

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Edyta Brzóska-Wójtowicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 21.02.2005

tytuł rozprawy: Rola wybranych białek transbłonowych w adhezji i fuzji mioblastów

promotor: prof. dr hab. Jerzy Moraczewski

magister biologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 03.07.2000

tytuł pracy: Zmiany fosforylacji taliny w różnicujących się *in vitro* komórkach satelitowych wolno- i szybko kurczących się mięśni szkieletowych szczura traktowanych estrami forbolu

promotor: prof. dr hab. Jerzy Moraczewski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

03.2005–obecnie	adiunkt	Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa
09.2007–12.2008	adiunkt	Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
01.2005–08.2007	asystent	Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
07.2004–12.2004	samodzielny biolog	Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
01.2001–06.2004	starszy biolog	Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
02.2000-12.2000	laborant	Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

4. Wskazanie osiągnięcia*¹ wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):
a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Udział białek adhezyjnych oraz cytokiny Sdf-1 w różnicowaniu komórek macierzystych i ich mobilizacji do uszkodzonych mięśni szkieletowych

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. Wrobel E, **Brzoska E**, Moraczewski J. M-cadherin and beta-catenin participate in differentiation of rat satellite cells. (2007) Eur J Cell Biol 86: 99-109
2. **Brzoska E**, Przewozniak M, Grabowska I, Janczyk-Ilach K, Moraczewski J. Pax3 and Pax7 expression during myoblast differentiation in vitro and fast and slow muscle regeneration in vivo. (2009) Cell Biol Int 33: 483-492
3. Grabowska I, Szeliga A, Moraczewski J, Czaplicka I, **Brzoska E**. Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. (2011) Cell Biol Int 35: 125-133
4. **Brzoska E**, Kowalewska M, Markowska-Zagrajek A, Kowalski K, Archacka K, Zimowska M, Grabowska I, Czerwinska AM, Czarnecka-Gora M, Streminska W, Janczyk-Ilach K, Ciemerych MA. Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells. (2012) Biol Cell 104: 722-737
5. Przewozniak M, Czaplicka I, Czerwinska AM, Markowska-Zagrajek A, Moraczewski J, Streminska W, Janczyk-Ilach K, Ciemerych MA, **Brzoska E**. Adhesion proteins-an impact on skeletal myoblast differentiation. (2013) PLoS One 8: e61760
6. **Brzoska E**, Kowalski K, Markowska-Zagrajek A, Kowalewska M, Archacki R, Plaskota P, Stremińska S, Jańczyk-Ilach K, Ciemerych MA. Sdf-1 (CXCL12) induces CD9 expression in stem cells engaged in muscle regeneration. (2015) Stem Cell Res Ther 6:46, DOI 10.1186/s13287-015-0041-1
7. Kowalski K, Archacki R, Archacka K, Stremińska W, Paciorek A, Gołębek M, Ciemerych MA, **Brzoska E**. Stromal derived factor-1 and granulocyte-colony stimulating factor treatment improves regeneration of Pax7^{-/-} mice skeletal muscles. (2015) J Cachexia Sarcopenia Muscle, DOI: 10.1002/jcsm.12092

¹ * w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Udział białek adhezyjnych oraz cytokiny Sdf-1 w różnicowaniu i mobilizacji komórek macierzystych do uszkodzonych mięśni szkieletowych

Różnicowanie miogeniczne w przebiegu regeneracji mięśni szkieletowych

Uszkodzone mięśnie szkieletowe mają zdolność do odbudowy swojej struktury [praca przeglądowa (Moraczewski i wsp., 2008)]. Rekonstrukcja tkanki mięśniowej możliwa jest dzięki związanym z włóknami mięśniowymi unipotentnym komórkom macierzystym nazywanym komórkami satelitowymi [praca przeglądowa (Relaix i wsp., 2012; Archacka i wsp., 2013)]. Pierwsze opisy regeneracji mięśni pochodzą już z 1849 roku (Rokitansky, 1849), a komórek satelitowych z 1961 roku, kiedy to ich obecność w mięśniach żaby opisał niezależnie dwóch badaczy, a byli to Alexander Mauro (Mauro, 1961) i Bernard Katz (Katz i wsp., 1961). Udział komórek satelitowych w regeneracji mięśni myszy został opisany w 1965 roku przez Shafiqą i Goryckiego (Shafiq i wsp., 1965). W publikacji z 1968 roku Mauro, Shafiq i Gorycki udowodnili, że komórki satelitowe odgrywają także rolę w zachodzącym w okresie pourodzeniowym wzroście mięśni (Shafiq i wsp., 1968). W tym czasie jądra komórek satelitowych stanowią od 30 do 35% wszystkich jąder komórkowych obecnych w mięśniu (mysz, szczur), natomiast u dorosłych organizmów procent ten wynosi poniżej 5 (Allbrook i wsp., 1971; Schultz, 1974). Zatem liczba komórek satelitowych gwałtownie spada podczas dojrzewania organizmu. Kolejne badania polegające przede wszystkim na izolacji i hodowli komórek satelitowych w warunkach *in vitro*, a także ich transplantacji, pozwoliły na zgłębienie wiedzy na temat roli komórek satelitowych we wzroście i regeneracji mięśni szkieletowych [praca przeglądowa (Scharner i wsp., 2011)].

Rekonstrukcję mięśnia poprzedza mioliza uszkodzonych włókien mięśniowych. W ciągu pierwszych kilku godzin po uszkodzeniu do tkanki mięśniowej napływają neutrofile, które są w niej obecne jedynie przejściowo, po upływie 36 - 48h nie są już bowiem wykrywane w mięśniu. Liczba makrofagów obecnych w mięśniu zaczyna wzrastać kilka godzin po uszkodzeniu i zwiększa się przez około 3 - 4 dni. Makrofagi prozapalne o fenotypie M1 fagocytują uszkodzone włókna mięśniowe i poprzez cząsteczki adhezyjne, a także produkowane mitogeny (Il-6, ang. interleukin-6; TNF- α , ang. tumor necrosis factor- α ; G-CSF, ang. granulocyte colony stimulating factor), stymulują proliferację komórek satelitowych. Pojawiające się później makrofagi przeciwzapalne o fenotypie M2 poprzez wydzielanie cytokin i czynników wzrostu, na przykład TGF- β (ang. tumor growth factor), stymulują różnicowanie mięśniowych komórek prekursorowych, a więc komórek wywodzących się z komórek

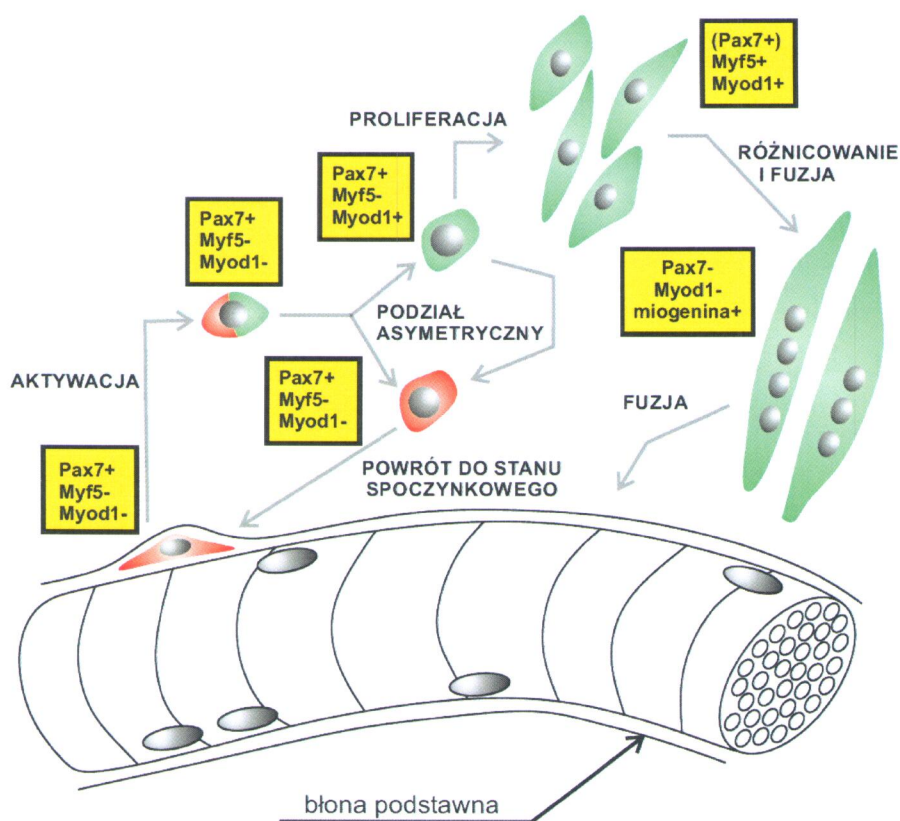
satelitowych. W momencie zakończenia różnicowania komórek prekursorowych w mioblasty oraz rozpoczęcia ich fuzji i tworzenia miotub liczba makrofagów gwałtownie spada [praca przeglądowa (Saclier i wsp., 2013)].

