

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Monika
GASIŪNIENĖ

Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių
diferenciacijos reguliavimo ir
epigenetinių mechanizmų tyrimai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija N 004

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2015 – 2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute (iki 2016 m. Vilniaus universiteto Biochemijos institutas).

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (projektas „Epigenetinių veiksnių ir mikro RNR vaidmuo vaisiaus vandenių kamieninių ląstelių funkcionavime“, MIP-57/2015; gauta stipendija už akademinus pasiekimus).

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – dr. Augustas Pivoriūnas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biochemija - N 004).

Nariai:

dr. Virginija Bukelskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

prof. dr. Gediminas Čepinskas (Lawson Sveikatos mokslų institutas, Kanada, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

prof. dr. Diana Ramašauskaitė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2019 m. rugsėjo mėn. 27 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-101 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10527, Vilnius, Lietuva

Tel. +37052234420; el. paštas info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Monika
GASIŪNIENĖ

Regulation of differentiation and
epigenetic mechanisms of amniotic
fluid-derived stem cells

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2019

This dissertation was written between 2015 and 2019 at Vilnius University Life Sciences Center Institute of Biochemistry (until 2016 Vilnius University Institute of Biochemistry).

The research was supported by the Research Council of Lithuania (project „Regulation of amniotic fluid-derived stem cell functioning by microRNA and epigenetic factors”, contract No. MIP-057/2015; a scholarship was granted for academic accomplishments).

Academic supervisor:

Prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – dr. Augustas Pivoriūnas (State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

dr. Virginija Bukelskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

prof. dr. Gediminas Čepinskas (Lawson Health Research Institute, Canada, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

prof. dr. Diana Ramašauskaitė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13 h on 27 September 2019 in the meeting room R-101 of Vilnius University Life Sciences Center.

Address: Sauletekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania

Tel. +37052234420; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
1. METODAI	11
1.1. VV-MKL išskyrimas, kultivavimas ir diferenciacijos indukcija.....	11
1.2. Paviršiaus žymenų analizė tėkmės citometru	12
1.3. RNR išskyrimas ir AT-kPGR	13
1.4. Baltymų išskyrimas ir imuninė analizė	13
1.5. Ląstelės ciklo analizė.....	14
1.6. Ląstelių energetikos ir metabolizmo tyrimai	14
1.7. Imunofluorescencija ir kiekybinis branduolinio Nkx2.5 įvertinimas.....	15
1.8. Chromatino imunoišsodinimas, DNR sekoskaita ir duomenų analizė	15
1.9. Statistinė analizė.....	16
2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	17
2.1. VV-MKL charakterizavimas	17
2.2. VV-MKL diferenciacijos potencialas.....	19
2.2.1. Diferencijuotų VV-MKL morfologiniai pokyčiai.....	19
2.2.2. Genų ir baltymų raiškos pokyčiai indukuojant VV-MKL diferenciaciją.....	22
2.2.2.1. Genų raiškos pokyčiai osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu.....	22
2.2.2.2. Genų ir baltymų raiškos pokyčiai kardiomiogeninės diferenciacijos metu.....	24
2.3. Epigenetiniai pokyčiai VV-MKL indukuotų diferenciacijų metu ...	29
2.3.1. Epigenetiniai pokyčiai osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu	29

2.3.2. Epigenetiniai pokyčiai indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu	33
2.3.2.1. Chromatino imunoišsodinimo iš kardiomiogenine kryptimi indukuotų VV-MKL, naudojant antikūną prieš hiperacetilintą H4, tyrimo rezultatai	37
2.4. Ląstelių energetika ir metabolizmas kardiomiogeninės diferenciacijos metu	40
IŠVADOS.....	43
SUMMARY	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS / REFERENCES.....	51
REZULTATŲ VIEŠINIMAS	63
PADĖKA.....	655
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS.....	666
UŽRAŠAMS	67

SANTRUMPOS

- BMI1** – pirmojo Polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog*)
- Cx43** – Connexin43 baltymas
- DMEM** – Dulbecco's modifikuota Eagle terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DNMT** – DNR metiltransferazė (angl. *DNA methyltransferase*)
- ECAR** – užląstelinio rūgštėjimo greitis (angl. *extracellular acidification rate*)
- EKL** – embrioninės kamieninės ląstelės
- EZH2** – antrojo Polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*)
- FBS** – fetalinis veršiuko serumas (angl. *fetal bovine serum*)
- FITC** – fluoresceino izotiocianatas (angl. *fluorescein isothiocyanate*)
- HDAC** – histonų deacetilazė (angl. *histone deacetylase*)
- HP1 α** – heterochromatino baltymas 1 α (angl. *heterochromatin protein 1 α*)
- miR** – mikroRNR
- MKL** – mezenchiminės kamieninės ląstelės
- NDS** – natrio dodecilsulfatas (angl. *sodium dodecylsulphate, SDS*)
- OCR** – deguonies suvartojimo greitis (angl. *oxygen consumption rate*)
- PAA** – poliakrilamidas
- PE** – fikoeritinas (angl. *phycoerythrin*)
- Pft α** – Pifitinas- α
- PRC1 / 2** – Polikombo slopinantis kompleksas 1 / 2 (angl. *Polycomb repressive complex 1 / 2, PRC1 / 2*)
- RA** – retinoinė rūgštis (angl. *all-trans retinoic acid*)
- SUZ12** – antrojo Polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *suppressor of zeste 12 protein*)
- TGF- β 1** – transformuojantis augimo veiksnys-beta 1 (angl. *transforming growth factor- β 1*)
- VV-MKL** – vaisiaus vandenų mezenchiminės kamieninės ląstelės

ĮVADAS

Vaisiaus vandenų mezenchiminės kamieninės ląstelės (VV-MKL) – vienas iš ląstelių tipų, aptinkamų besivystančio vaisiaus vandenyse. Yra žinoma, kad vaisiaus vandenyse randama daugybė įvairių tipų vaisiaus ir ekstraembrioninių audinių ląstelių, pavyzdžiui, vaisiaus odos, placentos, epitelinių, virškinamojo, kvėpavimo ir šalinimo traktų ląstelės (De Coppi et al., 2007; Trohatau et al., 2013).

Vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės pasižymi mezenchiminių kamieninių ląstelių ypatybėmis, t.y. turi didelį proliferacijos ir atsinaujinimo potencialą ir geba diferencijuoti į mezodermos gemalinių lapelio ląstelių linijas (osteocitus, miocitus, riebalų, kremzlių ląsteles) (Tsai et al., 2004; Roubelakis et al., 2007; Savickiene et al., 2015). Tačiau labai svarbu pabrėžti, kad VV-MKL turi daug platesnį diferenciacijos potencialą nei iš suaugusio žmogaus audinių, pvz. riebalų ar kaulų čiulpų, surinktos mezenchiminės kamieninės ląstelės – VV-MKL gali diferencijuoti ir į ektodermos (nervinio audinio ląstelės) bei endodermos (hepatocitai) gemalinių lapelių ląsteles (Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007). Taigi, kamieninių ląstelių hierarchijoje VV-MKL užima nišą tarp pluriotentinių kamieninių ląstelių ir labiau diferencijuotų multipotentinių kamieninių ląstelių iš suaugusio žmogaus audinių (Ratajczak et al., 2014).

Be plataus diferenciacijos potencialo, VV-MKL pasižymi ir kitais privalumais, dėl kurių jos gali būti laikomos nauju alternatyviu kamieninių ląstelių šaltiniu ląstelių terapijai, regeneracinei medicinai bei audinių inžinerijai (Sessarego et al., 2008; Loukogeorgakis & De Coppi, 2017). Vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės yra terapiškai saugios: neimunogeniškos, nesukelia imuninės sistemos atsako net ir alogeninės transplantacijos atveju ir neformuoja teratomų *in vivo* (De Coppi et al., 2007; Loukogeorgakis & De Coppi, 2016). Be to, tai yra „jaunos“ kamieninės ląstelės, nes jos yra vaisiaus kilmės ir jų savybės priklauso tik nuo nėštumo trimestro, tačiau nepriklauso nuo donorės amžiaus, priešingai riebalinio audinio mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, kurių augimo kinetika, morfologija, diferenciacijos potencialas ir senėjimas priklauso nuo donoro amžiaus (Kornicka et al., 2015; Marędziak et al., 2016). Taigi, vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės pasižymi daugybe išskirtinių savybių ir turi galimą pritaikymą klinikiniuose tyrimuose ir terapijoje (Dziadosz et al., 2015; Loukogeorgakis & De Coppi, 2016), todėl jų funkcionavimo reguliavimo įvairių diferenciacijų metu molekulinį mechanizmų tyrimai suteikia

papildomų žinių norint kuo efektyviau pritaikyti šias ląsteles klinikinėje praktikoje.

Greta kamieninių ląstelių reguliavimo transkripciniame ir transliaciniame lygmenyse, labai svarbų vaidmenį vaidina ir epigenetinė reguliacija – ji apima trumpas ir ilgas nekoduojančias RNR, DNR metilinimą, chromatino modifikavimo baltymus bei histonų modifikacijas (Klose & Bird, 2006). Parodyta, kad embrioninėse kamieninėse ląstelėse (EKL) DNR metilinimas ir histonų metilinimas bei acetilinimas kartu su Polikombo slopinančiais kompleksais 1 ir 2 yra pagrindiniai kamieniškumo reguliatoriai, palaikantys bivalentinę chromatino struktūrą genuose, atsakinguose už embriono vystymąsi ir diferenciaciją (Meissner et al., 2008; Fouse et al., 2008; Barrand & Collas, 2010; Aloia et al., 2013). Jie veikia lygiagrečiai su kamieniškumą palaikančiais ir diferenciaciją slopinančiais transkripcijos faktoriais Oct4, Sox2 ir Nanog bei mikroRNR (Kashyap et al., 2009). Suaugusio žmogaus mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse diferenciacijos įvairiomis kryptimis metu histonus modifikuojantys fermentai taip pat vaidina labai reikšmingą reguliacinį vaidmenį (Wei et al., 2011; Haberland et al., 2010; Hemming et al., 2014). Tad ir vaisiaus vandenų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse, kurios pagal diferenciacijos potencialą užima nišą tarp embrioninių ir suaugusio žmogaus kamieninių ląstelių, epigenetiniai veiksniai ir jų dalyvavimas nediferencijuotos būsenos palaikyme bei indukuotų diferenciacijų metu neabejotinai yra labai svarbūs. Deja, minėti epigenetiniai mechanizmai VV-MKL kol kas ne itin plačiai išaiškinti, tad jų tyrimai svariai prisidėtų prie šių ląstelių apibūdinimo ir galimo terapinio panaudojimo.

Darbo tikslas: išaiškinti vaisiaus vandenų mezenchiminių kamieninių ląstelių molekulinis (genetinius bei epigenetinius) pokyčius po diferenciacijos indukcijos įvairiomis kryptimis (osteogenine, miogenine, neurogenine ir kardiomiogenine).

Darbo uždaviniai:

1. Charakterizuoti VV-MKL pagal paviršiaus žymenų ir kamieniškumo genų raišką po ląstelių išskyrimo ir įvertinti molekulinis pokyčius skirtingomis kryptimis (osteogenine, miogenine, neurogenine ir kardiomiogenine) diferencijuotose VV-MKL.
2. Nustatyti epigenetinių veiksnių, tokių kaip chromatino pertvarkymo baltymų ir modifikuotų histonų, pakitimus, vykstančius indukavus VV-MKL diferenciaciją osteogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis.

3. Ištirti epigenetinius virsmus indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu bei identifikuoti genus, praturtintus sąveika su hiperacetilintu H4 ir dalyvaujančius epigenetiniame kardiomiogeninės diferenciacijos reguliavime.
4. Įvertinti kardiomiogenine kryptimi indukuotų VV-MKL energetinį fenotipą ir metabolizmo pokyčius.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Šiame darbe visapusiškai nagrinėjome procesus, vykstančius žmogaus vaisiaus vandens kamieninių ląstelių diferenciacijos įvairiomis kryptimis metu. Parodėme, kad šioms ląstelėms diferencijuojantis osteogenine, miogenine, neurogenine ir kardiomiogenine kryptimis chromatinas yra visuotinai pertvarkomas, keičiasi histonų modifikacijų bei mikroRNR profilis. Tai reikalinga, kad būtų aktyvuojami diferenciaciją skatinantys genai ir slopinami genai, susiję su ląstelės atsinaujinimu ir kamieniškumo palaikymu. Pirmieji išsamiai išnagrinėjome žmogaus VV-MKL ląstelės ciklo pokyčius ir jo reguliavimą, atlikome ląstelės energetikos ir metabolizmo tyrimus indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu bei parodėme, kad VV-MKL diferencijuojant į kardiomiocitų pirmtakus aktyvuojami genai yra praturtinti transkripciškai aktyvią chromatino būseną lemiančiu hiperacetilintu histonu H4. Taip pat parodėme, kad inicijuoti VV-MKL pokyčius link kardiomiogeninės diferenciacijos galima naudojant cheminės prigimties agentus (DNMT ir p53 slopiklius) ir kai kurias biomolekules (Angiotenziną II, TGF- β 1). Pastarosios natūraliai aptinkamos žmogaus organizme, dalyvauja daugybėje signalinių kelių įvairių audinių ląstelėse, tad yra laikomos saugiomis, o jų sukelti genetiniai, epigenetiniai bei metaboliniai pokyčiai yra labai panašaus lygio, kaip ir veikiant cheminiams agentams.

Gauti tyrimų rezultatai papildo esamas žinias apie dar pakankamai naują kamieninių ląstelių šaltinį – žmogaus vaisiaus vandens kamienines ląsteles, jų funkcionavimą bei molekulinis mechanizmus įvairių diferenciacijų metu. Mūsų gauti duomenys atskleidžia galimą žmogaus VV-MKL praktinį pritaikomumą medicinoje. Ateityje šios ląstelės sėkmingai gali būti panaudotos ląstelių terapijoje ar regeneracinėje medicinoje, pvz. kaulų atstatymui, širdies raumens regeneracijai po miokardo infarkto ar kitų širdies ir kraujagyslių sistemos ligų gydymui.

1. METODAI

1.1. VV-MKL išskyrimas, kultivavimas ir diferenciacijos indukcija

Vaisiaus vandenys (dažniausiai antro trimestro metu, 14-28 savaitę) paimti amniocentezės būdu iš nėščių moterų, kurioms reikalinga priešgimdyvinė vaisiaus diagnostika, tačiau atlikus tyrimus jokių genetinių pakitimų neaptikta, tad iš jų išskirtos ląstelės laikomos sveikomis (norma). Visi protokolai buvo patvirtinti Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto (leidimo nr. 158200-123-428-122). VV-MKL buvo išskirtos kaip aprašyta ankstesniuose darbuose (Savickienė et al., 2015; Gasiūnienė et al., 2019a, b, c, d), t. y. vaisiaus vandenys centrifuguojami 20 min. 500 x g kambario temperatūroje, nusėdusios ląstelės plaunamos steriliu PBS tirpalu (fosfatinu buferiniu tirpalu, angl. *phosphate buffered saline*) ir suspenduojamos augimo terpėje AmnioMAX-C100 su AmnioMAX-C100 priedu, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino (Gibco). Ląstelės auginamos 37 °C termostate, 5 % CO₂. Po 10-15 dienų terpė su dar neprikibusiomis VV-MKL pernešama į naują auginimo indą. Čia prikibusios VV-MKL dauginamos ir naudojamos tyrimams. Ląstelės persėjamos pasiekus 70-80 % konfluenciją, naudojant 0,05 % tripsino-EDTA tirpalą (Gibco).

Diferenciacija skirtingomis kryptimis buvo inicijuota ląstelėms augant monosluoksniu:

a) osteogeninė diferenciacija indukuota naudojant komercinę diferenciacijos terpę StemPro Osteogenesis Differentiation kit (Gibco), keičiant ją kas 2-3 dienas 15 dienų. Diferencijuotos ląstelės įvertintos morfologiškai naudojant Alizarin Red dažą ir pagal būdingų genų-žymenų raišką. Detalus protokolas pateiktas Glemžaitė & Navakauskienė (2016).

b) kardiomiogeninė diferenciacija indukuota dvejopai: naudojant DNR metiltransferazių slopiklius (Decitabina, Zebularina, RG108 (Sigma-Aldrich)) ir p53 slopiklį Pifitriną- α (Merck-Millipore) bei biomolekules (Angiotenziną II (Sigma-Aldrich) ir transformuojantį augimo veiksnį- β 1, angl. *Transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1* (R&D Systems)). Ląstelės diferencijuotos 12 dienų, vėliau įvertintos morfologiškai, pagal kardiomiocitų genų-žymenų raišką, kardiomiocitų jonų kanalų genų raišką, Connexin43 baltymo lygį ir lokalizaciją. Induktorių koncentracijos ir diferenciacijos terpių sudėtis pateikta Gasiūnienė et al. (2019a) ir Gasiūnienė et al. (2019d).

c) miogeninė diferenciacija indukuota pridodant 2 % arklio serumo (Gibco) į DMEM terpę (Gibco) su 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml

streptomicino. Diferenciacijos terpė keičiama kas 2-3 dienas 12 dienų. Daugiabranduolės ląstelės vizualizuotos 0,1 % Kristalinio violeto dažų bei pagal būdingų genų raišką. Detalesnis aprašymas pateiktas Gasiūnienė et al. (2019b).

d) neurogeninė diferenciacija indukuota pridėjant 1,5 μ M all-*trans* retinoinės rūgšties į DMEM/F12 terpę su GlutaMax ir N2 priedu (Gibco). Diferenciacijos terpė keičiama kas 2-3 dienas 12 dienų. Morfolginiai pokyčiai stebimi nudažius ląsteles 0,1 % Kristalinio violeto dažų bei pagal būdingų genų raišką. Detalesnis aprašymas pateiktas Gasiūnienė et al. (2019b).

e) adipogeninė diferenciacija indukuota naudojant komercinę diferenciacijos terpę STEMPro Adipogenic Differentiation medium (Gibco), keičiant ją kas 2-3 dienas 12 dienų. Diferencijuotos ląstelės įvertintos morfolgiškai dažant susidariusius riebalų lašelius Oil Red O dažų (Gasiūnienė et al., 2019b).

f) chondrogeninė diferenciacija indukuota naudojant komercinę diferenciacijos terpę STEMPro Chondrogenic Differentiation medium (Gibco), keičiant ją kas 2-3 dienas 12 dienų. Diferencijuotos ląstelės įvertintos dažant 1 % Alcian Blue dažų (3 % acto rūgštyje) (Gasiūnienė et al., 2019b).

