

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.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy różnicowania trofektodermy w przedimplantacyjnym zarodku myszy

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Szczepanska, K.**, Stanczuk, L., and Maleszewski, M. (2011). Oct4 protein remains in trophectoderm until late stages of mouse blastocyst development. *Reprod Biol* **11**, 145-56. (IF=1,921; punkty MNiSW=15, cytowań 6)

Wkład habilitantki - 60%. Autor korespondencyjny. Zaplanowanie doświadczeń, czynna opieka nad oznaczeniami wykonanymi przez studenta, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu.

2. **Szczepanska, K.**, Stanczuk, L., and Maleszewski, M. (2011). Isolated mouse inner cell mass is unable to reconstruct trophectoderm. *Differentiation* **82**, 1-8. (IF=2,807; punkty MNiSW-30, cytowań 5)

Wkład habilitantki - 60%. Autor korespondencyjny. Zaplanowanie doświadczeń, czynna opieka nad oznaczeniami wykonanymi przez studenta, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu

3. Kondratiuk, I., Bazydło, K., Maleszewski, M., and **Szczepanska, K.** (2012). Delay of polarization event increases the number of Cdx2-positive blastomeres in mouse embryo. *Dev Biol* **368**, 54-62. (IF=3,868, punkty MNiSW- 35, cytowań 5)

Wkład habilitantki - 70%. Autor korespondencyjny. Zaplanowanie doświadczeń, czynna opieka nad oznaczeniami wykonanymi przez studenta, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu

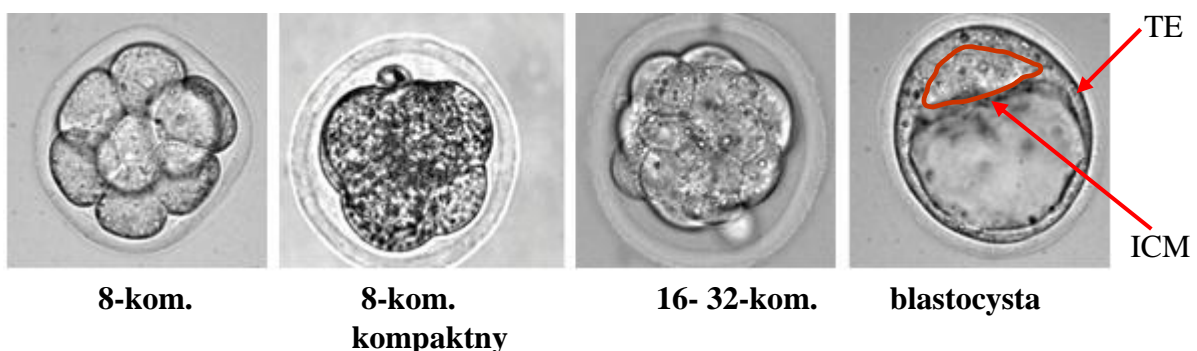
4. Humiecka, M., Szpila, M., Klos, P., Maleszewski, M., and **Szczepanska, K.** (2017). Mouse blastomeres acquire ability to divide asymmetrically before compaction. *PLoS One* **12**, e0175032. (IF=2,806 , punkty MNiSW- 40, cytowań 0)

Wkład habilitantki - 80%. Autor korespondencyjny. Zaplanowanie doświadczeń, wykonanie części doświadczeń, czynna opieka nad oznaczeniami wykonanymi przez studentów, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu

Łączny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia: 11,40; punkty MNiSW: 120.

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

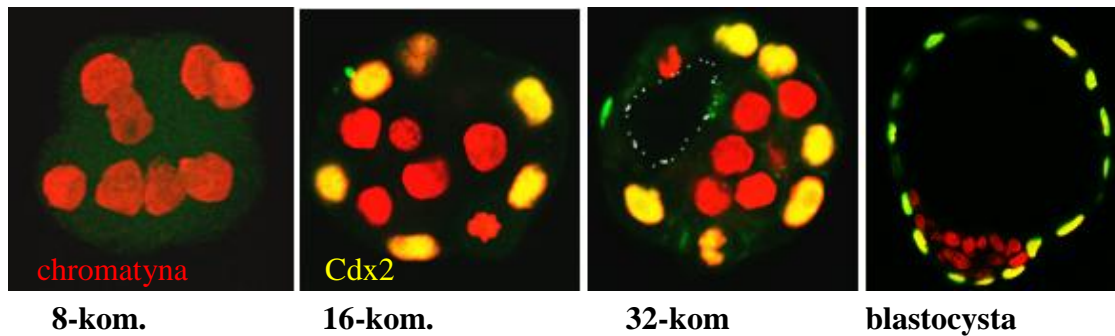
Jednym z najważniejszych procesów w rozwoju przeimplantacyjnym zarodka ssaka jest wytworzenie dwóch typów komórek – trofektodermy (TE) i wężła zarodkowego (ICM od ang. inner cell mass), które zasadniczo różnią się potencjałem rozwojowym. Komórki TE są pierwszą wyróżnicowaną tkanką pozazarodkową, umożliwiającą implantację zarodka w ścianach macicy a potem wchodzącą w skład łożyska. Natomiast komórki ICM zachowują pluripotencję i po implantacji wykształcają wszystkie tkanki zarodka oraz większość błon płodowych. Piątego dnia rozwoju, kiedy zarodek ma postać pęcherzyka zwanego blastocystą, komórki TE stanowią jego zewnętrzną warstwę, natomiast ICM to grupa komórek położonych wewnątrz, z jednej strony przylegająca do TE a z drugiej kontaktując się z płynem wypełniającym jamkę blastocysty (Ryc.1).



Ryc.1. Zmiany morfologiczne zarodka myszy podczas tworzenia blastocysty.

W stadium 8-komórkowym zarodek ulega kompacji na skutek tworzenia obwódek przylegania pomiędzy komórkami. Od stadium 16-komórkowego komórki zewnętrzne zarodka stają się prekursorami trofektodermy (TE). Tworzące się między nimi połączenia ściśle umożliwiają tworzenie jamki i stopniowe przekształcanie się w blastocystę. (Zdjęcia - E.Borsuk i D.Maluchnik)

Mechanizmy leżące u podstaw wyodrębniania się komórek TE nie są do końca wyjaśnione. Kluczowym momentem są zmiany zachodzące w blastomerach zarodka w stadium 8-komórkowym (Fleming i wsp., 1986; Johnson i Ziomek, 1981b; Reeve i Ziomek, 1981). Zarodek przechodzi wtedy kompaktę, polegającą na zwiększeniu przylegania blastomerów na skutek aktywacji i przemieszczeniu białek, takich jak E-kadheryna i β -katenina, do bocznych błon komórek. Tworzy się wtedy nowy typ połączeń między komórkami - obwódki przylegania (ang. adherent junctions) (Collins i Fleming, 1995; Fleming i Johnson, 1988). Ścisłszemu przyleganiu i spłaszczeniu komórek towarzyszy ich polaryzacja – w szczytowej części komórek, kontaktującej się ze środowiskiem zewnętrznym, powstaje tzw. domena apikalna. Przemieszczają się do niej białka takie jak aktyna i ezryna, które stabilizują utworzone tam skupienia mikrokosmków (Louvet i wsp., 1996). Po kolejnym podziale bruzdkowania, w stadium 16-komórkowej moruli, zarodek składa się z dwóch typów komórek: zewnętrznych, które od strony domeny apikalnej kontaktują się z otoczeniem i wewnętrznych, które stykają się z innymi blastomerami na całej swojej powierzchni (Johnson i Ziomek, 1981a; Johnson i Ziomek, 1983). Komórki zewnętrzne stają się prekursorami TE i zaczynają ekspresować czynnik transkrypcyjny Cdx2 (caudal-related homeobox 2), charakterystyczny marker komórek TE, który warunkuje rozwój tej linii komórkowej (Ryc.2) (Jedrusik i wsp., 2004; Ralston and Rossant, 2008; Strumpf i wsp., 2005). Komórki wewnętrzne wejdą w skład przyszłego węzła zarodkowego (ICM), którego charakteryzuje ekspresja czynników pluripotencji takich jak Oct4, Nanog i Sox2 (Albert i Peters, 2009; Avilion i wsp., 2003; Dietrich and Hiiragi, 2007; Niwa i wsp., 2005). Od stadium 32-komórkowego zarodek zaczyna przekształcać się w blastocystę. Jest to związane z procesem kawitacji, czyli powstawaniem wewnątrz zarodka jamki wypełnionej płynem. Kawitacja jest uwarunkowana formowaniem połączeń ścisłych (ang. tight junctions) w szczytowych częściach błon łączących komórki zewnętrzne (Collins i Fleming, 1995). Tworzone są z udziałem białek takich jak okludyna, cyngulina, ZO-1, ZO-2 czy Rab13, których gromadzenie rozpoczęło się już w czasie kompaktacji w zarodku 8-komórkowym. Połączenia ścisłe, pełniąc funkcję uszczelniającą, warunkują nabłonkowy charakter powstającej trofektodermi (Collins i Fleming, 1995). Podczas formowania blastocysty dochodzi do przestrzennego oddzielenia od siebie komórek TE i komórek ICM. Komórki TE stanowią pojedynczą warstwę spolaryzowanych komórek połączonych za pomocą połączeń ścisłych i obwódek przylegania, natomiast ICM to niezróżnicowane, pluripotentne komórki zlokalizowane wewnętrznie na jednym z biegunów jamki blastocysty (Johnson i Ziomek, 1981a).



