCT4 and GFAP, were detected in NSCs by IF imaging, fibrillar localization of NES, DCX, TUBB3, MAP2, and S100B was mainly apparent in differentiating cells, and only sporadic positivity for GALC and OLIG1 was detected in the later stages (Fig. 2B). Once the BG differentiation had been triggered, the mRNA level of neuronal (DCX, TUBB3, and MAP2) and NSC (NES, SOX2) markers was strongly induced (Fig. 3A). In the second week, the expression of neuronal markers had further increased, and remained stably high, while the expression of NSC markers had gradually decreased (Fig. 3A). Glial markers had dropped in the first week which was followed by steeply rising levels of the astrocyte marker S100B but steady levels of oligodendrocyte markers (GALC, OLIG1) (Fig. 3A).

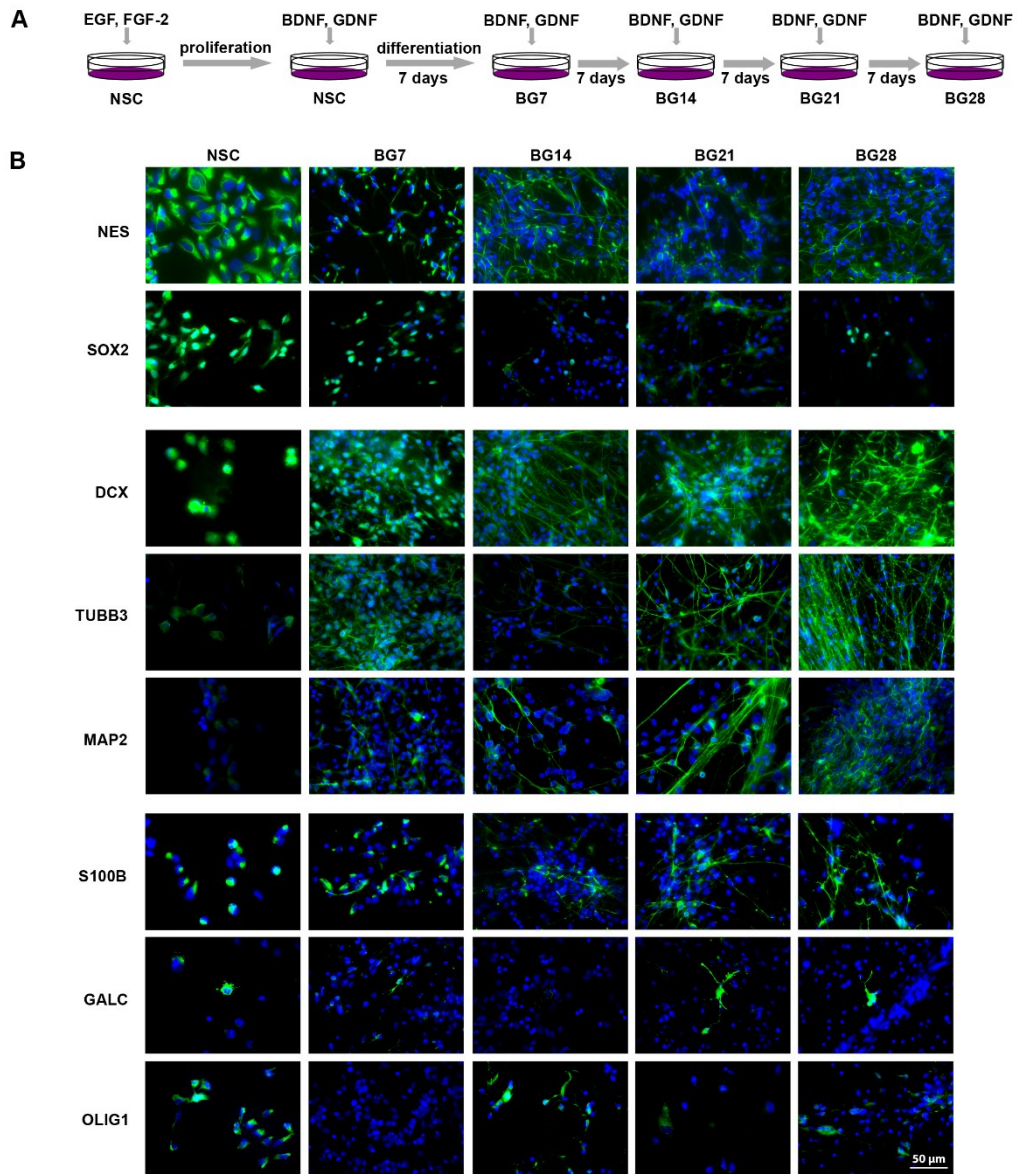
The clustering of expression profiles (Fig. 3B) showed a separation of NSC (NES, SOX2) and neuronal (DCX, TUBB3, MAP2) markers from glial lineage markers (S100B, OLIG1, GALC). As we expected, our IF and RT-qPCR data showed an induced expression of neuronal markers and a reduced expression of glial markers at the early stages of neuronal differentiation, which was followed by a reduced expression of NSC markers in the later stages.

#### BDNF and GDNF differentiation defined by SRM

The BG differentiation peptide samples were subjected to simultaneous quantitative measurement by SRM (Table S6). Only proteins detected with  $\geq 2$  peptides in either BG differentiated cells or control cells (NSCs) were assigned as quantifiable. This included neuronal and NSC markers (DCX, TUBB3, MAP2, NES, SOX2), and the astrocyte marker S100B (Fig. 4A). If only one peptide of a protein had been detected, this marker was assigned as detectable in a particular condition (GFAP, GALC, OLIG1) (Table S6). In agreement with IF imaging results, OCT4 was not detected by SRM in BG differentiating NSCs (Table S6).

DCX was quantifiable only in differentiating BG cells and not in proliferating NSCs, reaching its maximum level after 3 weeks of differentiation with the highest abundance change recorded in our study. MAP2 and TUBB3 were gradually rising from day 7 and 14, respectively. NES and SOX2 were decreasing from day 7 and 14, respectively. Only one of two analysed SOX2 peptides remained detectable after 4 weeks of differentiation. SRM quantification results show that the method enables monitoring of NSC differentiation (Fig. 4A). All neuronal markers are increased in differentiating BG cells, and all NSC markers are decreased in these cells.

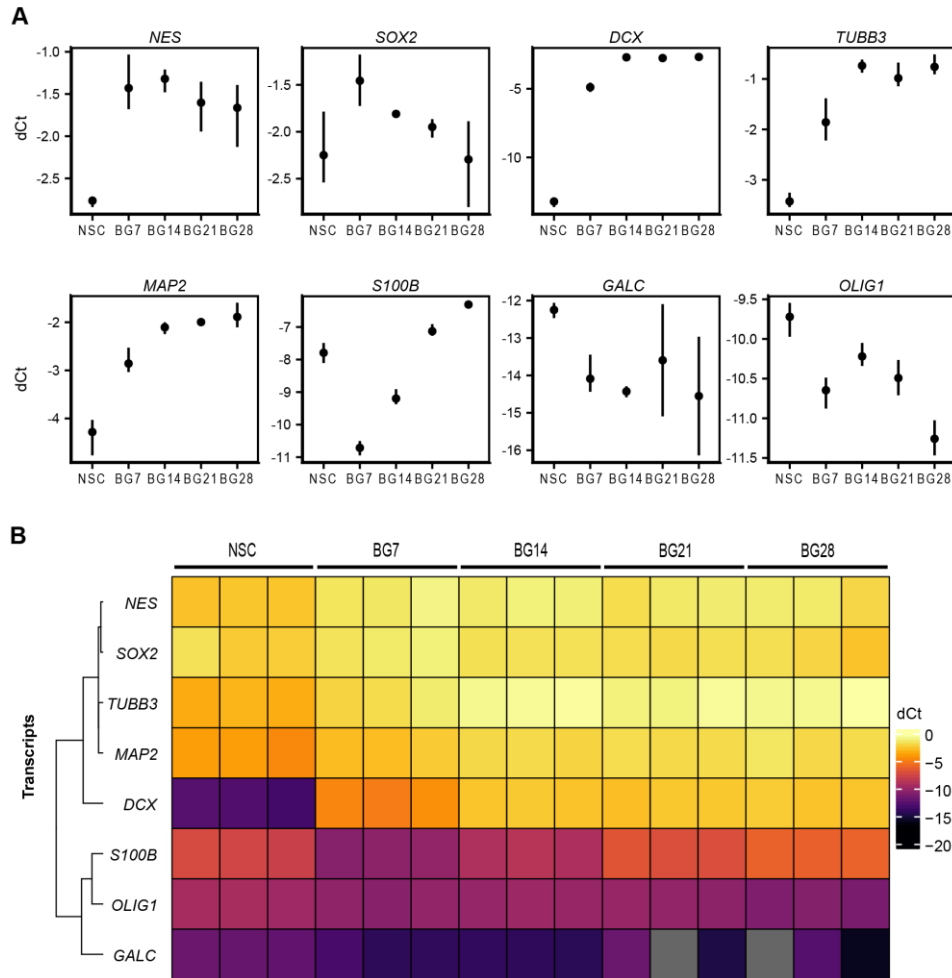
A significant positive correlation over the differentiation time-course was observed for the neuronal markers TUBB3 and MAP2, DCX and MAP2, but also for the glial marker S100B with TUBB3 (Fig. 4B). Despite differences in the S100B peptides



**Fig. 2. NSC differentiation analysed by immunocytochemistry.** (A) Scheme of NSC differentiation into neurons by the exchange of EGF and FGF-2 for BDNF and GDNF (BG) for 7, 14, 21, and 28 days. (B) Representative IF images of BG differentiation show protein markers in green; cell nuclei counterstained by DAPI in blue. Scale bar: 50  $\mu$ m. Images of negative controls (no primary antibody) are shown in Table S3 with the table of used antibodies.

performance (Fig. 4A), the changes at the protein level reliably reflected the changes at the mRNA level (Fig. 4C). The S100B protein level decreased in the first week, and returned to its

original level in the later stages of BG differentiation (Fig. 4A). The levels of DCX and MAP2 measured by SRM also positively correlated with mRNA levels measured by RT-qPCR (Fig. 4C;



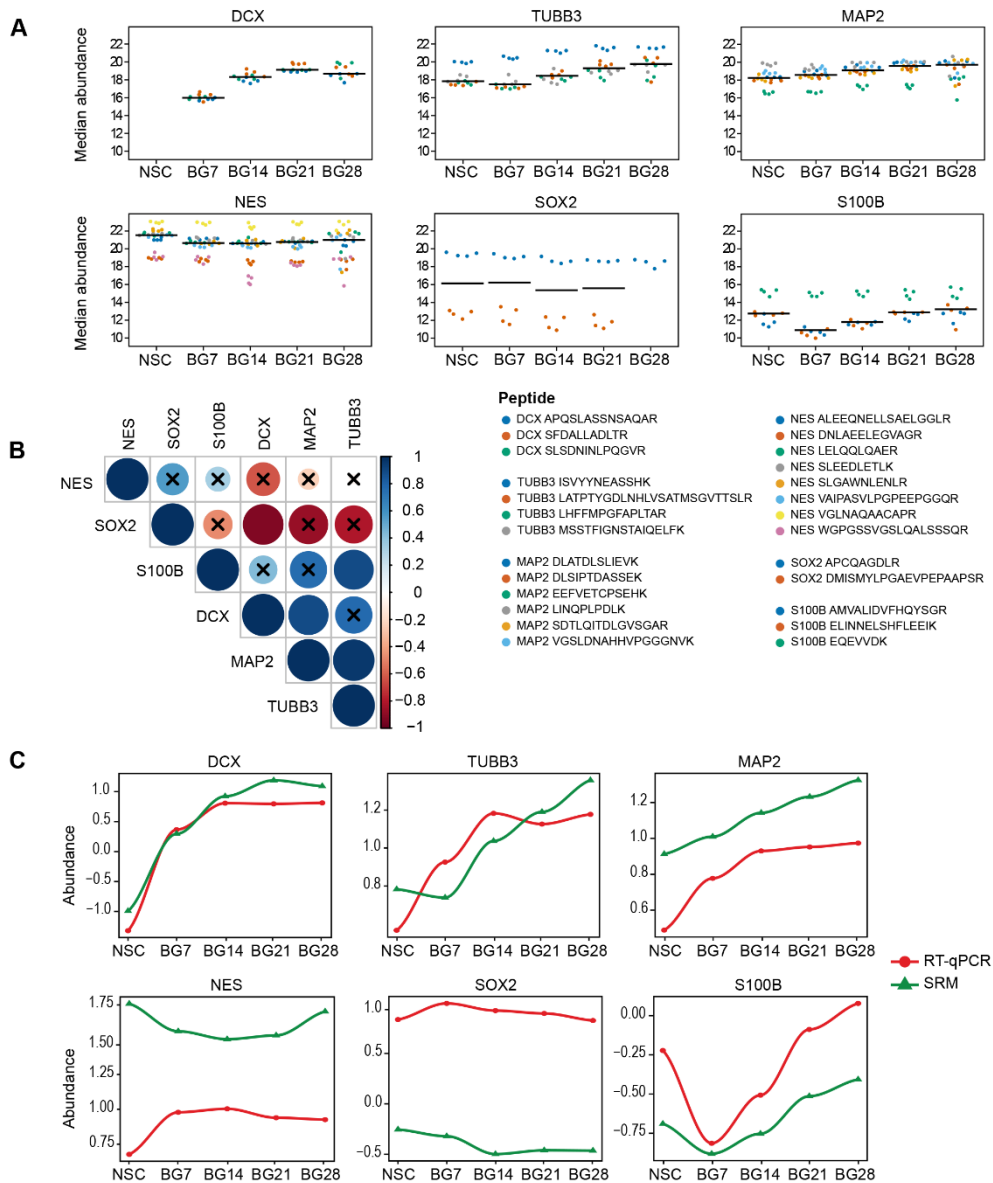
**Fig. 3. Analysis of gene expression during NSC differentiation.** (A) mRNA levels analysed by RT-qPCR. Individual transcripts were normalized to two housekeeping mRNA controls (*GAPDH* and *ATP5F1B*). Data from three independent experiments are displayed as mean (point) dCt values  $\pm$ 95% confidence intervals (vertical lines). (B) A heatmap of normalized dCt values from A shows similar co-expression profiles of neural and glial markers over the course of *in vitro* differentiation. Primers are listed in Table S4.

Table S7). The significant negative correlation of SOX2 versus DCX (Fig. 4B) confirms the switch from NSCs to differentiating neuronal states.

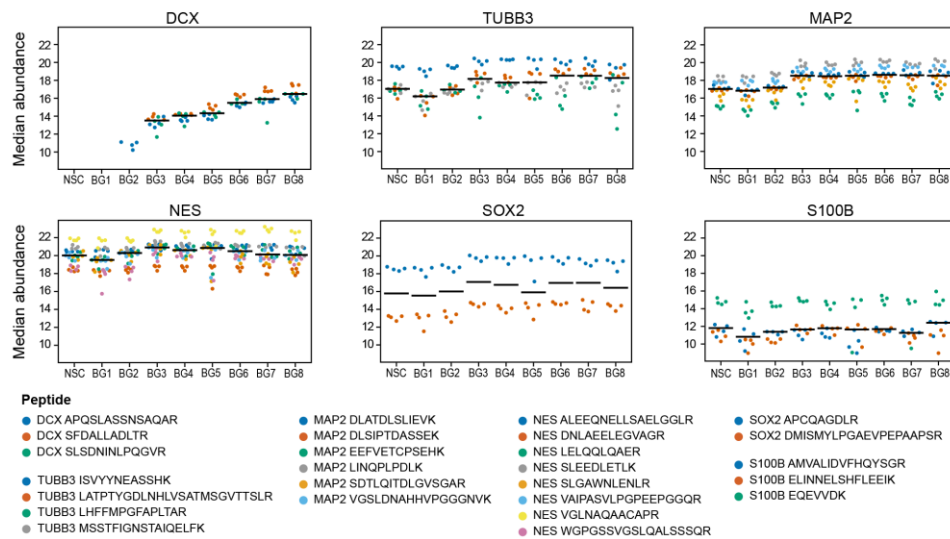
Our data indicate that major changes occur in the first week of the BG differentiation (Figs 3 and 4), so we zoomed in, and analysed differentiating NSCs daily for the first 8 days. We found that DCX and TUBB3/MAP2 increased from day 2 and 3, respectively, NES and SOX2 decreased from day 4, and S100B decreased until day 8 (Fig. 5). The expression of neuronal and NSC markers, and the astrocyte marker S100B is regulated at the very early stages of *in vitro* differentiation.

#### SRM monitoring of differentiating NSCs, ESCs, and astrocytes

Next, we tested a panel of additional culture conditions. NSCs were directed into neurons using the differentiation medium without EGF and FGF-2 supplemented with different combinations of BDNF and GDNF, and into astrocytes using FBS (Fig. 6A). Our recent data revealed that these neurotrophic factors affected the later stages of differentiation (Červenka et al., 2021), so we employed our SRM assay to depict this effect after 4 weeks of differentiation. As a reference, pluripotent ESCs and mature astrocytes were processed for MS analysis (Fig. 6A).



**Fig. 4. Simultaneous quantification of 28-day BG differentiation.** (A) Median abundances (black lines) of each protein marker in a given time interval of BG differentiation (7, 14, 21, 28 days). Dots of the same colour represent peptide abundances in four biological replicates. This is defined as the median of log<sub>2</sub>-transformed peak area of all transitions of the same peptide. Quantification results can be found in Table S6. (B) A correlogram is depicting pair-wise Pearson correlations of individual protein markers over the differentiation time-course. Colour and dot sizes indicate correlation strength, correlations without cross are statistically significant ( $P < 0.05$ ). (C) Plots are depicting a correlation of the transcripts levels (RT-qPCR, data from Fig. 3A) and the proteins levels (SRM, data from Fig. 4A) over time. The dCT values for mRNA levels and the log<sub>2</sub>-transformed values (abundances) for proteins were scaled and centred to mean 0 and standard deviation 1 across all measured targets to allow display in the same graph. A table of corresponding Pearson correlation coefficients is provided as Table S7.



**Fig. 5. SRM quantification of 8-day BG differentiation.** Median abundances (black lines) of each protein marker in a given time interval of BG differentiation (1–8 days). Dots of the same colour represent peptide abundances in four biological replicates. This is defined as the median of log<sub>2</sub>-transformed peak area of all transitions of the same peptide.

SOX2, DCX, and MAP2 were quantifiable in the course of neuronal differentiation induced with BDNF and/or GDNF (BG28, B28, G28), in the spontaneously differentiated NSCs (S28), and in the astroglial differentiation induced by FBS (Astro1) (Fig. 6B; Table S6). NES and TUBB3 were detected by SRM at a quantifiable level in all conditions (Fig. 6B), regardless of their expected specificity. OCT4 was quantifiable in the reference ESCs (ESC1, ESC2) and GFAP in the reference astrocytes (Astro2), exclusively (Fig. 6A; Table S6). In agreement with our SRM data (Fig. 6B), the expression of OCT4 pluripotent ESC marker was previously confirmed in the ESC1 and ESC2 cell lines (The International Stem Cell Initiative\*, 2007). S100B astrocyte marker was recognized as a suitable protein for quantification in both astrocyte conditions, and in NSCs induced to neuronal differentiation (Fig. 6B).

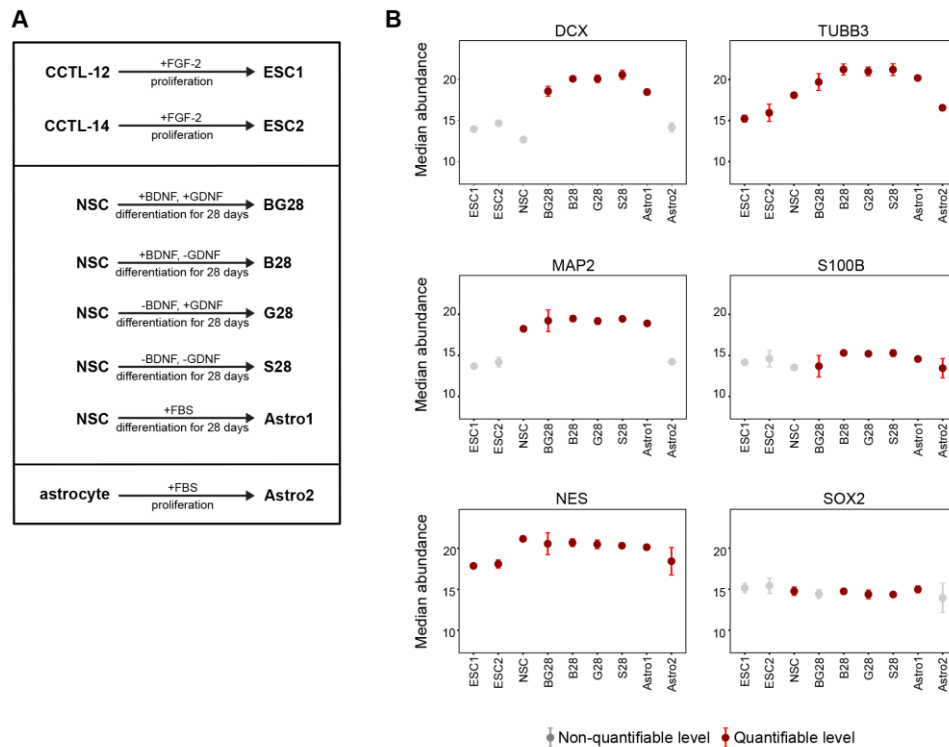
Our neural cell cultures do not contain detectable amounts of terminally differentiated oligodendrocytes. GALC levels could be quantified by SRM in the pluripotent ESCs and in the astrocyte differentiating NSCs (Table S6), highlighting the validity of this protein as a target for stem cell studies. OLIG1 was identified in differentiating NSCs only as detectable, without possible quantification. This marker was retained in the assay for its prospective use in oligodendrocyte differentiation studies where OLIG1 levels are expected to rise and for its correlation with GALC levels. Protein abundance changes prove the validity of all protein markers, except OLIG1, for their simultaneous quantification by SRM (Table S6).

The SRM data showed that neuronal markers, and the astrocyte marker S100B were strongly induced, while NSC markers were mostly reduced in all differentiation conditions (Fig. 6B). A weak signal of the astrocyte marker GFAP was detected only in the BG-induced NSCs for one of its unique peptides (Table S6). Different levels of astrocyte markers were identified in the Astro1 cells derived from NSCs and in the Astro2 mature astrocytes

(Fig. 7). S100B increased in abundance in the astrocyte differentiating NSCs, but not in the mature astrocytes (Fig. 7A,B). All four peptides of the GFAP marker were detected specifically in the mature astrocytes, but not in the astrocyte differentiating NSCs (Fig. 7A). In mature astrocytes, antibody-based imaging confirmed strongly positive cells for GFAP (Fig. 7C), which was negative in all differentiation conditions of H9-derived NSCs (data not shown). BG cells were positive for S100B (Fig. 2B) without expected morphological changes, compared to mature astrocytes (Fig. 7C). Importantly, proteins marked in our study as quantifiable in the pluripotent ESC1 and ESC2 cells (OCT4, GALC) were also observed in the Astro1 cells exposed to FBS (less defined culture conditions) (Table S6). Based on SRM, we demonstrate that all the differentiation conditions we considered have pleiotropic effects, and simple removal of EGF and FGF-2 is sufficient for triggering neuronal phenotype changes. The astrocyte differentiating H9-derived NSCs manifest rather neuronal than astroglial phenotype.

## DISCUSSION

The animal *in vivo* grafting experiments with human NSCs derived from fetal tissue, ESCs, or iPSCs have accumulated convincing and valuable data to support cell-replacement therapies in neurological disorders and CNS injuries (Cizkova et al., 2007; Hefferan et al., 2012; Jensen et al., 2013; Kelly et al., 2004; Lu et al., 2012, 2014; Svendsen et al., 1997; van Gorp et al., 2013; Yuan et al., 2013). Fetal tissues come with inherent ethical and logistical issues (Barker and de Beaufort, 2013), and it is evident that the source of such a tissue is limited. However, fetal cerebral tissue grafting experiments into human patients with neurodegenerative diseases provided us with invaluable information about feasibility, safety, and experimental procedures. It thus paved the way for the use of proliferating NSC lines generated from a single donor (fetal tissue, embryo, or skin biopsy-reprogrammed cells) that may represent the



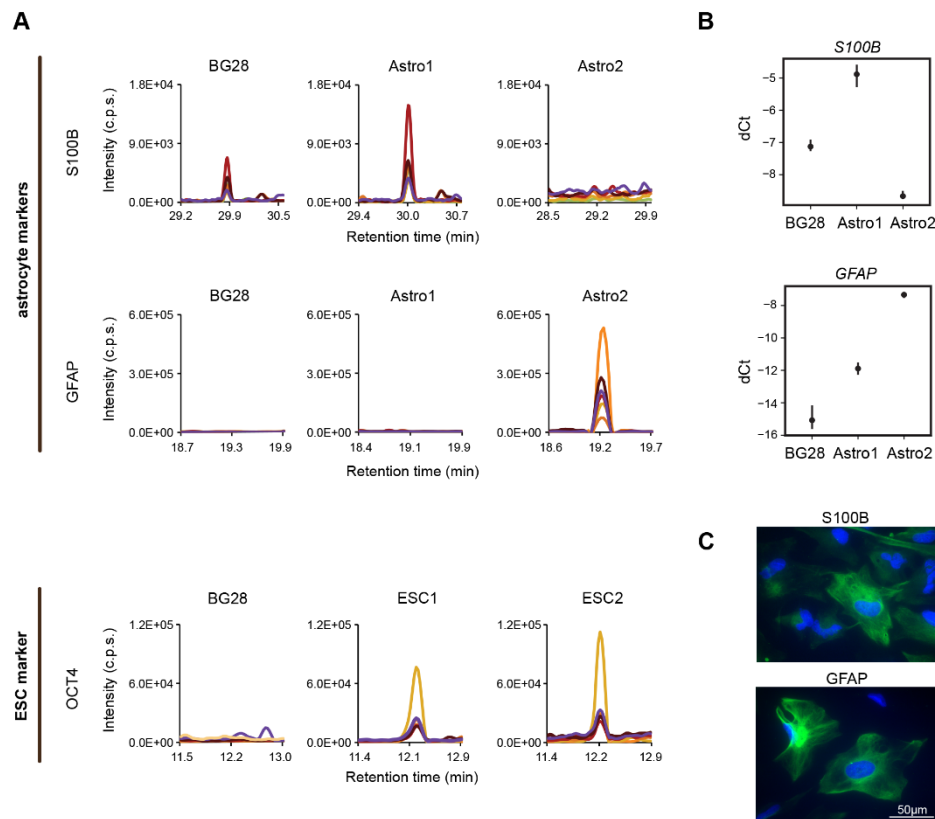
**Fig. 6. SRM monitoring of NSC differentiation.** (A) A panel of additional conditions for validation involved two reference ESC lines (ESC1, ESC2), NSCs differentiated with both BDNF and GDNF (BG28), BDNF only (B28), GDNF only (G28), spontaneously differentiated NSCs (S28), astrocyte differentiating NSCs (Astro1), and reference mature astrocytes (Astro2). (B) Condition plots from quadruplicate cultures were generated using MSstats; graphs show median signal and 95% confidence intervals. Red colour means that the protein was quantifiable in this condition (≥2 peptides per protein were detected in ≥3 biological replicates), grey colour means that protein abundances were below quantification levels in particular conditions.

cells of choice. While the development of new grafting and immunosuppression strategies is ongoing (Bjarkam et al., 2010; Boulis, 2010; Cunningham, 1998; Marsala, 2014; Usvald et al., 2010), it is essential to establish in parallel a reliable and reasonably fast screening protocol that would assess the potential of the selected NSCs as well as their safety.

To address shortcomings of antibody-based screens, targeted MS analysis by SRM can be used not only to accurately verify protein abundance changes emerging from global transcriptome and proteome profiling (Cervenka et al., 2021; Donega et al., 2019; Tyleckova et al., 2016; Yocum et al., 2008), but rather to identify markers that would provide a reliable read-out for the differentiation potential of NSCs. We had developed a quantitative high-throughput assay for neuroscience studies, and evaluated its capability to monitor neurogenic potential and maturity of lineage-directed populations of NSCs. A variety of expected responses were detected by SRM, including increased neuronal markers from very early stages of *in vitro* differentiation and decreased NSC multipotency markers in later stages. Persisting expression of NES and SOX2 in differentiated cells might indicate that multipotent NSCs are still present in this population, providing a

potential source for ongoing proliferation and differentiation upon transplantation into the host CNS. Alternatively, it may suggest persistent NES and SOX2 expression in non-neuronal populations, e.g. differentiating glia. Either way, it would make NES and SOX2 ideal negative selection markers for pure neuronal populations.

Our data show that DCX, TUBB3, and MAP2 represent more neuro-specific markers compared to NES and SOX2. For this reason, no single marker should be used as definitive proof of a particular cell type. Instead, a quantitative evaluation of several markers in a combinatory assay should be used to identify a protein profile (cell signature) of a selected cell population. Combinatory quantitative assays targeting protein markers may indeed represent a powerful method that would report on the multidifferentiation potential of NSCs, both *in vitro* and *in vivo* (Nagato et al., 2005). Dunkley et al. (2015) introduced a human pluripotent stem cell-derived cellular model of neuronal development. The SRM-based protein profiling applied in this study enabled the identification of time-dependent patterns conserved across multiple cell lines. However, care should be taken to include only reliable and independently verified markers, to avoid measuring uninformative markers.



