

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Krzysztof Kobielał

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1999 - Doktor nauk medycznych, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Tytuł rozprawy: „Badania Molekularne DNA w Zespole Christ-Siemens-Touraine.” Promotor pracy: Profesor Wiesław Henryk Trzeciak

1996 - Lekarz medycyny, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkiewicza w Poznaniu

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- | | |
|-------------------|---|
| 11/2015 - obecnie | Kierownik Laboratorium Komórek Macierzystych, Rozwoju i Regeneracji Tkank, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, Polska |
| 2007 - 2015 | Kierownik Laboratorium / Assistant Professor, Department of Pathology, The Eli and Edythe Broad Center for Regenerative Medicine & Stem Cell Research, Keck School of Medicine, the University of Southern California (USC), Los Angeles, USA |
| 2002 – 2007 | Staż Podoktorancki / Postdoctoral Associate, Howard Hughes Medical Institute, Laboratory of Mammalian Cell Biology and Development, The Rockefeller University (RU), New York, USA |
| 2000 – 2002 | Staż Podoktorancki / Postdoctoral Associate, Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular Genetics & Cell Biology, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA |
| 2000 – 2001 | Adiunkt, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska |
| 1997 – 2000 | Asystent, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny K. Marcinkowskiego w Poznaniu |
| 1995-1997 | Asystent Naukowy, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny K. Marcinkowskiego w Poznaniu |

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

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

„Rola ścieżki sygnałowej BMP oraz jej wpływ na ścieżkę WNT w regulacji komórek macierzystych i komórek prekursorowych mieszkających włosowego”.

4.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

1. **Kobielał K[#]**, Pasolli HA, Alonso L, Polak L, Fuchs E. Defining BMP function in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor-1A. **J Cell Biol** 163:609-623, 2003, article awarded with the journal cover, (U.S. Patent Application No.: US 2012/0034616 A1, Pub. Date: Feb. 9, 2012) **IF: 12,02 Times Cited: 173**
2. **Kobielał K[#]**, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. **PNAS** 104:10063-10068, 2007, **IF: 9,59 Times Cited: 190**
3. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, Widelitz R, Chuong CM, **Kobielał K.*** Competitive balance of Intrabulge BMP/WNT signaling reveals a robust gene network ruling stem cell homeostasis and cyclic activation. **Proc Natl Acad Sci USA** 110(4):1351-6, 2013. **(Faculty of 1000 Recommendation)**, (US Patent Application No.:US 2015/0033371 A1, Pub. Date: Jan. 29, 2015) **IF: 9,80 cytowania: 85**
4. Kandyba E, Hazen V, Kobielał A, Butler J.S, **Kobielał K.*** Smad1&5 but not Smad8 establish stem cell quiescence which is critical to transform the premature hair follicle during morphogenesis towards the postnatal state. **Stem Cells**. 32(2):534-47, 2014 , **IF: 7.13 cytowania: 15**
5. Kandyba E, **Kobielał K.*** Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. **Stem Cells**. 32(4):886-901, 2014. **(Faculty of 1000 Recommendation)**, **IF: 7.13 cytowania: 27**
6. **Kobielał K.****, Kandyba E, Leung Y. "Skin and Skin Appendages Regeneration" in **Translational Regenerative Medicine**, Academic Press, **22 Rozdział Książki**. Editor(s): Atala A, Allickson JG., pages:269-292, 2015, rozdział książki/artkuł przeglądowy *napisany na zaproszenie*, Elsevier Publications **IF: niedostępny cytowania: niedostępne**

pierwszy autor; * autor korespondencyjny

Sumaryczny IF dla prac wchodzących w skład osiągnięcia: **45.67**

Sumaryczna liczba cytowań prac wchodzących w skład osiągnięcia: **490**

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5 (Oświadczenia współautorów).

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

A. Wstęp

Podczas rozwoju embrionalnego warstwa multipotencjalnych komórek macierzystych daje początek i jest odpowiedzialna za powstanie naskórka i przydatków skóry, w tym mieszków włosowych. Morfogenezę mieszków włosowych wynika z serii wzajemnych oddziaływań nabłonkowo-mezenchymalnych, zapoczątkowujących wgłębienie nabłonka, który następnie namnaża się i różnicuje, tworząc najpierw kanał lub wewnętrzną pochewkę włosa (ang. inner root sheath, IRS), a następnie łodygę włosa (1, 2). Po urodzeniu dojrzała łodyga włosa (ang. hair shaft, HS) składa się z rdzenia (ang. medulla), otoczonego koncentrycznym pierścieniem komórek korowych (ang. cortical cells), które z kolei na powierzchni włosa są otoczone warstwą powłoczki (ang. hair shaft cuticle). Pod powierzchnią skóry łodyga włosa jest otoczona przez wewnętrzną pochewkę włosa (ang. inner root sheath, IRS), która składa się przesuwając się od środka na zewnątrz z osłonki pochewki wewnętrznej, warstw Huxley'a i Henle'a. Komórki osłonki pochewki wewnętrznej łączą się z komórkami powłoczki włosa, ale w pobliżu powierzchni skóry wewnętrzna pochewka włosa degeneruje się, aby uwolnić łodygę włosa na powierzchnię skóry (1). Nad podstawą włosa (cebulką włosa), warstwa Henle'a jest otoczona warstwą towarzyszącą (ang. companion layer) i zewnętrzną pochewką włosa (ang. outer root sheath, ORS), strukturą przylegającą i biochemicznie podobną do warstwy podstawowej naskórka.

Komórki macierzyste włosa (ang. hfSC), znajduje się u podstawy stałego, nie podlegającego zmianom cyklicznym odcinka mieszka włosowego zwanej wybrzuszeniem, w warstwie zewnętrznej pochewki włosa (ORS), które w czasie cyklu włosa proliferują w głąb skóry właściwej i w miarę ich różnicowania dostarczają komórek prekursorowych macierzy włosa (3-5). Komórki prekursorowe macierzy włosa, następnie różnicują w łodygę włosa (HS) i wewnętrzną pochewkę włosa (IRS). Zarówno łodyga włosa (HS), jak i wewnętrzna pochewka włosa tworzą się równocześnie przez końcowe różnicowanie szybko dzielących się komórek prekursorowych macierzy, które otaczają i utrzymują kontakt z brodawką włosa (ang. dermal papilla DP) (5, 6). Kontakt z komórkami brodawki włosa (DP) wydaje się być niezbędny do przekształcenia komórek macierzystych włosa w przejściowo proliferujące komórki prekursorowe macierzy (7, 8). Zatem mieszki włosowe są wysoce zorganizowanymi miniaturowymi organami, które mają wyjątkową zdolność do aktywnego przechodzenia zsynchronizowanych cykli regeneracyjnych w normalnych warunkach fizjologicznych. Cykliczna natura normalnej regeneracji mieszków włosowych jest dobrze zdefiniowana z zsynchronizowanymi cyklami wzrostu (anagen), degeneracji (katagen) i uśpienia (telogen), które są regulowane na poziomie molekularnym poprzez interakcję z centrum sygnalizacji mieszczącym się w brodawce włosa (DP) (9).

Przestrzennie zdefiniowane programy różnicowania włosa sprawiają, że jest to doskonały model do badania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw nabłonkowo-mezenchymalnych interakcji podczas specyfikacji linii komórek macierzystych. W tym procesie zaangażowane jest mnóstwo szlaków transdukcji sygnału (2, 10-12). Sonic hedgehog (Shh) ulega ekspresji w części komórek prekursorowych macierzy i uważa się, że odgrywa rolę w proliferacji włosa (13). Różnicowanie łodygi włosa zależy od sygnalizacji Wnt, a zmiany w tym szlaku generują szereg jej nieprawidłowości (2, 14-19). U myszy z genem reporterowym, TOPGAL dla ścieżki Wnt jest on najbardziej aktywny w różnicujących się komórkach korowych, które wycofały się z cyklu komórkowego (20). Kanoniczna

sygnalizacja przez ścieżkę Wnt prowadzi do stabilizacji β -kateniny, która aktywuje czynniki transkrypcyjne Lef1 / Tcf oddziaływujące z DNA (21). Aby, prekursorowe komórki macierzy włosa odpowiedziały na sygnalizację Wnt (22), muszą one ekspresować Lef1. Ostatnio wykazano, że ekspresja Lef1 w keratynocytach zależy od inhibitora sygnalizacji BMP czynnika Noggin, który jest wydzielany przez komórki brodawki włosa (23, 24). Gdy, komórki prekursorowe macierzy włosa ekspresujące Lef1 reagują na Wnts, aktywują specyficzne dla włosa geny keratyn, które posiadają na DNA w swoich regionach regulatorowych 5' miejsca wiązania Lef1 (25, 26). Chociaż wydaje się, że kompleksy Lef1 / β -kateniny są wymagane do ekspresji genów keratyn włosa, inne czynniki transkrypcyjne, w tym FoxN1 i Hoxc13, mogą być również zaangażowane (27).

Kiedy dołączyłem do laboratorium profesor Elaine Fuchs i rozpocząłem szkolenie podoktoranckie na pierwszy rzut oka, rola hamowania BMP w mieszkach włosowym wydawała się bardzo ważna, ale nie do końca zrozumiana. Trudności w zrozumieniu jak ścieżka BMP reguluje różne warstwy włosa wynikały ze złożonego wzoru jej ekspresji. W tym czasie wiadomo było, że BMP2 i BMP4 ulegały ekspresji w komórkach prekursorowych włosa, BMP4 i BMP7 w brodawce włosa, BMP7 w zewnętrznej pochewce włosa, a BMP7, BMP8a i BMP8b były obecne w wewnętrznej pochewce włosa (28-31). Ponadto postulowano również pozytywną rolę BMP we włosach, gdzie aktywacja BMP wpływa zarówno na proliferację, jak i różnicowanie (32, 33). W dodatku, podczas gdy Noggin (jako antagonistą BMP) miał pozytywny wpływ na ekspresję Lef1, ma negatywny wpływ na warstwę korową włosa, gdzie ektopowa ekspresja Noggin'a zmniejszała ekspresję FoxN1 i Hoxc13 i spowodowała głównie defekty łodygi włosa bez widocznych nieprawidłowości wewnętrznej pochewce włosa (34, 35). Wiedząc, że przesiewanie przez potencjalne funkcje ścieżki BMP we włosie będzie stanowiło poważne wyzwanie, dlatego generowałem to potrzebę stworzenia nowych ujednoczonych systemów modelowych. Tak, aby mogły one odpowiedzieć na pytania dotyczące roli sygnalizacji BMP w rozwoju mieszków włosowych, skupiając się na zarówno na komórkach prekursorowych i komórkach macierzystych włosa. Ponadto jednym z kluczowych pytań bez odpowiedzi w tym czasie było pytanie, jak wyjaśnić, że chociaż ekspresja mRNA Lef1 była najwyższa w proliferujących komórkach prekursorowych macierzy, to jednak występowało niewyjaśnione opóźnienie, zanim pojawiły się oznaki odpowiedzi ścieżki Wnt, z następującą koncentracją Lef1 i β -katenina w jądrze i postęp w kierunku różnicowania włosów (20, 25).

Sygnalizacja przez ścieżkę BMP ma kluczowe znaczenie dla instruowania komórek prekursorowych macierzy do ostatecznego różnicowania się w widoczną strukturę włosów

Aby odpowiedzieć na powyższe pytania i zbadać dalej rolę sygnalizacji BMP w różnicowaniu mieszków włosowych, zdecydowałem się użyć specyficznej tkankowo technologii ablacji genu *in vivo* na modelu mysim. Biorąc pod uwagę potencjalną nadmierność ekspresji ligandów BMP, skupiłem się na receptorze 1A dla ścieżki BMP (BMPRIA), o którym było wiadomo, że ulega ekspresji w mieszkach włosowych (23), i jest wymagany do specyfikacji ektodermy kończyny (36, 37). Poprzez skrzyżowanie myszy, w których ekspresja rekombinazy Cre (38) aktywowana jest przez promotor keratyny 14 (K14) z myszami *Bmpr1a* flox / flox (39), byłem w stanie wyłączyć ekspresję BMPRIA zarówno w komórkach macierzystych zarodkowego nabłonka skóry i we wszystkich komórkach nabłonkowych skóry już w dniu 15.5 rozwoju zarodkowego (E15.5). Większość zwierząt pozbawionych BMPRIA umierała kilka dni po urodzeniu (najprawdopodobniej z powodu ubytków w nabłonku jamy ustnej), ale przeszczepienie skóry z dnia E17.5 umożliwiło jej analizę po urodzeniu. Myszy niosące dwa floxed allele *Bmpr1a* i K14-Cre były mniejszych rozmiarów i wykazywały wyraźnie nieprawidłowe lub całkowity brak włosów (40). W E17.5, mieszki włosowe pozytywne dla BMPRIA

były widoczne w skórze kontrolnej (CON), i aż do 1 dnia pourodzeniu (P1), kontrolne włosy ujawniły komórki BMPRIA-pozytywne we wszystkich stadiach różnicowania. Zauważyłem, że ekspresja BMPR1A była najwyższa w ORS, komórkach prekursorowych macierzy i komórkach przedkorowych włosa, co było zgodne z poprzednimi obserwacjami grupy Botchkarev i in. (41). Dalsze analizy wykazały, że wąsy i włosy nie uformowały się przy całkowitym braku BMPRIA. Histologia mieszków włosowych bez receptora 1A (BMPR1AKO, nokaut, KO) w 2-gim dniu po urodzeniu (P2) wykazała duże nieprawidłowości w jego rozwoju. W tym wieku włosy w kontroli na grzbiecie zaczęły wykazywać dobrze zróżnicowaną strukturę, złożoną z zewnętrznej pochwki włosa (ORS), wewnętrznej pochwki włosa (IRS) i łodygi włosa (HS), przeciwnie w KO zauważyłem, że włosy wykazywały strukturę ORS i opuszkową podstawy włosa, ale brakowało typowych warstw IRS i łodygi włosa (HS) (40). Ogólnie, mieszki włosowe wydawały się niedojrzałe, przypominające te ze skóry zarodkowej w późnym stadium, a nie ze skóry po urodzeniu. W przeciwieństwie do tego, naskórek KO wykazywał normalne różnicowanie końcowe (40). W dniu P4 różnice w mieszkach włosowych były jeszcze bardziej widoczne, włosy bez BMPR1A nadal nie wykazywały żadnej warstwy komórek korowych (Co), komórek poprzecznie prążkowanego rdzenia (Me), ani wewnętrznej pochwki włosa (IRS), podczas, gdy te struktury były dobrze rozwinięte we włosach w kontroli (40).

We wczesnych stadiach normalnego różnicowania końcowego wszystkie warstwy IRS wykazywały granulki trichohaliny (Th), które są większe i bardziej obfite niż w rdzeniu włosa. Przesuwając się stopniowo w górę warstwa Henle'a w warstwie wewnętrznej pochwki włosa staje się wysoce zrogowaciała, budując rząd płaskich, wierzchołkowych komórek. Warstwa towarzysząca (Cp) opiera się na warstwie Henle'a. U podstawy (cebulki) zarówno mieszków włosowych kontrolnych, jak i mieszków włosowych KO, obserwowałem względnie niezróżnicowane komórki prekursorowe macierzy (Mx). Komórki macierzy wykazywała liczne mitozy (Mi), zgodne z jej stanem proliferacyjnym (40). Wreszcie różnice, które zauważyłem w mieszkach włosowych w P2, zostały dalej wyolbrzymione w P4. Na tym etapie rdzeń był dobrze rozwinięty w większości kontrolnych mieszków włosowych, a jego wysoce zorganizowany rząd komórek w centrum mieszka włosowego był wypełniony granulkami trichohaliny (Th) i melaniny (Mel). Natomiast łodyga włosa w P4 w BMPR1AKO składała się głównie z komórek ORS i warstwy towarzyszącej (Cp).

Aby potwierdzić te morfologiczne nieprawidłowości we włosach bez BMPR1A, sprawdziłem ponadto markery biochemiczne specyficzne dla wewnętrznej pochwki włosa (IRS) lub różnicowania łodygi włosa (HS). Wykazałem, że trichohialina (rozpoznawana przez AE15 Ab) specyficzna dla IRS i rdzenia (42) lub specyficzne dla łodygi włosa keratyny dla głównego białka strukturalnego (rozpoznawalnego przez AE13 Ab)(43) były nieobecne we włosach bez BMPR1A (40). Natomiast wykazałem również, że keratyna 5 (K5) specyficzna dla naskórkowej warstwy podstawowej i zewnętrznej pochwki włosa (ORS) normalnego mieszka włosowego (44) i część białek keratyny 6 (K6) specyficznych dla warstwy towarzyszącej (Cp), oddzielającej zewnętrzną i wewnętrzną ostonkę włosa (45) została utrzymana w mieszkach włosowych BMPR1AKO (40).