Ryc.2. Ekspresja białka Cdx2 podczas przedimplantacyjnego rozwoju zarodka myszy. Białko Cdx2, charakterystyczny marker TE, jest ekspresjonowane przez zewnętrzne komórki zarodka od stadium 16-komórkowego. Zdjęcia przedstawiają lokalizację białka Cdx2 badano metodą immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. (Fot.K.Szczepańska)

Zrozumienie mechanizmów regulujących wyodrębnianie się pierwszej linii komórkowej jaką jest TE jest przedmiotem badań od wielu lat (Beck i wsp., 1995; Niwa i wsp., 2005; Palmieri i wsp., 1994; Strumpf i wsp., 2005). Uważa się, że w różnicowaniu komórek TE znaczenie ma zarówno zewnętrzna pozycja blastomerów w zarodku (Tarkowski i Wroblewska, 1967) jak i ich polaryzacja, (Johnson i Ziomek, 1981b).

Badania przedstawione w pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego dotyczą mechanizmów wyodrębniania się trofektodermy w zarodku myszy, zarówno we wczesnych etapach jej różnicowania, kiedy powstają prekursorzy komórek trofektodermalnych (prace 3 i 4) jak i w ostatnim stadium przedimplantacyjnym, czyli blastocystie (prace nr 1 i 2).

Opis badań przedstawiono w kolejności publikacji wymienionych w pkt.4 b)

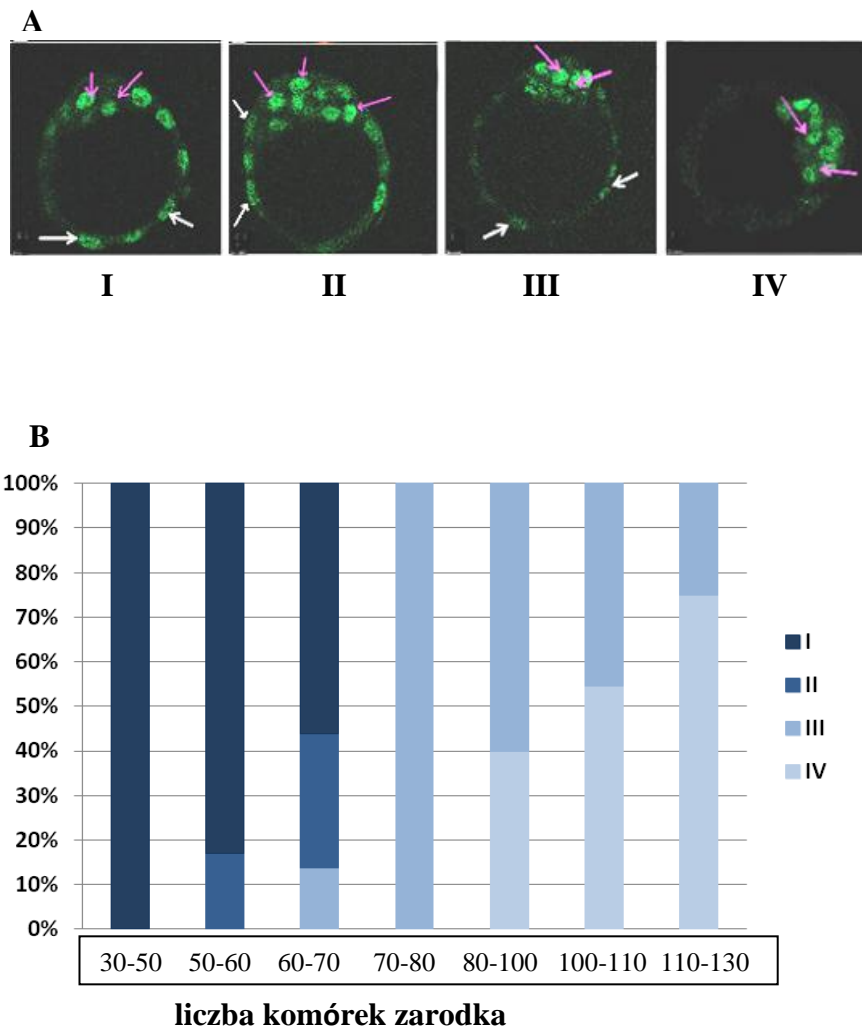
Określenie stadium rozwoju blastocysty, w którym w trofektodermie zanika czynnik pluripotencji Oct4

Szczepańska, K., Stańczuk, L. and Maleszewski M., Oct-4 protein remains in trophectoderm until late stages of mouse blastocyst development. *Reprod. Biol.* 2011, 145-56.

Wprowadzenie: Rozwój trofektodermy (TE) jest kontrolowany przez czynnik transkrypcyjny Cdx2 (caudal-related homeobox 2) (Beck i wsp., 1995; Strumpf i wsp., 2005), który pojawia się już w stadium 8-komórkowym we wszystkich komórkach, ale od stadium

16-komórkowej moruli jego ekspresja jest dużo wyższa w zewnętrznych blastomerach (Beck i wsp., 1995; Strumpf i wsp., 2005). W dalszym rozwoju zwiększająca się ekspresja Cdx2 w komórkach zewnętrznych jest przyczyną wygaszania ekspresji genu pluripotencji *Oct4* w tych komórkach (Niwa i wsp., 2005), co w rezultacie prowadzi do występowania białka Cdx2 wyłącznie w TE a białka Oct4 wyłącznie w ICM rozwiniętej blastocysty. Wiadomo, że stopniowe wygaszanie ekspresji Oct-4 w trofektodermie jest związane z antagonistycznym działaniem białka Cdx2, od którego zależy prawidłowe różnicowanie komórek TE. Mutanty *Cdx2^{-/-}*, pomimo utworzenia prawidłowej pod względem morfologicznym blastocysty, nie implantują się w endometrium macicy, a w ich trofektodermie nie dochodzi do obniżenia ekspresji Oct-4 (Strumpf i wsp., 2005). Z kolei czynnik Oct4 jest niezbędny do utrzymania pluripotencji komórek ICM i ich różnicowania, dlatego rozwijające się blastocysty mutantów *Oct4^{-/-}*, obumierają krótko po implantacji (Nichols i wsp., 1998). Zaobserwowane zależność pomiędzy białkami Cdx2 i Oct-4, polegająca na wzajemnej inhibicji jest warunkiem rozwoju prawidłowej blastocysty, w której Oct-4 występuje wyłącznie w komórkach ICM a Cdx2 tylko w TE. Zanim jednak dojdzie do przestrzennego zróżnicowania ekspresji białek Oct-4 i Cdx2, współwystępują one przez jakiś czas w trofektodermie rozwijającej się blastocysty (Dietrich and Hiiragi, 2007; Nichols i wsp., 1998; Palmieri i wsp., 1994; Ralston i wsp., 2010).

Celem moich badań było dokładne określenie stadium rozwoju blastocysty, w którym trofektoderma nie wykazuje już ekspresji czynnika pluripotencji Oct-4. Badania prowadzono metodą immunofluorescencji pośredniej, analizując lokalizację i poziom ekspresji białka Oct-4 na wszystkich stadiach rozwoju blastocysty, czyli od stadium 32-komórkowego, kiedy rozpoczyna się kawitacja i powstaje jamka blastocysty aż do stadium okołoinplantacyjnego, kiedy zarodek zbudowany jest ze 130-140 komórek. Dzięki dokładnej analizie udało się określić korelację między zmniejszającą się ekspresją Oct-4 i stadium rozwoju blastocysty, mierzonej liczbą komórek. **Wyniki** moich badań pokazały, że ekspresja białka Oct4 zmniejsza się stopniowo w trofektodermie rozwijającej się blastocysty aż do stadium późnej blastocysty, czyli wtedy gdy zarodek zbudowany jest ze 120-130 komórek. Wykazałam, że wygaszanie ekspresji Oct-4 w trofektodermie manifestuje się zarówno poprzez zmniejszającą się stopniowo ekspresją tego czynnika w TE a także zmniejszającą się liczbą komórek, które go ekspresjują (Ryc.3A).



Ryc.3. A) Stopnie ekspresji białka Oct-4 w trofektodermie: I- wysoka ekspresja Oct-4 w TE , II- ekspresja Oct-4 mniejsza w TE niż w ICM, III- Oct-4 obecny tylko w niektórych komórkach TE, IV- całkowity brak Oct-4 w komórkach TE. (białe strzałki - Oct-4 , różowe strzałki- Oct-4 w ICM). Lokalizację białka Oct-4 badano metodą immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. B) Zależność między liczbą komórek zarodka a ekspresją białka Oct-4 w komórkach TE. (I,II,III, IV - stopnie ekspresji Oct-4 przedstawione w punkcie A).

Uzyskane wyniki wskazują, że pierwsze oznaki zmniejszenia ilości Oct-4 w TE występują w blastocystach 50-60-komórkowych, jednakże w tych stadiach rozwoju ten czynnik transkrypcyjny jest ciągle obecny we wszystkich jądrach komórek TE (Fig.3B). Dopiero w stadium 70-komórkowym można zauważyć, że Oct-4 jest ekspresjonowany tylko w niektórych komórkach TE i od tego stadium obecność OCT-4 zaczyna ograniczać się stopniowo tylko do komórek ICM.