**Fig. 7. Astrocyte and ESC markers.** (A) S100B and GFAP astrocyte markers in NSCs directed into astrocytes (Astro1) and in mature astrocytes (Astro2). OCT4 marker of ESCs in reference ESC lines (ESC1, ESC2). Representative endogenous peptides are displayed as a chromatographic trace of peptide elution and detection by SRM. Coloured traces represent the detection of different SRM transitions. (B) S100B and GFAP mRNAs analysed by RT-qPCR. Individual transcripts were normalized to two housekeeping controls (*GAPDH* and *ATP5F1B*) from three independent experiments. Mean  $\pm$ 95% confidence intervals are shown as black points and vertical lines. (C) Representative IF images of mature astrocytes (Astro2) show GFAP and S100B protein markers in green, cell nuclei counterstained by DAPI in blue. Scale bar: 50  $\mu$ m. Images of negative controls (no primary antibody) are shown in Table S3 with the table of used antibodies.

Ideally, reference pure cell populations would be used as controls for individual markers, but the post-mitotic nature of terminally differentiated neurons and oligodendrocytes makes this impossible for human cells. Immortalized or progenitor human cell lines still depend on *in vitro* differentiation and/or suffer from biased protein patterns (Conti and Cattaneo, 2010; Melo-Braga et al., 2015). FBS had been used in our study to differentiate NSCs into astrocytes, and the OCT4 marker became detectable, indicating the potential of H9-derived NSCs to dedifferentiate and manifest pluripotent traits. The GALC marker did not reach the limit of quantification in the course of BG differentiation, but appeared at a quantifiable level in pluripotent ESCs and in the FBS-induced NSCs.

S100B levels varied considerably in H9-derived NSCs exposed to various stimuli. Although S100B is a broadly accepted marker of astroglial cells, its dynamic expression was reported in NSCs in developing rat brain (Patro et al., 2015), and in human NSC

lines (Lam et al., 2019). S100B expression in rat neural progenitor cells correlated with their proliferative potential. When the progenitor cells had stopped dividing, S100B was downregulated, and its expression was restored in mature astrocytes, together with an astrocyte marker GFAP (Patro et al., 2015). GFAP was readily detected in our mature astrocytes, and was at detection, but not quantification limit in BG neuronal differentiation cells, demonstrating the presence of sporadic astrocytes in this population. As we reported recently, NSCs derived from human ESCs showed no detectable GFAP signal during 3–6 weeks of the FBS-induced *in vitro* differentiation. However, 2–6 months after *in vivo* grafting into immunosuppressed rats and minipigs, a high number of GFAP positive human astrocytes is clearly detectable (Bohaciakova et al., 2019). These findings resemble *in vivo* embryonal development of the human cerebral cortex, where no expression of GFAP was detectable at week 11, whereas S100B was expressed (Vinci et al.,



2016). Our results suggest that classical protocols are not optimal for *in vitro* differentiation of mature astrocytes from the ESC-derived NSCs.

Here we show that the SRM-based quantification of suitable proteins/peptides is a powerful tool to report on the presence of pluripotent, multipotent, and committed neuronal and glial cells. SRM allows fast and reproducible detection of a predefined set of proteins, spanning a broad range of abundances (Lange et al., 2008). Some of the potential specific markers were not accessible by SRM due to the lack of tryptic peptides specific for a single protein with respect to the human proteome (NANOG). For other targets, specific SRM assays could be developed using synthetic heavy-labelled peptides, but were below the limit of detection in our cultures (PAX6, MKI67, VEGF-A, and CXCL1). These proteins can be substituted by other markers, such as minichromosome maintenance complex components as additional markers of proliferation, or other relevant proteins expected from the literature to report on neural (stem) cell populations and their derivatives (Zizkova et al., 2015).

The quantitative SRM assay presented here can be applied to an unlimited number of human NSC lines at high throughput and reproducibility, and using ~300,000 cells to be able to perform this high-accuracy quantitative measurement repeatedly. Since the *in vitro* differentiation takes long periods of time, we suggest running the assay before commencing large-scale experiments to ensure high reproducibility. On top of that, relatively low cell numbers required for a successful SRM measurement brings the possibility of using identical samples for multiple high-throughput screens, including bulk or single-cell deep RNA sequencing, thus offering unique gene/protein expression cross-validation.

We propose the application of the developed neural cell SRM assay as quality control for optimizing culture conditions during NSCs propagation and differentiation. The multiplexing capacity enables to include broad spectra of targets (~150 proteins) that could be selected from relevant molecular pathways (e.g. cell cycle, apoptosis, stress response, etc.) and measured together with the current panel of markers within the 30-min MS method (Soste et al., 2014). However, novel candidate markers need to be screened for their biological relevance and MS detectability with respect to the number of targeted peptides and their suitability for quantification. Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis of proliferating NSCs could increase the throughput in the SRM assays validation step, which could be further combined with a sorting strategy coupled to SRM. This would make it possible to distinguish between maturity and purity of neural populations generated from NSCs, adding another level of information.

### Conclusions

In summary, we developed a novel SRM-based assay that could be easily employed to assess the neurogenic/gliogenic potential of NSCs during the propagation phase. The assay can be further exploited in *in vitro* experiments which could lead to improved or even novel differentiation protocols. The sensitivity and speed could eventually allow for testing of banked NSCs to test their differentiation potential upon long-term storage. Moreover, the SRM assay can be simply adapted to the analysis of additional cell types and experimental approaches.

### MATERIALS AND METHODS

#### Neural stem cells differentiation

Unless otherwise stated, cell culture reagents were obtained from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere.

Gibco Human Neural Stem Cells (H9-derived) generated from the NIH approved human ESCs (WA09; 46, XX) had been obtained from Life Technologies (catalogue number 510088, lot number 1402001, Thermo Fisher Scientific Inc.) and cultured as described previously (Červenka et al., 2021) with modifications. Briefly, the H9-derived NSCs (condition NSC) were grown on 20 µg/ml poly-L-ornithine and 5 µg/ml laminin-coated plates (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the NSC proliferation medium containing KnockOut Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12, 2 mM GlutaMAX, 1% penicillin-streptomycin, 2% StemPro Neural Supplement, 20 ng/ml human recombinant FGF-2, and 20 ng/ml human recombinant EGF. The NSC proliferation medium was changed every other day, and cells were passaged every 5–7 days using 0.05% trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Once the NSC culture had been established, low-passage cells were directed toward a specific lineage using an appropriate differentiation medium.

For directed differentiation into neurons, the NSC proliferation medium was switched to neuronal differentiation medium by exchanging FGF-2 and EGF for human recombinant BDNF and human recombinant GDNF (10 ng/ml of each; both from PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Half of the differentiation medium was changed every other day, directing the NSC differentiation into neurons upon the treatment with BDNF and GDNF for 7, 14, 21, and 28 days (conditions BG7, BG14, BG21, BG28).

In the zooming experiment, NSCs were supplemented with BDNF and GDNF for 1–8 days (conditions BG1–8).

To evaluate the effect of BDNF and GDNF, these factors were applied exclusively for 28 days (conditions B28, G28). For spontaneous neuronal differentiation, neither BDNF nor GDNF was used, and NSCs differentiated by removing FGF-2 and EGF (condition S28).

For differentiation into astrocytes, NSCs were grown on Geltrex-coated plates, and the NSC proliferation medium was switched to astrocyte differentiation medium containing KnockOut DMEM/F-12, 1% N-2 Supplement, 2 mM GlutaMAX, 1% FBS, 1% penicillin-streptomycin. The astrocyte differentiation medium was changed every 3–4 days, directing the NSC differentiation into astrocytes for 28 days (condition Astro1).

#### Reference cell populations

Gibco Human Astrocytes generated from brain progenitor-derived astrocytes were obtained from Life Technologies (part number K1884, lot number 1640797, Thermo Fisher Scientific Inc.). Astrocytes (condition Astro2) were cultured according to the manufacturer's instructions on Geltrex-coated plates in the astrocyte proliferation medium containing Gibco Astrocyte Medium, 1% N-2 Supplement, 1% penicillin-streptomycin, and 10% FBS. The astrocyte proliferation medium was changed every other day, and cells were passaged every 3–4 days using 0.05% trypsin/EDTA.

Human ESC lines CCTL-12 [46, XX, del(18); condition ESC1] and CCTL-14 (46, XX; condition ESC2) (The International Stem Cell Initiative\*, 2007) were grown on gelatin-coated plates in the presence of mitotically inactivated primary mouse embryonic fibroblasts (derived from 12.5-day-old mouse embryos, strain CF1; density 24,000 cells/cm<sup>2</sup>). DMEM/F-12 was supplemented with 15% knockout serum replacement, 2 mM L-Glutamine, 1× minimum essential medium non-essential amino acids, 0.5% penicillin-streptomycin, 100 µmol/β-2 mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and 4 ng/ml FGF-2 (PeproTech). The embryonic culture medium was changed every day, and cells were manually passaged every 5–7 days. For sample preparation, ESC colonies were manually detached from the cell culture dish to avoid contamination with mouse embryonic fibroblasts.

#### Immunocytochemistry

Selected markers were monitored in BG-differentiating NSCs and in astrocyte conditions by IF imaging. Cells were seeded on Nunc Lab-Tek chambered slides. Cells cultured as described above were washed with pre-heated phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, and washed three times with PBS. The cells were then permeabilized and blocked with 0.1% Triton X-100, 5% goat serum, and 1% bovine serum albumin in PBS for 45 min. For the cell surface marker GALC, Triton X-100 was omitted. Antibodies (Table S3) were diluted in 5% goat serum in PBS and incubated with the cells overnight at 4°C. After

three washing steps with PBS, antibodies were detected using fluorescently-labelled secondary antibodies (goat anti-mouse or goat anti-rabbit; Alexa Fluor 488; both from Thermo Fisher Scientific Inc.) diluted to 1:500 in 5% goat serum in PBS for 60 min in the dark. After three washing steps with PBS, DNA was stained with DAPI. In the negative controls, primary antibodies were omitted (Table S3). Fluorescent images were captured using an inverted fluorescent microscope in 16-bit depth (DMI6000 B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and assembled in ImageJ software (v1.49k, National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) (Schneider et al., 2012).

#### Quantitative reverse transcription PCR

Gene expression analyses of selected markers were performed as described previously (Červenka et al., 2021). Briefly, total RNA was isolated from BG-differentiating NSCs and astrocyte conditions by RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) with QIAshredder (Qiagen), and converted into cDNA with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The reaction mix for one quantitative PCR contained 5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 125 nM of each primer (Table S4), 25 ng of cDNA template, and PCR water. Following settings were used on CFX96 Touch Real-Time detection system (Bio-Rad): 12 min at 95°C for enzyme activation, then 15 s at 95°C for denaturation with 40 cycles of 30 s at 57°C for annealing, and 30 s at 72°C for an extension. Cycle threshold (Ct) values were normalized to the average of two housekeeping genes Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and ATP synthase subunit beta, mitochondrial (*ATP5F1B*).

#### Sample preparation for MS analysis

Cell samples in four bioreplicates for each condition were washed with PBS and resuspended in a buffer containing 8 M urea (Sigma-Aldrich), 50 mM ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , Sigma-Aldrich), and 5 mM EDTA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). The cells were disrupted by vortexing (ten consecutive rounds of 1.2 min) and by sonicating on ice (15 min). The samples were centrifuged at 20,000 *g* for 15 min (4°C) to remove any remaining debris, and protein concentrations were determined (Pierce 660 nm Protein Assay, Thermo Fisher Scientific Inc.). The protein extracts were then supplemented with ProteaseMAX Surfactant (Promega, Madison, WI, USA) to a final concentration of 0.1%. After vortexing and sonicating as described above, proteins were reduced with 10 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine for 30 min at 32°C and alkylated with 40 mM iodoacetamide for 45 min at 25°C, in the dark. Samples were diluted with freshly prepared 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and 0.01% ProteaseMAX to a final concentration of 1 M urea, and incubated at 37°C with sequencing-grade Lysyl Endopeptidase (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) and sequencing-grade porcine trypsin (Promega) proteases for 4 h and 14 h, respectively, both in an enzyme/substrate ratio of 1/100 (w/w). The digestion was stopped by acidification with formic acid (FA) to a final pH <3. The peptide mixtures were loaded onto C18 spin columns (The Nest Group Inc., Southborough, MA, USA) to desalt according to the manufacturer's instructions. Peptides were eluted with 80% acetonitrile. Peptide samples were desiccated on a vacuum centrifuge and re-solubilized in 0.1% FA for LC-MS analysis. Samples were processed in parallel with their respective controls (NSCs).

#### SRM assays development

Proteotypic peptides matching 14 frequently used protein markers of the NSC differentiation (Table S1) were retrieved from publicly available resources of targeted proteomics assays (SRM Atlas, <http://www.srmatlas.org/>). Development and validation of SRM assays to measure protein abundances were performed as previously described (Soste et al., 2014) using heavy-labelled unpurified synthetic peptides (Thermo Scientific Biopolymers, Thermo Fisher Scientific Inc.). These were mixed and monitored by LC-SRM using a 5500 QTrap triple-quadrupole/ion-trap mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a nano-electrospray ion source (Sciex). On-line chromatographic separation of the peptides was achieved with an Eksigent 425 nanoLC system (Eksigent/Sciex) equipped with a 20-cm fused-silica column with a 75- $\mu\text{m}$  inner

diameter (New Objective, Woburn, MA, USA), packed in-house with ProntoSIL C18 AQ 3  $\mu\text{m}$  beads (Bischoff Analytentechnik GmbH, Leonberg, Germany). The peptide mixtures were loaded and separated with a linear gradient from 5% to 35% acetonitrile over 30 min at a flow rate set to 350 nL/min. The instrument was operated as described in Soste et al. (2014). SRM analysis was conducted with Q1 and Q3 operated at unit resolution (0.7 *m/z* half-maximum peak width) with a dwell time of 10 ms and a cycle time ~3.5 s. For each peptide, doubly and triply charged precursor ions, and the 20 most probable singly or doubly charged fragment ions from the b- and y-ion series were selected using Skyline (v3.1.1.7490, release date 20 May 2015, MacCoss Lab Software, University of Washington, Seattle, WA, USA) (MacLean et al., 2010) and measured by SRM. The indexed retention time peptides (Biognosys AG, Zürich, Switzerland) were annotated and used to schedule the acquisition of selected SRM traces within retention-time (RT) windows. Synthesized peptides containing a heavy-isotope label were then spiked into cell samples, and corresponding heavy and light transitions were targeted to monitor the co-elution of endogenous (i.e. light) peptides and the spiked-in (heavy) surrogates in different conditions. The raw data can be accessed at <http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS00872>. Data were analysed with Skyline, and ten validated markers represented by  $\geq 2$  proteotypic peptides per protein and the  $\geq 4$  most suitable transitions (precursor and fragment ion pairs) per peptide were experimentally selected for quantification experiments.

#### Protein quantification

To track the system performance, commercial predigested Beta-Galactosidase (Sciex) was diluted with indexed retention time peptides (Biognosys AG) and Glu-1-Fibrinopeptide B (Sciex) to a working solution of 20 fmol/ $\mu\text{l}$ , and monitored prior to analysis. In time-scheduled SRM experiments, protein markers were targeted in all bioreplicates of each condition (total 258 transitions, 4-min RT window, 1.7-s cycle time, 1  $\mu\text{g}$  peptides, 30-min gradient) (Table S5). Corresponding conditions and controls (NSCs) were analysed with the same RT window using the instrument settings described above. The raw data can be accessed at <http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS00873>. SRM peaks were manually inspected using Skyline by checking for co-elution, peak shape similarity, a match in relative intensities of fragment ions and retention times compared to the assay development phase. Only SRM peaks detected with a signal-to-noise ratio of >3 for at least the top transition were considered for quantification. Raw SRM data (peak areas) were exported from Skyline and, for transitions below the transition specific background level, the peak areas were assigned to one-third of the background level. Protein significance analysis was performed using an open-source statistical environment R (R Core Team, 2020) (version 4.0.2) with package MSstats (version 3.20.1), which combines the quantitative measurements for peptides, charge states, and transitions, and detects proteins that change in abundance between conditions while controlling the false discovery rate (Chang et al., 2012; Choi et al., 2014). The peptide and protein abundances were calculated from log<sub>2</sub>-transformed peak areas of individual transitions. A linear mixed-effects model was used for the relative quantification of a given condition with respect to its control (NSCs). Significant abundance changes were reported as log<sub>2</sub> fold-changes with standard error, T value, degrees of freedom, and *P*-value adjusted for multiple comparisons (Table S6). A false discovery rate-adjusted *P*-value cut-off of 0.05 was used. The R environment (R Core Team, 2020) was used to generate a variety of different plots.

#### Acknowledgements

We thank Helena Kupcova Skalnikova for the critical reading of the manuscript, and Michaela Mullerova and Eva Kotrova for skilful assistance with experiments.

#### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

#### Author contributions

Conceptualization: R.S., H.K., P.V.; Methodology: R.S., M.K., P.V.; Formal analysis: R.S., P.V.; Investigation: R.S., M.K., J.C., D.B., K.V.K., T.N., K.B., A.S.; Resources:

D.B., J.M., P.V.; Data curation: R.S., P.V.; Writing - original draft: R.S., M.K., J.C., M.H.P., M.M., J.M., H.K., P.V.; Writing - review & editing: R.S., M.K., J.C., M.H.P., D.B., K.V.K., A.S., M.M., P.V.; Visualization: R.S., M.K., J.C., A.S., P.V.; Supervision: R.S., M.M., J.M., H.K., P.V.; Project administration: R.S., P.V.; Funding acquisition: M.H.P., D.B., J.M., P.V.

#### Funding

This research was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports projects InterCOST (LTC18079, P.V.) under CellFit COST Action (CA16119), and National Sustainability Programme I (LO1609, J.M., P.V.), by the Operational Programme Research, Development and Education (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000785), by The Academy of Sciences of the Czech Republic (Institutional Research Concept RVO67985904), and by the Czech Science Foundation (GJ15-18316Y, D.B.), M.H.P. was supported by a Milton Safenowitz Postdoctoral Fellowship from the Amyotrophic Lateral Sclerosis Association (16-PDF-247) and a postdoctoral fellowship from the University of Zurich (FK-15-097).

#### Data availability

The datasets generated and analysed during the current study are available in the Peptide Atlas repository (<http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS00872>, <http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS00873>). The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional file.

#### References

- Aebersold, R. and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207. doi:10.1038/nature01511
- Barker, R. A. and de Beaufort, I. (2013). Scientific and ethical issues related to stem cell research and interventions in neurodegenerative disorders of the brain. *Prog. Neurobiol.* **110**, 63-73. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.003
- Bjarkam, C. R., Glud, A. N., Margolin, L., Reinhart, K., Franklin, R., Deding, D., Etrup, K. S., Fitting, L. M., Nielsen, M. S., Sørensen, J.-C. H. et al. (2010). Safety and function of a new clinical intracerebral microinjection instrument for stem cells and therapeutics examined in the götting minipig. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* **88**, 56-63. doi:10.1159/000268743
- Bodenmiller, B. (2016). Multiplexed epitope-based tissue imaging for discovery and healthcare applications. *Cell Syst* **2**, 225-238. doi:10.1016/j.cels.2016.03.008
- Bohacikova, D., Hruska-Plochan, M., Tsunemoto, R., Gifford, W. D., Driscoll, S. P., Glenn, T. D., Wu, S., Marsala, S., Navarro, M., Tadokoro, T. et al. (2019). A scalable solution for isolating human multipotent clinical-grade neural stem cells from ES precursors. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 83. doi:10.1186/s13287-019-1163-7
- Boulis, N. M. (2010). Floating spinal cannula and method of use. U.S. Patent US7833217B2 filed July 1, 2009, and issued November 16, 2010.
- Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z., Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A. and Wahlberg, L. U. (1999). In Vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp. Neurol.* **158**, 265-278. doi:10.1006/exnr.1999.7098
- Cattaneo, E. and McKay, R. (1991). Identifying and manipulating neuronal stem cells. *Trends Neurosci.* **14**, 338-340. doi:10.1016/0166-2236(91)90158-Q
- Červenka, J., Týlečková, J., Kupcová Skalníková, H., Vodičková Kepková, K., Poliak, I., Valeková, I., Pfeiferová, L., Kolář, M., Vaškovičová, M., Pánková, T. et al. (2021). Proteomic characterization of human neural stem cells and their secretome during in vitro differentiation. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 612560. doi:10.3389/fncel.2020.612560
- Chang, C.-Y., Picotti, P., Hüttenhain, R., Heinzlmann-Schwartz, V., Jovanovic, M., Aebersold, R. and Vitek, O. (2012). Protein significance analysis in selected reaction monitoring (SRM) measurements. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.014662. doi:10.1074/mcp.M111.014662
- Choi, M., Chang, C.-Y., Clough, T., Broudy, D., Killeen, T., MacLean, B. and Vitek, O. (2014). MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *Bioinformatics* **30**, 2524-2526. doi:10.1093/bioinformatics/btu305
- Cizkova, D., Kakinošana, O., Kucharova, K., Marsala, S., Johe, K., Hazel, T., Hefferan, M. P. and Marsala, M. (2007). Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neuroscience* **147**, 546-560. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.065
- Conti, L. and Cattaneo, E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 176-187. doi:10.1038/nrn2761
- Cunningham, M. G. (1998). Systems and methods for delivering therapeutic agents to selected sites in a subject. U.S. Patent US5792110A filed June 26, 1996, and issued August 11, 1998.
- Doetsch, F., Caillie, L., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716. doi:10.1016/S0092-8674(00)80783-7
- Donega, V., Burm, S. M., van Strien, M. E., van Bodegraven, E. J., Pallukhovich, I., Geut, H., van de Berg, W. D. J., Li, K. W., Smit, A. B., Basak, O. et al. (2019). Transcriptome and proteome profiling of neural stem cells from the human subventricular zone in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* **7**, 84. doi:10.1186/s40478-019-0736-0
- Dunkley, T., Costa, V., Friedlein, A., Lugert, S., Aigner, S., Ebeling, M., Miller, M. T., Patsch, C., Piraino, P., Cutler, P. et al. (2015). Characterization of a human pluripotent stem cell-derived model of neuronal development using multiplexed targeted proteomics. *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 684-694. doi:10.1002/prca.201400150
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4**, 1313-1317. doi:10.1038/33305
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H. and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* **156**, 1072-1083. doi:10.1016/j.cell.2014.01.044
- Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billingham, L. L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. U. et al. (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1033-1039. doi:10.1038/3473
- Hefferan, M. P., Galik, J., Kakinošana, O., Sekerova, G., Santucci, C., Marsala, S., Navarro, M., Hruska-Plochan, M., Johe, K., Feldman, E. et al. (2012). Human neural stem cell replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis by spinal transplantation. *PLoS ONE* **7**, e42614. doi:10.1371/journal.pone.0042614
- Jensen, M. B., Yan, H., Krishnaney-Davison, R., Al Sawaf, A. and Zhang, S.-C. (2013). Survival and differentiation of transplanted neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells in a rat stroke model. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **22**, 304-308. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.09.008
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Rislings, M., Lendahl, U. and Frisén, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25-34. doi:10.1016/S0092-8674(00)80956-3
- Kelly, S., Bliss, T. M., Shah, A. K., Sun, G. H., Ma, M., Foo, W. C., Masel, J., Yenari, M. A., Weissman, I. L., Uchida, N. et al. (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11839-11844. doi:10.1073/pnas.0404474101
- Klein, S. M., Behrstock, S., McHugh, J., Hoffmann, K., Wallace, K., Suzuki, M., Aebischer, P. and Svendsen, C. N. (2005). GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum. Gene Ther.* **16**, 509-521. doi:10.1089/hum.2005.16.509
- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K. et al. (2012). Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS ONE* **7**, e52787. doi:10.1371/journal.pone.0052787
- Kupcova Skalnikova, H., Cizkova, J., Cervenka, J. and Vodicka, P. (2017). Advances in proteomic techniques for cytokine analysis: focus on melanoma research. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2697. doi:10.3390/ijms18122697
- Lam, M., Sanosaka, T., Lundin, A., Imaizumi, K., Etal, D., Karlsson, F. H., Clausen, M., Cairns, J., Hicks, R., Kohyama, J. et al. (2019). Single-cell study of neural stem cells derived from human iPSCs reveals distinct progenitor populations with neurogenic and gliogenic potential. *Genesis Cells* **24**, 836-847. doi:10.1111/gtc.12731
- Lange, V., Picotti, P., Doman, B. and Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 222. doi:10.1038/msb.2008.61
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V. and Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1468-1475. doi:10.1038/nbt1365
- Lu, P., Wang, Y., Graham, L., McHale, K., Gao, M., Wu, D., Brock, J., Blesch, A., Rosenzweig, E. S., Havton, L. A. et al. (2012). Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* **150**, 1264-1273. doi:10.1016/j.cell.2012.08.020
- Lu, P., Woodruff, G., Wang, Y., Graham, L., Hunt, M., Wu, D., Boehle, E., Ahmad, R., Poplawski, G., Brock, J. et al. (2014). Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron* **83**, 789-796. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.014
- MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D. L., Liebler, D. C. and MacCoss, M. J. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966-968. doi:10.1093/bioinformatics/btq054
- Marsala, M. (2014). Spinal cord pulsation-cancellation injection system. World Intellectual Property Organization Patent WO2014047540A1 filed September 23, 2013, and issued March 27, 2014.
- Melo-Braga, M. N., Schulz, M., Liu, Q., Swistowski, A., Palmisano, G., Engholm-Keller, K., Jakobsen, L., Zeng, X. and Larsen, M. R. (2014). Comprehensive quantitative comparison of the membrane proteome, phosphoproteome, and sialome of human embryonic and neural stem cells. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 311-328. doi:10.1074/mcp.M112.026898
- Melo-Braga, M. N., Meyer, M., Zeng, X. and Larsen, M. R. (2015). Characterization of human neural differentiation from pluripotent stem cells using proteomics/PTMomics—Current state-of-the-art and challenges. *Proteomics* **15**, 656-674. doi:10.1002/pmic.201400388

- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C. J., Likhite, S., McElroy, S., Renusch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R. A., Ravits, J. et al. (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 829-832. doi:10.1073/pnas.1314085111
- Nagato, M., Heike, T., Kato, T., Yamanaka, Y., Yoshimoto, M., Shimazaki, T., Okano, H. and Nakahata, T. (2005). Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. *J. Neurosci. Res.* **80**, 456-466. doi:10.1002/jnr.20442
- Patro, N., Naik, A. and Patro, I. K. (2015). Differential temporal expression of S100 $\beta$  in developing rat brain. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 87. doi:10.3389/fncel.2015.00087
- R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 674-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Shoemaker, L. D. and Kornblum, H. I. (2016). Neural stem cells (NSCs) and proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 344-354. doi:10.1074/mcp.O115.052704
- Song, Y., Subramanian, K., Berberich, M. J., Rodriguez, S., Latorre, I. J., Luria, C. M., Everley, R., Albers, M. W., Mitchison, T. J. and Sorger, P. K. (2019). A dynamic view of the proteomic landscape during differentiation of ReNcell VM cells, an immortalized human neural progenitor line. *Scientific Data* **6**, 190016. doi:10.1038/sdata.2019.16
- Soste, M., Hrabakova, R., Wanka, S., Melnik, A., Boersema, P., Maiolica, A., Wernas, T., Tognetti, M., von Mering, C. and Picotti, P. (2014). A sentinel protein assay for simultaneously quantifying cellular processes. *Nat. Methods* **11**, 1045-1048. doi:10.1038/nmeth.3101
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Shen, J., ter Borg, M. G., Rosser, A. E., Tyers, P., Karmiol, S. and Dunnett, S. B. (1997). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **148**, 135-146. doi:10.1006/exnr.1997.6634
- The International Stem Cell Initiative\* (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* **25**, 803-816. doi:10.1038/nbt1318
- Tyleckova, J., Valekova, I., Zizkova, M., Rakocycova, M., Marsala, S., Marsala, M., Gadher, S. J. and Kovarova, H. (2016). Surface N-glycoproteome patterns reveal key proteins of neuronal differentiation. *J. Proteomics* **132**, 13-20. doi:10.1016/j.jprot.2015.11.008
- United Nations. Nearly 1 in 6 of world's population suffer from neurological disorders – UN report (2007). *UN News*.
- Usvald, D., Vodicka, P., Hlucilova, J., Prochazka, R., Motlik, J., Kuchorova, K., Johe, K., Marsala, S., Scadeng, M., Kakinohana, O. et al. (2010). Analysis of dosing regimen and reproducibility of intraspinal grafting of human spinal stem cells in immunosuppressed minipigs. *Cell Transplant.* **19**, 1103-1122. doi:10.3727/096368910X503406
- van Gorp, S., Leerink, M., Kakinohana, O., Platoshyn, O., Santucci, C., Galik, J., Joosten, E. A., Hruska-Plochan, M., Goldberg, D., Marsala, S. et al. (2013). Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 57. doi:10.1186/srct209
- Vescovi, A. L., Parati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Fröhlichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A. et al. (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp. Neurol.* **156**, 71-83. doi:10.1006/exnr.1998.6998
- Vinci, L., Ravarino, A., Fanos, V., Naccarato, A. G., Senes, G., Gerosa, C., Bevilacqua, G., Faa, G. and Ambu, R. (2016). Immunohistochemical markers of neural progenitor cells in the early embryonic human cerebral cortex. *Eur. J. Histochem.* **60**, 13-19. doi:10.4081/ejh.2016.2563
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jönsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C. et al. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **21**, 655-679. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.07.018
- World Health Organization. *Neurological disorders: public health challenges* (2006). World Health Organization.
- Yabut, O. R. and Pleasure, S. J. (2016). The crossroads of neural stem cell development and tumorigenesis. *Opera Med. Physiol.* **2**, 181-187. doi:10.20388/omp2016.003.0040
- Yocum, A. K., Gratsch, T. E., Leff, N., Strahler, J. R., Hunter, C. L., Walker, A. K., Michailidis, G., Omenn, G. S., O'Shea, K. S. and Andrews, P. C. (2008). Coupled global and targeted proteomics of human embryonic stem cells during induced differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 750-767. doi:10.1074/mcp.M700399-MCP200
- Yuan, S. H., Martin, J., Elia, J., Flippin, J., Paramban, R. I., Hefferan, M. P., Vidal, J. G., Mu, Y., Killian, R. L., Israel, M. A. et al. (2011). Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS ONE* **6**, e17540. doi:10.1371/journal.pone.0017540
- Yuan, T., Liao, W., Feng, N.-H., Lou, Y.-L., Niu, X., Zhang, A.-J., Wang, Y. and Deng, Z.-F. (2013). Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 73. doi:10.1186/srct224
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O. and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1129-1133. doi:10.1038/nbt1201-1129
- Zizkova, M., Sucha, R., Tyleckova, J., Jarkovska, K., Mairychova, K., Kotrcova, E., Marsala, M., Gadher, S. J. and Kovarova, H. (2015). Proteome-wide analysis of neural stem cell differentiation to facilitate transition to cell replacement therapies. *Expert Rev. Proteomics* **12**, 83-95. doi:10.1586/14789450.2015.977381

Methods in Molecular Biology (2022) 2520: 335–360  
DOI 10.1007/7651\_2022\_462  
© Springer Science+Business Media, LLC 2022  
Published online: 18 May 2021



## Proteomic Analysis of Human Neural Stem Cell Differentiation by SWATH-MS

Jirina Tyleckova, Jakub Cervenka, Ievgeniia Poliakh, Jaromir Novak, Katerina Vodickova Kepkova, Helena Kupcova Skalnikova, and Petr Vodicka

### Abstract

The unique properties of stem cells to self-renew and differentiate hold great promise in disease modelling and regenerative medicine. However, more information about basic stem cell biology and thorough characterization of available stem cell lines is needed. This is especially essential to ensure safety before any possible clinical use of stem cells or partially committed cell lines. As proteins are the key effector molecules in the cell, the proteomic characterization of cell lines, cell compartments or cell secretome and microenvironment is highly beneficial to answer above mentioned questions. Nowadays, method of choice for large-scale discovery-based proteomic analysis is mass spectrometry (MS) with data-independent acquisition (DIA). DIA is a robust, highly reproducible, high-throughput quantitative MS approach that enables relative quantification of thousands of proteins in one sample. In the current protocol, we describe a specific variant of DIA known as SWATH-MS for characterization of neural stem cell differentiation. The protocol covers the whole process from cell culture, sample preparation for MS analysis, the SWATH-MS data acquisition on TTOF 5600, the complete SWATH-MS data processing and quality control using Skyline software and the basic statistical analysis in R and MSstats package. The protocol for SWATH-MS data acquisition and analysis can be easily adapted to other samples amenable to MS-based proteomics.

