

AUTOREFERAT

dr Iwona Grabowska - Kowalik

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 2019

dr Iwona Grabowska - Kowalik
Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

I. Imię i nazwisko.

Iwona Grabowska - Kowalik

Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

tel. 0048 225542203

e-mail: igrabowska@biol.uw.edu.pl

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

doktora - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, nauki biologiczne w zakresie biologii, 11.06.2007

Promotor – Prof. dr hab. Jerzy Moraczewski

Praca doktorska „Udział komórek macierzystych izolowanych z zarodków oraz różnych tkanek w regeneracji mięśni szkieletowych”

magistra – Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, biologia ogólna, 04.07.2002

Promotor – Prof. dr hab. Jerzy Moraczewski

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

od 01.10.2017 Uniwersytet Warszawski. Wydział Biologii. Instytut Zoologii;

stanowisko: asystent

adres: ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

01.07.2007 – 30.09.2017 Uniwersytet Warszawski. Wydział Biologii. Instytut Zoologii;

stanowisko: adiunkt

Adres: ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

IV. Wskazanie osiągnięcia¹ 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. 2017 r. poz. 1789):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Komórki macierzyste – regulacja proliferacji oraz różnicowania miogenicznego *in vitro* i *in vivo*

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji wymienionych poniżej w punkcie B. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z oświadczeniami o wkładzie autorów zostały zawarte w Załączniku 5.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Helinska A, Krupa M, Archacka K, Czerwinska AM, Streminska W, Janczyk-Ilach K, Ciemerych MA, **Grabowska I*** (2017), Myogenic potential of mouse embryonic stem cells lacking functional Pax7 tested *in vitro* by 5-azacitidine treatment and *in vivo* in regenerating skeletal muscle. Eur J Cell Biol.; 96(1):47-60.
praca oryginalna
IF 2.939; IF_{5-letni} 3.532; punkty MNiSW 25; liczba cytowań: 1
Mój udział procentowy szacuję na 60%
2. Czerwinska AM, Nowacka J, Aszer M, Gawrzak S, Archacka K, Fogtman A, Iwanicka-Nowicka R, Jańczyk-Ilach K, Koblowska M, Ciemerych MA, **Grabowska I*** (2016), Cell cycle regulation of embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts lacking functional Pax7. Cell Cycle; 15(21):2931-2942.
praca oryginalna
IF 3.530 IF_{5-letni} 4.064; punkty MNiSW 30; liczba cytowań: 3
Mój udział procentowy szacuję na 52%
3. Czerwinska AM, **Grabowska I**, Archacka K, Bem J, Swierczek B, Helinska A, Streminska W, Fogtman A, Iwanicka-Nowicka R, Koblowska M, Ciemerych MA (2016), Myogenic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells That Lack a Functional Pax7 Gene. Stem Cells Dev.; 25(4):285-300.
praca oryginalna
IF 3.562; IF_{5-letni} 3.821; punkty MNiSW 35; liczba cytowań: 5
Mój udział procentowy szacuję na 30%
4. **Grabowska I**, Mazur MA, Kowalski K, Helinska A, Moraczewski J, Stremińska 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(6):395-404.
praca oryginalna
IF 2.071; IF_{5-letni} 1.987; punkty MNiSW 15; liczba cytowań: 2
Mój udział procentowy szacuję na 52%

5. **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(1):82-90.
praca oryginalna
IF 2.861; IF_{5-letni} 3.000; punkty MNiSW 20; liczba cytowań: 9
Mój udział procentowy szacuję na 54%
6. Czerwinska AM, Streminska W, Ciemerych MA, **Grabowska I*** (2012), Mouse gastrocnemius muscle regeneration after mechanical or cardiotoxin injury. *Folia Histochem Cytobiol.*; 50(1):144-53.
praca oryginalna
IF 1.101; IF_{5-letni} 1.284; punkty MNiSW 15; liczba cytowań: 13
Mój udział procentowy szacuję na 60%
7. **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(8):1711-26.
praca oryginalna
IF 4.422; IF_{5-letni} 3.982; punkty MNiSW 40; liczba cytowań: 11
Mój udział procentowy szacuję na 77%

*autor korespondujący

C) Dane publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

1. Sumaryczny Impact Factor według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **20.486**
2. Sumaryczny Impact Factor _{5-letni} według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **21.670**
3. Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **180**
4. Sumaryczna liczba cytowań publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe według bazy danych Web of Science (WoS): **44**

Indeks Hirscha według WoS: **11**

V. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Komórki macierzyste – regulacja proliferacji oraz różnicowania miogenicznego *in vitro* i *in vivo*

Regulacja molekularna i udział komórek w regeneracji mięśni szkieletowych

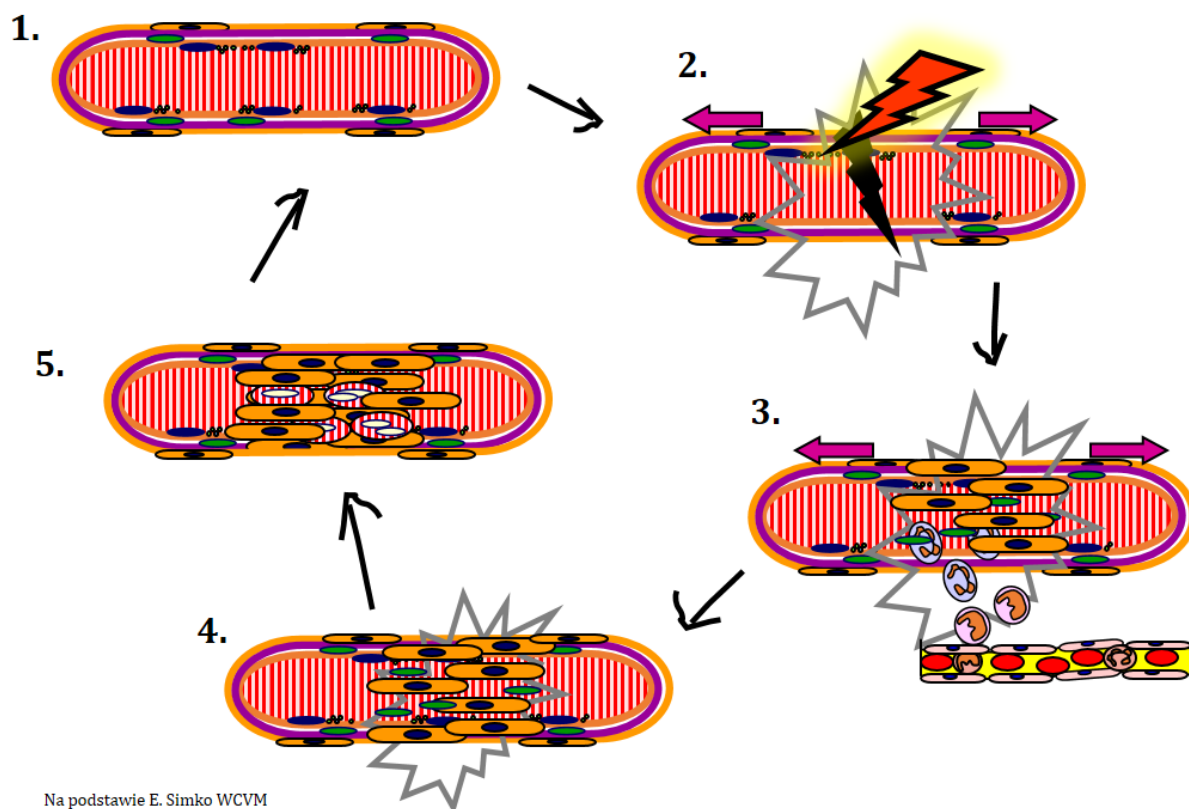
Mięśnie szkieletowe mają zdolność do regeneracji, nawet po rozległych uszkodzeniach. Informacje dostępne na temat mechanizmów naprawy mięśni są jednak wciąż niepełne. Również dane na temat skutecznego wykorzystania komórek macierzystych w celu zwiększenia zdolności mięśni do regeneracji, których zdolność regeneracyjna jest ograniczona ze względu na np. stan zdrowia, miopatię lub w wyniku sarkopenii, są ograniczone. W ostatnich latach celem wielu badań nad regeneracją mięśni było wykorzystanie komórek macierzystych i przeszczepianie ich do uszkodzonej tkanki. Jednak, wiedza na temat interakcji mięśni szkieletowych z przeszczepionymi komórkami macierzystymi oraz roli poszczególnych czynników transkrypcyjnych, czy funkcji niszy w procesie regeneracji wciąż jest niewystarczająca. Prawidłowe interakcje między uszkodzonym mięśniem a komórkami macierzystymi są kluczowe dla wydajnej naprawy i przywrócenia funkcji tkanki po urazie.

Regenerację mięśni można podzielić na dwie główne fazy: degradację i rekonstrukcję (Fig. 1) [Charge and Rudnicki, 2004; **Czerwinska et al., 2012**]*. Fazy regeneracji mięśni są podobne u różnych organizmów (np. u myszy, szczura i człowieka) a także wtedy kiedy regeneracja wynika z różnych typów uszkodzeń. Jednakże, kinetyka, zasięg oraz intensywność każdej fazy może się różnić w zależności od rozległości uszkodzenia i czynnika, który je wywołał. Jednym z najprostszych i najczęściej stosowanych eksperymentalnych sposobów wywoływania uszkodzeń mięśni jest zastosowanie kardiotoksyny (CTX). CTX jest peptydem wyizolowanym z jadu kobry, który indukuje uszkodzenie i regenerację mięśni poprzez nagłą depolaryzację sarkolemy, prowadzącą do jej zniszczenia [Fletcher *et al.*, 1996; Harris, 2003].

Inicjacja degeneracji mięśni wiąże się z utratą stabilności błon komórkowych, uwolnieniem jonów wapnia, aktywacją enzymów proteolitycznych oraz uszkodzeniem struktury włókien mięśniowych. Następnie rozpoczyna się stan zapalny, a liczne komórki migrują i lokalizują się śródmiąższowo i w obrębie uszkodzonych włókien mięśniowych. Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w regeneracji mięśni. Neutrofile stanowią pierwszą populację komórek układu odpornościowego, które migrują do miejsca uszkodzenia. Komórki te fagocytują uszkodzone włókna mięśniowe i uwalniają wiele czynników, m.in. cytokiny, które „przyciągają”, indukują migrację i różnicowanie lokalnych monocytów do makrofagów. Po początkowym znacznym zwiększeniu liczba neutrofilów spada 24 godziny po uszkodzeniu. Pierwszą populacją makrofagów, makrofagi M1, obserwowana po uszkodzeniu mięśni ma charakter prozapalny. Makrofagi M1 fagocytują nekrotyczne włókna mięśniowe i produkują prozapalne cytokiny (np. TNF- α , IL-1 β). Drugą populacją makrofagów uczestniczących w naprawie mięśni szkieletowych są makrofagi M2 wykazujące aktywność przeciwzapalną poprzez wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 i TGF- β [Villalta *et al.*, 2009]. Prozapalne komórki M1, "wykorzystując" cząsteczki adhezyjne, jak

*W niniejszym załączniku prace wchodzące w skład osiągnięcia zaznaczono **pogrubioną** czcionką.

również uwalnianie mitogenów (IL-6, TNF- α , G-CSF), stymulują proliferację komórek macierzystych mięśni szkieletowych, tzw. satelitowych i pozytywnie wpływają na proliferację komórek wywodzących się z komórek satelitowych – mioblastów [Arnold *et al.*, 2007]. Cytokiny przeciwzapalne produkowane przez komórki M2 wspomagają miogenezę, angiogenezę i indukują syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*), co jest krytyczne dla prawidłowego i efektywnego tworzenia nowych włókien mięśniowych [Deng *et al.*, 2012].



Na podstawie E. Simko WCVN

Fig.1 Przebieg regeneracji mięśni szkieletowych. W zdrowych, nieuszkodzonych mięśniach, komórki satelitowe pozostają w fazie G0 (1, zielone), zlokalizowane pomiędzy sarkolemą włókna mięśniowego a błoną podstawną (fioletowa). W wyniku działania czynników zewnętrznych, takich jak uszkodzenie mięśni (2, symbol błyskawicy), rozpoczyna się stan zapalny, co jest związane z pojawieniem się komórek stanu zapalnego (3). Komórki satelitowe ulegają aktywacji (zielony/żółty), wznowiają cykl komórkowy i różnicują w mioblasty (4). Po kilku rundach podziału mioblasty (5, komórki czerwone, białe jądra komórkowe) fuzują i tworzą miotuby (5, czerwone syncytium). Dojrzewanie miotub prowadzi do powstawania włókien mięśniowych. Równocześnie powstaje błona podstawna i odnawia się pula komórek satelitowych (1).

Po zakończeniu różnicowania komórek satelitowych w mioblasty i po powstaniu miotub, liczba makrofagów gwałtownie spada (omówione w: [Saclier *et al.*, 2013]). Stan zapalny jest więc procesem zsynchronizowanym, który wymaga odpowiedniej regulacji, aby regeneracja była wydajna i prowadziła do przywrócenia funkcji mięśnia. Zaburzenia w napływie i/lub udziale odpowiednich populacji komórek stanu zapalnego może skutkować przedłużającym się stanem zapalnym, który w efekcie prowadzi do nieprawidłowości w regeneracji.