Najważniejszy osiągnięciem opisywanej pracy było wykazanie, że całkowite zakończenie ekspresji Oct-4 w TE następuje dopiero w stadium okołoinplantacyjnym, czyli wtedy gdy blastocysta jest zbudowana z około 130-140 komórek. Co interesujące, moje badania po raz pierwszy pokazały, że około 25% tych blastocyst wykazuje jeszcze niewielką ekspresję białka Oct-4 w niektórych komórkach TE. Można wnioskować, że całkowite wyciszenie ekspresji czynnika pluripotencji Oct-4 nie jest konieczne do rozwoju TE. Co więcej, badania wskazują, że w stadium 32-komórkowym, kiedy komórki prekursorowe TE wykazują jeszcze bardzo wysoki poziom ekspresji Oct-4, są one już zdeterminowane do tworzenia linii pozazarodkowej (Suwinska i wsp., 2008). Wydaje się więc, że o różnicowaniu TE decyduje wzrastający poziom ekspresji czynnika Cdx2 w tych komórkach a obecność czynnika Oct-4 nie ma wpływu na hamowanie tego procesu. Oct-4 jest jedynym spośród czynników pluripotencji pozostającym w komórkach TE aż do stadium okołoinplantacyjnego, ponieważ Nanog i Sox2, są wyciszane w TE już w stadium 64-komórkowym i ich ekspresja jest wykrywana wyłącznie w ICM (Cockburn and Rossant, 2010; Plusa i wsp., 2008). Co ciekawe, w zarodkach innych ssaków również wykazano długo utrzymującą się wysoką ekspresję Oct-4 w komórkach TE przez cały czas rozwoju blastocysty (Kuijk i wsp., 2008). W blastocystach świni i krowy, ekspresja Oct-4 w TE jest tak samo wysoka jak w komórkach ICM, co wskazuje, że czynnik ten nie jest u tych gatunków istotny w wyodrębnianiu się tych dwóch linii komórkowych a raczej, jak się sugeruje, uczestniczy w zapobieganiu zbyt wczesnemu różnicowaniu TE. Nie znana jest dotychczas rola jaką pełni Oct-4 w rozwijającej się TE blastocysty myszy i zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Zbadanie jak długo komórki ICM zachowują zdolność do tworzenia trofektoderm

Szczepańska, K., Stańczuk, L. and Maleszewski M., Isolated mouse inner cell mass is unable to reconstruct trophoctoderm. *Differentiation* 2011 82, 1-8

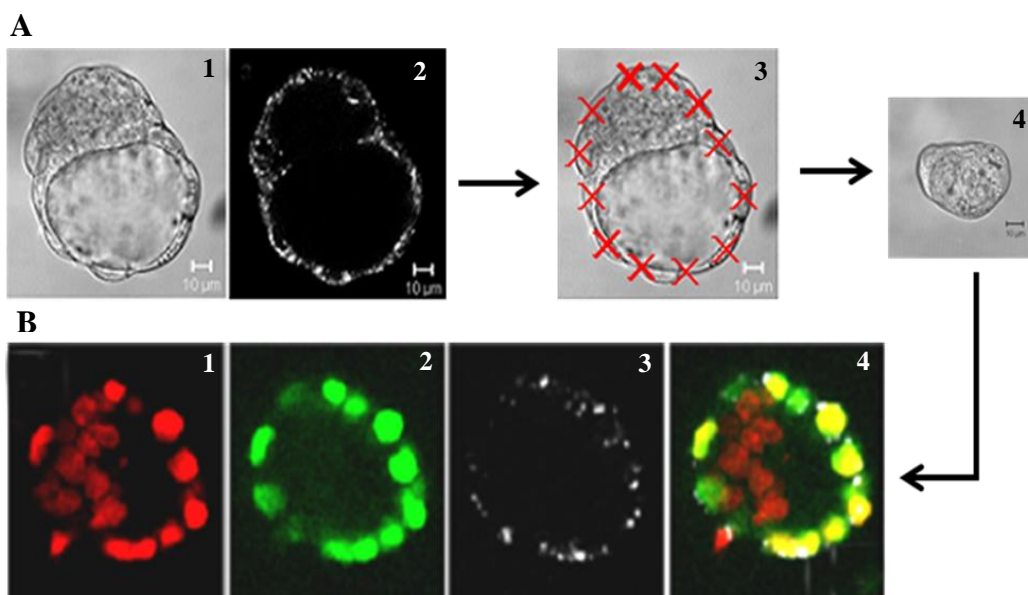
Wprowadzenie: Komórki TE są spolaryzowane i ekspresyjają czynnik Cdx2, który determinuje rozwój i funkcjonalność tej linii komórkowej w czasie implantacji blastocysty w śluzówce macicy (Beck i wsp., 1995; Strumpf i wsp., 2005). Komórki węzła zarodkowego (ICM) pochodzą z niespolaryzowanych komórek wewnętrznych zarodka i ekspresyjają czynniki pluripotencji: Oct-4, Nanog i Sox2 (Cockburn i Rossant, 2010). Wyróżnicowanie tych dwóch linii komórkowych zachodzi stopniowo, począwszy od stadium 16-komórkowego, kiedy po raz pierwszy powstają komórki wewnętrzne i zewnętrzne zarodka,

będące odpowiednio prekursorami komórek ICM i TE (Johnson i Ziomek, 1981a). Jednakże w tym stadium zarodka komórki nie są jeszcze ostatecznie zdeterminowane do tworzenia wyłącznie danej linii komórkowej i kierunek ich różnicowania można eksperymentalnie zmienić poprzez zmianę ich pozycji w zarodku (Suwinska i wsp., 2008; Ziomek i wsp., 1982). Okazuje się, że jeżeli komórki wewnętrzne zarodka 16-komórkowego, które w normalnym rozwoju są prekursorami ICM, zostaną po wyizolowaniu umieszczone zewnętrznie w eksperymentalnie utworzonym zarodku, to ulegają one polaryzacji, ekspresyjną *Cdx2* i przekształcają się w komórki TE w rozwijającej się blastocysty. Podobnie komórki zewnętrzne 16-komórkowego zarodka, będące prekursorami TE, po eksperymentalnym ulokowaniu wewnątrz zarodka, rozwijają się w komórki ICM. Stopień zdeterminowania losu komórek w późniejszych stadiach rozwoju zarodka, czyli od momentu powstania wczesnej blastocysty, był przedmiotem badań od wielu lat, ale wyniki tych doświadczeń są często sprzeczne (Beddington i Robertson, 1989; Eckert i wsp., 2004; Fleming i wsp., 1984; Nichols i Gardner, 1984; Pierce i wsp., 1988). Sugeruje się jednak, że komórki ICM dłużej pozostają plastyczne rozwojowo niż komórki TE, których różnicowanie już od stadium 32-komórkowego jest ograniczone tylko do tej jednej linii pozazarodkowej. Wykazano bowiem, że agregaty złożone wyłącznie z komórek TE tego stadium nie są już w stanie odtworzyć blastocysty, podczas gdy podobnie skonstruowane eksperymentalnie zarodki, ale zbudowane wyłącznie z komórek ICM, rozwijały się w prawidłowe blastocysty (Suwinska i wsp., 2008). O plastyczności komórek ICM w stadium 32-komórkowym świadczą również doświadczenia, w których z zarodków w tym stadium usuwano komórki TE. Wykazano, że wyizolowany w ten sposób ICM odtwarzał na swojej powierzchni komórki TE (Suwińska, niepublikowane). Wydaje się więc, że komórki ICM przynajmniej do stadium 32-komórkowego zachowują totipotencję, rozumianą jako zdolność do utworzenia struktur zarówno zarodkowych jak i pozazarodkowych. W dalszych etapach rozwoju blastocysty dochodzi do wyróżnicowania w obrębie ICM dwóch kolejnych linii komórkowych - pierwotnej endodermy (PE), która jest linią pozazarodkową wchodzącą po implantacji w skład pęcherzyka żółtkowego oraz epiblastu (EPI), budującego głównie struktury zarodkowe oraz współtworzącego błony płodowe. Te dwie linie komórkowe wyodrębniają się w rozwiniętej blastocysty tuż przed jej implantacją w ścianie macicy, ale komórki prekursorowe dla PE i EPI, z charakterystycznymi dla nich czynnikami transkrypcyjnymi, *GATA6* i *Nanog*, występują w obrębie ICM już w stadium 64-komórkowym (Chazaud i wsp., 2006). Wyniki wielu badań wskazują, że w tym stadium rozwoju blastocysty komórki ICM nadal mogą odtworzyć trofektodermę, ale dane na ten temat nie są jednoznaczne (Eckert i wsp., 2004; Handyside, 1978; Hogan i Tilly, 1978a;

Hogan i Tilly, 1978b; Johnson, 1979; Nichols i Gardner, 1984; Nishioka i wsp., 2009; Pierce i wsp., 1988; Rossant i Lis, 1979).

Autorzy wymienionych prac zakładali bowiem, że za pomocą metody immunochirurgicznej usuwane są wszystkie komórki TE, wobec tego źródłem nowopowstającej TE są przeprogramowane komórki ICM. Nie weryfikowano jednak w żaden sposób skuteczności użytej metody, wobec tego istnieje prawdopodobieństwo, że w tych eksperymentach TE odtwarzała się z "oryginalnych" komórek TE, które otaczały ICM i nie zostały skutecznie usunięte.