1.2. Paviršiaus žymenų analizė tėkmės citometru

Paviršiaus žymenų nustatymui tėkmės citometru ląstelės pažymėtos specifiniais antikūnais prieš tiriamus ląstelių paviršiaus baltymus kaip aprašyta Glemžaitė & Navakauskienė (2016). Naudoti šie žymėti antikūnai: pelės prieš žmogaus CD44, žymėti fluoresceino izotiocianatu (*angl.*, fluorescein isothiocyanate (FITC)) (Invitrogen), CD45-FITC (BD Pharmingen), CD34-FITC (Miltenyi Biotec) ir CD90-FITC (Molecular Probes), pelės prieš žmogaus CD105, žymėti fikoeritrinu (*angl.*, phycoerythrin (PE)) (Invitrogen). Pelės IgG2A-FITC (Miltenyi Biotec), IgG1-FITC, IgG2b-FITC (Invitrogen) bei IgG1-PE (Molecular Probes) buvo naudoti kaip izotipinės kontrolės. Žymėti mėginiai analizuoti tėkmės citometru Guava easyCyte 8HT (Millipore) su InCyte 2.2.2 programa arba BD FACSCanto II ir BD FACSDIVA programa (BD Biosciences).

1.3. RNR išskyrimas ir AT-kPGR

RNR išskirta naudojant TRIzol reagentą (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo nurodymus. Genų raiškos analizei kopijinė DNR (kDNR) sintetinta naudojant Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (AT-kPGR) vykdyta naudojant Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) ir Rotor-Gene 6000 termociklerį (Qiagen Instruments AG). Santykinė genų raiška (lyginant su nediferencijuota kontrole) apskaičiuota $\Delta\Delta C_t$ metodu, normalizavus pagal *GAPDH* raišką. Naudoti pradmenys pateikti šiuose šaltiniuose: Glemžaitė & Navakauskienė (2016); Gasiūnienė et al. (2019a, b, c, d).

mikroRNR raiškos analizei, specifinė kDNR buvo sintetinta naudojant Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit ir Taqman MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific). mikroRNR raiškos lygis tirtas naudojant Taqman MicroRNA Assay ir Taqman Universal PCR Master Mix II, without UNG (Thermo Fisher Scientific). mikroRNR lygis normalizuotas pagal RNU48 raišką, santykinė raiška (lyginant su nediferencijuota kontrole) apskaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_t$ metodą. Tirtos šios mikroRNR: miR-223, miR-21, miR-34a, miR-17, miR-148b, miR-145, miR-146a.

1.4. Baltymų išskyrimas ir imuninė analizė

Visi ląstelės baltymai buvo išskirti naudojant NDS lizės buferinį tirpalą, kaip pateikta Glemžaitė & Navakauskienė (2016). Baltymų lizatas buvo išfrakcionuotas gradientiniame NDS-PAA gelyje (7,5-15 %) ir perneštas ant PVDF membranos. Tiriami baltymai detektuoti naudojant šiuos pirminius antikūnus prieš žmogaus baltymus: ožkos prieš DNMT1, pelės prieš HDAC1 ir HDAC2, pelės prieš p21 ir p53 (Santa Cruz Biotechnology), triušio prieš EZH2 ir SUZ12 (Cell Signaling), triušio prieš H3K4me3, H3K9Ac, H3K9me3, H3K27me3, H4 hiperacetilintą, pelės prieš BMI1 ir prieš HP1 α (Merck-Millipore), triušio prieš Connexin43 (Thermo Scientific), triušio prieš Nkx2.5 (GeneTex). Pirminiai pelės antikūnai prieš *GAPDH* ar triušio prieš H4 (Abcam,) buvo naudojami kaip užnešimo kontrolė. Antriniai antikūnai prieš pelės, triušio ar ožkos imunoglobulinius buvo žymėti krienų peroksidaze (Dako), chemiluminescencinė baltymų detekcija vykdyta naudojant Clarity Western ECL Substrate ir ChemiDoc XRS+system su Image Lab programine įranga (Bio-Rad Laboratories). Pusiau kiekybinis išryškintų baltymų juostelių įvertinimas atliktas naudojant ImageJ programą (NIH), santykinis kiekvienos

baltymo juostelės tankis normalizuotas pagal užnešimo kontrolės tankį ir apskaičiuotas pokytis (kartais) diferencijuotose ląstelėse lyginant su nediferencijuota kontrole.

1.5. Ląstelės ciklo analizė

Ląstelės ciklo matavimui per naktį 96 % etanoliu fiksuotos ląstelės buvo nudažytos propidžio jodidu ir analizuotos tėkmės citometru BD FACSCanto II. Detali informacija pateikta Gasiūnienė et al. (2019d).

1.6. Ląstelių energetikos ir metabolizmo tyrimai

Diferencijuotų ir kontrolinių ląstelių energetinis profilis buvo nustatytas naudojant Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer ir Cell Energy Phenotype Test Kit (Agilent Technologies). Mitochondrinis kvėpavimas išmatuotas naudojant tą patį analizatorių ir Cell Mito Stress Test Kit. Matavimo metu lygiagrečiai detektuojamas deguonies suvartojimo greitis (angl. *oxygen consumption rate (OCR)*) ir užląstelinio rūgštėjimo greitis (angl. *extracellular acidification rate (ECAR)*). Pirmiausia nustatomos bazinės šių parametrų vertės (be elektronų pernašos grandinės slopiklių), o vėliau palaipsniui pridėdama elektronų pernašos grandinės slopiklių: oligomicino (slopina V ATP sintazės kompleksą), FCCP (suardo protonų gradientą) ir rotenono kartu su antimicinu A (slopina III ATP sintazės kompleksą), ir matuojamas OCR ir ECAR. Išmatavus, ląstelės buvo surinktos, sulizuotos RIPA buferiniu tirpalu ir išmatuota suminė baltymų koncentracija naudojant DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) ir spektrofotometrą Infinite M200 Pro (Tecan). Visuose skaičiavimuose OCR ir ECAR vertės normalizuotos pagal baltymų kiekį ir išreikštos mikrogramui baltymo. Įvertinti ir apskaičiuoti šie parametrai: a) ląstelių energetinis fenotipas (aerobinis ar glikolitinis); b) OCR/ECAR santykis, nurodantis, ar vyrauja oksidacinis fosforilinimas, ar glikolizė; c) metabolinis potencialas (procentais) – OCR padidėjimas po oligomicino ir FCCP pridėjimo lyginant su bazine OCR verte bei ECAR padidėjimas tomis pačiomis sąlygomis lyginant su bazine ECAR verte, rodo ląstelių gebėjimą prisitaikyti prie maksimalių energijos sąnaudų per kvėpavimą ar glikolizę; d) maksimalus kvėpavimas (angl. *maximal respiration*) – skirtumas tarp OCR vertės pridėjus FCCP ir nemitochondrinio OCR (pridėjus visų slopiklių), išreiškiamas kaip pokytis (kartais) lyginant su bazine OCR verte; e) rezervinė kvėpavimo talpa (angl. *spare respiratory capacity*) – santykis (procentais) tarp bazinio ir maksimalaus kvėpavimo, kur

bazinis kvėpavimas atspindi tik mitochondrinį kvėpavimą; f) ATP gamyba – OCR skirtumas prieš pridėdant oligomicino ir pridėjus; g) sujungimo efektyvumas (angl. *coupling efficiency*), procentais – santykis tarp ATP gamybos ir bazinio OCR.

1.7. Imunofluorescencija ir kiekybinis branduolinio Nkx2.5 įvertinimas

Baltymų detekcijai imunofluorescencijos būdu kontrolinės ir diferencijuotos VV-MKL buvo išsėtos ant stikliukų ir detektuoti tiriami baltymai – plyšinių jungčių komponentas Connexin43 ir transkripcijos veiksnys Nkx2.5 (Gasiūnienė et al., 2019d). Connexin43 detekcijai stikliukai inkubuoti su pirminiais triušio antikūnais prieš Connexin43 ir antrinais ožkos prieš triušio IgG Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor-488 antikūnais (Thermo Fisher Scientific), f-aktinas žymėtas naudojant Alexa Fluor-594 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific). Nkx2.5 detekcijai stikliukai inkubuoti su pirminiais triušio antikūnais prieš Nkx2.5 ir antrinais ožkos prieš triušio IgG Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor-594 antikūnais (Thermo Fisher Scientific), f-aktinas šiose ląstelėse žymėtas naudojant Alexa Fluor-488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific). Ląstelių branduoliai nudažyti 300 nM DAPI tirpalu. Mėginiai analizuoti Zeiss Axio Observer (Zeiss) fluorescenciniu mikroskopu, 63X imersiniu objektyvu, naudojant Zen BLUE programinę įrangą. Nkx2.5 kiekis branduolyje buvo apskaičiuotas kaip raudonai fluorescuojančių taškų kiekis branduolio regione naudojantis imunofluorescencijos vaizdas ir Matlab™ aplinka (The MathWorks). Duomenys pateikti Tukey stiliaus grafiku, pokyčiai tarp mėginių ir kontrolės medianų įvertinti statistiniu Wilcoxon ranginiu testu. Matematinės operacijos plačiau aprašytos Gasiūnienė et al. (2019a).

1.8. Chromatino imunoišsodinimas, DNR sekoskaita ir duomenų analizė

Chromatino imunoišsodinimas atliktas naudojant rinkinį Zymo-Spin ChIP kit (Zymo Research Corp) su modifikacijomis ir antikūną prieš hiperacetilintą histoną H4 ir aprašytas Gasiūnienė et al. (2019c). DNR fragmentų, praturtintų anti-hiperacetilintu H4 antikūnu, biblioteka paruošta su rinkiniu KAPA HyperPrep Library Preparation Kit (Kapa Biosystems). DNR kiekis ir kokybė įvertinta spektrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific), fluorimetru Quantus (Promega Corporation) ir 2100 bioanalizatoriumi

(Agilent Technologies). Bibliotekos kvantifikuotos kPGR ir naujos kartos sekoskaita vykdyta HiSeq 1500 (Illumina). Gauti duomenys apdoroti Trimmomatic programa (Usadel Lab), prilyginti žmogaus referentiniam genomui (hg38) ir detektuoti išsodinti pikai. Šie pikai priskirti genų promotoriams (3 kb į viršų ir 0,5 kb žemyn nuo transkripcijos pradžios vietos) ir genų kūnams, atlikta jų diferencinė analizė bei funkcinė analizė genų, kurie galimai reguliuojami H4 acetilinimu promotoriuose ar genų kūnuose. Detalus bioinformatinės analizės aprašymas pateiktas Gasiūnienė et al. (2019c).

1.9. Statistinė analizė

Visi eksperimentai buvo pakartoti mažiausiai 3 kartus, jei neapibrėžta kitaip. Duomenys pateikti kaip vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. Statistinė analizė atlikta naudojant Stjudento t-testą ar vienkryptę ANOVA su Tukey testu GraphPad Prism programoje.

Išsodintos DNR sekoskaitos duomenims palyginti ir statistiškai įvertinti įvesta tikimybė aptikti atsitiktinai (angl. *probability of obtaining by chance* – *POC*). Pvz., jei ji lygi 0,01, tai reiškia, kad atlikus 2 mėginių (kontrolės ir diferencijuotų ląstelių) pikų diferencinę persidengimo analizę 100 kartų, yra 1 % tikimybė, kad jie sutaps atsitiktinai.

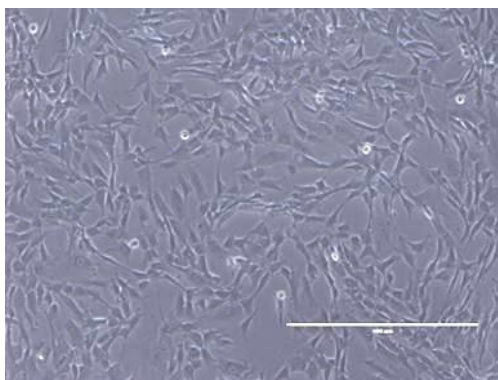
2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šioje dalyje aptariami rezultatai, pateikti su disertacijos tema susijusiose publikacijose, dėmesį kreipiant į VV-MKL diferenciacijos reguliavimą ir epigenetinius mechanizmus.

2.1. VV-MKL charakterizavimas

Tyrimuose naudotos žmogaus vaisiaus vandenų mezenchiminės kamieninės ląstelės išskirtos iš antrojo trimestro nėščių moterų vaisiaus vandenų. Po išskyrimo ląstelės kultivuotos ir charakterizuotos pagal keletą požymių: morfologiją, kamieniškumą, paviršiaus žymenų raišką bei diferenciacijos potencialą.

Žmogaus VV-MKL pasižymi verpstiška, pailga, fibroblastiška forma (2.1 pav.).



2.1 pav. VV-MKL morfologija kultivavimo metu, mikroskopo skalė – 400 μm (Gasiūnienė et al., 2019d).

Nustatėme, kad joms būdinga tam tikrų paviršiaus žymenų raiška: daugiau nei 95 % VV-MKL turi CD44 (ląstelių adhezijos molekulė), CD90 (Thy-1, timocitų antigenas-1) ir CD105 (endoglinas) molekules, tačiau yra neigiamos pagal CD34 (hematopoetinių ląstelių žymuo) ir CD45 (leukocitų antigenas) žymenis. Parodėme, kad, kaip ir embrioninėse kamieninėse ląstelėse, VV-MKL vyksta kamieniškumo genų, tokių kaip *OCT4*, *SOX2*, *REX1* ir *NANOG* raiška (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019a, b, c, d). Kadangi šios vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės yra priskiriamos mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, be jau paminėtų charakteristikų, jos taip pat, kaip ir mezenchiminės kamieninės, *in vitro* gali

diferencijuoti bent trimis kryptimis – adipogenine, osteogenine, chondrogenine (Gasiūnienė et al., 2019b), o kaip parodėme mes – taip pat ir miogenine, neurogenine bei kardiomiogenine kryptimis. Taigi, VV-MKL pilnai atitinka Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos (angl. *International Society for Cellular Therapy*) pateiktus mezenchiminių kamieninių ląstelių kriterijus: morfologiją, specifinių paviršiaus žymenų, tokių kaip CD44, CD90, CD105, raišką ir CD34 ar CD45 nebuvimą bei diferenciacijos potencialą *in vitro* trimis kryptimis (Dominici et al., 2006).

Indukuotų diferenciacijų metu ląstelės praranda kamieniškumą, kadangi pradeda diferencijuoti ir virsti specializuotomis ląstelėmis – osteocitų, miocitų, neuronų ar kardiomiocitų pirmtakais ir kt., taigi ir kamieniškumo genų raiška turėtų mažėti. Parodyta, kad visi kamieniškumo žymenys – Oct4, Sox2, Rex1 ir Nanog – formuoja uždarą kamieninių ląstelių reguliacijos tinklą, kontroliuojantį pagrindinių kamieniškumo genų raišką (Rodda et al., 2005). Mūsų tirtose kamieninėse ląstelėse po osteogeninės ir kardiomiogeninės diferenciacijos indukcijos sumažėja *SOX2*, *REX1* (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019c, d) bei *NANOG* (Gasiūnienė et al., 2019c) genų raiška. Yra žinoma, kad Sox2 kartu su Oct4 valdo visą kamieniškumo reguliacijos tinklą ir skatina ląstelių proliferaciją palengvindami jų perėjimą iš G1 ląstelės ciklo fazės į S fazę (Chen et al., 2008). Mūsų gautais duomenimis, indukuotų diferenciacijų metu VV-MKL stabdomas augimas bei ląstelės ciklas (Gasiūnienė et al., 2019d) ir viena iš to priežasčių galimai yra Sox2 raiškos kritimas. Taip pat yra žinoma, kad Sox2 laikomas vienu iš Rex1 reguliatorių kartu su kitais kamieniškumo žymenimis (Shi et al., 2006), tad žemesni Sox2 kiekiai koreliuoja su sumažėjusiais Rex1 kiekiais indukuotose ląstelėse.

Taigi VV-MKL pasižymi bruožais, būdingais ir embrioninėms kamieninėms ląstelėms (kamieniškumo genų raiška), ir suaugusio žmogaus mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms (paviršiaus žymenų raiška). Indukavus diferenciaciją, jų augimas lėtėja, o kamieniškumo požymiai silpnėja ląstelėms pereinant į labiau specializuotą būseną. Toliau aptariamais VV-MK ląstelių diferenciacijos įvairiomis kryptimis metu vykstantys molekuliniai pokyčiai.

2.2. VV-MKL diferenciacijos potencialas

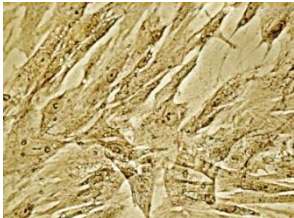
Kaip jau buvo minėta, VV-MKL pasižymi platesniu diferenciacijos potencialu nei MKL iš suaugusio žmogaus audinių, kadangi jos gali diferencijuoti ne tik į mezodermos gemalinių lapelio ląstelių linijas, tačiau ir į kitų gemalinių lapelių ląsteles (Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007). Šiame darbe VV-MKL buvo tiriamos *in vitro* indukavus diferenciaciją osteogenine, miogenine, neurogenine ir kardiomiogenine kryptimis.

2.2.1. Diferencijuotų VV-MKL morfologiniai pokyčiai

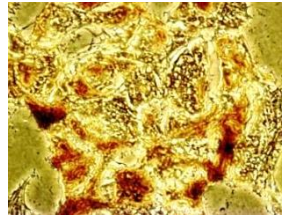
Įvykusią sėkmingą VV-MKL diferenciacijos indukciją pirmiausia įvertinome pagal ląstelių morfologinius pokyčius.

Osteogeninė diferenciacija šiame darbe buvo indukuota naudojant komercinę diferenciacijos terpę. Vykstant šiai diferenciacijai, ląstelės pradeda gaminti mineralines nuosėdas, sudarytas iš kalcio katijonų ir neorganinių fosfatų, kurie kaupiasi tarpląsteliniame užpilde ląstelių monosluoksniu paviršiuje (Stein et al., 1990). Šias kalcio sandaugas 15 dienų diferencijuotose VV-MK ląstelėse galima stebėti nudažius jas Alizarin Red dažu, kai tuo tarpu nediferencijuotose kontrolinėse ląstelėse kalcio sandaugų nematyti (2.2 pav., Glemžaitė & Navakauskienė, 2016).

Nediferencijuotos ląstelės



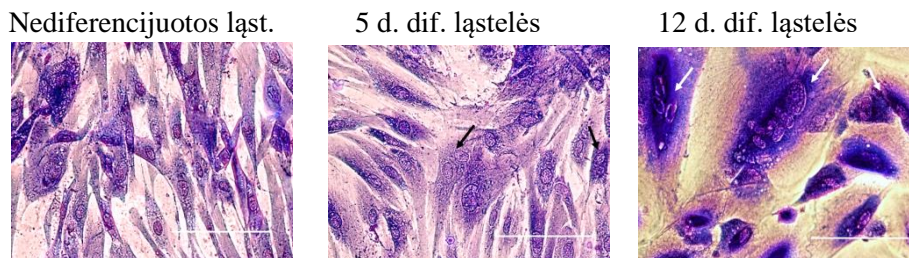
Diferencijuotos ląstelės



2.2 pav. Osteogenine kryptimi diferencijuotos VV-MKL (15 d.), dažytos Alizarin Red dažu. Mikroskopo padidinimas – 20X (pagal Glemžaitė & Navakauskienė, 2016).