**Key words** Proteomics, Data independent acquisition, SWATH-MS, Neural stem cell, Neural differentiation, Spectral library, Skyline, Mass spectrometry

---

## 1 Introduction

The unique ability of embryonic stem cells (ESCs) to differentiate into different cell types of the adult body makes them an attractive model system for various human diseases. They are useful for hypothesis testing, understanding underlining biological processes and developmental mechanisms of these diseases, testing of new pharmaceuticals or cell transplantation therapies [1]. However, isolation of ESCs from human embryos is burdened with ethical issues [2]. These obstacles can be overcome by using induced pluripotent

---

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at [[https://doi.org/10.1007/7651\\_2022\\_462](https://doi.org/10.1007/7651_2022_462)].

stem cells (iPSCs) derived by reprogramming of adult fibroblasts or other terminally differentiated cells [3]. ESC-/iPSC-derived neural stem cells (NSCs) that can differentiate into all neural subtypes are in addition a great hope for treatment of nervous system injuries, neurodegenerations and autoimmune diseases affecting nervous system [4, 5]. For example, NSCs could compensate deficits of cholinergic neurons in the cerebral cortex in Alzheimer disease [6], medium spiny neurons in striatum in Huntington disease [7] or dopaminergic neurons in the substantia nigra in Parkinson disease [8]. However, the translation of NSCs into cell-replacement-based application has been limited so far, with many concerns regarding ethical and safety issues (e.g., potential for tumorigenesis). Moreover, availability of numerous cell lines with unclear origin and high variability in both ESCs and NSCs differentiation protocols make proper standardization and characterization required for clinical use difficult. Presence of mixed cell populations of various differentiation stages common to many protocols used in research settings is unacceptable in clinic and reliable method to test for presence of such undesired populations is needed.

Transcriptomic approaches are often used to identify changes in gene expression connected to proliferation and differentiation of NSCs and indirectly gain insight into regulation of these processes. However, changes in protein abundance and post-translational modifications are ultimately responsible for changes in cellular phenotypes and functions. Therefore, proteomic approaches that enable the detection and quantification of a large number of proteins in multiple conditions without any prior knowledge by large-scale experiments employing mass spectrometry (MS) represent a method of choice [9].

Traditional shot-gun MS proteomic data-dependent acquisition (DDA) strategy is due to the partially stochastic sampling of MS2 spectra not suitable for fully reliable quantification. Other approach is targeted analysis using Selected Reaction Monitoring (SRM) method, which is precise and sensitive, but limited to approximately one hundred of preselected protein targets in one analysis. Recently, we developed SRM-based assay for specific and sensitive monitoring of cell type-specific (human ESCs, NSCs, glial cells, and neurons) protein markers expression, which allows characterization of cell populations in culture and further optimization of differentiation protocols [10]. Nowadays, another approach called data-independent acquisition (DIA) is gaining more popularity, mainly due to the reproducibility and accuracy of label-free protein quantification. In DIA, MS1 scan is divided into windows with specific  $m/z$  values and all precursor ions in every particular window are fragmented, which should theoretically lead to identification and quantification of all detectable spectra. The same precursor isolation windows are measured in repeated cycles across the whole chromatographic separation [11]. This process results in

very complex fragmentation spectra from different precursor ions within the same isolation window, making classical peptide identification by search against protein sequence databases impossible. This can be resolved by generation of sample specific spectral library from parallel measurement of DDA, ideally on the same sample and instrument [12], or computationally by generation of spectral libraries in silico [13]. Currently, number of different DIA protocols for distinct MS instruments have been developed [14]. One of specific DIA implementations represents Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra (SWATH-MS) data acquisition on TripleTOF 5600 (AB Sciex). SWATH-MS combines advantages of sensitivity of SRM-like data extraction with in depth proteome coverage. Thousands of proteins may be measured and quantified in a single sample.

This chapter presents complete protocol for SWATH-MS characterization of NSC differentiation starting from cell culture, followed by sample preparation protocol for MS analysis, the MS analysis on TTOF 5600+ itself, then SWATH-MS data processing and quality control in Skyline [15] and finally the basic statistical analysis using MSstats package in R [16]. The aim of the protocol is to provide an overview of one of the numerous possibilities of DIA analyses of human cell lines using procedures that are easily to repeat in a general wet lab with the main software tools freely available (Skyline, R). This protocol is focused on the analysis of a complete cell lysate. We performed a comprehensive characterization of cellular proteome during spontaneous differentiation of human H9 ESC-derived NSCs and quantified changes in expression of more than 2500 proteins by employing this protocol [17]. Further modifications of sample preparation allow for analysis of a specific cell compartment or cell conditioned media/secretome as well.

---

## 2 Materials

### 2.1 Cell Culture and Differentiation

All material for cell culture should be prepared in sterile conditions according to basic laboratory practice (*see Note 1*).

1. Sterile deionized water.
2. Sterile Phosphate buffered saline 1× (PBS), pH 7.4 at 25 °C.
3. Poly-L-ornithine working solution 20 µg/mL in sterile deionized water.
4. Laminin mouse protein working solution 10 µg/mL in sterile PBS.
5. Human Neural Stem Cells (H9 ESC-derived) (Thermo Fisher Scientific, N7800100) (*see Note 2*).

6. Stem Pro™ Neural Stem Cell Serum Free Medium (SFM) (Thermo Fisher Scientific) containing KnockOut™ DMEM/F-12 with 2 mM GlutaMAX™, 2% StemPro™ Neural Supplement (v/v) without the growth factors, 20 ng/mL recombinant human EGF, 20 ng/mL recombinant human FGF basic and combination of antibiotics 1% penicillin–streptomycin (*see Note 3*).
7. Stem Pro™ Neural Stem Cell differentiation medium: Knock-Out™ D-MEM/F-12 including 2 mM GlutaMAX™ with 2% StemPro™ Neural Supplement without the growth factors and with combination of antibiotics 1% penicillin–streptomycin.
8. Cell culture plastics.

### 2.2 Consumables for Cell Lysis and Sample Preparation

1. Sterile polypropylene 15 mL and 50 mL tubes.
2. Sterile polypropylene 2 mL microtubes that withstand centrifugation forces of  $20,000 \times g$ .
3. Precision pipettes with tips up to 1000  $\mu$ L.
4. 96-well flat bottom plates or cuvettes for protein concentration determination assay.
5. Cell scrapers.
6. Hamilton glass syringe.
7. pH indicator strips for pH 1–7.
8. Ready-to-use spin columns of porous C18 reverse-phase resin (*see Note 4*).

### 2.3 Chemicals for Cell Lysis and Sample Preparation

All the solutions for peptide cleanup, peptide sample dilution and mobile phases for liquid chromatography (LC) have to be in LC-MS grade quality.

1. Ammonium Bicarbonate, 50 mM in LC-MS water.
2. Denaturation buffer containing 8 M urea, 5 mM EDTA, and 50 mM ammonium bicarbonate.
3. Assay kit for determination of protein concentration (*see Note 5*).
4. ProteaseMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer (Promega), prepare 1% solution by adding 100  $\mu$ L of 50 mM ammonium bicarbonate to 1 mg vial of lyophilized ProteaseMAX™.
5. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), 100 mM stock solution in LC-MS water (*see Note 6*).
6. Iodoacetamide (IAA), 400 mM stock solution in LC-MS water.
7. Proteases Endoproteinase Lys-C MS grade and Trypsin MS grade, 1  $\mu$ g/ $\mu$ L LysC/Trypsin in 50 mM acetic acid.
8. Formic acid (FA).



9. Acetonitrile (ACN).
10. Water.

#### **2.4 Hardware and Software for Sample Preparation**

1. Spectrophotometer for determination of protein and peptide concentration with appropriate software.
2. Ultrasonic water bath.
3. Vortex.
4. Refrigerated centrifuge with fixed angle rotor for microtubes, up to  $20,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ .
5. Thermo Shaker incubator for microtubes.
6. Acid-Resistant Centrifugal Vacuum Concentrator.

#### **2.5 Hardware and Software for Data Acquisition and Analysis of SWATH-MS Measurement in Trap-Elute Mode**

Workflow described in this protocol is designed and optimized on following hardware and software setup.

1. 5600+ TripleTOF mass spectrometry system (AB Sciex).
2. Eksigent 425 Nano-LC system (AB Sciex).
3. Trap column Acclaim™ PepMap™ 100 C18 (100 Å 5 μm, 0.1 × 20 mm; Thermo Fisher Scientific).
4. 25-cm fused-silica analytical column (75-μm inner diameter) packed in-house with ProntoSIL 120 Å 3 μm C18 AQ beads (Bischoff Analysentechnik GmbH).
5. Analyst TF software 1.7.1 Components for NanoCell (AB Sciex).
6. Eksigent Control Software 4.2 (AB Sciex).
7. PeakView 2.2 (AB Sciex).
8. SWATH Acquisition Variable Window Calculator Excel Sheet (AB Sciex).
9. Mascot Distiller 2.7.1 (Matrix Science Ltd.).
10. Mascot Server 2.6 (Matrix Science Ltd.).
11. Skyline-daily (version 20.1 or higher, MacCoss Lab Software) [15].
12. R (R Core Team) interactive statistical environment [18] (*see Note 7*).

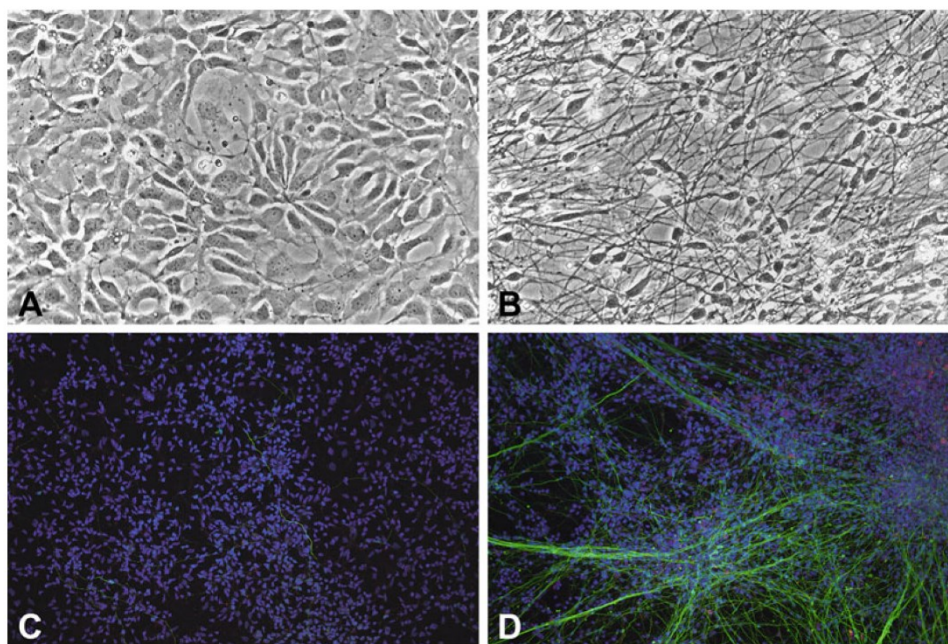
#### **2.6 Standards for Nano-LC/MS Analysis**

1. Mix of indexed retention time (iRT) standard peptides (*see Note 8*).
2. 25 fmol Beta-galactosidase (Bgal) digest (AB Sciex) with 67 fmol Glu<sup>1</sup>-Fibrinopeptide B peptide (AB Sciex) in aqueous solution of 10% acetonitrile and 0.1% formic acid for calibration mass spectra of precursor and product ions.
3. A complex digested lysate as quality control of mass spectrometer performance (*see Note 9*).

### 3 Methods

#### 3.1 Cell Culture and Differentiation

1. Culture the NSCs under sterile condition according to guidelines for culturing GIBCO human H9 ESC-derived NSCs ([GIBCO H9 Protocol](#)). In summary, culture the NSCs on poly-L-ornithine/laminin coated tissue-culture dishes in Stem-Pro NSCs SFM complete medium at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in the air (*see Note 10*). Replace the cell culture media with fresh media every other day (*see Note 11*).
2. When cells reach approx. 70% confluence, the differentiation may be started. Perform the spontaneous differentiation by growth factors withdrawal from the cell culture media (Stem Pro NSCs differentiation medium). Change half of the media (*see Note 12*) every other day for 7 and 21 days after growth factors withdrawal (Fig. 1). Prepare at least four biological replicates per condition.



**Fig. 1** Morphology and immunocytochemistry characterization of spontaneously differentiated NSCs. Human H9 ESC-derived NSCs were spontaneously differentiated by withdrawal of growth factors for 21 days. Cellular morphology is significantly changed from still NSC-like at day 7 (**a**) to neuronal at day 21 (**b**). Sporadic signals of neuronal marker Tubulin beta-3 chain (green color) and astrocyte marker protein S100-B (red color) were detectable at day 7 (**c**), but expression of both markers was highly increased at day 21 (**d**). Nuclei were stained by DAPI (blue color)

### 3.2 Cell Harvesting and Cell Lysate Preparation

1. Remove medium from the plate with differentiated cells.
2. Carefully wash the plate with prewarmed PBS solution (37 °C).
3. Add cold (4 °C) PBS to the plate.
4. Place the plate on box with ice.
5. Using a cell scraper, scrape cells from the bottom and collect them in the corner of the dish (*see* **Notes 13** and **14**).
6. Transfer the cells in PBS solution from plate to polypropylene tube with polypropylene pipette (*see* **Note 15**).
7. Add more PBS (4 °C) to the plate to wash it and transfer PBS with remaining cells to the same tube from **step 6**.
8. Pellet cells by centrifugation at 4 °C, 300 × *g* for 5 min.
9. Remove PBS with fluid aspirator.
10. Resuspend cells in PBS (4 °C).
11. Repeat **steps 8–10** two more times.
12. Centrifuge at 4 °C, 700 × *g* for 5 min.
13. Remove supernatant (*see* **Note 16**).
14. Add denaturation buffer to the pellet (minimally 50 µL of denaturation buffer/1 × 10<sup>6</sup> of cells).
15. Disrupt the cell pellet by vortexing for 10 s and centrifuge at room temperature, 1000 × *g* for 2 min. Transfer the cell samples to 2 mL microtubes.
16. Add ProteaseMAX™ to the protein lysate to final concentration of 0.1% (v/v) (*see* **Note 17**).
17. Incubate on ice for approx. 12 min with occasional vortexing and spinning (*see* **Note 18**).
18. Sonicate lysate on ice in an ultrasonic water bath with frequency approximately 40 kHz for 15 min (*see* **Note 19**).
19. Repeatedly pipette the sample through a thin pipet tip (*see* **Note 20**).
20. Centrifuge samples at 4 °C, 20,000 × *g* for 15 min, keep the supernatant (*see* **Note 21**).
21. Determine protein concentration to ensure that initial amount of proteins is the same in all samples (optimal is approx. 50–100 µg of proteins per sample) (*see* **Note 22**).

### 3.3 In-Solution Cell Lysate Digestion and Peptide Desalting

There are numerous methods for sample preparation for MS proteomic analysis. Here we describe a universal technique for peptide isolation, which is in-solution protein digestion. It is one of the most common, reproducible and error-proof protocol. Alternatively, Filter Aided Sample Preparation (FASP) [19] protocol is often used for removing detergents from lysis buffer, which interfere with digestion and MS measurement. For deeper proteome

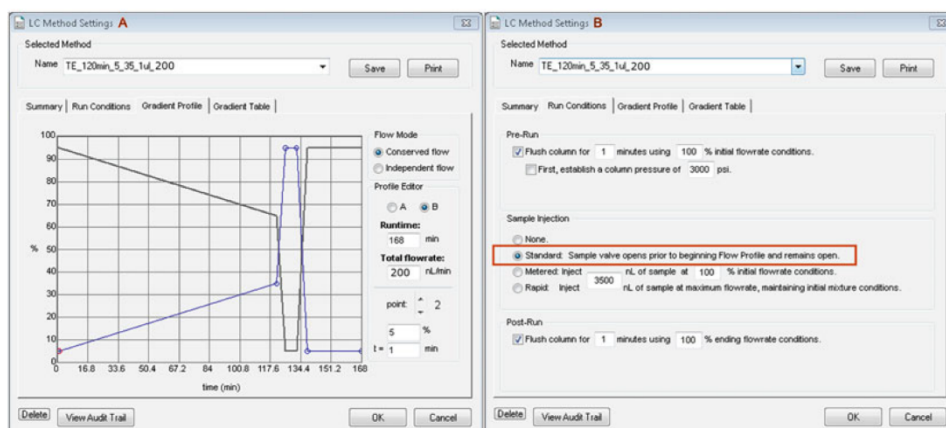
coverage abundant protein depletion, enrichment and fractionation methods are highly recommended.

1. Add reducing agent TCEP to the protein lysate to a final concentration of 10 mM.
2. Incubate for 30 min at 32 °C under agitation.
3. Add alkylating agent IAA to the protein lysate to a final concentration of 40 mM.
4. Incubate for 45 min at room temperature in the dark under agitation.
5. Dilute the sample with freshly prepared 50 mM Ammonium Bicarbonate and 1% ProteaseMAX™ to final concentration of 1 M urea and about 0.02% ProteaseMAX™.
6. Add LysC in 1:100 enzyme–substrate ratio.
7. Incubate for 2–4 h at 37 °C on a shaker under agitation.
8. Add Trypsin in 1:100 enzyme–substrate ratio.
9. Incubate for 14–16 h (overnight) at 37 °C in the dark under agitation.
10. Stop the digestion by adding FA to a final concentration of 2% (*see Notes 23 and 24*).
11. Centrifuge at 20,000 × *g* for 15 min (4 °C) and keep the supernatant.
12. Use pH indicator strip to check that the pH is lower than 3 for the peptide cleanup.
13. Desalt samples, for example, on C18 spin columns according to manufacturer's directions. Select the C18 spin column size according to sample load (*see Note 25*).
14. Vacuum centrifuge the eluted peptides after desalting step to dryness at 45 °C.
15. Resuspend dry peptides in aqueous solution with 2% ACN and 0.5% FA and sonicate in water with ice bath for 5 min.
16. Centrifuge at 20,000 × *g* for 15 min (4 °C) and collect pure supernatants.
17. Determine the peptide concentration by measuring absorbance at 280 nm with Nanodrop or equivalent spectrophotometer with low sample volume requirement.

Prepare peptide samples of defined concentration (e.g., 1 µg/µL) with 1:30 of spike-in iRT peptides in aqueous solution with 2% ACN and 0.5% FA into MS vials (*see Note 26*).

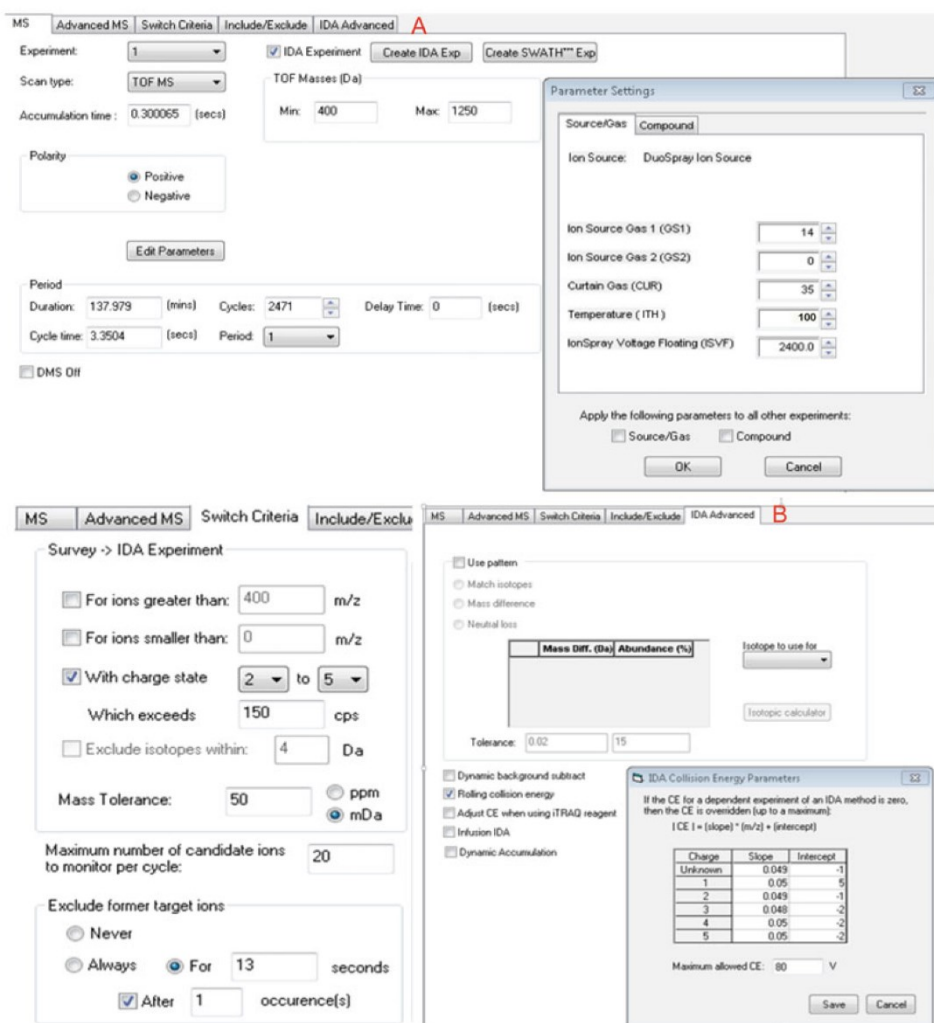
### **3.4 LC-MS/MS Methods and Measurements**

Separate the peptide mixture by reversed phase C18 in a trap-elute mode using the nano-LC system coupled online to MS.



**Fig. 2** Example of LC method settings. (a) Graphical summary of LC method of 120-min linear gradient of 5–35% ACN followed by column wash with 95% ACN and column equilibration with 5% ACN with flowrate 200 nL/min and total run time 168 min. (b) Settings of LC method. For trap-and-elute configuration choose standard type for sample injection

1. Set the autosampler method injecting 1  $\mu\text{L}$  of sample.
2. Set the LC loading method using a loading pump flow rate 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  of 2% ACN and 0.5% FA for 10 min and the analytical gradient method using a flow rate 200 nL/min on a linear gradient of 5–35% (v/v) ACN with 0.1% FA (from 0 to 120 min), 35–95% ACN with 0.1% FA (from 125 to 130 min), 95–5% ACN with 0.1% FA (from 130 to 135 min), 95–5% ACN with 0.1% FA (from 135 to 140 min) and column equilibration in 5% ACN with 0.1% FA (from 140 to 168 min) (Fig. 2).
3. In Analyst 1.7.1 create a new IDA acquisition method (see Note 27). Set Experiment 1 to TOF MS with  $m/z$  400–1250 (see Note 28), the accumulation time 300 ms and positive polarity (Fig. 3a). Click on Edit parameters button and fill the Source/Gas and Compound Parameters settings according to Table 1, and Fig. 3a (see Note 29). Set Experiment 2 to Product Ion, select IDA experiment. Set accumulation time to 150 ms and  $m/z$  to 170–2000. Monitor 20 candidate ions (see Note 30) per one survey scan with charge state 2–5, which exceeds 150 cps with mass tolerance 50 mDa and exclude former target ions for 13 s after one MS/MS spectra is collected (Fig. 3b) (see Note 31). Check Rolling collision energy (RCE) (see Note 32) box in IDA advanced settings. Set the duration of MS method to 140 min. Save the LC-MS acquisition method with LC sync.
4. Ahead of creating SWATH-MS method prepare the Variable Window text file by computing from previously acquired IDA



**Fig. 3** (a) Example of typical IDA acquisition method settings for TOF MS. Typical Source/Gas Parameter Settings are 2300–2500 V for ISVF; 10–15 for GS1; 0 for GS2; 25–35 for the Curtain Gas and 100–150 for IHT. (b) Example of Switch Criteria settings and the IDA Collision Energy Parameters that need to be actualized time-to-time

data of your specific sample. Use the Variable windows calculator that can be downloaded from AB Sciex webpage after registration ([SWATH Variable Window Calculator](#)). Follow the steps in the Instructions. Select the number of variable windows (*see Note 30*), set the mass range (typically 400–1250 for TripleTOF 5600) and the window overlap (usually 1 Da). Set the CES to 15 and minimum window width

**Table 1**  
**Typical Source/Gas and Compound settings that must be optimized for each TTOF source**

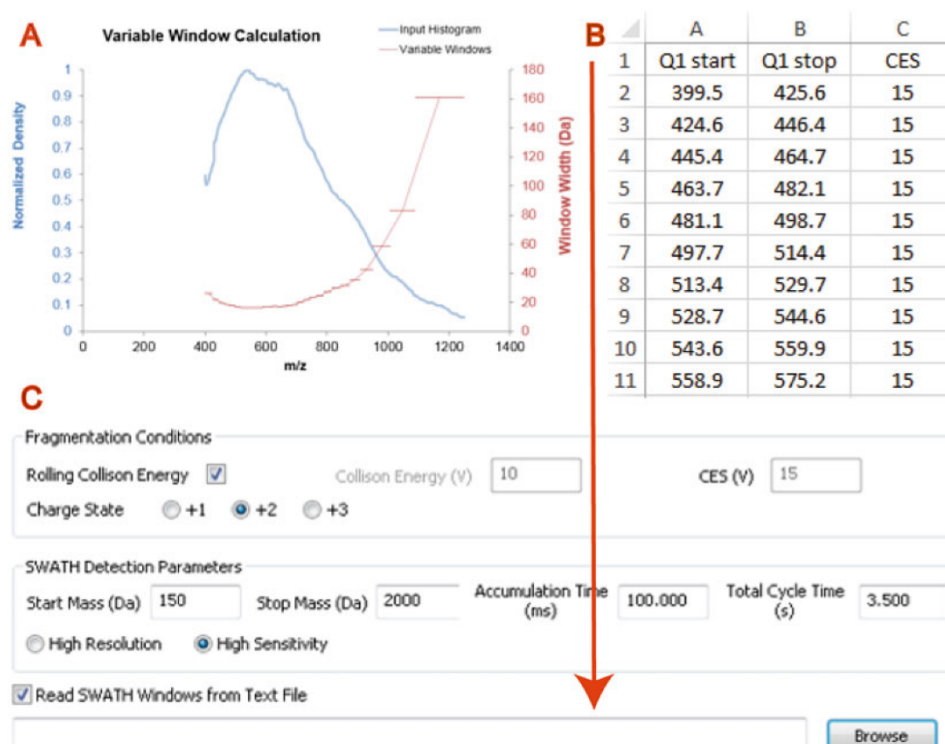
Parameter	Typical settings	Note
Ion source gas 1 (GS1)	10–15	
Ion source gas 2 (GS2)	0	
Curtain gas (CUR)	25–35	
Interface heater temperature (IHT)	100–150	<i>see Note 29</i>
IonSpray voltage floating (ISVF)	2300–2500 V	
Declustering potential (DP)	80–100 V	
Collision energy spread (CES)	10–15 V	

(no lower than 4). After calculating the windows, copy the Q1 start, Q1 stop and CES columns in the OUTPUT for Analyst tab and save it as text file (Fig. 4a, b).

