

## **ANALIZA PROTEOMICZNA I METABOLOMICZNA PROCESÓW INDUKCJI PLURIPOTENCJI W MIOBLASTACH ORAZ RÓŻNICOWANIA INDUKOWANYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH W KIERUNKU KOMÓREK KARDIALNYCH**

### **STRESZCZENIE**

Badania oparte na modelu mysiego serca pozawałowego pozwalają na poznanie podstawowych procesów molekularnych zachodzących w trakcie zawału, ocenę jego stopnia, a także umożliwiają przedkliniczne testowanie nowych technologii regeneracji uszkodzonego mięśnia. Jednak, nowoczesne podejście, jakim jest wykorzystanie autologicznych, indukowanych komórek pluripotentnych (iPS) uzyskanych od pacjentów do poprawy funkcjonowania uszkodzonego mięśnia sercowego, mogłoby przyczynić się do opracowania metod spersonalizowanej medycyny regeneracyjnej i znacznie poprawić jakość życia pacjentów po zawale. Mimo, że dostępnych jest kilka różnych sposobów uzyskiwania komórek iPS, wciąż potrzebne są optymalizujące badania *in vitro* i *in vivo* wyjaśniające zmiany molekularne zachodzące w trakcie odróżnicowywania i późniejszego różnicowania komórek iPS, co jest konieczne dla uzyskania pewności, że zaproponowana terapia jest wydajna i, przede wszystkim, bezpieczna.

Celem przedstawionej pracy było opisanie na poziomie proteomicznym i metabolomicznym zmian zachodzących w trakcie indukcji pluripotencji w mioblastach ludzkich, jak również w trakcie późniejszego różnicowania uzyskanych komórek iPS w kierunku komórek o charakterze kardialnym. Ocenie poddano również zmiany zachodzące w proteomie i metabolomie serca po podaniu tak uzyskanych komórek kardialnych do myszy, u których wcześniej wywołano zawał przez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej. Uzyskane z wykorzystaniem metod spektrometrii mas wyniki przeanalizowano przy użyciu bioinformatycznych analiz funkcjonalnych w celu wskazania procesów metabolicznych i szlaków/ścieżek sygnałowych zmieniających się podczas kolejnych procesów odróżnicowywania i różnicowania. Badania zostały uzupełnione poprzez analizy kariotypu, barwienia immunofluorescencyjne białek, analizy RT-PCR genów oraz ocenę morfologiczną komórek wykonaną przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Przeprowadzone analizy pozwoliły scharakteryzować proteom i metabolom badanych populacji ludzkich mioblastów, komórek iPS oraz komórek o charakterze kardialnym na różnym etapie procesów odróżnicowywania oraz różnicowania. Porównano również profile

proteomiczne komórek odróżnicowywanych z wykorzystaniem dwóch różnych protokołów. Zastosowanie do odróżnicowywania ludzkich mioblastów metody STEMCCA z użyciem wektorów lentiwirusowych spowodowało aktywację metabolizmu ksenobiotyków i utleniania lipidów oraz zahamowanie sygnalizacji receptora efryny, w odróżnieniu od podejścia opartego na wektorze wirusowym SENDAI. Porównanie uzyskanych populacji komórek iPS uzyskanych przy użyciu wektora wirusowego SENDAI do mioblastów, z których je wyprowadzono ujawniło, że w trakcie procesu odróżnicowywania następuje intensywny wzrost akumulacji bardzo wielu białek. Może to wynikać z wysokiego potencjału komórek iPS do różnicowania w szereg innych rodzajów komórek, w odróżnieniu od funkcjonalnie stabilnych mioblastów. Podczas procesu uzyskiwania komórek iPS następowała aktywacja procesów charakterystycznych dla komórek szybko proliferujących m.in.: składania RNA, sygnalizacji receptora EIF2, a także rekombinacji homologicznej oraz zahamowanie funkcji specyficznych dla wyspecjalizowanych komórek mięśniowych. Z kolei, w trakcie różnicowania komórek iPS w kierunku komórek o charakterze kardialnym, zaobserwowano podwyższenie poziomu białek zaangażowanych w fosforylację oksydacyjną i procesy związane z tworzeniem włókien mięśniowych, co potwierdzałoby następującą specjalizację uzyskiwanych komórek. Wyniki profilowania metabolomicznego wykazały, że największe zmiany w akumulacji związków niskocząsteczkowych wywołało wzbudzenie ścieżki mezodermalnej w trakcie procesu generowania komórek o charakterze kardialnym, a podwyższony poziom akumulacji tych związków utrzymywał się do końca procesu różnicowania.

Podanie uzyskanych komórek kardialnych do serc pozawałowych myszy wywołało efekt w postaci obniżenia poziomu kwasu mlekowego, przy równoczesnym wzroście akumulacji białek zaangażowanych w system ubikwityna – proteasom. Może to sugerować powrót do tlenowego pozyskiwania energii charakterystycznego dla zdrowego mięśnia sercowego oraz zapoczątkowanie procesów regeneracyjnych.

Porównawcze analizy proteomiczne i metabolomiczne oparte o techniki spektrometrii mas, wspomagane przez platformy bioinformatyczne, stanowią bardzo dobre narzędzie do opisywania zmian zachodzących w komórkach w trakcie ich odróżnicowywania i różnicowania. Uzupełniane przez badania na innych poziomach „omicznych” oraz analizy funkcjonalne badanych komórek *in vitro* oraz *in vivo* mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów zachodzących w trakcie tych procesów i tym samym przyspieszyć wprowadzanie technik opartych na komórkach iPS do kolejnych etapów badań klinicznych.