Aby dokładniej zbadać aberracje w wewnętrznej pochewce włosa (IRS) i różnicowaniu łodygi włosa (HS), zbadałem ekspresję czynników transkrypcyjnych znanych z regulowania tych programów. Czynniki transkrypcyjne GATA-3 odgrywa zasadniczą rolę w różnicowaniu komórek prekursorowych wewnętrznej pochwki włosa (IRS)(46), podczas gdy specyficzne dla łodygi włosa geny keratyn posiadają sekwencje regulatorowe dla czynnika transkrypcyjnego Lef1 (25). GATA-3 był znacznie zmniejszony w mieszkach włosowych BMPR1AKO w stosunku do ich odpowiedników kontrolnych, w przeciwieństwie do tego, mieszki włosowe KO zachowały ekspresję Lef1, potwierdzając hipotezę, że ekspresja Lef1 w keratynocytach skóry może zależeć od hamowania sygnalizacji BMP (23, 24).

Potwierdziłem również status proliferacji komórek mieszków włosowych KO w macierzy włosa, stosując przeciwciała przeciwko Ki67 dla komórek w aktywnym cyklu podziałowym. Dane te, sugerują, że komórki prekursorowe macierzy włosa nie były zatrzymane w rozwoju, ale raczej zdeorganizowane i zablokowane w ich różnicowaniu. W przypadku IRS blok wydawał się być na poziomie ekspresji GATA-3, podczas gdy w przypadku struktur łodygi włosa blok wydawał się przekraczać poziom ekspresji Lef1, ale występował przed aktywacją specyficznych dla włosów genów keratyn regulowanych za pośrednictwem ścieżki WNT (40).

Aby dokładniej zbadać defekty molekularne leżące u podstaw defektów związanych z BMPRIA w różnicowaniu łodygi włosa, przetestowałem wrażliwość komórek prekursorowych macierzy na ścieżkę WNT w skórze BMPR1AKO. Do tych badań wygenerowałem nowe myszy transgeniczne, gdzie efekty warunkowej ablacji dla genu BMPRIA był monitorowany na myszach reporterowych TOPGAL, wrażliwych na aktywację ścieżki WNT, w których TOP promotor kieruje ekspresją β -galaktozydazy. TOPGAL reporter wiernie wyznakowywał komórki przedkorowe i korowe łodygi włosa in vivo, wszędzie tam, gdzie obecne są jądro Lef1 i jądro β -katenina (20). Co ciekawe, w mieszkach włosowych bez BMPR1A barwienie TOPGAL w teście X-gal nie było widoczne (40). Podsumowując, odkrycia te sugerują, że pod nieobecność BMPRIA, komórki prekursorowe macierzy są zdolne do ekspresji Lef1, ale nie reagują na WNTs i dlatego nie aktywują TOPGAL ani endogennych, wrażliwych na WNT genów keratynowych odpowiadających na WNT.

Co więcej, byłem w stanie wykazać, że w skórze kontrolnej aktywność TOPGAL dobrze korelowała z komórkami, które wykazują jądro Lef1, jak również jądro β -kateninę, w przeciwieństwie do skóry BMPRIA-KO, gdzie nawet pomimo ekspresji Lef1, nie wykryto jądro β -kateniny w odpowiadający region rozwijających się mieszków włosowych (40). Odkrycia te sugerują, że wada polegała na braku postępu mieszków włosowych z niedoborem BMPRIA w stabilizacji β -kateniny i aktywacji Lef1. Chociaż WNTs uważane są za odpowiedzialne za sygnalizację na tym etapie (22), w przyszłości będzie interesujące zbadanie dalszego mechanizmu molekularnego, w jaki sposób komórki prekursorowe macierzy są w stanie aktywować kanoniczny szlak WNT ze stabilizacją β -kateniny w obecności BMP sygnalizacji.

Na tym etapie badań udało mi się zbadać to bardziej szczegółowo in vitro, hodując pierwotne keratynocyty izolowane ze skóry kontrolnych i BMPR1AKO myszy. Najpierw sprawdziłem, że utrata BMPRIA była wystarczająca, aby zapobiec sygnalizacji BMP w tych hodowanych keratynocytach, wykazując brak aktywacji fosforylacji czynnika transkrypcyjnego P-Smad1 (47), następnie pokazałem silną jądro ekspresję Lef1, podczas gdy keratynocyty kontrolne wykazały jej brak (40). Zatem wyniki wykazały przekonująco, że działanie pożywki z dodatkiem Noggin'a na ekspresję Lef1 obserwowaną uprzednio w keratynocytach (24), jest pośredniczone przez wpływ na aktywację receptora 1A ścieżki BMP. Zdolność mieszków włosowych BMPR1AKO do ekspresji Lef1 i Wnts, a mimo to nie aktywowania TOPGAL sugerowała blokowanie zdolności tych komórek do reagowania na sygnalizację WNT. Dlatego, aby jeszcze bardziej zbadać tę możliwość, przeprowadziłem badania in vitro przy użyciu dwóch dobrze znanych promotorów reagujących na WNT: TOP, zawierających multimeryzowane miejsca wiązania DNA dla Lef1 (48), i HK1, jeden ze specyficznych promotorów keratyn włosów zawierających funkcjonalne miejsca wiązania dla Lef1 na DNA (25, 26).

Hodowane w normalnych warunkach pożywki, zarówno kontrolne, jak i KO keratynocyty wykazywały bardzo niską aktywację TOPFlash i HK1Flash. W obecności N-końcowo skróconej, wysoce stabilnej β -kateniny ($\Delta N\beta$ -catenin), kontrolne keratynocyty nadal wykazywały minimalną aktywację albo TOPFlash albo HK1Flash. Przeciwnie, komórki BMPR1AKO wykazywały ponad pięciokrotny wzrost aktywacji dla TOPFlash i HK1Flash w odpowiedzi na transfekowaną $\Delta N\beta$ -kateninę. Razem dane te

pokazują, że keratynocyty z ablacją BMPR1A i z brakiem aktywacji Smad ekspymowały Lef1 i można było przywrócić reaktywność genów reporterowych TOPFlash i HK1Flash przez transfekcję konstytutywnie stabilizowaną β -kateniną (40).

Ponieważ myszy pozbawione *Bmpr1a* umierają kilka dni po urodzeniu, aby ocenić długoterminowe konsekwencje braku ekspresji BMPRIA w nabłonku skóry, przeszczepiłem skórę noworodka z myszy kontrolnych i myszy po ablacji genu BMPR1A na grzbiet myszy z obniżoną odpornością (*nu/nu*). W 24-tym tygodniu po przeszczepie włosy były widoczne tylko na przeszczepach kontrolnych, podczas gdy w przeszczepach KO nie było widocznych włosów. Dalsza analiza przeszczepionej skóry potwierdziła te same nieprawidłowości obserwowane wcześniej u myszy KO, mianowicie mieszkom włosowym brakowało łodygi włosa (HS) i wewnętrznej pochewki włosa (IRS). W większości przypadków rozwinęły się struktury przypominające cysty, komórki w cystach wydawały się być mieszaniną komórek prekursorowych macierzy, zewnętrznej pochewki włosa ORS i komórek warstwy towarzyszącej i wykazywały liczne mitozy, odzwierciedlające stan proliferacji, jednak bez znaczników różnicowania dla IRS lub łodygi włosów (HS) (40).

Co zaskakujące, wykazałem, że struktury przypominające mieszki włosowe z przeszczepów skórnych kontynuowały ekspresję mRNA dla *Wnt10b* (40), głównego *Wnt* mieszka włosowego (22). Dlatego w przyszłości interesujące będzie dalsze badanie, dlaczego bez sygnalizacji BMP, komórki prekursorowe macierzy nie są w stanie reagować na sygnalizację *Wnt* i stabilizować poziomu β -kateniny z następującym różnicowaniem do łodygi włosa.

W przypadku braku BMPRIA, mieszki włosowe wydawały się rozwijać, ale ORS nie mógł utrzymać swojej normalnej architektury pod nieobecność IRS i łodygi włosa. Struktury opuszkowe cebulki włosa nadal rosły, ale przeorganizowały się w struktury przypominające torbiel, złożone z komórek prekursorowych macierzy, które zostały zablokowane w końcowym różnicowaniu. Między czasem, w którym Lef1 jest wytwarzany przez komórki prekursorowe macierzy, a czasem, w którym komórki reagują na sygnalizację *Wnt*, występowało opóźnienie. Opóźnienie to jest konieczne, aby umożliwić przejściową amplifikację populacji komórek prekursorowych macierzy przed ich różnicowaniem. To, co pozwala na to opóźnienie, było nieznanne. W tych badaniach dostarczyłem przekonujących dowodów, że opóźnienie wiąże się z istotnym etapem pośrednim, a mianowicie późniejszą aktywacją BMPR1A w celu wygenerowania reaktywności na *Wnt* w komórkach prekursorowych. Zatem komórki prekursorowe, których BMPR1A zostało całkowicie zablokowane, mogą wytwarzać niektóre *Wnts* (jak na przykład *Wnt 10b*) i wytwarzać Lef1, ale nie mogą gromadzić β -kateniny w jądrze i włączać specyficznych dla włosów genów keratyny.

Pokazałem też *in vitro*, że mogę przywrócić ekspresję genów docelowych regulowanych przez *Wnt*, wprowadzając stabilizowaną β -kateninę do keratynocytów. Podsumowując, moje odkrycia dostarczyły przekonujących dowodów na model, w którym mezenchymalny *noggin* blokuje nabłonkowe działanie BMPRIA, co pozwala komórkom prekursorowym macierzy włosa podnieść poziom mRNA Lef1, ale utrzymuje ich niezróżnicowany stan poprzez hamowanie działania BMPRIA. Gdy komórki prekursorowe macierzy są eksponowane na *Noggin*, zaczynają tworzyć BMP4, a także dzielą się i oddalają od źródła *Noggin*. Rezultatem jest aktywacja BMPRIA, która obniża pulę mRNA Lef1, ale teraz powoduje, że komórki reagują na *Wnt*. Ta równowaga przeciwstawnych, ale koniecznych, sekwencyjnych działań *Noggin*'a i BMP definiuje pasmo komórek prekursorowych włosów, które posiadają wystarczająco dużo Lef1 i stabilizowanej β -kateniny, aby aktywować specyficzne dla włosów geny keratyny i generować łodygę włosa. Tak więc, praca ta dostarczyła nowych ważnych informacji i polepszyła nasze zrozumienie, w jaki sposób hamowanie i aktywacja sygnalizacji BMP może współdziałać w kontrolowaniu czasowego wzoru różnicowania organu, w tym

przypadku mieszka włosowego. Pokazała również, w jaki sposób oba te sygnały mogą być połączone z inną istotną ścieżką, szlakiem WNT, w kontrolowaniu różnicowania. W rzeczywistości niektóre aspekty moich odkryć zostały objęte patentem: „Metody modulowania linii komórek macierzystych nabłonka” (patent USA nr: US 2012/0034616 A1) i pojawiły się w wiadomościach *Journal of Cell Biology* oraz na stronach Uniwersytetu Rockefeller’a. Ponadto jedna z moich rycin z tego badania została nagrodzona i pojawiła się na okładce czasopisma *Journal of Cell Biology*. W ramach tych badań zdobyłem również prestiżową nagrodę Ministra Zdrowia za najlepszy artykuł opublikowany w 2003 roku. Po kolejnych latach po opublikowaniu badania inne grupy pracujące w tym obszarze opublikowały podobne badania, w pełni potwierdzające moje odkrycia (49-51).

Sygnalizacja ścieżki BMP jest niezbędna dla utrzymania komórek macierzystych włosa w stanie uśpienia

Moje i innych badania wskazywały na rolę kanonicznej ścieżki BMP w specyfikacji różnicowania mieszków włosowych (40, 49, 50), ale jak sygnalizacja BMP funkcjonuje w komórkach macierzystych włosa (hfSC) pozostawało nieznane w tym czasie. Dlatego, aby odpowiedzieć na to pytanie, zdecydowałem się zastosować strategię warunkowej indukowalnej delekcji genu, aby odkryć rolę sygnalizacji BMP w równoważeniu wyciszenia i aktywacji komórek macierzystych włosa (hfSC) u dorosłych myszy.

W skórze dorosłej poszczególne mieszki włosowe (HF) zawierają rezerwuar komórek macierzystych zlokalizowanych w wyspecjalizowanym regionie, zwanym wybrzuszeniem znajdującym się bezpośrednio pod gruczołami łojowymi u podstawy stałej części mieszka włosowego (HF). Oznaczenie wybrzuszenia jako domniemanej lokalizacji komórek macierzystych włosa (hfSC) zostało ustalone za pomocą eksperymentów wykorzystujących znakowane nukleotydy (5, 7, 52) i ekspresję transgeniczną fluorescencyjnego białka histonowego (3), która wykazała spoczynkowe, wolno dzielące się komórki (ang. label-retaining cells, LRC) specyficznie w obszarze wybrzuszenia (11). W mysich mieszkach włosowych, region wypukłości (ang. bulge) staje się morfologicznie odmienny pod koniec morfogenezy mieszka włosowego podczas pierwszego pourodzeniowego telogenu (około dnia P18), równocześnie z tym, komórki macierzyste włosa także ekspresują dojrzwały marker, CD34 swojej powierzchni (53).

W połączeniu z integryną $\alpha 6$, ekspresję CD34 można stosować jako wiarygodny marker komórek macierzystych włosa (hfSC) do swoistego izolowania podstawowych hfSC ($\alpha 6$ -integryna + / CD34 +) poprzez sortowanie komórek z aktywowaną fluorescencją (FACS) (4, 53, 54) w obrębie wybrzuszenia podczas telogenu pourodzeniowego. Analizy klonalne wykazują, że komórki wybrzuszenia wykazują właściwości samoodnawiających się komórek macierzystych in vitro, a po przeszczepieniu na grzbiet myszy pozbawionych owłosienia (Nude) wytwarzają naskórek, włosy i gruczoły łojowe (4, 54, 55). Aby ocenić, w jaki sposób ablacja Bmpr1a wpływa na pourodzeniową homeostazę hfSC, musiałem ustalić nowy indukowalny system in vivo, krzyżując myszy floxed/floxed BMPR1A (39) z myszami K14-CreTM (38). W tym modelu in vivo, byłem w stanie kontrolować wyłącznie sygnalizację ścieżki BMP u dorosłych myszy po ustaleniu się komórek macierzystych w wybrzuszeniu poprzez miejscowe stosowanie tamoksyfenu (TM) przez 16 dni w okresie pourodzeniowym od dnia P44, tuż po wprowadzeniu mieszków włosowych w rozszerzony drugi telogen.

Myszom Bmpr1a (fl/fl) niosącym transgen K14-CreTM aktywowany TM (cKOTM) włosy nie odrosły, wykazując podobny defekt w końcowym różnicowaniu, jak zaobserwowałem podczas ablacji BMPR1A w czasie morfogenezy skóry i włosów, jednak myszy te były zdolne do życia. Pomimo braku

widocznych włosów, ich mieszki włosowe były w anagenie w dniu P59, przeciwnie, mieszki kontrolne (CONTM) pozostały w telogenie (56). Co ciekawe, po traktowaniu TM zaobserwowałem, że mieszki włosowe cKOTM wykazywały około 10 razy mniej komórek pozytywnych na marker CD34 po sortowaniu za pomocą FACS niż kontrola (CONTM). Ponadto, gdy myszom podawany był BrdU w pierwszym anagenie pourodzeniowym (P23-25), które następnie traktowano TM od dnia 44 do dnia 55 i badano w 5 tygodniu po podaniu BrdU, zauważyłem, że komórki zatrzymujące znacznik (LRC) były powszechne tylko w kontroli (CONTM), ale nie w komórkach cKOTM wybrzuszenia. Aby sprawdzić, czy brak CD34-pozytywnych, wolno dzielących się komórek (LRC) w wybrzuszeniu po inaktywacji sygnalizacji BMP może być odzwierciedleniem aktywacji komórek macierzystych (hfSC), przetestowałem wbudowanie BrdU po jego 4-godzinnym podaniu. Rzeczywiście, w P57 i P59, mieszki włosowe cKOTM wykazywały liczne komórki znakowane BrdU w wybrzuszeniu, podczas gdy CONTM pozostawały w fazie telogenowej (56).