5. Create a new SWATH-MS method. Open the IDA method and in the acquisition method tab click on Create SWATH Exp button, choose Manual button. Under the fragmentation conditions check RCE. SWATH Detection Parameters set to 170–2000 with accumulation time 100 ms (*see Note 33*). Tick the Read SWATH Windows from Text File and upload the variable windows text file (Fig. 4c). Save the SWATH-MS acquisition method and check the TOF MS settings.
6. Set the queue with random NSC differentiation samples positions and both IDA and SWATH-MS methods for each sample and with quality control and calibration Bgal samples among them and run the queue.

### 3.5 Data Analysis

For processing SWATH-MS data (or DIA data in general), several workflows using different tools have been introduced. There are two main strategies of processing DIA data. The first one and the most prevalent is a peptide-centric approach that uses spectral libraries established from previous DDA measurements for targeted extraction of the SWATH-MS (DIA) data. The most common tools used for this type of SWATH-MS data analyses are OpenSWATH (ETH Zürich) [20, 21] and PeakView (AB Sciex) [22]. The second one is a spectral-centric approach that uses data from DIA measurement for the library building. This kind of analysis still has lower number of identified precursor ions when compared to the peptide-centric approach, but software tools are regularly improving. This approach is supported by a DIA-Umpire [13] and Group-DIA [23]. MaxDIA (MaxQuant software from Cox laboratory) [24], Skyline (MacCoss Lab Software) [25], and Spectronaut (Biognosys) [26, 27] allow both types of analyses.



**Fig. 4** (a) An example of using SWATH-MS Variable windows calculator for constructing variable windows pattern (red line) from  $m/z$  density histogram (blue line) from the NSCs sample TOF MS IDA data. In high  $m/z$  dense regions with high number of precursors smaller Q1 windows are used (b). A text file characterizing the Q1 isolation window strategy that can be loaded into the SWATH-MS method editor for SWATH-MS method building (c)

In the next section, we describe the use of Skyline for SWATH-MS data analysis of spontaneous differentiation of H9 ESC-derived NSCs and MStats package in R for statistical analysis of the data. We choose Skyline because it is a free software with incorporated options for spectral library building (*see Note 34*) and mProphet peak picking for SWATH-MS data. Unlike OpenSWATH and DIA-Umpire, Skyline has a user-friendly graphical interface with unique options of data visualization. Skyline is optimal for small laboratories and beginners, who need to quickly learn how to process data from MS measurements. Skyline creators provide their users with free webinars, tutorials and quick support feedback. Skyline may be also preferred by users familiar with SRM data analysis.

For SWATH-MS data analysis in Skyline you will need to build a spectral library and create a retention time calculator. Before this, you will specify peptide and transition settings in Skyline document,



accordingly to parameters from your measurements. For peak picking and finding a match in your assay library Skyline has incorporated the mProphet model. Finally, Skyline allows basic statistical analysis using MSstats plug-in or export of data for further advanced analysis in other statistical programs such as R.

Complete published dataset [17] comprising spectral library and SWATH-MS measurements analyzed in Skyline is available in the Panorama Public repository (<https://panoramaweb.org/NSCsdifferentiation.url>). For simplicity, selected samples of this dataset were processed separately and are provided as Electronic Supplementary Material (Data 1 and 2) for this protocol in the form of the example input data for further MSstats analysis.

### 3.5.1 Skyline Document Transition Settings

1. Start with resetting Skyline parameters by clicking on *Settings/Default* (see Note 35).
2. In *Settings/Transition Settings/Full-Scan* (Fig. 5) both for *MS1* and *MS/MS filtering* choose your *Product mass analyzer* and set *Resolving power* from your measurements (see Note 36).

**Fig. 5** Example of full-scan parameters in transition settings

- (a) In MSI filtering choose *Isotope peaks included/Count* (see **Note 37**).
  - (b) In MS/MS filtering choose *Acquisition method/DIA*.
  - (c) In MS/MS filtering create isolation scheme through *Isolation scheme/Add/Prespecified isolation windows/Import*—choose one of the raw SWATH-MS data .wiff files (see **Note 38**).
  - (d) Tick *Use high-selectivity extraction* in case you measured the data in high-selectivity mode.
  - (e) Set window width in minutes in *Retention time filtering/Use only scans within N minutes of predicted RT* (see **Note 39**).
3. In *Settings/Transition Settings/Filter* set *Peptides/Precursor charges: 2, 3, 4; Ion charges: 1, 2, 3* and *Ion types: y, b*. In *Product ion selection* select *From: ion 3* and *To: last ion*. Tick *Use DIA precursor window for exclusion* and *Auto-select all matching transitions* (see **Note 40**).
  4. For future assay library settings choose in *Settings/Transition Settings/Library/Ion match tolerance: 0.05 m/z*; tick *If a library spectrum is available, pick its most intense ions*; **Pick:** 6 product ions and 3 minimum product ions and select *From filtered product ions*.
  5. In *Settings/Transition Settings/Instrument* copy parameters from your SWATH-MS method settings. For example, on TTOF 5600+ we measure with *Min m/z: 170 m/z* and *Max m/z: 2000 m/z* with *Method match tolerance m/z: 0.05 m/z*.
  6. In *Settings/Transition Settings/Prediction* and in *Settings/Transition Settings/Ion Mobility* leave everything default.

### 3.5.2 Spectral Library Building from IDA Measurements in Skyline and Peptide Settings

1. Run protein sequence database search of your IDA measurements against annotated database of your sample species (see **Notes 41** and **42**). For example, we use Mascot Distiller with Mascot Server (see **Note 43**) and a human Swiss-Prot FASTA file extended by a list of common protein contaminants for MS.
2. Export sequence database search from your search engine in format acceptable in Skyline like .dat file.
3. Specify in *Settings/Peptide settings/Digestion*, which enzyme/s you used (see **Note 44**) and how many missed cleavages you allow (see **Note 45**). If you used combination of enzymes, build background proteome in *Background proteome/Add* using the same FASTA file as set in your search engine and *Enforce peptide uniqueness by: None* (Fig. 6a).

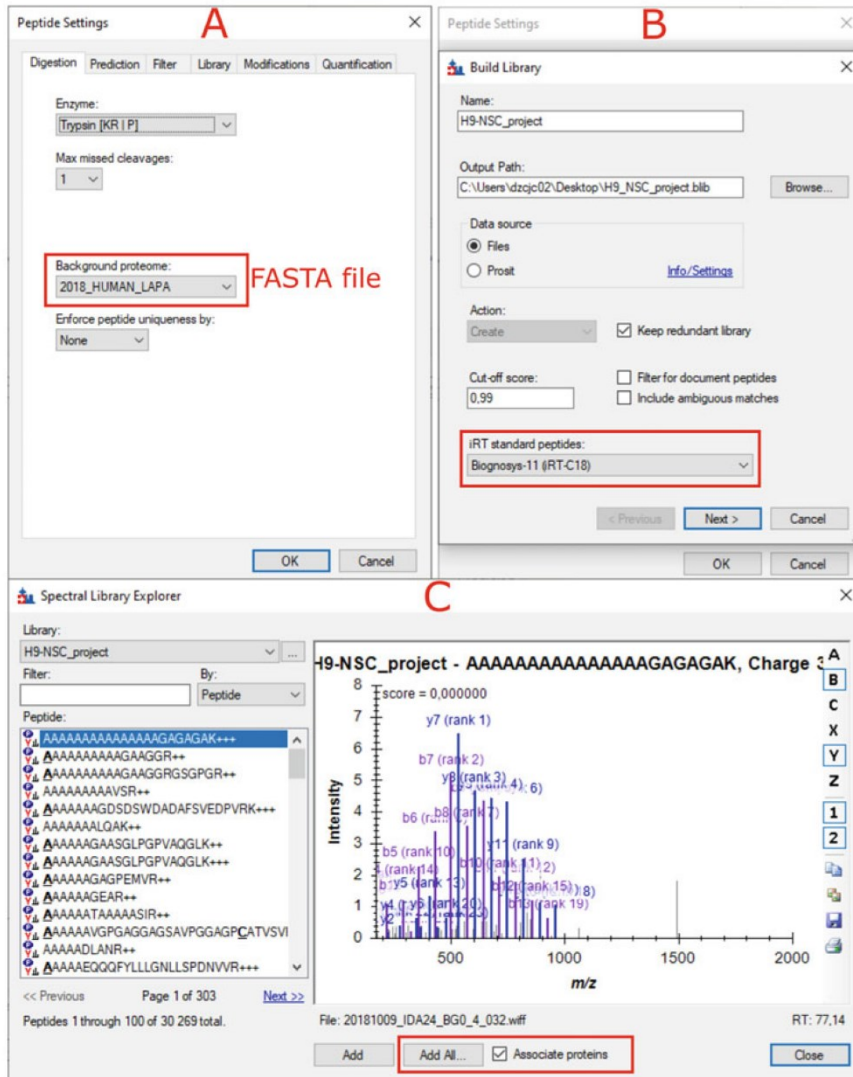


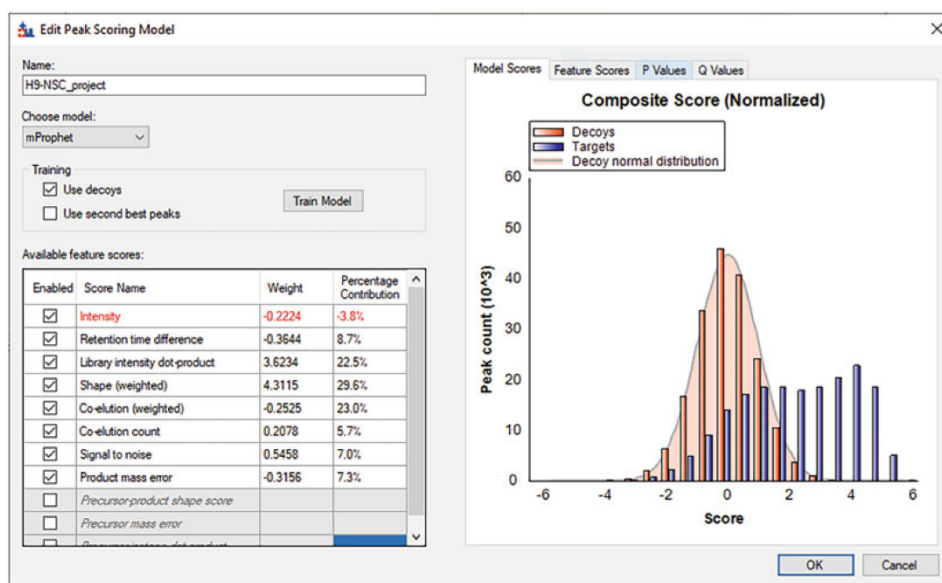
Fig. 6 Example of library building in Skyline with steps (a) to (c)

4. In *Settings/Peptide settings/Filter* choose *Min length: 7* and *Max length: 36*, set 0 to *Exclude N-terminal AAs* and tick *Auto-select all matching peptides*.
5. In *Settings/Peptide settings/Modifications* set your peptide modifications, most common are carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine and acetylation of N-term, *Max variable mods: 3*.

6. Build your spectral library and iRT calculator predictor in one window through *Settings/Peptide settings/Library/Build*, name your library and choose output path. Choose your type of spiked-in standard peptides for building retention time predictor (Fig. 6b). In our case, we used 11 iRT peptides from Biognosys and set *cut-off score: 0.99* (see Note 46). Click on *Next* and *Add files* from your search engine (e.g., .dat files) and click on *Finish*. After finishing the library building, click on *OK* for *Add iRT Peptides*. Then click on *Yes* for *Do you want to recalibrate the iRT standard values relative to the peptides being added?* (see Note 47). Skyline will ask you for *Add Retention Time Predictor*—name it and set *Time window: 10 min*. When library is prepared, in *Settings/Peptide settings/Library* set *Pick peptides matching: Library and Filter*.
7. In *Settings/Peptide settings/Prediction* and in *Settings/Peptide settings/Quantification* leave everything default.
8. After confirming all *Settings/Peptide settings* Skyline may ask you for *Add Standard Peptides*—set *Maximum transitions per peptide: 3* and click on *Yes*. This step will add Biognosys standard peptides to your protein targets.
9. To add protein targets to your Skyline go to *View/Spectral Libraries*, in *Library:* choose your library, tick *Associate proteins* and click on *Add all* (Fig. 6c). Click on *Do not add for peptides matching multiple proteins* as well as for *peptides not matching the current filter settings*.

### 3.5.3 Importing the SWATH-MS Data into Skyline and Peak Picking with mProphet

1. Adjust settings for your data analysis in *Refine/Advanced*—set *Remove repeated peptides* and *Remove duplicate peptides* (see Note 48). In the same window set *Min peptides per protein: 2* and *Min transitions per precursor: 3*. In *Refine/Remove Empty Proteins*. In case your FASTA file for background proteome contains iRT peptides, delete them from the Targets prior this step. Otherwise, both your iRT peptides and Biognosys standards added in Subheading 3.5.2, step 8 will be removed from your Targets.
2. In *Refine/Add Decoys* choose *Decoy generation method: Shuffle Sequence* (see Note 49). *Number of decoy peptides* should correspond to the number of all peptides in protein targets without iRT peptides.
3. *File/Import/Results*—choose *Add single-injection replicates in files* with *Optimizing: None* (see Note 50).
4. In *Refine/Reintegrate* tick *Integrate all peaks* and in *Peak scoring model* choose *Add*. Name your model, *Choose model: mProphet*, tick *Use decoys* and click on *Train Model*. Perform a quality control of mProphet model. View graph of decoys and targets discrimination (Fig. 7).

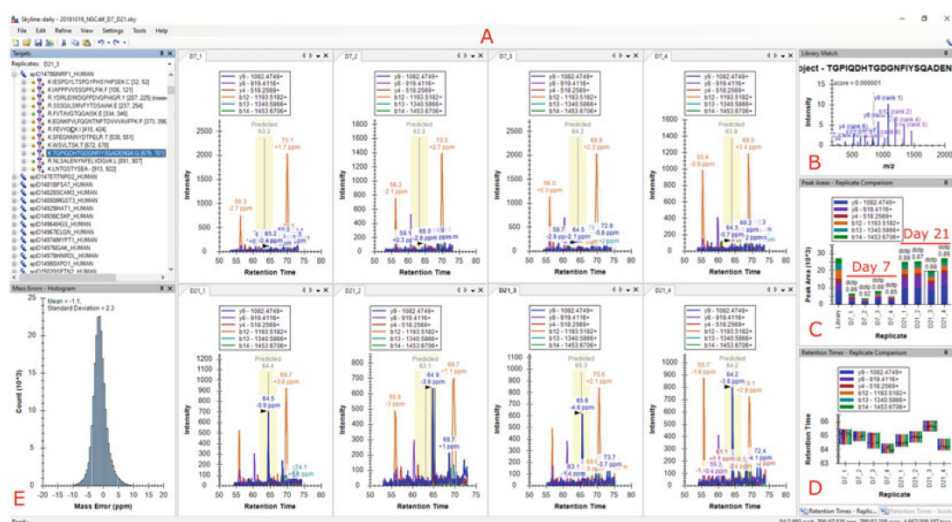


**Fig. 7** Example of mProphet quality control. The generated Decoys (red histogram) should match the Decoy normal distribution. When using sample specific library, the Targets distribution (blue histogram) should be clearly distinct from the Decoys distribution

5. Perform a manual quality control check of your extraction parameters (see **Note 51**, Fig. 8). To see whether mass error was set correctly, click on *View/Mass Errors/Histogram* (Fig. 8e) and *View/Mass Errors/Replicate Comparison*. To see the linear regression used to predict the target retention time, click on *View/Retention Time/Regression/Score To Run*.

#### 3.5.4 Sample Annotation, Group Comparison and Data Export

1. Annotate your data for downstream statistical analysis in *Settings/Document Settings/Annotations*—click on **Add** and define annotations for *Condition* (set *Type: Value List, Applies to: Replicates*) and *BioReplicate* (set *Type: Number, Applies to: Replicates*). Then go to *View/Document Grid* and annotate the samples (see **Note 52**).
2. Basic group comparison can be performed directly in Skyline, using MSstats as an external tool. If not already installed, add MSstats tool to your Skyline in *Tools/External Tools*—click on **Add**, choose *From Tool Store* and select *MSstats* (see **Note 53**). Click on *Tools/MSstats/Group comparison* and select groups you want to compare, control group and type of normalization. The results from group comparison will be by default automatically saved to your Skyline folder.



**Fig. 8** Example of quality control check of extraction parameters on Neurepilin-1 peptide TGPIQDHTGDGNFYQSADENQK on day 7 (D7) and day 21 (D21) of differentiation. (a) Check the correct peak picking (identification) together with checking the peak boundaries and matching in relative transition intensities to the library spectrum (b). (c) Check the reproducibility of relative transition peak intensities among samples (Peak Areas) and look at Retention Time Replicate Comparison where the box plots should appear approx. at the same retention time and with similar distributions (d). (e) Look at histogram of mass errors and adjust parameters in Settings/Transition Settings/Full-Scan if needed

3. Customize your data export for external MSstats analysis in *File/Export/Report* click on *Edit list*—choose *MSstats Input* and click on *Edit* to add desired information to your export. In case that *MSstats Input* is not in your report options, you can create it in *File/Export/Report* click on *Edit list*, click on *Add* and then name your export report and configure it.
4. Remove Biognosys standards (or iRT peptides), contaminants and Decoys from the Targets before exporting the results as MSstats Input, because these are not needed for quantification (see Note 54).
5. Export data for further analysis in *File/Export/Report/MSstats Input*—click on *Preview* (Fig. 9), control data and then click on *Export*.

### 3.6 Statistical Analysis: Relative Quantification Using R

Commented script replicating above described statistical analysis with up to date R [18] and MSstats version (R version 4.1.2, released 2021-11-01, MSstats\_4.0.1) is available as Electronic Supplementary Files (Data 1 and 2) with this chapter. In our example, we use data preprocessed in Skyline and convert the Skyline output into correctly formatted MSstats input using `SkylinetoMSstatsFormat` function. However, MSstats provides several convenient

Protein Name	Peptide Modified Sequence	Precursor Charge	Fragment Ion	Product Charge	Isotope Label Type	Condition	BioReplicate	File Name	Area	Standard Type	Truncated	Detection Q Value
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D7	1	5_S7_2.wiff	1661		False	0.0426
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D7	2	6_S7_2.wiff	1877		False	0.1265
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D7	3	7_S7_3_2ul.wiff	649		False	0.1426
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D7	4	8_SD7_4.wiff	1996		False	0.0047
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D21	5	13_S21_1.wiff	2318		False	0.2314
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D21	6	14_S21_2.wiff	1202		False	0.0124
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D21	7	15_S21_3.wiff	2400		False	0.0152
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y9	1	light	D21	8	16_S21_4.wiff	2433		False	0.1135
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D7	1	5_S7_2.wiff	5187		False	0.0426
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D7	2	6_S7_2.wiff	6534		False	0.1265
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D7	3	7_S7_3_2ul.wiff	5263		False	0.1426
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D7	4	8_SD7_4.wiff	11321		False	0.0047
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D21	5	13_S21_1.wiff	5718		False	0.2314
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D21	6	14_S21_2.wiff	9152		False	0.0124
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D21	7	15_S21_3.wiff	8574		False	0.0152
401ADAVT1LUBAE	YVLGDTAMGK	2	y8	1	light	D21	8	16_S21_4.wiff	12073		False	0.1135

**Fig. 9** The MSstats required parameters for MSstats Input are Protein Name, Peptide Modified Sequence, Precursor Charge, Fragment Ion, Product Charge, Isotope Label Type, Condition, BioReplicate, File Name, Area, Standard Type, Truncated and Detection Q Value

conversion functions for preparing output of other SWATH-MS data processing pipelines for statistical analysis (e.g., OpenSWATH-toMSstatsFormat). The main function for transforming and summarizing original raw data into quantitative data for model fitting and comparison of groups of interest is “dataProcess.” We refer readers to MSstats documentation for detailed explanation of all available parameters of this function. One important parameter of note is “censoredInt,” which defaults to “NA,” but should be set to “0” for Skyline input. Function “quantification” provides log-transformed protein abundances summarized either on sample or biological group level. Sample level output is useful if more complex statistical analysis beyond simple between group (e.g., Control vs Treatment) or repeated measure (Pretreatment vs Post-treatment on the same subject) comparison is required. Other R packages, such as limma [28, 29], lme4 [30, 31] and others can be used to fit appropriate models to exported sample level data.

## 4 Notes

1. The following products are recommended to prepare solutions for cell culture: Phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich), poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich), Laminin mouse protein (Thermo Fisher Scientific), EGF (Thermo Fisher Scientific), FGF basic (Thermo Fisher Scientific), penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific).
2. Discontinued product.
3. Each SFM component can be purchased independently from Thermo Fisher Scientific; KnockOut™ DMEM/F-12, StemPro™ Neural Supplement without the growth factors, EGF, FGF basic and GlutaMAX™. GlutaMAX™ is the L-alanine-L-glutamine dipeptide, which is more stable source of L-

- glutamine in cell culture media as L-glutamine spontaneously degrades into toxic ammonia over time.
4. Choose the columns accordingly to the amount of peptide in the sample. There are several manufacturers (e.g., The Nest Group, Thermo Fisher Scientific, Oasis, Merck), and all of them have been proved to be good.
  5. Pierce™ 660 nm Protein Assay Kit is recommended and compatible with denaturation buffer.
  6. Aliquots of stock solutions of denaturation buffer, 100 mM TCEP in LC-MS water, 400 mM IAA in LC-MS water, 1% ProteaseMAX™ in 50 mM ammonium bicarbonate, 1 µg/µL LysC in 50 mM acetic acid, and 1 µg/µL trypsin in 50 mM acetic acid can be stored at –20 °C. Ammonium bicarbonate: prepare always fresh.
  7. Optionally RStudio [32] (R-Tools Technology, Inc) integrated development environment may be used.
  8. In our workflow we use iRT peptides from Biognosys. These iRT standards are highly stable non-naturally occurring peptides that can also be used for calibration of LC system. Other alternatives are offered by, for example, Thermo Fisher Scientific, Polyquant (RePLiCal), AB Sciex (PepCalMix), Sigma-Aldrich. Alternatively, you can design and use your own iRTs. As far as we know, iRT standards from Biognosys are incorporated not only in Skyline, but also in other software tools for SWATH-MS (DIA) data processing.
  9. We use in-house prepared peptide mixture of cell lysate of uniform NSCs for quality control of MS performance and sample preparation procedure. This should be prepared in bulk to be used for approx. 1 year. Alternatively, commercial HeLa Protein Digest Standard (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 88329) or K562 Protein Extract Digest (part of SWATH Acquisition Performance Kit, AB Sciex, Cat. No. 5045757) can be used. The advantage of the commercial protein digests is their possible usage in interlaboratory comparison including some automated quality control systems, for example, QCloud [33].
  10. The NSCs may benefit from culture at lower oxygen partial pressure (10% of oxygen in the air) in order to decrease the oxidative stress.
  11. Six-well culture plates can be used for cell growth and differentiation to obtain sufficient material for SWATH-MS analysis as minimal requirements are approx.  $3 \times 10^5$  cells. Cells from one well (surface about 9 cm<sup>2</sup>) represent one sample replicate. At least four replicates are recommended for each condition. Use



3 mL of culture medium/PBS per well or adjust the volume as needed for different cell culture vessels.

12. The medium should be never completely aspirated from differentiating cells. Medium should be changed carefully by very slow pipetting against the wall of the culture dish, as cells tend to detach in sheets after prolonged differentiation (high risk of detachment from day 7 on).
13. Check under microscope that the cells are detached from the bottom to the solution. If needed, scrape remaining cells from the plate again.
14. Alternatively, detach the cells using StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent (Thermo Fisher Scientific) or 0.05% solution of Trypsin. Check under microscope for cell detachment. When using Trypsin, do not extend incubation over 3 min and stop the enzyme action with soybean Trypsin inhibitor. Accutase preserves higher cell viability in comparison to Trypsin and should be more appropriate for NSCs.
15. Prewet the pipette in PBS before use, to prevent cells from sticking to pipette walls, resulting in loss of material.
16. You can freeze the cell pellet at  $-80^{\circ}\text{C}$  at this moment and keep until further use.
17. ProteaseMAX™ is surfactant that solubilizes proteins and thus enhances protein digestion.
18. Combispin (Biovondor) or similar combined centrifuge/vortex device installed in a refrigerator or cold room can be used for this purpose. Recommended settings are 10 cycles, 1 min at 6000 RPM, 20 s hard shaking.
19. You may optionally repeat **steps 17 and 18** to enhance the protein yield.
20. This step helps to fragment DNA when the sample tends to become highly viscous. You may add more denaturation buffer to reduce viscosity.
21. You can freeze the samples at  $-80^{\circ}\text{C}$  at this moment and keep until further use.
22. Optional: You can spike-in proteins from another nonhomologous protein species to your protein sample at this moment as quality control of your sample preparation protocol and your protein quantification workflow. For human samples we use chicken ovalbumin protein and alcohol dehydrogenase protein from *S. cerevisiae*. The spike-in proteins spiked in equal amounts per sample could be used only as simple quality control, for example, significantly lower abundance of these proteins in a specific sample would mean problem with your sample preparation. When proteins are spiked into samples in

different ratios one can inspect the quantification workflow correctness. For less complex samples or for samples where more than 50% of protein content will change in abundance the spike-in proteins could be used as normalization standards as well.

23. When handling FA, work under the hood and use a glass syringe.
24. Alternatively, you can stop the digestion by heating the sample to 80 °C for 20 min.
25. The appropriate cleanup column for this type of sample should be, for example, MacroSpin™ (NestGroup) or BioPureSPN MACRO™ SPE column with sample capacity 30–350 µg of peptide/protein. This depends on the initial amount of proteins in a sample lysate, which in our case was approx. 50–100 µg of protein lysate from NSCs differentiated for 7 and 21 days and harvested from one well of about 9 cm<sup>2</sup> per sample.
26. The peptide sample load should be optimized for each sample type and instrument. Too high sample load may lead to saturation of the detector and to decrease in LC-MS/MS performance over time due to contamination of MS front end. Our experience is that sample load of 0.5 µg of peptides per sample run is usually enough for 5600+ TripleTOF, the sample load may be increased to 1 µg if necessary for a higher number of spectra and peptide/protein identifications.
27. IDA is an abbreviation for Information Dependent Acquisition in AB Sciex terminology used in AB Sciex software with the same meaning as DDA (Data-Dependent Acquisition).
28. TripleTOF 6600 can go up to  $m/z$  2250.
29. IHT depends mainly on the ESI source. In our settings with black NanoSpray Source III that maintains higher inner temperature IHT 100 may be enough. Low IHT may lead to increased front-end contamination, too high IHT may lead to column tip damage.
30. Accumulation time and ions to monitor are parameters that we recommend to optimize. Depending on chromatographic peak width you should have 6–8 points across the chromatographic peak at half height, that is, for a peak width of 20 s at half height your cycle time should be around 3 s. If you set shorter accumulation time, you can monitor more candidate ions and the other way around. The same principle applies to the number of variable windows that can be used in SWATH-MS mode.
31. These parameters should be again optimized for individual system and sample type. The exclusion time should be set that the peptide is triggered around the highest intensity of

chromatographic peak. Mass tolerance in mDa is fixed across the  $m/z$ , whereas the absolute mass tolerance in ppm will change across the  $m/z$ .

32. RCE is calculated based on the charge state of the ion. RCE slope and intercept values needed for determining the unknown charge state should be updated according to AB Sciex instructions over time in the IDA CE Parameters Table (Fig. 3b).
33. We prefer to use longer accumulation time and lower number of windows. Probably more popular is to keep shorter accumulation time and higher number of windows, that is, 30 ms accumulation time would allow 100 variable windows, which is the maximum for TripleTOF 5600. However, with higher number of windows the intensity of detected fragment ions will be lower.
34. Skyline uses term “assay library” for spectral library including retention time calculator.
35. If you already have an optimized profile, for example for SRM analyses, do not forget to save it first—Settings/Save Current.
36. Mass accuracy in ppm is used for centroid data, whereas resolving power is used for raw (profile) data. Approximately, resolving power of 30,000 equals to 15 ppm, 30 ppm equals to resolving power of 15,000 etc. According to Skyline creators, profile data should perform better than centroid data for TTOF 5600+, but the trade-off is a larger data file size and slower data import and processing. Skyline and OpenSWATH creators recommend msConvert (ProteoWizard) for data conversion to centroid data format.
37. Choosing MS1 filtering is optional, but it is assumed that it will increase quality of spectral library.
38. This is an important step. All of your data have to be measured with the same DIA windows parameters/method.
39. The retention time window depends on stability of your LC separation. In our experience 3–10 min is enough. If setting 5 min, the time window will be 10 min ( $\pm 5$  min from predicted time).
40. Setting Ion types: p for precursors can be used to check how MS1 spectra match with MS/MS spectra; however, it is not recommended for our current protocol. For more information about using precursor ions please refer to Skyline tutorials.
41. For organisms other than human and mouse, UniProtKB reference proteomes with one protein sequence per gene provide better results than Swiss-Prot as the number of manually reviewed proteins is usually low.