Celem naszych badań było sprawdzenie do jakiego stadium rozwoju blastocysty komórki ICM zachowują totipotencję, czyli mogą różnicować w komórki TE. Opierałam się na założeniu, że w od momentu wyróżnicowania TE następuje stopniowe zmniejszenie potencjału rozwojowego komórek ICM, od totipotencji charakteryzującej ICM wczesnej (32-komórkowej) blastocysty aż do pluripotencji, kiedy komórki ICM tracą zdolność do tworzenia TE i mogą różnicować już tylko w EPI i PE. Do usuwania komórek TE z blastocyst w różnych stadiach rozwoju (od 40- do 90-komórek) zastosowałam zmodyfikowaną metodę immunochirurgii. W naszych doświadczeniach jako pierwsi zastosowaliśmy fluorescencyjne znakowanie komórek TE przed ich usunięciem. Takie podejście eksperymentalne pozwoliło nam zweryfikować skuteczność metody immunochirurgii i zidentyfikować pochodzenie komórek, z których odtwarzana była TE (Ryc.4). Wyizolowany węzeł zarodkowy był hodowany *in vitro*, a komórki TE były identyfikowane na podstawie obecności czynnika Cdx2, będącego markerem tej linii komórkowej.



Ryc.4. A) Procedura usuwania komórek TE (3) była poprzedzona ich wyznakowaniem za pomocą kulek fluorescencyjnych (1- blastocysta w świetle przechodzącym, 2- komórki TE wyznakowane kulkami fluorescencyjnymi – obraz z mikroskopu konfokalnego). Wyizolowany węzeł zarodkowy (4) był hodowany *in vitro* przez około 26 godzin. B) W odtworzonych blastocystach badano lokalizację białka Cdx2 metodą immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. (1- chromatyna, 2-Cdx2, 3- kulki fluorescencyjne, 4- nałożenie zdjęć). (Fot.K.Szczepańska)

Wykazaliśmy, że węzły zarodkowe wyizolowane z blastocyst zawierających od 40 do 90 komórek nie wykazują już totipotencji, gdyż ich komórki nie są zdolne do różnicowania w komórki TE. Udowodniliśmy, że odtworzenie TE, obserwowane po hodowli niektórych izolowanych ICM, jest możliwe tylko z komórek oryginalnej TE, które często pozostają na powierzchni ICM po zastosowaniu metody immunochirurgii (Ryc.4). W świetle naszych badań możemy więc wnioskować, że obserwowane przez innych autorów odtwarzanie TE przez komórki ICM pochodzące ze stadium późniejszego niż 32-komórkowe było skutkiem niecałkowitego usuwania komórek TE z blastocysty. Nasze wyniki rzucają nowe światło na mechanizmy różnicowania i determinację losu komórek w obrębie ICM. Wykazaliśmy, że przed wyodrębnieniem kolejnej linii pozazarodkowej, jaką jest PE, kiedy komórki ICM stanowią jeszcze heterogenną pulę prekursorów PE i EPI, dochodzi do ograniczenia ich potencji rozwojowych i utraty zdolności do różnicowania w TE.

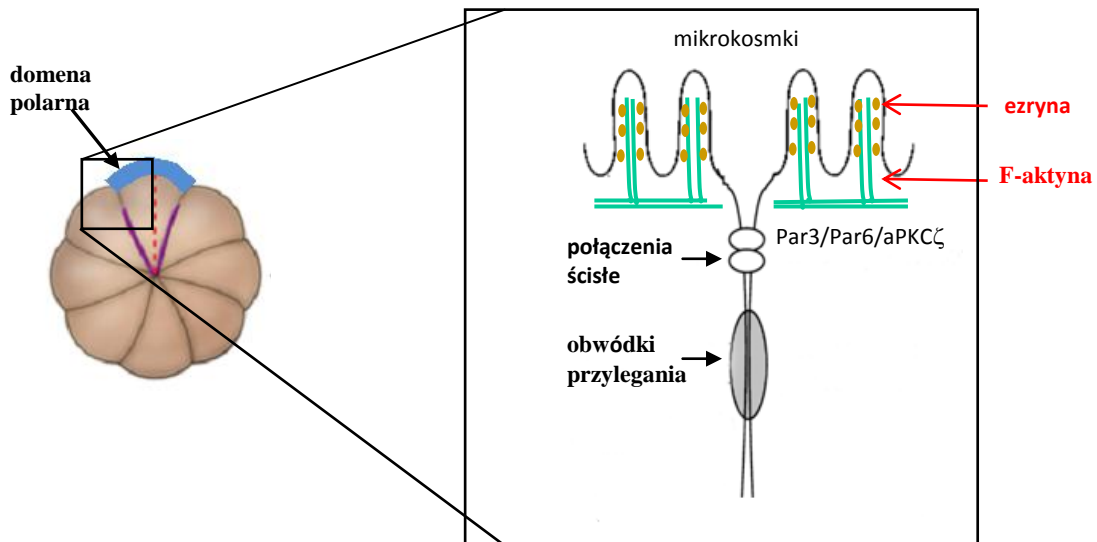
Określenie roli pozycji i polaryzacji w różnicowaniu komórek prekursorowych trofektodermy.

Kondratiuk, I., Bazydło K, Maleszewski, M., **Szczepańska, K.** Delay of polarization event increases the number of Cdx2-positive blastomeres in mouse embryo. *Dev. Biol.* 2012, 368, 54-62.

Od momentu, gdy zarodek zaczyna być zbudowany z komórek zewnętrznych i wewnętrznych, czyli od stadium 16-komórkowego, rozpoczyna się zróżnicowana ekspresja czynników transkrypcyjnych w obydwu populacjach komórek. Prekursory trofektodermy, czyli komórki zewnętrzne, ekspresjują białko Cdx2, natomiast w komórkach wewnętrznych, które staną się komórkami ICM, dominują czynniki pluripotencji, takie jak Sox2, Nanog i Oct-4 (Albert i Peters, 2009; Avilion i wsp., 2003; Dietrich i Hiiragi, 2007).

Jedną z teorii tłumaczących wyodrębnianie się komórek prekursorowych TE zakłada, że momentem kluczowym dla późniejszego zróżnicowania komórek zewnętrznych i wewnętrznych jest spolaryzowanie blastomerów, które ma miejsce w stadium 8-komórkowym podczas kompaktacji (Johnson i Ziomek, 1981b). Między blastomerami tworzą się wtedy obwódki przylegania a w części apikalnej komórek zarodka formuje się domena korykalna, gdzie skupiają się mikrokosmki stabilizowane przez filamenty aktynowe i ezrynę (Louvet i wsp., 1996). Dochodzi wtedy do asymetrycznego rozlokowania białek polaryzacyjnych PAR (*Partitioning defective*) (Ahringer, 2003) w taki sposób, że białko Par1

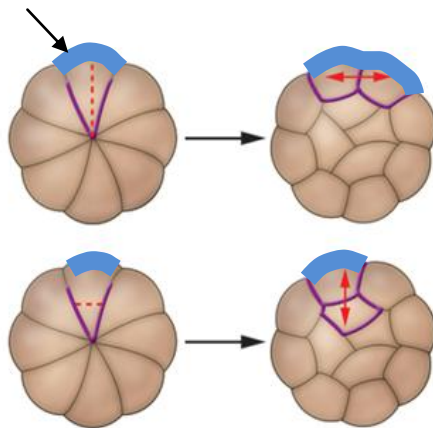
znajduje się w bocznych błonach komórek, natomiast białka Par3 i Par6 razem z kinazą białkową aPKC ζ tworzą kompleks, który umiejscawia się w części apikalnej blastomerów (Ryc.5) (Dard i wsp., 2009; Plusa i wsp., 2005; Vinot i wsp., 2005).



Ryc.5. Polaryzacja blastomerów zarodka 8-komórkowego. W apikalnej części komórek tworzy się domena polarna, w której mikrokosmki stabilizowane są przez filamenty aktynowe i ezrynę. Polaryzację blastomerów reguluje kompleks białek Par3/Par6/aPKC ζ , lokalizujący się w apikalnej części komórek. (zmodyfikowany schemat wg (Cockburn i Rossant, 2010)

Gdy spolaryzowane blastomery zarodka 8-komórkowego dzielą się (Johnson and Ziomek, 1981b), ich komórki potomne dziedziczą w nierównomierny sposób informację o polarności w postaci domeny apikalnej. Jeżeli komórka dzieli się w sposób symetryczny, to obydwie komórki potomne dziedziczą domenę apikalną i stają się komórkami spolaryzowanymi, zlokalizowanymi zewnętrznie w zarodku. Jeżeli komórka dzieli się w sposób asymetryczny, to powstaje jedna spolaryzowana komórka zewnętrzna i jedna komórka wewnętrzna, niespolaryzowana. Po dwóch rundach podziałów asymetrycznych i symetrycznych (stadia 8→16 i 16→32) zarodek zbudowany jest ze spolaryzowanych komórek zewnętrznych, które ekspresyjają białko Cdx2 i stają się prekursorami trofektodermi oraz niepolarnych komórek wewnętrznych, które stają się komórkami węzła zarodkowego w tworzącej się blastocystie (Ryc.6)

domena polarna



podział symetryczny

komórki zewnętrzne = prekursorzy TE
spolaryzowane

podział asymetryczny

komórka zewnętrzna = prekursorzy TE
spolaryzowane

komórka wewnętrzna = prekursor ICM
niespolaryzowane

zarodek 8-komórkowy 16-komórkowy

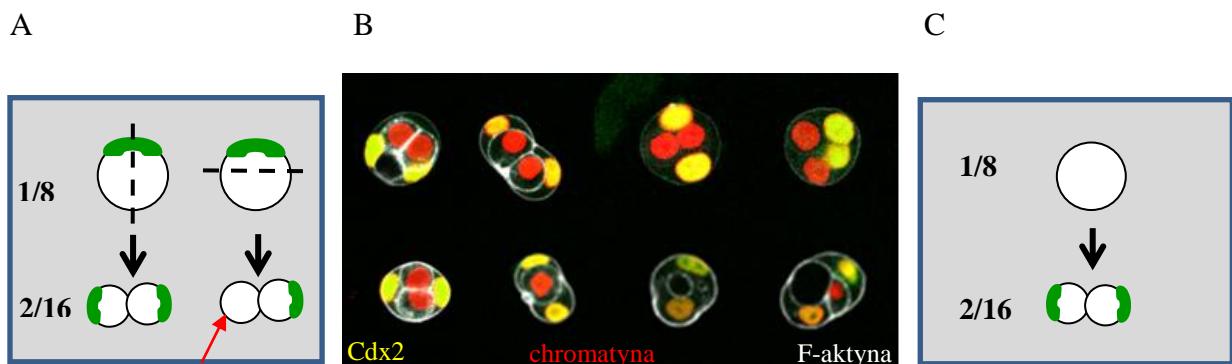
Ryc.6. Powstawanie prekursorów TE i ICM podczas podziałów symetrycznych i asymetrycznych spolaryzowanych blastomerów 8-komórkowego zarodka myszy. Komórki dziedziczące domenę polarną stają się prekursorami TE. Komórki niepolarne wejdą w skład przyszłego ICM blastocysty. Schemat wg (Cockburn i Rossant, 2010)