Aby dokładniej ocenić, które właściwości komórek macierzystych zostały utracone po utracie BMPR1A, zbadałem ekspresję czynników transkrypcyjnych Sox9 i Lhx2, które są niezbędne do utrzymania komórek macierzystych włosa (57, 58). Zaobserwowałem, że zarówno w mieszkach włosowych cKOTM, jak i CONTM, Sox9 i Lhx2 były nadal obecne w wybrzuszeniu, jak również w pozytywnych na P-kadheryny załączkach włosów (ang. hair germs), pojawiających się po indukcji anagenu z obszaru wybrzuszenia. Ponadto zaobserwowałem również, że inne geny, Sox4 i Sonic hedgehog (Shh), które normalnie ulegają ko-ekspresji w rozwijającym się załączku włosa, ale nie w wybrzuszeniu, były ekspresjonowane w normalnych włosach (59, 60). Co ciekawe, Sox4 był nietypowo wykrywany zarówno w wybrzuszeniu cKOTM, jak i komórkach potomnych, a pozytywne komórki Shh przeważały w dolnej części mieszka włosowego cKOTM (56). Ponadto, kilka miesięcy po traktowaniu TM, wykryłem, że każdy mieszek włosowy cKOTM wyglądał jak gałąź komórek podobnych do guza składających się głównie z tych samych populacji komórek pozytywnych dla Lhx2, Sox9, Sox4 i Shh. Krawędzie komórek pozytywnych dla P-kadheryny i Shh podobnych do guza pozostawały proliferacyjne wiele miesięcy po ablacji Bmpr1a, a eksperymenty na obecność wolno dzielące się komórek (LRC) nie wykazały śladów retencji BrdU. Ponadto zaobserwowałem, że komórki z tych struktur po zahamowaniu sygnalizacji BMP były zdolne do regeneracji naskórka po jego zeszkobaniu lub usunięciu enzymatycznym, a zatem komórki te nadal były w stanie utrzymać właściwości multipotencjalnych komórek macierzystych in vivo (56). Ponieważ stabilizacja β -kateniny sprzyja przejściu stanu spoczynkowego komórek macierzystych do proliferującego potomstwa pozytywnego na Sox4 (59), dlatego zbadałem obecność jądrowego Lef1 i β -kateniny i wykryłem oba te geny ulegające ekspresji w załączkach włosów w dniu P77 CONTM, ale nie w wypukłości. Natomiast wykryłem, że ekspresja jądrowa Lef1 i β -kateniny występowała nie tylko w przedwczesnych załączkach włosów P59 cKOTM, ale także w wybrzuszeniu, jak również później w P77, markery te były nadal pozytywne w wybrzuszeniu i w obrębie rosnących mas (56). Aby sprawdzić możliwy mechanizm stabilizacji β -kateniny, zbadałem hamowanie kinazy GSK3 β , która fosforyluje β -kateninę powodując jej degradację i obrót (61). Co ciekawe, w mieszkach włosowych P59 i P77 po zahamowaniu sygnalizacji BMP wykryłem, że GSK3 β był fosforylowany w Ser9 (nieaktywny), podobnie jak to miało miejsce w mieszkach włosowych kontrolnym podczas wczesnego przejścia do anagenu. Rzeczywiście, pokazałem, że mieszki włosowe cKOTM na tych etapach posiadały również odpowiednie barwienie dla jądrowej β -kateniny (56).

Gsk3 β -Ser9 jest ustalonym celem dla fosforylacji AKT i ma związek między sygnalizacją BMP a aktywacją PTEN, dlatego przetestowałem, czy PTEN może być zmieniony w komórkach macierzystych włosa (hfSC) z brakiem BMPR1A. W telogenie do przejścia anagenowego, w mieszkach włosowym

kontrolnym w P77, podobnie jak w P21, byłem w stanie wykryć (nieaktywny) fosforylowany PTEN w rozwoju załączków włosowych, ale nie wykryto sygnału w telogenie. Przeciwnie, barwienie anti-PTEN było dobrze widoczne w komórkach macierzystych wybrzuszenia włosa cKOTM i w jego komórkach potomnych (56).

Cele AKT obejmują Ser552 β -kateniny, znak, który ułatwia asocjację z 14-3-3 ζ i translokację jądrową (62). Rzeczywiście zaobserwowałem barwienie anti-14-3-3 ζ w załączkach włosa cKO i mieszkach włosowych kontrolnych, jak również w rozwoju mas podobnych do guzów. Wyniki te potwierdziłem również za pomocą analiz immunoblot, które dodatkowo sugerowały, że bez BMPR1A, PTEN pozostawał nieaktywny promując szlak PI3K / AKT do inaktywacji GSK3 β , co skutkowało stabilizacją β -kateniny (56).

Na koniec poddałem hodowlane KO i kontrolne keratynocyty testom z genem reporterowym TOPFlash, a podczas gdy keratynocyty kontrolne wymagały Wnt3a i Noggin dla optymalnej aktywności TOPFlash, było ono hamowane przez BMP6. W podłożu zawierającym niską procentowość surowicy, TOPFlash był wyższy w KO niż w grupie kontrolnej, a Noggin - głównie w podwyższał kontrolę, ale nie do poziomu obserwowanego w KO, co sugeruje, że niski poziom endogennych BMP częściowo odpowiadał za te różnice. Zauważyłem także różnice w sygnalizacji PI3K, ponieważ Ly294002, chemiczny inhibitor PI3K, znacząco zmniejszył aktywność TOPFlash i zminimalizował różnice między keratynocytami kontrolnymi i KO. Co ciekawe, Wnt3A zwiększył aktywność TOPFlash zarówno w keratynocytach kontrolnych, jak i keratynocytach KO, i nie było to wyraźnie tłumione przez hamowanie PI3K. Podsumowując, aktywność TOPFlash była optymalna, gdy aktywowano sygnalizację WNT i aktywność BMPR1A była hamowana. Ponadto, sygnalizacja WNT i sygnalizacja PI3K były w stanie stabilizować β -kateninę, ale wydawały się to robić równolegle i przynajmniej częściowo niezależnymi szlakami (56). Opublikowałem te wyniki w *PNAS*, zostały one również podkreślone i pojawiły się w wiadomościach tego czasopisma, a także w wiadomościach Uniwersytetu Rockefeller'a.

Molekularny mechanizm sygnalizacji BMP w regulacji komórek macierzystych włosa

Moje badania ujawniły znaczenie równoważenia sygnalizacji ścieżki BMP w regulacji komórek macierzystych włosa (hfSC), ale dokładnie to, w jaki sposób funkcje sygnalizacja BMP na poziomie molekularnym pozostało nieznane. Dlatego, kiedy rozpocząłem samodzielną pracę na stanowisku asystent profesora w Centrum Medycyny Regeneracyjnej i Badań Komórek Macierzystych na Uniwersytecie Południowej Kalifornii w Los Angeles, moje laboratorium skupiło się na zrozumieniu mechanizmu, za pomocą którego sygnalizacja BMP reguluje podstawowy proces homeostaza hfSC.

W tym czasie główną przeszkodą, aby zadać to ważne pytanie w biologii komórek macierzystych była utrata ekspresji CD34, jedyne dostępne markera do izolacji hfSC po zahamowaniu BMP (56). Dlatego, aby zaadresować to wyzwanie, opracowałem nową strategię genetyczną, które pozwoliła nam po raz pierwszy wyizolować, scharakteryzować i hodować komórki macierzyste włosa (hfSC), w których inaktywowano sygnalizację BMP. W tym czasie wiedziałem na podstawie moich wstępnych niepublikowanych danych, że u myszy po indukowanym tkankowo specyficznej ablacji BMPR1A (56), keratyna 15 (K15) była nadal ekspresjonowana w hfSC. W związku z tym postanowiłem wygenerować myszy ze specyficzną inaktywacją sygnalizacji BMP w hfSC przy użyciu rekombinazy regulowanej pod promotorem keratyny 15 (K15) (Cre) sprzężonej ze skróconym receptorem progesteronu (PR) (K15-CrePR) (4). Aby jednocześnie oznaczyć hfSCs in vivo, skrzyżowałem te myszy z linią reporterową myszy YFP (Yellow Fluorescent Protein), zależną od rekombinazy (Cre), włożonej pod wszechobecnie

ekspresjonowany locus Rosa26 (63, 64). Po miejscowym traktowaniu RU486 (RU) myszy K15CrePR / BMPR1A (fl/fl) / ROSA26-stop-YFP, dowolne komórki macierzyste włosa (hfSC), które włączały ekspresję K15-CrePR, również nieodwracalnie włączały ekspresję YFP. RU wykorzystano do wywołania zależnej od Cre rekombinacji u dorosłych myszy w czasie, gdy mieszki włosowe były w drugim rozszerzonym i zsynchronizowanym telogenu po urodzeniu. Przed traktowaniem RU cKO były nie do odróżnienia od zwierząt kontrolnych (CON). Jak oczekiwano w P120 u myszy cKO^{RU} wykazano silny fenotyp ze stratą włosów, co potwierdziło wysoką skuteczność rekombinacji (65). RU stosowano miejscowo na ogoloną skórę grzbietu dorosłych myszy w celu wywołania rekombinacji zależnej od Cre w czasie, gdy mieszki włosowe były w drugim przedłużonym i zsynchronizowanym telogenu po urodzeniu w P43 i były nie do odróżnienia na końcu traktowania RU w P59. Po testach eksperymentalnych, 16 dni stosowania RU na skórze grzbietu było optymalnym czasem, aby skutecznie aktywować ekspresję YFP specyficznie w regionach wybrzuszenia mieszków włosowych cKO^{RU} i CON^{RU}. W P59 po urodzeniu, mieszki włosowe zarówno cKO^{RU}, jak i CON^{RU} nadal wykazywały morfologię telogenu w regionach wybrzuszenia znakowanych YFP, a uśpienie zostało potwierdzone przez inkorporację BrdU (65). Aby wyizolować YFP pozytywne hfSC po zahamowaniu sygnalizacji ścieżki BMP, wykonaliśmy zawiesinę pojedynczych komórek z całej skóry grzbietu z cKO^{RU} lub CON^{RU} w dniu P59, zanim nastąpiły zmiany morfologiczne między CON i cKO. Korzystając z tego podejścia, byliśmy w stanie wyizolować komórki macierzyste włosa oznaczone przez YFP z cKO^{RU} lub CON^{RU} poprzez FACS, a około 1-2% całkowitej populacji komórek izolowanych ze skóry grzbietowej cKO^{RU} lub CON^{RU} było YFP pozytywne i żywe. Następnie podzieliliśmy populacje YFP-dodatnie z cKO^{RU} lub CON^{RU} hfSCs, stosując barwienie α 6-integryną i przeciwciałami CD34 (Ab), jak opisano wcześniej (54) w trzech odrębnych subpopulacjach: YFP + α 6 +; YFP + CD34 + (nadpodstawnej hfSCs) i YFP + α 6 + CD34 + (podstawnej b-hfSC) (65). Chociaż morfologicznie mieszki włosowe pozostawały w fazie telogenowej cyklu włosa, potwierdziliśmy, że po inaktywacji sygnalizacji BMP, ekspresja markera CD34 w hfSC była już obniżona w komórkach cKO^{RU}, w porównaniu z wysokim poziomem w frakcji CON^{RU} YFP + CD34 (65).

Aby scharakteryzować geny docelowe istotne dla sygnalizacji BMP, całkowite RNA z populacji podstawnych komórek macierzystych włosa cKO^{RU} i CON^{RU} (b-hfSCs; YFP + α 6 + CD34 +) zastosowano do przeprowadzenia analizy mikromacierzy (65). Potwierdziliśmy, że gen *Bmpr1a* uległ skutecznej ablacji w populacji cKO^{RU} hfSC poprzez wykrywanie delecji eksonu 2 przez RT-PCR w przesortowanej frakcji YFP dodatniej b-hfSCs. W analizie danych z mikromacierzy, po pierwsze, zapytaliśmy, czy którykolwiek z genów sygnaturowych, zwykle regulowanych w spoczynkowych komórkach macierzystych (3, 54, 59, 66), został zmieniony pomiędzy cKO^{RU} i CON^{RU} hfSC w tym wczesnym momencie po zahamowaniu BMP. Analiza zestawu danych mikromacierzy ujawniła obniżenie poziomu 103 genów (~ 25%) i tylko podwyższoną regulację 16 genów (~ 8%) z 426 sond genów sygnaturowych o podwyższonej ekspresji w komórkach macierzystych włosa po zahamowaniu sygnalizacji BMP. Następnie chcieliśmy określić los cKO^{RU} hfSC po inaktywacji BMPR1A, dlatego sprawdziliśmy zmiany w ekspresji poprzednio opublikowanych genów sygnaturowych załączka włosa w cKO^{RU} hfSC [25]. Odkryliśmy, że cKO^{RU} hfSC uzyskują pewne cechy molekularne przypominające załączek włosa (HG) (32% wcześniej scharakteryzowanych genów sygnaturowych HG było podwyższonych lub obniżonych po zahamowaniu BMP) (65).

Chociaż wcześniej wykazałem, że hamowanie sygnalizacji BMP powodowało stabilizację β -kateniny, a następnie aktywację kanonicznego szlaku WNT w komórkach macierzystych włosa, nie mogłem wykluczyć, że kanoniczna aktywacja szlaku WNT mogła być zależna od receptora i ligandu tej ścieżki (56). Dodatkowo, chociaż postulowano, że kanoniczny szlak Wnt odgrywa istotną rolę w regulacji

hfSC, nie zaproponowano żadnej konkretnej kandydatury liganda (ligandów) i receptora (-ów) WNT, aby odgrywały główną rolę w tym procesie (3, 4, 14, 15, 22, 59, 67).

Dlatego najpierw postanowiłem przeanalizować geny z naszego zestawu danych mikromacierzy, które mogą być zaangażowane zarówno w szlaki BMP, jak i WNT. Odkryłem, że hfSC z zahamowaną sygnalizacją BMP wykazują głęboko zmienioną ekspresję genów w obu szlakach. Te zmiany genów obserwowane w cKO^{RU} b-hfSCs (subpopulacja YFP + $\alpha 6$ + CD34 +) były zgodne ze wzorcami ekspresji genów z innego zestawu danych mikromacierzy, który wygenerowaliśmy przy użyciu całych frakcji YFP pozytywnych hfSC z CON^{RU} i cKO^{RU}. Izolację „żywej” frakcji komórek YFP pozytywnych do porównania mikromacierzy między cKO^{RU} i CON^{RU} przeprowadzono z niezależnych próbek biologicznych w tym samym punkcie czasowym, P59, podczas cyklu włosa (po tym samym schemacie traktowania RU, zaczynając od P43 przez 16 dni). Większość tych zmian genów została potwierdzona przez analizę qPCR przy użyciu niezależnych próbek biologicznych FACS posortowanych YFP + hfSC z CON^{RU} i cKO^{RU}.

Te nowe odkrycia sugerują koncepcję, że stała konkurencyjna i cykliczna aktywacja i inhibicja w hfSC ma kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy komórek macierzystych. Zatem postawiłem hipotezę, że sygnalizacja BMP utrzymuje hfSC w stanie spoczynku przez interakcję z kilkoma szlakami molekularnymi, w tym WNTs. Zasugerowałem ponadto, że każde zdarzenie, które może przechylić równowagę BMP-Wnt, może prowadzić do stochastycznej, ale czasowej aktywacji niektórych komórek macierzystych włosa. Następnie uwolnienie samoodnawiania hfSC może przywrócić równowagę do spokoju w wybrzuszeniu włosa, osiągając w ten sposób cykliczną sieć molekularną.

Tak więc w tym badaniu ujawniliśmy nowy, wcześniej nieodkryty mechanizm regulacji komórek macierzystych włosa z konkurencyjną równowagą sygnalizacji BMP/WNT, która ma miejsce i dzieje się samoistnie w populacji wybruszenia komórek macierzystych, gdzie hamowanie BMP reguluje zależną od ligandu-receptora kanoniczną aktywację Wnt w hfSC. Ponadto byłem w stanie zidentyfikować nowe ligandy Wnt, w tym Wnt7a i Wnt7b, które pośredniczą w tym połączeniu i korelowały z podwyższoną regulacją tylko jednego receptora Wnt, Frizzled 10 (Fzd10). Po raz pierwszy zademonstrowaliśmy, że ekspresja endogennego białka Wnt7a, Wnt7b i receptora Wnt, Fzd10 w komórkach macierzystych w wybrzuszeniu i załączku włosa, potwierdzając, że wszystkie te składniki wzajemnej wymiany informacji są wewnątrznie ekspresjonowane na poziomie białek w tych lokalizacjach podczas aktywacji fizjologicznego cyklu włosów (9, 65).

W celu dalszego zbadania roli sygnalizacji BMP na zachowanie komórek macierzystych włosa skonstruowałem również myszy niosące TRE-BmpR1A-CA-HA (56, 65), transgen regulowany tetracykliną (Dox) kodujący konstytutywnie aktywny i znakowany epitopem receptor 1A dla ścieżki BMP (BMPR1A-CA-HA) (68). Następnie myszy skrzyżowałem tak, aby były podwójnie transgeniczne (dTg) dla TRE-BmpR1A-CA-HA i K14-rtTA, kodując transaktywator indukujący Dox (69).