42. It is possible to use sample nonspecific libraries, for example, pan-Human Library [34]. The currently available SWATH-MS libraries can be downloaded from [swathatlas.org](http://swathatlas.org). When using sample nonspecific library, it is necessary to use strict cut-off score (0.95 or higher), otherwise the number of the false positive protein identifications may be high.
43. Skyline allows creation of spectral libraries from several search engines as well as employment of Peptide Search tool integrated in Skyline (both for profile and centroid data).
44. The most common enzyme is Trypsin, often used in combination with Lys-C, as in our case. Unfortunately, Skyline does not support combination of Lys-C and Trypsin directly, but there are two different ways to use Skyline with this combination of enzymes: (1) Select trypsin and continue according to this protocol. This way will result in underreporting of missed cleavages after lysine followed by proline. (2) Select Trypsin/P and import your protein list (File/Import/FASTA). This way will result in overreporting of missed cleavages after arginine, thus increase of number of allowed missed cleavages in Skyline may be required.
45. Set the same number of missed cleavages as in search engine, as Skyline fully relies on missed cleavage results from the search engine. Typically allowing one to two missed cleavages is optimal to see all possible peptides. However, only peptides without missed cleavages should be used for quantification.
46. At this step iRT calculator will be created automatically. The cut-off score 0.99 should approximately correspond to 1% false discovery rate (FDR) for Mascot protein identifications.
47. If you created a sample-specific library, the recalibration of the iRT values relative to the peptides being added can improve retention time alignment under stable chromatographic conditions.
48. Only unique (proteotypic) peptides should be used for statistical analysis. It is a common practice to use at least two peptides per protein and three transitions per peptide for quantification.
49. Decoy transitions are necessary for implemented mProphet algorithm to work as they serve as negative controls [35]. Setting decoy generation method is optional, however, Skyline creators suggest using “shuffle sequence” setting.
50. This part may take some time depending on the size of your results file. Do not import results before adding decoys, otherwise you will have to reimport the data. You may choose to import many files simultaneously.
51. You can manually inspect your data by browsing the Skyline document or by searching for specific proteins/peptides of

interest. Pay attention to peak picking, to chromatographic pattern and/or to the retention time shifts.

52. Here you can add classification of your samples into biologically meaningful groups (Condition), that is, day 7 (D7) and day 21 (D21) in our example of NSC differentiation. The BioReplicate should be numerical value, that is, with eight samples in our analysis the BioReplicate values are 1–8.
53. The MSstats version available in Skyline external tool store is currently outdated and relies on R version 3.5.0. R and several required packages will be installed when you select this option. Presence of other R versions on the same system or customization of R library location will interfere with correct MSstats installation and function and should be avoided. Installation of MSstats from Skyline store can also overwrite your already installed R packages, so care should be taken if any other analysis depends on specific package versions.
54. You can remove iRTs, decoys and contaminants before exporting the results or you can remove it later on in R data preprocessing, because MSstats does not recognize them. Depending on Skyline version, decoys may be removed automatically by Skyline during MSstats Input export generation.

---

## Acknowledgments

This work was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports project InterCOST (I.TC.18079) under CellFit COST Action (CA16119), the Charles University, projects GA UK No. 1767518 and No. 1460217, and the Czech Science Foundation (19-01747S).

## References

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145–1147
2. Barker RA, de Beaufort I (2013) Scientific and ethical issues related to stem cell research and interventions in neurodegenerative disorders of the brain. *Prog Neurobiol* 110:63–73
3. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
4. Goldman SA (2016) Stem and progenitor cell-based therapy of the central nervous system: hopes, hype, and wishful thinking. *Cell Stem Cell* 18:174–188
5. Zizkova M, Sucha R, Tyleckova J et al (2015) Proteome-wide analysis of neural stem cell differentiation to facilitate transition to cell replacement therapies. *Expert Rev Proteomics* 12:83–95
6. Boese AC, Hamblin MH, Lee J-P (2020) Neural stem cell therapy for neurovascular injury in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 324:113112
7. Choi K-A, Hong S (2017) Induced neural stem cells as a means of treatment in Huntington's disease. *Expert Opin Biol Ther* 17: 1333–1343
8. Fan Y, Winanto, Ng S-Y (2020) Replacing what's lost: a new era of stem cell therapy for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 9:2

9. Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198–207
10. Sucha R, Kubickova M, Cervenka J et al (2021) Targeted mass spectrometry for monitoring of neural differentiation. *Biol Open* 10: bio058727
11. Gillet LC, Navarro P, Tate S et al (2012) Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 11(6): O111.016717
12. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G et al (2018) DIA-umpire: comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods* 12:258–264, 7 p following 264
13. Tsou C-C, Avtonomov D, Larsen B et al (2015) DIA-umpire: comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods* 12:258–264, 7 p following 264
14. Meyer JG, Schilling B (2017) Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev Proteomics* 14: 419–429
15. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N et al (2010) Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26:966–968
16. Choi M, Chang C-Y, Clough T et al (2014) MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *Bioinformatics* 30: 2524–2526
17. Červenka J, Tylečková J, Kupcová Skalníková H et al (2021) Proteomic characterization of human neural stem cells and their secretome during in vitro differentiation. *Front Cell Neurosci* 14:612560
18. R Core Team (2021) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
19. Wiśniewski JR (2016) Quantitative evaluation of filter aided sample preparation (FASP) and multienzyme digestion FASP protocols. *Anal Chem* 88:5438–5443
20. Röst HL, Rosenberger G, Navarro P et al (2014) OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data. *Nat Biotechnol* 32:219–223
21. Röst HL, Aebersold R, Schubert OI (2017) Automated SWATH data analysis using targeted extraction of ion chromatograms. In: Comai L, Katz JE, Mallick P (eds) *Protocomics*. Springer, New York, pp 289–307
22. Holewinski RJ, Parker SJ, Matlock AD et al (2016) Methods for SWATH™: data independent acquisition on TripleTOF mass spectrometers. *Methods Mol Biol* 1410:265–279
23. Li Y, Zhong C-Q, Xu X et al (2015) Group-DIA: analyzing multiple data-independent acquisition mass spectrometry data files. *Nat Methods* 12:1105–1106
24. Sinitcyn P, Hamzciy H, Salinas Soto F et al (2021) MaxDIA enables library-based and library-free data-independent acquisition proteomics. *Nat Biotechnol* 39:1–11
25. Egertson JD, MacLean B, Johnson R et al (2015) Multiplexed peptide analysis using data independent acquisition and skyline. *Nat Protoc* 10:887–903
26. Kelstrup CD, Bekker-Jensen DB, Arrey TN et al (2018) Performance evaluation of the Q exactive HF-X for shotgun proteomics. *J Proteome Res* 17:727–738
27. Koopmans F, Ho JTC, Smit AB et al (2018) Comparative analyses of data independent acquisition mass spectrometric approaches: DIA, WiSIM-DIA, and untargeted DIA. *Proteomics* 18:1700304
28. Ritchie ME, Phipson B, Wu D et al (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47
29. Smyth G, Hu Y, Ritchie M et al (2020) limma: linear models for microarray data, bioconductor version: release (3.10)
30. Bates D, Mächler M, Bolker B et al (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48
31. Bates D, Mächler M, Bolker B et al (2018) lme4: linear mixed-effects models using “Eigen” and S4
32. RStudio Team (2021) RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, Inc., Boston, MA
33. Chiva C, Olivella R, Borràs E et al (2018) QCcloud: a cloud-based quality control system for mass spectrometry-based proteomics laboratories. *PLoS One* 13:e0189209
34. Rosenberger G, Koh CC, Guo T et al (2014) A repository of assays to quantify 10,000 human proteins by SWATH-MS. *Sci Data* 1:140031
35. Reiter L, Rinner O, Picotti P et al (2011) mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments. *Nat Methods* 8:430–435

## Proteomics in Huntington's Disease Biomarker Discovery



Jakub Červenka, Kateřina Budková, Rita Suchá, Petr Vodička,  
and Eleni Voukali

### Abbreviations

2-DE	Two-dimensional gel electrophoresis
AD	Alzheimer's disease
ALDH2	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase
APOA4	Apolipoprotein A-IV
BACHD	Bacterial artificial chromosome HD
BASP1	Brain abundant membrane attached signal protein 1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CAG	Cytosine-adenine-guanine
CAP	CAG-age product
Cb1	Cannabinoid receptor 1
Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5/regulated on activation normal T cell expressed and secreted
CKB	Creatine kinase
CLU	Clusterin
CNS	Central nervous system
Coro1a	Coronin-1A
CPE	Carboxypeptidase E
CRP	C-reactive protein
Cryab	Alpha-crystallin B chain
CSF	Cerebrospinal fluid
DDA	Data-dependent acquisition
DIA	Data-independent acquisition

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at [https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2_9).

J. Červenka · K. Budková · R. Suchá · P. Vodička · E. Voukali (✉)  
Laboratory of Applied Proteome Analyses, Institute of Animal Physiology and Genetics,  
Czech Academy of Sciences, Libeň, Czech Republic  
e-mail: [Voukali@iapg.cas.cz](mailto:Voukali@iapg.cas.cz)

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Switzerland AG 2023  
E. A. Thomas, G. M. Parkin (eds.), *Biomarkers for Huntington's Disease*,  
Contemporary Clinical Neuroscience, [https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-32815-2_9)

209

DIGE	Differential in gel electrophoresis
Dlst	Mitochondrial dihydrolipoamide S-succinyltransferase
DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
ECM	Extracellular matrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Eno1	$\alpha$ -Enolase
F2	Prothrombin
Flot2	Flotillin-2
FTL	Ferritin light polypeptide
GABA	Gamma aminobutyric acid
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Glu1	Glutamine synthetase
GM2A	Ganglioside GM2 activator
GO	Gene ontology
Got2	Aspartate aminotransferase
GRIA4	Glutamate receptor 4
Gspt2	G1 to S phase transition 2
GSTM2	Glutathione S-transferase mu-2
HD	Huntington's disease
hESCs	Human embryonic stem cells
IIP	IIaptoglobin
Hspa9	Stress-70 protein
Hypk	Huntingtin interacting protein K
Iapp	Amylin
ICAT	Isotope-coded affinity tag
IL6	Interleukin 6
Ins1/2	Insulin
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
IsoHD	Isogenic HD
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantitation
LAP3	Cytosol aminopeptidase
LC	Liquid chromatography
Lep	Leptin
Lmna	Prelamin-A/C
M/z	Mass-to-charge
mIITT	Mutant huntingtin
MOB4	MOB family member 4
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem MS
Mtor	Serine/threonine-protein kinase mTOR
NCAM3	Neural cell adhesion molecule 2
NDUFS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial
NFASC	Neurofascin
NFL	Neurofilament light polypeptide
NPCs	Neural progenitor cells



NRXN3	Neurexin 3
OMGP	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein
Park7	Parkinson disease protein 7 homolog
PD	Parkinson's disease
Pde10a	Phosphodiesterase 10a
PDYN	Proenkephalin-B
Pebp1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
PENK	Proenkephalin-A
Pkm2	Pyruvate kinase PKM
PolyQ	Polyglutamine tract
PPFIA3	Liprin-alpha-3
Prdx3	Peroxiredoxin-3
PRM	Parallel reaction monitoring
PTMs	Post-translational modifications
Py	Peptide Y
Ran	GTP-binding nuclear protein Ran
Scn4b	Sodium channel subunit 4
SILAC	Stable isotope labelling by amino acids in cell culture
Sod2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
SRM	Selected reaction monitoring
STXBP3	Syntaxin-binding protein 3
TMTs	Tandem mass tags
TOF	Time-of-flight
TTR	T <sub>4</sub> -binding protein
Vim	Vimentin
YAC	Yeast artificial chromosome

## 1 Huntington's Disease and the Need for Biomarkers

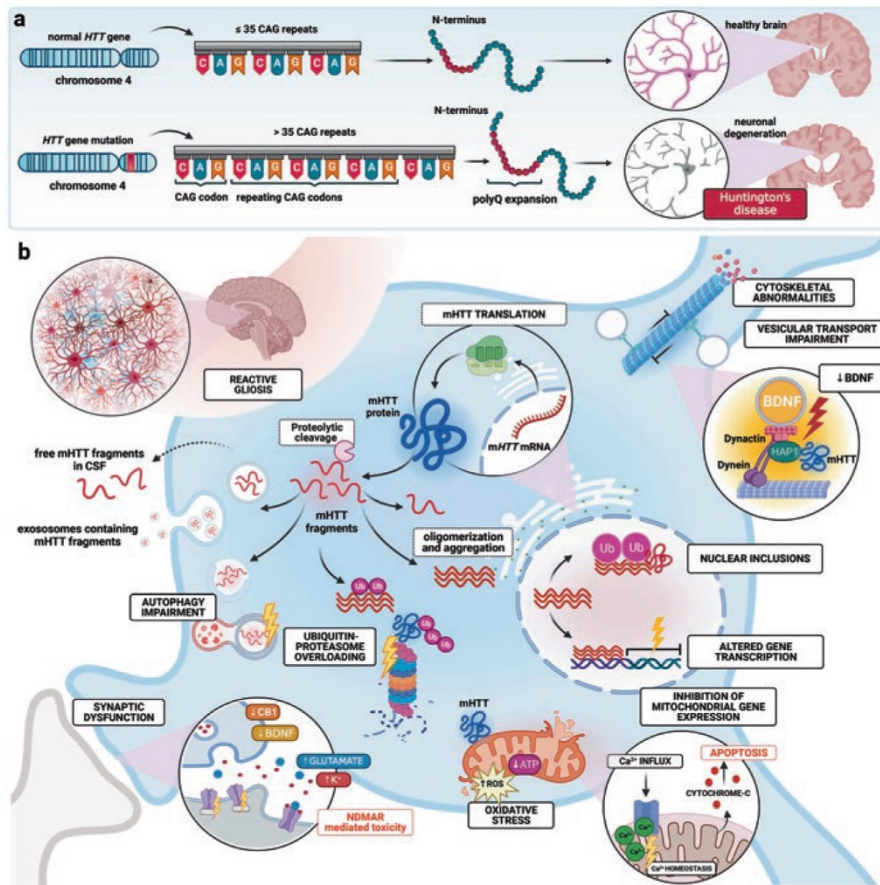
Huntington's disease (HD) is a progressive lethal neurodegenerative condition with a prevalence of 4.88 per 100,000 (Medina et al., 2022). HD is inherited in an autosomal dominant manner and caused by a single genetic mutation; an expansion of the CAG (cytosine-adenine-guanine) repeats in the huntingtin (*HTT*) gene on chromosome 4. Translation of this gene produces a mutated huntingtin protein (mHTT) with an abnormally long polyglutamine tract (polyQ) at its N-terminal end (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Expansions longer than 35 CAG repeats lead to HD (Kremer et al., 1994), and the length of the polyQ tract influences the age of disease onset (Rosenblatt et al., 2003, 2006, 2012; Wexler, 2004) (Fig. 1a). HD commonly manifests during the fourth decade of life (Fusilli et al., 2018). The gene-expansion carrier will insidiously and ultimately develop a range of symptoms referred to as Huntington's triad, i.e., choreiform movements, psychiatric problems and cognitive decline (Bates et al., 2015; Ross et al., 2014).

HTT is broadly expressed throughout the central nervous system (CNS) and most tissues (Carroll et al., 2015; Marques Sousa & Humbert, 2013), with widespread subcellular localisation that reflects its pleiotropic functions. HTT protein interacts with a wide range of proteins (Wanker et al., 2019), and participates in many cellular processes, acting as a molecular scaffold and multivalent interaction hub (Guo et al., 2018; Saudou & Humbert, 2016). Two main pathogenic processes have been suggested as a cause of neurodegeneration in HD. The first process involves the loss of HTT function and toxic gain of function of the polyQ repeats, which may disrupt a number of cellular events (Gil & Rego, 2008; Saudou & Humbert, 2016; Zuccato et al., 2001) (Fig. 1b). The second process involves toxic fragments of mHTT released as a result of proteolytic cleavages as post-translational modifications (PTMs) of full-length mHTT (El-Daher et al., 2015). These fragments of mHTT then form large intranuclear inclusions (DiFiglia et al., 1997; Riguet et al., 2021), but the role of these aggregates in neuropathology remains controversial (Kuemmerle et al., 1999; Michalik & Van Broeckhoven, 2003).

Neuropathological features in HD brains are well-characterised. The striatum is the first affected region, but serial atrophic changes occur throughout variable cortical areas, with a loss of brain weight by up to 30% (Aylward et al., 2011; Halliday et al., 1998; Rosas et al., 2008). Striatal volume loss is the hallmark of HD and occurs in a specific temporal manner; cortical thinning is considered an associated pathology (Vonsattel, 2008). Striatal gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic medium spiny neurons are lost, with prominent degenerative changes in dendrites, whereas medium spiny interneurons are not affected (Ferrante et al., 1987; Graveland et al., 1985).

Although the symptomatology of HD is generally well-defined, individual symptoms may vary. Besides CNS pathology, HD patients may suffer from metabolic disturbances, skeletal muscle wasting, weight loss, cardiac failure, testicular atrophy, osteoporosis (van der Burg et al., 2009), and congenital immune dysfunction, which is increasingly recognised as one of the key characteristics of HD and other neurodegenerative diseases (Andre et al., 2016). The HD patient usually succumbs 20 years following symptoms onset due to aspiration pneumonia (Heemskerk & Roos, 2012). Since there is no cure available, HD management is currently best provided by a multidisciplinary team through supportive and symptomatic treatment (Bachoud-Lévi et al., 2019).

A long pre-symptomatic period offers a potential therapeutic window for experimental HD interventions, such as gene-silencing approaches to lower mHTT levels, which are the focus of some clinical trials (Estevez-Fraga et al., 2022; Tabrizi et al., 2022). International consensus has established a set of motor, cognitive and neuroimaging assessments with predictive value for HD onset and progression (Tabrizi et al., 2022). However, during the prodromal stage in the absence of clinical symptoms, reliable biochemical biomarkers would allow more effective monitoring of a given intervention. An ideal biomarker should i) reflect the underlying neuropathology and/or disease progression, ii) show minimal variability between subjects, and iii) be obtainable from a biofluid with minimal invasion (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Molecular changes detected in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of HD patients propose many potential biomarkers (Byrne & Wild, 2016; Przybyl et al., 2021; Rodrigues et al., 2018; Silajdžić & Björkqvist, 2018; Tabrizi et al., 2022), but



**Fig. 1** Pathogenic mechanisms in Huntington's disease (HD). (a) HD is caused by a mutation in the *HTT* gene, which leads to CAG repeats expansion resulting in the production of the toxic mutant huntingtin (mHTT) protein. As a result of the disruption of mHTT functions, degeneration of neurons occurs. (b) Dysregulated biological pathways in HD after production of insoluble N-terminal mHTT fragments with a tendency to oligomerize and aggregate. The fragments form nuclear inclusions. Some of the aggregates enter catabolic degradation pathways (ubiquitin-proteasome system and autophagy), which are overwhelmed, abnormal proteins accumulate, and protein homeostasis is disrupted. The effect of mHTT on vesicular transport is closely related to binding to molecular motors and HAP1 protein, transport of vesicles slows down or stops. Synaptic dysfunctions are caused by a combination of many factors, e.g., reduction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cortical synapses, downregulation of *BDNF* transcription, switching of synaptic N-methyl-D-aspartate receptor signalling, and the associated excitotoxicity. mHTT affects a range of mitochondrial processes, such as mitochondrial gene expression, resulting in metabolic abnormalities and oxidative stress. mHTT interacts with the outer mitochondrial membrane and reduces the level of Ca<sup>2+</sup> required for mitochondrial permeability transition pore opening, leading to cytochrome C release and apoptosis. Astrocytes and microglia transit to reactive morphology causing neuroinflammation and gliosis. (The figure was created with [BioRender.com](https://BioRender.com))

at the moment, only the levels of mHTT and neurofilament light chain (NFL), a marker of axonal damage, are used as surrogate markers in HD clinical trials (Byrne et al., 2018; Byrne et al., 2017; Estevez-Fraga et al., 2022; Rodrigues et al., 2020).

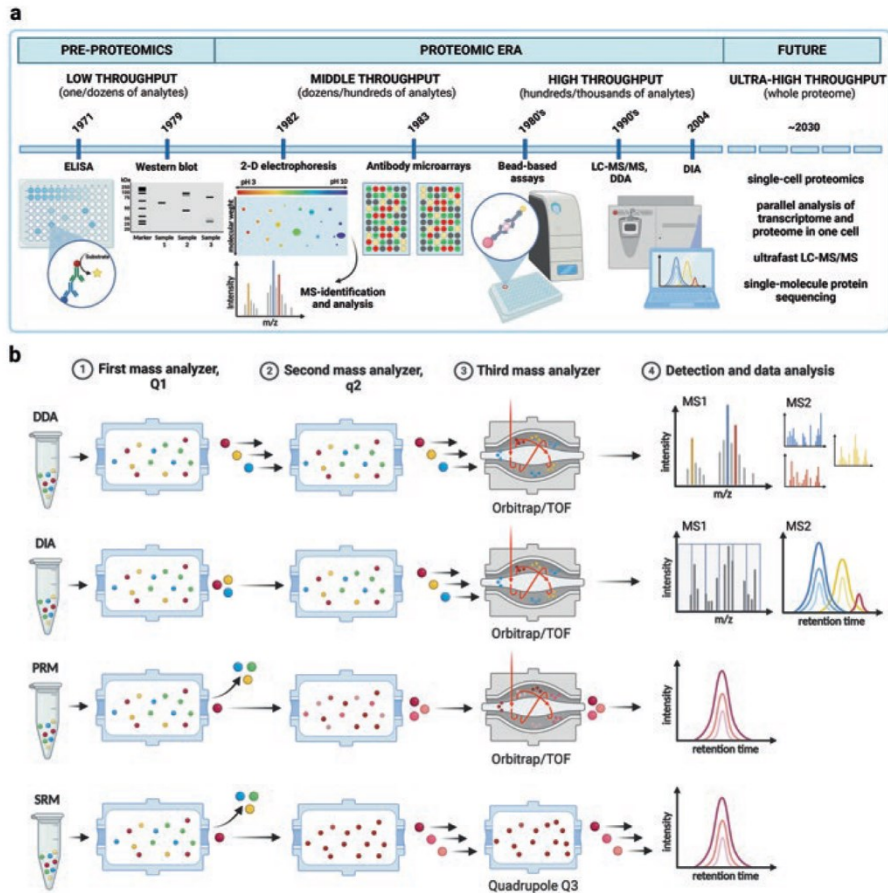
Although transcriptomic methods (e.g., RNA sequencing) are widely used, the correlation between mRNA and protein levels may vary between different genes, and with disease conditions (reviewed in (Buccitelli & Selbach, 2020)). Proteomics offers the potential to study the dynamics of the functional processes at the level of HD phenotypes (Fig. 1), providing an effective tool to discover candidate proteins to monitor the disease progression and to design safe and effective therapies for patients. The purpose of this literature review is to discuss existing proteomic studies recapitulating HD pathology. We describe the basic principles and methods of proteomics (Fig. 2), including their powerful potential, but also current limitations. First, we discuss proteins whose abundance changes were verified using an independent method by the same investigators (Supp. Table 1), and then proteins whose abundance changes were consistently reported in independent studies of HD patients and models (Fig. 3). To integrate relevant findings and to identify protein patterns, functional analysis of dysregulated proteins was performed with a focus on human CNS samples (Fig. 4).

## 2 Proteomics Approaches

Proteomics is a collection of methods and techniques that allows us to study a proteome – a set of proteins present in a sample at a particular time. Protein identity, abundance, or PTMs (e.g., phosphorylation, glycosylation, or ubiquitination) can be revealed. Protein 3D structures, protein-protein and protein-small molecule interactions, or protein localisation within the tissue can be reliably determined by modern proteomics (Aebersold & Mann, 2016). Proteomics methods can be divided into two categories, the antibody-based, and the methods based on mass spectrometry (MS) (Fig. 2a). However, the division between these two groups is not absolute, as some techniques combine both approaches (e.g., mass cytometry). This subchapter briefly summarises the particular methods enabling global and targeted proteome analyses.

---

**Fig. 2** (continued) reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM), require previous knowledge about proteins, i.e., the mass-to-charge ( $m/z$ ) ratios of precursor ions for selected peptides and their retention times. The first quadrupole filters out all other precursor ions than the targeted one, which is sent to the second quadrupole for fragmentation. In PRM, full MS2 spectra of all fragment ions are measured by the third high-resolution mass analyser. For SRM assays,  $m/z$  ratios of fragment ions are also defined, the third quadrupole filters out all other fragment ions than the targeted one, and several fragment ions are sequentially analysed. Data are collected and integrated for relative or absolute proteins quantification. (The figure was created with [BioRender.com](https://www.biorender.com))



**Fig. 2** Evolution of proteomic techniques and the main approaches of bottom-up proteomics. **(a)** The timeline of proteomic technology tools starts with Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that represent protein biology/biochemistry techniques with rather limited multiplexing capabilities. The “true” proteomic methods are 2-D electrophoresis coupled with mass spectrometry (MS), antibody microarrays and bead-based assays. In the early 1990s, liquid chromatography (LC) coupled to tandem MS (LC-MS/MS) instruments with data-dependent acquisition (DDA) approach were introduced. Later, data-independent acquisition (DIA) methods improved quantification reliability and robustness. In the next decade, ultrafast MS-based methods may dominate in proteomics, mainly based on the DIA principle with a focus on single-cell proteomics, eventually combined with transcriptomics. **(b)** Main stages of bottom-up proteomic techniques. Bottom-up MS proteomic experiments begin with the digestion of proteins. All peptides of the proteins (colour balls in tubes) are separated (LC) and ionised before they enter the tandem MS instrument. For both global approaches, DDA and DIA, the complete spectrum of precursor ions (MS1) is measured by high-resolution Orbitrap or time-of-flight (TOF) mass analysers. Then, in the DDA approach, a defined number of precursor ions is sequentially selected by the first quadrupole (Q1) mass analyser, fragmented in the second mass analyser (Q2), and product ions are measured in the third mass analyser, generating MS2 spectra. In the DIA approach, the MS1 spectrum is divided into defined windows and all precursor ions within this window are fragmented and analysed together (MS2). When all selected precursor ions in DDA or all windows in DIA are measured, another cycle starts with a new MS1 experiment. Both targeted approaches, parallel

### ***Antibody-Based Methods***

Low-abundant proteins can be assessed using high sensitivity antibody-based methods. Compared to MS-based methods, sample preparation and data analysis for antibody-based methods are easier. Immunoassays are well-established but highly dependent on the specificity of available antibodies (Frohner et al., 2020; Hafko et al., 2013). Due to cross-reactivity, their multiplexing capacity is limited to tens to hundreds of proteins (Kupcova Skalnikova et al., 2017). For a significant part of the proteome, however, antibody-based measurements are the only way to be detected, as some proteins are present in samples in extremely low concentrations. In antibody microarrays, antibodies are spotted on a planar solid surface, and the analysis can be performed as semi-quantitative (relative quantification), or fully-quantitative by using standards with determined concentrations (absolute quantification). Antibodies can also be immobilised on beads, and different beads are identified by flow cytometry according to their internal dye or size. Flow cytometry can further be applied for protein analysis at a single-cell level, and up to 40 proteins can be simultaneously analysed. Mass cytometry, also known as cytometry by time-of-flight (TOF), provides results comparable with classical flow cytometry (Gadalla et al., 2019; Ravkov et al., 2019), but the number of measurable features within one cell is approximately two times higher.

### ***Mass Spectrometry-Based Methods***

#### **Hypothesis-Free Workflows**

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was the first widely used proteomic method able to quantify hundreds to thousands of proteins within a sample. Denatured proteins are separated by isoelectric focusing at the first dimension and at the second dimension, proteins are separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to their molecular weight. Proteins are visualised, protein maps are compared, and differential protein spots are analysed by MS (Thiede et al., 2005). MS instruments are reviewed in (Haag, 2016). 2-DE suffers from lower reproducibility (Zhou et al., 2005), together with high variability between gels, although this issue may be overcome by the employment of differential in gel electrophoresis (DIGE) (Ünlü et al., 1997).

Nowadays, the most widely used MS method is a bottom-up proteomics approach where proteins are cleaved into peptides, separated by liquid chromatography (LC), and measured by the MS instrument. Protein identification and quantification are then computationally inferred from the peptide data (Zhang et al., 2013). MS-based methods offer very high specificity and unprecedented depth of analysis (more than 10,000 proteins can be quantified simultaneously in one sample) (Meier et al., 2018). On the other hand, analysis of complex samples (e.g., blood plasma) is challenging due to the extremely high concentration range of proteins (Anderson &

Anderson, 2002). For global proteome profiling, data-dependent acquisition (DDA) and data-independent acquisition (DIA) are used. Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) are used in hypothesis-driven proteomics (Fig. 2b).

