

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest sprzężoną z płcią chorobą genetyczną spowodowaną mutacjami w genie *DMD* kodującym dystrofinę. Ich efektem jest całkowity brak tego białka w komórkach, co prowadzi do stopniowego pogarszania się stanu mięśni szkieletowych, a także do rozwoju niewydolności serca. Wieloletnie obserwacje pacjentów z DMD wykazały ponadto, że choroba ma ogólnoustrojowy charakter, związany z zaburzeniami metabolicznymi takimi jak insulinooporność oraz cukrzyca.

Zarówno w myszach *mdx*, wykorzystywanych jako model DMD, jak i w modelu *in vitro* opartym o pozbawione dystrofiny ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (hiPSC) zróżnicowane w kierunku kardiomiocytów (hiPSC-CM), zaobserwowano liczne nieprawidłowości w aktywności elektrofizjologicznej komórek, w tym zaburzenia gospodarki wapniowej. Ponadto, w sercach myszy *mdx* dochodzi do nasilenia procesu autofagii, jak i do zahamowania mitofagii, a w mięśniach szkieletowych również zaburzenia metabolizmu glukozy, zarówno na poziomie jej poboru, jak i utylizacji.

Jednym z potencjalnych czynników wpływających na fenotyp myszy *mdx* jest mikroRNA-378a (miR-378a), którego poziom ekspresji w mięśniach szkieletowych tych zwierząt, ale także u ludzi cierpiących na DMD, jest znacząco obniżony. Co więcej, wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały u myszy *mdx* pozbawionych miR-378a mniej nasilone zwłóknienie tkanki mięśniowej, a także funkcjonalną poprawę stanu zwierząt. miR-378a określany jest jako jeden z ważnych regulatorów metabolizmu komórkowego, będąc zaangażowanym w regulację zarówno poboru glukozy, funkcji mitochondriów, efektu Warburga, jak również procesu autofagii. Co ważne, dotychczasowe badania na modelach zwierzęcych wykazały, że miR-378a wpływa na tworzenie blizny pozawałowej oraz wzrost hipertroficznego serca, niemniej jego rola w ludzkich kardiomiocytach, w szczególności w kontekście regulacji metabolizmu oraz funkcji komórek pozbawionych dystrofiny, nie została do tej pory opisana.

Biorąc to pod uwagę, celem pracy było dokładne poznanie aktywności miR-378a w ludzkich kardiomiocytach kontrolnych oraz pozbawionych dystrofiny, wykorzystując hiPSC-CM jako model badawczy. Komórki te otrzymano poprzez różnicowanie hiPSC z wykorzystaniem związków drobnocząsteczkowych regulujących ścieżkę sygnałową WNT. Metodą CRISPR/Cas9 przygotowano natomiast odpowiednie linie hiPSC z delecją *MIR378A* (hiPSC miR-378aKO), eksonu 50 *DMD* (hiPSC DMDex50KO) lub obu (hiPSC DKO).

Z przeprowadzonych badań wynika, że miR-378a nie wpływa na elektrofizjologię hiPSC-CM, ale odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu hipertroficznego oraz oscylacji fal wapniowych. Jego brak powodował bowiem zwiększenie rozmiarów kardiomiocytów oraz zmniejszenie częstotliwości napływu jonów wapnia do komórek. Co ważne, jest on również istotny dla metabolizmu glukozy w kardiomiocytach poprzez regulację poziomu transportera glukozy GLUT1. W szczególności, brak miR-378a spowodował wzrost poziomu tego transportera, podobnie jak tendencję do zwiększonego poboru glukozy, jednak aktywność heksokinazy i LDHA pozostała obniżona. Jednocześnie zaobserwowano spadek aktywności metabolicznej w hiPSC-CM miR-378aKO w testach Seahorse XF Mito Stress. Brak miR-378a obniżył poziom podjednostek budujących mitochondrialny łańcuch oddechowy, stosunek mtDNA/DNA oraz poziom ekspresji *TFAM*, zaangażowanego w replikację mtDNA. Zaobserwowano również obniżenie efektywnej mitofagii i autofagii w kardiomiocytach pozbawionych miR-378a.

Dotychczasowe badania wskazują, że miR-378a może być potencjalnym celem terapeutycznym w DMD. Rozszerzając te doświadczenia o model ludzkich, dystroficznych hiPSC-CM (hiPSC-CM DMD), zaobserwowano w nich obniżoną ekspresję miR-378a w porównaniu do komórek zdrowych. Ponownie, zarówno brak jak i nadekspresja miR-378a nie miały wpływu na zbadane właściwości elektrofizjologiczne hiPSC-CM DMD, ale istotne efekty delekcji miR-378a zaobserwowaliśmy na poziomie poboru glukozy. W szczególności, brak miR-378a spowodował zmniejszenie ilości pobieranej glukozy oraz spadek ekspresji jej transporterów, a także podniesienie poziomu aktywnej formy GSK3 β . Zarówno w hiPSC-CM DMD jak i DKO zaobserwowaliśmy spadek ekspresji *TFAM* oraz mtDNA/DNA. hiPSC-CM DMD wykazywały obniżony poziom LC3 I i II zarówno w testach indukowanej przez głodzenie autofagii jak i mitofagii wywołanej rozprężnięciem mitochondrialnego łańcucha elektronowego, natomiast delekcja miR-378a w hiPSC-CM DMD odwróciła te efekty. Brak miR-378a nie miał natomiast wpływu na zaburzoną biosyntezę mitochondriów w kardiomiocytach DMD.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły nam na określenie roli miR-378a w kardiomiocytach oraz jego potencjalnego działania w dystrofii mięśniowej Duchenne'a. W modelu hiPSC-CM, miR-378a odgrywa rolę w regulacji wzrostu hipertroficznego, gospodarki wapniowej, biosyntezy mitochondriów oraz mitofagii, metabolizmu glukozy i autofagii. Delekcja i nadekspresja miR-378a nie wpłynęła na potencjał elektrofizjologiczny hiPSC-CM DMD, jednak brak miR-378a ograniczył pobór glukozy oraz obniżył poziom jej transporterów

w kardiomiocytach DMD. Zaobserwowaliśmy również zwiększenie poziomu LC3 i jego lipidowanej formy po stymulacji kardiomiocytów CCCP, co sugeruje poprawę w indukcji mitofagii.

Uzyskane wyniki sugerują, że zahamowanie ekspresji miR-378a w kardiomiocytach pozbawionych dystrofiny przywraca równowagę pomiędzy biosyntezą mitochondriów a mitofagią. W połączeniu z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi na poprawę wydolności fizycznej myszy *mdx* oraz ich metabolizmu przy dodatkowym wyłączeniu ekspresji miR-378a, obecne wyniki wskazują na miR-378a jako potencjalny cel terapii modulującej przebieg choroby w dystrofii mięśniowej Duchenne'a.