Podstawową rolę w regeneracji mięśni szkieletowych odgrywają komórki satelitowe ([Mauro, 1961], omówione w: [Scharner and Zammit, 2011]). Komórki satelitowe

znajdują się pomiędzy błoną podstawną i sarkolemmą włókien mięśniowych i charakteryzują się ekspresją *Pax7* (gen kodujący czynnik transkrypcyjny Pax7), *Scd4* (kodujący syndekan-4) i *Cdh15* (kodujący m-kadherynę). Komórki te są mitotycznie nieaktywne (stan G0) i ulegają aktywacji w odpowiedzi na bodźce fizjologiczne, tj. ćwiczenia, wzrost organizmu lub warunki patologiczne, takie jak urazy, miopatie, choroby degeneracyjne. Aktywacja komórek satelitowych jest wynikiem działania czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, ang. *hepatocyte growth factor*) i czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factor*), wydzielanych przez komórki stanu zapalnego, komórki śródbłonka, komórki śródmiąższowe (fibroblasty, mezenchymalne komórki macierzyste) lub uwolnione z macierzy pozakomórkowej (omówione w: [Brzoska *et al.*, 2011; Ciemerych *et al.*, 2011]). Aktywowane komórki satelitowe proliferują i różnicują w mioblasty. Mioblasty mogą albo łączyć się ze sobą, tworząc nowe miotuby, które później dojrzewają we włókna mięśniowe. Mogą również fuzjować z istniejącymi włóknami mięśniowymi [Gayraud-Morel *et al.*, 2009] (Fig. 1). Nieznaczna część populacji komórek satelitowych nie różnicuje i powraca do stanu G0, odtwarzając populację komórek macierzystych koniecznych w przypadku kolejnych uszkodzeń mięśni lub ich wzrostu [Zammit *et al.*, 2004]. Wszystkie uszkodzone elementy architektury mięśnia szkieletowego muszą zostać odtworzone. Należą do nich błona podstawna otaczająca włókna mięśniowe oraz unaczynienie zapewniające dopływ krwi. Najważniejsze jednak dla pełnej regeneracji i dojrzewania włókien mięśniowych jest ich unerwienie przez wyspecjalizowaną synapsę, tj. połączenie nerwowo-mięśniowe (NMJ, ang. *neuromuscular junction*) [Bloch-Gallego, 2015].

Regeneracja mięśni szkieletowych a powstawanie mięśni w czasie rozwoju

Regeneracja mięśni szkieletowych pozwala na utrzymanie homeostazy dorosłego organizmu i umożliwia naprawę mięśni w odpowiedzi na uszkodzenia lub choroby, aktywując komórki satelitowe, jak również inne komórki macierzyste i prekursorowe. Powstawanie mięśni, tj. miogeneza i regeneracja, mają pewne wspólne cechy, np. sieć czynników je regulujących, sygnały zewnętrzne i zmiany morfologiczne (Fig. 2).

Miogeneza zarodkowa zachodzi w dwóch falach różnicowania komórek, które są kontrolowane przez specyficzne i sekwencyjnie ekspresjonowane geny. Czynniki transkrypcyjne zawierające domenę *paired* Pax3 i jego paralog Pax7 działają przed czynnikami należącymi do rodziny mięśniowych czynników regulatorowych (MRF, ang. *myogenic regulatory factors*), zawierających domenę helisa-pętla-helisa (ang. *helix-loop-helix*; *HLH*): MyoD, Myf5, Mrf4 i miogeniną. Pax3 jest ekspresjonowany w mezodermie przyosiowej i w somitach [Goulding *et al.*, 1994; Williams and Ordahl, 1994]. Znaczenie Pax3 w miogenezie odkryto uzyskując zarodki myszy pozbawione funkcjonalnej kopii genu *Pax3*, u których nie rozwijają się mięśnie kończyn i przepona [Bober *et al.*, 1994; Tremblay *et al.*, 1998]. Ekspresja *Pax7* rozpoczyna się w trakcie rozwoju somitów i nie jest niezbędna dla tworzenia mięśni zarodkowych, ale odgrywa kluczową rolę w rozwoju/dojrzewaniu mięśni po urodzeniu [Jostes *et al.*, 1990; Mansouri *et al.*, 1996; Seale *et al.*, 2000]. Analiza skutków braku funkcjonalnych kopii genów kodujących niektóre czynniki transkrypcyjne u myszy wykazała, że MyoD, Myf5 i Mrf4 są kluczowe dla miogenezy [Rudnicki *et al.*, 1993]. Przy braku wszystkich trzech czynników jednocześnie mięśnie szkieletowe nie powstają. Miogenina, czwarty MRF, kontroluje różnicowanie mioblastów we włókna mięśniowe (omówione w: [Moncaut *et al.*, 2013]).

Mięśnie szkieletowe wywodzą się z somitów, które są stopniowo tworzone w efekcie segmentacji mezodermy. Sygnały z sąsiednich tkanek i struktur, tj. cewki nerwowej, struny grzbietowej, ektodermy grzbietowej i mezodermy bocznej, indukują ekspresję czynników regulujących powstawanie mięśni szkieletowych. Wykazano, że Shh, Wnt1/3, Wnt11 i IGF indukują ekspresję *Myf5*. Pax3 i *Myf5* niezależnie regulują ekspresję genu kodującego *MyoD*, natomiast *Myf5* reguluje przejściową ekspresję *Mrf4*. *Myf5* i *MyoD* niezależnie aktywują ekspresję miogeniny, która indukuje ekspresję genów kodujących białka strukturalne włókien mięśniowych, np. ciężkie łańcuchy miozyny (*MyHC*, ang. *myosin heavy chains*).

Podczas rozwoju zarodkowego mięśnie szkieletowe powstają w wieloetapowym procesie wynikającym z sekwencyjnej ekspresji aktywacji genów i tworzenia różnych typów komórek prekursorowych. W rozwoju zarodkowym myszy miogeneza rozpoczyna się wcześnie (8 dnia rozwoju) i trwa około 10 dni, jednak 2-3 tygodnie po urodzeniu rozwój mięśni wciąż trwa. Przebieg miogenezy u dorosłych organizmów, tj. podczas regeneracji mięśni, odtwarza wiele komórkowych i molekularnych aspektów zarodkowego rozwoju mięśni, m.in. sygnalizację pozakomórkową i oddziaływania pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi. Nieaktywne komórki satelitowe ekspresyjnie *Pax7*, który reguluje ekspresję *MyoD* i *Myf5*, następnie *Myf5* reguluje ekspresję *MyoD*, który z kolei promuje ekspresję miogeniny i *Mrf4*, a miogenina indukuje ekspresję miozyny. Podobnie jak w rozwoju, aktywność *MyoD* reguluje losy komórek prekursorowych mięśni, czyli samoodnawiających się i różnicujących komórek satelitowych.

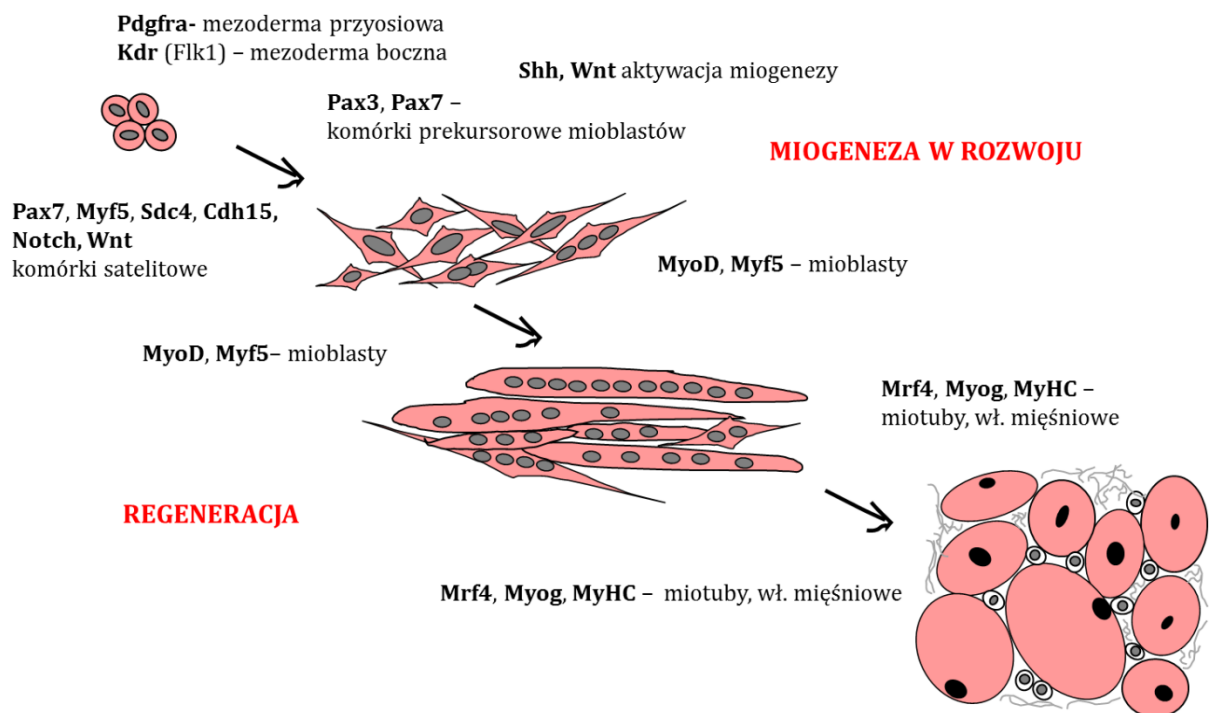


Fig.2 Najważniejsze czynniki regulujące przebieg regeneracji mięśni i w miogenezie zarodkowej.

Interakcje i sieci powiązań pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi, zewnętrznymi regulatorami i komórkami podczas miogenezy zarodkowej i regeneracji w dorosłym organizmie nadal nie są w pełni poznane. W związku z powyższymi celami moich badań były:

- 1) charakterystyka mechanizmów regeneracji mięśni szkieletowych przy użyciu różnych metod i modeli,*
- 2) charakterystyka mechanizmów odpowiedzialnych za interakcje między tkanką mięśniową a przeszczepionymi komórkami macierzystymi,*
- 3) wyjaśnienie roli specyficznych czynników transkrypcyjnych w różnicowaniu komórek macierzystych.*

Porównałam różne techniki stosowane do wywoływania uszkodzeń mięśni szkieletowych oraz różne modele mysie, takie jak myszy z niedoborem odporności, co pozwoliło mi udowodnić, że jednym z kluczowych czynników regulujących regenerację jest prawidłowa progresja stanu zapalnego [Czerwinska et al., 2012; Grabowska et al., 2015]. Wyniki moich badań nad różnymi modelami regeneracji pozwoliły mi przeanalizować zdolność mezenchymalnych komórek macierzystych i pluripotencjalnych komórek macierzystych do różnicowania miogenicznego i wspomagania regeneracji [Grabowska et al., 2012b; Grabowska et al., 2013; Czerwinska et al., 2016a; Helinska et al., 2017]. Ponieważ komórki macierzyste, takie jak komórki pluripotencjalne, bardzo trudno jest skierować na ścieżkę różnicowania w komórki satelitarne lub mioblasty skoncentrowałam się na maszynierii molekularnej sterującej różnicowaniem. Skupiłam się na badaniu roli czynnika transkrypcyjnego Pax7 w proliferacji i miogenicznym różnicowaniu komórek macierzystych [Czerwinska et al., 2016a; Czerwinska et al., 2016b; Helinska et al., 2017].

1. Charakterystyka mechanizmów regeneracji mięśni szkieletowych przy użyciu różnych metod i modeli

Jak można modelować regenerację mięśni szkieletowych?

W licznych badaniach nad regeneracją mięśni szkieletowych wykorzystuje się kilka eksperymentalnych modeli kontrolowanego uszkodzenia tej tkanki. Do najczęściej stosowanych metod uszkodzania mięśni należą: wstrzykiwanie miotoksyn, takich jak bupiwakaina [Benoit and Belt, 1970], kardiotoksyna z jadu kobry (CTX) [Couteaux et al., 1988], uszkodzenie fizyczne, np. zamrażanie [Vracko and Benditt, 1972], przeszczepy mięśni [Carlson and Gutmann, 1975], miażdżenie [Bassaglia and Gautron, 1995] lub odnerwienie i wywołanie niedokrwienia [Anderson, 1991]. Każda z tych metod prowadzi do uszkodzenia mięśni i ich degeneracji, a następnie indukcji regeneracji. Jednak charakterystyka przebiegu regeneracji może się różnić w zależności od zastosowanego typu uszkodzenia, co sprawia, że porównanie wyników uzyskanych w różnych badaniach jest trudne. Regeneracja mięśni szkieletowych w dorosłym organizmie trwa zazwyczaj 3-4 tygodnie. Przeprowadzono wiele eksperymentów mających na celu zbadanie licznych aspektów regeneracji, ale tylko w kilku pracach Autorzy przeprowadzili szczegółowe porównanie regeneracji mięśni wywołanej różnymi metodami. Publikacje te nie obejmują jednak wszystkich zmian molekularnych zachodzących w mięśniach [Lefaucheur and Sebillé, 1995; Fink et al., 2003; Vignaud et al., 2005].