Pozycja jaką komórki zajmują w zarodku od dawna wydawała się być ważnym czynnikiem decydującym o ich przeznaczeniu. Model „outside-inside” (Tarkowski i Wroblewska, 1967) wskazywał, że odmienne otoczenie w jakim znajdują się komórki zewnętrzne i wewnętrzne może być przyczyną ich zróżnicowanego rozwoju. Model pozycyjny poparły wyniki badań, w których zmieniona pozycja komórek w zarodku 16- i 32-komórkowym powodowała determinację ich losu zgodną z nowym położeniem (Suwinska i wsp., 2008; Tarkowski i wsp., 2010; Ziomek i Johnson, 1982; Ziomek i wsp., 1982). Rola informacji pozycyjnej w różnicowaniu komórek został ostatnio uzupełniony o nowe dane wskazujące, że wyodrębnianie się komórek TE w zarodku związane jest z udziałem ścieżki sygnalizacyjnej Hippo (Ota i Sasaki, 2008), której aktywność zależy od liczby kontaktów międzykomórkowych. Wykazano, że ekspresja białka Cdx2 w komórkach zewnętrznych zarodka jest związana z zahamowaniem aktywności ścieżki Hippo i że ścieżka ta jest aktywna tylko w komórkach wewnętrznych (Nishioka i wsp., 2009). Lokalizacja komórek w zarodku wydaje się więc być ważnym czynnikiem decydującym o determinacji ich losu.

Jednak komórki zewnętrzne i wewnętrzne różnią się nie tylko lokalizacją w zarodku, ale są również różne pod względem jakościowym. Ponieważ, jak wspomniano wcześniej, są generowane w czasie asymetrycznych podziałów blastomerów zarodka 8-komórkowego, dziedziczą w nierównomierny sposób domenę polarną. Wykazano, że jej obecność w

komórkach zewnętrznych zarodka warunkuje ekspresję białka Cdx2. Komórki, w których obniżono aktywność elementów kompleksu polaryzacyjnego, takich jak Par6 lub aPKC ζ , ekspresyjają mniej białka Cdx2 (Alarcon, 2010) lub częściej dzielą się asymetrycznie, co prowadzi do powstawanie większej liczby komórek ICM (Plusa i wsp., 2005).

Ponieważ związek pomiędzy pozycją komórki w zarodku, jej polaryzacją i ekspresją białka Cdx2 nie jest do końca jasny, **celem moich badań** było określenie roli tych czynników w czasie wyróżnicowania prekursorów trofektodermy. Aby to osiągnąć pozycja komórek w zarodku była eksperymentalnie zmieniana lub/i zaburzano ich polaryzację, po czym oceniano jak wpłynie to na ekspresję markera trofektodermy - białka Cdx2 w powstałych komórkach potomnych. Badania prowadzone były na pojedynczych blastomerach wyizolowanych z zarodka 8-komórkowego (zwanymi 1/8), które jak wiadomo (Dietrich i Hiiragi, 2007) zachowują zdolność do przechodzenia podziałów symetrycznych i asymetrycznych w czasie hodowli *in vitro*. Taki układ eksperymentalny zapewniał zmianę pozycji komórek wobec tej, która ma miejsce w zarodku, ponieważ zapobiegał powstawaniu komórek wewnętrznych w stadium 16-komórkowym (Ryc.7A). W naszych doświadczeniach blastomery 1/8 przechodziły *in vitro* dwie kolejne rundy podziałowe, tworząc 4-komórkowe fragmenty zarodka odpowiadające stadium 32-komórkowemu (zwane 4/32). Wykazaliśmy, że w kompletach 8 fragmentów 4/32 pochodzących ze wszystkich blastomerów zarodka 8-komórkowego (Ryc.7B) liczba komórek ekspresyjujących białko Cdx2 jest taka sama jak w całym zarodku 32-komórkowym (Ryc.2).

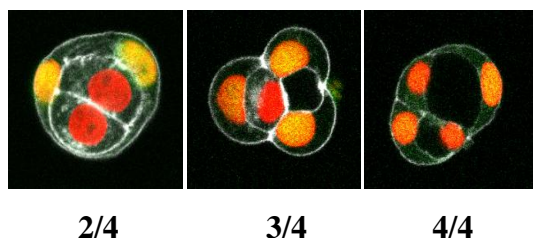


Ryc.7. A) Schemat eksperymentu, w którym pojedyncze blastomery zarodka 8-komórkowego przechodziły podziały symetryczne i asymetryczne. Przedstawiona jest pierwsza runda podziałów (blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16). Na zielono zaznaczono domenę polarną. Czerwona strzałka wskazuje blastomer, którego pozycja została zmieniona z wewnętrznej na zewnętrzną w porównaniu z zarodkiem 16-komórkowym. B) Komplet 8 fragmentów 4-komórkowych powstałych po dwóch rundach podziałów - (blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16 → fragment 4/32). Lokalizację białka Cdx2 badano metodą immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. C) Schemat eksperymentu, w którym polaryzacja blastomerów następowała po pierwszej rundzie podziałów blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16.

Można więc wnioskować, że ekspresja białka Cdx2 zależy nie od samego położenia blastomeru w zarodku, ale od dziedziczonej w trakcie podziałów domeny polarnej.

Uzyskaliśmy również dodatkowy dowód przemawiający za kluczową rolę polaryzacji w wyodrębnianiu komórek prekursorowych trofektodermy. W doświadczeniach, w których izolowano blastomery stadium 8-komórkowego na tyle wcześnie, że nie były to jeszcze komórki spolaryzowane, po następnym podziale uzyskiwaliśmy fragmenty 2/16, w którym obydwie komórki ulegały polaryzacji (Ryc.7C). W ten sposób opóźniliśmy polaryzację do stadium 16-komórkowego a dodatkowo w tym modelu wszystkie blastomery odpowiadające temu stadium zarodka były spolaryzowane, co nigdy nie zachodzi w całym zarodku. Zaobserwowane po następnej rundzie podziałowej, czyli we fragmentach 4/32, zwiększenie liczby komórek ekspresyjujących białko Cdx2, potwierdziło nasze przypuszczenia, że polarność komórek jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wyodrębnianie się prekursorów trofektodermy.

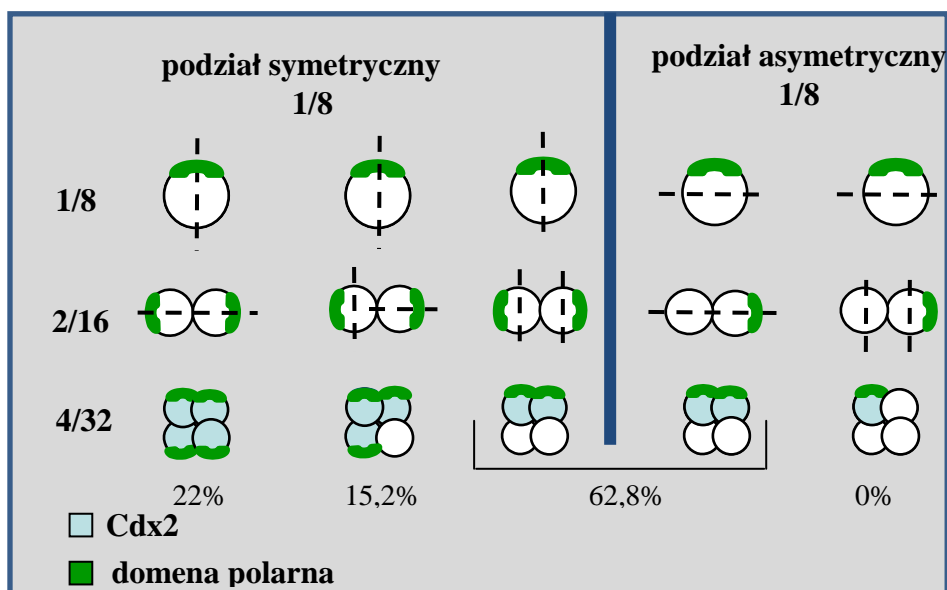
Ważnym osiągnięciem naszej pracy było też dokładne scharakteryzowanie wzorów ekspresji białka Cdx2 w uzyskanych fragmentach 4/32 oraz zwrócenie uwagi na zróżnicowaną morfologię tworzących je komórek (Ryc.8). Stwierdziliśmy, że najczęściej powstającym fragmentem 4/32 jest taki, w którym występują dwie duże komórki ekspresyjujące białko Cdx2, otaczające dwie mniejsze Cdx2-negatywne komórki. Zauważyliśmy również, że opóźnienie polaryzacji do stadium 16-komórkowego zwiększyło częstość powstawania fragmentów 4/32, w których wszystkie komórki ekspresyjują białko Cdx2.