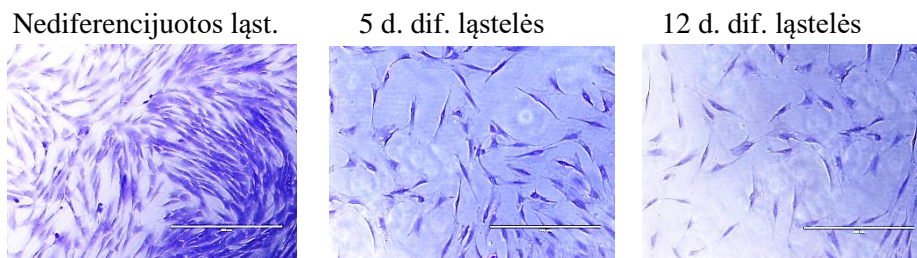
Miogeninės VV-MKL diferenciacijos indukcijai naudojome arklio serumą. Jis turi nedaug augimą skatinančių veiksnių, todėl ląstelių proliferacija yra lėtesnė ir paskatinama diferenciacija (Franke et al., 2014; Lin et al., 2014). Taip pat, nesant augimo veiksnių, aktyvuojama MyoD transkripcijos veiksnių šeima, kurie yra specifiniai raumenų ląstelėms, slopina ląstelių dalijimąsi ir aktyvina diferenciaciją (Olson 1992). Pagrindinis miogeninės diferenciacijos bruožas – daugiabranduolių ląstelių atsiradimas.

Gauti rezultatai rodo, kad daugiabranduolės ląstelės aptinkamos jau 5 dieną nuo diferenciacijos indukcijos pradžios, o po 12 dienų po diferenciacijos indukcijos jų dar labiau padaugėja (2.3 pav., Gasiūnienė et al., 2019b).



2.3 pav. Miogenine kryptimi diferencijuotos VV-MKL po 5 ir 12 d. diferenciacijos indukcijos, dažytos Kristalinio violeto dažu. Rodyklėmis parodytos daugiabranduolės ląstelės, mikroskopo skalė – 400 μ m (pagal Gasiūnienė et al., 2019b).

Neurogeninė diferenciacija indukuota retinoine rūgštimi (angl. *all-trans retinoic acid*). Retinoinė rūgštis (RA) – signalinė molekulė, dalyvaujanti nerviniame vystymese, diferenciacijoje ir aksonų augime (Maden et al., 2007). Yra parodyta, kad RA viena ar kombinacijoje su kitais cheminiais agentais (IBMX, BDNF, Forskolin) bei augimo veiksniais pagerina neurogeninės diferenciacijos indukcijos efektyvumą (Jin et al., 2015; Rafieemehr et al., 2015). Įvykusią neurogeninę diferenciaciją morfologiškai vertinome pagal ląstelių formos pakitimą – ląstelės kūnas pailgėja, ląstelės išsitempia, susidaro ląstelių atšakos (2.4 pav., Gasiūnienė et al., 2019b).



2.4 pav. Neurogenine kryptimi diferencijuotos VV-MKL po 5 ir 12 d. diferenciacijos indukcijos, dažytos Kristalinio violeto dažu. Mikroskopo skalė – 400 μ m (pagal Gasiūnienė et al., 2019b).

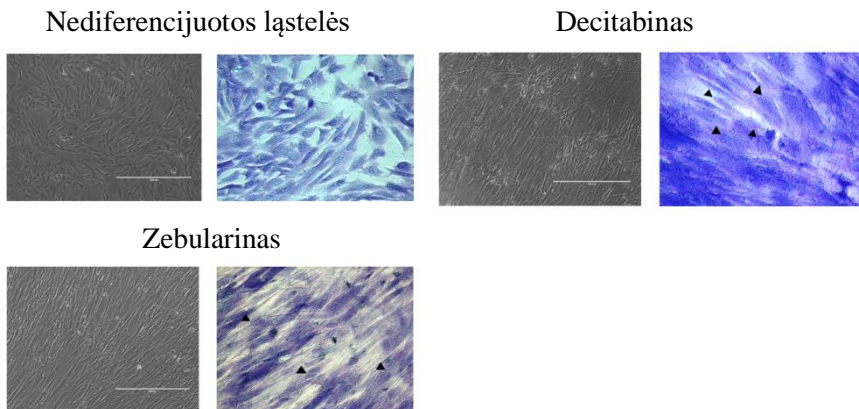
Kardiomiogeninė diferenciaciją šiame darbe indukavome dvejopai: naudodami cheminės prigimties agentus – DNR metiltransferazių (DNMT) slopiklius Decitabiną (5-aza-2'-deoksicitidiną), Zebulariną, RG108 bei p53

baltymo slopiklį Pifitriną- α ir biomolekules, tokias kaip Angiotenzinas II (AngII) ir transformuojantis augimo veiksnys-beta 1 (TGF- β 1) (2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Naudoti kardiomiogeninės diferenciacijos induktoriai

Kardiomiogeninės diferenciacijos induktorius	Funkcija
Decitabinas	Nukleozidinis DNMT slopiklis, indukuoja žmogaus VV-KL kardiomiogeninę diferenciaciją (Guan et al., 2011).
Zebularinas	Nukleozidinis DNMT slopiklis, indukuoja pelės embrioninių kamieninių ląstelių kardiomiogeninę diferenciaciją (Horrilo et al., 2013).
RG108	Nenukleozidinis DNMT slopiklis, pasižymi priešvėžiniu efektu prostatos vėžio (Graca et al., 2014) ar leukemijos atveju (Savickienė et al., 2012), kardiomiogeninėje diferenciacijoje netirtas.
Pifitras- α	P53 baltymo slopiklis, tirtas kaip galimas kardiomiogeninės diferenciacijos induktorius žiurkės kaulų čiulpų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse (Yan et al., 2011; Liu et al., 2013).
Angiotenzinas II	Vienas iš renino-angiotenzino sistemos komponentų, kuri labai svarbi kamieninėse ląstelėse ir širdies-kraujagyslių sistemos vystymesi (Ahmadian et al., 2015). Sukelia žiurkės kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciaciją link kardiomiocitų (Xing et al., 2012).
TGF- β 1	Citokinų šeimos, dalyvaujančios širdies-kraujagyslių sistemos vystymesi ir inkstų renino-angiotenzino sistemoje, narys (Azhar et al., 2003). Inicijuoja žmogaus ar žiurkės kaulų čiulpų kamieninių ląstelių diferenciaciją link kardiomiocitų pirmtakų (Mohanty et al., 2013; Lv et al., 2016).

Visais tirtais atvejais kardiomiogeninės diferenciacijos metu VV-MK ląstelės padidėja, pailgėja, sudaro labai tankų pluoštinį monosluoksnį (Gasiūnienė et al., 2019a, d), kai kur atsiranda dvibranduolių ląstelių (2.5 pav., Gasiūnienė et al., 2019c).



2.5 pav. Kardiomiogenine kryptimi diferencijuotos VV-MKL, indukuotos naudojant Decitabiną ir Zebulariną, 12 d. po diferenciacijos indukcijos. Pateikiamos nedažytų ląstelių ir Kristalinio violeto dažų dažytų ląstelių nuotraukos, rodyklėmis pažymėtos dvibranduoless ląstelės. Mikroskopo skalė – 400 μm (pagal Gasiūnienė et al., 2019c).

Taigi, visų indukuotų diferenciacijų metu ląstelių morfologija stipriai pakinta lyginant su nediferencijuotomis kontrolinėmis ląstelėmis. Tai pirmasis požymis, rodantis, kad VV-MKL pasikeičia ir iš kamieninių ląstelių tampa labiau specializuotomis. Kitas požymis – specifinių, su diferenciacija susijusių genų ir baltymų raiškos aktyvinimas, aprašytas toliau einančiame skyriuje.

2.2.2. Genų ir baltymų raiškos pokyčiai indukuojant VV-MKL diferenciaciją

2.2.2.1. Genų raiškos pokyčiai osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu

Be pakitusios MK ląstelių morfologijos, kitas prasidėjusios indukuotos diferenciacijos požymis – padidėjusi diferencijuotoms ląstelėms specifinių genų, susijusių su specializuotų ląstelių funkcijomis ir struktūriniais pokyčiais, raiška. Osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu tirtų genų aprašymas pateiktas 2.2 lentelėje. Šie genai laikomi tirtų diferenciacijų žymenimis, kurių raiškos padidėjimą indukuotose ląstelėse galima laikyti sėkmingos diferenciacijos iniciacijos požymiu.

2.2 lentelė. Tirti diferencijuotų ląstelių genai-žymenys

Tirti genai	Genų koduojamų baltymų funkcijos
OSTEOGENINĖ DIFERENCIACIJA	
ALP (angl. <i>Alkaline Phosphatase</i>)	Šarminė fosfatazė, dalyvauja kietųjų audinių formavimesi ir yra gaminama dideliais kiekiais mineralizuotų audinių ląstelėse (Marom et al., 2005; Golub & Boesze-Battaglia, 2007).
Osteopontinas	Laikomas mezenchiminių ląstelių osteogenezės žymeniu (Zohar et al., 1998).
MIOGENINĖ DIFERENCIACIJA	
Aktininas- α (<i>ACTN2</i> , angl. <i>Actinin alpha 2</i>)	Griaučių raumenų žymuo, sarkomerų dalis, jungia aktino filamentus, formuoja Z diskus (Baldassarri et al., 2012).
Kalponinas	Lygiųjų raumenų žymuo (Duband et al., 1993).
Desminas (<i>DES</i>)	Lygiųjų ir griaučių raumenų žymuo, tarpinių filamentų baltymas, aptinkamas kraujagyslių lygiuosiuose raumenyse, susijęs su raumenų gebėjimu susitraukinėti, tad randamas ir širdies raumenyse (Capetanaki et al., 1997).
MRF4 (angl. <i>myogenic regulatory factor 4</i>)	Griaučių raumenų žymuo, dalyvauja embrioninėje, bet ne suaugusio individo miogenezėje kartu su MyoD1, miogenu ir Myf5 baltymais (Rhodes & Konieczny, 1989; Zammit 2017).
NEUROGENINĖ DIFERENCIACIJA	
Nestinas (<i>NES</i>)	Tarpinių filamentų baltymas, nediferencijuotų nervinių kamieninių ląstelių ar jau specializuotis pradėjusių pirmtakinių ląstelių žymuo, atsirandantis vystantis centrinei nervų sistemai (Lendahl et al., 1990; Dahlstrand et al., 1995).
NSE (angl. <i>neuron-specific enolase</i>)	Glikolitinis izofermentas, skirtingos izoformos aptinkamos neuronuose ir glijos ląstelėse. Vėlyvos nervinės diferenciacijos žymuo, embriono smegenyse aptinkamas mažais kiekiais (Marangos et al., 1980).

Remiantis tyrimų duomenimis, osteogeninės diferenciacijos atveju stebima stipriai išaugusi šarminės fosfatazės ir šiek tiek mažiau – osteopontino raiška (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016).

Nustatėme, kad vykstant miogenei diferenciacijai labiausiai padidėja griaučių raumenų genų raiška – MRF4 ir aktinino- α , šiek tiek mažiau – desmino, kuris aptinkamas ir lygiuosiuose raumenyse, o mažiausiai – kalponino raiška. Taigi mūsų tirtomis sąlygomis miogeningė diferenciacija

vyksta labiau link griaučių raumenų mioblastų – ląstelių-pirmtakių formavimosi (Gasiūnienė et al., 2019b).

Taip pat ištyrėme, kad indukuotos neurogeninės diferenciacijos metu stipriau padidėja Nestino – ankstyvojo neuronų pirmtakų geno raiška – nei NSE, kuris laikomas vėlyvos nervinės diferenciacijos žymeniu (Gasiūnienė et al., 2019b).

Taigi, po diferenciacijos indukcijos VV-MKL padidėjo specifinių genų-žymenų, susijusių su diferencijuotų ląstelių struktūra ir funkcijomis, raiška, o tai rodo, kad ląstelės iš kamieninių pradėjo virsti specializuotomis kaulų, raumenų ar nervinio audinio ląstelėmis.

2.2.2.2. Genų ir baltymų raiškos pokyčiai kardiomiogeninės diferenciacijos metu

Kaip buvo minėta 2.1. skyriuje, kardiomiogeninę diferenciaciją indukavome dviem skirtingais būdais – cheminiais agentais (DNMT ir p53 slopikliais) ir biomolekulėmis (AngII ir TGF-β1). Diferenciacijos metu nustatėme šių genų, kurie pateikti 2.3 lentelėje, raiškos pokyčius (Gasiūnienė et al., 2019a, c, d). Be to, kardiomiogeninės diferenciacijos metu tyrėme ir Desmino, kuris randamas ir lygiuosiuose bei skeletiniuose, ir širdies raumenyse (2.2 lentelė), raišką.

2.3 lentelė. Tirti kardiomiogeninės diferenciacijos genai-žymenys

Tirti genai	Genų koduojamų baltymų funkcijos
KARDIOMIOGENINĖ DIFERENCIACIJA	
Transkripcijos veiksniai	
NKX2-5 (angl. <i>NK2 Homeobox 5</i>)	Dalyvauja embriono ir suaugusio individo kamieninių ląstelių kardiomiogenezeje, prieširdžių ir skilvelių vystymesi, reguliuoja tokių genų kaip α-sarkomerinis aktinis ar β-MHC transkripciją (Faustino et al., 2008).
TBX5 (angl. <i>T-Box 5</i>)	Tbx5 kartu su Nkx2.5 skatina širdies vystymąsi, reguliuoja kardiomiogenezę (Hiroi et al., 2001).
GATA4 (angl. <i>GATA Binding Protein 4</i>)	Siejamas su kardiomiogeninės diferenciacijos metu aktyvuojamų genų valdymu (Rossi et al., 2001), aktyvuoja Nkx2.5, kuris jungiasi su Tbx5 (Durocher et al., 1997).
Struktūrinių baltymų genai	
TNNT2 (angl. <i>Troponin T2, Cardiac Type</i>)	Širdies troponinas T – viena iš troponino T izoformų. Sarkomeros sudėtinė dalis, dalyvauja širdies raumenų judesiuose, užtikrina jų koordinaciją (Wei ir Jin, 2016).

2.3 lentelė (tęsinys). Tirti kardiomiogeninės diferenciacijos genai-žymenys

MYH6 (angl. <i>Myosin Heavy Chain 6</i>)	α -MHC (angl. <i>myosin heavy chain</i>) α miozino sunkiosios grandinės baltymas. Vystantis širdžiai būna ir skilvelių, ir prieširdžių miocituose, vėliau dažniausiai nustatomas prieširdžiuose. Dalyvauja širdies susitraukimuose (England & Loughna, 2013).
Jonų kanalų genai	
SCN5A (angl. <i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5</i>)	Natrio jonų įtampa valdomo kanalo Nav1.5 alfa-5 subvienetas. Dalyvauja sarkomerų susitraukime, atlieka pagrindinį vaidmenį elektrinio signalo generavime ir perdavime (Priest & McDermott, 2015).
CACNA1D (angl. <i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D</i>)	L-tipo kalcio kanalo Cav1.3 dalis, formuojanti porą membranoje, pro kurią keliaujant Ca^{2+} jonams užtikrinamas širdies raumenų susitraukimas, dalyvauja pulso palaikyme (Priest & McDermott, 2015).
KCNJ12 (angl. <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 12</i>)	ATP jautrus įeinančios srovės kalio kanalas Kir2.2, paprastai randamas skilvelių miocituose, reguliuoja ramybės potencialą (Zobel et al., 2003).
KCNJ2 (angl. <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2</i>)	Įeinančios srovės kalio kanalas Kir2.1, reguliuoja srovę skilvelių miocituose ir membranų ramybės potencialą (Lange et al., 2003; Zobel et al., 2003), kontroliuoja ir siaurų arterijų tonusą (Jackson 1998).
KCND3 (angl. <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3</i>)	Įtampos valdomas trumpalaikės išeinančios srovės kalio kanalas Kv4.3 (Priest & McDermott, 2015).
HCN2 / HCN4 (angl. <i>Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 2/4</i>)	Hiperpolarizacija aktyvuojamas ciklinių nukleotidų (cAMP) valdomas kanalas, dalyvaujantis širdies ritmo palaikyme, galintis generuoti greitąją srovę (Biel et al., 2002).

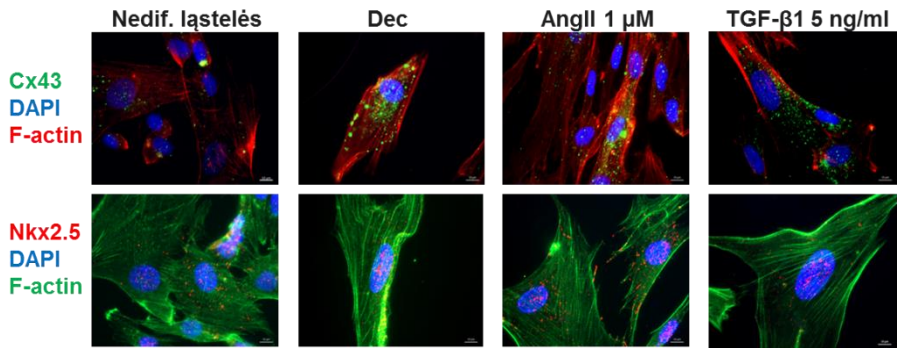
Visais atvejais indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu didžiausia raiška pasižymėjo struktūrinių kardiomiocitų baltymų genai, tokie kaip *MYH6*, *TNNT2*, *DES* bei *ACTN2*. Mažesnis pokytis indukuotose ląstelėse lyginant su nediferencijuota kontrole užfiksuotas transkripcijos veiksnių

NKX2-5, *TBX5* bei *GATA4* genų raiškoje. Tai rodo, kad net ir santykinai nedidelės kardiomiocitų transkripcijos veiksmų aktyvacijos užtenka, kad būtų aktyvuoti funkciniai ir struktūriniai kardiomiocitų genai. Labiausiai tirtų genų raišką didino poveikis Decitabinu, mažiausiai – RG108, o biomolekulės daugeliu atvejų veikė panašiai kaip Decitabinas ar šiek tiek silpniau (Gasiūnienė et al., 2019a, c, d).

Greta šių genų ištyrėme ir kardiomiocitų jonų kanalų genų raišką. Gauti duomenys rodo, kad ir DNMT bei p53 slopikliais, ir AngII bei TGF-β1 indukuotose VV-MKL labiausiai didėjo kalcio kanalo *CACNA1D* bei kalio kanalų *KCNJ12* ir *KCND3* ir *HCN4* genų raiška, o natrio kanalo *SCN5A*, kalio kanalo *KCNJ2* bei *HCN2* genų raiška aktyvuota žymiai silpniau (Gasiūnienė et al., 2019a, d). Šis detektuotas kardiomiocitų jonų kanalų genų raiškos padidėjimas ir kardiomiogeninės programos inicijavimas gali būti siejamas su VV-MKL būsenos pasikeitimo lygiu – nors spontaniškų ląstelių susitraukinėjimų ar elektrofiziologinių charakteristikų pokyčių neaptikome (nepublikuoti duomenys), ląstelių likimas virsti funkcionaliais kardiomiocitais *in vitro* ar *in vivo* po subrendimo jau nulemtas ir grįžti atgal (dediferencijuoti) jos nebegali (Honda et al., 2011).