Nadekspresja TRE-BmpR1A-CA-HA podczas krótkiego telogenu pierwszego cyklu włosów po podaniu Dox wykazała, że ogólna morfologia wybruszenia wydaje się być nienaruszona w mieszkach włosowych dTg, chociaż włosy były utrzymywane w przedłużonej fazie spoczynkowej telogenu. Następnie potwierdziłem, że po aktywacji szlaku BMP in vivo w dTg komórkach macierzystych włosa zwiększona fizjologicznie regulacja ekspresji Wnt7a w dniu P21 została całkowicie zahamowana (65).

Ponadto po raz pierwszy przy użyciu tego nowo stworzonego systemu dTg udało mi się z powodzeniem opracować i zastosować technikę immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) i rozwiązać bardzo trudne pytanie in vivo (nie w hodowanych komórkach) w małej puli komórek macierzystych włosa. Rzeczywiście, potwierdzając bezpośrednią interakcję sygnalizacji BMP przez fosforylowane Smady (P-Smads 1,5,8), z elementem reagującym z BMP (BMPRE) na promotorze WNT7a. Ponadto

potwierdziliśmy funkcjonalną rolę rekombinowanego białka Wnt7a w przedwczesnej aktywacji komórek macierzystych włosa *in vivo* (65).

Następnie, w oparciu o nasz zintegrowany model regulacji hfSC (9, 65), zbadaliśmy rolę Wnt7b, liganda Wnt zidentyfikowanego przez naszą analizę mikromacierzy, która, jak stwierdziłem, jest zwiększona wewnątrznie w hfSC podczas fizjologicznego i przedwczesnego anagenu po inibicji BMP *in vivo*. Dotąd funkcja Wnt7b w cyklach mieszki włosowej i rozwoju włosów nie była badana *in vivo*. Dlatego, po raz pierwszy zajęliśmy się badaniem funkcji Wnt7b przy użyciu warunkowej celowanej ablacji genów (Wnt7b cKO) zarówno w czasie morfogenezy włosów jak i w populacji dorosłych komórek macierzystych włosa (Wnt7b cKO^{RU}). Chociaż niektóre ligandy Wnt zostały scharakteryzowane w czasie inicjacji morfogenezy mieszki włosowej, o wiele mniej wiadomo było, które z ligandów Wnt są wymagane, i czy poszczególne ligandy Wnt działają w komórkach macierzystych w sposób niezbędny podczas pourodzeniowego początku anagen i progresji cyklu włosa. Nasze odkrycia pokazały znaczenie wewnętrznej ekspresji Wnt7b w aktywacji komórek macierzystych i normalnej cykliczności włosa i zaskakująco ujawniło ważną rolę Wnt7b w regulacji długości wzrostu (anagenu) i zwyrodnienia (katagenu) włosa, powodując krótszą produkcję włosów ze zmniejszoną ekspresją markerów ich różnicowania, która nie była kompensowana przez inne ligandy Wnts (9, 70).

Ukierunkowana, postnatalna ablacja Wnt7b specyficznie w populacji pozytywnych dla keratyny 15 komórek macierzystych włosa, spowodowała opóźnienie ich aktywacji, wpływając zarówno na załazek włosa, jak i na komórki macierzyste w wyrzuceniu, zachowując nadal dwuetapową sekwencję ich stymulacji. Co ciekawe, komórki macierzyste bez Wnt7b uczestniczyły w ponownym tworzeniu nowego wyrzucenia komórek macierzystych włosa, ale z wolniejszym samoodnawianiem, zaburzając wejście w anagen w następnym cyklu włosa (70).

Opublikowałem te wyniki w czasopiśmie *PNAS* (65) i *Stem Cells* (70), a obie prace zostały uznane przez międzynarodową społeczność naukową i polecane przez „Faculty of 1000”. Niektóre aspekty moich odkryć były objęte patentem: „Metody regulowania komórek macierzystych włosa” (patent USA nr: US 2015/0033371 A1).

Kanoniczna sygnalizacja ścieżki BMP przez Smad1 i 5, ale nie przez Smad8, ustanawia uśpienie komórek macierzystych, które ma kluczowe znaczenie dla przekształcenia stanu wczesnego mieszki włosowej podczas morfogenezy w kierunku stanu postnatalnego

Nasze wcześniej opublikowane wyniki (40, 56, 65) wykazały, że hamowanie sygnalizacji BMP było niezbędne do promowania aktywacji spoczynkowych komórek macierzystych do proliferacji i komórek prekursorowych macierzy do różnicowania włosów, ale w tym czasie dokładne mechanizmy transdukcji sygnału ścieżki BMP, kontrolujące cykl postnatalny włosa wciąż się rozwijały. Wiedzieliśmy, że interakcje z egzogennymi BMP mogą stymulować szlak kanoniczny przez transbłonowy receptor BMP 1A (BMPR1A) do fosforylacji cytoplazmatycznych Smad1, Smad5 i Smad8 (50, 56), które następnie heterodimeryzują z Smad4. Te ko-kompleksy przemieszczają się do jądra, gdzie transaktywują swoje docelowe geny.

Wiedziałem też, że receptor 1A dla ścieżki BMP jest ekspresjonowany przez komórki macierzyste wyrzucenia włosa (41), gdzie jest aktywowany wyłącznie podczas fazy spoczynku cyklu włosów poprzez kanoniczną sygnalizację BMP (50, 56). Jednakże w naszej wiedzy naukowej istniała luka dotycząca dokładnie tego, w jaki sposób sygnalizacja BMP przekazuje sygnały z receptora BMPR1A i czy kanoniczne lub niekanoniczne szlaki sygnałowe BMP są odpowiedzialne za regulowanie tych procesów biologicznych.

W związku z tym moje laboratorium zaadresowało to pytanie i zbadało funkcjonalną rolę dwóch kanonicznych efektorów sygnalizacji BMP, Smad1 i Smad5 podczas morfogenezy włosów i cyklu postnatalnego w skórze *in vivo*. Nieoczekiwanie, dezaktywacja Smad1 i Smad5 podczas morfogenezy ujawniła wyraźne wzory aktywacji fosforylowanych Smadów (pSmads). pSmad1 i pSmad5 były aktywowane wyłącznie w mieszkach włosowych, podczas gdy pSmad8 był ograniczony do naskórka między mieszkami włosowymi i nie występował w rozwoju mieszków włosowych. Ponadto, podczas morfogenezy, ablacje Smad1 i 5 uniemożliwiały tworzenie się wybrzuszenia (rezewuaru spoczynkowych komórek macierzystych) i całkowicie blokowały różnicowanie komórek prekursorowych macierzy w struktury widocznych włosów (71). Natomiast, gdy te same Smady: Smad1 i Smad5 były usunięte po indukcji już po uformowaniu się wybrzuszenia i spoczynkowych komórek macierzystych w skórze postnatalnej, zaobserwowaliśmy przeciwnie, że pSmad8 nie był już ograniczony do naskórka i był również aktywowany w populacji dorosłych komórek macierzystych i dodatkowo w komórkach prekursorowych macierzy włosa (71). Co ciekawe, chociaż ta postnatalna rearanżacja aktywacji pSmad8 nie zapobiegła przedwczesnej aktywacji komórek macierzystych włosa (anagen), to przywróciła prawidłowe różnicowanie komórek prekursorowych macierzy włosa do widocznych struktur włosów po urodzeniu (71). Tak więc po raz pierwszy wykazaliśmy, że sygnalizacja BMP działa głównie poprzez komponenty szlaku kanonicznego i działa inaczej podczas morfogenezy oraz w skórze dorosłej, powodując różne wyniki fenotypowe. Wykazaliśmy, że sygnalizacja pSmad1 i pSmad5 (ale nie pSmad8) była warunkiem wstępnym dla utworzenia dojrzałej populacji spoczynkowych komórek macierzystych i architektury niszy włosa zarówno przed powstaniem wybrzuszenia i po powstaniu wybrzuszenia. Istotne dojrzewanie komórek macierzystych w wybrzuszeniu przez aktywne kanoniczne przekazywanie sygnału BMP przez pSmad1 i pSmad5 było krytycznym wydarzeniem w rozwoju włosów w celu promowania aktywności pSmad8 w postnatalnych mieszkach włosowych (71).

Rzeczywiście, postnatalna zmiana ekspresji pSmad8 miała istotne konsekwencje dla regulacji różnicowania komórek prekursorowych macierzy włosa, powodując pełne przywrócenie powstawania widocznych włosów. Te odkrycie, zwraca uwagę na nowy nieopisany poprzednio mechanizm ujawniający precyzyjne komponenty sygnalizacyjne w kanonicznym szlaku BMP, które odgrywają kluczową rolę w regulacji komórek macierzystych i różnicowaniu komórek prekursorowych. Wykazaliśmy również, że inny próg kanonicznej sygnalizacji BMP, działający za pośrednictwem pSmad1 i pSmad5, ale nie pSmad8, jest wymagany do utrzymania wyciszenia komórek macierzystych i prawidłowego cyklu włosa. Co więcej, wyniki te mogą potencjalnie podkreślać różne funkcje pSmad1/5 i pSmad8 w regulacji komórek macierzystych, ale bardzo podobne role w różnicowaniu komórek prekursorowych (71).

Do zaprezentowania tych ekscytujących danych z ostatnich trzech publikacji już w trakcie ich opracowywania, byłem zapraszany na kilka prezentacji ustnych na arenie międzynarodowej, począwszy od 2010 r. (na 70 i na 72 dorocznej Konferencji Towarzystwa Dermatologii Stosowanej w Atlancie, USA, 2010 oraz w Karolinie Północnej, USA, 2012). Zaproszono mnie również do wygłoszenia prelekcji na temat tych zaktualizowanych wyników badań na bardzo prestiżowe 60 Sympozjum Montagna na temat biologii skóry (Stevenson, Waszyngton, USA, 2011). Zostałem również zaproszony na ustne prezentacje tych odkryć na 6-tej Międzynarodowej Konferencji Komórek Macierzystych i Sygnalizacji Komórkowej, w Bostonie (USA, Massachusetts, 2013) i 7-mym Światowym Kongresie Badań Włosów w Edynburgu (Szkocja, Wielka Brytania 2013). Początkowo, w ramach tego projektu, zostałem nagrodzony przez Fundację Baxter'a (2009-2010) i Fundację Wright'a

(2009-2010), co pomogło mi rozwinąć moje wyniki do pełnej aplikacji grantu R01 z Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH/NIAMS R01, Bethesda, Maryland, USA), której zostałem laureatem od 2012 do 2017 roku. Obecnie kontynuuję moje badania w Centrum Nowych Technologii na Uniwersytecie Warszawskim, a moje badania są wspierane przez granty Opus i Team odpowiednio z Narodowego Centrum Nauki (NCN) i Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP).

Ostatnie badania odnośnie roli molekularnej ścieżki BMP we włosach zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach: *PNAS* i dwóch kolejnych *Stem Cells* i zostały wyróżnione przez kilka różnych międzynarodowych agencji informacyjnych, w tym Europejskich i Azjatyckich (takich jak: *Stem Cells Translational Medicine*, *Science Daily*, *Weekly Science & Technology Report*, *UK News*, *Red-Orbit-Stem Cells*, *Mirror-UK*, *Medical News Today*, *Standard Digital News*, *Steady Health*, *ReportersTV*, *Stem Cells Freak*, *Hair Loss Cure*, *Stem Cells Therapy*, *Health* and etc.), implikując to dla przyszłej terapii z szerszym potencjałem nie ograniczającym się do tylko do łysienia, regeneracji skóry i raka skóry [9].

B. Podsumowanie

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych prac uważam:

1. Używając warunkową ablację genu u myszy odkryłem, że receptor IA dla ścieżki BMP jest niezbędny dla morfologicznego i biochemicznego różnicowania przejściowo dzielących się komórek prekursorowych macierzy w wewnętrzną pochwę włosy (IRS) i łodygę włosy (HS). W ten sposób wykazałem, że sygnalizacja BMP kontroluje przełączanie komórki prekursorowych macierzy pomiędzy ich proliferacją, a różnicowaniem, co zachodzi we właściwym miejscu i czasie.
2. Pokazałem, że bez aktywacji BMPRIA zasadniczy regulator transkrypcji wewnętrznej pochwki włosy (IRS), GATA-3 jest obniżony, a różnicowanie IRS jest zablokowane.
3. Wykazałem, że u myszy po ablacji BMPRIA zasadniczy regulator transkrypcji ekspresji genów keratyn włosów i tworzenia się łodygi włosy (HS), Lef-1, jest podwyższony w komórkach prekursorowych macierzy, ale różnicowanie włosów jest nadal zablokowane.
4. Odkryłem, że komórki prekursorowe łodygi włosy (HS) bez sygnalizacji BMP nie reagują na sygnalizację Wnt konieczną dla transaktywacji Lef1.
5. In vitro wykazałem, że w hodowanych keratynocytach po ablacji BMPRIA, aktywację transkrypcji za pośrednictwem Wnt można przywrócić przez transfekcję tych keratynocytów konstytutywnie aktywowaną β -kateniną. To umieszcza blok poniżej ekspresji Lef1, ale powyżej stabilizacji β -kateniny i kanonicznej sygnalizacji Wnt w różnicowaniu łodygi włosy.
6. Wykazałem, że kiedy gen *Bmpr1a* jest warunkowo usunięty, normalnie uśpione komórki macierzyste włosy (hfSC) są aktywowane do proliferacji, co spowoduje ich ekspansję i utratę charakterystyki wolno dzielących się komórek. Tak więc sygnalizacja BMP jest niezbędna do utrzymania stanu wyciszenia komórek macierzystych włosy.

7. Odkryłem, że kilka głównych cech charakterystycznych dla komórek macierzystych włosa, a mianowicie ekspresja receptora CD34 i status wolno dzielących się komórek, zostały utracone po usunięciu BMPRIA. Niemniej jednak, pula Sox9, Lhx2, Sox4 i Shh pozytywnych komórek, których ekspresja jest charakterystyczna dla wyciszonych komórek macierzystych wybruszenia włosa i/lub ich wcześniej proliferujących komórek potomnych, uległa rozszerzeniu po zahamowaniu sygnalizacji BMP, a pochodzące z nich komórki prekursorowe nadal nie ulegały ostatecznemu różnicowaniu w celu formowania widocznych włosów.
8. Moje wstępne odkrycia wiązały hamowanie sygnalizacji BMP ze stabilizacją β -kateniny poprzez inaktywację GSK3 β przynajmniej częściowo poprzez szlak obejmujący hamowanie PTEN i aktywację PI3K/AKT. Tak więc, moje odkrycia były zgodne z rolą Akt zarówno w dezaktywacji GSK3 β poprzez fosforylację w Ser9, jak i pośrednio fosforylację β -kateniny w Ser 552, prowadząc do jej wzmocnionego połączenia z 14-3-3 ζ i preferencyjnej lokalizacji jądrowej.
9. Wykazałem podwyższony poziom zarówno Lef1, jak i β -kateniny, które tworzyły dwuczęściowy kompleks transkrypcyjny wymagany do rozpoczęcia cyklu włosa po zahamowaniu sygnalizacji BMP w komórkach macierzystych włosa.
10. Odwrotnie, również pokazałem, że ciągła sygnalizacja BMP w komórkach macierzystych włosa blokuje ich aktywację i promuje przedłużony telogen.
11. Pokazałem, że mieszki włosowe po zahamowaniu sygnalizacji BMP nadal posiadają zdolność do naprawy ran naskórka, co dodatkowo pokazało, że multipotencjalne komórki macierzyste włosa nadal istnieją i przetrwały ablację Bmpr1a. Zatem hamowanie BMPRIA jest niezbędne dla utrzymania proliferującego statusu komórek macierzystych i ich potomstwa w wybruszeniu włosa, a CD34 i charakterystyka wolno dzielących się komórek nie są istotnymi cechami komórek macierzystych włosa.
12. Ponadto ujawniłem nowy, wcześniej nieudokumentowany mechanizm regulacji komórek macierzystych z konkurencyjną równowagą sygnalizacji ścieżek BMP/WNT, która dzieje się wewnątrz populacji komórek macierzystych wybruszenia włosa, gdzie hamowanie BMP reguluje ligandowo-receptorowo zależną aktywację kanonicznej ścieżki WNT w komórkach macierzystych włosa. Zaproponowałem więc hierarchię sygnalizacji ścieżki BMP jako nadrzędnej w stosunku do sygnalizacji ścieżki WNT w regulacji komórkach macierzystych włosa.
13. Odkryłem nowe ligandy Wnt, w tym Wnt7a i Wnt7b, które pośredniczą w tym połączeniu i korelowały one z podwyższoną regulacją jedyne go receptora Wnt, Frizzled 10 (Fzd10). Wykazałem również, że ekspresja endogenne go białka Wnt7a, Wnt7b i receptora Wnt, Fzd10 w komórkach macierzystych wybruszenia i załączka włosa (HG) potwierdzając, że wszystkie te składniki wzajemnie ze sobą oddziałują i są wewnętrznie ekspresjonowane na poziomie białka w komórkach macierzystych wybruszenia / załączka włosa podczas aktywacji fizjologiczne go cyklu włosów.