Celem opisanych badań było kompleksowe porównanie przebiegu regeneracji mięśni szkieletowych wywołanego dwoma rodzajami urazów: 1) mechaniczne uszkodzenie włókien mięśniowych poprzez miażdżenie lub 2) wstrzyknięcie kardiotoksyny, która jest czynnikiem miotoksycznym powodującym mielizę włókien mięśniowych [Czerwinska et al., 2012]. Ponieważ w licznych publikacjach dotyczących wykorzystania komórek macierzystych w celu poprawy lub przyspieszenia regeneracji, stosuje się myszy o obniżonej odporności [Shi et al., 2004; Sakurai et al., 2008; de la Garza-Rodea et al., 2010; Skuk et al., 2010; Fakhfakh et al., 2011], w związku z tym, oprócz wyżej wymienionych badań, przeprowadziliśmy analizę regeneracji mięśni szkieletowych u myszy z niedoborem odporności (SCID, ang. *severe combined immunodeficiency*), charakteryzujących się brakiem odporności humoralnej i komórkowej z powodu braku dojrzałych limfocytów T i B [Renz et al., 1996]. Ponieważ myszy SCID charakteryzują się obecnością komórek NK, przed wszczęciem komórek w układzie ksenogenicznym konieczne jest poddanie myszy działaniu cyklofosfamidu [Basch et al., 1997]. Zastosowany przez nas szczep myszy został wyprowadzony z myszy BALB/c C.B-17 [Bosma et al., 1983]. Myszy SCID akceptują przeszczepy ksenogeniczne i z tego powodu są często wykorzystywane jako model do badania potencjału miogenicznego ludzkich komórek macierzystych [Brzoska et al., 2006; Dellavalle et al., 2007; Morosetti et al., 2010; Grabowska et al., 2012b; Grabowska et al., 2013].

W obu projektach mysie mięśnie szkieletowe były uszkodzane i poddane analizie w kolejnych stadiach regeneracji. Masa mięśni i szczegółowa analiza histologiczna wykazała, że stan zapalny i powstawanie nowych włókien mięśniowych jest opóźnione w przypadku uszkodzenia mechanicznego mięśni myszy BALB/c w porównaniu do nastrzykiwanych CTX. Mięśnie uszkodzone mechanicznie charakteryzowały się również istotnie niższą masą w porównaniu z mięśniami nastrzykiwanymi CTX [Czerwinska et al., 2012]. Określiliśmy też liczbę i zdolność do tworzenia miotub (wyrażona, jako indeks fuzji) komórek wyizolowanych z mięśni uszkodzonych mechanicznie i przez wstrzyknięcie CTX. Mięśnie uszkodzone mechanicznie zawierały więcej komórek jednojądrowych niż uszkodzonych przez CTX, zarówno w 7 jak i 14 dniu po urazie. Średnia wartość indeksu fuzji komórek wyizolowanych z nieuszkodzonych/kontrolnych mięśni i hodowanych przez 12 dni wynosiła 13,3%. Średni indeks fuzji komórek wyizolowanych z mięśni uszkodzonych przez wstrzyknięcie CTX był podobny niezależnie od zaawansowania procesu regeneracji i wynosił około 7%. Jednak w przypadku urazu mechanicznego indeks fuzji różnił się istotnie (4% w 7 dniu w porównaniu z 17,9% w 14 dniu). Taka obserwacja sugeruje, że komórki wyizolowane ze zmiażdżonych mięśni różnicują z pewnym opóźnieniem w porównaniu z komórkami otrzymanymi z mięśni uszkodzonych CTX [Czerwinska et al., 2012].

Postęp regeneracji można również analizować na podstawie ekspresji różnych izoform ciężkich łańcuchów miozyny (MyHCs). Wśród nich najbardziej znaczące są: wolna (I) i szybka (IIa, IIb, IIc/x), ale także zarodkowa i tzw. noworodkowa izoforma MyHCs. W trakcie miogenezy zmienia się wzorzec ekspresji MyHCs, jako pierwsza obserwowana jest zarodkowa, potem noworodkowa, następnie wolna (I) i szybkie (IIa, IIb, IIc/x) izoformy MyHCs [Lyons et al., 1990; Lu et al., 1999], z wyjątkiem tego, że podczas regeneracji szybka izoforma MyHC może występować przed wolną izoformą [d'Albis et al., 1989; Launay et al., 2006]. Nasze badania dowiodły, że ekspresja różnych izoform ciężkich łańcuchów miozyny obserwowana była wcześniej w mięśniach myszy BALB/c uszkodzonych CTX w porównaniu ze uszkodzonymi poprzez miażdżenie. Tak więc, pierwszy rodzaj urazu może spowodować zaburzenia regeneracji i atrofię włókien mięśniowych [Czerwinska et al., 2012]. Jednak

regeneracja mięśni przebiegała według schematu standardowego, niezależnie od tego, w jaki sposób mięśnie zostały uszkodzone.

Kontynuacją tych badań było porównanie regeneracji mięśnia szkieletowego myszy BALB/c i myszy charakteryzujących się niedoborem odporności (SCID). Wczesne etapy regeneracji w mięśniach obu szczepów myszy były porównywalne. Jednak niższa liczba komórek jednojądrowych w regenerujących mięśniach myszy SCID wskazywała na niższy poziom stanu zapalnego. Zaobserwowano różnice w liczbie komórek CD14-/CD45+ (makrofagi) i komórek CD14+/CD45+ (komórki hematopoetyczne, tj. granulocyty, komórki T, komórki B) między regenerującymi mięśniami BALB/c i SCID. U myszy BALB/c liczba komórek hematopoetycznych (CD14-/CD45+) wzrosła w ciągu pierwszych 24 h po urazie, a komórki te były obecne w regenerujących mięśniach w czasie 7 dni regeneracji mięśni. Największa liczba komórek CD14-/CD45+ obserwowana była w 2 dniu regeneracji, następnie zmniejszała się i była istotnie mniejsza w mięśniach myszy SCID. W 5 dobie regeneracji liczba komórek CD14+/CD45+ była istotnie mniejsza w mięśniach myszy SCID niż w mięśniach myszy BALB/c [Grabowska et al., 2015]. Ponadto stwierdziliśmy istotne różnice występowaniu populacji makrofagów, M1 i M2, identyfikowanych za pomocą markerów CD68 i CD163 w mięśniach myszy BALB/c i SCID. Makrofagi prozapalne M1 (CD68+) odgrywają ważną rolę w promowaniu odpowiedzi immunologicznej Th1, wytwarzają zestaw cytokin zapalnych i tlenek azotu [Roszer, 2015]. W mięśniach regenerujących myszy BALB/c i SCID liczba makrofagów była różna. Duża liczba makrofagów M1 była obserwowana w regenerującym mięśniu myszy SCID w 1 dniu, natomiast w myszy BALB/c w 3 dniu regeneracji. W mięśniach myszy SCID makrofagi M1 występowały częściej niż w przypadku myszy BALB/c. Zmiana fenotypowa makrofagów M2 wymaga odpowiedzi immunologicznej Th2, która nie występuje u myszy SCID. Makrofagi M2 odgrywają istotną rolę w modulacji naprawy i przebudowy tkanek [Roszer, 2015]. Makrofagi M2 promują miogenezę, wzmagają angiogenezę i stymulują syntezę białek ECM [Deng et al., 2012; Zhang et al., 2013]. Co ważne, w regenerujących mięśniach myszy SCID nie występowały natomiast makrofagi przeciwzapalne M2. Możliwe, że to ograniczenie stanu zapalnego spowodowało zwiększenie rozwoju tkanki łącznej obserwowane w mięśniu myszy SCID w 30 dniu regeneracji. Wykazano, zatem, że chociaż u myszy SCID nie występują w trakcie regeneracji mięśni komórki CD163+, czyli makrofagi M2, ich brak nie powodowała istotnych zaburzeń w przebiegu regeneracji [Grabowska et al., 2015].

Podsumowanie:

- *Niezależnie od sposobu uszkodzenia mięśni regeneracja przebiega zgodnie ze standardowym schematem.*
- *Regeneracja mięśni szkieletowych myszy z niedoborem odporności przebiega bez istotnych nieprawidłowości, pomimo braku makrofagów M2.*
- *Regenerujące mięśni myszy z niedoborem odporności charakteryzuje zwiększona ilość tkanki łącznej.*

Dynamika i efekt regeneracji mięśni szkieletowych zależy od zastosowanego modelu zwierzęcego (SCID, BALB/c) i metody uszkodzenia mięśni (CTX, uszkodzenie mechaniczne).

2. Charakterystyka mechanizmów odpowiedzialnych za interakcje między tkanką mięśniową a przeszczepionymi komórkami macierzystymi

Wspomaganie regeneracji mięśni

Uszkodzenie mięśni szkieletowych może być spowodowane urazem fizycznym, niedokrwieniem, chorobami degeneracyjnymi lub sarkopenią i prowadzić do postępującego osłabienia, niepełnosprawności, a w skrajnych przypadkach, np. dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD), do śmierci. Dystrofia lub urazy mięśni szkieletowych mogą spowodować uszkodzenie wszystkich lub dużych partii mięśni. Badania mające na celu zaprojektowanie właściwego leczenia koncentrują się na zastąpieniu uszkodzonej tkanki oraz poprawie mobilności pacjenta i homeostazy mięśni. Zanim jednak będzie to osiągalne konieczne jest zidentyfikowanie całej sieci interakcji między cząsteczkami i komórkami w tkance mięśniowej. Obecne terapie mające na celu leczenie chorób mięśni ograniczają się głównie do zredukowania objawów, np. zahamowania stanu zapalnego. Pojawiają się jednak obiecujące nowe koncepcje terapeutyczne. Należą do nich m.in: 1) farmakoterapie, w tym kontrola stanu zapalnego, regulacja homeostazy wapniowej oraz 2) terapie genowe z wykorzystaniem technologii *exon skipping* lub różnych wektorów (lentiwirusy lub wirusy związane z adenowirusami) - kodujących brakujące białka, takie jak mikrodystrofina lub utrofina. Inną możliwą terapią w przypadku dużej utraty masy mięśniowej jest zastosowanie strategii leczenia opartej na wykorzystaniu rusztowań, czyli wykorzystanie biomateriałów, które mogą dostarczyć sygnałów chemicznych i fizycznych przeszczepionym komórkom lub komórkom mięśniowym gospodarza umożliwiając lepszą regenerację mięśni [Liu *et al.*, 2018]. Regeneracja mięśni szkieletowych zależy jednak od działania komórek i w konsekwencji strategii opartej na wykorzystaniu komórek stanowią nadal pierwszy wybór.

Komórki macierzyste w regeneracji mięśni

Duże zainteresowanie możliwym zastosowaniem komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej wiąże się z ich właściwościami, tj. zdolnością do samoodnowy, która gwarantuje uzyskanie wystarczająco dużej liczby komórek do przeszczepienia oraz ich zdolność do różnicowania w wyspecjalizowane rodzaje komórek. Komórki macierzyste są obecne w organizmach na wszystkich etapach rozwoju. Komórki uzyskane z zarodków, czyli zarodkowe komórki macierzyste, charakteryzują się wysokim tempem proliferacji i dużą zdolnością różnicowania. Komórki macierzyste obecne w organizmach dorosłych, odpowiedzialne za uzupełnianie populacji komórek w tkankach, i które są „zużywane” w trakcie życia organizmu, wykazują zazwyczaj ograniczone zdolności różnicowania (Fig. 3) [Hipp and Atala, 2008]. Niezależnie od różnic, najważniejszą cechą wszystkich typów komórek macierzystych, które stanowią potencjalne źródło komórek do stosowania w terapii mięśni szkieletowych, jest ich zdolność do poddania się różnicowaniu miogenicznemu. Zdolność ta określana jest jako potencjał miogeniczny. Można go ocenić poprzez badanie komórek macierzystych w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Odpowiednio dobrane testy pozwalają określić, czy komórki macierzyste mogą różnicować się w mioblasty, miotuby, włókna mięśniowe i wreszcie komórki satelitowe.

In vitro komórki macierzyste, które rozważane są jako zdolne do wspomaganie regeneracji, porównywane są z mioblastami poprzez ocenę ich zdolności do ekspresji czynników Pax7 i MRF zarówno na poziomie mRNA, jak i białek, a także obecności białek adhezyjnych i strukturalnych niezbędnych do fuzji, czyli M-kadheryny, syndekanu-4,

podjednostki integryny $\alpha 3$. Następnie ważne jest określenie, czy sygnały ze środowiska, w którym znajdują się komórki macierzyste, są w stanie wywołać ich różnicowanie w mioblasty. Test taki może być przeprowadzony przy użyciu kilku procedur. Na przykład, badane komórki mogą być hodowane w podłożu sprzyjającym proliferacji i późniejszemu różnicowaniu komórek mięśniowych. Komórki macierzyste można również hodować w pożywce kondycjonowanej przez różnicujące mioblasty, zawierającej czynniki wydzielane przez mioblasty [Sherwood *et al.*, 2004; Bedada and Braun, 2008]. Jednak metody te często okazują się niewystarczające, aby zaindukować różnicowanie komórek macierzystych. Bardziej efektywna wydaje się być hodowla mieszana komórek macierzystych z różnicującymi mioblastami. Zapewnia ona bezpośredni kontakt komórkom, dzięki czemu mają one szansę zareagować na czynniki wydzielane przez mioblasty i rozpocząć różnicowanie. Hodowla mieszana pozwala również na określenie częstości występowania hybrydowych miotub powstających w wyniku fuzji komórek macierzystych z mioblastami. Obecność takich hybrydowych miotub sugeruje, że badany typ komórek może tworzyć komórki mięśniowe zdolne do uczestniczenia w regeneracji mięśni szkieletowych [Schulze *et al.*, 2005].