Do aktywacji komórek satelitowych dochodzi po uszkodzeniu tkanki mięśniowej, które może być spowodowane np. aktywnością fizyczną (EIMD, ang. exercise-induced muscle damage lub eccentric-induced muscle damage), urazami mechanicznymi, chemicznymi lub chorobami (omówione poniżej). W warunkach eksperymentalnych uszkodzenie tkanki mięśniowej może być wywołane mechaniczne, poprzez zmrożenie lub zastosowanie miotoksyn - na przykład kardiotoksyny. Kardiotoksyna izolowana z jadu kobry *Naja naja*, powoduje perforację błon komórkowych i aktywację fosfolipazy C, w wyniku czego dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu kanałów jonowych, depolaryzacji i degradacji błon komórkowych włókien mięśniowych (Lin Shiau i wsp., 1976). Aktywacja komórek satelitowych, które w dojrzałym mięśniu pozostają w stanie spoczynkowym, wyrażona wznowieniem przez nie cyklu komórkowego, następuje w wyniku działania czynników wzrostu, między innymi takich jak HGF (ang. hepatocyte growth factor) i FGF (ang. fibroblast growth factor), produkowanych przez komórki stanu zapalnego (neutrofile, makrofagi), komórki śródbłonna naczyń, komórki śródmiąższowe (fibroblasty, mezenchymalne komórki macierzyste) oraz uwalnianych z macierzy zewnątrzkomórkowej [prace przeglądowe (Brzoska i wsp., 2011; Ciemerych i wsp., 2011; Bentzinger i wsp., 2013)]. Komórki śródbłonna produkują także czynniki promujące proliferację komórek satelitowych, takie jak VEGF (ang. vascular endothelial growth factor), PDGF-B (ang. platelet-derived growth factor - B) i HGF [praca przeglądowa (Montarras i wsp., 2013)].

Komórki satelitowe są źródłem mięśniowych komórek prekursorowych, z których powstają mioblasty, które biorą udział w naprawie uszkodzonych włókien poprzez przyłączanie się do nich lub fuzję, w wyniku której powstają wielojądrowe miotuby, dojrzewające w nowe włókna mięśniowe. Proces różnicowania komórek satelitowych w mioblasty i następnie w miotuby może być badany w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych mioblastów lub pierwotnych hodowli (pochodzących bezpośrednio z organizmu) mioblastów uzyskanych z komórek satelitowych. Różnicowanie miogeniczne komórek satelitowych związane jest ze zmianą ekspresji szeregu genów w tym czynników transkrypcyjnych *Pax7* (ang. paired box protein 7) i miogenicznych czynników regulatorowych (MRF, ang. myogenic regulatory factors) takich jak *Myod1* (ang. myogenic differentiation 1), *Myf5* (ang. myogenic factor 5), *miogenina*, *Myf6* (ang. myogenic factor 6, dawniej zwany MRF4)(Rycina 1). Zarówno komórki satelitowe w stanie spoczynkowym jak i aktywowane ekspresyjnie czynnik transkrypcyjny *Pax7*. Odgrywa on bardzo ważną rolę w specyfikacji i utrzymaniu populacji komórek satelitowych w mięśniach szkieletowych [praca przeglądowa (Archacka i wsp., 2013)]. Mięśnie myszy pozbawionych funkcjonalnego genu *Pax7* charakteryzują się gwałtownie

spadającą liczbą komórek satelitowych w pierwszych dniach po urodzeniu (Seale i wsp., 2000; von Maltzahn i wsp., 2013).

Proliferujące komórki satelitowe syntetyzują czynnik transkrypcyjny Myf5 (mRNA dla Myf5 obecne jest także w komórkach w stanie spoczynkowym). Natomiast różnicowanie mioblastów, związane z zakończeniem podziałów, prowadzi do spadku poziomu Myf5. MyoD, które pojawia się w aktywowanych komórkach satelitowych, obecne jest również w mioblastach rozpoczynających różnicowanie. Mioblasty, w których dochodzi do syntezy miogeniny kończą podziały komórkowe, układają się w szeregi i fuzują ze sobą tworząc wielojądrowe miotuby (Rycina 1). Wzrost poziomu miogeniny indukuje ekspresję genów kodujących strukturalne białka mięśniowe, takie jak np. miozyna [praca przeglądowa (Yablonka-Reuveni, 2011)]. We włóknach mięśniowych dochodzi do ekspresji czynnika Myf6, który między innymi obniża ekspresję genu kodującego miogeninę.



Rycina 1. Komórki satelitowe (kolor czerwony) odgrywają kluczową rolę w regeneracji mięśni szkieletowych. Komórki satelitowe o fenotypie (Pax7⁺/Myf5⁻/Myod1⁻), aktywowane, w wyniku uszkodzenia mięśnia, dzielą się i różnicują w mioblasty (kolor zielony) o fenotypie (Pax7⁺/Myf5⁺/Myod1⁺). Mioblasty fuzują i tworzą wielojądrowe miotuby o fenotypie (Pax7⁻/Myf5⁻/Myod1⁻/miogenina⁺), a następnie włókna mięśniowe. Natomiast mioblasty, w których nie dochodzi do ekspresji Myf5 (Pax7⁺/Myf5⁻/Myod1⁺) odtwarzają populację komórek satelitowych, co wiąże się ze spadkiem poziomu Myod1 (Pax7⁺/Myf5⁻/Myod1⁻).

Dla prawidłowego przebiegu procesów różnicowania mioblastów i samoodnowy populacji komórek satelitowych kluczowy jest czynnik transkrypcyjny Pax7 [praca przeglądowa (Przewozniak i wsp., 2008)]. W części komórek, które wznowiły cykl komórkowy (Pax7⁺/Myf5⁻/Myod1⁺), dochodzi do spadku poziomu Myod1. Komórki te przestają się dzielić i nie różnicują, odnawiają natomiast populację komórek satelitowych (Zammit i wsp., 2004). Przeprowadzone przez nas badania (włączone do cyklu prac stanowiącego osiągnięcie naukowe) wykazały, że czynnik transkrypcyjny Pax7 obecny jest w niezróżnicowanych szczyrych mioblastach w hodowli *in vitro* (Brzoska i wsp., 2009). Ponadto w komórkach takich wykrywany jest mRNA kodujący kolejne białko z rodziny Pax - Pax3. Podczas różnicowania mioblastów dochodzi do spadku poziomu transkryptów Pax3 i Pax7. Czynniki te są nieobecne w zróżnicowanych miotubach. W hodowli *in vitro* wykrywane były także niezróżnicowane komórki wykazujące obecność mRNA Pax3 i Pax7. Były to najprawdopodobniej komórki odpowiedzialne za samoodnawianie się populacji komórek satelitowych. Zmiany w ekspresji czynników Pax3 i Pax7 obserwowane były również podczas regeneracji mięśni szkieletowych szczura (Brzoska i wsp., 2009).

Wyniki kolejnych eksperymentów przedstawione w publikacjach włączonych do osiągnięcia naukowego (Wrobel i wsp., 2007; Grabowska i wsp., 2011; Przewozniak i wsp., 2013) wykazały, że w przebiegu różnicowania komórek satelitowych oraz mioblastów bardzo ważną rolę odgrywają białka adhezyjne. Badania te były prowadzone w ramach uzyskanego przeze mnie grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych oraz 3 grantów wewnętrznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, na tzw. Badania Własne Wydziału Biologii UW. Białka adhezyjne są białkami błonowymi zaangażowanymi w tworzenie połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową lub z innymi komórkami. Do białek adhezyjnych należą między innymi badane przez nas M-kadheryna, tetraspaniny CD9 i CD81, VCAM-1 (ang. vascular cell adhesion molecule-1) oraz integryny $\alpha 3$ i $\beta 1$. Opublikowane przez nas prace poszerzyły wiedzę na temat białek uczestniczących w tworzeniu połączeń pomiędzy fuzującymi mioblastami. Fuzja mioblastów stanowi jeden z ważniejszych etapów powstawania miotub, które różnicują we włókna mięśniowe. Proces ten zachodzi zarówno podczas rozwoju zarodkowego, jak i regeneracji uszkodzonych włókien [prace przeglądowe (Abmayr i wsp., 2012; Hindi i wsp., 2013)].

Zanim jednak dojdzie do fuzji, mioblasty migrują i łączą się ze sobą tworząc tymczasowe połączenia międzykomórkowe. Migracja mioblastów jest indukowana przez takie czynniki jak interleukina 4 (IL-4), Sdf-1 (ang. stromal derived factor – 1), HGF (ang. hepatocyte growth factor) czy też PDGF (ang. platelet-derived growth factor). Zdolność mioblastów do migracji sukcesywnie maleje wraz z ich różnicowaniem. W kolejnym etapie różnicowania mioblasty ulegają adhezji. Powstanie połączeń międzykomórkowych pomiędzy mioblastami umożliwia fuzję błon komórkowych. W