14. Po raz pierwszy moje laboratorium z powodzeniem opracowało i zastosowało technikę immunoprecypitacji chromatyiny (ChIP) i zaadresowało bardzo trudnym pytaniem *in vivo*, potwierdzając bezpośrednią interakcję sygnalizacji ścieżki BMP poprzez fosforylowane Smady (P-Smads 1,5,8), z elementami reagującymi ze ścieżką BMP (BMPRE) na promotorach genów WNT7a, WNT7b i Id2.
15. Moje odkrycia pokazały znaczenie wewnętrznej ekspresji Wnt7b w aktywacji komórek macierzystych włosa i normalnego cyklu mieszka włosowego, co zaskakująco ujawnia niezbędną rolę Wnt7b w regulacji długości wzrostu (anagenu) i zwyrodnienia włosów (katagenu), powodując krótszą produkcję włosów. A ukierunkowana postnatalna ablacja Wnt7b powodowała opóźnienie aktywacji komórek macierzystych włosa.
16. Wykazałem, że dojrzewanie komórek macierzystych wybruszenia włosa dokonuje się poprzez aktywne kanoniczne przekazywanie sygnału BMP przez pSmad1 i pSmad5 i jest krytycznym wydarzeniem w rozwoju włosów w celu promowania aktywności pSmad8 w postnatalnych mieszkach włosowych.
17. Pokazałem, że sygnalizacja BMP działa głównie poprzez komponenty szlaku kanonicznego i działa inaczej podczas morfogenezy oraz w skórze dorosłych, powodując różne fenotypy *in vivo*. W czasie morfogenezy, ablacja Smad1 i 5 uniemożliwiała tworzenie się rezerwuaru spoczynkowych komórek macierzystych i całkowicie blokowała różnicowanie komórek prekursorowych macierzy w struktury włosa. Podczas, gdy postnatalna rearanżacja aktywacji pSmad8 przywracała prawidłowe różnicowanie komórek prekursorowych macierzy włosa w widoczne włosy, nie miała jednak wpływu na regulację komórek macierzystych włosa.
18. Podsumowując, odkryłem, że sygnalizacja BMP działa jako główny przełącznik, rządzący homeostazą komórek macierzystych, regulujący wspólne geny sygnaturowe między wybruszeniem (hfSC) a załączkiem włosa (HG) podczas cyklicznej aktywacji lub wyciszenia.

W trakcie mojej pracy odkryłem nowe spojrzenie na znaczenie zarówno hamowania, jak i promowania sygnalizacji BMP podczas rozwoju włosa. Moje odkrycia potwierdzają model, w którym działanie nabłonkowe BMPRIA jest najpierw blokowane przez mezenchymalny Noggin, który pozwala wczesnym komórkom prekursorowym włosów na ekspresję mRNA Lef1 i proliferację. Ponieważ komórki prekursorowe macierzy włosa dzielą się i przemieszczają w górę i oddalają od źródła Noggin'a, aktywują BMPRIA, obniżając pulę mRNA Lef1 i nadając komórkom wrażliwość na Wnt. Zatem sekwencyjne hamowanie i aktywacja BMPRIA są niezbędne do zdefiniowania pasma komórek prekursorowych macierzy włosa, które posiadają wystarczającą ilość Lef1 i stabilizowanej β -kateniny, aby aktywować specyficzne dla włosa geny keratyn i generować łodygę włosa i całą strukturę mini organu.

Ponadto wykazałem, że przy braku funkcji BMPRIA pojawia się przedwczesny anagen i chociaż właściwości komórek macierzystych włosa są zaburzone, komórki macierzyste nie są tracone. Zamiast tego, zarówno Lef1, jak i β -katenina są podwyższone w komórek macierzystych, co związane jest z oznakami inaktywacji GSK3 β i PTEN i aktywacją szlaku PI3K/AKT w komórkach macierzystych po usunięciu BMPRIA. Odkrycia te dały mechanistyczne powiązanie dla zbieżności szlaków BMP i Wnt w aktywacji komórek macierzystych włosa.

W istocie, jako mechanizm równoległy (który synergicznie zbiega się z hamowaniem GSK3 β), moje dalsze odkrycie zaproponowało nowy model molekularny, w którym mechanizm wzajemnej interakcji powiązany z hamowaniem sygnalizacji BMP w komórkach macierzystych włosa jest niezbędny do aktywacji dalszych efektorów kanonicznej sygnalizacji WNT w sposób zależny od ligandu. To zaproponowano również hierarchię sygnalizacji BMP jako nadrzędnej w stosunku do sygnalizacji WNT w regulacji komórek macierzystych włosa. Wreszcie ten nowy wewnętrzny mechanizm dodał jeszcze jedną hierarchiczną warstwę regulacji homeostazy komórek macierzystych, oprócz wcześniej proponowanej brodawki włosa i śródskórnej tkanki tłuszczowej, które działają jako zewnętrzne warstwy sygnalizacyjne w pobliżu komórek macierzystych włosa. Dlatego praca ta podkreśla, że wiele warstw hierarchicznych kontroluje aktywność komórek macierzystych. Te odkrycie może stanowić prawdopodobnie wspólnym mechanizm regulacji w wielu innych dorosłych systemach komórek macierzystych. Moje wyniki ujawniają również nieoczekiwane odkrycia, że istnieje wyróżniająca się nienakładająca się funkcja pSmad8 z pSmad1 i pSmad5 w morfogenezie mieszków włosowych, ustanowieniu i utrzymaniu wyciszenia komórek macierzystych w wyrzuceniu włosa, ale funkcja ta jest nakładająca w zróżnicowaniu komórek prekursorowych macierzy włosa u dorosłych.

Podsumowując, wykazałem, że w różnicowaniu komórek prekursorowych macierzy we wszystkie warstwy włosa (IRS i HS), BMP działa synergistycznie, poprzedzając aktywację sygnalizacji WNT. W przeciwieństwie do tego, w regulacji komórek macierzystych włosa, odkryłem, że hamowanie sygnalizacji BMP jest niezbędne do promowania przejścia uśpionych komórek macierzystych włosa do proliferujących komórek załączka włosa. W rzeczywistości sygnalizacja BMP w komórkach macierzystych włosa działa w celu utrzymania niezróżnicowanych komórek multipotencjalnych w stanie spoczynkowym, jednak szlak BMP działa antagonistycznie, tak aby zahamować kanoniczną sygnalizację WNT. Tak więc, ta sama sygnalizacja BMP w tym samym mini narządzie działa inaczej w różnych typach komórek, z jednej strony zachodzi blokowanie różnicowania i utrzymywanie multipotencjalnych komórek macierzystych włosa, z drugiej strony promowanie końcowego różnicowania i blokowanie dalszej proliferacji komórek prekursorowych macierzy włosa.

C. Literatura

(Prace wchodzące w skład osiągnięcia zaznaczono pogrubionym drukiem)

References:

1. Hardy MH. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* 1992;8(2):55-61. PubMed PMID: 1566372.
2. Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol.* 2002;118(2):216-25. PubMed PMID: 11841536.
3. Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004;303(5656):359-63. Epub 2003/12/13. doi: 10.1126/science.1092436 1092436 [pii]. PubMed PMID: 14671312; PMCID: 2405920.
4. Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22(4):411-7. Epub 2004/03/17. doi: 10.1038/nbt950 nbt950 [pii]. PubMed PMID: 15024388.
5. Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990;61(7):1329-37. Epub 1990/06/29. doi: 0092-8674(90)90696-C [pii]. PubMed PMID: 2364430.
6. Oliver RF, Jahoda CA. Dermal-epidermal interactions. *Clin Dermatol.* 1988;6(4):74-82. PubMed PMID: 3063375.
7. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 2000;102(4):451-61. Epub 2000/08/31. doi: S0092-8674(00)00050-7 [pii]. PubMed PMID: 10966107.
8. Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell.* 2001;104(2):233-45. Epub 2001/02/24. doi: S0092-8674(01)00208-2 [pii]. PubMed PMID: 11207364.
9. **Kobiela K., Kandyba E., Leung Y. Skin and Skin Appendages Regeneration. Translational Regenerative Medicine. 2015;Chapter 22:269-92.**
10. Fuchs E, Merrill BJ, Jamora C, DasGupta R. At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell.* 2001;1(1):13-25. Epub 2001/11/13. doi: S1534-5807(01)00022-3 [pii]. PubMed PMID: 11703920.
11. Panteleyev AA, Jahoda CA, Christiano AM. Hair follicle predetermination. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 19):3419-31. Epub 2001/10/30. PubMed PMID: 11682602.
12. Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol.* 2002;12(4):185-92. PubMed PMID: 11978538.
13. Oro AE, Higgins K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev Biol.* 2003;255(2):238-48. Epub 2003/03/22. PubMed PMID: 12648487.
14. Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell.* 1998;95(5):605-14. PubMed PMID: 9845363.
15. Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet.* 1999;21(4):410-3. PubMed PMID: 10192393.
16. Millar SE, Willert K, Salinas PC, Roelink H, Nusse R, Sussman DJ, Barsh GS. WNT signaling in the control of hair growth and structure. *Dev Biol.* 1999;207(1):133-49. PubMed PMID: 10049570.
17. Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell.* 2001;105(4):533-45. PubMed PMID: 11371349.
18. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell.* 2002;2(5):643-53. Epub 2002/05/23. doi: S1534580702001673 [pii]. PubMed PMID: 12015971.
19. Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* 2003;17(10):1189-200. PubMed PMID: 12756224.
20. DasGupta R, Fuchs E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development.* 1999;126(20):4557-68. PubMed PMID: 10498690.
21. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science.* 2002;296(5573):1644-6. Epub 2002/06/01. doi: 10.1126/science.1071549. PubMed PMID: 12040179.
22. Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, Morrisey EE, Millar SE. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev.* 2001;107(1-2):69-82. Epub 2001/08/25.

- doi: S092547730100452X [pii]. PubMed PMID: 11520664.
23. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol.* 1999;1(3):158-64. Epub 1999/11/13. doi: 10.1038/11078. PubMed PMID: 10559902.
 24. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature.* 2003;422(6929):317-22. PubMed PMID: 12646922.
 25. Zhou P, Byrne C, Jacobs J, Fuchs E. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.* 1995;9(6):700-13. Epub 1995/03/15. PubMed PMID: 7537238.
 26. Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.* 2001;15(13):1688-705. PubMed PMID: 11445543.
 27. Prowse DM, Lee D, Weiner L, Jiang N, Magro CM, Baden HP, Brissette JL. Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev Biol.* 1999;212(1):54-67. PubMed PMID: 10419685.
 28. Zhao GQ, Hogan BL. Evidence that mouse Bmp8a (Op2) and Bmp8b are duplicated genes that play a role in spermatogenesis and placental development. *Mech Dev.* 1996;57(2):159-68. PubMed PMID: 8843393.
 29. Takahashi H, Ikeda T. Transcripts for two members of the transforming growth factor-beta superfamily BMP-3 and BMP-7 are expressed in developing rat embryos. *Dev Dyn.* 1996;207(4):439-49. Epub 1996/12/01. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199612)207:4<439::AID-AJA8>3.0.CO;2-I [pii] 10.1002/(SICI)1097-0177(199612)207:4<439::AID-AJA8>3.0.CO;2-I. PubMed PMID: 8950518.
 30. Kratochwil K, Dull M, Farinas I, Galceran J, Grosschedl R. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.* 1996;10(11):1382-94. PubMed PMID: 8647435.
 31. Wilson N, Hynd PI, Powell BC. The role of BMP-2 and BMP-4 in follicle initiation and the murine hair cycle. *Exp Dermatol.* 1999;8(4):367-8. PubMed PMID: 10439283.
 32. Blessing M, Nanney LB, King LE, Jones CM, Hogan BL. Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles. *Genes Dev.* 1993;7(2):204-15. PubMed PMID: 8436293.
 33. Blessing M, Schirmacher P, Kaiser S. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions. *J Cell Biol.* 1996;135(1):227-39. PubMed PMID: 8858176.
 34. Kulesa H, Turk G, Hogan BL. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *Embo J.* 2000;19(24):6664-74. PubMed PMID: 11118201.
 35. Ma L, Liu J, Wu T, Plikus M, Jiang TX, Bi Q, Liu YH, Muller-Rover S, Peters H, Sundberg JP, Maxson R, Maas RL, Chuong CM. 'Cyclic alopecia' in Msx2 mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation. *Development.* 2003;130(2):379-89. PubMed PMID: 12466204.
 36. Ahn K, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR, Crenshaw EB, 3rd. BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development.* 2001;128(22):4449-61. PubMed PMID: 11714671.
 37. Soshnikova N, Zechner D, Huelsken J, Mishina Y, Behringer RR, Taketo MM, Crenshaw EB, 3rd, Birchmeier W. Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev.* 2003;17(16):1963-8. PubMed PMID: 12923052.
 38. Vasioukhin V, Degenstein L, Wise B, Fuchs E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(15):8551-6. PubMed PMID: 10411913.
 39. Mishina Y, Hanks MC, Miura S, Tallquist MD, Behringer RR. Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis.* 2002;32(2):69-72. PubMed PMID: 11857780.
 40. Kobiela K, Pasolli HA, Alonso L, Polak L, Fuchs E. Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J Cell Biol.* 2003;163(3):609-23. Epub 2003/11/12. doi: 10.1083/jcb.200309042 jcb.200309042 [pii]. PubMed PMID: 14610062; PMCID: 2173651.
 41. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Nakamura M, Huber O, Funa K, Lauster R, Paus R, Gilchrist BA. Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *FASEB J.* 2001;15(12):2205-14. Epub 2001/10/20. doi: 10.1096/fj.01-0207com 15/12/2205 [pii]. PubMed PMID: 11641247.
 42. O'Guin WM, Sun TT, Manabe M. Interaction of trichohyalin with intermediate filaments: three

- immunologically defined stages of trichohyalin maturation. *J Invest Dermatol.* 1992;98(1):24-32. PubMed PMID: 1728637.
43. Lynch MH, Oguin WM, Hardy C, Mak L, Sun TT. Acidic and Basic Hair Nail (Hard) Keratins - Their Colocalization in Upper Cortical and Cuticle Cells of the Human-Hair Follicle and Their Relationship to Soft Keratins. *Journal of Cell Biology.* 1986;103(6):2593-606. PubMed PMID: ISI:A1986F459500004.
44. Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development.* 1994;120(9):2369-83. PubMed PMID: 7525178.
45. Winter H, Langbein L, Praetzel S, Jacobs M, Rogers MA, Leigh IM, Tidman N, Schweizer J. A novel human type II cytokeratin, K6hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle. *Journal of Investigative Dermatology.* 1998;111(6):955-62. PubMed PMID: ISI:000077381000007.
46. Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML, Fuchs E. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev.* 2003. PubMed PMID: 12923059.
47. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91. PubMed PMID: 9759503.
48. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science.* 1997;275(5307):1784-7. PubMed PMID: 9065401.
49. Plikus M, Wang WP, Liu J, Wang X, Jiang TX, Chuong CM. Morpho-regulation of ectodermal organs: integument pathology and phenotypic variations in K14-Noggin engineered mice through modulation of bone morphogenetic protein pathway. *Am J Pathol.* 2004;164(3):1099-114. Epub 2004/02/26. PubMed PMID: 14982863; PMCID: 1614723.
50. Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB, 3rd, Millar SE. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development.* 2004;131(10):2257-68. Epub 2004/04/23. doi: 10.1242/dev.01125 dev.01125 [pii]. PubMed PMID: 15102710.
51. Zhang J, He XC, Tong WG, Johnson T, Wiedemann LM, Mishina Y, Feng JQ, Li L. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. *Stem Cells.* 2006;24(12):2826-39. Epub 2006/09/09. doi: 2005-0544 [pii] 10.1634/stemcells.2005-0544. PubMed PMID: 16960130.
52. Morris RJ, Potten CS. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):470-5. Epub 1999/04/14. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00537.x. PubMed PMID: 10201531.
53. Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol.* 2003;120(4):501-11. Epub 2003/03/22. doi: 12088 [pii] 10.1046/j.1523-1747.2003.12088.x. PubMed PMID: 12648211.
54. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 2004;118(5):635-48. Epub 2004/09/02. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.012 S0092867404007895 [pii]. PubMed PMID: 15339667.
55. Claudinot S, Nicolas M, Oshima H, Rochat A, Barrandon Y. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(41):14677-82. PubMed PMID: 16203973.
- 56. Kobiela K, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(24):10063-8. Epub 2007/06/08. doi: 0703004104 [pii] 10.1073/pnas.0703004104. PubMed PMID: 17553962; PMCID: 1888574.**
57. Vidal VP, Chaboissier MC, Lutzendorf S, Cotsarelis G, Mill P, Hui CC, Ortonne N, Ortonne JP, Schedl A. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Curr Biol.* 2005;15(15):1340-51. Epub 2005/08/09. doi: S0960-9822(05)00747-5 [pii] 10.1016/j.cub.2005.06.064. PubMed PMID: 16085486.
58. Rhee H, Polak L, Fuchs E. Lhx2 maintains stem cells character in hair follicles. *Science.* 2006;312:1946-9.
59. Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 2005;19(13):1596-611. Epub 2005/06/18. doi: gad.1324905 [pii] 10.1101/gad.1324905. PubMed PMID: 15961525; PMCID: 1172065.
60. Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA. Epidermal stem cells arise from the hair follicle