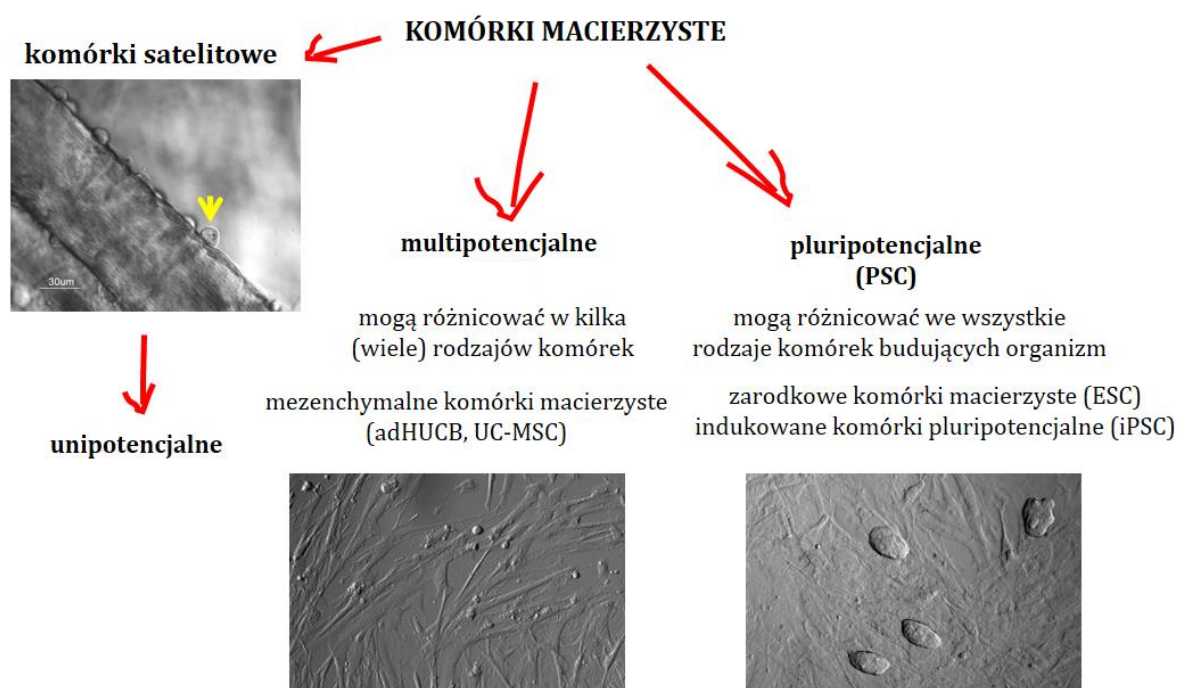


Fig. 3 Komórki macierzyste w regeneracji mięśni i klasyfikacja. Różne rodzaje komórek macierzystych są rozważane jako źródło komórek do naprawy uszkodzeń mięśni szkieletowych. adHUCB – adherentna frakcja komórek krwi pępowinowej, UC-MSK – komórki macierzyste/stromalne sznura pępowinowego.

Inna strategia pozwalająca na zbadanie potencjału miogenicznego komórek macierzystych polega na odtworzeniu oddziaływań kolejnych czynników odpowiedzialnych za indukcję miogenezy podczas rozwoju zarodkowego. Wśród nich są białka z rodziny Wnt, białko morfogenetyczne kości (BMP, ang. *bone morphogenetic protein*) lub Shh dodane do pożywki, w której hodowane są komórki macierzyste [Borchin *et al.*, 2013; Shelton *et al.*,

2014; Chal *et al.*, 2015]. Jednak próba naśladowania procesów zachodzących *in vivo* jest dość trudna i często wymaga zastosowania kilku czynników dodawanych do pożywki w określonej kolejności i stężeniu. Niemniej jednak, próby odtworzenia *in vitro* zdarzeń, sygnałów i ścieżek występujących podczas rozwoju zarodkowego są szeroko stosowane zwłaszcza w celu indukcji różnicowania komórek pluripotencjalnych. W przypadku pluripotencjalnych komórek macierzystych stosuje się również specjalne techniki hodowli. Wśród nich znajduje się uzyskiwanie i hodowla komórek w tzw. kulach zarodkowych (EBs, ang. *embryonic bodies*), czyli agregatach komórek macierzystych i ich rozrostach (EBOs, ang. *embryonic bodies outgrowths*). Różnicowanie niektórych komórek macierzystych można zaidukować poprzez zastosowanie czynników chemicznych, takich jak 5-azacytydyna (5azaC), która jest inhibitorem metylacji DNA oraz poprzez zmianę konformacji chromatyny w komórce wpływa na ekspresję niektórych genów. Pod wpływem 5azaC wiele typów komórek, np. komórki macierzyste płynu owodniowego i komórki macierzyste szpiku kostnego różnicują w komórki mięśniowe ([Constantinides *et al.*, 1977; Constantinides *et al.*, 1978; Taylor and Jones, 1979; De Coppi *et al.*, 2007; Caplan, 2009], omówione w: [Grabowska *et al.*, 2012a]).

Inne podejście stosowane do indukcji miogenicznego różnicowania komórek macierzystych polega na zastosowaniu wektorów kodujących określone mięśniowe czynniki regulatorowe. Taka strategia daje również pozytywne wyniki w przypadku pluripotencjalnych komórek macierzystych (PSCs, ang. *pluripotent stem cells*). Na przykład nadekspresja *Myod1* (gen kodujący MyoD) prowadzi do ich różnicowania, jednak komórki muszą być również hodowane w postaci EBs w pożywce o niskiej zawartości mitogenów [Dekel *et al.*, 1992; Shani *et al.*, 1992]. Podobnie, nadekspresja Pax3 lub Pax7 także indukuje wydajniejsze różnicowanie miogeniczne PSCs [Darabi *et al.*, 2008; Darabi and Perlingeiro, 2008; Darabi *et al.*, 2011a; Abujarour *et al.*, 2014; Maffioletti *et al.*, 2015]. Jednak zastosowanie takiej metody wyklucza przyszłe wdrożenie uzyskanych komórek do klinicznego zastosowania.

Ocena miogenicznego potencjału komórek macierzystych *in vitro* stanowi wstęp do najważniejszej części analizy, czyli weryfikacji uzyskanych danych *in vivo*. Różnicowanie *in vivo* może być analizowane poprzez uzyskanie potworniaków, czyli niezłośliwych guzów, składających się z różnorodnych komórek i tkanek, pochodzących ze trzech listków zarodkowych [Dixon and Moore, 1952]. Uzyskiwanie potworniaków pozwala na badanie spontanicznego różnicowania komórek *in vivo* i uwzględnia sygnały z przestrzennych interakcji pomiędzy komórkami (omówione w: [Grabowska *et al.*, 2012a; Swierczek *et al.*, 2015]). Potworniki służą jako łatwo dostępny test do określania zdolności różnicowania komórek pluripotencjalnych, które niosą różne mutacje. Wśród nich znalazły się pierwsze komórki iPSC uzyskane od osób cierpiących na dystrofię mięśniową Duchenne'a i Beckera [Park *et al.*, 2008].

Najczęściej stosowane testy *in vivo* polegają na wprowadzaniu badanych komórek do regenerujących mięśni szkieletowych zwierząt laboratoryjnych, a następnie kompleksowej analizie skutków tego przeszczepu. W doświadczeniach *in vivo* ważne jest sprawdzenie, czy wprowadzone komórki mogą przetrwać w środowisku regenerujących mięśni i czy są zdolne do podziałów i migracji w obrębie tej tkanki. Wprowadzone komórki mogą być rozpoznawane i eliminowane przez układ odpornościowy gospodarza, dlatego konieczne jest określenie, w jaki sposób ich obecność w mięśniu szkieletowym wpływa na rozwój stanu zapalnego i czy nie powoduje reakcji immunologicznej gospodarza na przeszczep, zakłócając tym samym przebieg regeneracji.

Komórki satelitowe mają największą zdolność do różnicowania *in vivo* w mioblasty i włókna mięśniowe. Komórki te charakteryzuje też jednak bardzo ograniczona zdolność do migracji i zasiedlania mięśni, a ponadto ich dostępność jest ograniczona [Guerette *et al.*, 1994; Huard *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1996; Guerette *et al.*, 1997; Skuk *et al.*, 1999]. Tak więc wśród populacji komórek rozważanych jako źródło komórek do wspomaganie regeneracji mięśni szkieletowych są również hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC, ang. *hematopoietic stem cells*), mezangioblasty, perycyty, mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne (MSC, ang. *mesenchymal stem/stromal cells*) oraz pluripotencjalne komórki macierzyste, czyli zarodkowe komórki macierzyste (ESCs, ang. *embryonic stem cells*) lub indukowane komórki pluripotencjalne (iPSC, ang. *induced pluripotent cells*) [Collins *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2008; Scheper and Copray, 2009]. Camargo i wsp. w 2003 roku wykazali, że HSC biorą udział w tworzeniu włókien mięśniowych tylko poprzez fuzję z mioblastami i włóknami biorcy, a nie poprzez przekształcanie ich w funkcjonalne mioblasty i następnie różnicowanie we włókna mięśniowe. Ponadto Sherwood i wsp. udowodnili, że HSC przeszczepione do mięśni nie biorą udziału w kolejnych rundach regeneracji mięśni, co oznacza, że nie powstają z nich komórki satelitowe [Camargo *et al.*, 2003].

Przeszczepienie odpowiednio dobranych komórek macierzystych może poprawić przebieg regeneracji i w rezultacie wspomóc odbudowę mięśni szkieletowych. Jednak terapia oparta na komórkach macierzystych będzie możliwa dopiero po dokładnej analizie ich cech, zwłaszcza ich potencjału miogenicznego, czyli zdolności do różnicowania w mioblasty i włókna mięśniowe.

Multipotencjalne komórki macierzyste

Mezenchymalne komórki macierzyste po raz pierwszy zostały odkryte w szpiku kostnym (omówione w: [Sacchetti *et al.*, 2016]). Są obecne w wielu tkankach, zarówno organizmów rozwijających się, jak i dorosłych, w tym we krwi pępowinowej, płynie owodniowym, tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych [Caplan, 2009; Markert *et al.*, 2009]. Komórki te są zatem łatwiej dostępne niż np. HSCs. Wiadomo również, że MSCs mogą różnicować przede wszystkim w tkanki wywodzące się z mezodermy, w tym w tkankę tłuszczową, chrząstkę i kość. W 1995 roku po raz pierwszy wykazano, że wykazują one również potencjał miogeniczny. MSCs wyizolowane ze szpiku kostnego szczura i hodowane w obecności 5azaC, różnicowały w mioblasty i syntetyzowały specyficzne czynniki mięśniowe oraz powstawały z nich wielojądrowe miotuby [Caplan, 2009]. MSCs w hodowli mieszanej z mioblastami tworzą hybrydowe miotuby, a wprowadzone do mięśni myszy mdx (myszy pozbawione dystrofiny, powszechnie stosowany, ale nie najlepszy model DMD) [Gussoni *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 2007; Rousseau *et al.*, 2010; Podkalicka *et al.*, 2019] spowodowały wzrost masy mięśniowej i ekspresję dystrofiny w nowoutworzonych włóknach [Caplan, 2009]. MSCs wyizolowane z innych źródeł, takich jak krew pępowinowa galareta Whartona sznura pępowinowego, płyn owodniowy i tkanka tłuszczowa również różnicowały i tworzyły włókna mięśniowe [Gang *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2006; De Coppi *et al.*, 2007].

W naszych własnych analizach badaliśmy skuteczność różnych populacji komórek wspomagających regenerację mięśni szkieletowych. Wśród takich komórek była adherentna frakcja komórek krwi pępowinowej (adHUCBCs) [Grabowska *et al.*, 2013] i mezenchymalne komórki stromalne wyizolowane ze sznura pępowinowego [Grabowska *et al.*, 2012b]. Ludzka krew pępowinowa zawiera zarówno mezenchymalne jak i hematopoetyczne komórki macierzyste i prekursorowe [Romanov *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2011]. MSCs mają zdolność

do różnicowania w komórki i tkanki pochodzenia mezodermalnego, ale mają również potencjał do różnicowania w komórki śródbłonna [Lin *et al.*, 2010], osteoblasty [Kim *et al.*, 2008], a także komórki tkanki nerwowej [Buzanska *et al.*, 2002; Buzanska *et al.*, 2005; Buzanska *et al.*, 2006]. Wykazano, że adherentna frakcja komórek HUCB jest subpopulacją wzbogaconą w MSC [Erices *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004]. Nasze badania wykazały, że komórki HUCB były również w stanie zasiedlać uszkodzony mięsień szkieletowy myszy SCID, jednak ich potencjał do poprawy regeneracji był ograniczony [Brzoska *et al.*, 2006]. Komórki HUCB wszczepione do uszkodzonych mięśni były wykrywalne przez 30 dni. Były one w stanie fuzjować z komórkami myszy i utworzyć hybrydowe włókna, i wziąć udział w regeneracji mięśni szkieletowych. W 7 dniu po uszkodzeniu odsetek hybrydowych włókien mięśniowych osiągnął aż 9,8%. Zasugerowaliśmy również, że zasiedlanie mięśni przez komórki HUCB zależy od aktywności osi SDF-1/CXCR4 [Brzoska *et al.*, 2006].