Be genų raiškos, svarbiu kardiomiogeninės diferenciacijos iniciacijos požymiu yra baltymo Connexin 43 (Cx43) kiekio padidėjimas ir jo lokalizacija ląstelėje. Cx43 yra pagrindinis plyšinių jungčių baltymas, valdantis elektrinį ir cheminį gretimų kardiomiocitų susijungimą (Boengler et al., 2006), tad jis turėtų būti aptinkamas ląstelės kraštuose, tarpląstelinių sąveikų vietose. Mūsų indukuotose VV-MKL (ir cheminėmis, ir biologinėmis molekulėmis) jo kiekis didėja ir jis pradeda kauptis ląstelių periferijoje, o tai sudaro pagrindą interkaliacinių diskų formavimuisi ir miokardo funkcijos palaikymui bręstant diferencijuotoms ląstelėms (2.6 pav., Gasiūnienė et al., 2019a, d).

Nkx2.5 taip pat detektavome ne tik genų, bet ir baltymų lygyje ir nustatėme, kad, kaip ir dera transkripcijos veiksmui, jo branduolinis kiekis po diferenciacijos indukcijos biomolekulėmis didėja (2.6 pav., Gasiūnienė et al., 2019a), o tai labai puikiai siejasi su jo atliekamomis funkcijomis vystantis širdžiai.



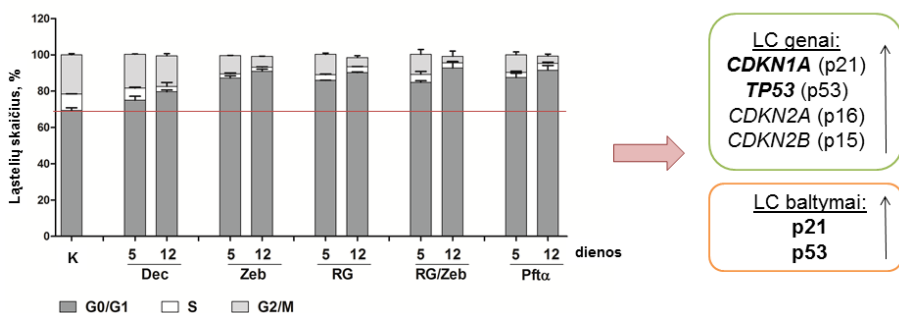
2.6 pav. Connexin 43 (Cx43) ir Nkx2.5 baltymų lokalizacija VV-MKL, indukuotose kardiomiogenine linkme naudojant Decitabiną (Dec), Angiotenziną II (AngII) ir TGF- β 1. Mikroskopo skalė = 10 μ m (pagal Gasiūnienė et al., 2019a).

Apibendrinant, galima teigti, jog VV-MKL sėkmingai gali būti indukuotos diferencijuoti kardiomiogenine kryptimi – pakinta ląstelių morfologija ir aktyvuojami specifiniai, kardiomiocitams būdingi genai bei prasideda unikalių, kitoms ląstelėms nebūdingų, baltymų sintezė. Svarbu pabrėžti, kad tai nėra pilnai subrendę kardiomiocitai, labiau – jų pirmtakai, pradėję vystytis į širdies raumens ląsteles ir galintys tapti funkcionaliais širdies miocitais patekę į reikiamą aplinką *in vitro* ar *in vivo*.

2.2.2.2.1. Ląstelės ciklą reguliuojančių genų ir baltymų pokyčiai indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu

Yra žinoma, kad ląstelėms diferencijuojantis, be morfologinių ir genetinių virsmų, vyksta ir ląstelės ciklo stabdymas vienoje ar kitoje fazėje. Buvo parodyta, kad diferenciacijos į lygiuosius raumenis metu ląstelės ciklas stabdomas G0/G1 fazėje (You et al., 2015). Šiame darbe ląstelės ciklo pokyčius tyrėme VV-MKL, indukuotose kardiomiogenine kryptimi naudojant DNMT slopiklius Decitabiną, Zebulariną, RG108 bei p53 slopiklį Pifitriną- α (2.7 pav., Gasiūnienė et al., 2019d).

Gauti rezultatai rodo, kad visais tirtais agentais kardiomiogenine linkme indukuotų VV-MKL ciklas stabdomas G0/G1 fazėje, mažėja ląstelių S ir G2/M fazėse. Taip pat didėja ir ląstelės ciklą reguliuojančius baltymus koduojančių genų raiška: *TP53* (p53 baltymas), *CDKN1A* (p21), *CDKN2A* (p16) ir *CDKN2B* (p15). Kartu didėja ir p21 bei p53 baltymų lygis indukuotose ląstelėse, nes yra žinoma, kad p53 aktyvuoja *CDKN1A* geno raišką ir inicijuoja ląstelės ciklo stabdymą G0/G1 fazėje EKL diferenciacijos metu (Jain et al., 2012).



2.7 pav. Ląstelės ciklo pokyčiai kardiomiogenine linkme indukuotose VV-MKL. Dec – Decitabinas, Zeb – Zebularinas, RG – RG108, Pftα – Pifitriinas-α, LC – ląstelės ciklas (pagal Gasiūnienė et al., 2019d.).

Literatūriniai duomenys rodo, kad p53 baltymas labai svarbus kardiomiogeninėje diferenciacijoje dar ir dėl to, kad embrioninėse kamieninėse ląstelėse jis gali slopinti kamieniškumo veiksnius OCT4 ar NANOG ir aktyvuoti specifinių vystymosi genų, pvz. *HOX*, transkripciją (Kim et al., 1994). Taip pat p53 geba sąveikauti su transkripcijos veiksniais Nkx2.5 ir Gata4 ir taip dalyvauja kardiomiocitams reikalingų aktyvių funkcinių ir architektūrinių genų transkripcijos palaikyme, mitochondrijų biogenezėje ir bioenergetikoje, gliukozės ir riebalų rūgščių metabolizme (Kojic et al., 2015; Mak et al., 2017). Taigi p53 vaidmuo širdies audinio homeostazėje yra labai įvairiapusis.

Apibendrinant galima teigti, kad diferenciacijai indukuotų VV-MKL kaupimasis G0/G1 ląstelės ciklo fazėje ir ląstelės ciklą valdančių baltymų p21 bei p53 lygio padidėjimas yra laikomas vienu iš ląstelių specializavimosi iš nediferencijuotų į diferencijuotas ženklių.

Taigi, kaip rodo VV-MKL diferenciacijos potencialo tyrimų rezultatai, šiose ląstelėse sėkmingai gali būti indukuota diferenciacija įvairiomis kryptimis – ne tik į mezodermos kilmės ląstelių linijas (osteocitus, miocitus, kardiomiocitus), bet ir į neuroektodermą (neuronų pirmtakai). Gauti duomenys puikiai pademonstruoja VV-MKL plastiškumą ir gebėjimą „įjungti“ skirtingas specializacijos programas morfologiniame, genų ir baltymų lygyje esant skirtingoms diferenciacijos sąlygoms. Toliau bus aptariami molekuliniai vyksmai diferenciacijų metu lydintys epigenetiniai pokyčiai.

2.3. Epigenetiniai pokyčiai VV-MKL indukuotų diferenciacijų metu

Indukavus VV-MKL diferenciacijas įvairiomis kryptimis, greta stebimų morfologinių ir transkripcinių pokyčių, ląstelėse kartu vyksta ir didžiuliai chromatinio persitvarkymo virsmi, nes ląstelių būsenai pereinant iš kamieninės į diferencijuotą yra aktyvuojami su diferenciacija susiję genai, slopinami kamieniškumo genai, o tam tikslui pasiekti reikalingi ne tik lokalūs, tačiau ir globalūs epigenetiniai pokyčiai. Šiame darbe epigenetinius virsmus indukuotų diferenciacijų metu nagrinėjome tirdami epigenetinių modifikatorių, tokių kaip chromatinio pertvarkymo baltymų, modifikuotų (metilintų ar acetilintų) histonų bei mikroRNR, lygį. Pirmiausia aptariami VV-MKL, indukuotų osteogenine, miogenine bei neurogenine kryptimi, pokyčiai epigenetiniame lygmenyje, o vėliau – kardiomiogenine linkme diferencijuotų VV-MKL epigenetiniai virsmi.

2.3.1. Epigenetiniai pokyčiai osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu

Įvertinę sėkmingą VV-MKL diferenciacijos indukciją osteogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis pagal morfologinius pasikeitimus ir specifinių, su diferenciacija susijusių, genų raiškos padidėjimą, toliau tyrėme epigenetinių modifikatorių pokyčius (jų kiekio padidėjimą ar sumažėjimą lyginant su nediferencijuotomis VV-MKL) diferenciacijų metu. Apibendrinti chromatinio pertvarkymo baltymų, histonų modifikacijų ir mikroRNR lygio kitimo duomenys 12-15 d. po indukuotos diferenciacijos pateikti 2.4 lentelėje (remiantis Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b).

Gauti rezultatai rodo, kad chromatinio pertvarkymo baltymų EZH2 (histonų metiltransferazė) ir SUZ12 (cinko pirštų domeną turintis baltymas) kiekis VV-MK ląstelėse visų indukuotų diferenciacijų – osteogeninės, miogeninės, neurogeninės – metu mažėjo (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b). Šie du baltymai įeina į Polikombo slopinančio komplekso 2 (angl. *Polycomb repressive complex 2*, *PRC2*) sudėtį, kuris veikia kartu su Polikombo slopinančiu kompleksu 1 (angl. *Polycomb repressive complex 1*, *PRC1*). PRC2 inicijuoja diferenciacijos metu nereikalingų genų, pvz. susijusių su kamieniškumo palaikymu ir atsinaujinimu, transkripcijos represiją, kuri yra palaikoma PRC1 komplekso ir jo komponento BMI1 baltymo (Shwartz & Pirrotta, 2008). Nustatyta, kad miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu BMI1 kiekis taip pat mažėjo

(Gasiūnienė et al., 2019b). Šie mūsų duomenys atitinka kitų tyrėjų paskelbtus rezultatus, rodančius, jog EZH2 stipriai susijęs su osteogeninės diferenciacijos valdymu (Wei et al., 2011), dalyvauja skirtingų genų slopinime įvairiose neurogeninės diferenciacijos stadijose (Corley & Kroll, 2015) ir yra laikomas vienu pagrindinių reguliatorių žmogaus EKL diferenciacijos į neuroektodermos ląsteles metu (Shan et al., 2017). Miogeninės diferenciacijos metu Polikombo kompleksai irgi yra svarbūs, tačiau jų atliekami vaidmenys gali būti labai įvairūs (Caretta et al., 2004; Asp et al., 2011).

2.4 lentelė. Epigenetinių modifikatorių pokyčiai 12-15 d. diferencijuotose ląstelėse (remiantis Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b)

Epigenetinis modifikatorius	Diferenciacijos		
	Osteogeninė	Miogeninė	Neurogeninė
Chromatino pertvarkymo baltymai			
EZH2	↓	↓	↓
SUZ12	↓	↓	↓
DNMT1	↓	↓	↓
HDAC1	↓	↓	↓
HDAC2	↓	<i>netirta</i>	<i>netirta</i>
BMI1	<i>netirta</i>	↓	↓
<i>DNMT3a</i>	<i>netirta</i>	↑	↑
<i>DNMT3b</i>	<i>netirta</i>	↑	↑
Modifikuoti histonai			
H3K4me3	~	↓	↓
H3K9ac	↑	↓	↓
H4hiperAc	↑	↓	↓
H3K27me3	↓	↑	↑
H3K9me3	<i>netirta</i>	↓	↓
mikroRNR			
miR-21	↑	~	~
miR-17	↓	↓	↓
miR-34a	↓	↑	~
miR-223	↓	<i>netirta</i>	<i>netirta</i>
miR-148b	~	<i>netirta</i>	<i>netirta</i>
miR-146a	<i>netirta</i>	↑	↑

↑ - lygis po diferenciacijos didėja; ↓ - lygis po diferenciacijos mažėja; ~ - lygis lieka panašus, kaip nediferencijuotose VV-MKL

Mes taip pat parodėme, kad tirtų osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu mažėjo ir kitų chromatino remodeliavimo

baltymų kiekiai, t.y. DNR metiltransferazės 1 bei histonų deacetilazių 1 ir 2 (HDAC1/2) (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b). DNMT1 yra atsakinga už DNR metilinimo palaikymą replikacijos metu, tad jos kiekio mažėjimas ląstelėms diferencijuojant gali būti siejamas su kamieniškumo ir atsinaujinimo praradimu, kadangi buvo parodyta, jog suaugusio žmogaus MKL DNMT1 yra tiesiogiai reguliuojama kamieniškumo veiksnių OCT4 ir NANOG, kurie jungiasi prie DNMT1 promotoriaus (Tsai et al., 2012). Yra žinoma, kad HDAC1 ir HDAC2 slopinimas skatina osteogenezę ir slopina adipogenezę (Haberland et al., 2010), o miogeninei ir neurogeninei diferenciacijai specifinių genų aktyvacija taip pat yra lydima DNMT1 ir HDAC1 sumažėjimo (Laker & Ryall, 2016; Noguchi et al., 2016). Tuo tarpu DNMT3a/3b, kurių genų raiškos padidėjimą nustatėme miogenine ir neurogenine kryptimis indukuotose VV-MKL (Gasiūnienė et al., 2019b), gali kontroliuoti histonų modifikacijas reguliuodamos PRC1 funkciją (Jin et al., 2009). Svarbu paminėti, kad nervinėse ląstelėse DNMT3b dalyvauja pradinuose diferenciacijos etapuose, o DNMT3a labiau reikalinga brendimui ir slopina galimą ląstelių dediferenciaciją tarsi fiksuodama esamą diferencijuotos būsenos ląstelių chromatiną (Watanabe et al., 2006).

Kartu su chromatinu pertvarkymo baltymais tyrėme ir modifikuotų histonų lygį indukuotų diferenciacijų metu. Kaip žinia, visos histonų modifikacijos gali būti suskirstytos į aptinkamas transkripciškai aktyvias („aktyvuojančios“ modifikacijos) ir transkripciškai neaktyvias („slopinančios“) chromatinuose regionuose. Mūsų tirtos H3K4me₃, H3K9ac ir H4hiperAc modifikacijos priskiriamos aktyvinančioms, o H3K27me₃ ir H3K9me₃ – slopinančioms, susijusioms su heterochromatinu formavimusi.

Ištyrę visuotinių histonų modifikacijų lygį osteogeninės diferenciacijos metu, nustatėme nepakitusį H3K4me₃ modifikacijos lygį lyginant su nediferencijuotomis VV-MKL ir padidėjusį acetilintų histonų H3K9 ir H4 lygį, o tai koreliuoja su sumažėjusiu HDAC1/2 lygiu šiose ląstelėse. Kartu su nukritusiu EZH2 baltymo lygiu, aptikome ir sumažėjusį lygį trimetilinto H3K27, už kurio metilinimą atsakingas EZH2 (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016). Tai koreliuoja su Wei ir bendraautorių duomenimis (Wei et al., 2011), rodančiais, kad žmogaus MKL osteogenezės metu H3K27me₃ lygis reguliuojamas dalyvaujant CDK1-EZH2 signalinio kelio baltymams.

Tuo tarpu miogeninės ir neurogeninės diferenciacijos metu VV-MKL įvykusių histonų modifikacijų pobūdis visiškai kitoks nei osteogenine kryptimi indukuotose VV-MKL. VV-MKL virstant miocitais ir neuronų pirmtakais ląstelėse nukrito visuminis histonų modifikacijų lygis, siejamų ir su aktyviu chromatinu, pvz. H3K4me₃, H3K9ac, H4hiperAc, ir su

neaktyviu – H3K9me3. O H3K27me3 žymės lygis abiejomis kryptimis diferencijuotose ląstelėse išaugo (Gasiūnienė et al., 2019b). Literatūriniai duomenys rodo, kad raumenų ląstelėms specifinių genų aktyvacija yra susijusi su H3K9 demetiliniu ir H3K27 hipometiliniu (Sincennes et al., 2016). Mūsų rezultatuose H3K27me3 lygis, šiek tiek sumažėja po 5 d. miogeninės diferenciacijos indukcijos, tačiau jis pasiekia pradinį lygį praėjus 12 d. po diferenciacijos indukcijos (Gasiūnienė et al., 2019b). Tai gali būti siejama su PRC1 komplekso slopinančiu veikimu, kuomet jis atstato šį H3K27 trimetilinią tų genų srityse, kurie turi būti nutildyti: BMI1 (PRC1 komponentas) koncentruojasi genų, nesusijusių su raumenine diferenciacija, srityse ir palaiko slopinančią H3K27me3 modifikaciją, kai EZH2 aktyvumas diferenciacijos metu nyksta (Asp et al., 2011). Žinoma, kad neurogeninės diferenciacijos atveju gali egzistuoti bivalentinės modifikacijos (H3K4me3 ir H3K27me3), būtinos neurogeniniam ląstelių vystymuisi (Mikkelsen et al., 2007). O kamieninių ląstelių virtimas neuronų pirmtakais yra lydimas epigenetinio slopinimo pašalinimo ir visuotinio hiperacetilinto H4, H3K4me3, H3K27me3 histonų modifikacijų lygio sumažėjimo bei DNR metilino pokyčių (5-metilcitozino pasiskirstymo, DNMT1, DNMT3a/3b) (Singh et al., 2009).

Greta chromatino remodeliavimo baltymų ir histonų modifikacijų, mes tyrėme ir specifinių, pasirinktų mikroRNR raišką indukuotų diferenciacijų metu. Yra žinoma, kad mažosios nekoduojančios RNR, vadinamos mikroRNR (miR), yra atsakingos už epigenomo valdymą ląstelėse, nes gali reguliuoti genų raišką potranskripciniame lygmenyje ir kontroliuoti raišką svarbių epigenetinių modifikatorių, pvz. DNR metiltransferazių, histonų deacetilazių ar Polikombo komplekso genų (Sato et al., 2011). Dvi iš mūsų tirtų mikroRNR – miR-21 ir miR-17 yra susijusios su kamieninių ląstelių proliferacijos ir kamieniškumo reguliavimu. miR-21 gali tiesiogiai slopinti Sox2 žmogaus MKL ir skatinti osteogeninę diferenciaciją (Trohatau et al., 2014; Mei et al., 2013), o miR-17 lygis yra stipriai padidėjęs žmogaus pluriptentinėse kamieninėse ląstelėse (Leonardo et al., 2012). Tą rodo ir mūsų gauti rezultatai, kur miR-21 raiška indukuotos VV-MKL osteogeninės diferenciacijos metu didėja, tačiau miogeninės ir neurogeninės diferenciacijos metu išlieka tokiam pat lygyje kaip kontrolinėse (neindukuotose diferenciacijai) ląstelėse, o tuo tarpu miR-17 raiška visų tirtų diferenciacijų metu sumažėja (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b).