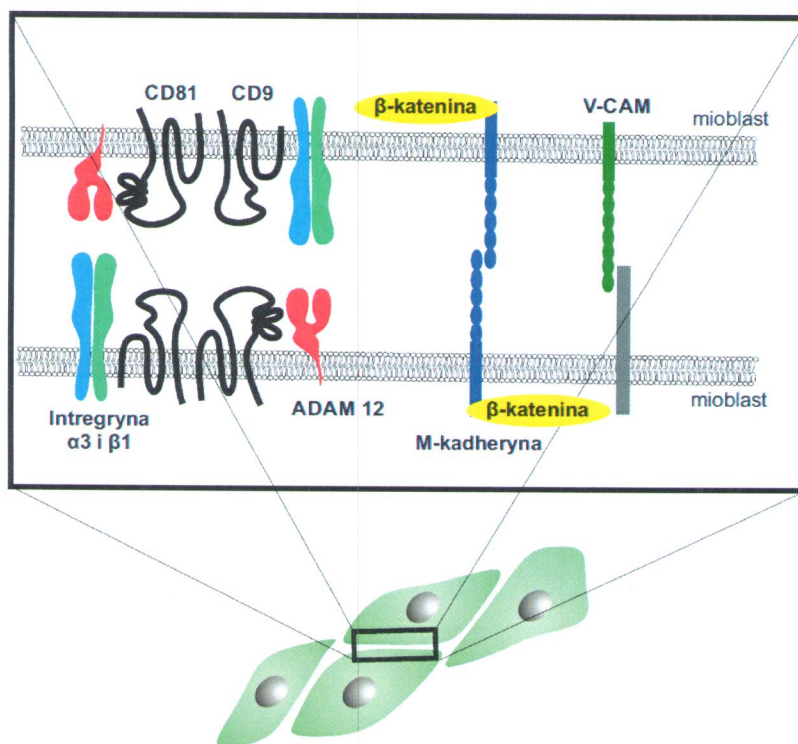
rozpoznawanie się komórek i tworzenie połączeń między nimi zaangażowane są białka adhezyjne takie jak N-kadheryna, M-kadheryna, ADAM12, integryna $\alpha 9\beta 1$ oraz inne czynniki takie jak np. kinaza płytek przylegania (FAK, ang. focal adhesion kinase), czy też kindlina-2 (białko związane z integrynami). Zarówno migracja, jak i fuzja mioblastów związane są również z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego. Fuzja błon wymaga natomiast zmiany ich składu, na przykład wzrostu poziomu fosfatydyloseryny i cholesterolu [prace przeglądowe (Abmayr i wsp., 2012; Hindi i wsp., 2013)].

W pierwszym etapie prowadzonych przez nas badań wykazaliśmy, że podczas fuzji mioblastów dochodzi do powstawania połączeń międzykomórkowych, w czym bierze udział M-kadheryna tworząca kompleksy z β -kateniną (Wrobel i wsp., 2007). M-kadheryna jest zależną od jonów wapnia transbłonową glikoproteiną uczestniczącą w formowaniu homofilowych połączeń międzykomórkowych (Kemler, 1993). Obecna jest ona zarówno w mięśniach formujących się w trakcie rozwoju zarodkowego, jak i w regenerujących mięśniach szkieletowych dorosłych organizmów (Donalies i wsp., 1991; Moore i wsp., 1993; Kaufmann i wsp., 1999). W mięśniach dorosłych organizmów M-kadheryna ulega ekspresji w komórkach satelitowych odgrywając niezwykle istotną rolę w ich adhezji do włókna mięśniowego (Irintchev i wsp., 1994; Reimann i wsp., 2000). Podczas regeneracji mięśni obecna jest w różnicujących i fuzjujących mioblastach (Irintchev i wsp., 1994). Kadheryny biorące udział w tworzeniu połączeń międzykomórkowych, łączą się z cytoszkieletem aktynowym przy udziale α i β -kateniny. Co istotne, zmiany aktywności β -kateniny, związane z jej fosforylacją, są ważnym elementem regulacji ekspresji genów [praca przeglądowa (Ben-Ze'ev i wsp., 1998)]. Przykładowo β -katenina bierze udział w aktywacji ekspresji miogeniny podczas różnicowania mioblastów (Goichberg i wsp., 2001). Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że M-kadheryna wiąże się z β -kateniną w fuzjujących mioblastach. W okresie poprzedzającym fuzję mioblastów β -katenina oddziałuje z cytoszkieletem aktynowym i uczestniczy w tworzeniu pierwszych miejsc kontaktu pomiędzy mioblastami. Powstanie takich połączeń jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu fuzji komórek (Wrobel i wsp., 2007).

Dalsze prowadzone przez nas prace wykazały, że równie istotne dla prawidłowej fuzji mioblastów jest tworzenie kompleksów podjednostki $\alpha 3$ i $\beta 1$ integryny z tetraspaninami CD9 i CD81 oraz białkiem ADAM12 (Grabowska i wsp., 2011; Przewozniak i wsp., 2013). Integryny będące receptorami dla białek macierzy zewnątrzkomórkowej tworzą w błonie komórkowej heterodimery zbudowane z podjednostki α i β . Integryny łączą się z cytoszkieletem aktynowym, wiążą się także z białkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału do komórki, takimi jak kinaza płytek przylegania (FAK, ang. focal adhesion kinase) oraz kinaza fosfatydyloinozytolu [praca przeglądowa (Seguin i wsp., 2015)]. Integryny mogą wiązać się z białkami ADAM (ang. a disintegrin and metalloproteinase), charakteryzującymi się wielodomenową strukturą. Jedną z domen zewnątrzkomórkowych białek

ADAM jest domena dezintegrynowa, która może wiązać integryny. Kolejna z domen posiada aktywność metaloproteinazy (Huovila i wsp., 2005). Białko ADAM12 odgrywa ważną rolę w procesie różnicowania i fuzji mioblastów zarówno podczas rozwoju zarodkowego, jak i podczas regeneracji (Yagami-Hiromasa i wsp., 1995; Borneman i wsp., 2000). Kolejnymi białkami błonowymi, będącymi przedmiotem naszych zainteresowań były tetraspaniny wiążące się z integrynami, receptorami czynników wzrostu i innymi białkami powierzchniowymi (Boucheix i wsp., 2001). Tetraspaniny CD9 i CD81 uczestniczą w fuzji mioblastów podczas regeneracji mięśni szkieletowych (Charrin i wsp., 2013). Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że ekspresja białek adhezyjnych zmienia się podczas różnicowania mioblastów w hodowli pierwotnej oraz linii komórkowych takich jak linia mysich mioblastów C2C12. Zmiany takie obserwowaliśmy także w hodowlach trójwymiarowych (Grabowska i wsp., 2011), a także podczas regeneracji mięśni (Przewozniak i wsp., 2013). Celem pracy było ponadto ustalenie, które z badanych białek wchodzi w skład kompleksu zaangażowanego w fuzję mioblastów. Wykazaliśmy, że tworzenie kompleksów podjednostki $\alpha 3$ integryny z podjednostką $\beta 1$, tetraspaninami CD9 i CD81, a także białkiem ADAM12 ma kluczowe znaczenie zarówno podczas regeneracji mięśni, jak i podczas różnicowania mioblastów *in vitro* (Grabowska i wsp., 2011; Przewozniak i wsp., 2013). Na zasadnicze znaczenie podjednostki integryny $\alpha 3$ w fuzji mioblastów wskazują wyniki doświadczeń, w których wyciszaliśmy jej ekspresję. Mioblasty, w których doprowadzono do wyciszenia ekspresji podjednostki integryny $\alpha 3$ fuzjują ze znacznie mniejszą wydajnością niż komórki kontrolne (Przewozniak i wsp., 2013).

Podsumowując, różnicowanie mięśniowych komórek macierzystych, to jest komórek satelitowych oraz wywodzących się z nich komórek prekursorowych i mioblastów, związane jest ze spadkiem ekspresji czynnika transkrypcyjnego Pax7 oraz ze wzrostem ekspresji białek adhezyjnych takich jak M-kadheryna, integryna $\alpha 3\beta 1$, białko ADAM12 oraz tetraspaniny CD9 i CD81 (Rycina 2). Powstawanie kompleksów integryny $\alpha 3\beta 1$, białka ADAM12 oraz tetraspanin CD9 i CD81, a także M-kadheryny i β -kateniny ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego różnicowania mioblastów i ich fuzji. Są to niezbędne etapy prawidłowej regeneracji mięśni szkieletowych.



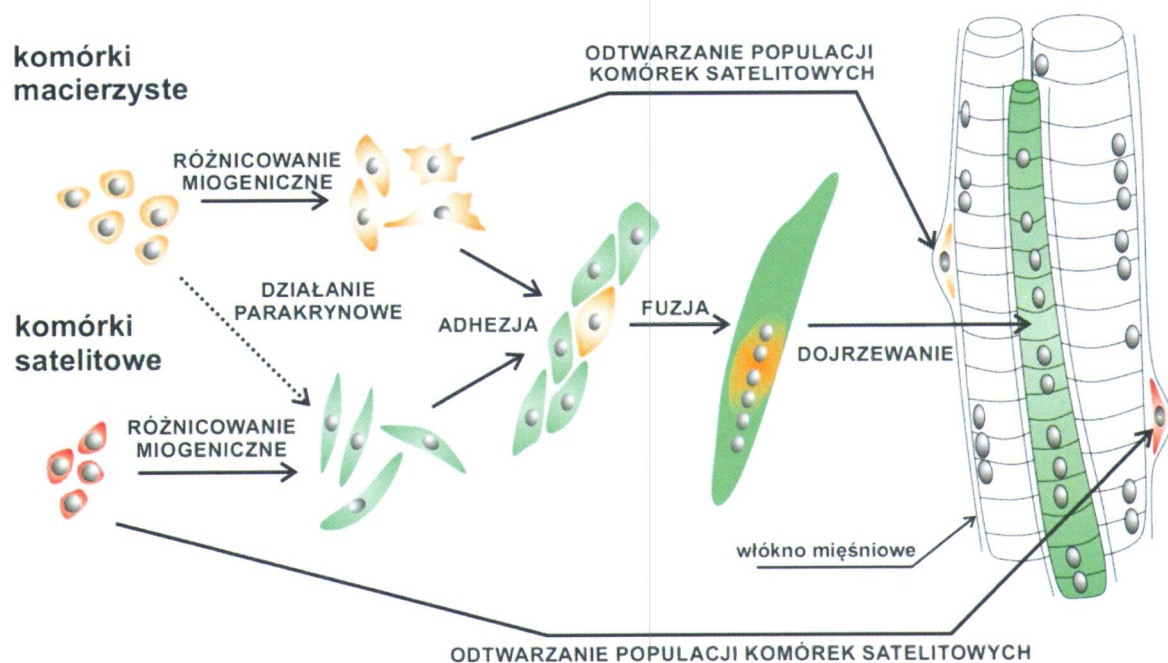
Rycina 2. Białka uczestniczące w tworzeniu kompleksów pomiędzy fuzującymi mioblastami: podjednostka $\alpha 3$ i $\beta 1$ integryny, tetraspaniny CD9 i CD81, białko ADAM12, M-kadheryna, V-CAM-1 (opis w tekście).