- after wounding. *Faseb J.* 2007;21:1-9. PubMed PMID: 17255473.
61. He X. Unwinding a path to nuclear beta-catenin. *Cell.* 2006;127(1):40-2. PubMed PMID: 17018273.
62. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. Phosphorylation of beta -catenin by AKT promotes beta -catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2007;282:1122-9. PubMed PMID: 17287208.
63. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol.* 2001;1:4. Epub 2001/04/12. PubMed PMID: 11299042; PMCID: 31338.
64. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 2007;129(5):999-1010. Epub 2007/06/02. doi: S0092-8674(07)00513-2 [pii] 10.1016/j.cell.2007.03.044. PubMed PMID: 17540178; PMCID: 2718740.
- 65. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, Widelitz R, Chuong CM, Kobielał K. Competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling reveals a robust gene network ruling stem cell homeostasis and cyclic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(4):1351-6. Epub 2013/01/08. doi: 10.1073/pnas.1121312110. PubMed PMID: 23292934; PMCID: PMC3557042.**
66. Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell.* 2009;4(2):155-69. Epub 2009/02/10. doi: S1934-5909(08)00626-7 [pii] 10.1016/j.stem.2008.12.009. PubMed PMID: 19200804; PMCID: 2668200.
67. Lo Celso C, Prowse DM, Watt FM. Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development.* 2004;131(8):1787-99. Epub 2004/04/16. doi: 10.1242/dev.01052 131/8/1787 [pii]. PubMed PMID: 15084463.
68. Hu MC, Piscione TD, Rosenblum ND. Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in ALK3 transgenic mice. *Development.* 2003;130(12):2753-66. PubMed PMID: 12736218.
69. Nguyen H, Fuchs E. Tcf3 maintains stem cells and represses cell fate determination in skin. *Cell.* 2006;127(1):171-83.
- 70. Kandyba E, Kobielał K. Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. *Stem Cells.* 2014;32(4):886-901. Epub 2013/11/14. doi: 10.1002/stem.1599. PubMed PMID: 24222445; PMCID: PMC4398394.**
- 71. Kandyba E, Hazen VM, Kobielał A, Butler SJ, Kobielał K. Smad1 and 5 but not Smad8 establish stem cell quiescence which is critical to transform the premature hair follicle during morphogenesis toward the postnatal state. *Stem Cells.* 2014;32(2):534-47. Epub 2013/09/12. doi: 10.1002/stem.1548. PubMed PMID: 24023003.**

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1 Dane bibliometryczne

Sumaryczny IF publikacji : **57.17**

Całkowita liczba cytowań: (Sum of times cited wg bazy ISI Web of Knowledge): **155** Index Hirscha

(wg bazy ISI Web of Knowledge): **10**

5.2 Lista publikacji niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Lee P, Gund R, Dutta A, Pincha N, Rana I, Ghosh S, Witherden D, Kandyba E, MacLeod A, **Kobielał K**, Havran WL, Jamora C. Stimulation of hair follicle stem cell proliferation through an IL-1 dependent activation of $\gamma\delta$ T-cells. *Elife*. Dec 4;6. pii: e28875. doi: 10.7554/eLife.28875, 2017
2. Wang Q, Oh JW, Lee HL, Dhar A, Peng T, Ramos R, Guerrero-Juarez CF, Wang X, Zhao R, Cao X, Le J, Fuentes MA, Jocoy SC, Rossi AR, Vu B, Pham K, Wang X, Mali NM, Park JM, Choi JH, Lee H, Legrand JMD, Kandyba E, Kim JC, Kim M, Foley J, Yu Z, **Kobielał K**, Andersen B, Khosrotehrani K, Nie Q, Plikus MV. A multi-scale model for hair follicles reveals heterogeneous domains driving rapid spatiotemporal hair growth patterning. *Elife*. Jul 11;6. pii: e22772. doi: 10.7554/eLife.22772, 2017
3. Li A, Lai YC, Yang T, Figueroa S, Widelitz R, **Kobielał K**, Nie Q, Chuong CM. Deciphering principles of morphogenesis from temporal and spatial patterns on the integument. *Dev Dyn*. Apr 9. doi: 10.1002/dvdy.24281, 2015
4. Leung Y, Kandyba E, Chen YB, Ruffins S, Chuong CM, **Kobielał K**.* Bifunctional ectodermal stem cells around the nail display dual fate homeostasis and adaptive wounding response toward nail regeneration. *PNAS* 111(42):15114-9, 2014
5. Zhang H, Boddupally K, Kandyba E, **Kobielał K**, Chen Y, Zu S, Krishnan R, Sinha U, Kobielał A. Defining the localization and molecular characteristic of minor salivary gland label retaining cells. *Stem Cells*. 32(8):2267-77, 2014
6. Leung Y, Kandyba E, Chen YB, Ruffins S, **Kobielał K**.* Label-Retaining Cells (LRCs) with Myoepithelial characteristic from the Proximal Acinar Region define Stem Cells in Sweat Gland. *PLOS ONE*. 18;8(9):e74174, 2013
7. Hughes MW, Jiang TX, Lin SJ, Leung Y, **Kobielał K**, Widelitz RB, Chuong CM. Disrupted Ectodermal Organ Morphogenesis in Mice with a Conditional Histone Deacetylase 1, 2 Deletion in the Epidermis. *J Invest Dermatol*. 134(1):24-32, 2014
8. Kobielał A, **Kobielał K**, Biedziak B, Trzeciak WH. A novel mutation A1270G of the EDA1 gene causing Tyr343Cys substitution in ectodysplasin-A in a family with anhidrotic ectodermal dysplasia. *Acta Biochim Pol*. 50(1):255-258; 2003

9. Wisniewski SA, Kobielał A, Trzeciak WH, **Kobielał K**. Recent advances in understanding of the molecular basis of anhidrotic ectodermal dysplasia: discovery of a ligand, ectodysplasin A and its two receptors. *J Appl Genet* 43(1):97-107; 2002
10. **Kobielał K**[#], Kobielał A, Roszkiewicz J, Wierzba J, Limon J, Trzeciak WH. Mutations in the *EDA* gene in three unrelated families reveal no apparent correlation between phenotype and genotype in the patients with an X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet.* 100(3):191-197; 2001
11. Kobielał A, **Kobielał K**, Trzeciak WH. A novel isoform of human lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1) gene transcript encodes a protein devoid of HMG domain and nuclear localization signal. *Acta Biochim Pol.* 48(1):221-226; 2001
12. Kobielał A., **Kobielał K.**, Wisniewski S.A., Midro A.T., Trzeciak W.H. Sequence polymorphisms of the *EDA* and the *DL* genes in the patients with an X-linked and an autosomal forms of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Folia Histochem Cytobiol* 39(2):113-114; 2001
13. Kobielał A., **Kobielał K.**, Wisniewski AS, Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH. The novel polymorphic variants within the paired box of the *PAX9* gene are associated with selective tooth agenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 39(2):111-112; 2001
14. **Kobielał K**[#], Kobielał A, Roszkiewicz J, Limon J, Trzeciak WH. Recurrent deletion of the region encoding two (Gly-X-Y) repeats in patients with anhidrotic ectodermal dysplasia indicates an important role for collagen-like domain of the *EDA* gene product - ectodysplasin A. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*; 19(6):425-432; 2000
15. **Kobielał K**[#], Kobielał A, Trzeciak WH. Novel isoforms of transcript of the *EDA* gene confirm X-linked inheritance of anhidrotic ectodermal dysplasia. *J. Appl. Genet.* 40:355-364; 1999
16. **Kobielał K**[#], Kobielał A, Trzeciak WH. Cloning of lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1) from rat kidney: homology to the mouse sequence *Acta Biochem. Polon* 46:885-888; 1999
17. **Kobielał K**[#], Kobielał A, Limon J, Trzeciak WH. Mutation in the regulatory region of the *EDA* gene coincides with the symptoms of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Acta Biochem. Polon.* 45:245-250; 1998
18. Łakomski J, **Kobielał K**, Kobielał A, Trzeciak WH. Correcting facial dismorphism in a patient with anhidrotic ectodermal dysplasia: a clinical report. *J Prosthet Dent* 80:524-526; 1998
19. **Kobielał K**[#], Kobielał A, Trzeciak WH. Is the recently discovered *EDA* gene associated with anhidrotic ectodermal dysplasia? *J. Appl. Genet.* 38:343-357; 1997

[#] first author; * corresponding author

5.3 Krótkie streszczenie osiągnięć naukowych niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Molekularne podstawy anhidrotycznej dysplazji ektodermalnej.

Już w trakcie studiów lekarskich i później doktoranckich, interesowałem się biologią rozwojową, szczególnie molekularnymi podstawami rozwoju przydatków skóry u ludzi. Dlatego zacząłem badać możliwą przyczynę anhidrotycznej dysplazji ektodermalnej (EDA). Zespół ten jest spowodowany przez mutacje w genach EDA lub DL, które należą do rodziny ligandów i receptorów TNF, zaangażowanych w komunikację między komórkami podczas życia embrionalnego. Zbadałem zarówno regiony kodujące, jak i niekodujące genów EDA i DL u pacjentów wykazujących objawy kliniczne dysplazji ektodermalnej (niedobór lub brak ekrynowych gruczołów potowych, oligodontia lub brak zębów, brak lub rzadkie włosy). Wykryłem kilka nowych mutacji i polimorfizmów w obu genach EDA i DL odpowiedzialnych za te same fenotypy zespołu EDA u ludzi. Moje najlepsze odkrycie zostało opublikowane w prestiżowym *Am J Med Genetics* (2001; papier # 10), a także dodane do bazy danych OMIM, a inne wyniki opublikowano w *Journal of Applied Genetics* (1997, 1999, 2002 artykuły # 19, 15, 9), *Journal Prosthetics Dentistry* (1998; papier # 18), *Acta Biochimica Polonica* (1998, 1999, 2001, 2003; artykuły # 17, 16, 11, 8), *Pediatric Pathology and Molecular Medicine* (2000; papier # 14), *Folia Histochemica et Cytobiologica* (2001; papier # 12). Do analizy promotora EDA we współpracy z moją żoną Agnieszką Kobiela sklonowaliśmy, ekspresjonowaliśmy i oczyściliśmy szczurzy i ludzki Lef-1 (GenBank: ludzki i szczurzy AF198532 i AF198533). Wykazaliśmy również stymulujący wpływ ludzkiej LEF-1 i β -kateniny na ekspresję genu EDA. Ponadto opisałem również pierwszą mutację w regionie regulacyjnym genu EDA zbieżną z objawami anhidrotycznej dysplazji ektodermalnej. Jako student doktorancki, moje badania uzyskały pierwszą nagrodę J. Opieńskiej-Blautha za najlepszą pracę zaprezentowaną przez studenta na spotkaniu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1995 r., a także nagrodę Rektora Uniwersytetu za najlepszą pracę doktorską (1999). Po obronie mojej pracy doktorskiej za niektóre z powyższych studiów dostałem niezależny grant ufundowany przez Państwowy Komitet Badań Naukowych (KBN) i zostałem liderem grupy badawczej. Za dalsze badania molekularnych podstaw anhidrotycznej dysplazji ektodermalnej otrzymałem także pierwszą nagrodę W. Mozołowskiego za najlepszy artykuł przedstawiony przez doktora na spotkaniu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 2000 r. W tym samym roku otrzymałem również Nagrodę Młodego Uczzonego z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

2. Molekularne podstawy agenezji zębów.

Uczestniczyłem również w badaniach, którego celem było zbadanie dwóch genów MSX1 i PAX9, które kodują czynniki transkrypcyjne i były związane z selektywną agenezją zębów. Przeprowadzałem analizę mutacji dwóch genów w naszej grupie pacjentów z niedoborem różnych zębów, w tym rodzinną lub sporadyczną postacią trwałą agenezji zębów. Analiza jednoniciowego polimorfizmu konformacyjnego nie wykazała mutacji w całej sekwencji kodującej genu MSX1. Ponadto u 20% pacjentów i analiza sekwencji ich krewnych ujawniła przejście C -> T w sekwencji kodującej genu PAX9. Zasugerowaliśmy, że mutacje w PAX9 mogą być odpowiedzialne za sporadyczną formę agenezji zębów. Badanie to zostało opublikowane w *Folia Histochemica et Cytobiologica* (2001; artykuły # 13).

3. Poszukiwanie nowych komórek macierzystych skóry w różnych jej przydatkach.

Dorośle komórki macierzyste (SC) są bardzo plastyczne pod względem zdolności do odtwarzania różnych tkanek, co prowadzi do dużego zainteresowania oceną ich potencjału terapeutycznego. Chociaż komórki macierzyste włosa (hfSC) są jednymi z najlepiej scharakteryzowanych dorosłych SC, wciąż niewiele wiadomo jest o innych SC w różnych przydatkach skóry, takich jak gruczoły potowe (SG) i paznokcie. Dlatego, kiedy rozpocząłem samodzielną pracę na stanowisku asystent profesora w Centrum Medycyny Regeneracyjnej i Badań Komórek Macierzystych na Uniwersytecie Południowej Kalifornii w Los Angeles, poza głównym celem badań mojego laboratorium, które zajmowało się molekularnym mechanizmem homeostazy komórki macierzyste włosa, część moich badań skupiała się na poszukiwaniu nowych komórek macierzystych skóry w różnych jej przydatkach. Niewłaściwa termoregulacja przez gruczoły potowe może spowodować hipertermię, która potencjalnie może prowadzić do śmierci. Pokazano, że komórki gruczołów potowych mogą odtworzyć funkcjonalny naskórek, co doprowadziło do dużego zainteresowania tym przydatkiem skóry, jako potencjalnie ważnego źródła dodatkowych komórek w regeneracji skóry oprócz ustalonych komórek macierzystych włosa (Miller i in., 1998; Biedermann i in., 2010; Ritte i in. . 2013).

3A. Lokalizacja, izolacja i charakterystyka wolno dzielących się komórek (LRC) z mioepitelialną charakterystyką z proksymalnego regionu nabłonkowego-wydzielniczego definiują komórki macierzyste gruczołów potowych.

W czasie, gdy moje laboratorium rozpoczęło to badanie, poprzednie publikacje nie adresowały dokładnie, które przedziały komórkowe lub populacje, jeśli w ogóle, w gruczołach potowych (SG) mają zdolność regeneracyjną z charakterystyką komórek macierzystych. Chociaż poprzednie grupy pokazały, że wolno dzielące się komórki (LRC) istnieją w proksymalnej części gruczołów potowych (Nakamura i in., 2009; Lu i in., 2012), to jednak w tym czasie dalsza charakterystyka molekularna SG-LRC i to, czy komórki te posiadają cechy komórek macierzystych, nie zostało rozwiązane.