DDA, also known as shotgun proteomics, is a global approach for proteome analysis (Aebersold & Mann, 2016). The exact mass-to-charge ( $m/z$ ) ratio of peptides (precursor ions) and their signal intensities are analysed in the MS1 experiment. Precursor ions are then sequentially selected by the first mass analyser in a signal intensity-dependent manner (e.g., 30 precursor ions from the highest to lower signal intensity in MS1) and fragmented in the second mass analyser. The product ions (smaller peptides and amino acid residues from a particular precursor ion, also called fragment ions) are then analysed by the third mass analyser (MS2 experiment). A new cycle starts with the following MS1 experiment, once MS2 experiments of all selected precursor ions are measured. Detected masses of the precursor ions and their product ions are computationally compared with theoretical masses from an *in silico* digested protein database of the analysed organism for protein identification. The major advantage of the DDA method is its high throughput. Without a need for prior knowledge about the sample proteome, hundreds or thousands of proteins can be identified. The main drawback is its partial stochasticity, as precursor ions are selected according to their signal intensity. A particular precursor ion may be detectable, but below the number of precursors selected for fragmentation. This would result in a missing data point that would bias protein quantification.

To reduce the DDA stochasticity, various labelling methods that enable researchers to mix or pool the peptides from several samples into one were developed, e.g., stable isotope labelling by amino acids in cell culture (SILAC) (Ong et al., 2002), stable-isotope dimethyl labelling (Hsu et al., 2003), tandem mass tags (TMTs) (Thompson et al., 2003), isotope-coded affinity tag (ICAT) (Shiio & Aebersold, 2006), or isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) (Ross et al., 2004). Proteins/peptides are labelled by stable isotopes in cells or small organisms metabolically during their growth, or during sample processing by chemical or enzymatic reactions, and measured by high-resolution MS. The isotope ratios are then used for accurate quantification of proteins.

In the DIA technique, the major difference over the DDA is in the selection of precursor ions for fragmentation. The MS1 spectrum is divided into dozens of windows of pre-specified  $m/z$  values (e.g., 25 Da – from 760 to 785  $m/z$ , and so on, consequently covering the whole range of  $m/z$  from the MS1 experiment), all precursor ions within the particular window are sent for fragmentation altogether, and resulting product ions are detected in one MS2 experiment. In theory, all peptides are measured and quantified in one analysis, eliminating the DDA stochasticity. DIA method thus provides high throughput for global proteome analysis (over 11,000 proteins can be quantified in one analysis) (Muntel et al., 2019), as well as the possibility for quantification of a selected set of proteins, with high reproducibility and accuracy (Kitata et al., 2022). Proteomic data analysis is possible with machine learning and bioinformatics software tools that are constantly being developed and improved (Neely et al., 2023; Tsiamis et al., 2019).

### Hypothesis-Driven Workflows

PRM is, in contrast to DDA and DIA methods, a hypothesis-driven targeted approach suitable for the validation of candidate biomarkers, rather than biomarker discovery. This method requires high resolution and high mass accuracy analysers, i.e., TOF or Orbitrap, at the end of the tandem MS set-up. For PRM analysis, prior knowledge of  $m/z$  values of peptides from targeted proteins, together with their retention times is essential. Particular precursor ions are selected by the first analyser (quadrupole) and sent to the second quadrupole for fragmentation. The resulting product ions are then monitored by TOF or Orbitrap mass analysers. This leads to very high specificity, sensitivity, and a wide dynamic range (Peterson et al., 2012). The PRM method also enables absolute quantification of targeted analytes, providing that internal standards (peptides labelled with stable isotopes) of known concentrations are used (Gerber et al., 2003). SRM is another targeted method for hypothesis-driven studies. For its implementation, a specific MS instrument consisting of three quadrupoles is required. The first and the third quadrupoles serve as mass filters, while the second quadrupole is used for fragmentation. Prior knowledge of  $m/z$  values for both precursor and product ions, and their retention time is necessary. The combination of known retention times and pre-defined  $m/z$  values assures high specificity and sensitivity (Lange et al., 2008; Vidova & Spacil, 2017). The SRM method also enables absolute quantification and provides higher measurement precision than PRM, but a lower dynamic range (Peterson et al., 2012).

### 3 Dysregulated Candidate Proteins Verified by an Independent Method

The verification by an orthogonal method (e.g., real-time quantitative polymerase chain reaction, Western blotting, etc.) was long considered an inevitable step for the confirmation of 2-DE and quantitative MS results. Since they have undergone imposing development in the last several years – from sample preparation workflows, over instrumentation, to data analyses, MS-based methods have been proven to be highly robust and reproducible (Mehta et al., 2022). For results from the targeted PRM and SRM methods, with several peptides per protein being highly specifically analysed, the requirement for an independent verification with less precise methods is no longer justified (Aebersold et al., 2013). In this part, we discuss findings obtained from global proteome screens, where selected protein changes were followed up in independent experiments. These results are complemented by findings from up-to-date targeted proteomics measurements. Such verified proteins are listed in Supp. Table 1.



## ***Biofluids***

### **Plasma**

Presently, human plasma is probably the most preferred biofluid for biomarker discovery. Its proteome has been used to identify changes in the level of proteins that are believed to be associated with blood-brain-barrier leakage, and that reflect many pathological processes. In addition, plasma is accessible and widespread laboratory infrastructure is in place for its analysis; therefore biomarkers that can be measured through a blood test are highly desirable (Rifai et al., 2006). Using two different depletion techniques and 2-DE, Dalrymple et al. identified proteins differentially abundant in the plasma of HD patients from various stages of the disease, including asymptomatic patients. Many of these proteins are regulators of the innate immune system. These findings reflect concurrent inflammation which was confirmed by measuring the levels of interleukin 6 (IL6) in HD patients and the R6/2 transgenic mouse model of HD by the same researchers. The authors proposed clusterin (CLU), an extracellular chaperone glycoprotein that inhibits protein aggregation, as a promising HD biomarker (Dalrymple et al., 2007; Poon et al., 2000; Wyatt et al., 2009). However, further evaluation of candidate biomarkers associated with innate immunity in plasma did not confirm CLU or other protein alterations, but revealed a decrease of C-reactive protein (CRP) in early HD (Silajdžić & Björkqvist, 2018). A later study used SRM assays for analysis of markers of innate immunity, members of the complement system and the CRP in pre-symptomatic and early HD patients. In contrast to the findings from Dalrymple and colleagues, none of the tested proteins showed a difference in any of the disease stages (Rezeli et al., 2014). All these results confirmed significant impact of inter-individual and/or intra-individual variability and support the necessity of validation of these biomarkers. Although the increase in the levels of inflammation markers might be unspecific to HD, substantial evidence indicates that neuroinflammation is one of the underlying pathogenetic mechanisms and clinical trials of immunomodulatory drugs are ongoing (Dickey & La Spada, 2018; Estevez-Fraga et al., 2022).

### **Cerebrospinal Fluid**

Despite being less accessible than plasma, CSF is the primary source for evaluating molecular variations of the CNS. The composition of CSF is dynamic and reflects physiological and pathological changes in the brain (Kroksveen et al., 2011). Fang et al. conducted an integrated analysis from five laboratories employing different MS detection methods and the same CSF samples. Although there was a large inconsistency between labs, the authors identified proteins with abundance changes throughout HD progression. Overall, brain-specific proteins decreased through HD advancement, while neuroinflammatory markers increased (Fang et al., 2009).

Huang et al. studied the CSF proteome from HD patients by 2-DE-based methods. In contrast to Fang et al., they did not use abundant protein depletion steps. They found that prothrombin (F2), apolipoprotein A-IV (APOA4) and haptoglobin (HP) were increased in CSF, but not in the serum of HD patients, and the authors proposed that this increase is CNS-derived (Huang et al., 2011).

A larger proteomic study explored the differences in CSF protein levels of HD gene carriers of different disease stages. After age adjustment, the authors proposed ubiquitin (UBC) as a candidate CSF biomarker. The ubiquitin peaks positively correlated with motor and functional scale scores and with the CAG-age product (CAP) score (Vinther-Jensen et al., 2015). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome system and dysfunctions of this system are well-documented in HD and other neurodegenerative diseases (Bennett et al., 2007). So far, the most extensive CSF profiling was recently conducted using label-free MS quantification in a cohort of pre-symptomatic and symptomatic HD patients. This absolute MS quantification method demonstrated that the severity of symptoms negatively correlated with the levels of the opioid precursor proenkephalin-A (PENK), which was decreased also in a separate HD cohort, and the authors proposed PENK as a candidate biomarker for HD progression (Niemela et al., 2021).

Other recent studies have used targeted analysis of candidate protein markers originally identified in earlier HD research (Al Shweiki et al., 2021; Barschke et al., 2022; Caron et al., 2022); in addition, two studies also compared HD patients to patients with other neurodegenerative diseases (Al Shweiki et al., 2021; Barschke et al., 2022). Consistent with findings by Niemela and colleagues (Niemela et al., 2021), Barschke and colleagues reported decreased levels of PENK in the CSF of HD patients, as well as decreased levels of another opioid precursor, proenkephalin-B (PDYN) (Barschke et al., 2022). Caron et al. investigated whether previously reported CSF protein changes (Al Shweiki et al., 2021; Fang et al., 2009; Niemela et al., 2021; Rodrigues et al., 2016; Vinther-Jensen et al., 2016) can be replicated and if candidates from gene expression studies in brains from humans (Corvol et al., 2004; García-Huerta et al., 2020; Hodges et al., 2006) and HD mouse models (Luthi-Carter et al., 2000; Mazarei et al., 2010, 2013; Ryskamp et al., 2017) have the potential to become biomarkers. Using PRM, the levels of pre-specified proteins were evaluated in the CSF from manifest HD patients, and pre-manifest mutation carriers and, consistently with previous studies, PENK, PDYN and NfL levels were altered (Al Shweiki et al., 2021; Niemela et al., 2021; Rodrigues et al., 2016). PENK appeared as the most important protein for the stratification between HD and controls in this study. Also, combinations of biomarkers performed better than individual proteins in discriminating between the various stages of HD (Caron et al., 2022).

## **Brain**

### **Human Brain Tissues**

Neurodegenerative changes in the brains of HD patients occur years before the manifestation of motor symptoms. Only a small number of studies have focused on the proteome of HD human brain samples, possibly due to the difficulty associated with obtaining human samples. These studies used post-mortem brain tissues; therefore, the described changes refer mostly to patients during the terminal stage of HD compared to “healthy” individuals without neurodegenerative disease. Using 2-DE, Sorolla et al. found altered levels of proteins implicated in energy metabolism and antioxidant defence. The striatum was more affected than the cortex. These findings are consistent with the hypothesis of disrupted metabolism and reactive gliosis in HD pathology (Sorolla et al., 2008). A case-control 2-DE study by Schönberger and colleagues described the protein changes in the middle frontal gyrus and visual cortex (Schönberger et al., 2013), and Chen et al. investigated the alterations in substantia nigra using a label-free quantitative analysis. Although there was no overlap with the findings of Sorolla et al., several other proteins implicated in energy metabolism were dysregulated (Chen et al., 2012). More recently, Ratovitski et al. employed quantitative LC-MS/MS in HD superior frontal gyrus and detected, to date, the highest number of protein abundance changes (4,789 proteins) in the examined brains (Ratovitski et al., 2016). Further re-analysis of the dataset utilized by Ratovitski et al. identified changes in extracellular matrix (ECM) caused by HD, such as pronounced alterations in aminoglycan metabolism similarly to Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) (Freitas et al., 2021).

### **Animal Brain Tissues**

#### **Transgenic Mice**

A variety of animal models that express polyQ-expanded HTT have been developed to mimic the progressive neurological phenotype of HD. Due to genomic similarity and ease of manipulation with relatively low costs, utilization of the most common mammalian disease model, the transgenic mouse, represented an important advance in the study of HD. Despite concerns raised about whether a mouse model can faithfully reproduce human pathology, transgenic HD mice provide an invaluable tool to efficiently investigate HD pathogenesis and therapeutic strategies, and are still preferred in drug screenings and preclinical studies. The well-characterised and most widely used HD mouse model system is R6/2, which expresses exon 1 of the human *HTT* gene with a highly expanded CAG repeat region (Mangiarini et al., 1996). Since the R6/2 model lacks the full-length mHTT protein, several transgenic

models, which express the full-length human mHTT (in addition to endogenous mouse Htt), were also developed, namely yeast artificial chromosome (YAC) 128 (Slow et al., 2003) and the bacterial artificial chromosome HD (BACHD) models (Gray et al., 2008). In the R6/2 mice, hallmarks of HD progression appear from a very early age. A loss of brain weight can be observed from the age of 4 weeks, motor functions are impaired from 6 weeks, and the typical phenotype is visible from 8 weeks (Zabel et al., 2009). Pronounced symptoms in the advanced stage are present from 12 weeks, with the disease endpoint at 14–15 weeks. Early changes manifest in the full-length mHTT transgenic mice from the age of 2 months (subtle motor deficit in BACHD mice) (Slow et al., 2003), and 3 months (hyperkinetic phenotype in YAC128 mice) (Gray et al., 2008). The YAC128 mice have a normal lifespan, with a progressive motor deficit that highly correlates with neuronal loss at 6 months; late-onset striatal atrophy is reached by 9 months of age, which is followed by cortical atrophy at 12 months (Slow et al., 2003). Similarly, in the BACHD mice, region-specific brain atrophy also develops by the age of 12 months (Gray et al., 2008).

The brain proteome of the R6/2 mice has been subjected to several proteomics analyses that allowed researchers to identify key players in HD progression. Most studies employed 2-DE followed by MS-based protein identification. In more recent workflows, differential proteins were subjected to independent verification, and pathway analyses were often used to establish biological context. To this end, it was revealed that in the R6/2 model, energy metabolism was upregulated in early to middle HD stages (Perluigi et al., 2005; Zabel et al., 2009, 2010), while ubiquitin-proteasome functions were critical in the terminal stages (Zabel et al., 2009, 2010), which protects cells with aggregates in HD, and also in other neurodegenerative disorders (Zabel et al., 2010). Particular proteins emerging from 2-DE analyses were inspected to recapitulate the process of HD pathogenesis; during early HD,  $\alpha$ -enolase (Eno1) was found in increased abundance in the R6/2 mice (Perluigi et al., 2005). Enolase is essential for glucose metabolic pathways that are vital for cellular functions, including adaptation. Eno1, however, was decreased in YAC128 mice, suggesting that the adaptation is specific to the R6/2 model (Wegrzynowicz et al., 2012). Down-regulation of this ubiquitously expressed enzyme was further demonstrated in YAC128 mice exposed to manganese toxicity, which was investigated as an environmental factor affecting the HD phenotype. NfL was also decreased in the late-onset YAC128 model (Wegrzynowicz et al., 2012).

In late to terminal stages, mitochondrial dihydrolipoamide S-succinyltransferase (Dlst) and aspartate aminotransferase (Got2) appeared to increase in symptomatic R6/2 mice, which was followed by a decrease in pyruvate dehydrogenase (Perluigi et al., 2005). Another study focused on the mitochondrial-enriched proteome of the cortices of R6/2 and YAC128 mice with different progression rates (Agrawal & Fox, 2019). This study revealed decreased levels of peroxiredoxin-3 (Prdx3, hydrogen peroxide scavenging enzyme), and stress-70 protein (Hspa9), as well as an increased level of Parkinson disease protein 7 homolog (Park7, chaperone protein). Decreased levels of Hspa9 have also previously been described in the human PD brain (Shi et al., 2008), and in the AD brain (Park et al., 2014). Park7 mutations, on the other

side, lead to early-onset recessive PD (Shendelman et al., 2004), and an increased abundance of this chaperone was recorded in the advanced HD (Sajjad et al., 2014). Finally, the alpha-crystallin B chain (Cryab) chaperone, which prevents protein aggregation and promotes cell survival, was decreased in mouse models of neurodegeneration, including R6/2 mice (Zabel et al., 2002, 2006).

Large-scale MS-based quantitative proteomic studies were conducted to reveal neuropathological mechanisms of advanced HD using the R6/2 mice (Benraiss et al., 2022; Burgold et al., 2019; Chiang et al., 2007; Hosp et al., 2017; Skotte et al., 2018; Wishart et al., 2012). Early HD stages were also investigated in these mice (Hosp et al., 2017; Liu et al., 2007), and in the full-length mHTT transgenic models, BACHD (Shirasaki et al., 2012) and YAC128 (Wan et al., 2013). Proteome changes were reported in the whole brain extract of mHTT-affected animals (Karayel-Basar et al., 2022), in the striatum (Burgold et al., 2019; Hosp et al., 2017; Liu et al., 2007; Skotte et al., 2018), cortex (Burgold et al., 2019; Hosp et al., 2017; Skotte et al., 2018), hippocampus and midbrain (Skotte et al., 2018), corpus callosum (Benraiss et al., 2022), as well as in striatal nuclear-fractionated samples (Chiang et al., 2007), and synapse-enriched samples (Wishart et al., 2012). Sample purification was particularly beneficial for the study of the HTT interactome (Shirasaki et al., 2012), as well as an in-depth analysis of inclusion bodies (Hosp et al., 2017), and the characterisation of palmitoyl-proteins (Wan et al., 2013). Symptomatic stages of HD were accompanied by compromised glutamine homeostasis (Liu et al., 2007; Skotte et al., 2018). Glial-specific glutamine synthetase (Glul) was reduced in the R6/2 brains (Hosp et al., 2017; Skotte et al., 2018). Isolated brain slices from the striatum and cortex were analysed using *ex vivo* <sup>13</sup>C labelling with substrates that distinguish between the astrocytic and neuronal compartments, with results indicating that limited amounts of glutamine reach the neuronal compartment of the R6/2 mice (Skotte et al., 2018).

A detailed interactome analysis in BACHD mice, complemented by validation in a *Drosophila* model of HD, provided a system-level view of the spreading pathology typically seen in HD (Shirasaki et al., 2012). Another spatiotemporal system-wide study enabled researchers to describe remodelling of the brain proteome and molecular signatures of HD neurodegeneration (Hosp et al., 2017). Inclusion bodies with HTT aggregates were isolated from the R6/2 mice and quantitative MS analysis revealed extensive protein sequestration to the insoluble fraction. R6/2 striata were significantly enriched for aggregation-prone proteins, and proteins with higher molecular weight, including HTT (Hosp et al., 2017).

### Knock-in Mice

In contrast to transgenic models where the fragment of the *mHTT* is inserted at a random site of the mouse genome, in knock-in mice, the *HTT* mutation is inserted at the appropriate locus under the endogenous mouse promoter (*Hdh*) (Menalled, 2005). Knock-in mice represent a genetically more precise paradigm of human HD than transgenic models. Disease progression is slower, but with an earlier

emergence of the HD phenotype. Available knock-in mouse models have polyQs from 50 to 200 (Pouladi et al., 2013). HD knock-in mice Q140 and zQ175 show both behavioural symptoms and molecular alterations, while models with shorter polyQs (e.g., Q80, Q92 and Q111) exhibit only molecular changes (Langfelder et al., 2016; Menalled et al., 2003, 2012). The zQ175 mouse model is the first knock-in model that shows HD symptoms as a heterozygote (Menalled et al., 2012). Comparative proteomic studies in HD knock-in models used LC-MS/MS, except for one study (Deschepper et al., 2012) that used both gel-free and 2-D DIGE approaches to characterise whole brain lysates (Deschepper et al., 2012; Sap et al., 2019), striata (Federspiel et al., 2019; Langfelder et al., 2016), cortical, and striatal synaptosomes (Sapp et al., 2020).

As a polyQ protein, HTT is involved in transcriptional regulation (Gerber et al., 1994). Global reductions in gene expression are documented in HD studies, implicating various processes through transcriptional dysregulation including histone acetylation (Hyeon et al., 2021; Sugars & Rubinsztein, 2003). Interactions of Hdac4, a lysine deacetylase associated with transcriptional repression, were analysed in dissected striata from Q140 mice (Federspiel et al., 2019). Hdac4 interactome, as well as striatal proteome and transcriptome datasets were integrated, revealing an overlap in enriched functional classes, particularly in vesicular trafficking and synaptic functions. In addition, proteins and transcripts were significantly different in the striatal tissue of Q140 mice, compared to Q20 mice, and these changes were concerted in association with Hdac4. Another integrated study used RNA-seq and label-free proteomics in the striatal tissue of knock-in mice of six different CAG lengths, and hundreds of differentially expressed genes were detected both at the mRNA and protein levels. These changes were continuous and dependent on the CAG length (Langfelder et al., 2016).

The brain proteomes and their ubiquitination patterns were analysed in the zQ175 and Q20 HD mice (Sap et al., 2019). In insoluble fractions of HD brains, Sap and colleagues observed a notable increase in vimentin (Vim). Glial fibrillary acidic protein (Gfap) and NfL were increased both in abundance and ubiquitination, but these findings require validation. The role of synaptic protein dysfunction was investigated in the synaptosomes from cortices and striata of heterozygous Q140 mice using LC-MS/MS. The proteome changes were age- and brain region-dependent and the decreased level of three proteins was apparent in HD mice, namely sodium channel subunit 4 (Scn4b), phosphodiesterase 10a (Pde10a) and cannabinoid receptor 1 (Cb1) (Sapp et al., 2020).

### Transgenic Rat

Compared to mice, the larger body size and weight of rats with consequently bigger inner organs allows for easier surgical intervention (e.g., neurosurgery), better resolution of brain imaging techniques, and easier handling in general. Metabolic alterations and hormonal changes have been documented in HD and so far, the only study of hypothalamic proteome and hormone levels was conducted using a transgenic rat

model. The transgenic animals were at different stages of HD progression and the analysis of euglycemic and metabolic hormones in blood plasma revealed a lower concentration of leptin (Lep), amylin (Iapp) and peptide Y (Pyy) in pre-symptomatic HD rats. Proteomic analysis based on LC-MS/MS with iTRAQ labelling measurements of hypothalami from symptomatic animals resulted in the identification of increased phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Pebp1), pyruvate kinase PKM (Pkm2), G1 to S phase transition 2 (Gspt2), and serine/threonine-protein kinase mTOR (Mtor). Gfap, flotillin-2 (Flot2), and prelamin-A/C (Lmna) were decreased in symptomatic animals. Insulin (Ins1/2) was decreased in both pre-symptomatic and symptomatic animals (Cong et al., 2012).

### Transgenic Sheep

Rodent models provided invaluable insights into HTT and mHTT functions, but there is a need for large animal models that would enable translational research. Recently, Mears et al. analysed the transcriptome, proteome (LC-MS/MS with iTRAQ labelling), and metabolome of the brain (cerebellum, hippocampus, motor cortex and striatum) and other tissues (e.g., blood plasma) using a pre-symptomatic transgenic HD sheep model to create a publicly available database containing data from all “omic” analyses. Such a database may be very useful for further studies focused on the interplay between metabolites, proteins, and transcripts in response to mHTT, and for data mining in search for novel candidate biomarkers of HD (Mears et al., 2021).

### *Peripheral Tissues*

Besides neurodegeneration, HD patients and animal models develop non-neurological symptoms, such as weight loss, skeletal muscle wasting, diabetes, and reduced fertility. These defects are directly related to mHTT and associated with disease progression and fatality, thereby, monitoring the peripheral pathological changes is clinically important (van der Burg et al., 2009; Sassone et al., 2009).

Nuclear inclusions of mHTT, the pathological hallmark of HD (DiFiglia et al., 1997), are prominent in muscle, but not in the skin or adipose tissue of R6/2 mice (van der Burg et al., 2009; Sassone et al., 2009). The Multiple Tissue Monitoring in Huntington's Disease study (Neueder et al., 2022) was recently conducted to explore the human peripheral molecular signatures of HD and revealed potential biomarkers. Skeletal muscle, adipose tissue and skin tissues were separated from collected biopsies from HD patients and quantitative proteomics revealed an increasing number of differentially expressed proteins associated with disease advancement. The authors reported two proteins consistently dysregulated in pre-manifest and early manifest HD patients, syntaxin-binding protein 3 (STXBP3) and MOB family member 4 (MOB4) in muscle and skin tissues, respectively. Although none of the

differentially abundant proteins coincided with differences in levels of mRNA, this is the first omics study of peripheral tissues from HD patients and validation of the reported proteins merits further effort.

### ***In Vitro Models***

Comparative proteomics studies focused on human and mouse cells expressing mHTT have provided valuable understanding of affected proteins at a cellular level. Here, we describe the findings that have emerged from these studies through the use of a variety of HD *in vitro* models.

#### **Mouse-Derived Cell Models**

Q7Q7, Q7Q111 and Q111Q111 mouse striatal neuronal cells were analysed for proteasome activity (Dasgupta et al., 2015). Using these models, the authors investigated the levels of endogenous peptides (peptidome) resulting from proteasome cleavage, and reported a significant reduction in almost all peptides detected, when comparing Q7Q111 or Q111Q111 to Q7Q7, further supporting the hypothesis of reduced activity of the proteasome in HD. Nevertheless, missing information on the total level of proteins, whose endogenous peptides were depleted because of reduced proteasome activity, makes proper interpretation challenging.

In striatal neuronal and neuroblast (Neuro2A) cells from homozygous Q111 knock-in mice, decreased huntingtin interacting protein K (Hypk) and Vim, together with increased GTP-binding nuclear protein Ran (Ran) and superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (Sod2) proteins were reported (Choudhury et al., 2016). Differentially abundant proteins, associated mainly with the cytoskeleton, were identified in Neuro2A cells transiently transfected to express HTT<sub>ex1</sub> fused with mCherry (Sui et al., 2020). It was found that mHTT affects proteome solubility by altering the localisation of stress granule proteins and by sequestering proteins involved in protein quality control systems (i.e., chaperones) into mHTT aggregates (Sui et al., 2020).

Chou et al. analysed primary cortical astrocytes derived from R6/2 mice and employed an antibody microarray to determine the abundance of chemokines and cytokines secreted into the culture media (Chou et al., 2008). Chemokine (C-C motif) ligand 5/regulated on activation normal T cell expressed and secreted (Ccl5) was found decreased and its lower secretion was confirmed in cortical and striatal, but not cerebellum-derived astrocytes. Conditioned medium from HD astrocytes resulted in limited neurite outgrowth in primary rat cortical neurons, as well as reduced migration and impaired calcium influx after membrane depolarization. Further analyses revealed that secretion of Ccl5 is suppressed by its intracellular



accumulation in astrocytes, which was confirmed in transgenic R6/2 mice, as well as in knock-in mice and brain tissues (caudate nucleus, frontal cortex and substantia nigra) of HD patients (Chou et al., 2008).

### Human-Derived Cell Models

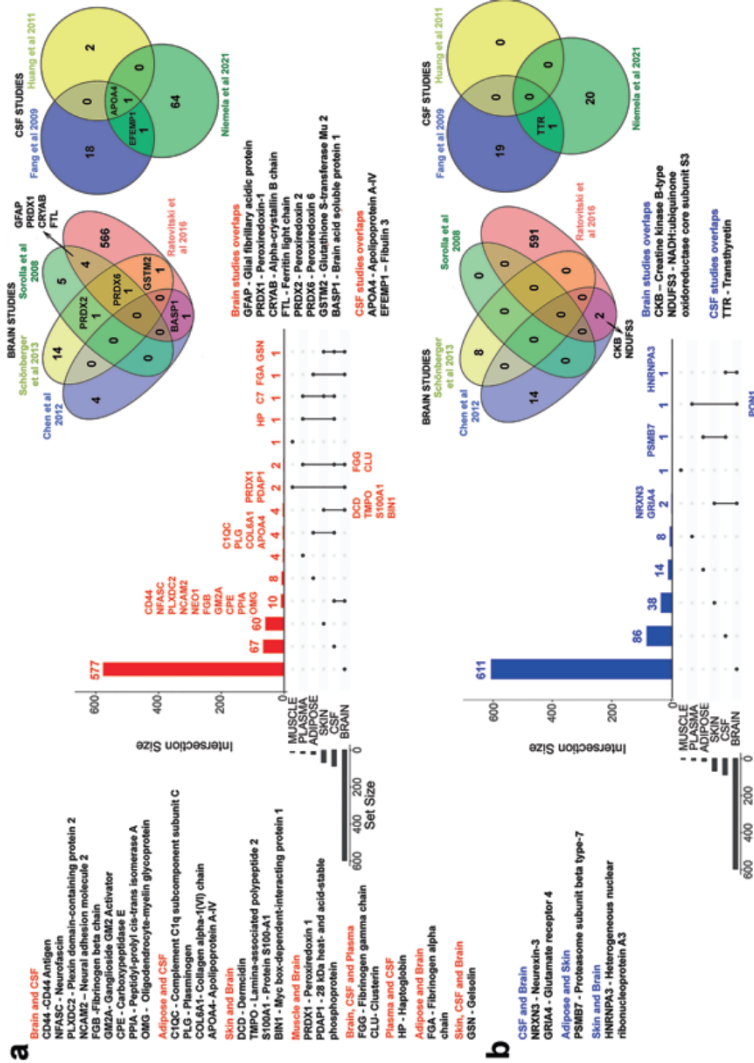
Studies using human-derived *in vitro* HD models utilised induced pluripotent stem cells (iPSCs) from HD patients (Akimov et al., 2021; The HD iPSC Consortium, 2020), and neural cells or neural progenitor differentiated cells derived from human embryonic stem cells (hESCs) (McQuade et al., 2014; Ooi et al., 2019). Both ESCs and iPSCs can differentiate and mimic a HD phenotype. These studies revealed dysregulated proteins associated with bioenergetic deficits (Akimov et al., 2021; The HD iPSC Consortium, 2020; McQuade et al., 2014; Ooi et al., 2019), alterations in endocytosis, GABA and glutamate signalling, sphingomyelin metabolism and ethanol degradation, cell-to-cell signalling and interaction (Akimov et al., 2021).