Komórki macierzyste w regeneracji mięśni szkieletowych

Rekonstrukcja uszkodzonych mięśni szkieletowych może być zakłócona w przebiegu chorób (nowotwory, AIDS, cukrzyca, dystrofie, choroby neurodegeneracyjne), a także w przypadku rozległych urazów. Degeneracja i spadek masy mięśni (atrofia) towarzyszy także starzeniu, a proces ten nazywany jest sarkopenią. W tych przypadkach komórki satelitowe nie są w stanie zrekonstruować uszkodzonego mięśnia, który zastępowany jest niefunkcjonalną tkanką łączną. Jedną z możliwości wspomagania regeneracji mięśni szkieletowych są terapie komórkowe z zastosowaniem komórek macierzystych [praca przeglądowa (Archacka i wsp., 2013; Bajek i wsp., 2015)]. Przeszczepione komórki macierzyste mogą w różny sposób wpływać na przebieg regeneracji mięśni szkieletowych (Rycina 3). Po pierwsze, mogą uczestniczyć naprawie uszkodzonych lub w tworzeniu nowych włókien mięśniowych. Mechanizmy tego procesu nadal pozostają niewyjaśnione. Aktualne pozostaje pytanie czy komórki macierzyste fuzują z mioblastami i to prowadzi do indukcji różnicowania miogenicznego, czy też przeszczepione komórki rozpoczynają różnicowanie miogeniczne w środowisku regenerującego mięśnia szkieletowego, czego konsekwencją jest fuzja z mioblastami. Po drugie, przeszczepione komórki macierzyste mogą brać udział w odtwarzaniu populacji komórek satelitowych i uczestniczyć w kolejnych rundach regeneracji. Po trzecie, produkowane przez komórki macierzyste cytokiny mogą

modulować przebieg stanu zapalnego podczas regeneracji mięśni oraz wpływać na procesy proliferacji i różnicowania mioblastów.

Ponadto przeszczepione komórki posiadają niezmienione lub „naprawione” geny, na przykład gen kodujący dystrofinę. Brak funkcjonalnej dystrofiny, obserwowany w dystrofii mięśniowej Duchenne’a, jest przyczyną postępującej degradacji włókien mięśniowych. Przeszczepione komórki, które wezmą udział w rekonstrukcji mięśni „wprowadzają” do nich funkcjonalną dystrofinę, uczestniczącą w tworzeniu połączeń pomiędzy cytoszkieletem a błoną włókna mięśniowego [praca przeglądowa (Benedetti i wsp., 2013)].



Rycina 3. Udział przeszczepionych komórek macierzystych w regeneracji mięśni szkieletowych. Komórki macierzyste mogą fuzjować z mioblastami i brać udział w tworzeniu nowych lub naprawie uszkodzonych włókien mięśniowych. Mogą brać także udział w odtwarzaniu populacji komórek satelitowych i uczestniczyć w kolejnych rundach regeneracji. Produkowane przez komórki macierzyste cytokiny mogą modulować przebieg regeneracji mięśni poprzez działanie na komórki stanu zapalnego i/lub proliferację oraz różnicowanie mioblastów.

Pierwszą populacją komórek, które próbowano przeszczepiać do uszkodzonych mięśni były komórki satelitowe i uzyskane z nich mioblasty [praca przeglądowa (Briggs i wsp., 2013; Meregalli i wsp., 2013)]. O niezwykłym potencjale regeneracyjnym komórek satelitowych świadczy fakt, że po przeszczepieniu do uszkodzonego mięśnia pojedynczego włókna mięśniowego wraz z towarzyszącymi mu komórkami satelitowymi (Collins i wsp., 2005), a nawet pojedynczej komórki satelitowej (Sacco i

wsp., 2008), komórki te z ogromną wydajnością były zdolne do odtwarzania włókien mięśniowych. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Partridge'a i współpracowników (Partridge i wsp., 1989) wykorzystano linię mysich mioblastów C2C12. Komórki te przeszczepiano domięśniowo myszom *mdx*, które nie posiadają funkcjonalnego genu kodującego dystrofinę. Przeszczepione komórki tworzyły prawidłowo funkcjonujące włókna mięśniowe, w których obserwowano ekspresję dystrofiny. Badania te rozpoczęły serię prób klinicznych z wykorzystaniem komórek satelitowych i mioblastów [praca przeglądowa (Bajek i wsp., 2015)]. Próby te jednak nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Obserwowano niską przeżywalność przeszczepianych komórek oraz ich ograniczoną zdolność do migracji w mięśniu. Ponadto stosowane metody izolacji komórek satelitowych oraz hodowli w warunkach *in vitro* prowadzą zazwyczaj do utraty ich „potencjału regeneracyjnego”. W regeneracji najbardziej wydajnie uczestniczą przeszczepione niezróżnicowane komórki satelitowe (Montarras i wsp., 2005; Cerletti i wsp., 2008; Sacco i wsp., 2008). Jednakże w tym przypadku poważnym ograniczeniem jest uzyskanie ich odpowiedniej liczby. Zwiększoną wydajność zasiedlania przez mioblasty dystroficznych mięśni uzyskano przeszczepiając komórki domięśniowo co 1 mm (Skuk i wsp., 2007). Niemniej jednak protokół ten może mieć zastosowanie tylko do łatwo dostępnych mięśni. Stosowanie leków immunosupresyjnych poprawia przeżywalność komórek, lecz uzyskiwane wyniki nie były jednoznaczne, ponieważ poprawę funkcji mięśni obserwowano również w przypadku stosowania wyłącznie leków immunosupresyjnych bez transplantacji komórek [praca przeglądowa (Briggs i wsp., 2013)].

Postęp wiedzy na temat komórek macierzystych doprowadził do prób ich wykorzystania w terapiach chorób mięśniowych [prace przeglądowe (Tedesco i wsp., 2012; Sirabella i wsp., 2013)]. Wiele rodzajów komórek macierzystych, izolowanych zarówno z mięśni szkieletowych jak i z innych tkanek, charakteryzuje potencjał miogeniczny - zdolność do różnicowania w komórki mięśniowe *in vitro* i we włókna mięśniowe *in vivo*. Jednym ze źródeł komórek macierzystych o potencjale miogenicznym jest sam mięsień szkieletowy. Z przestrzeni śródmiąższowej wyizolowano komórki PIC (ang. Pw1+ interstitial cells) wykazujące ekspresję białka Pw1, które jest wczesnym markerem komórek miogenicznych. Komórki PIC, w przeciwieństwie do komórek satelitowych, nie wykazują ekspresji białka Pax7. W warunkach *in vitro* mogą one różnicować w mioblasty i tworzyć miotuby, a po przeszczepieniu uczestniczyć w regeneracji mięśni (Mitchell i wsp., 2010). Inną populacją zasiedlającą zarówno niszę komórek satelitowych, jak i przestrzeń śródmiąższową są komórki mSP (ang. muscle side population), które podawane domięśniowo lub do tętnicy tworzą od 1 do 30% nowych włókien w uszkodzonym mięśniu (Asakura i wsp., 2002). Także komórki macierzyste wykazujące ekspresję białka CD133 nazywane AC133+, izolowane zarówno z mięśni szkieletowych, jak i z krwi obwodowej uczestniczą w rekonstrukcji mięśni szkieletowych. Obiecujące wyniki z zastosowaniem komórek

AC133+ w terapii dystrofii Duchenne'a uzyskano podczas pierwszej fazy próby klinicznej w 2007 roku (Torrente i wsp., 2007). Niezwykle interesujące dane uzyskano również po przeszczepieniu do krwioobiegu myszy *mdx* oraz dystroficznych psów mezangioblastów, czyli komórek macierzystych związanych z naczyniami krwionośnymi (Sampaolesi i wsp., 2003; Galvez i wsp., 2006). Komórki te bardzo efektywnie zasiedlały uszkodzone mięśnie. Podczas pierwszych prób klinicznych z zastosowaniem tych komórek podawanych dotętniczo wykazano, że metoda ta jest bezpieczna, a w mięśniach pacjentów pojawia się ekspresja dystrofiny (Cossu i wsp., 2015). Jednakże nie obserwowano poprawy funkcji mięśni (Cossu i wsp., 2015). Potencjał miogeniczny wykazują także mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z różnych tkanek, komórki macierzyste śródbłonna naczyń, hematopoetyczne komórki macierzyste, a także zarodkowe komórki macierzyste, indukowane pluripotentne komórki macierzyste [prace przeglądowe (Tedesco i wsp., 2012; Sirabella i wsp., 2013)]. Badania, w których uczestniczyłam (prace nie włączone do osiągnięcia naukowego) koncentrowały się na możliwości wykorzystania komórek macierzystych izolowanych z krwi pępowinowej, galarety Whartona (tkanka łączna w sznurze pępowinowym) oraz zarodkowych komórek macierzystych w celu poprawy wydajności regeneracji uszkodzonych mięśni szkieletowych (Brzoska i wsp., 2006; Grabowska i wsp., 2012; Grabowska i wsp., 2013; Archacka i wsp., 2014). Komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej i galarety Whartona okazały się być zdolne do zasiedlania mięśni i uczestniczenia w tworzeniu nowych włókien mięśniowych, jednak proces ten przebiegał z niską wydajnością (Brzoska i wsp., 2006; Grabowska i wsp., 2012; Grabowska i wsp., 2013).