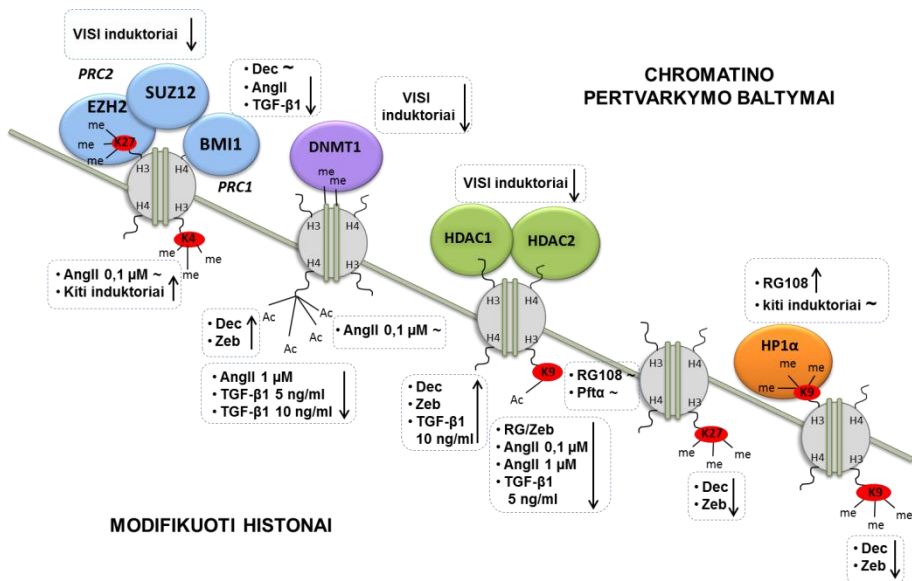
Mūsų tirtose osteogenine kryptimi indukuotose VV-MKL taip pat sumažėjo miR-223 ir miR-34a (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016), kurios laikomos osteogeninės diferenciacijos slopikliais (Guan et al., 2015) ir MKL

proliferacijos regulatoriais, dalyvaujančiais ląstelės ciklo kontrolėje (Chen et al., 2014). Tad galimai dėl to miogeninės diferenciacijos metu miR-34a raiška kilo, o neurogeninės diferenciacijos metu – liko nediferencijuotų ląstelių lygyje (Gasiūnienė et al., 2019b). miR-148b, kuri susijusi su osteogenezės skatinimu (Liao et al., 2014), raiška mūsų indukuotose ląstelėse labai nežymiai didėjo, o miR-146a, kuri dalyvauja osteogennės diferenciacijos slopinime (Huszar & Payne, 2014), miogeninės ir neurogeninės diferenciacijų metu didėjo (Gasiūnienė et al., 2019b). Remiantis mūsų gautais rezultatais iš skirtingų diferenciacijų indukcijos tyrimų galime teigti, kad mikroRNR veikimas yra universalus, o ne specifinis skirtinga linkme indukuotose ląstelėse, kadangi tos pačios mikroRNR gali slopinti ar indukuoti labai įvairių genų raišką priklausomai nuo ląstelės būvio.

Taigi, apibendrinant epigenetinius pokyčius, vykstančius osteogennine, miogennine ir neurogennine kryptimi indukuotose VV-MKL, galima teigti, kad globalus chromatino persitvarkymas, kuomet mažėja su transkripciskai neaktyvia chromatino būseną susijusių baltymų lygis, yra universalus ir būdingas visoms diferenciacijoms. Tuo tarpu histonų modifikacijų svyravimai yra labiau specifiskesni konkrečiai diferencijuotai būsenai. Tai galimai susiję su konkrečių specifinių genų, reikalingų diferenciacijos indukcijai, pradinėms stadijoms ir vėliau indukuotos būsenos palaikymui, raiškos kitimais. Apskritai, visi epigenetiniai modifikatoriai, t.y. mikroRNR, Polikombo kompleksai, DNR metilinimas ir kamieniškumo veiksniai, tokie kaip Oct4, Sox2, Nanog, veikia koordinuotai palaikydami kompleksiskus genų raiškos reguliavimo mechanizmus nediferencijuotose VV-MKL ir indukuotų diferenciacijų metu.

2.3.2. Epigenetiniai pokyčiai indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu

VV-MKL kardiomiogeninė diferenciacija, kaip jau minėta, buvo indukuota cheminiais agentais – DNMT ir p53 slopikliais bei biologiškai aktyviomis molekulėmis – Angiotenzinu II ir TGF- β 1. Morfologiškai, genų ir baltymų raiškos lygyje patvirtinus sėkmingą diferenciacijos iniciaciją, toliau tyrėme jos metu vykstančius epigenetinius pokyčius. 2.8 pav. pateikta apibendrinanti schema, atspindinti chromatino pertvarkymo baltymų ir modifikuotų histonų lygio kitimus įvairiais induktoriais paveiktose VV-MKL (parengta remiantis Gasiūnienė et al., 2019a, c, d).



2.8 pav. Apibendrinti epigenetinių modifikatorių – chromatino pertvarkymo baltymų ir acetilintų bei metilintų histonų – pokyčiai skirtingais agentais indukuotos kardiomiogeninės VV-MKL diferenciacijos metu (12 d.). Dec – Dacitabinas, Zeb – Zebularinas, Pfta – Pifitrasin-α, AngII – Angiotenzinas II, TGF-β1 – transformuojantis augimo veiksnys-beta 1. – tygis po diferenciacijos didėja, - lygis po diferenciacijos mažėja, ~ - lygis lieka panašus, kaip nediferencijuotose VV-MKL (remiantis Gasiūnienė et al., 2019a, c, d).

Mūsų gauti rezultatai rodo, kad visais tirtais induktoriais paveiktose VV-MKL sumažėjo chromatino remodeliavimo baltymų, tokių kaip PRC2 komplekso komponentų EZH2 ir SUZ12, DNMT1 bei histonų deacetilazių 1 ir 2 (Gasiūnienė et al., 2019a, c, d). Šie duomenys koreliuoja su publikuotais rezultatais, tvirtinančiais, kad EZH2 ir SUZ12 yra reikšmingi kardiomiogeninės diferenciacijos reguliacijoje (Aloia et al., 2013), o jų lygio sumažėjimas skatina diferenciaciją į kardiomiocitų pirmtakus (Coppola et al., 2014). Kaip buvo parodyta, DNR metiltransferazė 1 yra atsakinga už DNR metilinimo palaikymą ląstelės ciklo S fazės metu (Hervouet et al., 2012). Tuo tarpu mūsų gauti rezultatai, demonstruojantys VV-MKL ciklo stabdymą G0/G1 fazėje po kardiomiogeninės diferenciacijos indukcijos DNMT ir p53 slopikliais (2.2.2.2.1 skyrius; Gasiūnienė et al., 2019d), koreliuoja su aptiktu DNMT1 kiekiu sumažėjimu indukuotos diferenciacijos metu. Parodyta, kad HDAC1 ir HDAC2 baltymai vaidina esminį vaidmenį kardiomiogenezeje – kontroliuoja specifinių kardiomiocitų genų, tokių kaip *TNNT2* ar *MYH6*, raišką, o HDAC1 raiškos ir aktyvumo slopinimas sukelia ląstelėse virsmus

link kardiomiogeninės diferenciacijos indukcijos (Liu et al., 2009; Montgomery et al., 2007).

Svarbu paminėti, kad BMI1 baltymo, Polikombo slopinančio komplekso 1 komponento, lygis taip pat sumažėjo biomolekulėmis kardiomiogenine linkme indukuotose VV-MKL (Gasiūnienė et al., 2019a). Tai atitinka Zhou ir kolegų atradimus, teigiančius, kad sumažinus BMI1 lygį fibroblastuose labai padidėja jų virtimo susitraukinėjančiais kardiomiocitais efektyvumas (Zhou et al., 2016). Be to, sumažėjusi BMI1 raiška yra siejama su aktyvios histonų modifikacijos H3K4me3 lygio padidėjimu kardiomiocitams specifiniuose genuose (Zhou et al., 2016), o mes savo tyrimuose parodėme panašų globalinį H3K4me3 padidėjimą indukuotos diferenciacijos metu (Gasiūnienė et al., 2019a, c, d). Mūsų gauti rezultatai rodo, kad visais agentais, išskyrus RG108, indukuotose VV-MKL užfiksuotas nežymus HP1 α baltymo pokytis (Gasiūnienė et al., 2019d). Buvo parodyta, kad šis baltymas susijęs su proliferaciją skatinančių genų slopinimu suaugusio žmogaus kardiomiocituose (Sdek et al., 2011) bei heterochromatino žyme H3K9me3 ir genų nutildymu (Mishima et al., 2015). Tad Decitabinu ir Zebularinu indukuotose VV-MKL šio modifikuoto histono lygis sumažėjo (Gasiūnienė et al., 2019c), o tai atitinka Horrillo ir bendraautorių paskelbtus rezultatus (Horrillo et al., 2013).

Jeigu aptarti chromatino remodeliavimo baltymų lygio pakitimai buvo panašūs visais indukoriais paveiktose VV-MKL, detektuoti modifikuotų histonų pokyčiai daug labiau varijavo. Kaip ir H3K9me3, kita slopinanti histono H3K27me3 modifikacija, taip pat buvo sumažėjusi Decitabinu ir Zebularinu indukuotose VV-MKL (Gasiūnienė et al., 2019c). Tuo tarpu H3K4me3, transkripciškai aktyvaus chromatino požymio, lygis visose indukuotose VV-MKL kilo (Gasiūnienė et al., 2019a, c, d). Svarbu pabrėžti, kad H3K27me3 EKL dažnai aptinkama kartu su aktyvuojančia žyme H3K4me3 bivalentiniuose domenuose, pvz. pagrindinių kardiomiocitų transkripcijos veiksnių (GATA4, NKX2.5, TBX5) genuose, kur vykstant diferenciacijai, pereinant iš vienos stadijos į kitą yra palaipsniui prarandama slopinanti H3K27me3 modifikacija ir didėja aktyvinančios H3K4me3 modifikacijos, o tai susiję su šių transkripcijos veiksnių raiška ir jų valdomų procesų įsijungimu (Paige et al., 2012).

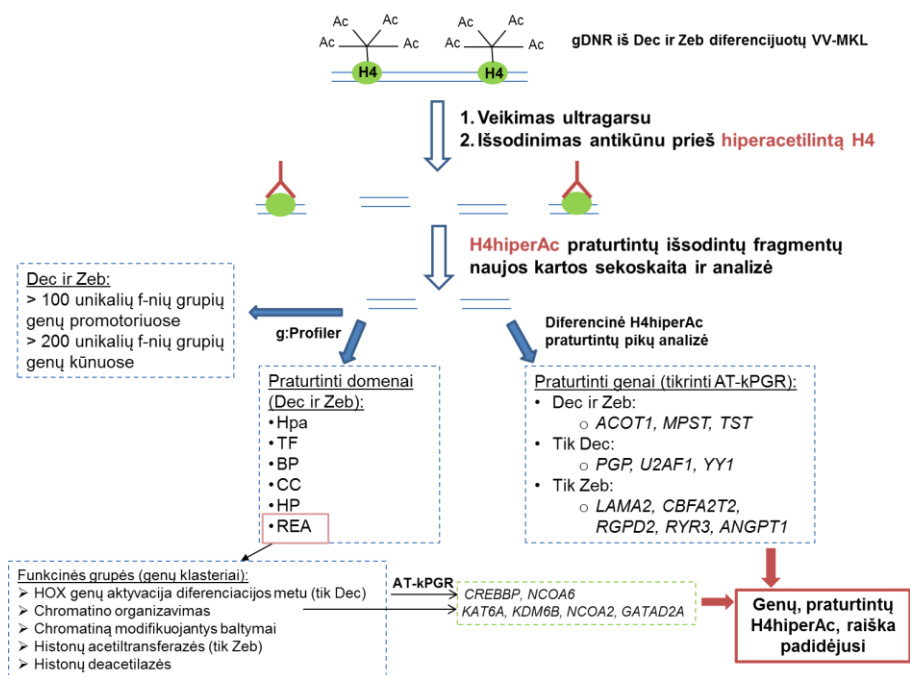
Įdomu tai, kad mūsų gautuose rezultatuose histonų H3 ir H4 acetilinimas, siejamas su transkripciškai aktyviu chromatinu, itin varijuoja skirtingais agentais diferencijuotose VV-MKL. Šių modifikuotų histonų – H3K9ac ir H4hiperAc – lygio padidėjimas daugiausia aptinkamas Decitabinu bei Zebularinu indukuotose VV-MKL (Gasiūnienė et al., 2019c, d), tuo tarpu

po AngII ir TGF- β 1 poveikio šių modifikacijų kiekis mažėja (Gasiūnienė et al., 2019a). Mūsų ląstelėse, kaip ir EKL, po poveikio Zebularinu HDAC lygis mažėjo ir H4 acetilinimas augo (Horrillo et al., 2013). Kaip buvo parodyta, kardiomiocitams būdingų genų (*TNNT2*, *MYH6*) promotoriai praturtinti acetilintu H3 ir H4 ir bendras aukštesnis acetilinimo lygis koreliuoja su didesniu kardiomiogeniniu potencialu (Wang et al., 2013). Tad atsižvelgiant į tai ir į aptiktus genų raiškos skirtumus tarp cheminių agentais ir biomolekulėmis indukuotų VV-MKL, galima teigti, kad AngII ir TGF- β 1 paveiktos ląstelės galimai turi šiek tiek mažesnę kardiomiogeninę potencialą. Taip pat, kaip teigia Sdek ir kolegos (Sdek et al., 2011), tokie histonų H3 ir H4 acetilinimo ir metilinimo statuso svyravimai galimai rodo nesubrendusį kardiomiocitų fenotipą, kadangi pilnai diferencijuotose širdies ląstelėse histonų acetilinimo lygis yra žemas, o dominuoja metilinimas, susijęs su transkripcijos slopinimu (H3K9me3, H3K27me3). Kita vertus, globalus acetilinimo lygis nebūtinai atspindi tikrąjį epigenetinį statusą genų, susijusių su širdies vystymusi, o aptikti visuminiai skirtumai gali atsirasti dėl skirtingos diferenciacijos induktorių prigimties ir veikimo mechanizmų.

Apibendrinant epigenetinius pokyčius, vykstančius VV-MKL indukuotos kardiomiogeninės diferenciacijos metu, galima pastebėti, kad chromatinio pertvarkymo baltymų lygis sumažėja nepriklausomai nuo to, kaip buvo indukuota diferenciacija – cheminių agentais ar biomolekulėmis. Taipogi šie rezultatai labai panašūs ir su osteogeninės, miogeninės bei neurogeninės diferenciacijos metu vykstančiais epigenetiniais virsmis. Tuo tarpu metilintų ar acetilintų histonų kiekis kardiomiogeninės diferenciacijos metu labai varijuoja skirtingais induktoriais diferencijuotose VV-MKL. Tai gali būti susiję su skirtinga agentų prigimtimi, skirtingais veikimo mechanizmais ir histonų modifikacijų kitimo dinamiškumu.

2.3.2.1. Chromatino imunoišsodinimo iš kardiomiogenine kryptimi indukuotų VV-MKL, naudojant antikūną prieš hiperacetilintą H4, tyrimo rezultatai

Decitabinu ir Zebularinu kardiomiogenine linkme indukuotose VV-MKL siekėme iširti, kaip vyksta epigenetinė reguliacija kardiomiogeninės diferenciacijos iniciacijos metu ir kokie genai yra praturtinti H4 hiperacetilintu histonu, kadangi ši modifikacija Dec ir Zeb indukuotose VV-MKL buvo viena iš labiausiai padidėjusių. Taipogi yra žinoma, kad histonų acetilinimas žymi transkripciškai aktyvų chromatiną (Strahl & Allis, 2000) ir, kaip jau buvo minėta, kardiomiocitams specifinių genų (*MYH6*, *TNNT2* ir kt.) promotoriai yra praturtinti hiperacetilintu H4 histonu (Wang et al., 2013), o tai palaiko sąsają tarp H4 acetilinimo ir transkripcijos aktyvumo, kurią patvirtinti mes ir siekėme. 2.9 pav. pateikta apibendrinanti tyrimo ir gautų rezultatų schema (remiantis Gasiūnienė et al., 2019c).



2.9 pav. Chromatino imunoišsodinimo iš Decitabinu (Dec) ir Zebularinu (Zeb) indukuotų VV-MKL naudojant antikūną prieš hiperacetilintą H4 (H4hiperAc) tyrimų rezultatus apibendrinanti schema. *Hpa* – human protein atlas, *TF* – transcription factor, *BP* – biological process, *CC* – cellular component, *HP* – human phenotype ontology, *REA* – reactome (remiantis Gasiūnienė et al., 2019c).

Gauti rezultatai rodo, kad atlikus chromatino imunoišsodinimą su antikūnu prieš hiperacetilintą H4, nuskaičius gautus fragmentus naujos kartos sekoskaita ir atlikus gautų pikų analizę, nustatyta daugiau nei 100 unikalių funkcinų grupių, praturtintų H4hiperAc, promotorių regionuose ir apie 200 – genų kūnuose. Atlikus funkcinę pikų analizę, aptikta, kad daugiausia praturtintų genų priklausė bendriesiems domenams, tokiems kaip Hpa – žmogaus baltymų atlasas (angl. *Human protein atlas*), TF – transkripcijos veiksniai (angl. *Transcription factors*), BP – biologiniai procesai (angl. *Biological processes*) ir kt. H4hiperAc praturtinti genai, priskiriami šioms domenams, buvo bendri ir nediferencijuotoms VV-MKL, ir indukuotoms Decitabinu bei Zebularinu, kadangi jie atspindi pagrindinėms ląstelės funkcijoms gyvybiškai svarbius genus ir jų reguliuojamus procesus (Gasiūnienė et al., 2019c).

Daugiau specifinių genų, susijusių su indukuota diferenciacija ir praturtintų H4hiperAc modifikacija, aptikta REA (reaktomų) domene. Daugiausia šie genai buvo susiję su įvairiais epigenetiniais pokyčiais, pvz. chromatino organizavimu, chromatiną modifikuojančiais baltymais, histonų acetilazėmis ar deacetilazėmis, *HOX* genų aktyvacija diferenciacijos metu. Norėdami patvirtinti koreliaciją tarp praturtinimo aktyvuojančia modifikacija – H4hiperAc – ir genų raiškos, mes pasirinkome keletą genų iš REA domeno genų klasterių ir AT-kPGR metodu ištyrėme jų raišką Dec ir Zeb indukuotose VV-MKL. Gauti rezultatai parodė raiškos padidėjimą šių genų, susijusių su histonų ir kitų baltymų acetilinimu – *CREBBP*, *NCOA6*, *KAT6A* (Cazzalini et al., 2014; Mahajan & Samuels, 2000), susijusių su histonų demetilinimu (*KDM6B*), transkripcijos aktyvinimu vystantis širdžiai (*NCOA2*) bei chromatino remodeliavimu (*GATAD2A*) (Lan et al., 2007; Reineke et al., 2014; Lai & Wade, 2011). Labai svarbu, kad šie duomenys atitinka imuninės analizės metodu gautus epigenetinių pokyčių rezultatus – *KAT6A*, kurio raiška padidėjo po kardiomiogeninės diferenciacijos indukcijos, atsakinga už histonų H3K9 ir H4 acetilinimą, o mes nustatėme padidėjusį šių modifikacijų lygį Dec ir Zeb indukuotose VV-MKL (2.8 pav.). Tas pats gauta ir su *KDM6B*, H3K27 demetilaze – jos raiška padidėjusi po diferenciacijos indukcijos ir tai galima sieti mūsų nustatytu H3K27me3 modifikacijos mažėjimu.

