

O wyjątkowości komórek macierzystych decyduje ich unikatowa zdolność do samoodnowy i różnicowania. Ze względu na ich pochodzenie możemy wyróżnić komórki uzyskane z zarodków, takie jak np. zarodkowe komórki macierzyste (ESC, ang. embryonic stem cells), oraz te obecne w tkankach dorosłych organizmów, np. komórki satelitarne w mięśniach szkieletowych. ESC cechuje pluripotencja, czyli zdolność do różnicowania we wszystkie rodzaje komórek i tkanek budujących organizm. ESC zostały po raz pierwszy uzyskane w latach 80. XX w, z komórek węzła zarodkowego mysiej blastocysty, a więc zarodka w 3,5 dniu rozwoju. Komórki te stanowią doskonały model do badania procesów zachodzących podczas różnicowania. Można je wykorzystywać w badaniach funkcji genów, podłoża chorób czy toksyczności leków. W badaniach prowadzonych w Zakładzie Cytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego koncentrujemy się na tematyce związanej z regeneracją mięśni szkieletowych a także na wykorzystaniu różnego rodzaju komórek macierzystych w celu poprawienia przebiegu tego procesu. W przypadku chorób wpływających na funkcjonowanie mięśni szkieletowych, takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne'a, komórki macierzyste mięśni (komórki satelitarne), odpowiedzialne za naprawę uszkodzonej tkanki, ulegają wyczerpaniu. Z tego powodu regeneracja mięśni szkieletowych nie przebiega prawidłowo. Terapie tego rodzaju chorób mogłyby polegać na przeszczepianiu komórek macierzystych, np. ESC. Aby było to możliwe konieczne jest poznanie mechanizmów kierujących różnicowaniem tych komórek. Pomimo wielu lat badań wiedza na temat różnicowania jest wciąż niepełna, co stanowi jedną z przyczyn uniemożliwiających kliniczne zastosowanie komórek macierzystych. Większość analiz ESC przeprowadza się wykorzystując modele różnicowania *in vitro*. Takie podejście niekoniecznie odzwierciedla zachowanie się komórek *in vivo*, ponadto ogranicza badania do wczesnych faz różnicowania – te zaawansowane nie zawsze można uzyskać hodując komórki w szalce. Modelem badawczym pozwalającym na pełne różnicowanie miogeniczne ESC, a więc od komórki macierzystej poprzez mioblasty aż do stadium unerwionych włókien mięśniowych, są nienowotworowe guzy zwane potworniakami (*gr. teratos* - potwór). Wykorzystanie potworniaków, zapewnia możliwość dokładnej analizy różnicowania ESC. Stosując ten model zbadamy rolę regulatora miogenezy Pax7 w powstawaniu w pełni wykształconych włókien mięśniowych, a co najważniejsze komórek satelitowych. Gen *Pax7* koduje czynnik transkrypcyjny kluczowy zarówno dla powstawania i różnicowania komórek prekursorowych mięśni szkieletowych jak i dla powstawania komórek satelitowych. Ponadto, w czasie rozwoju ssaków Pax7 reguluje powstawanie dwóch populacji mioblastów: zarodkowych i płodowych. O istotności tego czynnika świadczy m.in. fakt, że Pax7 działa anty-apoptotycznie, a u myszy pozbawionych funkcjonalnego genu *Pax7* liczba komórek satelitowych jest znacząco obniżona. Wyniki naszych badań wskazują, że brak funkcjonalnego czynnika Pax7 pozytywnie wpływa na podziały różnicujących ESC i wczesne etapy ich różnicowania. Nie wiemy natomiast jakie konsekwencje niesie ze sobą brak funkcjonalnego czynnika Pax7 podczas zaawansowanych etapów różnicowania miogenicznego ESC, aż do stadium włókien mięśniowych.

Celem nowego projektu jest stwierdzenie jaką funkcję pełni Pax7 podczas wczesnych i zaawansowanych etapów miogenicznego różnicowania ESC *in vivo*. W szczególności zbadamy wpływ Pax7 na: powstawanie, proliferację i apoptozę mioblastów; powstawanie określonego rodzaju włókien mięśniowych (szybkokurczących versus wolnokurczących) oraz powstawanie komórek satelitowych. Narzędziem do przeprowadzenia zaplanowanych analiz będą uzyskane i dostępne w Zakładzie Cytologii UW kontrolne linie ESC oraz te pozbawione funkcjonalnego genu *Pax7*. Przeprowadzimy kompleksowe badania, obejmujące analizy potworniaków uzyskanych z ESC o genotypach *Pax7*^{+/+} i *Pax7*^{-/-}:

1. Histologiczną analizę tkanki mięśniowej w potworniakach.
2. Kompleksową analizę ekspresji kluczowych regulatorów różnych etapów miogenezy, w tym także warunkujących powstawanie mioblastów zarodkowych i płodowych.
3. Analizę zdolności do tworzenia komórek satelitowych w potworniakach.
4. Określenie rodzaju włókien mięśniowych występujących w potworniakach.
5. Charakterystykę proliferacji oraz apoptozy komórek różnicujących w potworniakach

Rola Pax7 w regulacji samoodnowiania i różnicowania komórek satelitowych nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące funkcji tego czynnika w mięśniach dorosłych ssaków. Realizacja planowanych badań pozwoli na pełniejsze zdefiniowanie roli Pax7 i innych miogenicznych czynników transkrypcyjnych w różnicowaniu komórek ESC w mioblasty i opisanie ścieżek miogenezy, które regulują różnicowanie komórek pluripotencjalnych. Uzyskane przez mnie wyniki mogą stać się kolejnym krokiem na drodze do opracowania metod wydajnego różnicowania ESC i wykorzystania ich w terapii chorób degeneracyjnych.