Próby mobilizacji komórek macierzystych do uszkodzonych mięśni

Przeszczepianie komórek macierzystych wiąże się z kilkoma ograniczeniami. Po pierwsze, stosowane do terapii komórki muszą być łatwe do pozyskania oraz hodowania *in vitro*, w warunkach zapewniających zachowanie ich niezróżnicowanego charakteru. Po drugie, nierozwiązane pozostają problemy z odrzucaniem przeszczepionych komórek i ich apoptozą po transplantacji. Kolejnym ograniczeniem jest także sposób podawania komórek. Przeszczepiane komórki mogą być podawane systemowo, to znaczy do krwioobiegu, lub domięśniowo. W przypadku podawania komórek do krwioobiegu mogą one zasiedlać liczne uszkodzone mięśnie. Jednak tylko niektóre rodzaje komórek macierzystych posiadają zdolność migracji przez śródbłonek naczyń krwionośnych. Większość komórek musi być przeszczepiana domięśniowo, co ogranicza ich zastosowanie w przypadku trudnodostępnych mięśni lub rozległych uszkodzeń. Przykładowo, przeszczepiane komórki satelitowe nie mają zdolności do przechodzenia przez ściany naczyń krwionośnych (Dellavalle i wsp., 2007). W związku z wymienionymi ograniczeniami podjęliśmy próby mobilizacji endogennych komórek macierzystych do

uszkodzonych mięśni. Opierały się one o wykorzystanie cytokiny Sdf-1. Badania te były finansowane z trzech grantów, których byłam kierownikiem i które były ufundowane przez Fundację Naukową Polpharma, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (program Iuventus Plus) oraz Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (program POMOST).

Pytanie o udział komórek macierzystych innych niż satelitowe w regeneracji mięśni w warunkach fizjologicznych (bez transplantacji) nadal pozostaje otwarte. Wiadomo, że ze stosunkowo niską wydajnością perycyty (Dellavalle i wsp., 2007; Dellavalle i wsp., 2011), czyli komórki macierzyste związane z naczyniami krwionośnymi oraz komórki szpiku kostnego (Palermo i wsp., 2005), mogą uczestniczyć w regeneracji mięśni i odtwarzaniu populacji komórek satelitowych. Realizując badania, których wyniki stały się elementem prezentowanego osiągnięcia naukowego podjęłam próbę zwiększenia wydajności zasiedlania uszkodzonych mięśni przez endogenne (nieprzeszczepiane) komórki macierzyste. W tym celu do uszkodzonych mięśni podawaliśmy cytokinę Sdf-1, która jest chemoatraktantem dla komórek mających na swojej powierzchni receptor CXCR4 (ang. C-X-C chemokine receptor type 4). Sdf-1 wiąże się także z drugim, znacznie mniej poznanym receptorem, to jest CXCR7. CXCR4 i CXCR7 to receptory metabotropowe związane z białkami G. Sdf-1 odgrywa bardzo ważną rolę w migracji komórek macierzystych i prekursorowych posiadających na swojej powierzchni wymienione receptory [prace przeglądowe (Karin, 2010; Kowalski i wsp., 2012)]. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że podawanie domięśniowo Sdf-1 poprawia wydajność regeneracji mięśni szkieletowych. W mięśniach traktowanych Sdf-1 obserwowano nie tylko poprawę morfologii włókien mięśniowych oraz obniżoną fibrozę, ale także podwyższoną ekspresję strukturalnych białek mięśniowych (Brzoska i wsp., 2012). Ponadto nasze badania dowiodły, że do mięśni traktowanych Sdf-1 napływają komórki wykazujące ekspresję markerów CD34 i CXCR4. Wykazaliśmy także, że pod wpływem Sdf-1 zwiększa się zdolność migracji mioblastów na drodze zależnej od metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 (Brzoska i wsp., 2012). Niezwykle cennych informacji dostarczyły badania podczas których myszom pozbawionym funkcjonalnego genu *Pax7* (*Pax7*^{-/-}) podawano Sdf-1 (Kowalski i wsp., 2015). Wyniki tych prac stały się elementem prezentowanego osiągnięcia naukowego. Tak jak wspomniano powyżej, czynnik transkrypcyjny *Pax7* odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu populacji komórek satelitowych, a mięśnie myszy *Pax7*^{-/-} charakteryzują się gwałtownie spadającą liczbą komórek satelitowych w pierwszych dniach po urodzeniu. Wykazaliśmy, że domięśniowe podanie Sdf-1, a także Sdf-1 po uprzednim traktowaniu G-CSF (ang. granulocyte-colony stimulating factor), w istotny sposób poprawia regenerację mięśni myszy *Pax7*^{-/-}. W przypadku podawania Sdf-1 i G-CSF obserwowaliśmy wzrost liczby komórek związanych z włóknami mięśniowymi, które wyizolowaliśmy z regenerujących mięśni. Do uszkodzonych mięśni napływały komórki wykazujące ekspresję CD34, CXCR4 i CXCR7. Przeprowadzone analizy pozwoliły nam na stwierdzenie, że podawanie Sdf-1 i G-CSF

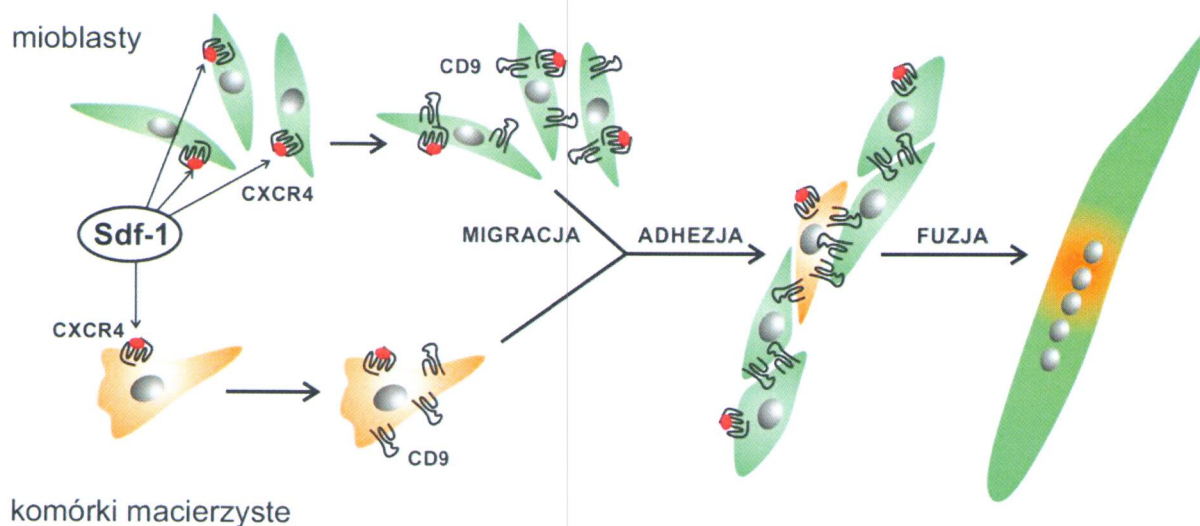
stymuluje regenerację mięśni szkieletowych nawet w przypadku niedoboru komórek satelitowych (Kowalski i wsp., 2015).

Udział białek adhezyjnych w mobilizacji komórek macierzystych do uszkodzonych mięśni

Kolejnym etapem prowadzonych przeze mnie badań była analiza mechanizmu działania Sdf-1 prowadzącego do poprawy regeneracji mięśni szkieletowych. Postawiłam hipotezę, że Sdf-1 wpływając na poziom białek adhezyjnych zwiększa zdolność komórek macierzystych do migracji, a więc zasiedlania przez nie uszkodzonych mięśni i do ich fuzji z mioblastami. Wykazaliśmy, że traktowanie regenerujących mięśni Sdf-1 prowadzi do wzrostu ekspresji tetraspaniny CD9 (Brzoska i wsp., 2015). Przeprowadzone przez nas badania wykazały także, że pod wpływem Sdf-1 w hodowanych *in vitro* komórkach macierzystych, takich jak mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego czy też zarodkowe komórki macierzyste, dochodzi do wzrostu ekspresji białka adhezyjnego CD9. Również w hodowanych *in vitro* mioblastach traktowanych Sdf-1 wzrasta poziom białka CD9. Wzrost ekspresji tetraspaniny CD9 okazał się być związany z aktywacją receptora CXCR4, a nie CXCR7. Wyciszenie ekspresji CXCR4 prowadziło do spadku poziomu CD9. Po wyciszeniu ekspresji CXCR7 nie obserwowano znaczących zmian w poziomie CD9. Ponadto wykazaliśmy, że w hodowlach mieszanych komórki macierzyste ze zwiększoną ekspresją CD9 bardziej wydajnie migrują, fuzjują i tworzą miotuby z mioblastami. Może mieć to kluczowe znaczenie dla zwiększenia wydajności udziału komórek macierzystych w regeneracji mięśni szkieletowych.

Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły na określenie roli białek adhezyjnych i cytokiny Sdf-1 w różnicowaniu i mobilizacji komórek macierzystych do uszkodzonych mięśni (Rycina 4). Różnicowanie unipotentnych mięśniowych komórek macierzystych, to jest komórek satelitowych, w mioblasty, wyrażone utratą ekspresji czynnika transkrypcyjnego Pax7, prowadzi do fuzji mioblastów. Prawidłowa fuzja mioblastów przebiega z udziałem białek adhezyjnych, takich jak M-kadheryna oraz integryna $\alpha 3\beta 1$. Kluczowe dla fuzji mioblastów jest tworzenie kompleksów integryny $\alpha 3\beta 1$ z białkiem ADAM12, tetraspaniną CD9 oraz CD81, a także M-kadheryny z β -kateniną. Wzrost ekspresji tetraspaniny CD9 przez komórki macierzyste mobilizowane podanym domięśniowo Sdf-1 prowadzi do wzrostu wydajności zasiedlania przez nie uszkodzonych mięśni oraz wydajniejszej fuzji tych komórek z mioblastami. Sdf-1 zwiększa także zdolność mioblastów do migracji. Konsekwencją tych procesów jest wydajniejsza regeneracja mięśni szkieletowych. Opisane w autoreferacie wyniki mają szanse przyczynić się do opracowania terapii uszkodzonych lub źle regenerujących mięśni szkieletowych. Mają więc potencjalne zastosowanie praktyczne. Wyniki te stanowią podstawę projektów o znaczeniu aplikacyjnym, które uzyskały finansowanie z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach

Programu Badań Stosowanych III (tytuł projektu „Opracowanie i wdrożenie nowej metody wspomaganie regeneracji mięśni szkieletowych z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych uzyskiwanych z tkanki tłuszczowej”) oraz Programu Strategicznego: profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych STRATEGMED (tytuł projektu „Wykorzystanie potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych”).



Rycina 4. Udział białek adhezyjnych i cytokiny Sdf-1 w różnicowaniu i mobilizacji komórek macierzystych do uszkodzonych mięśni. Różnicowanie unipotentnych mięśniowych komórek macierzystych (komórek satelitowych) w mioblasty, wyrażone utratą ekspresji czynnika transkrypcyjnego Pax7, prowadzi do fuzji mioblastów. Prawidłowa fuzja mioblastów przebiega z udziałem białek adhezyjnych takich jak M-kadheryna oraz integryna $\alpha 3\beta 1$. Kluczowe dla fuzji mioblastów jest tworzenie kompleksów integryny $\alpha 3\beta 1$ z tetraspaninami CD9 i CD81. Wzrost ekspresji tetraspaniny CD9 przez komórki macierzyste mobilizowane po domięśniowym podaniu Sdf-1 prowadzi do wydajniejszego zasiedlania przez nie uszkodzonych mięśni oraz wydajniejszą fuzję tych komórek z mioblastami. Konsekwencją tych zjawisk jest wydajniejsza regeneracja mięśni szkieletowych.

Podziękowania

Opisywane prace nie powstałyby bez nieocenionej pomocy prof. dr hab. Marii Anny Ciemerych-Litwinienko, mgr. Kamila Kowalskiego, dr Iwony Grabowskiej, dr Edyty Wróbel oraz Katarzyny Jańczyk-Illich i mgr Władysławy Stemińskiej. Swoje podziękowania pragnę także skierować do: prof. dr hab. Jerzego Moraczewskiego, prof. dr hab. Jerzego Kawiaka, prof. dr hab. Zygmunta Pojdy, dr Eugeniusza Machaja, dr Marty Gawor, dr Karoliny Archackiej, dr Małgorzaty Zimowskiej, dr Grażyny Hoser, dr hab. Magdaleny Kowalewskiej i dr. Rafała Archackiego. Dziękuję również za współpracę studentom pracującym pod moją opieką: mgr Agnieszce Markowskiej-Zagrajek, mgr Paulinie Cichosz, mgr Izabeli Plaskocie, mgr Marii Sikorskiej, mgr Magdalenie Czarneckiej-Górze, mgr Iwonie Czaplickiej, dr Arcie Czerwińskiej, dr. Krzysztofowi Olszyńskiemu, dr Agnieszce Denkis, Annie Paciorek, Magdalenie Gołąbek i mgr Marcie Godlewskiej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

W niniejszej części opisano dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora.

Oprócz sześciu prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe jestem także współautorem siedmiu prac oryginalnych i siedmiu prac przeglądowych. Pierwsza z prac oryginalnych dotyczyła udziału podjednostki $\alpha 3$ integryny i mechanizmów fuzji mioblastów w warunkach *in vitro* (Brzoska i wsp., 2006). Kolejne koncentrowały się na roli metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (Zimowska i wsp., 2008) oraz przebiegu stanu zapalnego (Grabowska i wsp., 2015) podczas regeneracji mięśni szkieletowych. Cztery prace traktowały o możliwości zastosowania różnych populacji komórek macierzystych do wspomagania regeneracji mięśni szkieletowych i były to komórki wyizolowane z krwi pępowinowej (Brzoska i wsp., 2006), mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona (Grabowska i wsp., 2012), frakcji adhezyjnej komórek macierzystych krwi pępowinowej (Grabowska i wsp., 2013) oraz zarodkowych komórek macierzystych (Archacka i wsp., 2014). Trzy pierwsze prace powstały w wyniku współpracy z Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego oraz Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej. Kolejna z prac powstała również w wyniku współpracy z Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej w Warszawie. W trakcie jej realizacji badano poziom ekspresji SCCA-1 i -2 (ang. squamous cell carcinoma antigen 1 and 2) w PBMC (ang. peripheral blood mononuclear cell) oraz komórkach raka sromu (Chechlinska i wsp., 2010).

Prace oryginalne:

1. **Brzoska E**, Bello V, Darribere T, Moraczewski J (2006) Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion *in vitro*. *Differentiation* 74: 105-118
2. **Brzoska E**, Grabowska I, Hoser G, Streminska W, Wasilewska D, Machaj EK, Pojda Z, Moraczewski J, Kawiak J (2006) Participation of stem cells from human cord blood in skeletal muscle regeneration of SCID mice. *Exp Hematol* 34: 1262-1270
3. Zimowska M, **Brzoska E**, Swierczynska M, Streminska W, Moraczewski J (2008) Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Int J Dev Biol* 52: 307-314
4. Chechlinska M, Kowalewska M, **Brzoska-Wojtowicz E**, Radziszewski J, Ptaszynski K, Rys J, Kaminska J, Nowak R (2010) Squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 expression in cultured normal peripheral blood mononuclear cells and in vulvar squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 31: 559-567

5. Grabowska I, **Brzoska E**, Gawrysiak A, Streminska W, Moraczewski J, Polanski Z, Hoser G, Kawiak J, Machaj EK, Pojda Z, Ciemerych MA (2012) Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell Transplant* 21: 1711-1726
6. Grabowska I, Streminska W, Janczyk-Ilach K, Machaj EK, Pojda Z, Hoser G, Kawiak J, Moraczewski J, Ciemerych MA, **Brzoska E** (2013) Myogenic potential of mesenchymal stem cells - the case of adhesive fraction of human umbilical cord blood cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 8: 82-90
7. Archacka K, Denkis A, **Brzoska E**, Swierczek B, Tarczyluk M, Janczyk-Ilach K, Ciemerych MA, Moraczewski J (2014) Competence of in vitro cultured mouse embryonic stem cells for myogenic differentiation and fusion with myoblasts. *Stem Cells Dev* 23: 2455-2468
8. Grabowska I, Mazur MA, Kowalski K, Helinska A, Moraczewski J, Streminska W, Hoser G, Kawiak J, Ciemerych MA, **Brzoska E** (2015) Progression of inflammation during immunodeficient mouse skeletal muscle regeneration. *J Muscle Res Cell Motil* 36: 395-404

Byłam współautorem także siedmiu prac przeglądowych. Prace te dotyczyły regeneracji mięśni szkieletowych (Moraczewski i wsp., 2008) oraz udziału komórek macierzystych w tym procesie (Kawiak i wsp., 2006; Archacka i wsp., 2013). Kolejne publikacje opisywały zagadnienia samoodnowy i aktywacji komórek satelitowych, czyli unipotentnych komórek macierzystych biorących udział w regeneracji mięśni szkieletowych (Przewozniak i wsp., 2008; Brzoska i wsp., 2011), wspomaganie regeneracji mięśni szkieletowych poprzez zastosowanie cytokin (Kowalski i wsp., 2012) lub transplantacji komórek (Bajek i wsp., 2015).

