

Wiele chorób neurorozwojowych charakteryzuje dysfunkcja mitochondriów, ale jaki jest jej mechanizm molekularny i jaki ma związek z biogenezą mitochondriów, do tej pory nie zostało wyjaśnione. Wiemy natomiast, że na wczesnych etapach rozwoju człowieka, pluripotencjalne komórki macierzyste z których powstaje cały organizm – również Ośrodkowy Układ Nerwowy, przechodzą proces zmiany sposobu oddychania z glikolitycznego (bez udziału mitochondriów) do tlenowego, w którym ważna jest zarówno liczba mitochondriów w komórce jak również ich dojrzałość strukturalno/funkcjonalna.

Prezentowany projekt zatytułowany: „Wpływ PGC1 $\alpha$  na biogenezę mitochondriów i różnicowanie neuralne podczas wczesnych etapów rozwoju ludzkich organoidów mózgu” próbuje wyjaśnić rolę jaką spełnia biogeneza mitochondriów podczas wczesnego rozwoju neuralnego. Modelem badawczym są organoidy mózgu, otrzymane w hodowli *in vitro* z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC). W tym projekcie stymulujemy biogenezę mitochondriów i badamy w jaki sposób wpływa to na parametry komórkowe w organoidach odzwierciedlających w hodowli wczesne etapy rozwoju ludzkiego układu nerwowego. Dodatkowo badamy zależności molekularne pomiędzy ścieżkami przekazywania sygnału w komórce związanymi z biogenezą mitochondriów i różnicowaniem neuronalnym. W celu obserwacji zmian na poziomie komórki wprowadziliśmy do systemu białko fluorescencyjne, które zaczyna świecić dopiero wtedy, gdy podlega ekspresji wyznacznik biogenezy mitochondriów – białko PGC-1 $\alpha$ . Taki efekt można osiągnąć stosując metody inżynierii genetycznej, umożliwiające otrzymanie tzw. „linii reporterowej” pluripotencjalnych komórek macierzystych, która posłuży nam dalej do otrzymania w hodowli *in vitro* organoidów ludzkiego mózgu na różnych fazach rozwoju: kul zarodkowych (ang. embryoid bodies), neurosfer oraz organoidów mózgu (struktur przypominających układ warstwowy kory mózgu).

Plan naszego projektu oparty jest na zastosowaniu czterech przełomowych osiągnięć ostatnich lat w dziedzinie komórek macierzystych, biologii molekularnej i inżynierii tkankowej, są to:

- 1) **ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC)**, które stanowią alternatywę dla badań nad ludzkimi zarodkowymi komórkami macierzystymi, ponieważ posiadają podobne właściwości, a nie stwarzają kontrowersji etycznych. Co więcej, każdą komórkę organizmu można „reprogramować” do komórki iPSC, czyli jest to nieskończone źródło komórek do badań i terapii z zastosowaniem komórek własnych pacjenta- czyli tzw. medycyny personalizowanej;
- 2) **metoda „edycji genomu” (CRISPR/CAS9)**, która pozwala precyzyjnie i bezpiecznie wprowadzać („Knoked in”) lub wycinać („Knoked out”) sekwencje DNA;
- 3) **metoda optogenetyczna stymulacji transkrypcji genów**
- 4) **organoidy otrzymane w hodowli *in vitro***, czyli struktury przypominających organy ludzkie, które odzwierciedlają wczesny rozwój zarodkowy tych organów. Organoidy mózgu, wywodzące się z ludzkich komórek macierzystych stanowią innowacyjny, wygodny i alternatywny system modelowy wczesnego rozwoju układu nerwowego, który reaguje na farmakologiczne i genetyczne manipulacje, co nie jest możliwe w zastosowaniu u ludzi.

Linia reporterowa: „IPS-PPRGCA1-DsRed2-Mito-7” oraz wyprowadzone z niej *in vitro* ludzkie organoidy mózgu otrzymać w tym projekcie tylko dzięki wspomnianym powyżej nowym przełomowym technologiom bioinżynierii i biologii molekularnej. Poza detekcją spodziewanych zmian w ekspresji genu PGC-1 $\alpha$ , sprzężonego ze świeceniem białka fluorescencyjnego (obserwacja możliwa również w komórkach żywych), różnice w ekspresji genów na poziomie RNA będą badane w organoidach z określonych stadiów rozwoju, przy zastosowaniu analizy sekwencji genów mitochondrialnych i jądrowych metodą RNA-Seq (Sekwencjonowanie Następnej Generacji) oraz dla wybranych markerów rozwoju metodą badania ekspresji genów w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Molekularny system optogenetyczny umożliwi nam stymulację aktywności PGC1 $\alpha$  światłem w określonych stadiach rozwoju organoidów mózgu. W projekcie zweryfikowane zostaną hipotezy dotyczące wpływu stymulacji biogenezy mitochondriów na procesy komórkowe związane z różnicowaniem neuralnym, stymulacją ścieżki sygnałowej PGC1-a (głównego regulatora biogenezy mitochondrialnej) oraz ścieżki sygnałowej FGFR1 (istotnej dla wczesnego rozwoju neuralnego, a także zaangażowanej w patologii schizofrenii) w prezentowanym modelu organoidów ludzkiego mózgu na wczesnych etapach rozwoju.. Otrzymane wyniki pozwolą na określenie roli biogenezy mitochondriów w rozwoju *in vitro* ludzkich organoidów mózgu i wyjaśnią niektóre mechanizmy molekularne leżące u podłoża różnicowania neuralnego. Eksperymenty z organoidami mózgu na różnym etapie ich rozwoju umożliwią określenie ‘okna wrażliwości’ na działanie potencjalnych czynników terapeutycznych.