Analysis of striatal neural cells differentiated from patients-derived iPSCs and inspected by LC-MS/MS with iTRAQ labelling revealed downregulated glycolysis and upregulated oxidative phosphorylation (McQuade et al., 2014). Moreover, supplementation of cells with late-stage glycolytic metabolites (e.g., pyruvate) restored the normal level of ATP and increased cell viability. These findings indicate that these metabolites might be beneficial for HD therapy (The HD iPSC Consortium, 2020).

Recently, Ooi et al. created an allelic panel of isogenic HD (IsoHD) ESCs with 30, 45, 65 and 81 CAG repeats from human H9 ESCs. The IsoHD ESCs were able to differentiate into neural progenitor cells (NPCs) and neurons. Analysis of HD NPCs recapitulated known HD phenotypes that were more associated with CAG repeat length than cell type. Comparison of proteomes by LC-MS/MS with TMT labelling showed much higher variability at the level of NPCs compared to ESCs, and only a minor overlap of proteins changed in both cell types. A combination of data from RNA-seq and proteomic analyses confirmed the repeatedly discussed limited correlation of mRNA and protein levels, thus supporting the employment of both techniques for complex HD studies (Ooi et al., 2019).

## 4 Analysis of Overlaps in Identified Dysregulated Proteins Between Multiple Independent Studies

Attempting to summarise a complete picture drawn from the HD proteome studies of patient samples and experimental animal and cell models, we examined their overlap (Fig. 3, Supplementary File 2). In this part, we will discuss promising proteins extracted from proteomics studies based on their consistent detection across multiple independent studies. While not yet verified using an independent method, such proteins certainly deserve attention in future targeted measurements.



**Fig. 3** Graphical summaries of the overlaps from all significantly dysregulated proteins reported in mass spectrometry (MS) studies analysing the global proteome in samples from Huntington’s disease patients. The accepted significance was  $p < 0.05$  for gel-based and  $p$  adjusted  $< 0.05$  for gel-free studies. Upregulated proteins are shown in (a) and downregulated in (b). The UpSet graphs plot the convergence of gene products across tissues. The Venn diagrams show the differentially abundant proteins and their overlaps per study for brain tissue and cerebrospinal fluid (CSF). Note the increase in number of significantly altered proteins reported by more recent studies using tandem MS such as Rátovitski et al. (2016) or Niemela et al. (2021). The shared proteins are indicated as gene names at each intersection and their full names are explained on the left side for Upset plots and the right side for Venn diagrams

### ***Tissues Overlaps***

Global proteomes from different parts of post-mortem brains of HD patients were analysed by four studies, indicating 10 proteins dysregulated in the cortex, striatum or substantia nigra. These proteins are listed on Fig. 3a, b (brain studies overlaps), namely GFAP, peroxiredoxins 1, 2 and 6 (PRDX1, PRDX2, PRDX6), CRYAB, ferritin light polypeptide (FTL), glutathione S-transferase Mu-2 (GSTM2), brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1), creatine kinase (CKB) and NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (NDUFS3). Differences in the output datasets can be attributed to biological variability and different efficacy of the proteomic MS platform (gel-based vs gel-free).

Brain increases of GFAP were reported in the striatum and cortex from HD patient samples (Ratovitski et al., 2016; Sorolla et al., 2008), and HD mouse models (Sap et al., 2019; Zabel et al., 2009). GFAP is a neuroinflammatory marker of astroglia activation and gliosis related to HD progression and striatal degeneration (Vonsattel et al., 1985). An increase in blood GFAP was correlated with blood NFL levels, disease burden and functional and motor impairment in a cohort of HD mutation carriers, suggesting GFAP as a potential biomarker for evaluating HD progression (You et al., 2021).

Other proteins with a neuroprotective role were increased in HD patients in the striatum (Sorolla et al., 2008) and cortex (Ratovitski et al., 2016) compared to controls, in contrast to proteomic findings from HD animal models. One example is CRYAB, one of the small heat shock proteins, expressed in various neuronal cell types, especially in astrocytes (Zhu & Reiser, 2018). CRYAB attenuates mitochondrial dysfunctions and oxidative stress, reduces the accumulation of misfolded proteins, prevents neuroinflammation and apoptosis (Zhu & Reiser, 2018) and, in BACHD mice, astrocytic overexpression of *Cryab* alleviated the motor impairment *in vivo* (Oliveira et al., 2016). However, in transgenic (Skotte et al., 2018; Zabel et al., 2006, 2009) and knock-in (Sap et al., 2019) models of HD, the gene product of *Cryab* was decreased compared to control mice. Similarly, BASP1 was upregulated in the human striatum (Sorolla et al., 2008) and cortex (Ratovitski et al., 2016), but downregulated in the brains of R6/2 mice (Burgold et al., 2019). BASP1 is a cytoskeleton-related, calmodulin-binding protein with expression induced following nerve regeneration during development or injury. During neuroinflammation, increased levels of cytokines and neurotrophins activate phosphorylation and increase in BASP1 levels which promotes synaptogenesis and neurite outgrowth (Chung et al., 2020). BASP1 interacts with HTT but its role in HD has not been explored (Kaltenbach et al., 2007).

In most proteomic studies, oxidative stress was the major dysregulated pathway, and proteins related to antioxidant defence, redox regulation, and mitochondrial function were commonly altered across samples from HD patients, as well as *in vivo* and *in vitro* HD models. Mammalian cells express six isoforms of peroxiredoxins (Rhee et al., 2005) and in the brain, different peroxiredoxins are cell-specific (Szeliga, 2020). PRDX1, PRDX2 and PRDX6 have been reported as increased in at

least two brain studies of HD patients (Ratovitski et al., 2016; Schönberger et al., 2013; Sorolla et al., 2008). Sorolla and colleagues verified the upregulation of PRDX1, PRDX2 and PRDX6, but not of 3, 4 and 5 in the human HD striatum (Sorolla et al., 2008). In addition, PRDX1 was increased in iPSC lines from HD patients compared to control iPSCs and ESCs (Chae et al., 2012). Dysregulated levels of peroxiredoxins were evident in knock-in (Langfelder et al., 2016) and transgenic (Agrawal & Fox, 2019; Skotte et al., 2018; Zabel et al., 2009) mouse models. Another enzyme implicated in antioxidant defence, a cytosolic isoform of glutathione transferase, GSTM2 was increased in the cortex in two studies (Ratovitski et al., 2016; Schönberger et al., 2013). NDUFS3 was downregulated in substantia nigra (Chen et al., 2012) and motor cortex (Ratovitski et al., 2016) in HD patients and mouse models (Federspiel et al., 2019; Zabel et al., 2009).

CKB was downregulated in human HD brains (Chen et al., 2012; Ratovitski et al., 2016), consistent with alterations shown by proteomic findings in R6/2 (Skotte et al., 2018; Zabel et al., 2009) and knock-in mice (Deschepper et al., 2012; Langfelder et al., 2016). Substantial evidence exists that suppression of CKB occurs in the presence of mHTT (Ju et al., 2012), and reduced brain and plasma levels were found in R6/2 mice and HD patients using Western blot and immunohistochemistry (Kim et al., 2010). Clinical trials of creatine supplementation showed that daily administration of creatine significantly reduced oxidative DNA damage in early HD patients (Hersch et al., 2006). It slowed brain atrophy and was well tolerated by pre-manifest HD patients (Rosas et al., 2014), but high-dose creatine failed to slow the functional decline in early manifest HD participants (Hersch et al., 2017).

An increase in FTL was shown in two studies in post-mortem HD brains (Ratovitski et al., 2016; Sorolla et al., 2008) and striatum and midbrain from the R6/2 transgenic mouse (Skotte et al., 2018). FTL is one of the two subunits of ferritin implicated in the intracellular storage and detoxification of iron (Harrison & Arosio, 1996). Alteration of FTL levels is consistent with the role of HTT in iron homeostasis (Hilditch-Maguire et al., 2000), and the dysregulation of metal ions deposition due to the presence of mHTT (Bartzokis et al., 1999; Muller & Leavitt, 2014).

Of note, a number of protein changes consistently reported across tissues in human patients were altered in opposite directions in animal and cell models of HD. For example, CLU was increased in HD patients (Dalrymple et al., 2007; Niemela et al., 2021) but several studies in HD mice models found decreased levels (Burgold et al., 2019; Langfelder et al., 2016; Skotte et al., 2018). Carboxypeptidase E (CPE), neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2) and neurofascin (NFASC) were upregulated in HD patient brains (Niemela et al., 2021), but downregulated in iPSCs derived from HD patients (The HD iPSC Consortium, 2020), or in transgenic mice (Burgold et al., 2019) and rats (Cong et al., 2012).

### ***Cerebrospinal Fluid Overlaps***

Present in such proximity to the brain and sharing a fraction of its excreted proteins, CSF offers the opportunity to discover HD-specific biomarkers. Two precursors of endogenous opioids, PENK and PDYN stand out as two of the most promising HD-specific biomarkers identified in CSF (Supp. Table 1).

Brain and CSF had the highest convergence in our overlap analysis. Among the CNS-related protein changes, CD44, NFASC, NCAM2, oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMGP), or ganglioside GM2 activator (GM2A) were upregulated in the human CSF and brains (Fig. 3a). GM2A is a lipid transport protein with overexpression linked to the impairment of neurite integrity and reduction in the mean firing rate of human neurons *in vitro* (Hsieh et al., 2022). The upregulation of GM2A was also found in the striatum of symptomatic R6/2 mice (Skotte et al., 2018). Other CNS proteins related to synaptic organisation were downregulated in the brain and CSF (Fig. 3b), namely glutamate receptor 4 (GRIA4) and neurexin 3 (NRXN3). NRXN3 was also downregulated in knock-in mice (Sap et al., 2019). Increased levels of immune-related proteins HP, CLU, and fibrinogen gamma chain (FGG) coincided in plasma and CSF.

CSF candidate protein overlaps across studies included APOA4, Fibulin-3 and T<sub>4</sub>-binding protein (TTR) (Fig. 3a, b). Since APOA4 levels are controlled by leptin in the hypothalamus to allow inhibition of food intake, regulation of body weight, cholesterol transport and energy homeostasis (Shen et al., 2007, 2008; Tso et al., 2001), this protein marker could be correlated to the weight loss seen in HD patients. Fibulin-3 was upregulated in CSF in HD patients (Fang et al., 2009; Niemela et al., 2021), and we propose this glycoprotein, which has been implicated in ECM remodelling tissue regeneration and organogenesis (Timpl et al., 2003), as a target for validation studies. Physiologically, fibulin-3 has very low expression levels in rodent brains (Kobayashi et al., 2007), and its upregulation has been reported in gliomas (Hu et al., 2009), but its relationship with HD has not been studied so far. Although CSF levels of TTR were found unaltered between disease stages in the PRM study of Caron et al., TTR did show an association with predicted years to disease onset in premanifest HD mutation carriers (Caron et al., 2022). Also, Cong et al. reported significantly decreased levels of TTR in transgenic rat hypothalamus (Cong et al., 2012). Hypothalamic neurodegenerative changes are well documented in post-mortem human brains (Kremer et al., 1990) and neuroendocrine abnormalities occur in HD patients.

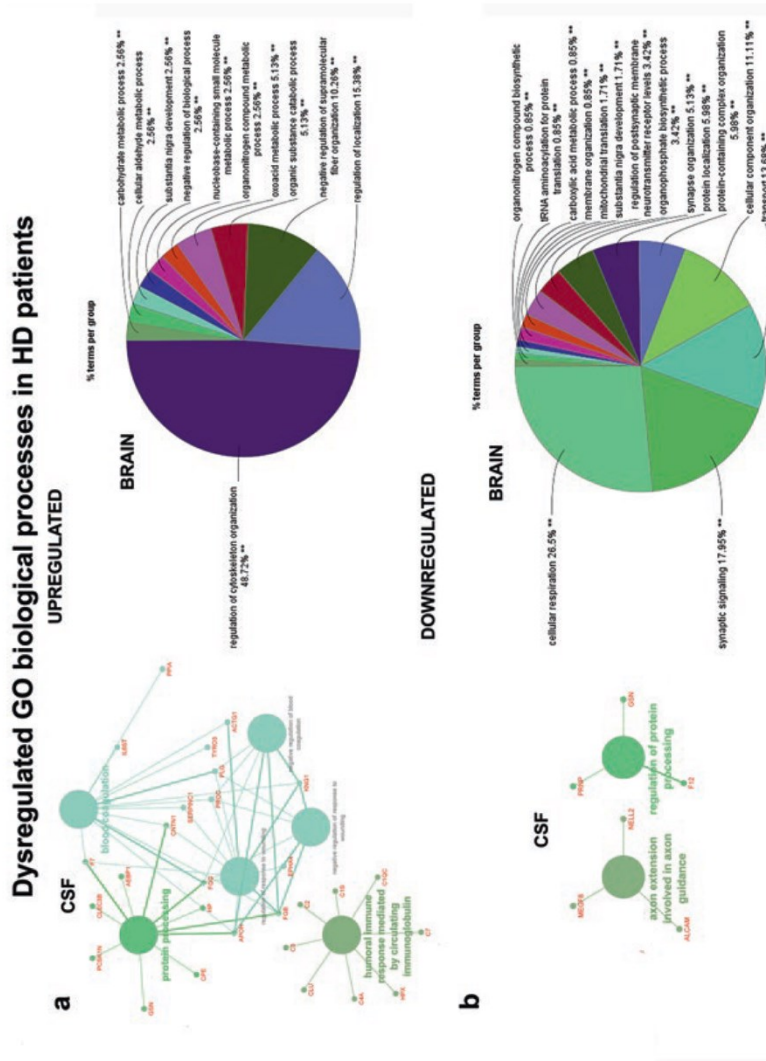
### ***Functional Analysis***

Inflammation and immune hyperactivity were among the most prominent upregulated biological processes in CSF and plasma in HD patients (Dalrymple et al., 2007; Fang et al., 2009; Huang et al., 2011; Niemela et al., 2021) and the R6/2

mouse model (Hosp et al., 2017). We completed a functional analysis of the dys-regulated proteins previously reported in studies of HD patients, and further validated that immune response-related pathways were the most significantly enriched in CSF (Fig. 4a). Although some of the reported immune-related proteins were not verified (Vinther-Jensen et al., 2014, 2016), an early inflammatory response is among the first changes in HD animal models and patients (Jia et al., 2022; Valekova et al., 2016). Microglia expressing mHTT exhibit a pro-inflammatory transcriptional activation and enhanced reactivity (Crotti et al., 2014), and early changes in cytokines IL6 and tumour necrosis factor  $\alpha$  appear in pre-symptomatic and early-stage HD patients (Björkqvist et al., 2008). Other biological processes included mitochondrial dysfunction and cellular respiration, synaptic regulation, and cytoskeletal changes (Fig. 4).

## 5 Overview of Proteomics Findings and Limitations

HD is a hereditary monogenic disorder, which can be confirmed by a simple genetic test. However, there is an urgent need for biomarkers of HD progression in CNS and other tissues, as well as for an assessment of the effectiveness of possible HD therapies. Omics technologies have contributed to numerous studies proposing thousands of candidate biomarkers. In this review, we described all differential proteins that were identified and verified in proteome studies focused on HD pathology (Supp. Table 1). Several verified proteins were identified in parallel proteomics studies, such as GFAP, Glul, Ca2, and Vim. To ensure that relevant non-verified markers were not omitted, we additionally extracted the proteins that appeared differentially abundant in more than one HD proteome study focused on the human brain and biofluids (Fig. 3). These overlapping proteins also include verified proteins, such as PENK, APOA4, CRYAB, PRDX1, PRDX2, PRDX6, CKB, NRXN3, HP, and CLU. Animal models allow us to delve into the molecular profile of asymptomatic HD stages that would not be possible by studies of post-mortem human brains. A few studies compared the proteomic profiling of brains from transgenic (Burgold et al., 2019; Hosp et al., 2017; Perluigi et al., 2005; Zabel et al., 2009) or knock-in (Deschepper et al., 2012; Federspiel et al., 2019) mice in different ages and showed that widespread molecular changes occur mostly at later stages in the brain of diseased animals. Additional candidates for early HD biomarkers coming from both human iPSCs (Akimov et al., 2021; The HD iPSC Consortium, 2020), or ESCs (McQuade et al., 2014; Ooi et al., 2019), and post-mortem HD brains (Ratovitski et al., 2016) included upregulated proteins implicated in bioenergetic dysfunction (e.g., cytosol aminopeptidase, LAP3; mitochondrial aldehyde dehydrogenase, ALDH2) and downregulated proteins implicated in synapse organisation (e.g., cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1, DYNC1L1; Liprin-alpha-3, PPFIA3). Finally, all datasets explored in this review showed a substantial similarity



**Fig. 4** Results of functional analysis from all significantly dysregulated proteins that were reported in studies analysing the global proteome in cerebrospinal fluid (CSF) and post-mortem brain from Huntington's disease patients. Gene ontology (GO) Biological processes enriched pathways are shown as a network for CSF, and a pie chart for the brain for (a) upregulated proteins and (b) downregulated proteins. Only non-redundant significant pathways are shown (false discovery rate < 0.001)

at the level of impacted pathways, confirming that dysregulated proteins are implicated in well-documented processes of HD neurodegeneration.

Most of the HD proteomics studies focused on the elucidation of HTT and mHTT (patho)physiological roles, rather than on biomarker discovery. Although many changes in protein abundances were described in various tissues of HD patients and models, and some of them were verified by other methods and/or in independent samples, no clinically applied HD biomarker currently exists. There are several obstacles which may affect the reproducibility, translatability and applicability of these biomarkers when it comes to the clinical testing of HD patients. The most limiting factor for reproducible measurements is biological variability (inter-individual and intra-individual), and model-associated factors (e.g., the length of CAG repeats and disease stage, biology related to species, genetic background, gender, comorbidity, etc.). This applies to all biological experiments, and the translation of results from proteomics studies is further limited by differences in: (i) sample preparation (e.g., homogenisation, protein extraction, or pre-fractionation); (ii) LC-MS/MS settings (e.g., protein/peptide separation, ionisation/fragmentation); and (iii) data analysis workflows.

Another limitation discussed above is the current sensitivity of MS methods for small or extremely low abundant proteins, particularly in complex samples (blood plasma, CSF, etc.) (Anderson & Anderson, 2002). Emerging ultrasensitive antibody-based techniques, e.g., Single-molecule array (Rissin et al., 2010) and Single-molecule counting assays (Wu et al., 2006), exceed the sensitivity of MS-based methods, and were successfully used for assessment of candidate biomarkers in HD patients – mHTT in CSF (Wild et al., 2015), blood plasma and saliva (Parkin et al., 2023), GFAP in blood plasma (You et al., 2021), and NFL in CSF (Al Shweiki et al., 2021) and blood plasma (Byrne et al., 2022; Byrne et al., 2017). These antibody-based assays should be combined with targeted MS measurements in validation studies using a large cohort of HD samples to assess the possible benefits of the candidate biomarkers for the prediction of HD onset and progression, and for therapy monitoring.

## 6 Conclusion and Future Directions

In this review, we reported HD biomarker candidates verified by independent methods and/or independent studies. Well-known markers such as NFL and mHTT (Byrne et al., 2017; Rodrigues et al., 2020) were confirmed by proteomics studies and novel candidates were also proposed. Validation in large-scale trials is anticipated for HD-specific candidate biomarkers (e.g., PENK or PDYN), CNS-specific proteins presumably associated with neurodegeneration (e.g., GFAP), but also for proteins with limited specificity to neurodegeneration (e.g., proteins associated with homeostasis, immune response or metabolism).



Numerous studies have already contributed to deciphering HD pathology and identifying candidate biomarkers; however, there remains a significant aspect of HD models that have not been analysed by proteomics methods. For instance, iPSC-derived 3D *in vitro* models with cerebral architecture and greater physiological relevance will also require detailed analysis. On the other hand, large animal models (e.g., non-human primate rhesus macaque or minipig HD models), have so far been poorly characterised at a system-wide proteome level. These models share similarities with the human in anatomy (especially body and organ size and weight), physiology (e.g., longer life), or slow HD progression. Such models are more suitable for translational research of HD development and progression, as well as for pre-clinical testing of potential therapy.

In light of the rapid development of separation techniques, MS instruments, sample preparation (and its automatization), and data analyses, we believe that MS-based proteomics with the DIA approach will be the method of choice in the near future. Single-cell MS will deliver unique data in (patho)physiology (Tajik et al., 2022). Comprehensive analyses of PTMs and proteoforms will provide novel insights into the regulation of fundamental biological processes, identifying new targets for disease therapies (Smith & Kelleher, 2018) during ultrafast analyses (up to 5 minutes) with unprecedented high proteome coverage and throughput (Messner et al., 2021). Moreover, the recently announced combination of RNA-seq and MS proteomics at a single-cell level will enable researchers to perform highly complex systems biology studies (Fulcher et al., 2022). However, not all proteins will be accessible by MS (inability to ionisation, very low abundance etc.), and the development of novel approaches that would allow analysis of a single copy of a protein, deciphering its sequence and PTMs is at the forefront of interest, with some candidates already on the horizon (Timp & Timp, 2020).

**Acknowledgments** This work was supported by the Czech Science Foundation project 22-24983S and by the Operational Programme Research, Development and Education (reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000785).

## References

- Aebersold, R., & Mann, M. (2016). Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature. Nature Publishing Group*, 537(7620), 347–355.
- Aebersold, R., Burlingame, A. L., & Bradshaw, R. A. (2013). Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(9), 2381–2382.
- Agrawal, S., & Fox, J. H. (2019). Novel proteomic changes in brain mitochondria provide insights into mitochondrial dysfunction in mouse models of Huntington's disease. *Mitochondrion*, 47, 318–329.
- Akimov, S. S., Jiang, M., Kedaigle, A. J., Arbez, N., Marque, L. O., Eddings, C. R., et al. (2021). Immortalized striatal precursor neurons from Huntington's disease patient-derived iPSC cells as a platform for target identification and screening for experimental therapeutics. *Human Molecular Genetics*, 30(24), 2469–2487.

- Al Shweiki, M. R., Oeckl, P., Pachollek, A., Steinacker, P., Barschke, P., Halbgebauer, S., et al. (2021). Cerebrospinal fluid levels of Prodynorphin-derived peptides are decreased in Huntington's disease. *Movement Disorders*, *36*(2), 492–497.
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, *1*(11), 845–867.
- Andre, R., Carty, L., & Tabrizi, S. J. (2016). Disruption of immune cell function by mutant huntingtin in Huntington's disease pathogenesis. *Current Opinion in Pharmacology*, *26*, 33–38.
- Aylward, E. H., Nopoulos, P. C., Ross, C. A., Langbehn, D. R., Pierson, R. K., Mills, J. A., et al. (2011). Longitudinal change in regional brain volumes in prodromal Huntington disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *82*(4), 405–410.
- Bachoud-Lévi, A.-C., Ferreira, J., Massart, R., Youssov, K., Rosser, A., Busse, M., et al. (2019). International guidelines for the treatment of Huntington's disease. *Frontiers in Neurology* [Internet]. [cited 2023 Feb 2], *10*. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00710>
- Barschke, P., Abu-Rumeileh, S., Al Shweiki, M. H. D. R., Barba, L., Paolini Paoletti, F., Oeckl, P., et al. (2022). Cerebrospinal fluid levels of proenkephalin and prodynorphin are differentially altered in Huntington's and Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *269*(9), 5136–5143.
- Bartzokis, G., Cummings, J., Perlman, S., Hance, D. B., & Mintz, J. (1999). Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Archives of Neurology*, *56*(5), 569–574.
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., et al. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, *1*, 15005.
- Bennett, E. J., Shaler, T. A., Woodman, B., Ryu, K.-Y., Zaitseva, T. S., Becker, C. H., et al. (2007). Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature. Nature Publishing Group*, *448*(7154), 704–708.
- Benraiss, A., Mariani, J. N., Tate, A., Madsen, P. M., Clark, K. M., Welle, K. A., et al. (2022). A TCF7L2-responsive suppression of both homeostatic and compensatory remyelination in Huntington disease mice. *Cell Reports*, *40*(9), 111291.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *69*(3), 89–95.
- Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., et al. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(8), 1869–1877.
- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics. Nature Publishing Group*, *21*(10), 630–644.
- Burgold, J., Schulz-Trieglaff, E. K., Voelkl, K., Gutiérrez-Ángel, S., Bader, J. M., Hosp, F., et al. (2019). Cortical circuit alterations precede motor impairments in Huntington's disease mice. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, *9*(1), 6634.
- Byrne, L. M., & Wild, E. J. (2016). Cerebrospinal fluid biomarkers for Huntington's disease. *Journal of Huntington's Disease. IOS Press*, *5*(1), 1–13.
- Byrne, L. M., Rodrigues, F. B., Blennow, K., Durr, A., Leavitt, B. R., Roos, R. A. C., et al. (2017). Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurology*, *16*(8), 601–609.
- Byrne, L. M., Rodrigues, F. B., Johnson, E. B., Wijeratne, P. A., Vita, E. D., Alexander, D. C., et al. (2018). Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease. *Science Translational Medicine* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; [cited 2021 Mar 9], *10*(458). Available from: <https://stm.sciencemag.org/content/10/458/eaat7108>
- Byrne, L. M., Schultz, J. L., Rodrigues, F. B., van der Plas, E., Langbehn, D., Nopoulos, P. C., et al. (2022). Neurofilament light protein as a potential blood biomarker for Huntington's disease in children. *Movement Disorders*, *37*(7), 1526–1531.
- Caron, N. S., Haqqani, A. S., Sandhu, A., Aly, A. E., Findlay Black, H., Bone, J. N., et al. (2022). Cerebrospinal fluid biomarkers for assessing Huntington disease onset and severity. *Brain Communications*, *4*(6), fcac309.

- Carroll, J. B., Bates, G. P., Steffan, J., Saft, C., & Tabrizi, S. J. (2015). Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurology*, *14*(11), 1135–1142.
- Chae, J.-I., Kim, D.-W., Lee, N., Jeon, Y.-J., Jeon, I., Kwon, J., et al. (2012). Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. *The Biochemical Journal*, *446*(3), 359–371.
- Chen, S., Lu, F. F., Seeman, P., & Liu, F. (2012). Quantitative proteomic analysis of human substantia nigra in Alzheimer's disease, Huntington's disease and multiple sclerosis. *Neurochemical Research*, *37*(12), 2805–2813.
- Chiang, M.-C., Juo, C.-G., Chang, H.-H., Chen, H.-M., Yi, E. C., & Chern, Y. (2007). Systematic uncovering of multiple pathways underlying the pathology of Huntington disease by an acid-cleavable isotope-coded affinity tag approach. *Molecular & Cellular Proteomics*, *United States*, *6*(5), 781–797.
- Chou, S.-Y., Weng, J.-Y., Lai, H.-L., Liao, H., Sun, S. H., Tu, P.-H., et al. (2008). Expanded-polyglutamine huntingtin protein suppresses the secretion and production of a chemokine (CCL5/RANTES) by astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, *28*(13), 3277–3290.
- Choudhury, K. R., Das, S., & Bhattacharyya, N. P. (2016). Differential proteomic and genomic profiling of mouse striatal cell model of Huntington's disease and control; probable implications to the disease biology. *Journal of Proteomics*, *132*, 155–166.
- Chung, D., Shum, A., & Caravco, G. (2020). GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cell and Development Biology*, *8*, 567537.
- Cong, W., Cai, H., Wang, R., Daimon, C. M., Maudsley, S., Raber, K., et al. (2012). Altered hypothalamic protein expression in a rat model of Huntington's disease. *PLOS ONE. Public Library of Science*, *7*(10), e47240.
- Corvol, J.-C., Muriel, M.-P., Valjent, E., Féger, J., Hanoun, N., Girault, J.-A., et al. (2004). Persistent increase in olfactory type G-protein  $\alpha$  subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *Journal of Neuroscience. Soc Neurosci*, *24*(31), 7007–7014.
- Crotti, A., Benner, C., Kerman, B., Gosselin, D., Lagier-Tourenne, C., Zuccato, C., et al. (2014). Mutant huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nature Neuroscience*, *17*(4), 513–521.
- Dalrymple, A., Wild, E. J., Joubert, R., Sathasivam, K., Björkqvist, M., Petersén, A., et al. (2007). Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *Journal of Proteome Research. United States*, *6*(7), 2833–2840.
- Dasgupta, S., Fishman, M. A., Mahallati, H., Castro, L. M., Tashima, A. K., Ferro, E. S., et al. (2015). Reduced levels of proteasome products in a mouse striatal cell model of Huntington's disease. *PLOS ONE. Public Library of Science*, *10*(12), e0145333.
- Deschepper, M., Hoogendoorn, B., Brooks, S., Dunnett, S. B., & Jones, L. (2012). Proteomic changes in the brains of Huntington's disease mouse models reflect pathology and implicate mitochondrial changes. *Brain Research Bulletin. United States*, *88*(2–3), 210–222.
- Dickey, A. S., & La Spada, A. R. (2018). Therapy development in Huntington disease: from current strategies to emerging opportunities. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *176*(4), 842–861.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., et al. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, *277*(5334), 1990–1993.
- El-Daher, M.-T., Hagen, E., Bruyère, J., Poizat, G., Al-Ramahi, I., Pardo, R., et al. (2015). Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin I dysregulation. *The EMBO Journal*, *34*(17), 2255–2271.
- Istevez-Fraga, C., Tabrizi, S. J., & Wild, E. J. (2022). Huntington's disease clinical trials corner: November 2022. *Journal of Huntingtons Disease*, *11*(4), 351–367.