Prace przeglądowe:

1. Kawiak J, **Brzoska E**, Grabowska I, Hoser G, Streminska W, Wasilewska D, Machaj EK, Pojda Z, Moraczewski J (2006) Contribution of stem cells to skeletal muscle regeneration. *Folia Histochem Cytobiol* 44: 75-79
2. Moraczewski J, Archacka K, **Brzoska E**, Ciemerych MA, Grabowska I, Janczyk-Ilach K, Streminska W, Zimowska M (2008) From planarians to mammals - the many faces of regeneration. *Int J Dev Biol* 52: 219-227
3. Przewozniak M, **Brzoska E** (2008) Białka Pax w różnicowaniu komórek i organogenezie. *Postępy Biologii Komórki* 35: 227-240
4. **Brzoska E**, Ciemerych MA, Przewozniak M, Zimowska M (2011) Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix. *Vitam Horm* 87: 239-276
5. Kowalski K, Markowska-Zagrajek A, Plaskota I, Kowalewska M, Archacki R, Archacka K, Czerwińska AM, Grabowska I, Zimowska M, Jańczyk-Ilach K, Stremińska W, Ciemerych MA, **Brzoska-Wojtowicz**

- E** (2012) Rola SDF-1 w procesach regeneracji i nowotworzenia. Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji 2: 29-38
6. Archacka K, Kowalski K, **Brzoska E** (2013) Czy komórki satelitowe są macierzyste? Postępy Biochemii 59: 205-218
7. Bajek A, Porowinska D, Kloskowski T, **Brzoska E**, Ciemerych MA, Drewa T (2015) Cell therapy in Duchenne Muscular Dystrophy treatment. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 25: 1-11

Obecnie jako wykonawca biorę udział w realizacji dwóch grantów finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Pierwszy uzyskany został w ramach konkursu Program Badań Stosowanych III i zatytułowany jest „Opracowanie i wdrożenie nowej metody wspomaganie regeneracji mięśni szkieletowych z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych uzyskiwanych z tkanki tłuszczowej”. Jest to grant realizowany przez konsorcjum MioCell, którego liderem jest Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (Zakład Cytologii), a członkami Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej oraz firma OpenExome SC. Drugi został uzyskany w ramach Programu Strategicznego: profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych STRATEGMED i dotyczy wykorzystania potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego (tytuł projektu „Wykorzystanie potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych”). Liderem konsorcjum EXPLORE ME jest Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, a Zakład Cytologii wraz z kolejnymi 9 jednostkami jego współwykonawcą. Oba projekty mają charakter aplikacyjny.

Bibliografia

- Abmayr, S. M., G. K. Pavlath (2012). "Myoblast fusion: lessons from flies and mice." *Development* **139**(4): 641-656.
- Allbrook, D. B., M. F. Han, A. E. Hellmuth (1971). "Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity." *Pathology* **3**(3): 223-243.
- Archacka, K., A. Denkis, E. Brzoska, B. Swierczek, M. Tarczyluk, K. Janczyk-Ilach, M. A. Ciemerych, J. Moraczewski (2014). "Competence of in vitro cultured mouse embryonic stem cells for myogenic differentiation and fusion with myoblasts." *Stem Cells Dev* **23**(20): 2455-2468.
- Archacka, K., K. Kowalski, E. Brzoska (2013). "[Are satellite cells stem cells?]." *Postepy Biochem* **59**(2): 205-218.
- Asakura, A., P. Seale, A. Girgis-Gabardo, M. A. Rudnicki (2002). "Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle." *J Cell Biol* **159**(1): 123-134.
- Bajek, A., D. Porowinska, T. Kloskowski, E. Brzoska, M. A. Ciemerych, T. Drewa (2015). "Cell therapy in Duchenne Muscular Dystrophy treatment. ." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **25**(1): 1-1.
- Ben-Ze'ev, A., B. Geiger (1998). "Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer." *Curr Opin Cell Biol* **10**(5): 629-639.
- Benedetti, S., H. Hoshiya, F. S. Tedesco (2013). "Repair or replace? Exploiting novel gene and cell therapy strategies for muscular dystrophies." *FEBS J* **280**(17): 4263-4280.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, N. A. Dumont, M. A. Rudnicki (2013). "Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche." *EMBO Rep* **14**(12): 1062-1072.
- Borneman, A., R. Kuschel, A. Fujisawa-Sehara (2000). "Analysis for transcript expression of meltrin alpha in normal, regenerating, and denervated rat muscle." *J Muscle Res Cell Motil* **21**(5): 475-480.
- Boucheix, C., E. Rubinstein (2001). "Tetraspanins." *Cell Mol Life Sci* **58**(9): 1189-1205.
- Briggs, D., J. E. Morgan (2013). "Recent progress in satellite cell/myoblast engraftment -- relevance for therapy." *FEBS J* **280**(17): 4281-4293.
- Brzoska, E., M. A. Ciemerych, M. Przewozniak, M. Zimowska (2011). "Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix." *Vitam Horm* **87**: 239-276.
- Brzoska, E., I. Grabowska, G. Hoser, W. Streminska, D. Wasilewska, E. K. Machaj, Z. Pojda, J. Moraczewski, J. Kawiak (2006). "Participation of stem cells from human cord blood in skeletal muscle regeneration of SCID mice." *Exp Hematol* **34**(9): 1262-1270.
- Brzoska, E., M. Kowalewska, A. Markowska-Zagrajek, K. Kowalski, K. Archacka, M. Zimowska, I. Grabowska, A. M. Czerwinska, M. Czarnecka-Gora, W. Streminska, K. Janczyk-Ilach, M. A. Ciemerych (2012). "Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells." *Biol Cell* **104**(12): 722-737.
- Brzoska, E., K. Kowalski, A. Markowska-Zagrajek, M. Kowalewska, R. Archacki, I. Plaskota, W. Streminska, K. Janczyk-Ilach, M. A. Ciemerych (2015). "Sdf-1 (CXCL12) induces CD9 expression in stem cells engaged in muscle regeneration." *Stem Cell Res Ther* **6**(1): 46.
- Brzoska, E., M. Przewozniak, I. Grabowska, K. Janczyk-Ilach, J. Moraczewski (2009). "Pax3 and Pax7 expression during myoblast differentiation in vitro and fast and slow muscle regeneration in vivo." *Cell Biol Int* **33**(4): 483-492.
- Cerletti, M., S. Jurga, C. A. Witczak, M. F. Hirshman, J. L. Shadrach, L. J. Goodyear, A. J. Wagers (2008). "Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles." *Cell* **134**(1): 37-47.
- Charrin, S., M. Latil, S. Soave, A. Polesskaya, F. Chretien, C. Boucheix, E. Rubinstein (2013). "Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81." *Nat Commun* **4**: 1674.
- Ciemerych, M. A., K. Archacka, I. Grabowska, M. Przewozniak (2011). "Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells." *Results Probl Cell Differ* **53**: 473-527.
- Collins, C. A., I. Olsen, P. S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, T. A. Partridge, J. E. Morgan (2005). "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." *Cell* **122**(2): 289-301.
- Cossu, G., S. C. Previtali, S. Napolitano, M. P. Cicalese, F. S. Tedesco, F. Nicastro, M. Noviello, U. Roostalu, M. G. Natali Sora, M. Scarlato, M. De Pellegrin, C. Godi, S. Giuliani, F. Ciotti, R. Tonlorenzi, I. Lorenzetti, C. Rivellini, S. Benedetti, R. Gatti, S. Marktel, B. Mazzi, A. Tettamanti, M. Ragazzi, M. A. Imro, G. Marano, A. Ambrosi, R. Fiori, M. P. Sormani, C. Bonini, M. Venturini, L. S. Politi, Y. Torrente, F. Ciceri (2015). "Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy." *EMBO Mol Med* **7**(12): 1513-1528.
- Dellavalle, A., G. Maroli, D. Covarello, E. Azzoni, A. Innocenzi, L. Perani, S. Antonini, R. Sambasivan, S. Brunelli, S. Tajbakhsh, G. Cossu (2011). "Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells." *Nat Commun* **2**: 499.
- Dellavalle, A., M. Sampaolesi, R. Tonlorenzi, E. Tagliafico, B. Sacchetti, L. Perani, A. Innocenzi, B. G. Galvez, G. Messina, R. Morosetti, S. Li, M. Belicchi, G. Peretti, J. S. Chamberlain, W. E. Wright, Y. Torrente, S. Ferrari, P. Bianco, G. Cossu (2007). "Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells." *Nat Cell Biol* **9**(3): 255-267.
- Donalies, M., M. Cramer, M. Ringwald, A. Starzinski-Powitz (1991). "Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18): 8024-8028.
- Galvez, B. G., M. Sampaolesi, S. Brunelli, D. Covarello, M. Gavina, B. Rossi, G. Constantin, Y. Torrente, G. Cossu (2006). "Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability." *J Cell Biol* **174**(2): 231-243.