Moje laboratorium zajęło się tym pytaniem, szukając wolno dzielących się komórek wykorzystujących system H2BGFP LRC (Tumbar i in., 2004), który to po raz pierwszy pozwolił nam precyzyjnie zlokalizować i wyizolować nowe komórki macierzyste skóry z cechami mioepitelialnymi ograniczonymi do proksymalnej części nabłonkowo-wydzielniczej gruczołów potowych z lokalizacją w warstwie podstawnej. Ponadto komórki te nie były obecne w odcinku dystalnym przewodu wydzielniczego gruczołów potowych. Następnie zidentyfikowaliśmy przez profil transkrypcyjny kilka genów szlaku BMP i potwierdziliśmy funkcjonalne wymagania BMPR1A w tworzeniu gruczołów potowych. Ponadto wykazaliśmy, że SG-LRC są multipotencjalne z charakterystyką komórek macierzystych in vivo z możliwością różnicowania w naskórek podczas gojenia się ran. Nasze wyniki sugerują również plastyczność komórek gruczołów potowych in vivo w odtworzenia zarówno SG, jak również, co nas zaskoczyło mieszków włosowych. Badanie to zostało opublikowane w *PLOS ONE* (2013; artykuły # 6) i chronione jest patentem amerykańskim (nr publikacji: US 2016/0075995 A1, pub. Data: 17 marca 2016 r.). Aby rozwinąć projekt komórek macierzystych w gruczołach potowych SGSCs, zostałem nagrodzony przez Narodowego Instytutu Zdrowia grantem R03 (NIH/NIAMS R03, Bethesda, Maryland, USA).

3B. Charakterystyka wolno dzielących się, K15 pozytywnych i zdolnych do regeneracji komórek macierzystych paznokci.

Różne mini-narządy ektodermalne mają różne sposoby, odnowy i regeneracji, jak również różną dynamikę w utrzymaniu homeostazy komórek macierzystych, tak aby radzić sobie skutecznie ze

zużyciem. Paznokcie podlegają ciągłemu wzrostowi w warunkach fizjologicznych, ale mogą również regenerować się po usunięciu. W tym czasie, nadal istniały rozbieżności w lokalizacji i dynamice domniemanych komórek macierzystych paznokci. Ponadto, dalsza izolacja, charakterystyka molekularna i potwierdzenie potencjału komórek macierzystych paznokci nie zostały jeszcze rozwiązane. Moje laboratorium zidentyfikowało wolno dzielące się komórki (LRC) dokładnie ograniczone do fałdu proksymalnego z konfiguracją podobną do pierścienia. Funkcjonalnie przez przeszczepienie nowo zidentyfikowanych komórek LRC paznokci, pokazaliśmy, że mogą one partycypować w strukturze paznokcia i uczestniczyć w regeneracji paznokci po wszczęciu in vivo. Wykazaliśmy również, że te komórki LRC z paznokci ekspresjonują marker komórek macierzystych włosów, keratynę 15 (K15), a śledzenie linii wykazało, że te komórki pochodzące z K15 znakowanej populacji mogą uczestniczyć zarówno odnawianiu struktury paznokcia, jak i naskórka okołopaznokciowego (z przewagą tego drugiego). Zatem ta populacja komórek macierzystych jest dwufunkcyjna. Ponadto pokazaliśmy funkcjonalne wymaganie sygnalizacji BMP, molekularnie, zmniejszona sygnalizacja BMP powodowała przeznaczenie keratynocytów paznokci do różnicowania w kierunku naskórka. Te wyniki pokazały, że moje laboratorium było w stanie zidentyfikować nieopisaną dotąd populację spoczynkowych dwufunkcyjnych komórek macierzystych ektodermy zlokalizowanych wokół paznokcia, w podstawnej warstwie fałdu proksymalnego paznokcia, które wykazują podwójną homeostazę i adaptacyjną odpowiedź na rany w kierunku regeneracji paznokci. Badanie to zostało opublikowane w *PNAS* (2014; artykuły # 4) i zostało podkreślone przez czasopismo i wiadomości uniwersyteckie, a także międzynarodowe wiadomości, takie jak *Science Daily* i *Dermatology Times*.

Podsumowując, zidentyfikowaliśmy i scharakteryzowaliśmy nowe dorosłe komórki macierzyste skóry z paznokci i gruczołów potowych. Wiedza ta może być przydatna w przełożeniu tych podstawowych odkryć na nowe formy terapii komórkami macierzystymi z zastosowaniem w chorobach ludzkich, takich jak dysplazje ektodermalne (ED), które manifestują objawy związane z brakiem przydatków skóry, w tym włosów, zębów, gruczołów potowych, a także paznokci, ale również może dotyczyć ofiar oparzeń, u których brakuje włosów i gruczołów potowych.

4. Rola deacetylazy histonowej 1, 2 w morfogenezie narządu ektodermalnego.

Współpracowałem z laboratorium dr Ming Chuong'a na Uniwersytecie Południowej Kalifornii, aby opracować myszy z warunkową delecją deacetylazy histonowej 1, 2 (HDAC1 i HDAC2) w naskórku. Skóra myszy z podwójną delecją, HDAC-KO wykazywała spektrum zmian, nieregularnie pogrubionego naskórka między-włosowego, łysienia, dystrofii mieszków włosowych, dystrofii paznokci i nieprawidłowej pigmentacji. Różne rodzaje włosów w sierści zostały utracone. Podczas pierwszego cyklu włosów, włosy były traczone i zastępowane przez dystroficzne mieszki włosowe z rozszerzeniami w kształcie lejków. Wyniki te pokazują, że zahamowanie aktywności HDAC naskórka prowadzi do niewłaściwej morfogenezy narządu ektodermalnego i zaburzonej regeneracji mieszków włosowych i homeostazy, jak również ma pośredni wpływ na pigmentację. Moja wiedza wykorzystana została również do pomocy w analizie immunofluorescencyjnej mieszków włosowych i naskórka. Badanie to zostało opublikowane w *Journal of Investigative Dermatology* (2014; artykuł # 7).

5. Charakterystyka wolno dzielących się komórek macierzystych jamy ustnej.

Uczestniczyłem w projekcie laboratorium dr Agnieszki Kobiela na Uniwersytecie Południowej Kalifornii, aby pomóc jej laboratorium zlokalizować i scharakteryzować dorosłe komórki macierzyste (SC) w jamie ustnej, które są ważne dla utrzymania homeostazy tej tkanki. W tym przypadku

wykorzystano metodę czułego wykrywania in vivo zielonego białka fluorescencyjnego (GFP) w wolno dzielących się komórkach w celu wyizolowania i scharakteryzowania komórek zatrzymujących znacznik, czyli potencjalnych komórek macierzystych nabłonka języka i gruczołów ślinowych (większych i mniejszych). W przypadku mniejszych gruczołów ślinowych strategia znakowania histonu2B białkiem GFP (H2BGFP) pozwoliła na zidentyfikowanie wolno dzielących się komórek utrzymujących znacznik (LRC) w mniejszych gruczołach ślinowych, które preferencyjnie lokalizują się w warstwie podstawowej dolnego przewodu wydalniczego. Wszczepienie wyizolowanych komórek LRC z gruczołów ślinowych in vivo wykazało ich potencjał do różnicowania się w struktury pozytywne dla keratyny 5 (marker warstwy podstawowej) i keratyny 8 (marker warstwy luminalnej). Analiza transkrypcyjna ujawniła aktywację docelowych genów TGFβ1 w komórkach LRC z gruczołów ślinowych i sygnalizacji BMP w komórkach prekursorowych z gruczołów ślinowych. Dane te po raz pierwszy podkreśliły istnienie komórek LRC w drobnych gruczołach ślinowych z charakterystyką komórek macierzystych oraz pokazały rolę szlaku TGFβ w ich utrzymaniu. Wyniki te zostały opublikowane w *Stem Cells* (2014; papier # 5).

6. Zasady regeneracji powłok.

Byłem zaangażowany w napisanie artykułu przeglądowego z grupą dr Chuong'a na Uniwersytecie Południowej Kalifornii. Mój udział polegał na przygotowaniu części dotyczącej dynamicznych interakcji pomiędzy komórkami macierzystymi, a ich sąsiadującą niszą, które regulują zachowania regeneracyjne i są modulowane przez wielowarstwowe czynniki makro-środowiskowe. Zasady samoorganizacji uzyskane z modeli narządów powłok mogą być zastosowane w celu przywrócenia uszkodzonych wzorów podczas regeneracyjnego gojenia ran i inżynierii tkankowej w celu odbudowy tkanek. Badanie to zostało opublikowane w *Developmental Dynamics* (2015; artykuły # 3).

7. Odkrycie heterogenicznych domen mieszków włosowych napędzających szybką czasoprzestrzenną regenerację wzorców wzrostu włosów.

Do tych badań dostarczyłem modelu myszy Krt14-Cre z warunkową ablacją genu Wnt7b fl/fl oraz uczestniczyłem w interpretacji danych w projekcie grupy Dr. Plikus'a. Za pomocą modelowania wieloskalowego pokazaliśmy, że sprzężone inhibitory i aktywatory z fizycznym wzrostem włosa są wystarczające do napędzania okresowości i pobudliwości regeneracji mieszków włosowych. Symulacje modelowe i dane eksperymentalne ujawniały, że skóra myszy zachowuje się jak heterogeniczne pole regeneracyjne, złożone z domen anatomicznych, w których mieszki włosowe mają odrębną dynamikę cyklu. Interakcje między szybkim cyklem podbródka i brzuszными mieszkami włosowymi, a wolno dzielących się grzbietowymi mieszkami włosowymi wytwarza obustronnie symetryczne wzory. Skóra ucha, natomiast zachowuje się jak hiperrefrakcyjna domena z mieszkami włosowymi w przedłużonej fazie spoczynku. Taka hiperrefrakcyjność dotyczy wysokich poziomów ligandów BMP i antagonistów WNT, częściowo ekspresjonowanych przez chrząstkę i mięśnie specyficzne dla ucha. Wyniki te dostarczają nowe zrozumienie tego, jak cała skóra zwierzęcia zarządza całą regeneracją włosów i została opublikowana w *eLife* (2017; papier # 2).

8. Nowe mechanistyczne spostrzeżenia na temat regulacji i funkcji komórek odpornościowych występujących w naskórku i ich interakcji z odrębnymi niszami komórek macierzystych podczas regeneracji skóry i włosów.

Do tego projektu dostarczyłem model komórek macierzystych włosa wyizolowanych przez FACS, a następnie hodowanych in vitro oraz uczestniczyłem w interpretacji danych w badaniach laboratorium Dr. Jamora. W programie gojenia ran skóry pośredniczy mobilizacja lokalnych populacji komórek macierzystych w celu promowania regeneracji i naprawy tkanek. Wykorzystując inaktywację naskórkowej kaspazy-8 jako modelu gojenia ran in vivo u myszy, odkryliśmy, że IL-1 α i IL-7 wydzielane z keratynocytów działają razem, aby rozszerzyć aktywowaną populację rezydentnych komórek $\gamma\delta$ T naskórka. Dalszym efektem aktywowanych komórek $\gamma\delta$ T jest preferencyjna proliferacja komórek macierzystych włosa. Odkrycia te dostarczają nowych spostrzeżeń mechanistycznych, w jaki sposób komponenty klasycznie związane z zapaleniem mogą w różny sposób wpływać na różne nisze komórek macierzystych w tkance. Niniejsze badanie zostało opublikowane w *eLife* (2017; papier # 1).

5.4 Kierowanie i udział w projektach naukowych

Charakter udziału w projekcie	Tytuł projektu	Nr projektu	Źródła finansowania	Wysokość finansowania	Miejsce realizacji	Lata
Kierownik grantu	Wzajemne oddziaływanie komórek macierzystych włosa i otaczającej niszy w czasie regeneracji skóry i cyklu włosa. Reciprocal interaction between hair follicle Stem Cells and surrounding niche during skin and hair regeneration.	TEAM/2017-4/36	TEAM, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej	3 499 999,00 PLN	CeNT, Uniwersytet Warszawski	2018-2021
Kierownik grantu	Regulacja komórek macierzystych mieszków włosowych podczas cyklicznej regeneracji włosów. Hair follicle stem cells regulation during hair cyclic regeneration.	2015/19/B/NZ3/02948	OPUS, Narodowe Centrum Nauki	1 683 222,00 PLN	CeNT, Uniwersytet Warszawski	2016-2019
Opiekun naukowy grantu	Regulatory ścieżek sygnałowych BMP i WNT w homeostazie komórek macierzystych mieszk włosa. Regulators of BMP and WNT signaling pathways in homeostasis of hair follicle stem cells.	2017/25/N/NZ3/02622	Preludium, Narodowe Centrum Nauki	180 000,00 PLN	CeNT, Uniwersytet Warszawski	2018-2020
Kierownik grantu	Activator - Inhibitor interactions in the cyclic regeneration of hair follicle.	R01 AR061552	US National Institutes of Health (NIH)/NIAMS	1 850 000 USD	University of Southern California, Los Angeles/ University of California Irvine	2012-2017
Kierownik grantu	Isolation and characterization of new adult stem cells from sweat glands.	R03 AR061028	US National Institutes of Health (NIH)/NIAMS	240 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2011-2014
Opiekun naukowy grantu	Defining Bone Morphogenetic Protein (BMP) functions in hair follicle stem cell homeostasis by conditional ablation or activation of BMP receptor 1A (Bmpr1a).		CIRM - Research Training Program II in the Stem Cell Biology fellowship	113 484 USD	University of Southern California, Los Angeles	2010-2012
Opiekun naukowy grantu	The Role of BS69 in Mouse Embryogenesis and Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation		US National Institutes of Health (NIH)/NICHD T32 Pre-doctoral Training	64 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2012-2014
Kierownik grantu	The role of niche microenvironment in initiation of tumor formation in		Wright Foundation	100 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2009-2010

	skin after activation of hair follicle stem cell.					
Kierownik grantu	The role of BMP signaling in regulation of hair follicle stem cells.		Baxter Foundation	100 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2009-2010
Kierownik grantu	The role of PTEN pathway in initiation of tumor formation in skin by its targeted inactivation in hair follicle stem cell niche.	IRG-58-007-48	American Cancer Society Institutional Research Grant ACS/IRG pilot project	25 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2008-2009
Współ-wykonawca grantu	Clinical Regenerative Wound Healing with Stem Cells.	DT1-00653	CIRM Disease Team Planning Award	33 626 USD	University of Southern California, Los Angeles	2008-2009

5.5 Udział i w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Byłem współautorem doniesień zjazdowych na następujących konferencjach:

Prezentacje Ustne/Oral presentations:

1. K. Kobielał, 2003. "Regulation of hair follicle morphogenesis: Part II". Skin Symposium, New York Academy of Science, USA
2. K. Kobielał, 2005. "Regulation of hair follicle morphogenesis by BMP signaling". Symposium Molecular Cell and Developmental Biology, Max Plank Institute, Dresden, Germany
3. K. Kobielał, 2005. "Regulation of hair follicle morphogenesis by BMP signaling. Symposium Molecular Cell and Developmental Biology, The International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland
4. K. Kobielał, 2006. "Role of BMP signaling in hair follicle stem cell niche". Symposium Molecular Cell Biology, Institute of Cell Biology ETH, Zurich, Switzerland
5. K. Kobielał, 2008. "Skin and hair follicle stem cells". CA-Harvard Stem Cell Symposium /CIRM, UCLA, Los Angeles, California, USA
6. K. Kobielał, 2010. "Defining BMP functions in hair follicle stem cells homeostasis by conditional ablation or activation of BMP receptor 1A". 70th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology (SID), Atlanta, Georgia, USA 2010
7. K. Kobielał, 2011. "Two faces of BMP signaling: multipotency versus differentiation of hair follicle stem cells". Stem Cell Center Seminar Series, University of California Riverside UCR, California, USA

8. K. Kobielał, 2011. "Understanding the molecular mechanism of skin stem cell regulation and the role of surrounding microenvironment in skin homeostasis". International Symposium The use of cord blood stem cells in haematologic and non-haematologic disorders. St. Petersburg, Russia
9. K. Kobielał, E. Kandyba, 2011. "Unveiling a new ligand dependent mechanism of cross-talk between BMP and canonical WNT signaling in hair follicle stem cell activation". CIRM Meeting, San Francisco, California, USA
10. K. Kobielał, 2011. "Integration of molecular network between BMP and WNT signaling in hair follicle stem cells regulation". The 60th Annual Montagna Symposium on the Biology of the Skin, Stevenson, Washington, USA
11. K. Kobielał, 2012. "New intrinsic mechanism of ligand-receptor dependent cross-talk between BMP and WNT signaling in hair follicle stem cell homeostasis". 72nd Annual Meeting Society for Investigative Dermatology (SID), Raleigh, North Carolina, USA
12. K. Kobielał, Leung Y, 2011. "Localization, isolation and characterization of new skin stem cells from sweat glands. 72nd Annual Meeting Society for Investigative Dermatology (SID), Raleigh, North Carolina, USA 2012
13. K. Kobielał, 2013. "BMP/Wnt signaling in stem cell gene networks of cycling hair follicle". Stem Cells & Regenerative Medicine, 6th International Stem Cells and Cell Signaling, Boston Massachusetts, USA
14. K. Kobielał, 2013. "Competitive balance of Intra-bulge BMP/WNT signaling reveals a robust gene network governing stem cell homeostasis and cyclic activation". The 7th World Congress for Hair Research, Edinburgh, Scotland, UK
15. K. Kobielał, Y. Leung, 2013. "Defining the Label Retaining Cells (LRCs) from Nails as Putative New Skin Stem Cells". International Investigative Dermatology 2013, Edinburgh, Scotland, UK 2013
16. K. Kobielał, 2014. "Unveiling Distinct Skin Stem Cells and Their Homeostasis and Regenerative Potential in Different Skin Appendages". The Gross Stem Cell Research Center, University of California Irvine UCI, California, USA
17. K. Kobielał, 2014. "Skin Stem Cells: from Hair to Digit Regeneration". The Holland Regenerative Medicine Program, University of Nebraska Medical Center UNMC, USA October
18. K. Kobielał, 2014. "Skin and Skin Appendages, unveiling their different Stem Cell Homeostasis and Regenerative Potentials". Stem Cell Center Seminar Series, University of California Riverside UCR, California, USA June
19. K. Kobielał, 2015. "Beyond Surface — Skin Stem Cells: from Hair to Digit Regeneration". The Keck School of Medicine of USC, Los Angeles, California, USA