Ryc.8. Wzory ekspresji białka Cdx2 uzyskane we fragmentach 4/32 powstałych po dwóch rundach podziałów (blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16 → fragment 4/32). Oznaczenia wzorów ekspresji: 2/4 - dwie komórki ekspresyjujące Cdx2, 3/4 - trzy komórki Cdx2, 4/4 - cztery komórki Cdx2. Lokalizację białka Cdx2 badano metodą immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej.

Aby wyjaśnić sposób powstawania wszystkich wzorów ekspresji białka Cdx2 w uzyskanych eksperymentalnie 4-komórkowych fragmentach zarodków, stworzyliśmy model dziedziczenia

domeny polarnej podczas dwóch rund podziałów (blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16 → fragment 4/32) z uwzględnieniem wszystkich możliwych podziałów symetrycznych i asymetrycznych (Ryc.9). Dzięki naszemu modelowi mogliśmy na podstawie częstości uzyskiwania fragmentów 4/32 z różnymi wzorami ekspresji Cdx2, przeanalizować liczbę i kolejność podziałów symetrycznych i asymetrycznych przebiegających od blastomeru 1/8 do fragmentu 4/32. Szczegółowa analiza pozwoliła nam wnioskować, że informacja o polarności jest dziedziczona nie tylko w czasie podziału 8→16, ale również w następnej rundzie podziałowej 16→32, co jest odzwierciedlone w liczbie komórek prekursorowych trofektodermy ekspresyjujących białko Cdx2.



Ryc.9. Model dwóch rund podziałów: blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16 → fragment 4/32. Ekspresja Cdx2 zależy od dziedziczenia domeny polarnej przez komórki potomne powstające w czasie podziałów symetrycznych i asymetrycznych. Najczęściej powstający fragment, z dwiema komórkami ekspresyjującymi Cdx2 (wzór 2/4), może powstać zarówno z symetrycznego jak i asymetrycznego podziału blastomeru 1/8.

Podsumowując, w tej pracy udowodniliśmy że czynnikiem decydującym o powstawaniu prekursorów trofektodermy jest polaryzacja komórki a nie jej położenie w zarodku. Co więcej, zwróciliśmy uwagę na sposób oddziaływania blastomerów we fragmentach 4/32, co przejawiało się często obrastaniem mniejszych komórek przez większe, które ekspresywały białko Cdx2.

Nasze wnioski zostały później poparte przez innych badaczy, którzy wykazali, że komórki, które w trakcie podziału asymetrycznego dziedziczą domenę polarną, różnią się własnościami biomechanicznymi od komórek niespolaryzowanych, co wpływa na ich wzajemne interakcje

decydujące o późniejszej lokalizacji w zarodku (Anani i wsp., 2014; Lorthongpanich i Issaragrisil, 2015; Maitre i wsp., 2015; Maitre i wsp., 2016; Samarage i wsp., 2015). Wykazano, że na skutek różnic w kurczliwości korteksu, komórki spolaryzowane mają zdolność obrastania komórek apolarnych, które w wyniku tego są przemieszczane do środka zarodka. Determinacja losu komórek trofektodermi jest więc związana z obecnością domeny polarnej a położenie komórki w zarodku wydaje się być sprawą wtórną.

Rolę polaryzacji w wyróżnianiu komórek trofektodermi potwierdziły również badania, w których wykazano w jaki sposób kompleks polaryzacyjny PAR3-PAR6-aPKC ζ wpływa na ekspresję białka Cdx2 poprzez hamowanie ścieżki Hippo (Chazaud i Yamanaka, 2016; Hirate i wsp., 2013; Lorthongpanich i Issaragrisil, 2015). Wykazano, że białko AMOT (angiomotyna), które jest istotne w aktywacji ścieżki Hippo i w komórkach wewnętrznych zlokalizowane jest w połączeniach adhezyjnych, jest inaczej ulokowane w komórkach zewnętrznych. Na skutek interakcji z kompleksem białek polaryzacyjnych AMOT wiąże się z domeną polarną, uniemożliwiając aktywację ścieżki Hippo w tych komórkach, co sprzyja ekspresji białka Cdx2 i różnicowaniu komórek TE (Hirate i wsp., 2013).

Zbadanie kiedy komórki przedimplantacyjnego zarodka uzyskują zdolność do przechodzenia podziałów różnicujących

Humięcka M., Szpila M., Kłóś P., Maleszewski M., **Szczepańska K.** Mouse blastomeres acquire ability to divide asymmetrically before compaction. *PLoS One*, 2017, **12**, e0175032.

Podziały różnicujące (asymetryczne), jakie przechodzą spolaryzowane blastomery zarodka 8-komórkowego, dają początek dwóm populacjom komórek o różnym przeznaczeniu - komórkom prekursorowym trofektodermi i komórkom wężła zarodkowego (Johnson i Ziomek, 1981a; Yamanaka i wsp., 2006). Podstawą podziałów różnicujących jest nierównomierne dziedziczenie domeny polarnej przez komórki potomne zarodka 8-komórkowego, decydujące również o odpowiedniej pozycji w zarodku. Komórki spolaryzowane lokalizują się zewnętrznie, podczas gdy komórki niespolaryzowane stają się komórkami wewnętrznymi zarodka. Na podstawie średniej liczby blastomerów wewnętrznych w stadium 16-komórkowym ustalono, że przynajmniej 5 blastomerów zarodka 8-komórkowego przechodzi podział asymetryczny, natomiast reszta dzieli się w sposób

symetryczny, dając wyłącznie blastomery zewnętrzne (Anani i wsp., 2014; Handyside, 1981; Suwinska i wsp., 2008).

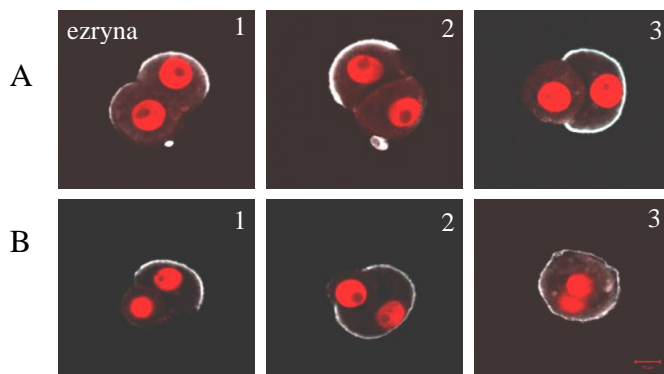
Do tej pory nie wiadomo co decyduje o sposobie podziału blastomerów zarodka 8-komórkowego. Przypuszcza się, że blastomery dzielą się symetrycznie lub asymetrycznie w sposób losowy (Dard i wsp., 2009), ale są też dane przemawiające za pewną predeterminacją rodzaju podziałów. Może ona wynikać z heterogenności blastomerów pod względem ilości białek kompleksu polaryzacyjnego Par3/Par6/aPKC ζ (Jedrusik i wsp., 2008) lub/i zróżnicowanej ekspresji genów regulujących pluripotencję, takich jak Sox-21 (Goolam i wsp., 2016). Wykazano, że zmniejszenie ilości białek Par3 lub aPKC powoduje zwiększenie częstotliwości podziałów asymetrycznych, powodując zwiększenie liczby komórek wchodzących w skład ICM (Plusa i wsp., 2005), podczas gdy wzrost ekspresji Cdx2 koreluje z podniesieniem ekspresji aPKC i wzrostem liczby podziałów symetrycznych (Jedrusik i wsp., 2008). Jednocześnie pokazano, że obniżenie ekspresji czynnika pluripotencji Sox21 prowadzi do zwiększenia ekspresji Cdx2 w stadium 8-komórkowym i powstawania większej liczby komórek tworzących linię pozazarodkową (Goolam i wsp., 2016).

Wyniki naszych badań opisanych w poprzedniej publikacji (Kondratiuk i wsp., 2012) wskazują, że liczba podziałów symetrycznych i asymetrycznych jakie przechodzą blastomery od stadium 8-komórkowego do 32-komórkowego podlega kontroli, niezależnie od tego czy podziały odbywają się w całym zarodku czy we fragmentach zarodka powstałych z pojedynczych blastomerów wyizolowanych z zarodka 8-komórkowego, o czym świadczy podobna liczba powstałych komórek ekspresyjujących białko Cdx2.