- Goichberg, P., M. Shtutman, A. Ben-Ze'ev, B. Geiger (2001). "Recruitment of beta-catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction." *J Cell Sci* **114**(Pt 7): 1309-1319.
- Grabowska, I., E. Brzoska, A. Gawrysiak, W. Streminska, J. Moraczewski, Z. Polanski, G. Hoser, J. Kawiak, E. K. Machaj, Z. Pojda, M. A. Ciemerych (2012). "Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord." *Cell Transplant* **21**(8): 1711-1726.
- Grabowska, I., M. A. Mazur, K. Kowalski, A. Helinska, J. Moraczewski, W. Streminska, G. Hoser, J. Kawiak, M. A. Ciemerych, E. Brzoska (2015). "Progression of inflammation during immunodeficient mouse skeletal muscle regeneration." *J Muscle Res Cell Motil* **36**(6): 395-404.
- Grabowska, I., W. Streminska, K. Janczyk-Ilach, E. K. Machaj, Z. Pojda, G. Hoser, J. Kawiak, J. Moraczewski, M. A. Ciemerych, E. Brzoska (2013). "Myogenic potential of mesenchymal stem cells - the case of adhesive fraction of human umbilical cord blood cells." *Curr Stem Cell Res Ther* **8**(1): 82-90.
- Grabowska, I., A. Szeliga, J. Moraczewski, I. Czaplicka, E. Brzoska (2011). "Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression." *Cell Biol Int* **35**(2): 125-133.
- Hindi, S. M., M. M. Tajrishi, A. Kumar (2013). "Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion." *Sci Signal* **6**(272): re2.
- Huovila, A. P., A. J. Turner, M. Pelto-Huikko, I. Karkkainen, R. M. Ortiz (2005). "Shedding light on ADAM metalloproteinases." *Trends Biochem Sci* **30**(7): 413-422.
- Irintchev, A., M. Zeschnigk, A. Starzinski-Powitz, A. Wernig (1994). "Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles." *Dev Dyn* **199**(4): 326-337.
- Karin, N. (2010). "The multiple faces of CXCL12 (SDF-1[alpha]) in the regulation of immunity during health and disease." *J Leukoc Biol*.
- Katz, B., R. Miledi (1961). "The localized action of end-plate drugs' in the twitch fibres of the frog." *J Physiol* **155**: 399-415.
- Kaufmann, U., B. Martin, D. Link, K. Witt, R. Zeitler, S. Reinhard, A. Starzinski-Powitz (1999). "M-cadherin and its sisters in development of striated muscle." *Cell Tissue Res* **296**(1): 191-198.
- Kawiak, J., E. Brzoska, I. Grabowska, G. Hoser, W. Streminska, D. Wasilewska, E. K. Machaj, Z. Pojda, J. Moraczewski (2006). "Contribution of stem cells to skeletal muscle regeneration." *Folia Histochem Cytobiol* **44**(2): 75-79.
- Kemler, R. (1993). "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion." *Trends Genet* **9**(9): 317-321.
- Kowalski, K., R. Archacki, K. Archacka, W. Stremińska, A. Paciorek, M. Gołębek, M. A. Ciemerych, E. Brzoska (2015). "Stromal derived factor-1 and granulocyte-colony stimulating factor treatment improves regeneration of Pax7^{-/-} mice skeletal muscles." *J Cachexia Sarcopenia Muscle*.
- Kowalski, K., A. Markowska-Zagrajek, I. Plaskota, M. Kowalewska, R. Archacki, K. Archacka, A. M. Czerwińska, I. Grabowska, M. Zimowska, J.-I. K., W. Stremińska, M. A. Ciemerych, E. Brzoska-Wojtowicz (2012). "Rola SDF-1 w procesach regeneracji i nowotworzenia. ." *Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji* **2**: 29-38.
- Lin Shiao, S. Y., M. C. Huang, C. Y. Lee (1976). "Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle." *J Pharmacol Exp Ther* **196**(3): 758-770.
- Mauro, A. (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-495.
- Meregalli, M., A. Farini, M. Belicchi, D. Parolini, L. Cassinelli, P. Razini, C. Sitzia, Y. Torrente (2013). "Perspectives of stem cell therapy in Duchenne muscular dystrophy." *FEBS J* **280**(17): 4251-4262.
- Mitchell, K. J., A. Pannerec, B. Cadot, A. Parlakian, V. Besson, E. R. Gomes, G. Marazzi, D. A. Sassoon (2010). "Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development." *Nature cell biology* **12**(3): 257-266.
- Montarras, D., A. L'Honore, M. Buckingham (2013). "Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell." *FEBS J* **280**(17): 4036-4050.
- Montarras, D., J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge, M. Buckingham (2005). "Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration." *Science* **309**(5743): 2064-2067.
- Moore, R., F. S. Walsh (1993). "The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle." *Development* **117**(4): 1409-1420.
- Moraczewski, J., K. Archacka, E. Brzoska, M. A. Ciemerych, I. Grabowska, K. Janczyk-Ilach, W. Streminska, M. Zimowska (2008). "From planarians to mammals - the many faces of regeneration." *Int J Dev Biol* **52**(2-3): 219-227.
- Palermo, A. T., M. A. Labarge, R. Doyonnas, J. Pomerantz, H. M. Blau (2005). "Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress." *Dev Biol* **279**(2): 336-344.
- Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman, L. M. Kunkel (1989). "Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts." *Nature* **337**(6203): 176-179.
- Przewozniak, M., E. Brzoska (2008). "Białka Pax w różnicowaniu komórek i organogenezie. ." *Postępy Biologii Komórki* **35**: 227-240.
- Przewozniak, M., I. Czaplicka, A. M. Czerwińska, A. Markowska-Zagrajek, J. Moraczewski, W. Streminska, K. Janczyk-Ilach, M. A. Ciemerych, E. Brzoska (2013). "Adhesion proteins--an impact on skeletal myoblast differentiation." *PLoS One* **8**(5): e61760.
- Reimann, J., A. Irintchev, A. Wernig (2000). "Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice." *Neuromuscul Disord* **10**(4-5): 276-282.
- Relaix, F., P. S. Zammit (2012). "Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage." *Development* **139**(16): 2845-2856.

- Rokitansky, C. (1849). "Zeitschrift der kais kon Gesellschaft der Aerzte zu Wein." Pathologisch-anatomische Beobachtungen **5**: 329-333.
- Sacco, A., R. Doyonnas, P. Kraft, S. Vitorovic, H. M. Blau (2008). "Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells." Nature **456**(7221): 502-506.
- Saclier, M., S. Cuvellier, M. Magnan, R. Mounier, B. Chazaud (2013). "Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration." FEBS J **280**(17): 4118-4130.
- Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M. A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M. G. De Angelis, K. P. Campbell, R. Bottinelli, G. Cossu (2003). "Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts." Science **301**(5632): 487-492.
- Scharner, J., P. S. Zammit (2011). "The muscle satellite cell at 50: the formative years." Skelet Muscle **1**(1): 28.
- Schultz, E. (1974). "A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle." Anat Rec **180**(4): 589-595.
- Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, M. A. Rudnicki (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." Cell **102**(6): 777-786.
- Seguin, L., J. S. Desrosellier, S. M. Weis, D. A. Chersh (2015). "Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance." Trends Cell Biol.
- Shafiq, S. A., M. A. Gorycki (1965). "Regeneration in skeletal muscle of mouse: some electron-microscope observations." J Pathol Bacteriol **90**(1): 123-127.
- Shafiq, S. A., M. A. Gorycki, A. Mauro (1968). "Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat." J Anat **103**(Pt 1): 135-141.
- Sirabella, D., L. De Angelis, L. Berghella (2013). "Sources for skeletal muscle repair: from satellite cells to reprogramming." J Cachexia Sarcopenia Muscle **4**(2): 125-136.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, V. Piette, C. H. Cote, P. Chapdelaine, J. Y. Hogrel, M. Paradis, J. P. Bouchard, M. Sylvain, J. G. Lachance, J. P. Tremblay (2007). "First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up." Neuromuscul Disord **17**(1): 38-46.
- Tedesco, F. S., G. Cossu (2012). "Stem cell therapies for muscle disorders." Curr Opin Neurol **25**(5): 597-603.
- Torrente, Y., M. Belicchi, C. Marchesi, G. D'Antona, F. Cogiamanian, F. Pisati, M. Gavina, R. Giordano, R. Tonlorenzi, G. Fagiolari, C. Lamperti, L. Porretti, R. Lopa, M. Sampaolesi, L. Vicentini, N. Grimoldi, F. Tiberio, V. Songa, P. Baratta, A. Prelle, L. Forzenigo, M. Guglieri, O. Pansarasa, C. Rinaldi, V. Mouly, G. S. Butler-Browne, G. P. Comi, P. Biondetti, M. Moggio, S. M. Gaini, N. Stocchetti, A. Priori, M. G. D'Angelo, A. Turconi, R. Bottinelli, G. Cossu, P. Rebullà, N. Bresolin (2007). "Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients." Cell Transplant **16**(6): 563-577.
- von Maltzahn, J., A. E. Jones, R. J. Parks, M. A. Rudnicki (2013). "Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(41): 16474-16479.
- Wrobel, E., E. Brzoska, J. Moraczewski (2007). "M-cadherin and beta-catenin participate in differentiation of rat satellite cells." Eur J Cell Biol **86**(2): 99-109.
- Yablonka-Reuveni, Z. (2011). "The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50." J Histochem Cytochem **59**(12): 1041-1059.
- Yagami-Hiromasa, T., T. Sato, T. Kurisaki, K. Kamijo, Y. Nabeshima, A. Fujisawa-Sehara (1995). "A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion." Nature **377**(6550): 652-656.
- Zammit, P. S., J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge, J. R. Beauchamp (2004). "Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?" J Cell Biol **166**(3): 347-357.
- Zimowska, M., E. Brzoska, M. Swierczynska, W. Streminska, J. Moraczewski (2008). "Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo." Int J Dev Biol **52**(2-3): 307-314.

