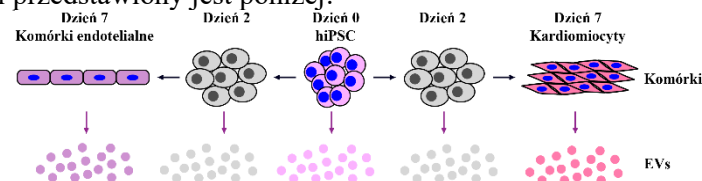


Badanie zmian w ekspresji lncRNA podczas kardio- i angiogenezy oraz mechanizmów molekularnych umożliwiających ich selektywne pakowanie do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pluripotencjalne komórki macierzyste (PSCs) mogą wydajnie zwiększać swoją liczbę przez podziały komórkowe, a jednocześnie, pod wpływem specyficznej stymulacji cząsteczkami sygnałowymi, mogą różnicować do niemal każdego typu komórek wyspecjalizowanych. Są więc obiektem dużego zainteresowania w medycynie regeneracyjnej, gdzie mogłyby znaleźć zastosowanie w naprawie uszkodzonych tkanek. Embrionalne komórki macierzyste występują wyłącznie w pierwszych stadiach rozwoju embrionalnego i ich zastosowanie budzi poważne etyczne zastrzeżenia. W 2006 roku, naukowcy odkryli, że PSCs mogą być generowane poprzez wprowadzenie wybranych genów do komórek somatycznych (dojrzałych), na przykład do łatwo dostępnych komórek krwi. Takie komórki nazwano indukowanymi PSCs (iPSCs). Ludzkie iPSCs (hiPSCs) mają znaczny potencjał jako system do modelowania ludzkich chorób oraz jako źródło różnych typów komórek w medycynie regeneracyjnej. Potencjał regeneracyjny hiPSCs może być, przynajmniej częściowo, zastąpiony przez produkowane przez te komórki pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs), które przekazują białka pochodzące od hiPSCs do uszkodzonych komórek i tkanek. EVs są niewielkimi strukturami otoczonymi błoną, które produkowane są przez wszystkie typy komórek i służą komunikacji międzykomórkowej. Przenoszą białka, lipidy, DNA i RNA. Dokładny skład EVs zależy, między innymi, od typu komórki i jej stanu fizjologicznego. Zawartość RNA w EVs jest interesująca, ponieważ jest bardzo złożona i wiele z zawartych w EVs cząsteczek RNA ma ważne funkcje regulacyjne i możliwość wpływania na los komórek docelowych dla EVs. Zauważono też, iż RNA są selektywnie pakowane do EVs, lecz nie jest jeszcze jasne jak komórki takie selektywne pakowanie przeprowadzają. Funkcjonalnie, RNA jest najbardziej różnorodną białcząstką. Może przenosić informacje genetyczne z genomu do aparatury produkującej białka, regulować ekspresję genów, funkcjonować jako materiał budulcowy dla struktur komórkowych oraz jako katalizator reakcji enzymatycznych. Niedawno opisane długie niekodujące RNA (lncRNAs) okazują się regulatorami różnych procesów komórkowych. Ponieważ wiele z nich jest zidentyfikowanych w komórkach, ale tylko mała część posiada znaną funkcję, istotnym jest by zwrócić naszą uwagę na te różnorodne RNA.

W proponowanym projekcie, planujemy zbadać zawartość lncRNAs w hiPSCs przed oraz w trakcie ich różnicowania do kardiomiocytów oraz komórek endotelialnych. Pogłębienie naszej wiedzy dotyczącej tych procesów różnicowania może pomóc w polepszeniu regeneracji mięśnia sercowego po urazach sercowo-naczyniowych. Próbkę RNA będą zbierane z różnicujących komórek oraz ich EVs. Schemat przedstawiający jak będą zbierane próbki przedstawiony jest poniżej:



Identyfikacja lncRNAs zostanie przeprowadzona za pomocą mikromacierzy dla lncRNA oraz sekwencjonowania RNA. Obydwie metody umożliwią nam detekcję licznych RNA, ich ilościową analizę oraz porównanie ich względnych ilości pomiędzy wybranymi próbkami. Otrzymane wyniki stanowiąc będą podstawę dla dwóch kolejnych części projektu. Po pierwsze, planujemy znaleźć białka będące potencjalnie zaangażowane w selektywne kierowanie i pakowanie RNA do EVs. W tym celu, wybierzemy te lncRNAs, które są wzbogacone w EVs w którymkolwiek punkcie czasowym i użyjemy ich do identyfikacji białek związanych z nimi w komórkach oraz w EVs. Wpływ zidentyfikowanych białek na kierowanie lncRNAs do EVs będzie badany w przyszłości. Po drugie, chcemy poznać lncRNAs, które są zaangażowane w regulację procesów różnicowania. Wybierzemy więc te lncRNA, których poziom wzrasta podczas różnicowania. Te lncRNAs zostaną usunięte z komórek hiPSCs przez techniki wyciszania genów. Następnie określimy, czy hiPSC pozbawione wybranych lncRNAs mogą różnicować do kardiomiocytów oraz komórek endotelialnych.

Wynikiem ukończenia tego projektu będzie zwiększenie naszej wiedzy dotyczącej funkcji regulacyjnych ludzkich lncRNAs podczas różnicowania komórek macierzystych. Dostarczymy także nowe informacje na temat lncRNAs zawartych w EVs produkowanych przez niezróżnicowane oraz różnicujące hiPSCs. Ta informacja może być przydatna w zrozumieniu biologicznych podstaw proregeneracyjnego działania EVs w naprawie uszkodzonych tkanek. Ponadto, hiPSCs mogą być genetycznie zmodyfikowane tak by produkować większe ilości wybranych lncRNAs, które byłyby efektywnie pakowane do EVs i mogłyby skutkować zwiększonym potencjałem regeneracyjnym takich EVs poprzez promowanie różnicowania w tkankach docelowych. Wyniki tych badań zwiększą też zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za selektywne pakowanie lncRNAs do EVs. Wyniki zaproponowanych badań prowadzonych w ludzkich komórkach będą miały bezpośrednie zastosowanie w biologii człowieka. Podsumowując, znaczenie projektu leży w jego wysokim potencjale do uzyskania wyników interesujących społeczność naukowe zainteresowane komórkami macierzystymi, EVs oraz RNA.