Celem pracy było określenie kiedy zostaje ustalony wzór podziałów blastomerów i w jakim stopniu zależy on od polaryzacji w osi bazalno-apikalnej, jaką uzyskuje blastomer w czasie kompaktacji zarodka. Ponadto chcieliśmy poszerzyć nasze obserwacje dotyczące oddziaływań blastomerów we fragmentach 4/32 i ustalić jak wyglądają interakcje komórek spolaryzowanych i niepolarnych w parach blastomerów 2/16, czyli po pierwszej rundzie podziałowej blastomeru 1/8. Aby to osiągnąć badania prowadzone były na pojedynczych blastomerach izolowanych z zarodków 8-komórkowych zarówno przed jak i po kompaktacji. Przeprowadziliśmy szczegółową analizę częstości podziałów symetrycznych i asymetrycznych, identyfikując rodzaj podziału w uzyskanych parach blastomerów 2/16 na podstawie obecności fosforylowanej ezryny, która lokalizuje się apikalnie tylko w komórkach spolaryzowanych. Wykazaliśmy, że blastomery wyizolowane z zarodków przed kompaktacją dzielą się głównie symetrycznie (66%), natomiast po kompaktacji prawie wszystkie (90%)

dziela się w sposób asymetryczny. Co więcej, wyizolowane blastomery przechodzą dużo częściej asymetryczne podziały niż blastomery całych zarodków podczas normalnego rozwoju. Możemy więc wnioskować, że na skutek oddziaływań przestrzennych liczba podziałów asymetrycznych jest redukowana w zarodku do najbardziej optymalnej. Ważnym osiągnięciem opisywanych badań było również wykazanie, że zanim dojdzie do kompaktacji zarodka i związanej z nią polaryzacji blastomerów, część blastomerów (34%) ma już zdolność do przejścia podziału asymetrycznego. Wskazuje to na wykształcanie się mechanizmu kontrolującego wzór podziału, zależnego prawdopodobnie od polaryzacji cytoplazmy komórki zachodzącej zanim nastąpi polaryzacja warstwy korytkalnej.

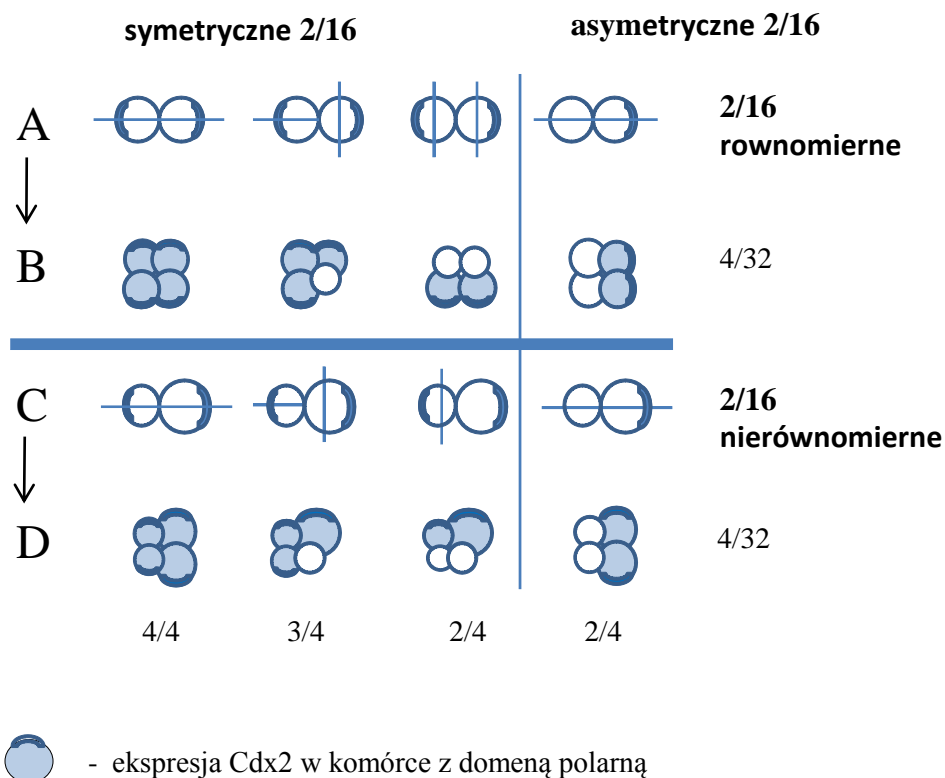
W badaniach prowadzonych na wyizolowanych blastomerach mieliśmy możliwość prześledzenia w jaki sposób powstałe w podziałach symetrycznych i asymetrycznych pary blastomerów 2/16 oddziałują ze sobą i tworzą po kolejnym podziale fragmenty 4/32 o określonych wzorach ekspresji białka Cdx2. Do tej pory wiadomo było, że podziały asymetryczne generują dwie populacje komórek o różnych właściwościach biomechanicznych, co powoduje obrastanie komórki apolarnej przez komórkę spolaryzowaną (Anani i wsp., 2014; Maitre i wsp., 2016). W naszej analizie wzięliśmy pod uwagę nie tylko rodzaj podziału, ale również wielkość powstających komórek potomnych i wykazaliśmy jako pierwsi, że obydwa rodzaje podziałów - symetryczne i asymetryczne, mogą być równomierne jak i nierównomierne (Ryc.10).



Ryc.10. Oddziaływania w parze blastomerów 2/16. A) 1. Podział symetryczny równomierny. 2. Podział asymetryczny równomierny. 3. Podział asymetryczny nierównomierny. B) Podział asymetryczny nierównomierny. 1,2,3 kolejne etapy obrastania małej niepolarnej komórki przez większą spolaryzowaną.

Biorąc pod uwagę wszystkie możliwe oddziaływania występujące pomiędzy komórkami apolarnymi a spolaryzowanymi w parach 2/16, mogliśmy uzupełnić wyniki uzyskane w poprzedniej pracy (Kondratiuk i wsp., 2012) i wyjaśnić dlaczego zwiększona częstość podziałów asymetrycznych w blastomerach zarodka kompaktowego manifestuje się

zwiększoną tendencją do tworzenia fragmentów 4/32, gdzie dwie komórki z czterech ekspresyjają białko Cdx2 (wzór ekspresji 2/4). Jednocześnie, dzięki stworzonemu przez nas modelowi podziałów, wskazaliśmy na różnorodność morfologii komórek budujących ten fragment w zależności od wielkości komórek (Ryc.11). Podobna analiza dotycząca podziałów blastomerów wyizolowanych z zarodka przed kompaktą pokazała związek między wysoką częstością podziałów symetrycznych a powstawaniem fragmentów 4/32, w których wszystkie komórki ekspresyjają białko Cdx2. Wykazaliśmy, że na sposób oddziaływania komórek wpływa przede wszystkim obecność domeny polarnej dziedziczonej podczas dwóch obserwowanych podziałów a nie wielkość oddziaływujących ze sobą komórek.



Ryc.11. Model dwóch rund podziałów: blastomer 1/8 → para blastomerów 2/16 → fragment 4/32. Ekspresja Cdx2 zależy od dziedziczenia domeny polarnej przez komórki potomne powstające w czasie podziałów symetrycznych i asymetrycznych. Uwzględniono różnice wielkości komórek.

PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za wyodrębnianie się linii komórek TE ulegających specjalizacji z komórek pierwotnie niezróżnicowanych i totipotencyjnych ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia jak w zarodku ssaka jest determinowany i realizowany jego wzór rozwoju. Badania nad różnicowaniem komórkowym zachodzącym podczas tworzenia blastocysty mogą również pomóc w lepszym zrozumieniu natury komórek pluripotencyjnych znajdujących się w ICM, które mogą być źródłem linii zarodkowych komórek macierzystych (ES - z ang.: Embryonic Stem Cells), dających ogromne nadzieje dla medycyny regeneracyjnej. Moje badania wpisują się w te zagadnienia a ich wyniki rozszerzyły nieco wiedzę na ten temat.

W publikacjach wchodzących w skład Osiągnięcia skupiam się na mechanizmach różnicowania trofektodermy na kolejnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy. Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych prac uważam:

- określenie stadium blastocysty, w którym komórki ICM tracą totipotencję i nie mogą już różnicować w komórki TE
- wykazanie, że rozwój trofektodermy w blastocystie odbywa się w obecności czynnika pluripotencji Oct-4 a jego całkowite wyciszenie następuje dopiero w stadium okołoinplantacyjnym
- pokazanie, że polaryzacja komórki a nie jej pozycja jest głównym czynnikiem prowadzącym do tworzenia prekursorów trofektodermy
- wykazanie, że w trakcie kompaktacji wszystkie blastomery uzyskują zdolność do przechodzenia podziałów asymetrycznych, jako wynik stopniowej, asynchronicznej polaryzacji komórek
- utworzenie modelu podziałów blastomerów od stadium 8-komórkowego do stadium 32-komórkowego z uwzględnieniem oddziaływań komórkowych wpływających na ekspresję białka Cdx2

Należy podkreślić, że zastosowany przez mnie układ ekperymentalny polegający na hodowli in vitro pojedynczych blastomerów przechodzących kolejne podziały bruzdkowania, pozwolił na obserwację i wnikliwą analizę oddziaływań między powstającymi komórkami potomnymi, co nie byłoby możliwe podczas badania całego zarodka.