Atlikus analizę aptikome genus, dalyvaujančius chromatino virsmuose ir globaliuose persitvarkymuose ląstelėms diferencijuojantis, tačiau specifinių, su kardiomiogeneze susijusių genų, nebuvo atskleista. Tad buvo išbandyta kita naujos kartos sekoskaitos duomenų analizės strategija – praturtintų pikų diferencinė analizė pagal jų buvimą / aukštį skirtingomis

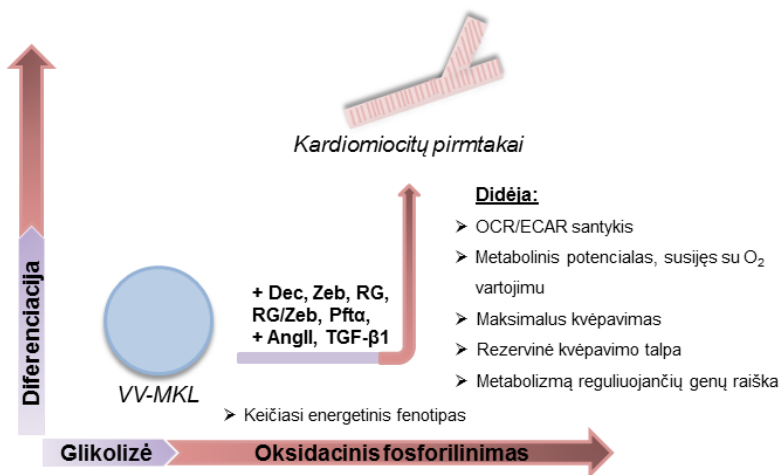
diferenciacijos sąlygomis (nediferencijuotos VV-MKL ir paveiktos Decitabinu ir Zebularinu). Taip buvo aptikti labiausiai H4 hiperacetilinta žyme praturtinti genai kiekvienu diferenciacijos atveju. Tie genai, kurių diferenciacijos mėginiuose buvo 5 ir daugiau kartų gausiau nei nediferencijuotose ląstelėse, pasirinkti raiškos validavimui AT-kPGR metodu. Kaip matyti iš 2.9 pav., kai kurie genai buvo būdingi tik Decitabinu, kai kurie – tik Zebularinu indukuotoms VV-MKL, o kai kurie – abiemis diferenciacijos atvejams. Kas yra įdomu, jog šie ir Decitabinu, ir Zebularinu indukuotose VV-MKL praturtinti genai, kurių raiška taip pat nustatyta suaktyvėjusi, t.y. *ACOT1*, *MPST* ir *TST*, yra susiję su metabolizmo aktyvinimu ir energijos gamyba širdies ir kraujagyslių audiniuose (Emerson et al., 2013; Emerson et al., 2012; Xia et al., 2015). Tuo tarpu genai, būdingi tik Dec ar tik Zeb diferencijuotoms ląstelėms, pasižymėjo labai didele funkcijų ir raiškos įvairove suaugusių individų ar embriono širdyje. Tačiau mūsų tirtose indukuotose VV-MKL šių genų raiška taip pat buvo padidėjusi, lyginant su nediferencijuotomis kontrolinėmis ląstelėmis.

Taigi apibendrinant galima teigti, kad chromatinio imunoišsodinimo ir naujos kartos sekoskaitos rezultatai patvirtino sąryšį tarp genų praturtinimo H4hiperAc modifikacija ir tų genų transkripcinio aktyvumo, t.y. raiškos padidėjimo. Taip pat parodėme, kad vykstant VV-MKL diferenciacijai kardiomiogenine kryptimi ląstelių būsenos pasikeitimus lemia kartu vykstantys genetiniai, epigenetiniai ir metaboliniai virsmai. Būtent ląstelių energetikos ir metabolizmo pokyčiai ir aptariami kitame skyriuje.

2.4. Ląstelių energetika ir metabolizmas kardiomiogeninės diferenciacijos metu

Kaip žinoma, embrioninės kamieninės ląstelės dažniausiai naudoja glikolizę paremtus anabolinius kelius energijos gamybai, o specializuotos pirmtakinės ląstelės pradeda naudoti ir oksidacinį metabolizmą augančioms energijos reikmėms patenkinti (Folmes et al., 2012). Buvo parodyta, kad kardiomiocitai, sukurti *in vitro* iš indukuotų žmogaus kamieninių ląstelių, energijos gamybai paprastai naudoja oksidacinį fosforilinimą (Rana et al., 2012; Denning et al., 2016).

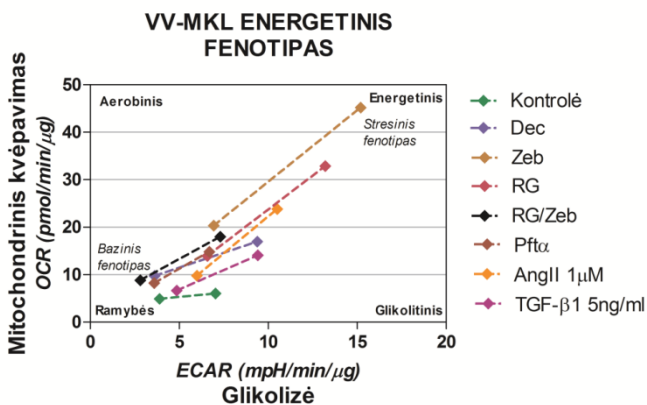
Tačiau su diferencijuotomis VV-MKL tokių tyrimų atlikta nebuvo. Šiame darbe mes pirmieji ištyrėme VV-MKL, indukuotų kardiomiogenine linkme naudojant DNMT ir p53 slopiklius bei biomolekules, energetikos ir metabolizmo pokyčius (Gasiūnienė et al., 2019a, d). 2.10 pav. schematiškai pateikti mūsų tirti parametrai ir indukuotose VV-MKL vykstantys metaboliniai ir energetiniai pokyčiai. Tyrimams naudojome Seahorse XFP analizatorių (Agilent), tuo pačiu metu matuojantį deguonies suvartojimo greitį (angl. *Oxygen consumption rate, OCR*) ir užląstelinio rūgštėjimo greitį (angl. *Extracellular acidification rate, ECAR*).



2.10 pav. Kardiomiogenine linkme indukuotose VV-MKL vykstantys energetiniai ir metaboliniai pokyčiai, detektuoti naudojant Seahorse XFP analizatorių (remiantis Gasiūnienė et al., 2019a, d).

Mūsų, kaip ir Capasso ir kolegų (Capasso et al., 2015), rezultatai rodo, kad sveikos, nediferencijuotos MKL kultūros ATP gamybą vykdo per trikarboksirūgščių ciklą ir anaerobinę glikolizę, o tuo tarpu ląstelės, indukuotos diferenciacijai, vis labiau ir labiau pereina prie mitochondrinių ATP gamybos kelių (Gasiūnienė et al., 2019a, d).

Kaip parodyta 2.11 pav., kontrolinėse ir indukuotose VV-MKL buvo išmatuoti OCR ir ECAR normaliomis (bazinis fenotipas) ir sukkelto streso sąlygomis (stresinis fenotipas). Šiuose tyrimuose stresinis fenotipas buvo sukeltas pridendant kvėpavimo grandinės slopiklių oligomicino, FCCP, rotenono ir antimicino A. Iš gautų rezultatų matyti, kad visų diferencijuotų pradėjusių VV-MKL fenotipas pasislinko link labiau energetinio, metaboliškai aktyvaus, kai tuo tarpu nediferencijuotų kontrolinių ląstelių liko daugiaž tokiame pat lygyje.



2.11 pav. Nediferencijuotų ir įvairiais agentais kardiomiogenine kryptimi indukuotų VV-MKL energetinis fenotipas, išmatuotas naudojant Seahorse XFp bioanalizatorių (remiantis Gasiūnienė et al., 2019a, d).

Taip pat iš išmatuoto bazinio ir stresinio OCR (gauto matavimo metu pridendant elektronų pernašos grandinės slopiklių) apskaičiavome ir kitus parametrus, susijusius su mitochondrijų funkcionavimu. Nustatėme, kad kardiomiogenine linkme indukuotų VV-MKL, naudojant cheminius agentus ir biomolekules, santykis tarp deguonies suvartojimo ir užląstelinio rūgštėjimo (OCR/ECAR) buvo didesnis nei nediferencijuotose ląstelėse, o tai rodo perėjimą prie mitochondrinio oksidacinio fosforilavimo labiau nei prie glikolizės (Gasiūnienė et al., 2019 a, d).

Įdomu tai, kad esant dideliems energijos poreikiams (sukkelto streso sąlygomis), Zebularinu, Pifitrinu- α ir Angiotenzinu II indukuotos VV-MKL

pasižymėjo didesniu stresiniu deguonies suvartojimu, kas rodo, kad jose stipriau vyko mitochondrinis kvėpavimas, tuo tarpu RG/Zeb ir Decitabinu paveiktos VV-MKL labiau naudojosi glikolize (jų buvo aukštesnis stresinis ECAR). RG108 ir TGF-β1 diferencijuotose VV-MKL, kaip ir nediferencijuotose kontrolinėse ląstelėse, imituojant didžiules energijos reikmes lygiagrečiai vyko ir glikolizė, ir oksidacinis fosforilinimas, tik šie procesai diferencijuotose ląstelėse buvo žymiai intensyvesni.

Visais atvejais kardiomiogenine linkme indukuotose ląstelėse nustatėme ir pakilusias maksimalaus kvėpavimo, rezervinės kvėpavimo talpos, sujungimo efektyvumo ir ATP gamybos padidėjimą lyginant su nediferencijuotomis VV-MKL. Šie parametrai susiję su ląstelių gebėjimu prisitaikyti prie pakitusio energijos poreikio, kitaip tariant, su jų plastiškumu ir, atitinkamai kaip ir ląstelių fenotipo duomenys, atspindi energijos gamybai labiau naudojamą mitochondrinį kvėpavimą nei glikolizę.

Gauti duomenys koreliuoja ir su genų raiškos tyrimu gautais rezultatais – Decitabinu, Angiotenzinu II ir TGF-β1 indukuotose VV-MKL ištyrėme keleto genų, dalyvaujančių metabolizmo valdyme, raišką. *PPARGC1A* (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), *NRF1* (angl. *nuclear respiratory factor 1*) ir *HIF1A* (angl. *hypoxia inducible factor 1 alpha*) genų raiška aptikta didesnė, nei kontrolinėse VV-MKL (Gasiūnienė et al., 2019a). Yra parodyta, kad *PPARGC1A* praturtintas audiniuose, pasižyminčiuose dideliu oksidaciniu aktyvumu, pvz. širdyje (Ventura et al., 2008), taip pat jis skatina mitochondrijų proliferaciją ir aktyvina *NRF1* (Wu et al., 1999), kuris yra pagrindinis veiksnys mitochondrijų biogenezėje ir kvėpavime (Xia et al., 1997). Be to, *HIF1A* gali skatinti kardiomiogeninę diferenciaciją embrioninėse kamieninėse ląstelėse (Kwong-Man et al., 2010).

Apibendrinant, aptarti ląstelių energetikos ir metabolizmo pokyčiai kartu su padidėjusia specifinių kardiomiocitų genų-žymenų, metabolizmo genų ir būdingų baltymų raiška rodo visuminius VV-MKL pokyčius bei jų sėkmingą diferenciaciją į kardiomiocitų pirmtakus, kurių likimas jau nulemtas ir kurie, esant tinkamoms sąlygoms, galėtų sėkmingai subręsti į funkcionuojančias širdies raumens ląsteles.

IŠVADOS

1. Patvirtinta, kad nediferencijuotos žmogaus VV-MKL pasižymi CD44, CD90 ir CD105 paviršiaus žymenų raiška ir yra neigiamos CD34 atžvilgiu bei jose vyksta kamieniškumo genų *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* ir *REX1* raiška. Šios ląstelės geba sėkmingai diferencijuoti osteogenine, miogenine, neurogenine ir kardiomiogenine linkme vertinant pagal pakitusią jų morfologiją ir būdingų genų bei baltymų raišką.
2. Ištirta, kad VV-MKL, diferencijuotose osteogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis, mažėja transkripciškai neaktyvų chromatiną palaikančių baltymų, tokių kaip DNMT1, EZH2, SUZ12, BMI1, HDAC1/2, lygis ir kinta acetilintų (H4hiperAc, H3K9ac) bei metilintų (H3K4me3, H3K27me3, H3K9me3) histonų lygis. Taip pat mažėja su kamieniškumo palaikymu susijusių mikroRNR (miR-17) ir didėja diferenciacijos reguliavimo dalyvaujančių mikroRNR (miR-21, miR-34a, miR-146a) raiška.
3. Parodyta, jog VV-MKL, indukuotose kardiomiogenine kryptimi naudojant cheminius agentus (Decitabiną, Zebulariną, RG108, Pifitriną- α) ir biomolekules (Angiotenziną II bei TGF- β 1), abiem atvejais chromatinio pertvarkymo baltymų (DNMT1, EZH2, SUZ12, BMI1, HDAC1/2) lygis mažėja, tačiau modifikuotų histonų (H3K4me3, H3K9ac, H4hiperAc) lygis kinta skirtingai. Taip pat nustatyta, kad Decitabinu ir Zebularinu kardiomiogenine linkme diferencijuotose VV-MKL aktyvuojami genai, praturtinti transkripciškai aktyvaus chromatinio modifikacija – hiperacetilintu histonu H4, yra susiję su epigenetiniu diferenciacijos (*NCOA6*, *KAT6A*, *KDM6B*, *NCOA2*, *GATA2D*) bei metabolizmo (*ACOT1*, *MPST*, *TST*) reguliavimu.
4. Nustatyta, kad kardiomiogenine linkme indukuotų VV-MKL fenotipas keičiasi link energetiškai aktyvaus, ląstelėse energijos gamybai ima vyrėti oksidacinis fosforilinimas ir vis mažiau naudojama glikolizė, o šie metaboliniai virsmai, kartu su genetiniais ir epigenetiniais persitvarkymais rodo VV-MKL virtimą specializuotais kardiomiocitų pirmtakais. Šie rezultatai patvirtina galimą šių ląstelių pritaikomumą medicinoje.

5. Gauti duomenys rodo, kad mūsų tirtos žmogaus vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės pasižymi plačiu diferenciacijos įvairiomis kryptimis potencialu *in vitro* ir šių diferenciacijų metu vyksta būdingi pokyčiai genetiniame, baltymų, metaboliniame bei epigenetiniame lygmenyse. Tai atveria galimybes perspektyviam šių ląstelių taikymui *in vivo* – ne tik gyvūnų modeliuose, tačiau ateityje ir klinikiniuose tyrimuose.

SUMMARY

Introduction

Human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells (AF-MSCs) are considered as a rather new alternative source of stem cells with the potential applications in cell therapy and regenerative medicine. They are found in the amnion of the developing fetus together with other types of embryonic and extraembryonic cells (De Coppi et al., 2007; Trohatau et al., 2013). Amniotic fluid containing AF-MSCs is obtained during the amniocentesis procedure which is considered to be rather safe for both the fetus and the mother.

These stem cells occupy the niche between the pluripotent embryonic stem cells and multipotent adult stem cells (Ratajczak et al., 2014) as it was shown that AF-MSCs have the differentiation potential not only into mesodermal lineage (osteocytes, myocytes, adipocytes, chondrocytes) (Tsai et al., 2004; Roubelakis et al., 2007; Savickiene et al., 2015) but also into ectodermal (neural cells) and endodermal (hepatocytes) lineages (Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007). In addition to the broad differentiation potential and easy obtaining procedure without any ethical restrictions, AF-MSCs have more advantages over other multipotent stem cells. Amniotic fluid MSCs are considered as non-immunogenic and do not cause immune system response even after allogeneic transplantation as well as do not form teratomas *in vivo* (De Coppi et al., 2007; Loukogeorgakis & De Coppi, 2016). Thus they may be potentially applied in clinical trials and therapy (Dziadosz et al., 2015; Loukogeorgakis & De Coppi, 2016) so the studies dealing with the regulation of AF-MSCs functionality molecular and epigenetic mechanisms during various differentiations would expand the knowledge and potentially maximize the applications of these stem cells in the clinics.

The aim: to study molecular (genetic and epigenetic) alterations of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells induced to differentiate into osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic lineages.

The main tasks:

1. To characterize AF-MSCs according to the expression of cell surface markers and pluripotency genes and to assess the potency of AF-MSCs to differentiate into various lineages (osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic) at the molecular level.

2. To evaluate epigenetic changes, such as chromatin remodeling proteins and modified histones, during the induced AF-MSCs differentiations towards osteogenic, myogenic and neural lineages.

3. To determine epigenetic changes during the induced cardiomyogenic differentiation of AF-MSCs as well as to identify the genes after ChIP-Seq, enriched in hyperacetylated H4, that are related to the epigenetic regulation of differentiation.

4. To investigate energetic phenotype and metabolic alterations in AF-MSCs during the induced cardiomyogenic differentiation.

Scientific novelty

In this work, we explored the processes occurring in human AF-MSCs during the induced differentiations towards various lineages. We demonstrated that when AF-MSCs are induced to become osteocytes, myocytes, neural and cardiomyocytes progenitors, chromatin, modified histones and the microRNAs profile undergo a global changeover so that genes, promoting differentiation, would be activated and genes, related to the cell renewal and maintenance of stemness, would be repressed. We were the first to analyze AF-MSCs cell cycle and its regulation comprehensively as well as to investigate cellular energetics and metabolism during the induced cardiomyogenic differentiation and revealed that genes, activated at the initiation of cardiac progenitors formation from AF-MSCs, are enriched in hyperacetylated histone H4 modification. We also indicated that the cardiomyogenic differentiation of AF-MSCs can be initiated using both the chemical inducers (DNA methyltransferases (DNMT) and p53 inhibitors) and some biomolecules (Angiotensin II and TGF- β 1). The latter are found in a human organism, thus are safe, natural and participates in various signaling pathways whereas the genetic, epigenetic and metabolic alterations induced using these biomolecules are at the comparable level as using the chemical agents.

The obtained results complement the knowledge about this rather new source of stem cells – amniotic fluid stem cells, their functionality and molecular mechanisms during the induced differentiations. These results hold significant value as AF-MSCs possess a great future therapeutic potential, for

example, for bones restoration or regeneration of the heart tissue after myocardial infarction or for the treatment of other cardiovascular diseases.

Results

Characterization of AF-MSCs

Firstly, we characterized AF-MSCs as having spindle-shaped morphology and positive for a set of mesenchymal cells surface markers as detected using flow cytometry: CD44 (cell adhesion molecule), CD90 (Thy1), CD105 (endoglin) but negative for CD34 (hematopoietic cells marker) and CD45 (leukocyte antigen). Our isolated amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells also express the main pluripotency genes-markers, such as *OCT4*, *SOX2*, *REX1* and *NANOG* (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019a, b, c, d). We demonstrated that after the induction of osteogenic and cardiomyogenic differentiations, the relative expression of pluripotency genes *SOX2* and *REX1* (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019c, d), as well as *NANOG* (Gasiūnienė et al., 2019c), was downregulated.