Te obiecujące wyniki skłoniły nas do analizy mezenchymalnych komórek macierzystych wyizolowanych z galarety Whartona sznura pępowinowego [Grabowska *et al.*, 2012b]. Aby przeanalizować potencjał miogeniczny UC-MSCs przeprowadziliśmy szereg badań *in vitro* i *in vitro* [Grabowska *et al.*, 2012b]. Wstępne analizy UC-MSCs wykazały, że ponad 80% komórek scharakteryzowano jako komórki wyrażające CD29, CD73, a także CD105 i pozbawione CD34, CD45 i Lin1, w związku z tym analizowane komórki uznano za MSCs. Komórki te różnicowały *in vitro* w kierunku miogenicznym, co udowodniliśmy poprzez hodowlę mieszaną z mioblastami C2C12. Określiśmy częstotliwość występowania miotub zawierających ludzkie jądra, co pozwoliło stwierdzić, że 15% z nich to miotuby hybrydowe i pozwoliło nam uznać, że UC-MSC są w stanie różnicować w mioblasty i tworzyć miotuby w warunkach stymulujących zróżnicowanie miogeniczne. Następnie porównaliśmy przebieg regeneracji mięśni szkieletowych myszy uszkodzonych CTX oraz uszkodzonych CTX, do których przeszczepiono UC-MSC. Aby sprawdzić, czy SDF-1 poprawia zdolność UC-MSCs do zasiedlania uszkodzonych mięśni, przeprowadziliśmy eksperyment, w którym komórki przed przeszczepieniem w hodowli *in vitro* były wstępnie poddawane działaniu SDF-1 [Grabowska *et al.*, 2012b]. Analiza histologiczna uszkodzonych mięśni wykazała korzystny wpływ transplantowanych UC-MSCs na regenerację. Traktowanie komórek SDF-1 przed transplantacją spowodowało, że istotnie zwiększyła się masa mięśni, co jest miarą wydajnej regeneracji. Wykazaliśmy również, że traktowanie UC-MSCs cytokiną SDF-1 nie wpłynęło na liczbę ludzkich komórek zlokalizowanych w obrębie regenerującego mięśnia, co wskazuje na brak wpływu SDF-1 na zdolność UC-MSC do „przetrwania” w uszkodzonej tkance. Zarówno komórki kontrolne, jak i traktowane SDF-1, znajdowały się w bliskim sąsiedztwie nowoutworzonych włókien mięśniowych. Sporadycznie komórki wywodzące się z UC-MSC włączane były do regenerujących włókien mięśniowych. Zaledwie 5,3% włókien mięśniowych stanowiły włókna hybrydowe. Wykryto również UC-MSCs zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie włókien mięśniowych, w pozycjach specyficznych dla komórek satelitowych. Stwierdziliśmy, że UC-MSCs są w stanie skolonizować uszkodzone mięśnie szkieletowe i wspomagają regenerację, szczególnie po pre-traktowaniu SDF-1, mimo iż małą częstotliwością uczestniczą w tworzeniu nowych włókien mięśniowych.

Podsumowanie:

- *Multipotencjalne komórki macierzyste (adHUCB i UC-MSC) mają potencjał miogeniczny.*
- *In vitro UC-MSC fuzjują z mioblastami w tworzą hybrydowe miotuby z wysoką wydajnością.*

- Przeszczepianie komórek multipotencjalnych do uszkodzonych mięśni szkieletowych ma pozytywny wpływ na regenerację.

Multipotencjalne komórki macierzyste (adHUCB i UC-MSc) mają potencjał miogeniczny in vitro i wspomagają regenerację mięśni.

3. Rola specyficznych czynników transkrypcyjnych w różnicowaniu komórek macierzystych

Pluripotencjalne komórki macierzyste

Zarodkowe komórki macierzyste (ESCs) są pluripotencjalne, co oznacza, że mają zdolność do różnicowania we wszystkie komórki budujące organizm. Przy zastosowaniu odpowiednich warunków hodowli ESCs tworzą EBs różnicując w nich w komórki trzech listków zarodkowych, ekto-, endo- i mezodermy. *In vivo*, po wprowadzeniu ESC, np. pod skórę myszy z niedoborem odporności, ich pluripotencja przejawia się zdolnością do tworzenia potworniaków, czyli guzów, w których z PSCs powstają różnorodne komórki i tkanki [Grabowska *et al.*, 2012a]. Z punktu widzenia moich badań, najciekawsze wydaje się to, że w potworniakach, PSCs wydajnie różnicują w mięśniowe prekursor, mioblasty, miotuby a także w dojrzałe włókna mięśniowe (omówione w: [Grabowska *et al.*, 2012a]). Zdolność do tworzenia włókien mięśniowych w potworniakach potwierdza, że ESCs mają potencjał miogeniczny. Jednak przy zastosowaniu innych modeli badawczych ESCs bardzo nieefektywnie różnicują w komórki miogeniczne. Mając powyższe na uwadze, interesujące jest to, że ich zdolność do różnicowania w kardiomiocyty jest z kolei bardzo wysoka (dodatek aktywiny A i BMP4 do pożywki zwiększa odsetek kardiomiocytów uzyskanych z ludzkich ESCs do 90%) [Laflamme *et al.*, 2007].

Kiedy ESCs są hodowane w warunkach podtrzymujących pluripotencję nie ekspresują genów charakterystycznych dla mięśni szkieletowych [Kamochi *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Barberi *et al.*, 2007; Darabi *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009; **Czerwinska *et al.*, 2016a**]. Rohwedel i wsp. w 1994 roku po raz pierwszy opisali występowanie w kulach zarodkowych komórek ekspresujących geny kodujące czynniki z rodziny MRF [Rohwedel *et al.*, 1994]. Analiza ta opierała się na obserwacji zmian morfologii komórek i wykrywaniu transkryptów MRF, co budziło wątpliwości zgłaszane przez inne grupy badawcze. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że komórki budujące EB nie są w stanie "spontanicznie" rozpocząć różnicowania w mioblasty [Darabi *et al.*, 2008; Scheper and Copray, 2009], albo takie różnicowanie zachodzi z bardzo niską częstością [Zheng *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2008]. Indukcja różnicowania ESC do mioblastów była możliwa po zastosowaniu dodatkowego czynnika, np. 5azaC lub kwasu retinowego (RA, ang. *retinoic acid*) [Zheng *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2008]. Uzyskane w ten sposób komórki syntetyzowały jednak tylko niektóre markery miogeniczne i tworzą miotuby z niską częstotliwością [Zheng *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2008].

Inna strategia indukowania różnicowania miogenicznego ESCs została zastosowana przez Barberiego i wsp., którzy wykorzystali hodowlę mieszaną ludzkich ESCs z komórkami szpiku kostnego, które wydzielają czynniki promujące różnicowanie w mezodermę. Uzyskane przez nich prekursorzy mezodermy nie były zdolne do różnicowania w mioblasty. Tylko komórki o fenotypie CD73+ w hodowli mieszanej z mioblastami C2C12 lub inkubacja w pożywce zawierającej 5azaC indukowały ekspresję *Myod1* i *MyoG* [Barberi *et al.*, 2005].

Najlepsze wyniki w pozyskiwaniu komórek mięśniowych z ESCs otrzymano jednak poprzez nadekspresję określonych genów związanych z różnicowaniem komórek w mięśniowych, np. nadekspresja genu kodującego IGFII (insulinopodobny czynnika wzrostu II) doprowadziła do syntezy MyoD, Myf5, miogeniny i M-kadheryny. Komórki, w których indukowano zwiększoną ekspresję IGFII, tworzyły również miotuby *in vitro* [Wobus and Boheler, 2005; Kamochi *et al.*, 2006]. Również nadekspresja MyoD, który odgrywa centralną rolę w różnicowaniu miogenicznym [Berkes and Tapscott, 2005], prowadzi do miogenicznego różnicowania, ale tylko wtedy gdy komórki są hodowane w postaci kul zarodkowych w pożywce zawierającej czynniki indukujące różnicowanie [Dekel *et al.*, 1992; Shani *et al.*, 1992; Armour *et al.*, 1999; Gianakopoulos *et al.*, 2011]. Wśród czynników, którymi były transfekowane ESCs, aby wywołać różnicowanie, znalazły się również Pax3 i Pax7 [Dekel *et al.*, 1992; Darabi *et al.*, 2008; Darabi and Perlingeiro, 2008; Darabi *et al.*, 2009; Darabi *et al.*, 2011b; Goudenege *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2013; Abujarour *et al.*, 2014; Maffioletti *et al.*, 2015; Shoji *et al.*, 2016]. Oprócz metod polegających na nadekspresji wybranych czynników, zaproponowano szereg innych technik i modeli do pozyskiwania komórek mięśni szkieletowych z komórek pluripotencjalnych. Niemniej jednak, uzyskiwanie mioblastów *in vitro* jest nadal nieefektywne. Potencjał miogeniczny ESC został również oceniony *in vivo* [Bhagavati and Xu, 2005; Archacka *et al.*, 2010; Grabowska *et al.*, 2012a; Magli *et al.*, 2017]. Na przykład, Bhagavati i Xu przeprowadzili eksperymenty z wykorzystaniem wcześniej hodowanych z mioblastami przez kilka dni ESCs. Po przeszczepieniu wstępnie zróżnicowanych ESCs do regenerujących mięśni myszy *mdx*, liczba włókien mięśniowych zawierających dystrofinę była bardzo niska i mogła być wynikiem tak zwanego "spontanicznego odwrócenia mutacji" [Bhagavati and Xu, 2005]. Transplantacja wstępnie zróżnicowanych ESCs do mięśni szkieletowych, a następnie ocena skutków tej procedury została przeprowadzona również przez inne grupy badawcze.

Zastąpienie uszkodzonej tkanki mięśniowej lub poprawa przebiegu regeneracji z wykorzystaniem komórek macierzystych stanowi potencjalną strategię leczenia wielu chorób zwyrodnieniowych mięśni. Z tego powodu analizowaliśmy zdolność ESC do różnicowania w mioblasty i wspomagania regeneracji mięśni szkieletowych.

Pax7 – proliferacja i miogeniczne różnicowanie komórek pluripotencjalnych

Rodzina genów *Pax* stanowi konserwowaną ewolucyjnie grupę dziewięciu czynników transkrypcyjnych, które odgrywają kluczową rolę podczas organogenezy i homeostazy tkankowej [Chi and Epstein, 2002; Robson *et al.*, 2006; Buckingham and Relaix, 2007; Przewoźniak and Brzóska, 2008]. Spontaniczne mutacje w genach *Pax* mogą prowadzić do zaburzeń w rozwoju zarówno myszy jak i ludzi [Lang *et al.*, 2007] a także do rozwoju nowotworów [Robson *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008]. Pax3 i Pax7 to spokrewnione czynniki zaangażowane w specyfikację i utrzymanie populacji komórek prekursorowych mięśni szkieletowych [Bober *et al.*, 1994; Goulding *et al.*, 1994; Tajbakhsh *et al.*, 1997; Chi and Epstein, 2002; Robson *et al.*, 2006]. Pax7 odgrywa kluczową rolę podczas miogenezy zarodkowej, utrzymuje prawidłowe funkcjonowanie komórek satelitowych, które są komórkami macierzystymi dorosłego mięśnia szkieletowego. Uprzednio wykazano, że nadekspresja Pax7 promuje różnicowanie miogeniczne pluripotencjalnych komórek macierzystych [Darabi *et al.*, 2011a]. Pax7 jest eksprymowany w nieaktywnych mitotycznie komórkach satelitowych, a jego obecność utrzymuje się po aktywacji komórek aż do momentu rozpoczęcia różnicowania. Myszy Pax7^{-/-} rodzą się żywe, ale mają znacznie niższą

masę urodzeniową i z powodu osłabienia mięśni i problemów neurologicznych przeżywają zaledwie 2-3 tygodnie [Seale *et al.*, 2000]. Fenotyp myszy Pax7^{-/-} wskazuje, że Pax7 nie jest konieczny do powstania mięśni w rozwoju zarodkowym i płodowym. Myszy pozbawione Pax7 są co prawda mniejsze, ale mają stosunkowo dobrze wykształconą tkankę mięśniową. Zdolność regeneracji mięśni po uszkodzeniu jest jednak znacząco obniżona, co jest konsekwencją bardzo zredukowanej liczby komórek satelitowych albo wręcz ich braku [Mansouri *et al.*, 1996; Oustanina *et al.*, 2004].