20. K. Kobielał, 2015. "Under the Surface: From Hair to Digit Regeneration Unveiling Regenerative Potential of Distinct Skin Stem Cells". Central European Conference on Regenerative Medicine (CECRM), Bydgoszcz, Poland
21. K. Kobielał, 2015. "Chasing Stem Cells in the Skin and Unveiling Their Regenerative Potential. Department of Developmental and Cell Biology, University of California Irvine UCI, California, USA
22. K. Kobielał, 2016. "Deciphering Distinct Skin Stem Cells: From Hair to Digit Regeneration. Center of New Technologies, University of Warsaw, Poland
23. K. Kobielał, 2016. "Różnorodność Komórek Macierzystych w Ektodermie – Od Regeneracji Skóry do Regeneracji Kończyn". Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warsaw, Poland
24. K. Kobielał, 2017. "Adult Stem Cells in Tissue Specific Regeneration". Summer School, Center of New Technologies, University of Warsaw, Poland 2017
25. K. Kobielał, 2017. "Coexistence of Variety of Skin Stem Cells in Tissue Specific Homeostasis and Regeneration". The International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland

Prezentacje Posterowe/ Poster Presentation:

1. **Kobielał K**, Kobielał A, Trzeciak WH. Mutation in the regulatory region of the *EDA* gene coincides with the symptoms of anhidrotic ectodermal dysplasia. 30th Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Lisboa, Portugal. *European Journal of Human Genetics* 6:159, 1998
2. Kobielał A, **Kobielał K**, Trzeciak WH. The influence of mutation in the 3'UTR of the *MSX1* gene on selective tooth agenesis. FEBS 26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Nice, France. *Biochimie (supplement)* 6:168, 1999
3. **Kobielał K**, Kobielał A, Trzeciak WH. Demonstration of a novel transcript isoform of the *EDA* gene in human umbilical cord. FEBS 26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Nice, France. *Biochimie (supplement)* 6:334, 1999
4. Kobielał A, **Kobielał K**, Trzeciak WH. Mutation in the 3'NCF might results decreased stability of mRNA coding for human homeodomain protein *MSX1*. 31th Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Geneva, Switzerland. *European Journal of Human Genetics* 7:104, 1999
5. **Kobielał K**, Kobielał A, Trzeciak WH. Expression of a Novel Transcript Isoform of the *EDA* Gene in Human Umbilical Cord. 31th Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Geneva, Switzerland. *European Journal of Human Genetics* 7:104, 1999
6. **Kobielał A**, Kobielał K, Trzeciak WH. The role of the *MSX1* gene in the formation of tooth buds. FEBS, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK 2000
7. **Kobielał K**, Kobielał A, Trzeciak WH. The influence of the transcription factor LEF-1 on the expression of the *EDA* gene. FEBS, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK 2000
8. **Kobielał K**, Lemieux N, Fuchs E. New proteins interacting with TCF3 in skin. Annual Meeting of Cell Biology, Michigan, USA 2001

9. Pasolli HA, Kaufman CK, Bolotin D, **Kobielałak K**, Fuchs E. Cell lineage determination in the hair follicle: ultrastructural insights. 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA 2003
10. Fuchs E, Tumber T, Guasch G, Blanpain C, **Kobielałak K**, Merrill B, Jamora C, Pasolli H.A., Alonso L, Greco V, Polak L. Stem Cell lineages of the skin. Cancer and Development Symposium, Keystone, USA 2004
11. **Kobielałak K**, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. Stem Cell and Cancer, Gordon Research Conference, Big Sky, Montana, USA 2007
12. **Kobielałak K**, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. 11th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2008
13. **Kobielałak K**. Skin and hair follicle stem cells. 1st Annual Stem Cell and Developmental Biology Conference, the University of Southern California, Lake Arrowhead, California USA 2008
14. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, **Kobielałak K**. Regulation of homeostasis of hair follicle stem cells by BMP signalling. 49th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, ASCB, San Diego, California, USA 2009
15. Kandyba E, **Kobielałak K**. BMP signalling in hair follicle stem cells. 12th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2009
16. Leung Y, **Kobielałak K**. Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem cells from Nails and Sweat Glands. 12th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2009
17. Zhang H, **Kobielałak K**. BMP receptor-associated molecule 1 (BRAM1) is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. 12th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2009
18. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, **Kobielałak K**. Defining BMP functions in hair follicle stem cells homeostasis by conditional ablation or activation of BMP receptor 1A. 70th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology (SID), Atlanta, Georgia 2010, *The Journal of Investigative Dermatology* Abstracts 130 (Suppl 1):S111, 665 (Eve Kandyba, postdoctoral fellow, was selected from 104 applications from over 16 countries for the 2010 Albert Kligman Travel Fellowship)
19. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, **Kobielałak K**. Inhibition of BMP signaling activates hair follicle stem cells towards the hair germ characteristic. 8th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), San Francisco, California, USA 2010
20. Kandyba E, **Kobielałak K**. Regulation of Hair Follicle Stem Cell Homeostasis by BMP Signaling. 13th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2010 (Eve Kandyba was awarded first place under the Best Oral Presentation Category for postdoctoral fellow)
21. Leung Y, **Kobielałak K**. Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem cells from Nails and Sweat Glands. 13th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2010
22. Zhang H, Rippen M, **Kobielałak K**. The role of BS69 in mouse embryogenesis and mESC differentiation. 13th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2010

23. Hennigan A, Kandyba E, **Kobielałak K.** Constitutively Active BMP Signaling: Implications for Hair Follicle Cycling and Skin Morphogenesis. 13th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Dana Point, California USA 2010
24. Kandyba E, **Kobielałak K.** Inhibition of BMP signaling activates hair follicle stem cells towards the hair germ characteristic. Tri-Institutional Stem Cell Conference, USCF/UCLA/USC, Asilomar, California USA 2010
25. Leung Y, Kandyba E, **Kobielałak K.** New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. Tri-Institutional Stem Cell Conference, USCF/UCLA/USC, Asilomar, California USA 2010
26. Kandyba E, **Kobielałak K.** Targeting BMP functions in stem cells for hair and skin regeneration. The USC 1st Stem Cell Translational and Clinical Sciences Research Symposium, Los Angeles, California USA 2010
27. Leung Y, Kandyba E, Chen YB, **Kobielałak K.** Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. The USC 1st Stem Cell Translational and Clinical Sciences Research Symposium, Los Angeles, California USA 2010
28. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, **Kobielałak K.** Targeting BMP functions in hair follicle stem cells. 3rd Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Lake Arrowhead, California USA 2010
29. Leung Y, Kandyba E, Chen YB, **Kobielałak K.** Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. 3rd Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Lake Arrowhead, California USA 2010
30. Rippen M, Zhang H, **Kobielałak K.** The role of BS69 in mouse embryogenesis and mESC differentiation. 3rd Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Lake Arrowhead, California USA 2010
31. Hennigan A, Kandyba E, **Kobielałak K.** Constitutively Active BMP Signaling: Implications for Hair Follicle Cycling and Skin Morphogenesis. 14th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2011 (Andrew Hennigan was awarded first prize for poster presentation in graduate student category)
32. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, **Kobielałak K.** Targeting BMP functions in hair follicle stem cells. 14th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2011 (Eve Kandyba was awarded first place for Best Poster Presentation for postdoctoral fellow)
33. Leung Y, Kandyba E, **Kobielałak K.** Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. 14th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2011
34. Rippen M, Zhang H, **Kobielałak K.** The role of BS69 in mouse embryogenesis and mESC differentiation. 14th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2011
35. Leung Y, Kandyba E, **Kobielałak K.** Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. 4th Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Cambria, California USA 2011
36. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, **Kobielałak K.** Unveiling a new intrinsic ligand-receptor dependent mechanism of cross-talk between BMP and WNT signaling in hair follicle stem cell homeostasis. 4th Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Cambria, California USA 2011

37. Rippen M, Zhang H, **Kobielał K**. The role of BS69 in mouse embryogenesis and mESC differentiation. 4th Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Cambria, California USA 2011
38. Kandyba E, Hazan V, Kobielał A, Butler S, **Kobielał K**. Canonical BMP Signaling Activates Different Smad-Complexes during Skin Morphogenesis and Postnatal Hair Follicle Formation. 15th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2012 (Eve Kandyba was awarded second place under the Best Poster Presentation Category for postdoctoral fellow)
39. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, Widelitz R, Chuong CM, **Kobielał K**. New intrinsic mechanism of ligand-receptor dependent cross-talk between BMP and WNT signaling in hair follicle stem cell homeostasis. 72nd Annual Meeting Society for Investigative Dermatology (SID), Raleigh, North Carolina 2012. Printed in *The Journal of Investigative Dermatology* Abstract 132, S148:864.
40. Leung Y, Kandyba E, **Kobielał K**. Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. 72nd Annual Meeting Society for Investigative Dermatology (SID), Raleigh, North Carolina 2012. Printed in *The Journal of Investigative Dermatology* Abstract 132, S147:857. (Yvonne Leung, Ph.D. student in my lab, received the 2012 Albert Kligman Travel Fellowship Award)
41. Tom B, Rippen M, **Kobielał K**. Gene Influence on the Development of Germ Layers in Mouse. CIRM's Creativity Awards program Meeting at Stanford University, California 2012
42. Leung Y, Kandyba E, **Kobielał K**. Localization, Isolation and Characterization of New Skin Stem Cells from Nails and Sweat Glands. 15th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2012 (Yvonne Leung was awarded first place for Best Poster Presentation for graduate student)
43. Rippen M, Zhang H, **Kobielał K**. The role of BS69 in mouse embryogenesis. 15th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Oxnard, California USA 2012
44. Kandyba E, **Kobielał K**. New intrinsic mechanism of ligand-receptor dependent cross-talk between BMP and WNT signaling in hair follicle stem cell homeostasis. Tri-Institutional Stem Cell Conference, USCF/UCLA/USC, Asilomar, California USA 2012
45. Rippen M, Zhang H, **Kobielał K**. The role of BS69 in mouse embryogenesis. 16th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2013 (Marie Rippen was awarded first place under Best Poster Presentation Category for PhD graduate student)
46. Kandyba E, Hazan V, Kobielał A, Butler S, **Kobielał K**. Postnatal hair follicle differentiation but not stem cell quiescence can be maintained by Smad8 alone after Smad1 and Smad5 ablation. 16th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2013 (Eve Kandyba was awarded first place under the Best Research Paper Award for her 2013 PNAS publication for postdoctoral fellow)
47. Kandyba E, Hazan V, Kobielał A, Butler S, **Kobielał K**. Postnatal hair follicle differentiation but not stem cell quiescence can be maintained by Smad8 alone after Smad1 and Smad5 ablation. International Investigative Dermatology 2013 (IID), Edinburgh, UK 2013. Printed in *The Journal of Investigative Dermatology Vol.1, Suppl.1* Abstract 1443, S245
48. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, Widelitz R, Chuong CM, **Kobielał K**. Wnt7b regulates hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. International Investigative Dermatology 2013,

- Edinburgh, UK 2013. Printed in *The Journal of Investigative Dermatology Vol.1, Suppl.1* Abstract 1447, S246
49. Leung Y, Kandyba E, Chen YB, Ruffins S, **Kobielał K.** Defining the Label-Retaining Cells (LRCs) from Nails as a putative New Skin Stem Cells. International Investigative Dermatology 2013, Edinburgh, UK 2013. Printed in *The Journal of Investigative Dermatology Vol.1, Suppl.1* Abstract 1441, S245 (Yvonne Leung, Ph.D. student in my lab, received the 2013 IID Travel Fellowship Award)
 50. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, Widelitz R, Chuong CM, **Kobielał K.** New intrinsic layer of stem cells homeostasis regulation revealed by competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling during hair cyclic activation. Gordon Research Conferences (GRC), Epithelial Differentiation & Keratinization, Barga, Italy 2013
 51. Kandyba E, Leung Y, Chen YB, Widelitz R, Chuong CM, **Kobielał K.** New intrinsic layer of stem cells homeostasis regulation revealed by competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling during hair cyclic activation. 11th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Boston, MA, USA, 2013. Printed in ISSCR 2013 Poster Abstract eBook, Abstract T-1124, P740-741
 52. Leung Y, **Kobielał K.** Defining the Label Retaining Cells (LRCs) from Sweat glands and Nails as a putative New Skin Stem Cells. 16th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2013
 53. Flores A, **Kobielał K.** Constitutively active canonical BMP signaling in the Apical Ectodermal Ridge disrupts proximal-distal patterning in limb bud development. 16th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2013 (Aimee Flores was awarded first place for Best Oral Presentation for master graduate student)
 54. Kandyba E, **Kobielał K.** Competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling reveals a robust gene network governing stem cell homeostasis and cyclic activation. Factor Meeting, USC, 2013
 55. Cochrane A., Leung Y, Kandyba E, Chen YB, **Kobielał K.** In search of nail stem cells: Characterizing label-retaining, K15-expressing and regeneration-competent progenitor populations. 17th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2014 (Anne Cochrane was awarded first place for Best Poster Presentation for undergraduate student)
 56. Kandyba E, **Kobielał K.** Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. 17th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2014 (Eve Kandyba was awarded second place under the Best Poster Presentation Category for postdoctoral fellow)
 57. Li Y., **Kobielał K.** The role of PTEN in regulation of hair follicle stem cells homeostasis and in initiation of skin tumor formation. 17th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2014
 58. Rippen M., **Kobielał K.** Ectopic neural induction is accompanied by suppression of mesoderm formation after ablation of *BS69 gene* in embryos. 17th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2014
 59. **Kobielał K.**, Wang X, Wang G, Plikus MV, Chen YB, Yun K, Israel M, Kandyba E. Integration of molecular network governed by Smads targeted genes in hair follicle stem cells regulation. International Society for Stem Cell Research (ISSCR), San Francisco, CA, USA 2016

60. Wang X, Wang G, Kikulska A, Daszczuk P, Chen YB, Plikus M, Yun K, Israel M, Kandyba E, **Kobielał K.** Molecular network of Smads and Id2 genes in hair follicle stem cells regulation. 76th Annual Meeting of the Society-for-Investigative-Dermatology (SID), Portland, Oregon, USA 2017
61. Wang X, Boryń LM, Wang G, Ramos R, Wang X, Plikus M, Daszczuk P, Mazurek, Pieczonka T, Yun K, Israel M.A, Kandyba E, **Kobielał K.** Activation of Id2 gene regulatory network ruling quiescence of hair follicle Stem Cells. International Investigative Dermatology (IID) meeting in Orlando, Florida, USA, 2018
62. Boryn LM, Daszczuk P, Mazurek P, Pieczonka T, Wang X, Wang G, Ramos R, Plikus M, Kandyba E, **Kobielał K.** Molecular network of Smads and Id2 genes in hair follicle stem cells regulation. Centre of New Technologies (CeNT), annual meeting, Warsaw, Poland, 2018
63. Boryn LM, Wang X, Daszczuk P, Mazurek P, Pieczonka T, Amaro K, Wang G, Ramos R, Wang X, Kandyba E, Plikus M, Yun K, Israel M, **Kobielał K.** Id2 - the key to hair follicle stem cells homeostasis quiescence. 4th Baltic Stem Cell meeting, Warsaw, Poland, 2018
64. Daszczuk P, Boryn LM, Wang X, Mazurek P, Pieczonka T, Łukaszyk K, Wang G, Kandyba E, Plikus M, **Kobielał K.** pSmad1/5/8(9) - the trigger of gene inhibitory network activation in hfSCs. 4th Baltic Stem Cell meeting, Warsaw, Poland, 2018