- Fang, Q., Strand, A., Law, W., Faca, V. M., Fitzgibbon, M. P., Hamel, N., et al. (2009). Brain-specific proteins decline in the cerebrospinal fluid of humans with Huntington disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(3), 451–466.
- Federspiel, J. D., Greco, T. M., Lum, K. K., & Cristea, I. M. (2019). Hdac4 interactions in Huntington's disease viewed through the prism of multiomics\*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(8, Supplement 1), S92–S113.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Beal, M. F., Martin, J. B., Bird, E. D., & Richardson, E. P., Jr. (1987). Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 46(1), 12–27.
- Freitas, A., Aroso, M., Rocha, S., Ferreira, R., Vitorino, R., & Gomez-Lazaro, M. (2021). Bioinformatic analysis of the human brain extracellular matrix proteome in neurodegenerative disorders. *The European Journal of Neuroscience*, 53(12), 4016–4033.
- Frohner, I. E., Mudrak, I., Schüchner, S., Anrather, D., Hartl, M., Sontag, J.-M., et al. (2020). PP2AC phospho-Tyr307 antibodies are not specific for this modification but are sensitive to other PP2AC modifications including Leu309 methylation. *Cell Reports*, 30(9), 3171–3182.e6.
- Fulcher, J. M., Markillie, L. M., Mitchell, H. D., Williams, S. M., Engbrecht, K. M., Moore, R. J., et al. (2022). Parallel measurement of transcriptomes and proteomes from same single cells using nanodroplet splitting [Internet]. *bioRxiv* [cited 2023 Mar 8], 2022.05.17.492137. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.05.17.492137v1>
- Fusilli, C., Migliore, S., Mazza, T., Consoli, F., De Luca, A., Barbagallo, G., et al. (2018). Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington's disease: a retrospective analysis. *Lancet Neurology*, 17(11), 986–993.
- Gadalla, R., Noamani, B., MacLeod, B. L., Dickson, R. J., Guo, M., Xu, W., et al. (2019). Validation of CyTOF against flow cytometry for immunological studies and monitoring of human cancer clinical trials. *Frontiers in Oncology* [Internet]. [cited 2023 Mar 8], 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00415>
- García-Huerta, P., Troncoso-Escudero, P., Wu, D., Thiruvalluvan, A., Cisternas-Olmedo, M., Henríquez, D. R., et al. (2020). Insulin-like growth factor 2 (IGF2) protects against Huntington's disease through the extracellular disposal of protein aggregates. *Acta Neuropathologica*, 140(5), 737–764.
- Gerber, H.-P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M., Hug, M., Rusconi, S., et al. (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science. American Association for the Advancement of Science*, 263(5148), 808–811.
- Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., & Gygi, S. P. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 6940–6945.
- Gil, J. M., & Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2803–2820.
- Graveland, G. A., Williams, R. S., & DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science. American Association for the Advancement of Science*, 227(4688), 770–773.
- Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., André, V. M., Wilburn, B., Lu, X.-H., et al. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *The Journal of Neuroscience*, 28(24), 6182–6195.
- Guo, Q., Huang, B., Cheng, J., Seefelder, M., Engler, T., Pfeifer, G., et al. (2018). The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature*, 555(7694), 117–120.
- Haag, A. M. (2016). Mass analyzers and mass spectrometers. In: H. Mirzaei, M. Carrasco (Eds.), *Modern proteomics – Sample preparation, analysis and practical applications* [Internet]. Springer International Publishing; cited 2023 Feb 18]. p. 157–69. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7)

- Hafko, R., Villapol, S., Nostramo, R., Symes, A., Sabban, E. L., Inagami, T., et al. (2013). Commercially available angiotensin II At2 receptor antibodies are nonspecific. *PLoS ONE. Public Library of Science*, 8(7), e69234.
- Halliday, G. M., McRitchie, D. A., Macdonald, V., Double, K. L., Trent, R. J., & McCusker, E. (1998). Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 154(2), 663–672.
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1275(3), 161–203.
- Heemskerk, A.-W., & Roos, R. A. C. (2012). Aspiration pneumonia and death in Huntington's disease. *PLoS Current*, 4, RRN1293.
- Hersch, S. M., Gevorkian, S., Marder, K., Moskowitz, C., Feigin, A., Cox, M., et al. (2006). Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. *Neurology. Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology*, 66(2), 250–252.
- Hersch, S. M., Schifitto, G., Oakes, D., Bredlau, A.-L., Meyers, C. M., Nahin, R., et al. (2017). The CREST-E study of creatine for Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology*, 89(6), 594–601.
- Hilditch-Maguire, P., Trettel, F., Passani, L. A., Auerbach, A., Persichetti, F., & MacDonald, M. E. (2000). Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Human Molecular Genetics*, 9(19), 2789–2797.
- Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., et al. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human Molecular Genetics*, 15(6), 965–977.
- Hosp, F., Gutiérrez-Ángel, S., Schaefer, M. H., Cox, J., Meissner, F., Hipp, M. S., et al. (2017). Spatiotemporal proteomic profiling of Huntington's disease inclusions reveals widespread loss of protein function. *Cell Reports*, 21(8), 2291–2303.
- Hsieh, Y.-C., Negri, J., He, A., Pearce, R. V., Liu, L., Duong, D. M., et al. (2022). Elevated ganglioside GM2 activator (GM2A) in human brain tissue reduces neurite integrity and spontaneous neuronal activity. *Molecular Neurodegeneration*, 17, 61.
- Hsu, J.-L., Huang, S.-Y., Chow, N.-H., & Chen, S.-H. (2003). Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Analytical Chemistry. American Chemical Society*, 75(24), 6843–6852.
- Hu, B., Thirumara-Rajamani, K. K., Sim, H., & Viapiano, M. S. (2009 Nov). FIBULIN-3 is uniquely upregulated in malignant gliomas and promotes tumor cell motility and invasion. *Molecular Cancer Research*, 7(11), 1756–1770.
- Huang, Y.-C., Wu, Y.-R., Tseng, M.-Y., Chen, Y.-C., Hsieh, S.-Y., & Chen, C.-M. (2011). Increased prothrombin, apolipoprotein A-IV, and Haptoglobin in the cerebrospinal fluid of patients with Huntington's disease. *PLoS ONE. Public Library of Science*, 6(1), e15809.
- Hyeon, J. W., Kim, A. H., & Yano, H. (2021). Epigenetic regulation in Huntington's disease. *Neurochemistry International*, 148, 105074.
- Jia, Q., Li, S., Li, X.-J., & Yin, P. (2022). Neuroinflammation in Huntington's disease: from animal models to clinical therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 13, 1088124.
- Ju, T.-C., Lin, Y.-S., & Chern, Y. (2012). Energy dysfunction in Huntington's disease: insights from PGC-1 $\alpha$ , AMPK, and CKB. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(24), 4107–4120.
- Kaltenbach, L. S., Romero, E., Becklin, R. R., Chettier, R., Bell, R., Phansalkar, A., et al. (2007). Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genetics. Orr H, editor*, 3(5), e82.
- Karayel-Basar, M., Uras, I., Kiris, I., Sahin, B., Akgun, E., & Baykal, A. T. (2022). Spatial proteomic alterations detected via MALDI-MS imaging implicate neuronal loss in a Huntington's disease mouse (YAC128) brain. *Molecular Omics. The Royal Society of Chemistry*, 18(4), 336–347.

- Kim, J., Amante, D. J., Moody, J. P., Edgerly, C. K., Bordiuk, O. L., Smith, K., et al. (2010). Reduced creatine kinase as a central and peripheral biomarker in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(7–8), 673–681.
- Kitata, R. B., Yang, J.-C., & Chen, Y.-J. (2022). Advances in data-independent acquisition mass spectrometry towards comprehensive digital proteome landscape. *Mass Spectrom Reviews*, e21781. <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mas.21781>
- Kobayashi, N., Kostka, G., Garbe, J. H. O., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Hanisch, F.-G., et al. (2007). A comparative analysis of the Fibulin protein family: biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11805–11816.
- Kremer, H. P. H., Roos, R. A. C., Dingjan, G., Marani, E., & Bots, G. T. A. M. (1990). Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 49(4), 371–382.
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S. E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., et al. (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *The New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society*, 330(20), 1401–1406.
- van der Burg, J. M., Björkqvist, M., & Brundin, P. (2009). Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurology*, 8(8), 765–774.
- Kroksveen, A. C., Opsahl, J. A., Aye, T. T., Ulvik, R. J., & Berven, F. S. (2011). Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. *Journal of Proteomics*, 74(4), 371–388.
- Kuemmerle, S., Gutekunst, C.-A., Klein, A. M., Li, X.-J., Li, S.-H., Beal, M. F., et al. (1999). Huntingtin aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Annals of Neurology*, 46(6), 842–849.
- Kupcova Skalnikova, H., Cizkova, J., Cervenka, J., & Vodicka, P. (2017). Advances in proteomic techniques for cytokine analysis: focus on melanoma research. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), E2697.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., & Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology. John Wiley & Sons, Ltd.*, 4(1), 222.
- Langfelder, P., Cantle, J. P., Chatzopoulou, D., Wang, N., Gao, F., Al-Ramahi, I., et al. (2016). Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nature Neuroscience*, 19(4), 623–633.
- Liu, X., Miller, B. R., Rebec, G. V., & Clemmer, D. E. (2007). Protein expression in the striatum and cortex regions of the brain for a mouse model of Huntington's disease. *Journal of Proteome Research. American Chemical Society*, 6(8), 3134–3142.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., et al. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1259–1271.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., et al. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87(3), 493–506.
- Marques Sousa, C., & Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *Journal of Huntington's Disease. IOS Press*, 2(4), 395–403.
- Mazarei, G., Budac, D. P., Lu, G., Adomat, H., Tomlinson Guns, E. S., Möller, T., et al. (2013). Age-dependent alterations of the kynurenine pathway in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Journal of Neurochemistry*, 127(6), 852–867.
- Mazarei, G., Neal, S. J., Becanovic, K., Luthi-Carter, R., Simpson, E. M., & Leavitt, B. R. (2010). Expression analysis of novel striatal-enriched genes in Huntington disease. *Human Molecular Genetics*, 19(4), 609–622.
- McQuade, L. R., Balachandran, A., Scott, H. A., Khaira, S., Baker, M. S., & Schmidt, U. (2014). Proteomics of Huntington's disease-affected human embryonic stem cells reveals an evolu-

- ing pathology involving mitochondrial dysfunction and metabolic disturbances. *Journal of Proteome Research. American Chemical Society*, 13(12), 5648–5659.
- Mears, E. R., Handley, R. R., Grant, M. J., Reid, S. J., Day, B. T., Rudiger, S. R., et al. (2021). A multi-Omic Huntington's disease transgenic sheep-model database for investigating disease pathogenesis. *Journal of Huntingtons Disease*, 10(4), 423–434.
- Medina, A., Mahjoub, Y., Shaver, L., & Pringsheim, T. (2022). Prevalence and incidence of Huntington's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 37(12), 2327–2335.
- Mehta, D., Ahkami, A. H., Walley, J., Xu, S.-L., & Uhrig, R. G. (2022). The incongruity of validating quantitative proteomics using western blots. *Nature Plants. Nature Publishing Group*, 8(12), 1320–1321.
- Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J., & Mann, M. (2018). BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes. *Nature Methods. Nature Publishing Group*, 15(6), 440–448.
- Menalled, L. B. (2005). Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx*, 2(3), 465–470.
- Menalled, L. B., Kudwa, A. E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., et al. (2012). Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington's disease: zQ175. *PLoS One*, 7(12), e49838.
- Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Chesselet, M.-F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *The Journal of Comparative Neurology*, 465(1), 11–26.
- Messner, C. B., Demichev, V., Bloomfield, N., Yu, J. S. L., White, M., Kreidl, M., et al. (2021). Ultra-fast proteomics with scanning SWATH. *Nature Biotechnology. Nature Publishing Group*, 39(7), 846–854.
- Michalik, A., & Van Broeckhoven, C. (2003). Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Human Molecular Genetics*, 12(suppl\_2), R173–R186.
- Muller, M., & Leavitt, B. R. (2014). Iron dysregulation in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 130(3), 328–350.
- Muntel, J., Gandhi, T., Verbeke, L., Bernhardt, O. M., Treiber, T., Bruderer, R., et al. (2019). Surpassing 10 000 identified and quantified proteins in a single run by optimizing current LC-MS instrumentation and data analysis strategy. *Molecular Omics. The Royal Society of Chemistry*, 15(5), 348–360.
- Neely, B. A., Dorfer, V., Martens, L., Bludau, I., Bouwmeester, R., Degroev, S., et al. (2023). Toward an integrated machine learning model of a proteomics experiment. *Journal of Proteome Research* [Internet]. American Chemical Society [cited 2023 Feb 18]; Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00711>.
- Neueder, A., Kojer, K., Hering, T., Lavery, D. J., Chen, J., Birth, N., et al. (2022). Abnormal molecular signatures of inflammation, energy metabolism, and vesicle biology in human Huntington disease peripheral tissues. *Genome Biology*, 23(1), 189.
- Niemela, V., Landtblom, A.-M., Nyholm, D., Kneider, M., Constantinescu, R., Paucar, M., et al. (2021). Proenkephalin decreases in cerebrospinal fluid with symptom progression of Huntington's disease. *Movement Disorders*, 36(2), 481–491.
- Oliveira, A. O., Osmand, A., Outeiro, T. F., Muchowski, P. J., & Finkbeiner, S. (2016).  $\alpha$ B-Crystallin overexpression in astrocytes modulates the phenotype of the BACHD mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 25(9), 1677–1689.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., et al. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics\*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5), 376–386.
- Ooi, J., Langley, S. R., Xu, X., Utami, K. H., Sim, B., Huang, Y., et al. (2019). Unbiased profiling of isogenic Huntington disease iPSC-derived CNS and peripheral cells reveals strong cell-type specificity of CAG length effects. *Cell Reports*, 26(9), 2494–2508.e7.

- Park, S. J., Shin, J. H., Jeong, J. I., Song, J. H., Jo, Y. K., Kim, E. S., et al. (2014). Down-regulation of mortalin exacerbates A $\beta$ -mediated mitochondrial fragmentation and dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(4), 2195–2204.
- Parkin, G. M., Corey-Bloom, J., Snell, C., Smith, H., Laurenza, A., Daldin, M., et al. (2023). Salivary Huntingtin protein is uniquely associated with clinical features of Huntington's disease. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, *13*(1), 1034.
- Perluigi, M., Poon, H. F., Maragos, W., Pierce, W. M., Klein, J. B., Calabrese, V., et al. (2005). Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Molecular & Cellular Proteomics. United States*, *4*(12), 1849–1861.
- Peterson, A. C., Russell, J. D., Bailey, D. J., Westphall, M. S., & Coon, J. J. (2012). Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics\*. *Molecular & Cellular Proteomics. Elsevier*, *11*(11), 1475–1488.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A., & Wilson, M. R. (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry*, *39*(51), 15953–15960.
- Pouladi, M. A., Morton, A. J., & Hayden, M. R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience. Nature Publishing Group*, *14*(10), 708–721.
- Przybyl, I., Wozna-Wysocka, M., Kozłowska, E., & Fiszer, A. (2021). What, when and how to measure—peripheral biomarkers in therapy of Huntington's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1561.
- Ratovitski, T., Chaerkady, R., Kammers, K., Stewart, J. C., Zavała, A., Pletnikova, O., et al. (2016). Quantitative proteomic analysis reveals similarities between Huntington's disease (HD) and Huntington's disease-like 2 (HDL2) human brains. *Journal of Proteome Research. American Chemical Society*, *15*(9), 3266–3283.
- Ravkov, E. V., Charlton, C. M., Barker, A. P., Hill, H., Peterson, L. K., Slev, P., et al. (2019). Evaluation of mass cytometry in the clinical laboratory. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *96*(4), 266–274.
- Rezeli, M., Végvári, Á., Silajdžić, E., Björkqvist, M., Tabrizi, S. J., Laurell, T., et al. (2014). Inflammatory markers in Huntington's disease plasma—a robust nanoLC-MRM-MS assay development. *EuPA Open Proteomics*, *3*, 68–75.
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, *38*(12), 1543–1552.
- Rifai, N., Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2006). Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology. Nature Publishing Group*, *24*(8), 971–983.
- Riguet, N., Mahul-Mellier, A.-L., Maharjan, N., Bartscher, J., Croisier, M., Knott, G., et al. (2021). Nuclear and cytoplasmic huntingtin inclusions exhibit distinct biochemical composition, interactome and ultrastructural properties. *Nature Communications. Nature Publishing Group*, *12*(1), 6579.
- Rissin, D. M., Kan, C. W., Campbell, T. G., Howes, S. C., Fournier, D. R., Song, L., et al. (2010). Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology. Nature Publishing Group*, *28*(6), 595–599.
- Rodrigues, F. B., Byrne, L. M., McColgan, P., Robertson, N., Tabrizi, S. J., Zetterberg, H., et al. (2016). Cerebrospinal fluid inflammatory biomarkers reflect clinical severity in Huntington's disease. *PLoS One*, *11*(9), e0163479.
- Rodrigues, F. B., Byrne, L. M., Tortelli, R., Johnson, E. B., Wijeratne, P. A., Arridge, M., et al. (2020). Mutant huntingtin and neurofilament light have distinct longitudinal dynamics in Huntington's disease. *Science Translational Medicine*, *12*(574), eabc2888.
- Rodrigues, F. B., Byrne, L. M., & Wild, E. J. (2018). Biofluid biomarkers in Huntington's disease. *Methods in Molecular Biology. United States*, *1780*, 329–396.



- Rosas, H. D., Doros, G., Gevorkian, S., Malarick, K., Reuter, M., Coutu, J.-P., et al. (2014). PRECREST: a phase II prevention and biomarker trial of creatine in at-risk Huntington disease. *Neurology*, 82(10), 850–857.
- Rosas, H. D., Salat, D. H., Lee, S. Y., Zaleta, A. K., Pappu, V., Füschi, B., et al. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain*, 131(Pt 4), 1057–1068.
- Rosenblatt, A., Abbott, M. H., Gourley, L. M., Troncoso, J. C., Margolis, R. L., Brandt, J., et al. (2003). Predictors of neuropathological severity in 100 patients with Huntington's disease. *Annals of Neurology*, 54(4), 488–493.
- Rosenblatt, A., Kumar, B. V., Mo, A., Welsh, C. S., Margolis, R. L., & Ross, C. A. (2012). Age, CAG repeat length, and clinical progression in Huntington's disease. *Movement Disorders*, 27(2), 272–276.
- Rosenblatt, A., Liang, K.-Y., Zhou, H., Abbott, M. H., Gourley, L. M., Margolis, R. L., et al. (2006). The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology*. Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology, 66(7), 1016–1020.
- Ross, C. A., Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., et al. (2014). Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature Reviews. Neurology*, 10(4), 204–216.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattian, S., et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents\*. *Molecular Cell Proteom. Elsevier*, 3(12), 1154–1169.
- Ryskamp, D., Wu, J., Geva, M., Kusko, R., Grossman, L., Hayden, M., et al. (2017). The sigma-1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, 97, 46–59.
- Sajjad, M. U., Green, E. W., Miller-Fleming, L., Hands, S., Herrera, F., Campesan, S., et al. (2014). DJ-1 modulates aggregation and pathogenesis in models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 23(3), 755–766.
- Sap, K. A., Guler, A. T., Bezstarosti, K., Bury, A. E., Juenemann, K., Demmers, J. A., et al. (2019). Global proteome and Ubiquitinome changes in the soluble and insoluble fractions of Q175 Huntington mice brains. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(9), 1705–1720.
- Sapp, E., Seeley, C., Iuliano, M., Weisman, L., Vodicka, P., DiFiglia, M., et al. (2020). Protein changes in synaptosomes of Huntington's disease knock-in mice are dependent on age and brain region. *Neurobiology of Disease*, 141, 104950.
- Sassone, J., Colciago, C., Cislacchi, G., Silani, V., & Ciammola, A. (2009). Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues. *Experimental Neurology*, 219(2), 385–397.
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910–926.
- Schönberger, S. J., Jezdic, D., Faull, R. L. M., & Cooper, G. J. S. (2013). Proteomic analysis of the human brain in Huntington's disease indicates pathogenesis by molecular processes linked to other neurodegenerative diseases and to type-2 diabetes. *Journal of Huntingtons Disease. Netherlands*, 2(1), 89–99.
- Shen, L., Pearson, K. J., Xiong, Y., Lo, C.-M., Tso, P., Woods, S. C., et al. (2008). Characterization of apolipoprotein A-IV in brain areas involved in energy homeostasis. *Physiology & Behavior*, 95(1–2), 161–167.
- Shen, L., Tso, P., Woods, S. C., Sakai, R. R., Davidson, W. S., & Liu, M. (2007). Hypothalamic apolipoprotein A-IV is regulated by leptin. *Endocrinology*, 148(6), 2681–2689.
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Lecte, T., & Abeliovich, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biology*, 2(11), e362.
- Shi, M., Jin, J., Wang, Y., Beyer, R. P., Kitsou, E., Albin, R. L., et al. (2008). Mortalin: a protein associated with progression of Parkinson disease? *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(2), 117–124.

- Shiio, Y., & Aebersold, R. (2006). Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nature Protocol. Nature Publishing Group*, 1(1), 139–145.
- Shirasaki, D. I., Greiner, E. R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boonthueung, P., Geschwind, D. H., et al. (2012). Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron*, 75(1), 41–57.
- Silajdžić, E., & Björkqvist, M. (2018). A critical evaluation of wet biomarkers for Huntington's disease: current status and ways forward. *Journal of Huntingtons Disease*, 7(2), 109–135.
- Skotte, N. H., Andersen, J. V., Santos, A., Aldana, B. I., Willert, C. W., Nørremølle, A., et al. (2018). Integrative characterization of the R6/2 mouse model of Huntington's disease reveals dysfunctional astrocyte metabolism. *Cell Reports*, 23(7), 2211–2224.
- Slow, E. J., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S. H., Graham, R. K., Deng, Y., et al. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics*, 12(13), 1555–1567.
- Smith, L. M., & Kelleher, N. L. (2018). Proteoforms as the next proteomics currency. *Science. American Association for the Advancement of Science*, 359(6380), 1106–1107.
- Sorolla, M. A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., & Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(5), 667–678.
- Sugars, K. L., & Rubinsztein, D. C. (2003). Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends in Genetics*, 19(5), 233–238.
- Sui, X., Pires, D. E. V., Ormsby, A. R., Cox, D., Nie, S., Vecchi, G., et al. (2020). Widespread remodeling of proteome solubility in response to different protein homeostasis stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(5), 2422–2431.
- Szeliga, M. (2020). Peroxiredoxins in neurodegenerative diseases. *Antioxidants (Basel)*, 9(12), 1203.
- Tabrizi, S. J., Estevez-Fraga, C., van Roon-Mom, W. M. C., Flower, M. D., Scahill, R. I., Wild, E. J., et al. (2022). Potential disease-modifying therapies for Huntington's disease: lessons learned and future opportunities. *Lancet Neurology*, 21(7), 645–658.
- Tajik, M., Baharfar, M., & Donald, W. A. (2022). Single-cell mass spectrometry. *Trends in Biotechnology*, 40(11), 1374–1392.
- The HD iPSC Consortium. (2020). Bioenergetic deficits in Huntington's disease iPSC-derived neural cells and rescue with glycolytic metabolites. *Human Molecular Genetics*, 29(11), 1757–1771.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72(6), 971–983.
- Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., et al. (2005). Peptide mass fingerprinting. *Methods*, 35(3), 237–247.
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., et al. (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry. American Chemical Society*, 75(8), 1895–1904.
- Timp, W., & Timp, G. (2020). Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics. *Science Advances*, 6(2), eaax8978.
- Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G., & Chu, M.-L. (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group*, 4(6), 479–489.
- Tsiamis, V., Ienasescu, H.-I., Gabrielaitis, D., Palmblad, M., Schwämmle, V., & Ison, J. (2019). One thousand and one software for proteomics: Tales of the toolmakers of science. *Journal of Proteome Research. American Chemical Society*, 18(10), 3580–3585.
- Tso, P., Liu, M., Kalogeris, T. J., & Thomson, A. B. (2001). The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. *Annual Review of Nutrition*, 21, 231–254.
- Ünlü, M., Morgan, M. E., & Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11), 2071–2077.

- Valekova, I., Jarkovska, K., Kotrcova, E., Bucci, J., Ellederova, Z., Juhas, S., et al. (2016). Revelation of the IFN $\alpha$ , IL-10, IL-8 and IL-1 $\beta$  as promising biomarkers reflecting immuno-pathological mechanisms in porcine Huntington's disease model. *Journal of Neuroimmunology*, *293*, 71–81.
- Vidova, V., & Spacil, Z. (2017). A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta*, *964*, 7–23.
- Vinther-Jensen, T., Börnsen, L., Budtz-Jørgensen, E., Ammitzbøll, C., Larsen, I. U., Hjermand, L. E., et al. (2016). Selected CSF biomarkers indicate no evidence of early neuroinflammation in Huntington disease. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation* [Internet], *3*(6). Available from: <http://nn.neurology.org/content/3/6/e287.abstract>
- Vinther-Jensen, T., Budtz-Jørgensen, E., Simonsen, A. H., Nielsen, J. E., & Hjermand, L. E. (2014). YKL-40 in cerebrospinal fluid in Huntington's disease – a role in pathology or a nonspecific response to inflammation? *Parkinsonism & Related Disorders*, *20*(11), 1301–1303.
- Vinther-Jensen, T., Simonsen, A. H., Budtz-Jørgensen, E., Hjermand, L. E., & Nielsen, J. E. (2015). Ubiquitin: a potential cerebrospinal fluid progression marker in Huntington's disease. *European Journal of Neurology*, *22*(10), 1378–1384.
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *44*(6), 559–577.
- Vonsattel, J. P. G. (2008). Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, *115*(1), 55–69.
- Wan, J., Savas, J. N., Roth, A. F., Sanders, S. S., Singaraja, R. R., Hayden, M. R., et al. (2013). Tracking brain palmitoylation change: predominance of glial change in a mouse model of Huntington's disease. *Chemistry & Biology*, *20*(11), 1421–1434.
- Wanker, E. E., Ast, A., Schindler, F., Trepte, P., & Schnoegl, S. (2019). The pathobiology of perturbed mutant huntingtin protein–protein interactions in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, *151*(4), 507–519.
- Wegrzynowicz, M., Holt, H. K., Friedman, D. B., & Bowman, A. B. (2012). Changes in the striatal proteome of YAC128Q mice exhibit gene–environment interactions between mutant huntingtin and manganese. *Journal of Proteome Research. American Chemical Society*, *11*(2), 1118–1132.
- Wexler, N. S. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3498–3503.
- Wild, E. J., Boggio, R., Langbehn, D., Robertson, N., Haider, S., Miller, J. R. C., et al. (2015). Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation*, *125*(5), 1979–1986.
- Wishart, T. M., Rooney, T. M., Lamont, D. J., Wright, A. K., Morton, A. J., Jackson, M., et al. (2012). Combining comparative proteomics and molecular genetics uncovers regulators of synaptic and axonal stability and degeneration in vivo. *PLOS Genetics. Public Library of Science*, *8*(8), e1002936.
- Wu, A. H., Fukushima, N., Puskas, R., Todd, J., & Goix, P. (2006). Development and preliminary clinical validation of a high sensitivity assay for cardiac troponin using a capillary flow (single molecule) fluorescence detector. *Clinical Chemistry*, *52*(11), 2157–2159.
- Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., & Wilson, M. R. (2009). Structural characterization of clusterin-chaperone client protein complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(33), 21920–21927.
- You, H., Wu, T., Du, G., Huang, Y., Zeng, Y., Lin, L., et al. (2021). Evaluation of blood glial fibrillary acidic protein as a potential marker in Huntington's disease. *Frontiers in Neurology*, *12*, 779890.
- Zabel, C., Chamrad, D. C., Priller, J., Woodman, B., Meyer, H. E., Bates, G. P., et al. (2002). Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. *Molecular & Cellular Proteomics. United States*, *1*(5), 366–375.

- Zabel, C., Mao, L., Woodman, B., Rohe, M., Wacker, M. A., Kläre, Y., et al. (2009). A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for Huntington disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(4), 720–734.
- Zabel, C., Nguyen, H. P., Hin, S. C., Hartl, D., Mao, L., & Klose, J. (2010). Proteasome and oxidative phosphorylation changes may explain why aging is a risk factor for neurodegenerative disorders. *Journal of Proteomics, Netherlands*, 73(11), 2230–2238.
- Zabel, C., Sagi, D., Kaindl, A. M., Steireif, N., Kläre, Y., Mao, L., et al. (2006). Comparative proteomics in neurodegenerative and non-neurodegenerative diseases suggest nodal point proteins in regulatory networking. *Journal of Proteome Research, United States*, 5(8), 1948–1958.
- Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Back, M.-C., & Yates, J. R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, 113(4), 2343–2394.
- Zhou, S., Bailey, M. J., Dunn, M. J., Preedy, V. R., & Emery, P. W. (2005). A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics*, 5(11), 2739–2747.
- Zhu, Z., & Reiser, G. (2018). The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 115, 69–79.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., et al. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science, American Association for the Advancement of Science*, 293(5529), 493–498.