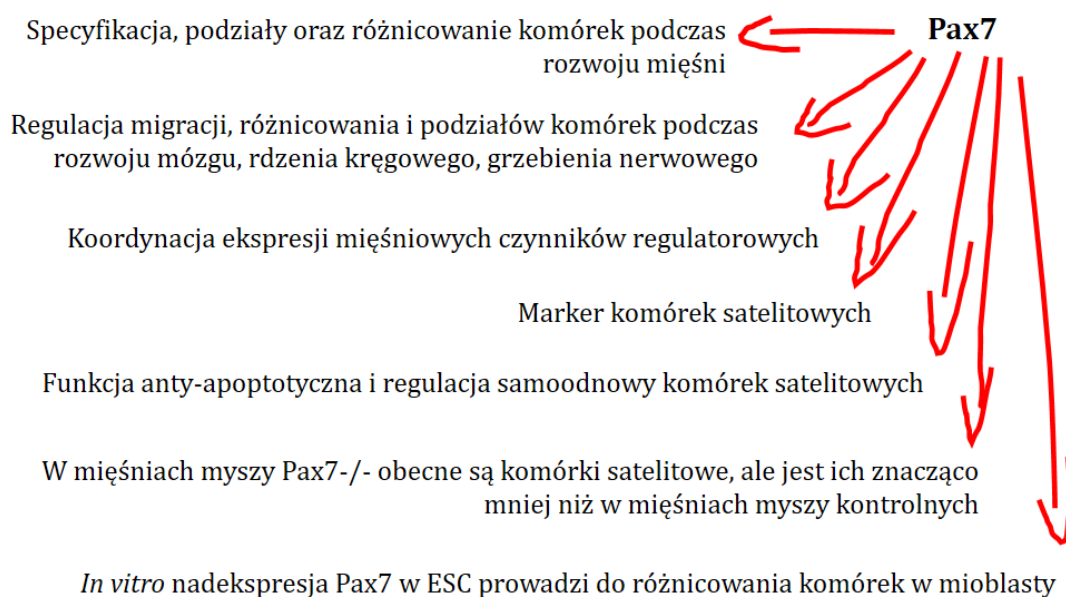


Fig.4 Pax7 – proliferacja i miogeniczne różnicowanie. Pax7 odgrywa różne role w regulacji miogenezy, pełni rolę w aktywacji programu różnicowania miogenicznego i jednocześnie zapobiega terminalnemu różnicowaniu.

Komórki progenitorowe mięśni obecne w somitach ekspresują Pax3 i Pax7 [Kassar-Duchossoy *et al.*, 2005; Relaix *et al.*, 2005]. Niektóre z tych komórek utrzymują się przez cały okres rozwoju embrionalnego i płodowego i dlatego są uważane za źródło postnatalnych komórek satelitowych. Wyniki eksperymentów z wykorzystaniem indukowanej inaktywacji Pax7 w mięśniach myszy zakwestionowały znaczenie tego czynnika w dojrzałych mięśniach [Lepper *et al.*, 2009]. Autorzy tych badań doszli do wniosku, że Pax7 ma kluczowe znaczenie dla utrzymania progenitorów komórek satelitowych podczas rozwoju i wczesnego dojrzewania, ale po ustanowieniu populacji nieaktywnych komórek satelitowych, tj. po 20 dniu od urodzenia myszy, Pax7 jest zbędny. Nie uwzględnili oni jednak udziału komórek infiltrujących mięśnie, które mogą zrekompensować brak lub upośledzenie funkcji komórek satelitowych [LaBarge and Blau, 2002; Kowalski *et al.*, 2016].

Pax7 jest wykrywany w aktywowanych i proliferujących komórkach satelitowych a jego poziom ulega szybkiej redukcji w zróżnicowanych komórkach [Olguin and Olwin, 2004; Zammit *et al.*, 2004]. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem pierwotnych mioblastów izolowanych z mięśni dorosłych myszy i hodowanych *in vitro* wykazały, że w niewielkiej części populacji komórek Pax7⁺/MyoD⁺ dochodzi do obniżenia ekspresji *MyoD1*, i podwyższenia ekspresji *Pax7*, co zapewnia utrzymanie puli komórek satelitowych [Olguin and Olwin, 2004; Reimann *et al.*, 2004; Zammit *et al.*, 2004]. Nadekspresja Pax7 w mioblastach

proceeds to a decrease in MyoD levels and blocks differentiation of myoblasts [Olguin and Olwin, 2004; Olguin *et al.*, 2007]. Thus, it is not surprising that in cultured *in vitro* myoblasts isolated from muscle of Pax7^{-/-} mice, MyoD activation is observed, along with increased proliferation and differentiation of myoblasts [Oustanina *et al.*, 2004; Kuang *et al.*, 2006; Relaix *et al.*, 2006]. However, in comparison with the family of MRF transcription factors, the role of Pax7 in embryonic myogenesis and in adult myoblasts (in particular during regeneration) is not fully defined (Fig. 4).

To test the role of Pax7 in myogenic differentiation of pluripotent cells, we generated ESC lines: control and Pax7-deficient functional copy of the Pax7 gene [Czerwinska *et al.*, 2016a]. We confirmed that the ESC lines are pluripotent, i.e. they can differentiate into all three germ layers: ectoderm, endoderm and mesoderm, including muscle myoblasts. Analysis of the generated cell lines showed that all control and Pax7^{-/-} ESC lines are pluripotent and can differentiate into muscle fibers in culture [Czerwinska *et al.*, 2016a]. We also analyzed the expression of myogenic transcription factors, such as MRF and muscle-specific microRNAs, in cultured ESCs under conditions that maintain pluripotency and in differentiating ESCs Pax7^{+/+} and Pax7^{-/-}. For *in vitro* ESC differentiation, we used specialized conditions for generating embryonic stem (ES) colonies and their expansion, including low serum concentration and supplementation of the culture medium with retinoic acid, insulin, transferrin and selenium (ITS) [Rohwedel *et al.*, 1999; Barberi *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2009]. We compared the transcriptomes of the two types of myoblasts. Expression of key transcription factors for myoblast specification and differentiation, such as Pax3, MyoD1, MyoG, Myf5 and Id2, was similar during ESC differentiation, but significantly higher in Pax7^{+/+} than in Pax7^{-/-} ESCs. In all analyzed ESC lines Pax7^{+/+} and Pax7^{-/-}, MyHC expression was detectable, indicating the formation of the contractile apparatus in differentiating myoblasts. Moreover, MyHC⁺ myoblasts contained myoblasts and myotubes, indicating that Pax7-deficient ESCs can reach advanced stages of myogenic differentiation. Additional analysis showed that myoblasts present in EBOs derived from Pax7^{-/-} ESCs were characterized by a higher number of MyoD⁺ cells than those derived from Pax7^{+/+} ESCs. We also analyzed the developmental stage of the analyzed myoblasts and myotubes generated from ESCs, i.e. whether they were primary (embryonic) or secondary (fetal), by determining the expression levels of Myh7, Nfix and Eno3 at 0, 2, 7 and 21 days of differentiation. The isoform of myosin heavy chain (Myh7) is characteristic for primary myofibers [Biressi *et al.*, 2007]. Eno3 is a metabolic enzyme characteristic for embryonic myoblasts [Barbieri *et al.*, 1990]. The product of the Nfix gene controls the transition of myogenesis from embryonic to fetal myogenesis [Messina *et al.*, 2010]. Our analysis showed that *in vitro* myogenic differentiation of ESCs in EBs and EBOs, independent of genotype, leads to the formation of myotubes with embryonic characteristics, as indicated by Myh7 expression and fetal myoblast precursors, which is indicated by Nfix expression. In conclusion, we showed that the absence of functional Pax7 does not prevent myogenic differentiation of ESCs *in vitro* and favors myogenic differentiation [Grabowska *et al.*, 2012a].

Some evidence indicates that MyoD1 is a key myogenic gene, and its ectopic expression can initiate a myogenic program in other cell types, i.e. fibroblasts, adipocytes, pigment cells and others [Davis *et al.*,

1987; Weintraub *et al.*, 1989]. Warto zauważyć, że nadekspresja Pax7 hamuje różnicowanie komórek C3H10T1/2 do mioblastów, różnicujących w wyniku ektopowej ekspresji *Myod1* [Olguin and Olwin, 2004] a także różnicowanie mioblastów C2C12 [Zammit *et al.*, 2006; McFarlane *et al.*, 2008; McKinnell *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009]. Prawdopodobnie Pax7 hamuje wczesne reakcje w molekularnej kaskadzie prowadzące do różnicowania mięśni [Olguin and Olwin, 2004; Olguin *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009], przypuszczalnie poprzez hamowanie aktywności transkrypcyjnej MyoD. Zastosowanie 5azaC w hodowli komórek linii C3H10T1/2 powoduje, że komórki te różnicują w komórki podobne mioblastów pod względem cech morfologicznych i biochemicznych [Pinney and Emerson, 1989]. Ta zmiana fenotypu może wynikać z aktywacji genów endogennych w odpowiedzi na hemimetylację [Ciemerych *et al.*, 2011; Bem and Grabowska, 2013; Swierczek *et al.*, 2015]. W kolejnych badaniach zweryfikowaliśmy rolę Pax7 w różnicowaniu ESCs przy użyciu czynnika demetylującego 5azaC w warunkach *in vitro* i *in vivo*, czyli w środowisku regenerujących się mięśni szkieletowych [Helinska *et al.*, 2017].

Molekularne podstawy działania 5azaC opierają się na zmianach epigenetycznych spowodowanych demetylacją cytozyn, prowadzącą do „odblokowania” ekspresji niektórych genów [Konieczny and Emerson, 1984]. Indukcja różnicowania komórek poprzez traktowanie 5azaC może wynikać nie tylko ze zmiany poziomu metylacji cytozyn, ale także przez degradację Oct3/4 i Nanog, w której pośredniczą kaspazy -3 i -7 [Musch *et al.*, 2010]. Co ważne, wykazano, że Oct3/4 zapobiega ekspresji *Myod1*, a zatem jego degradacja ma bezpośredni wpływ na różnicowanie miogeniczne [Watanabe *et al.*, 2011]. 5azaC rzeczywiście indukuje ekspresję MyoD w ludzkich ESC [Zheng *et al.*, 2006], jak również w mysich ESCs [Archacka *et al.*, 2014]. Archacka i wsp. zasugerowali, że 5azaC uwrażliwia komórki ESCs na czynniki obecne w surowicy końskiej, które indukują miogeniczne różnicowanie tych komórek [Archacka *et al.*, 2014]. Na podstawie wielu doniesień udokumentowano, że suplementacja podłoża hodowlanego surowicą końską jest kluczowa dla prawidłowego różnicowania komórek, takich jak mioblasty pierwotne, mioblasty C2C12 i inne komórki, np. komórki macierzyste AC133+ lub mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej [Torrente *et al.*, 2004; Di Rocco *et al.*, 2006]. Z tego powodu, od 1960 roku, surowica końska jest powszechnie stosowana w hodowli mioblastów [Capers, 1960]. Surowica ta była również wykorzystywana, jako czynnik promujący różnicowanie ESCs w mioblasty [Zheng *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2009].

Wykazaliśmy, że po 10 dniach hodowli kolonii ESCs w pożywce indukującej różnicowanie ich morfologia wskazywała na rozpoczęcie różnicowania - kolonie ESCs były okrągłe, ale „spłaszczone” na ich brzegach [Helinska *et al.*, 2017]. Zastosowanie 5azaC potęgowało ten efekt i dodatkowo powodowało rozproszenie kolonii i migrację komórek. Zmiany w morfologii kolonii były najbardziej widoczne w komórkach Pax7^{-/-}, co sugeruje, że komórki te są bardziej podatne na inicjowanie różnicowania w odpowiedzi na działanie 5azaC. Określenie pola powierzchni zajmowanego przez komórki MyHC⁺ potwierdziło, że różnicowanie miogeniczne było bardziej efektywne w przypadku linii ESCs Pax7^{-/-}. W komórkach Pax7^{-/-} ESC poziom mRNA i białek kodujących marker mezodermy przyosiowej Pdfgr α , a także Pax3, Myf5, Miogeniny były wyższe w porównaniu z komórkami Pax7^{+/+} [Helinska *et al.*, 2017]. Obiecujące wyniki uzyskane w warunkach *in vitro* skłoniły nas do zbadania zachowania się Pax7^{-/-} ESC w warunkach *in vivo*. Założyliśmy, że ESCs Pax7^{-/-}, które są bardziej podatne na up-regulację MRF *in vitro*, będą charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do uczestniczenia w regeneracji mięśni. Niestety, nie byliśmy w stanie

wykryć włókien mięśniowych utworzonych przez przeszczepione ESCs. Co ważne, zaobserwowaliśmy, że po 7 dniach regeneracji liczba komórek wywodzących się z przeszczepionych ESCs Pax7^{-/-} i obecnych w regenerujących mięśniach była istotnie wyższa niż w przypadku kontrolnych ESCs. Zjawisko to było związane z naszym odkryciem, że większy odsetek komórek wywodzących się z przeszczepionych komórek Pax7^{-/-} wyrażał Ki67, czyli marker komórek proliferujących. Postulujemy, zatem, że ESCs Pax7^{-/-} zachowały zdolność do proliferacji w regenerujących się mięśniach, co sprzyjało ich większej przeżywalności [Helinska et al., 2017].

Uzyskane dane wykazują, że ESCs pozbawione funkcjonalnej kopii genu kodującego Pax7 charakteryzowały się większą zdolnością proliferacyjną po przeszczepieniu do regenerujących się mięśni, w porównaniu z komórkami Pax7^{+/+}. Obecność tych komórek nie miała jednak wpływu na profil transkrypcyjny regenerującego mięśnia. Wykazaliśmy, że brak Pax7 nie zapobiega różnicowaniu miogenicznemu *in vitro* i zasiedlaniu regenerującego mięśnia *in vivo* [Helinska et al., 2017]. Co ważne, różnicujące *in vitro* ESCs Pax7^{-/-} są bardziej podatne na inicjowanie różnicowania miogenicznego, wskazując, że proces ten może być ułatwiony nie tylko przez nadekspresję miogenicznych czynników regulatorowych, ale także przez brak niektórych z nich.