Evaluation of the induced differentiations

Then we initiated AF-MSCs differentiation into osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic lineages. Osteogenic differentiation was induced using the commercially available differentiation medium and evaluated by staining inorganic extracellular calcium deposits produced by differentiated cells and determination of the relative expression of *Alkaline Phosphatase* and *Osteopontin* genes (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016). Myogenic differentiation was induced with horse serum applied instead of FBS (fetal bovine serum) and multinucleated cells started to appear as the sign of initiated myogenic phenotype. In addition, we detected the upregulation of the relative expression of myogenic genes-markers, such as *Actinin-a*, *Calponin*, *Desmin* and *MRF4* (Gasiūnienė et al., 2019b). We also studied neural differentiation initiated using all-*trans* retinoic acid and inspected the altered morphology of AF-MSCs, such as elongated bodies, the presence of neurite-like projections and cell extensions – typical features of neurons. Together with phenotypical changes, the enhanced expression of *Nestin* and *NSE* genes was observed (Gasiūnienė et al., 2019b). And finally, we induced cardiomyogenic differentiation of AF-MSCs using chemical agents – DNMT inhibitors Decitabine, Zebularine, RG108 and p53 inhibitor Pifithrin- α (Gasiūnienė et al., 2019c, d) as well as biomolecules, such as Angiotensin II and Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) (Gasiūnienė et al., 2019a). All

of these agents caused changes in AF-MSCs morphology and the increase in the relative expression of genes, specific to cardiomyocytes and cardiac progenitors, i.e. transcription factors *NKX2-5*, *TBX5*, *GATA4*, structural proteins *TNNT2*, *MYH6* as well as ion channels genes *SCN5A* (sodium), *CACNA1D* (calcium), *KCNJ12 / KCNJ2 / KCND3* (potassium) and *HCN2 / HCN4* (hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated). What is more, the levels of Connexin43 protein, the main component of gap junctions, and early cardiac transcription factor Nkx2.5 were elevated during the induced cardiac differentiation. In addition to that, we measured the cell cycle of AF-MSCs induced to cardiomyogenic lineage with DNMT and p53 inhibitors using flow cytometry. We obtained that the cell cycle of induced AF-MSCs was arrested at G0/G1 phase and the expression of genes, encoding cell cycle regulators p21, p53, p16 and p15, as well as p21 and p53 proteins, was upregulated indicating the changed status of AF-MSCs that started specializing into cardiomyocytes progenitors (Gasiūnienė et al., 2019d).

Epigenetic changes during the induced differentiations

Next, we explored global epigenetic changes, i.e. chromatin remodeling proteins, histone modifications and microRNAs, in AF-MSCs during the induced osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic differentiations using Western blot. The results revealed that levels of chromatin modifying proteins, such as DNMT1, Polycomb repressive complex 2 components EZH2 and SUZ12, histone deacetylases 1 and 2, Polycomb repressive complex 1 protein BMI1 as well as heterochromatin protein HP1 α were downregulated during the induced osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic differentiation initiated with almost all agents (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019a, b, c, d). The analysis of several microRNAs, involved in cell proliferation and potency regulation (miR-21 and miR-17), demonstrated the altered expression as well as microRNAs, related to the differentiated status of the cell (miR-223, miR-34a, miR-148b, miR-146a), during osteogenic, myogenic and neural differentiations (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b). However, the alterations in the levels of modified histones (acetylated or methylated) varied among the AF-MSCs induced to various differentiations and even among the AF-MSCs differentiated into cardiac lineage with various agents. The global pattern of histone modifications considered as the marks of transcriptionally active chromatin (H3K4me3, H3K9Ac, H4hyperAc) and histone modifications found in transcriptionally repressed chromatin (H3K27me3, H3K9me3) was almost opposite in AF-MSCs differentiated towards osteogenic lineage

compared to AF-MSCs induced to become myocytes and neural progenitors (Glemžaitė & Navakauskienė, 2016; Gasiūnienė et al., 2019b). Similarly, the profile of modified histones obtained in AF-MSCs differentiated with Decitabine and Zebularine had more differences than similarities in comparison to the histones profile in AF-MSCs induced using other DNMT or p53 inhibitors or biomolecules (Gasiūnienė et al., 2019a, c, d). Overall, these variations may indicate that modified histones are more specific to the particular differentiated state of the cell when different sets of genes should be switched on and off and the global levels do not fully reflect these processes. Moreover, using AF-MSCs induced to the cardiomyogenic lineage with Decitabine and Zebularine and ChIP-Seq with antibodies against hyperacetylated histone H4, we demonstrated that genes, related to cardiac differentiation and heart development and activated during the induced differentiation, were enriched in this activating histone modification (Gasiūnienė et al., 2019c). Thus we confirmed the relation between enrichment in H4hyperAc modification in the promoter or gene body and transcriptional activity of these genes.

Cellular energetics and metabolism during cardiac differentiation

For the first time, we measured alterations in AF-MSCs energetic profile and metabolism during the cardiomyogenic differentiation, induced using DNMT and p53 inhibitors (Decitabine, Zebularine, RG108 and Pifithrin- α) as well as biomolecules (Angiotensin II and TGF- β 1) (Gasiūnienė et al., 2019a, d). The study was done using Seahorse XFp analyzer that measures oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) simultaneously. Firstly, we measured the basal OCR and ECAR and then at the induced stress conditions – this was achieved by the addition of electron transfer chain inhibitors Oligomycin, FCCP, Antimycin and Rotenone A. The obtained results revealed a switch in differentiated AF-MSCs phenotype towards more energetic and metabolically active compared to undifferentiated control. What is more, we identified that AF-MSCs induced to cardiomyogenic lineage started utilizing mitochondrial oxidative phosphorylation more than glycolysis for energy production. Other detected parameters, such as maximal respiration, spare respiratory capacity and coupling efficiency also exhibited the upregulated mitochondrial respiration in AF-MSCs induced into cardiomyocytes progenitors. Together with the metabolic activation, the relative expression of several genes, related to the metabolism regulation, was enhanced as well (Gasiūnienė et al., 2019a). Overall, these data demonstrate that AF-MSCs committed to becoming

cardiomyocytes progenitors undergo various metabolic alterations leading to adjustment to the increased energetic demands and ATP production.

Conclusions

In this study we investigated the regulation of the functioning and epigenetic mechanisms in AF-MSCs differentiated into osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic lineages. We demonstrated that all of these differentiations are accompanied by the alterations in the cell morphology, activation of the differentiation-specific genes (*ALP*, *Osteopontin*, *Calponin*, *Desmin*, *Nestin*, *TNNT2*, *MYH6* and others) and proteins (Connexin43, Nkx2.5) as well as downregulation of pluripotency and self-renewal genes (*SOX2*, *NANOG*) and global chromatin changeover. The levels of chromatin remodeling proteins, keeping transcriptionally inactive DNA (DNMT1, EZH2, SUZ12, BMI1, HDAC1/2), were downregulated in AF-MSCs, induced to differentiate towards osteogenic, myogenic, neural and cardiomyogenic lineages. On the other hand, the profile of modified histones (H3K4me3, H4hyperAc, H3K9ac, H3K27me3, H3K9me3) was more specific to each differentiation as a different set of genes were activated and repressed. Also, the elevated levels of microRNAs (miR-21, miR-17, miR-34a, miR-223, miR-148b, miR-146) demonstrated their universal role in the regulation of gene expression during the induced osteogenic, myogenic and neurogenic differentiations. Moreover, we determined that genes, activated in cardiomyocytes progenitors from induced AF-MSCs and related to epigenetic (*NCOA6*, *KAT6A*, *KDM6B*, *NCOA2*, *GATAD2A*) and metabolic (*ACOT1*, *MPST*, *TST*) regulation, were enriched in hyperacetylated H4. In addition, AF-MSCs, induced to cardiomyogenic lineage, switched their phenotype towards more energetic, started utilizing mitochondrial oxidative phosphorylation for the increased energy demands and this, together with genetic and epigenetic changes, demonstrated the transformation of AF-MSCs into specialized cardiac progenitor cells. All in all, our results extend the knowledge of molecular mechanisms occurring at the initial stages of induced differentiations of AF-MSCs and may be valuable for the future applications of AF-MSCs in cell therapy.

LITERATŪROS SĄRAŠAS / REFERENCES

1. Ahmadian E, Jafari S, Yari Khosroushahi A. Role of angiotensin II in stem cell therapy of cardiac disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015 Dec;16(4):702-11. doi: 10.1177/1470320315621225.
2. Aloia L, Di Stefano B, Di Croce L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development* 2013;140:2525–2534.
3. Asp P, Blum R, Vethantham V, Parisi F, Micsinai M, Cheng J, Bowman C, Kluger Y, Dynlacht BD. Genome-wide remodeling of the epigenetic landscape during myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 31; 108(22): E149–58. doi: 10.1073/pnas.1102223108.
4. Azhar M, Schultz Jel J, Grupp I, Dorn GW 2nd, Meneton P, Molin DG, Gittenberger-de Groot AC, Doetschman T. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Oct;14(5):391-407.
5. Baldassarri V, Salucci S, Ferri P, Falcieri E, Burattini S. The role of α -actinin in Z-disks assembly: a morphological point of view. *Microscopie.* 2012;18(2): 37-44.
6. Barrand S, Collas P. Chromatin states of core pluripotency-associated genes in pluripotent, multipotent and differentiated cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1; 391(1):762-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.134.
7. Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2002 Jul;12(5):206-12.
8. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart.* 2006 Dec;92(12):1724-7.
9. Capasso S, Alessio N, Squillaro T, Di Bernardo G, Melone MA, Cipollaro M, Peluso G, Galderisi U. Changes in autophagy, proteasome activity and metabolism to determine a specific signature for acute and chronic senescent mesenchymal stromal cells. *Oncotarget.* 2015 Nov 24;6(37):39457-68. doi: 10.18632/oncotarget.6277.
10. Capetanaki Y, Milner DJ, Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct Funct.* 1997 Feb;22(1):103-16.
11. Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 2004 Nov 1; 18(21): 2627–38.

12. Cazzalini O, Sommati S, Tillhon M, Dutto I, Bachi A, Rapp A, Nardo T, Scovassi AI, Necchi D, Cardoso MC, Stivala LA, Prosperi E. CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis. *Nucleic Acids Res* 2014;42(13):8433-8448.
13. Chen L, Holmstrøm K, Qiu W, Ditzel N, Shi K, Hokland L, Kassem M. MicroRNA-34a inhibits osteoblast differentiation and in vivo bone formation of human stromal stem cells. *Stem Cells*. 2014 Apr;32(4):902-12. doi: 10.1002/stem.1615.
14. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):17969-78. doi: 10.1074/jbc.M802917200.
15. Coppola A, Romito A, Borel C et al. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res* 2014;12(2):323-337.
16. Corley M, Kroll KL. The roles and regulation of Polycomb complexes in neural development. *Cell Tissue Res*. 2015 Jan; 359(1): 65–85. doi: 10.1007/s00441-014-2011-9.
17. Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995 Jan 14;84(1):109-29.
18. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan; 25(1):100-6.
19. Denning C, Borgdorff V, Crutchley J et al. Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: From laboratory curiosity to industrial biomedical platform. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul;1863(7 Pt B):1728-48. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.014.
20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.
21. Duband JL, Gimona M, Scatena M, Sartore S, Small JV. Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation*. 1993 Dec;55(1):1-11.

22. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J*. 1997 Sep 15;16(18):5687-96.
23. Dziadosz M, Basch RS, Young BK. Human amniotic fluid: a source of stem cells for possible therapeutic use. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Mar;214(3):321-7. doi: 10.1016/j.ajog.2015.12.061.
24. Emerson B, Carter R, Morton NM, Gray GA. Cardiovascular phenotyping in mice with thiosulfate sulfurtransferase gene knock-out. *Nitric Oxide* 2013;31(suppl 2):39–40.
25. Emerson BS, Dransfield I, Morton NM, Gray GA. Characterisation of the synthetic enzymes of h2s in murine myocardium. *Heart* 2012;98:A3.
26. England J, Loughna S. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Apr;70(7):1221-39. doi: 10.1007/s00018-012-1131-1.
27. Faustino RS, Behfar A, Perez-Terzic C, Terzic A. Genomic chart guiding embryonic stem cell cardiopoiesis. *Genome Biol*. 2008 Jan 9;9(1):R6. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-r6.
28. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2012 Nov 2;11(5):596-606. doi: 10.1016/j.stem.2012.10.002.
29. Fouse SD, Shen Y, Pellegrini M, Cole S, Meissner A, Van Neste L, Jaenisch R, Fan G. Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, Polycomb binding and histone H3 lys4/lys27 trimethylation *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7; 2(2):160-9. doi: 10.1016/j.stem.2007.12.011.
30. Franke J, Abs V, Zizzadoro C, Abraham G. Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet Res*. 2014 May 26;10:119. doi: 10.1186/1746-6148-10-119.
31. Gasiūnienė M, Petkus G, Matuzevičius D, Navakauskas D, Navakauskienė R. Angiotensin II and TGF-β1 induce alterations in human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells leading to cardiomyogenic differentiation initiation. *Int J Stem Cells*. 2019a Apr 30. doi: 10.15283/ijsc18126. [Epub ahead of print]
32. Gasiūnienė M, Zentelytė A, Treigyte G, Baronaitė S, Savickienė J, Utkus A, Navakauskienė R. Epigenetic alterations in amniotic fluid mesenchymal stem cells derived from normal and fetus-affected gestations: a focus on myogenic and neural differentiations. *Cell Biol Int*. 2019b Mar;43(3):299-312. doi: 10.1002/cbin.11099.

33. Gasiūnienė M, Zentelytė A, Wojtas B, Baronaitė S, Krasovskaja N, Savickienė J, Gielniewski B, Kaminska B, Utkus A, Navakauskienė R. DNMT inhibitors effectively induce gene expression changes suggestive of cardiomyogenic differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells via chromatin remodeling. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019c;13:469–481. doi: 10.1002/term.2800.
34. Gasiūnienė M, Zubova A, Utkus A, Navakauskienė R. Epigenetic and metabolic alterations in human amniotic fluid stem cells induced to cardiomyogenic differentiation by DNA methyltransferases and p53 inhibitors. *J Cell Biochem.* 2019d;120:8129-8143. doi:10.1002/jcb.28092.
35. Glemžaitė M, Navakauskienė R. Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells Is Determined by Epigenetic Changes. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:6465307. doi: 10.1155/2016/6465307.
36. Golub EE ir Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop* 2007; 18:444–448.
37. Graça I, Sousa EJ, Baptista T, Almeida M, Ramalho-Carvalho J, Palmeira C, Henrique R, Jerónimo C. Anti-tumoral effect of the non-nucleoside DNMT inhibitor RG108 in human prostate cancer cells. *Curr Pharm Des.* 2014;20(11):1803-11.
38. Guan X, Delo DM, Atala A, Soker S. In vitro cardiomyogenic potential of human amniotic fluid stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 Mar;5(3):220-8. doi: 10.1002/term.308.
39. Guan X, Gao Y, Zhou J, Wang J, Zheng F, Guo F, Chang A, Li X, Wang B. miR-223 regulates adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through a C/EBPs/miR-223/FGFR2 regulatory feedback loop. *Stem Cells.* 2015 May;33(5):1589-600. doi: 10.1002/stem.1947.
40. Haberland M, Carrer M, Mokalled MH, Montgomery RL, Olson EN. Redundant control of adipogenesis by histone deacetylases 1 and 2. *J Biol Chem.* 2010 May 7; 285(19):14663-70. doi: 10.1074/jbc.M109.081679.
41. Hemming S, Cakouros D, Isenmann S, Cooper L, Menicanin D, Zannettino A, Gronthos S. EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. *Stem Cells.* 2014 Mar; 32(3):802-15. doi: 10.1002/stem.1573.
42. Hervouet E, Nadaradjane A, Gueguen M, Vallette FM, Cartron PF. Kinetics of DNA methylation inheritance by the Dnmt1-including

- complexes during the cell cycle. *Cell Div.* 2012;7:5. doi: 10.1186/1747-1028-7-5.
- 43.Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet.* 2001 Jul;28(3):276-80.
- 44.Honda M, Kiyokawa J, Tabo M, Inoue T. Electrophysiological characterization of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *J Pharmacol Sci.* 2011;117(3):149-159.
- 45.Horrillo A, Pezzolla D, Fraga MF, Aguilera Y, Salguero-Aranda C, Tejedo JR, Martin F, Bedoya FJ, Soria B, Hmadcha A. Zebularine regulates early stages of mESC differentiation: effect on cardiac commitment. *Cell Death Dis.* 2013 Apr 4;4:e570. doi: 10.1038/cddis.2013.88.
- 46.Huszar JM, Payne CJ. MIR146A inhibits JMJD3 expression and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 2014 May 2;588(9):1850-6. doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.057.
- 47.Jackson WF. Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation* 1998; 5:85-90.
doi: 10.1111/j.1549-8719.1998.tb00057.x
- 48.Jain AK, Allton K, Iacovino M, Mahen E, Milczarek RJ, Zwaka TP, Kyba M, Barton MC. p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLOS Biol.* 2012;10(2):e1001268. doi: 10.1371/journal.pbio.1001268.
- 49.Jin B, Yao B, Li JL, Fields CR, Delmas AL, Fields CR, Delmas AL, Liu C, Robertson KD. DNMT1 and DNMT3B modulate distinct polycomb-mediated histone modifications in colon cancer. *Cancer Res.* 2009 Sep 15;69(18):7412-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0116.
- 50.Jin W, Xu YP, Yang AH, Xing YQ. In vitro induction and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells by all-trans retinoic acid. *Int J Ophthalmol.* 2015 Apr 18;8(2):250-6. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.02.07.
- 51.Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* 2009 Sep;18(7):1093-108. doi: 10.1089/scd.2009.0113.