Wyniki naszych badań nad rolą Pax7 w proliferacji ESCs w regeneracji mięśni oraz wcześniejsze analizy wykazujące, że Pax7 jest obecny w proliferujących komórkach satelitowych i jest szybko degradowany w komórkach różnicujących [Olguin and Olwin, 2004; Zammit et al., 2004], wraz z danymi na temat przejściowej nadekspresji Pax7 w mioblastach, wykazującymi że Pax7 indukuje obniżenie poziomu ekspresji *Myod1* i zahamowanie miogenezy, a także redukcję inkorporacji BrdU w transfekowanych komórkach, wskazują że wpływ Pax7 na regulację proliferacji i apoptozy komórek satelitowych i mioblastów jest niepodważalny [Olguin et al., 2007]. Jednak jego udział w regulacji cyklu komórkowego jest jeszcze mało poznany w porównaniu z takimi regulatorami miogenicznymi jak na przykład MyoD.

W naszej pracy dotyczącej roli Pax7 w proliferacji wykazaliśmy, że brak funkcjonalnego Pax7 w różnicowaniu ESCs moduluje cykl komórkowy ułatwiając proliferację tych komórek. ESCs Pax7^{-/-} charakteryzuje wyższy poziom cykliny E1, niższy poziom inhibitorów cyklu komórkowego. W efekcie wyższy odsetek ESCs Pax7^{-/-} wyrażał marker Ki67 charakterystyczny dla proliferujących komórek, w porównaniu do komórek kontrolnych [Czerwinska et al., 2016b]. Kontrolne doświadczenia przeprowadzone zostały z wykorzystaniem komórek "niemięśniowych", a więc mysich zarodkowych fibroblastach (MEFs, ang. *mouse embryonic fibroblasts*). Wykazały one, że Pax7 jest wykrywalny również w MEFs. Wyniki analizy transkryptomu, wykonane techniką mikromacierzy, wskazały rolę Pax7 również w regulacji cyklu komórkowego MEFs. Potwierdziły one niższy poziom ekspresji inhibitora cyklu komórkowego kodującego mRNA, tj. p57, w MEF Pax7^{-/-} [Czerwinska et al., 2016b]. Wiązało się to z wyższym tempem proliferacji tych komórek. Brak Pax7 ma zatem pozytywny wpływ na proliferację zarodkowych fibroblastów myszy (komentarz [Dulak, 2017]).

W ostatnich latach wiele ośrodków badawczych sugerowało, że Pax7 odgrywa kluczową rolę w powstawaniu populacji komórek satelitowych i ich funkcji, utrzymaniu populacji i regulacji różnicowania miogenicznego [Seale et al., 2000; Kuang et al., 2006; Olguin et al., 2007; McKinnell et al., 2008; Collins et al., 2009; Lepper et al., 2009]. Jednak dokładna rola Pax7 w tych procesach, tj. regulacja, cele molekularne, interakcje, ścieżki sygnałowe, jest

wciąż zbadana tylko powierzchownie. Moim zdaniem Pax7 odgrywa, więc podwójną rolę w różnicowaniu ESCs - promuje miogenezę poprzez indukowanie ekspresji MRF oraz zapobieganiu terminalnemu różnicowaniu poprzez blokowanie funkcji MRF i wspieranie proliferacji.

Podsumowanie:

- *Brak Pax7 nie blokuje różnicowania miogenicznego komórek pluripotencjalnych.*
- *Transplantacja ESC Pax7-/- wykazała, że mają wyższą zdolność do kolonizacji mięśni szkieletowych.*
- *Zarodkowe komórki macierzyste Pax7-/- proliferują wydajniej.*

*Brak Pax7 ułatwia ekspresję MRF i różnicowanie ESC.
Pax7 jest zaangażowany w regulację cyklu komórkowego.*

Podsumowanie

Za swoje najważniejsze osiągnięcia uważam:

- **Wskazanie mechanizmów regulujących przebieg regeneracji przy zastosowaniu różnych metod uszkodzenia mięśni i modeli zwierzęcych.**
- **Określenie roli różnych typów komórek macierzystych we wspomaganie regeneracji mięśni.**
- **Odkrycie, że pluripotencjalne komórki macierzyste pozbawione funkcjonalnej kopii genu kodującego Pax7 wydajniej różnicują w mioblasty.**
- **Wskazanie nowej roli Pax7 w regulacji cyklu komórkowego.**

Zwięzły opis innych osiągnięć naukowych i perspektywy

Moje zainteresowania badawcze dotyczą miogenezy zarodkowej, regeneracji mięśni szkieletowych oraz mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za interakcje między tkanką mięśniową a różnymi typami komórek macierzystych. Badam również rolę specyficznych czynników transkrypcyjnych w różnicowaniu komórek macierzystych. Prowadzone przeze mnie badania były finansowane ze środków pozyskanych przez mnie m.in w NCN, ale byłam i jestem wykonawcą także w innych projektach naukowych, w których zajmuję się bliską moim zainteresowaniom naukowym tematyką (20 projektów). Realizacja własnych pomysłów i współpraca z innymi badaczami, w tym doktorantami, zaowocowała licznymi publikacjami oryginalnymi i przeglądowymi (31 publikacji) oraz prezentacjami podczas konferencji naukowych. Mam również bogate doświadczenie dydaktyczne: prowadzę zajęcia dla studentów studiów licencjackich i magisterskich. Byłam promotorem 26 studentów i promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich. Aktywnie popularyzuję naukę, jako uczestnik i organizator różnych wydarzeń na Wydziale Biologii. Pracuję również na rzecz Wydziału Biologii, jako członek Rady Wydziału, Rady Instytutu i komisji Rady Wydziału (Komisja ds. studenckich i toku studiów, Komisja ds. nagród naukowych i dydaktycznych).

Szczegółowe informacje dotyczące moich osiągnięć naukowych znajdują się w Załączniku 4.

Plany naukowe:

1. Zbadanie roli czynnika Pax7 w dojrzewaniu włókien mięśniowych.
 - Rola Pax7 w tworzeniu i organizacji połączeń nerwowo-mięśniowych
 - Rola Pax7 w regulacji rozwoju błony podstawnej z włókna mięśniowego.
 - Rola Pax7 w chorobach nerwowo-mięśniowych
2. Zbadanie, czy brak Pax7 wpływa na zróżnicowanie komórek macierzystych uzyskanych innymi metodami niż uzyskanie linii zarodkowych komórek macierzystych, w tym ludzkich iPSC.
3. Kontynuacja współpracy i badań nad wspomaganie regeneracji mięśni szkieletowych

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Prof. Marii Annie Ciemerych - Litwinienko, dr Edycie Brzósce - Wójtowicz, mgr Anicie Florkowskiej, dr Arecie Czerwińskiej, dr Joannie Bem, Katarzynie Jańczyk-Ilach oraz mgr Władysławie Stremińskiej.

Chciałbym również podziękować: Profesorowi Jerzemu Moraczewskiemu, Profesorowi Jerzemu Kawiakowi, Profesorowi Zygmuntowi Pojdzie, dr Eugeniuszowi Machajowi, dr Karolinie Archackiej, dr Małgorzacie Zimowskiej - Wypych, dr Grażynie Hoser i wszystkim studentom, z którymi pracowałam.

VI. Bibliografia

- Abujarour R, Bennett M, Valamehr B, Lee TT, Robinson M, Robbins D, Le T, Lai K, Flynn P (2014). Myogenic differentiation of muscular dystrophy-specific induced pluripotent stem cells for use in drug discovery. *Stem Cells Transl Med* 3, 149-160.
- Anderson JE (1991). Dystrophic changes in mdx muscle regenerating from denervation and devascularization. *Muscle Nerve* 14, 268-279.
- Archacka K, Denkis A, Brzoska E, Swierczek B, Tarczyłuk 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.
- Archacka K, Moraczewski J, Grabowska I (2010). Udział niemięśniowych komórek macierzystych w regeneracji mięśni szkieletowych. *Postępy Biologii Komórki* 37, 187-207.
- Armour C, Garson K, McBurney MW (1999). Cell-cell interaction modulates myoD-induced skeletal myogenesis of pluripotent P19 cells in vitro. *Exp Cell Res* 251, 79-91.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204, 1057-1069.
- Barberi T, Bradbury M, Dincer Z, Panagiotakos G, Socci ND, Studer L (2007). Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 13, 642-648.
- Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2, e161.
- Barbieri G, De Angelis L, Feo S, Cossu G, Giallongo A (1990). Differential expression of muscle-specific enolase in embryonic and fetal myogenic cells during mouse development. *Differentiation* 45, 179-184.
- Basch RS, Quito FL, Beh J, Hirst JA (1997). Growth of human hematopoietic cells in immunodeficient mice conditioned with cyclophosphamide and busulfan. *Stem Cells* 15, 314-323.
- Bassaglia Y, Gautron J (1995). Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J Muscle Res Cell Motil* 16, 420-429.
- Bedada FB, Braun T (2008). Partial induction of the myogenic program in noncommitted adult stem cells. *Cells Tissues Organs* 188, 189-201.
- Bem J, Grabowska I (2013). [The alchemy--epigenetic regulation of pluripotency]. *Postępy Biochem* 59, 144-156.
- Benoit PW, Belt WD (1970). Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat* 107, 547-556.
- Berkes CA, Tapscott SJ (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16, 585-595.
- Bhagavati S, Xu W (2005). Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 644-649.
- Biressi S, Tagliafico E, Lamorte G, Monteverde S, Tenedini E, Roncaglia E, Ferrari S, Ferrari S, Cusella-De Angelis MG, Tajbakhsh S, *et al.* (2007). Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells. *Dev Biol* 304, 633-651.
- Bloch-Gallego E (2015). Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cell Mol Life Sci* 72, 1029-1043.

- Bober E, Franz T, Arnold HH, Gruss P, Tremblay P (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 120, 603-612.
- Borchin B, Chen J, Barberi T (2013). Derivation and FACS-mediated purification of PAX3+/PAX7+ skeletal muscle precursors from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 1, 620-631.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527-530.
- 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.
- 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.
- Buckingham M, Relaix F (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 645-673.
- Buzanska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J, Domanska-Janik K (2005). Human cord blood-derived neural stem cell line--possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro* 19, 991-999.
- Buzanska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domanska-Janik K (2006). Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 15, 391-406.
- Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 115, 2131-2138.
- Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9, 1520-1527.
- Capers CR (1960). Multinucleation of skeletal muscle in vitro. *J Biophys Biochem Cytol* 7, 559-566.
- Caplan AI (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217, 318-324.
- Carlson BM, Gutmann E (1975). Regeneration in grafts of normal and denervated rat muscles. Contractile properties. *Pflugers Arch* 353, 215-225.
- Carvalho MM, Teixeira FG, Reis RL, Sousa N, Salgado AJ (2011). Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 6, 221-228.
- Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, *et al.* (2015). Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol* 33, 962-969.
- Chan J, O'Donoghue K, Gavina M, Torrente Y, Kennea N, Mehmet H, Stewart H, Watt DJ, Morgan JE, Fisk NM (2006). Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells* 24, 1879-1891.
- Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, *et al.* (2009). Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *Faseb J* 23, 1907-1919.
- Charge SB, Rudnicki MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84, 209-238.

- Chi N, Epstein JA (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18, 41-47.
- Ciemerych MA, Archacka K, Grabowska I, Przewozniak M (2011). Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. *Results Probl Cell Differ* 53, 473-527.
- Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, Morgan JE, Zammit PS (2009). Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS One* 4, e4475.
- Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122, 289-301.
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W (1977). Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267, 364-366.
- Constantinides PG, Taylor SM, Jones PA (1978). Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides. *Dev Biol* 66, 57-71.
- Couteaux R, Mira JC, d'Albis A (1988). Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. *Biol Cell* 62, 171-182.
- Czerwinska AM, Grabowska I, Archacka K, Bem J, Swierczek B, Helinska A, Streminska W, Fogtman A, Iwanicka-Nowicka R, Koblowska M, *et al.* (2016a). Myogenic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells That Lack a Functional Pax7 Gene. *Stem Cells Dev* 25, 285-300.
- Czerwinska AM, Nowacka J, Aszer M, Gawrzak S, Archacka K, Fogtman A, Iwanicka-Nowicka R, Janczyk-Ilach K, Koblowska M, Ciemerych MA, *et al.* (2016b). Cell cycle regulation of embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts lacking functional Pax7. *Cell Cycle* 15, 2931-2942.
- Czerwinska AM, Streminska W, Ciemerych MA, Grabowska I (2012). Mouse gastrocnemius muscle regeneration after mechanical or cardiotoxin injury. *Folia Histochem Cytobiol* 50, 144-153.
- d'Albis A, Couteaux R, Janmot C, Mira JC (1989). Myosin isoform transitions in regeneration of fast and slow muscles during postnatal development of the rat. *Dev Biol* 135, 320-325.
- Darabi R, Baik J, Clee M, Kyba M, Tupler R, Perlingeiro RC (2009). Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp Neurol* 220, 212-216.
- Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, Kamath S, Osawa M, Kamm KE, Kyba M, Perlingeiro RC (2008). Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 14, 134-143.
- Darabi R, Pan W, Bosnakovski D, Baik J, Kyba M, Perlingeiro RC (2011a). Functional myogenic engraftment from mouse iPS cells. *Stem Cell Rev* 7, 948-957.
- Darabi R, Perlingeiro RC (2008). Lineage-specific reprogramming as a strategy for cell therapy. *Cell Cycle* 7, 1732-1737.
- Darabi R, Santos FN, Filareto A, Pan W, Koene R, Rudnicki MA, Kyba M, Perlingeiro RC (2011b). Assessment of the myogenic stem cell compartment following transplantation of pax3/pax7-induced embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 29, 777-790.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.