52. Kim KK, Soonpaa MH, Daud AI, Koh GY, Kim JS, Field LJ. Tumor suppressor gene expression during normal and patho-logic myocardial growth. *J Biol Chem.* 1994;269:22607-22613.
53. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:89–97.
54. Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Protic O, Jasnic-Savovic J, Faulkner G, Radojkovic D. Cardiac transcription factor Nkx2.5 interacts with p53 and modulates its activity. *Arch Biochem Biophys.* 2015;569:45-53. doi: 10.1016/j.abb.2015.02.001.
55. Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, Marędzia M, Śmieszek A. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:309169. doi: 10.1155/2015/309169.
56. Kwong-Man N, Yee-Ki L, Yau-Chi C, Wing-Hon L, Man-Lung F, Ronald AL, Chung-Wah S, Hung-Fat T. Exogenous expression of HIF-1 α promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jun;48(6):1129-37. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.01.015.
57. Lai AY, Wade PA. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nat Rev Cancer* 2011;11:588–596.
58. Laker RC, Ryall JG. DNA methylation in skeletal muscle stem cell specification, proliferation, and differentiation. *Stem Cells Int.* 2016;2016:5725927. doi: 10.1155/2016/5725927.
59. Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstone JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 2007 Oct 11;449(7163):689-94.
60. Lange PS, Er F, Gassanov N, Hoppe UC. Andersen mutations of KCNJ2 suppress the native inward rectifier current IK1 in a dominant-negative fashion. *Cardiovasc Res* 2003; 59:321-7. doi: 10.1016/S0008-6363(03)00434-6.
61. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990 Feb 23;60(4):585-95.
62. Leonardo TR, Schultheisz HL, Loring JF, Laurent LC. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming *Nat Cell Biol.* 2012 Nov;14(11):1114-21. doi: 10.1038/ncb2613.
63. Liao YH, Chang YH, Sung LY, Li KC, Yeh CL, Yen TC, Hwang SM, Lin KJ, Hu YC. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells and

- calvarial defect repair using baculovirus-mediated co-expression of BMP-2 and miR-148b. *Biomaterials*. 2014 Jun;35(18):4901-10. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.055.
- 64.Lin Y, Zhao Y, Li R, Jiaqi G, Yucai Z, Wang Y. PGC-1 α is associated with C2C12 Myoblast differentiation. *cent.eur.j.biol*. 2014;9: 1030–1036. doi.org/10.2478/s11535-014-0341-y.
- 65.Liu BW, Lü AL, Hou J, Huang W, Hou H, Hou ZL, DA J, Ai SY. Electrophysiological characteristics of cardiomyocyte-like cells from rat bone marrow derived mesenchymal stem cells by four inductors. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(18):3528-33.
- 66.Liu Z, Li T, Liu Y, et al. WNT signaling promotes Nkx2.5 expression and early cardiomyogenesis via downregulation of Hdac1.*Biochim Biophys Acta*. 2009;1793:300-311.
- 67.Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Concise Review: Amniotic Fluid Stem Cells: The Known, the Unknown, and Potential Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells*. 2017 Jul;35(7):1663-1673. doi: 10.1002/stem.2553.
- 68.Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Stem cells from amniotic fluid-Potential for regenerative medicine. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016 Feb;31:45-57. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.08.009.
- 69.Lv Y, Liu B, Wang HP, Zhang L. Intramyocardial implantation of differentiated rat bone marrow mesenchymal stem cells enhanced by TGF- β 1 improves cardiac function in heart failure rats. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(6):e5273. doi: 10.1590/1414-431X20165273.
- 70.Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Oct;8(10):755-65.
- 71.Mahajan MA, Samuels HH. A new family of nuclear receptor coregulators that integrate nuclear receptor signaling through CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* 2000;20(14):5048-5063.
- 72.Mak TW, Hauck L, Grothe D, Billia F. p53 regulates the cardiac transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(9):2331-2336. doi: 10.1073/pnas.1621436114.
- 73.Marangos PJ, Schmechel DE, Parma AM, Goodwin FK. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res*. 1980 May 19;190(1):185-93.
- 74.Marędziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose

- Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2152435. doi: 10.1155/2016/2152435.
75. Marom R, Shur I, Solomon R, Benayahu D. Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. *J Cell Physiol.* 2005 Jan;202(1):41-8.
76. Mei Y, Bian C, Li J, Du Z, Zhou H, Yang Z, Zhao RC. MiR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Biochem.* 2013 Jun;114(6):1374-84. doi: 10.1002/jcb.24479.
77. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 2008 Aug 7; 454(7205):766-70. doi: 10.1038/nature07107.
78. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007 Aug 2;448(7153):553-60.
79. Mishima Y, Jayasinghe CD, Lu K et al. Nucleosome compaction facilitates HP1 γ binding to methylated H3K9. *Nucleic Acids Res* 2015;43(21):10200-10212.
80. Mohanty S, Bose S, Jain KG, Bhargava B, Airan B. TGF β 1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2013 Feb 10;163(1):93-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.08.003. Epub 2011 Sep 7.
81. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* 2007;21:1790-1802.
82. Noguchi H, Kimura A, Murao N, Namihira M, Nakashima K. Prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 in neural stem cells impairs neurogenesis and causes anxiety-like behavior in adulthood. *Neurogenesis (Austin).* 2016 Sep 9;3(1):e1232679.
83. Olson E. Interplay between Proliferation and Differentiation within the Myogenic Lineage. *Dev Biol.* 1992 Dec;154(2):261-72.
84. Paige SL, Thomas S, Stoick-Cooper CL et al. A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development. *Cell* 2012;151:221–232.

85. Rafieemehr H, Kheirandish M, Soleimani M. Improving the neuronal differentiation efficiency of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultivated under appropriate conditions. *Iran J Basic Med Sci.* 2015 Nov;18(11):1100-6.
86. Rana P, Anson B, Engle S, Will Y. Characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: bioenergetics and utilization in safety screening. *Toxicol Sci.* 2012 Nov;130(1):117-31. doi: 10.1093/toxsci/kfs233.
87. Ratajczak MZ, Marycz K, Poniewierska-Baran A, Fiedorowicz K, Zbucka-Kretowska M, Moniuszko M. Very small embryonic-like stem cells as a novel developmental concept and the hierarchy of the stem cell compartment. *Adv Med Sci.* 2014 Sep;59(2):273-80. doi: 10.1016/j.advms.2014.08.001.
88. Reineke EL, Benham A, Soibam B, Stashi E, Taegtmeier H, Entman ML, Schwartz RJ, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-2 is a dual regulator of cardiac transcription factor function. *J Biol Chem* 2014; 289(25):17721–17731.
89. Rhodes SJ, Konieczny SF. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 1989 Dec;3(12B):2050-61.
90. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1; 280(26):24731-7.
91. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 2001 Aug 1;15(15):1998-2009.
92. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, Antsaklis A, Anagnostou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Dec; 16(6):931-52.
93. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 2011 May;278(10):1598-609. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x.
94. Savickiene J, Treigyte G, Baronaite S, Valiuliene G, Kaupinis A, Valius M, Arlauskienė A, Navakauskienė R. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature, and

- Proteome Analysis. *Stem Cells Int.* 2015; 2015:319238. doi: 10.1155/2015/319238.
95. Savickiene J, Treigyte G, Borutinskaite VV, Navakauskiene R. Antileukemic activity of combined epigenetic agents, DNMT inhibitors zebularine and RG108 with HDAC inhibitors, against promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2012 Dec;17(4):501-25.
96. Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):266-73. doi: 10.1016/j.ceb.2008.03.002.
97. Sdek P, Zhao P, Wang Y et al. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes. *J Cell Biol* 2011;194: 407–423.
98. Sessarego N, Parodi A, Podestà M, Benvenuto F, Mogni M, Raviolo V, Lituania M, Kunkl A, Ferlazzo G, Bricarelli FD, Uccelli A, Frassoni F. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica.* 2008 Mar;93(3):339-46. doi: 10.3324/haematol.11869.
99. Shan Y, Liang Z, Xing Q, Zhang T, Wang B, Tian S, Huang W, Zhang Y, Yao J, Zhu Y, Huang K, Liu Y, Wang X, Chen Q, Zhang J, Shang B, Li S, Shi X, Liao B, Zhang C, Lai K, Zhong X, Shu X, Wang J, Yao H, Chen J, Pei D, Pan G. PRC2 specifies ectoderm lineages and maintains pluripotency in primed but not naive ESCs. *Nat Commun.* 2017 Sep 22; 8(1): 672. doi: 10.1038/s41467-017-00668-4.
100. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18; 281(33):23319-25.
101. Sincennes MC, Brun CE, Rudnicki MA. Concise review: epigenetic regulation of myogenesis in health and disease. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Mar;5(3):282-90. doi: 10.5966/sctm.2015-0266.
102. Singh RP, Shiue K, Schomberg D, Zhou FC. Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation. *Cell Transplant.* 2009;18(10):1197-211. doi: 10.3727/096368909X12483162197204.
103. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* 1990 Oct;4(13):3111-23.
104. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403(6765):41-45.
105. Trohatou O, Anagnou NP, Roubelakis MG. Human amniotic fluid stem cells as an attractive tool for clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013 Mar; 8(2):125-32.

106. Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, Pappa KI, Antsaklis A, Anagnostou NP, Roubelakis MG. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Jan;3(1):54-68. doi: 10.5966/sctm.2013-0081.
107. Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. Oct4 and nanog directly regulate dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell.* 2012 Jul 27;47(2):169-82. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.020.
108. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, Lee JL, Chang YJ. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod.* 2006 Mar;74(3):545-51. Epub 2005 Nov 23.
109. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004 Jun; 19(6):1450-6.
110. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2008; 79:208–217.
111. Wang M, Yu Q, Wang L et al. Distinct patterns of histone modifications at cardiac-specific gene promoters between cardiac stem cells and mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013;304(11):C1080-1090.
112. Watanabe D, Uchiyama K, Hanaoka K. Transition of mouse de novo methyltransferases expression from Dnmt3b to Dnmt3a during neural progenitor cell development. *Neuroscience.* 2006 Oct 27;142(3):727-37.
113. Wei B, Jin JP. TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships. *Gene.* 2016 May 10;582(1):1-13. doi: 10.1016/j.gene.2016.01.006.
114. Wei Y, Chen YH, Li LY, Lang J, Yeh SP, Shi B, Yang CC, Yang JY, Lin CY, Lai CC, Hung MC. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat Cell Biol.* 2011 Jan; 13(1):87-94. doi: 10.1038/ncb2139.
115. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999; 98:115–124.
116. Xia C, Dong R, Chen C, Wang H, Wang DW. Cardiomyocyte specific expression of Acyl-coA thioesterase 1 attenuates sepsis induced cardiac

- dysfunction and mortality. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Dec 25;468(4):533-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.078.
117. Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC, McMillin JB. Electrical stimulation of neo-natal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*1997;94:11399–11404.
118. Xing Y, Lv A, Wang L, Yan X. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem.* 2012 Jan;360(1-2):279-87. doi: 10.1007/s11010-011-1067-z.
119. Yan X, Lv A, Xing Y, Liu B, Hou J, Huang W, Li Y. Inhibition of p53-p21 pathway promotes the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 2011 Aug;354(1-2):21-8. doi: 10.1007/s11010-011-0801-x.
120. Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Dec;72:19-32. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.11.011.
121. Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Liu Z, Lu R, Alimohamadi S, Yin C, Fu JD, Wang GG, Liu J, Qian L. Bmi1 Is a Key Epigenetic Barrier to Direct Cardiac Reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2016 Mar 3;18(3):382-95. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.003.
122. Zobel C, Cho HC, Nguyen TT, Pekhletski R, Diaz RJ, Wilson GJ, Backx PH. Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *J Physiol* 2003; 550:365-72. doi: 10.1113/jphysiol.2002.036400.
123. Zohar R, Cheifetz S, McCulloch CA, Sodek J. Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jan;106 Suppl 1:401-7.

REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Žodiniai pranešimai

1. **M. Gasiūnienė**, R. Navakauskienė. Application of cytokines for cardiomyogenic differentiation induction of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. IV tarptautinė Lietuvos kamieninių ląstelių tyrėjų asociacijos konferencija, Vilnius, Lietuva, 2018 m. spalio 26 d.
2. **M. Gasiūnienė**, G. Petkus, N. Krasovskaja, A. Utkus, R. Navakauskienė. Assessment of the efficacy of TGF- β 1 and Angiotensin II to induce cardiomyogenic differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. The 43rd FEBS Congress, Praha, Čekija, 2018 m. liepos 7-12 d. *Tezės publikuotos: FEBS Open Bio*, 8: ShT.37-2. doi: 10.1002/2211-5463.12449. *Laimėta stipendija dalyvauti konferencijoje.*
3. **M. Gasiūnienė**, R. Navakauskienė. Searching for new inducers of cardiomyogenic differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. III tarptautinė Lietuvos kamieninių ląstelių tyrėjų asociacijos konferencija, Vilnius, Lietuva, 2017 m. spalio 27 d.
4. **M. Glemžaitė**, A. Zubova, N. Krasovskaja, A. Utkus, R. Navakauskienė. DNMT and p53 inhibitors are potential cardiomyogenic differentiation inducers of human amniotic fluid derived mesenchymal stem cells. 9th Annual Conference on Stem cells and Regenerative medicine, Berlynas, Vokietija, 2017 m. rugsėjo 25-26 d. *Tezės publikuotos: J Stem Cell Res Ther 2017*, 7:8(Suppl). doi: 10.4172/2157-7633-C1-026.
5. **M. Glemžaitė**, S. Baronaitė, A. Zentelytė, J. Savickienė, N. Krasovskaja, A. Arlauskienė, R. Navakauskienė. Human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells: features and differentiation potential. Open Readings 2017, Vilnius, Lietuva, 2017 m. kovo 14-17 d.
6. **M. Glemžaitė**, R. Navakauskienė. Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells. The Coins 2017 – International Conference of Life Sciences, Vilnius, Lietuva, 2017 m. vasario 28-kovo 2 d.

Stendiniai pranešimai

1. **M. Gasiūnienė**, G. Petkus, N. Krasovskaja, A. Utkus, R. Navakauskienė. Investigation of TGF- β 1 and Angiotensin II as potential cardiomyogenic differentiation inducers of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. XV Tarptautinė Lietuvos Biochemikų draugijos konferencija, Dubingiai, Lietuva, 2018 m. birželio 27-29 d.
2. **M. Glemžaitė**, S. Baronaitė, A. Zentelytė, J. Savickienė, N. Krasovskaja, A. Utkus, R. Navakauskienė. Features and differentiation potential of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. Hydra Summer School on Stem cells and Regenerative medicine, Hydra sala, Graikija, 2017 m. rugsėjo 10-17 d. *Laimėta stipendija dalyvauti vasaros mokykloje.*
3. Navakauskienė R, **Glemžaitė M**, Baronaitė S, Zentelytė A, Krasovskaja N, Borutinskaitė V, Savickienė J, Utkus A. Isolation and characterization of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells as a potential new source for stem cell research and regenerative medicine. World Advanced Therapies & Regenerative Medicine Congress 2017. Londonas, Didžioji Britanija, 2017 m. gegužės 17-19 d.
4. Borutinskaitė V, Baronaitė S, **Glemžaitė M**, Zentelytė A, Krasovskaja N, Arlauskienė A, Savickienė J, Utkus A, Navakauskienė R. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells are a new promising source for clinical applications. Stem Cell Community Day. Hamburgas, Vokietija, 2017 m. balandžio 4 d.
5. **M. Glemzaitė**, S. Baronaite, A. Zentelyte, J. Savickiene, B. Wojtas, B. Kaminska, R. Navakauskiene. Assessment of epigenetic changes during cardiac differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. IMB Conference “Epigenetics in Development”, Maincas, Vokietija, 2016 m. spalio 20-22 d.
6. **M. Glemžaitė**, R. Navakauskienė. Osteogenic differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells is determined by epigenetic changes. XIV Tarptautinė Lietuvos Biochemikų draugijos konferencija, Druskininkai, Lietuva, 2016 m. birželio 28-30 d.

PADĖKA

Visų pirma, nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei prof. dr. Rūtai Navakauskienei už suteiktą galimybę doktorantūros studijų metu darbuotis jos vadovaujamoje laboratorijoje ir tyrinėti labai įdomų objektą – vaisiaus vandens kamienines ląsteles, už parodytą kryptį ir naujas žinias, už palaikymą, patarimus, paskatinimą vykti į konferencijas, už suteiktas sąlygas ir toliau prisidėti prie mokslo populiarinimo vedant ekskursijas tiek po Gyvybės mokslų centrą, tiek po laboratoriją. Ačiū už tai, kad leidote ir skatinote augti tolygiai kaip mokslininkei ir kaip asmenybei.

Labai didelį ačiū sakau visam Ląstelės molekulinės biologijos kolektyvui, o ypač dr. J. Savickienei už įvedimą į kamieninių ląstelių pasaulį, dr. S. Baronaitei ir A. Zentelytei – už pasidalinimą ląstelių kultivavimo subtilybėmis ir pagalbą atliekant molekulinis tyrimus, dr. G. Treigytei – už supažindinimą su baltymų analizės metodais. Atskirai noriu padėkoti dr. G. Valiulienei, A. Zentelytei ir A. Vitkevičienei – už tai, kad visada galėjau kartu pasidžiaugti sėkmėmis, pasidalinti nuoskaudomis ar nepavykusiais eksperimentais, padiskutuoti moksliniais bei gyvenimiškais klausimais.

Be abejo, didelė padėka keliauja ir buvusiems mano studentams A. Zubovai, G. Petkui, E. Valatkaitei – jie savo darbais svariai prisidėjo prie šioje disertacijoje aptariamų rezultatų, taip pat padėjo man tobulėti mokymo srityje bei leido man pačiai mokytis bendrauti ir vadovauti.

Širdingai dėkoju tėveliams ir broliui už tą nuo pat mažų dienų jaustą akademinę aplinką, kantrybę, palaikymą ir paskatinimą siekti vis daugiau, supratingumą ir motyvaciją.

Ir, žinoma, iš visos širdies esu dėkinga savo vyrui Vytautui už tikėjimą manimi, visapusišką palaikymą ir pagalbą, nesibaigiantį optimizmą ir žinojimą, kad viskas bus gerai šiame mano mokslinio kelio etape.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS

1. **Glemžaitė M**, Navakauskienė R. Osteogenic Differentiation Of Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells Is Determined By Epigenetic Changes. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:6465307. Epub 2016 Oct 12. doi: 10.1155/2016/6465307.
2. **Gasiūnienė M**, Petkus G, Matuzevičius D, Navakauskas D, Navakauskienė R. Angiotensin II and TGF-β1 Induce Alterations in Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Leading to Cardiomyogenic Differentiation Initiation. *Int J Stem Cells.* 2019a Apr 30. doi: 10.15283/ijsc18126. [Epub ahead of print]
3. **Gasiūnienė M**, Zentelytė A, Treigyte G, Baronaitė S, Savickienė J, Utkus A, Navakauskienė R. Epigenetic Alterations In Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells Derived From Normal And Fetus-Affected Gestations: A Focus On Myogenic And Neural Differentiations. *Cell Biol Int.* 2019b Mar;43(3):299-312. doi: 10.1002/cbin.11099.
4. **Gasiūnienė M**, Zentelytė A, Wojtas B, Baronaitė S, Krasovskaja N, Savickienė J, Gielniewski B, Kaminska B, Utkus A, Navakauskienė R. DNMT inhibitors effectively induce gene expression changes suggestive of cardiomyogenic differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells via chromatin remodeling. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019c;13:469–481. doi: 10.1002/term.2800.
5. **Gasiūnienė M**, Zubova A, Utkus A, Navakauskienė R. Epigenetic and metabolic alterations in human amniotic fluid stem cells induced to cardiomyogenic differentiation by DNA methyltransferases and p53 inhibitors. *J Cell Biochem.* 2019d;120:8129-8143. doi: 10.1002/jcb.28092.

Autorės indėlis: Autorė parašė pirmą, antrą, ketvirtą ir penktą publikacijas, prisidėjo prie trečios publikacijos rengimo, atliko daugelį molekulinį ir epigenetinių tyrimų su VV-MKL iš sveiko nėštumo (normos), paskelbtų visose nurodytose publikacijose.

Visos publikacijų kopijos patalpintos spausdintoje disertacijos versijoje.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.