- De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, *et al.* (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 25, 100-106.
- de la Garza-Rodea AS, van der Velde I, Boersma H, Goncalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, Knaan-Shanzer S (2010). Long-Term Contribution of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells to Skeletal Muscle Regeneration in Mice. *Cell Transplant*.
- Dekel I, Magal Y, Pearson-White S, Emerson CP, Shani M (1992). Conditional conversion of ES cells to skeletal muscle by an exogenous MyoD1 gene. *New Biol* 4, 217-224.
- Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, *et al.* (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9, 255-267.
- Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG (2012). IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol* 189, 3669-3680.
- Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 119, 2945-2952.
- Dixon FJ, Moore RA (1952). Tumors of the testicle. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 8, 310-315.
- Dulak J (2017). Many roles for Pax7. *Cell Cycle* 16, 21-22.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242.
- Fakhfakh R, Michaud A, Tremblay JP (2011). Blocking the myostatin signal with a dominant negative receptor improves the success of human myoblast transplantation in dystrophic mice. *Mol Ther* 19, 204-210.
- Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M (1996). Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* 19, 853-860.
- Fink E, Fortin D, Serrurier B, Ventura-Clapier R, Bigard AX (2003). Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. *J Muscle Res Cell Motil* 24, 421-429.
- Fletcher JE, Hubert M, Wieland SJ, Gong QH, Jiang MS (1996). Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon* 34, 1301-1311.
- Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H (2004). Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 22, 617-624.
- Gayraud-Morel B, Chretien F, Tajbakhsh S (2009). Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med* 4, 293-319.
- Gianakopoulos PJ, Mehta V, Voronova A, Cao Y, Yao Z, Coutu J, Wang X, Waddington MS, Tapscott SJ, Skerjanc IS (2011). MyoD directly up-regulates premyogenic mesoderm factors during induction of skeletal myogenesis in stem cells. *J Biol Chem* 286, 2517-2525.
- Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA (2001). Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 581-588.
- Goudenege S, Lebel C, Huot NB, Dufour C, Fujii I, Gekas J, Rousseau J, Tremblay JP (2012). Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *Mol Ther* 20, 2153-2167.
- Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120, 957-971.

- Grabowska I, Archacka K, Czerwinska AM, Krupa M, Ciemerych MA (2012a). Mouse and human pluripotent stem cells and the means of their myogenic differentiation. *Results Probl Cell Differ* 55, 321-356.
- Grabowska I, Brzoska E, Gawrysiak A, Streminska W, Moraczewski J, Polanski Z, Hoser G, Kawiak J, Machaj EK, Pojda Z, *et al.* (2012b). Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell Transplant* 21, 1711-1726.
- 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.
- 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.
- Guerette B, Asselin I, Skuk D, Entman M, Tremblay JP (1997). Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant* 6, 101-107.
- Guerette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP (1994). Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant Proc* 26, 3461-3462.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
- Harris JB (2003). Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 42, 933-945.
- Helinska A, Krupa M, Archacka K, Czerwinska AM, Streminska W, Janczyk-Ilach K, Ciemerych MA, Grabowska I (2017). Myogenic potential of mouse embryonic stem cells lacking functional Pax7 tested in vitro by 5-azacitidine treatment and in vivo in regenerating skeletal muscle. *Eur J Cell Biol* 96, 47-60.
- Hipp J, Atala A (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 4, 3-11.
- Huard J, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G (1994). Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum Gene Ther* 5, 949-958.
- Jostes B, Walther C, Gruss P (1990). The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* 33, 27-37.
- Kamochi H, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Ueda Y, Masuda C, Takada E, Watanabe K, Sakakibara M, Natuki Y, Kimura K, *et al.* (2006). Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with IGFII gene in a mouse model of muscle injury. *Transplantation* 82, 516-526.
- Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 19, 1426-1431.
- Kennedy KA, Porter T, Mehta V, Ryan SD, Price F, Peshdary V, Karamboulas C, Savage J, Drysdale TA, Li SC, *et al.* (2009). Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol* 7, 67.
- Kim JS, Lee HK, Kim MR, Kim PK, Kim CW (2008). Differentially expressed proteins of mesenchymal stem cells derived from human cord blood (hUCB) during osteogenic differentiation. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 2309-2317.

- Konieczny SF, Emerson CP, Jr. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* 38, 791-800.
- Kowalski K, Archacki R, Archacka K, Streminska W, Paciorek A, Golabek M, Ciemerych MA, Brzoska E (2016). Stromal derived factor-1 and granulocyte-colony stimulating factor treatment improves regeneration of Pax7^{-/-} mice skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7, 483-496.
- Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 172, 103-113.
- Kumar D, Shadrach JL, Wagers AJ, Lassar AB (2009). Id3 is a direct transcriptional target of Pax7 in quiescent satellite cells. *Mol Biol Cell* 20, 3170-3177.
- LaBarge MA, Blau HM (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589-601.
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, *et al.* (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25, 1015-1024.
- Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA (2007). PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 73, 1-14.
- Launay T, Noirez P, Butler-Browne G, Agbulut O (2006). Expression of slow myosin heavy chain during muscle regeneration is not always dependent on muscle innervation and calcineurin phosphatase activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R1508-1514.
- Lee JH, Kosinski PA, Kemp DM (2005). Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res* 307, 174-182.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669-1675.
- Lefaucheur JP, Sebillé A (1995). The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord* 5, 501-509.
- Lepper C, Conway SJ, Fan CM (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 460, 627-631.
- Lin RZ, Dreyzin A, Aamodt K, Dudley AC, Melero-Martin JM (2010). Functional endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood. *Cell Transplant*.
- Liu J, Saul D, Boker KO, Ernst J, Lehman W, Schilling AF (2018). *Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration*. *Biomed Res Int* 2018, 1984879.
- Lu BD, Allen DL, Leinwand LA, Lyons GE (1999). Spatial and temporal changes in myosin heavy chain gene expression in skeletal muscle development. *Dev Biol* 216, 312-326.
- Lyons GE, Ontell M, Cox R, Sassoon D, Buckingham M (1990). The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J Cell Biol* 111, 1465-1476.
- Maffioletti SM, Gerli MF, Ragazzi M, Dastidar S, Benedetti S, Loperfido M, VandenDriessche T, Chuah MK, Tedesco FS (2015). Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPS cells. *Nat Protoc* 10, 941-958.

- Magli A, Incitti T, Kiley J, Swanson SA, Darabi R, Rinaldi F, Selvaraj S, Yamamoto A, Tolar J, Yuan C, *et al.* (2017). PAX7 Targets, CD54, Integrin alpha9beta1, and SDC2, Allow Isolation of Human ESC/iPSC-Derived Myogenic Progenitors. *Cell Rep* 19, 2867-2877.
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice. *Development* 122, 831-838.
- Markert CD, Atala A, Cann JK, Christ G, Furth M, Ambrosio F, Childers MK (2009). Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Pm R* 1, 547-559.
- Mauro A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493-495.
- McCarthy JJ, Esser KA, Andrade FH (2007). MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C451-457.
- McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, Kambadur R (2008). Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res* 314, 317-329.
- McKinnell IW, Ishibashi J, Le Grand F, Punch VG, Addicks GC, Greenblatt JF, Dilworth FJ, Rudnicki MA (2008). Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat Cell Biol* 10, 77-84.
- Messina G, Biressi S, Monteverde S, Magli A, Cassano M, Perani L, Roncaglia E, Tagliafico E, Starnes L, Campbell CE, *et al.* (2010). Nfix regulates fetal-specific transcription in developing skeletal muscle. *Cell* 140, 554-566.
- Moncaut N, Rigby PW, Carvajal JJ (2013). Dial M(RF) for myogenesis. *Febs J* 280, 3980-3990.
- Morosetti R, Gidaro T, Broccolini A, Gliubizzi C, Sancricca C, Tonali PA, Ricci E, Mirabella M (2010). Mesoangioblasts from Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy display in vivo a variable myogenic ability predictable by their in vitro behavior. *Cell Transplant*.
- Musch T, Oz Y, Lyko F, Breiling A (2010). Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PLoS One* 5, e10726.
- Olguin HC, Olwin BB (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* 275, 375-388.
- Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, Olwin BB (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* 177, 769-779.
- Oustanina S, Hause G, Braun T (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *Embo J* 23, 3430-3439.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.
- Pinney DF, Emerson CP, Jr. (1989). 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect* 80, 221-227.
- Podkalicka P, Mucha O, Dulak J, Loboda A (2019). Targeting angiogenesis in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* 76, 1507-1528.
- Przewoźniak M, Brzóška E (2008). Białka Pax w różnicowaniu komórek i organogenezie. *Postepy Biologii Komórki* 35, 227-240.

- Reimann J, Brimah K, Schroder R, Wernig A, Beauchamp JR, Partridge TA (2004). Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. *Cell Tissue Res* 315, 233-242.
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 172, 91-102.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948-953.
- Renz JF, Lin Z, de Roos M, Dalal AA, Ascher NL (1996). SCID mouse as a model for transplantation studies. *J Surg Res* 65, 34-41.
- Robson EJ, He SJ, Eccles MR (2006). A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 6, 52-62.
- Rohwedel J, Guan K, Wobus AM (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165, 190-202.
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164, 87-101.
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21, 105-110.
- Roszer T (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015, 816460.
- Rousseau J, Dumont N, Lebel C, Quenneville SP, Cote CH, Frenette J, Tremblay JP (2010). Dystrophin expression following the transplantation of normal muscle precursor cells protects mdx muscle from contraction-induced damage. *Cell Transplant* 19, 589-596.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.
- Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, Cossu G, Serafini M, Sampaolesi M, Tagliafico E, *et al.* (2016). No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. *Stem Cell Reports* 6, 897-913.
- Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B (2013). Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *Febs J* 280, 4118-4130.
- Sakurai H, Okawa Y, Inami Y, Nishio N, Isobe K (2008). Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells* 26, 1865-1873.
- Sasaki T, Matsuoka H, Saito M (2008). Generation of a multi-layer muscle fiber sheet from mouse ES cells by the spermine action at specific timing and concentration. *Differentiation* 76, 1023-1030.
- Scharner J, Zammit PS (2011). The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet Muscle* 1, 28.
- Scheper W, Copray S (2009). The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Rev* 5, 204-223.

- Schulze M, Belema-Bedada F, Technau A, Braun T (2005). Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. *Genes Dev* 19, 1787-1798.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777-786.
- Shani M, Faerman A, Emerson CP, Pearson-White S, Dekel I, Magal Y (1992). The consequences of a constitutive expression of MyoD1 in ES cells and mouse embryos. *Symp Soc Exp Biol* 46, 19-36.
- Shelton M, Metz J, Liu J, Carpenedo RL, Demers SP, Stanford WL, Skerjanc IS (2014). Derivation and expansion of PAX7-positive muscle progenitors from human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 516-529.
- Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL, Wagers AJ (2004). Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 22, 1292-1304.
- Shi D, Reinecke H, Murry CE, Torok-Storb B (2004). Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 104, 290-294.
- Shoji E, Woltjen K, Sakurai H (2016). Directed Myogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol* 1353, 89-99.
- Skuk D, Paradis M, Goulet M, Chapdelaine P, Rothstein DM, Tremblay JP (2010). Intramuscular transplantation of human postnatal myoblasts generates functional donor-derived satellite cells. *Mol Ther* 18, 1689-1697.
- Skuk D, Roy B, Goulet M, Tremblay JP (1999). Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol* 155, 22-30.
- Swierczek B, Ciemerych MA, Archacka K (2015). From pluripotency to myogenesis: a multistep process in the dish. *J Muscle Res Cell Motil* 36, 363-375.
- Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89, 127-138.
- Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, *et al.* (2013). Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One* 8, e61540.
- Taylor SM, Jones PA (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17, 771-779.
- Tian C, Lu Y, Gilbert R, Karpati G (2008). Differentiation of murine embryonic stem cells in skeletal muscles of mice. *Cell Transplant* 17, 325-335.
- Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, Tonlorenzi R, Porretti L, Gavina M, Mamchaoui K, *et al.* (2004). Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 114, 182-195.
- Tremblay P, Dietrich S, Mericskay M, Schubert FR, Li Z, Paulin D (1998). A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. *Dev Biol* 203, 49-61.
- Vignaud A, Hourde C, Torres S, Caruelle JP, Martelly I, Keller A, Ferry A (2005). Functional, cellular and molecular aspects of skeletal muscle recovery after injury induced by snake venom from *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon* 45, 789-801.

- Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18, 482-496.
- Vracko R, Benditt EP (1972). Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. *J Cell Biol* 55, 406-419.
- Wang Q, Fang WH, Krupinski J, Kumar S, Slevin M, Kumar P (2008). Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med* 12, 2281-2294.
- Watanabe S, Hirai H, Asakura Y, Tastad C, Verma M, Keller C, Dutton JR, Asakura A (2011). MyoD gene suppression by Oct4 is required for reprogramming in myoblasts to produce induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29, 505-516.
- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5434-5438.
- Williams BA, Ordahl CP (1994). Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* 120, 785-796.
- Wobus AM, Boheler KR (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85, 635-678.
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166, 347-357.
- Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 119, 1824-1832.
- Zhang C, Li Y, Wu Y, Wang L, Wang X, Du J (2013). Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J Biol Chem* 288, 1489-1499.
- Zheng JK, Wang Y, Karandikar A, Wang Q, Gai H, Liu AL, Peng C, Sheng HZ (2006). Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells. *Cell Res* 16, 713-722.