Piśmiennictwo

- Ahringer, J. (2003). Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 73-81.
- Alarcon, V. B. (2010). Cell polarity regulator PARD6B is essential for trophoctoderm formation in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* **83**, 347-58.
- Albert, M., i Peters, A. H. (2009). Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 113-21.
- Anani, S., Bhat, S., Honma-Yamanaka, N., Krawchuk, D., and Yamanaka, Y. (2014). Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development* **141**, 2813-24.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**, 126-40.
- Beck, F., Erler, T., Russell, A., and James, R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* **204**, 219-27.
- Beddington, R. S., and Robertson, E. J. (1989). An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* **105**, 733-7.
- Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* **143**, 1063-74.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* **10**, 615-24.
- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest* **120**, 995-1003.
- Collins, J. E., and Fleming, T. P. (1995). Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time. *Trends Biochem Sci* **20**, 307-12.
- Dard, N., Louvet-Vallee, S., and Maro, B. (2009). Orientation of mitotic spindles during the 8- to 16-cell stage transition in mouse embryos. *PLoS One* **4**, e8171.
- Dietrich, J. E., and Hiiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* **134**, 4219-31.
- Eckert, J. J., McCallum, A., Mears, A., Rumsby, M. G., Cameron, I. T., and Fleming, T. P. (2004). PKC signalling regulates tight junction membrane assembly in the pre-implantation mouse embryo. *Reproduction* **127**, 653-67.
- Fleming, T. P., and Johnson, M. H. (1988). From egg to epithelium. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 459-85.

- Fleming, T. P., Pickering, S. J., QaSim, F., and Maro, B. (1986). The generation of cell surface polarity in mouse 8-cell blastomeres: the role of cortical microfilaments analysed using cytochalasin D. *J Embryol Exp Morph* **95**, 169-191.
- Fleming, T. P., Warren, P. D., Chisholm, J. C., and Johnson, M. H. (1984). Trophectodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* **84**, 63-90.
- Goolam, M., Scialdone, A., Graham, S. J., Macaulay, I. C., Jedrusik, A., Hupalowska, A., Voet, T., Marioni, J. C., and Zernicka-Goetz, M. (2016). Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. *Cell* **165**, 61-74.
- Handyside, A. H. (1978). Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* **45**, 37-53.
- Handyside, A. H. (1981). Immunofluorescence techniques for determining the numbers of inner and outer blastomeres in mouse morulae. *J Reprod Immunol* **2**, 339-50.
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A., and Sasaki, H. (2013). Polarity-dependent distribution of angiomin 1 localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol* **23**, 1181-94.
- Hogan, B., and Tilly, R. (1978a). In vitro development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts. I. Inner cell masses from 3.5-day p.c. blastocysts incubated for 24 h before immunosurgery. *J Embryol Exp Morphol* **45**, 93-105.
- Hogan, B., and Tilly, R. (1978b). In vitro development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts. II. Inner cell masses from 3.5- to 4.0-day p.c. blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* **45**, 107-21.
- Jedrusik, A., Parfitt, D. E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J. B., Johnson, M. H., Robson, P., and Zernicka-Goetz, M. (2008). Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev* **22**, 2692-706.
- Jedrusik, P., Januszewicz, A., Busjahn, A., Wocial, B., Ignatowska-Switalska, H., Strelau, J., F, C. L., and Januszewicz, W. (2004). The effects of genetic factors on selected indicators of the activity of the sympathoadrenal system and the renin-angiotensin-aldosterone system in twins. *Kardiol Pol* **61**, 423-9; discussion 430.
- Johnson, M. H. (1979). Molecular differentiation of inside cells and inner cell masses isolated from the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* **53**, 335-44.
- Johnson, M. H., and Ziomek, C. A. (1981a). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* **24**, 71-80.
- Johnson, M. H., and Ziomek, C. A. (1981b). Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol* **91**, 303-8.
- Johnson, M. H., and Ziomek, C. A. (1983). Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32-cell stage. *Dev Biol* **95**, 211-8.
- Kondratiuk, I., Bazydło, K., Maleszewski, M., and Szczepanska, K. (2012). Delay of polarization event increases the number of Cdx2-positive blastomeres in mouse embryo. *Dev Biol* **368**, 54-62.
- Kuijk, E. W., Du Puy, L., Van Tol, H. T., Oei, C. H., Haagsman, H. P., Colenbrander, B., and Roelen, B. A. (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev Dyn* **237**, 918-27.
- Lorthongpanich, C., and Issaragrisil, S. (2015). Emerging Role of the Hippo Signaling Pathway in Position Sensing and Lineage Specification in Mammalian Preimplantation Embryos. *Biol Reprod* **92**, 143.

- Louvet, S., Aghion, J., Santa-Maria, A., Mangeat, P., and Maro, B. (1996). Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* **177**, 568-79.
- Maitre, J. L., Niwayama, R., Turlier, H., Nedelec, F., and Hiragi, T. (2015). Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nat Cell Biol* **17**, 849-55.
- Maitre, J. L., Turlier, H., Illukkumbura, R., Eismann, B., Niwayama, R., Nedelec, F., and Hiragi, T. (2016). Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature*.
- Nichols, J., and Gardner, R. L. (1984). Heterogeneous differentiation of external cells in individual isolated early mouse inner cell masses in culture. *J Embryol Exp Morphol* **80**, 225-40.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-91.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., and Sasaki, H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* **16**, 398-410.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* **123**, 917-29.
- Ota, M., and Sasaki, H. (2008). Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* **135**, 4059-69.
- Palmieri, S. L., Peter, W., Hess, H., and Scholer, H. R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* **166**, 259-67.
- Pierce, G. B., Arechaga, J., Muro, C., and Wells, R. S. (1988). Differentiation of ICM cells into trophectoderm. *Am J Pathol* **132**, 356-64.
- Plusa, B., Frankenberg, S., Chalmers, A., Hadjantonakis, A. K., Moore, C. A., Papalopulu, N., Papaioannou, V. E., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz, M. (2005). Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* **118**, 505-15.
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., and Hadjantonakis, A. K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* **135**, 3081-91.
- Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J. S., and Rossant, J. (2010). Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137**, 395-403.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* **313**, 614-29.
- Reeve, W. J., and Ziomek, C. A. (1981). Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *J Embryol Exp Morphol* **62**, 339-50.
- Rossant, J., and Lis, W. T. (1979). The possible dual origin of the ectoderm of the chorion in the mouse embryo. *Dev Biol* **70**, 249-54.

- Samarage, C. R., White, M. D., Alvarez, Y. D., Fierro-Gonzalez, J. C., Henon, Y., Jesudason, E. C., Bissiere, S., Fouras, A., and Plachta, N. (2015). Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo. *Dev Cell* **34**, 435-47.
- Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093-102.
- Suwinska, A., Czolowska, R., Ozdzinski, W., and Tarkowski, A. K. (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol* **322**, 133-44.
- Tarkowski, A. K., Suwinska, A., Czolowska, R., and Ozdzinski, W. (2010). Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Dev Biol* **348**, 190-8.
- Tarkowski, A. K., and Wroblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* **18**, 155-80.
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., and Louvet-Vallee, S. (2005). Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* **282**, 307-19.
- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R. O., and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* **235**, 2301-14.
- Ziomek, C. A., and Johnson, M. H. (1982). The roles of phenotype and position in guiding the fate of 16-cell mouse blastomeres. *Dev Biol* **91**, 440-7.
- Ziomek, C. A., Johnson, M. H., and Handyside, A. H. (1982). The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J Exp Zool* **221**, 345-55.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Na mój dorobek naukowy składa się w sumie 20 publikacji. Łączny Impact Factor moich prac wynosi 49,21, Indeks Hirscha 8, liczba cytowań (bez autocytowań) – 287, punkty MNiSW – 371. W latach 2005-2008 byłam kierownikiem Grantu KBN (2PO4C 136 29) „Rola białek polaryzacyjnych PAR w przebiegu oogenezy i pierwszych etapach rozwoju zarodkowego myszy”. W latach 2000-2016 wykonawcą łącznie w 8 grantach o różnych źródłach finansowania (KBN, MNiSW i FNP).

Moja praca magisterska, wykonywana w Zakładzie Embriologii UW pod kierunkiem Prof. Dr hab. A.K.Tarkowskiego, dotyczyła strukturalnych zmian jąder plemników w cytoplazmie partenogenetycznych oocytów mysich. Po zakończeniu studiów podjęłam pracę w Zakładzie Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologicznego w Warszawie, gdzie mogłam rozwijać drugi nurt moich zainteresowań naukowych jakim jest immunologia ssaków. W pierwszym okresie mojej działalności zawodowej zajmowałam się patogenezą reumatoidalnego zapalenia stawów u ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem roli aktywacji

limfocytów T i interleukiny-1 w przebiegu choroby. W ramach prac badawczych prowadzonych przez Zakład Patofizjologii i Immunologii IR zajmowałam się aktywacją limfocytów w chorobach reumatoidalnych t.j. młodzieńczym przewlekłym zapaleniu stawów (mpzs) i reumatoidalnym zapaleniu stawów (rzs), dokonując oceny występowania markerów aktywacji na limfocytach T (DR/DP i IL-2R) oraz na limfocytach B (CD5). W badaniach fenotypowych oceniałam również obecność markerów różnicowania CD4 i CD8 na limfocytach T od chorych z różnym stopniem aktywności r.z.s. Zajmowałam się również badaniem niektórych parametrów odporności komórkowej u chorych na mpzs (m.in. reaktywnością limfocytów na stymulację za pomocą PHA).

Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskałam w roku 1994 na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tematem mojej rozprawy doktorskiej była rola komórek jednojądrowych i interleukiny-1 w patogenezie poadiuwantowego wielostawowego zapalenia u szczurów, zwierzęcego modelu reumatoidalnego zapalenia stawów. W ramach moich badań scharakteryzowałam fenotypowo komórki patogenne in situ i w śledzionie oraz oceniłam aktywność IL-1 podczas przebiegu choroby.

Wyniki moich badań z tego okresu zostały opublikowane w 4 pracach:

- **K.Szczepańska**, „Rola limfocytów T i makrofagów w rozwoju poadiuwantowego wielostawowego zapalenia u szczurów na podstawie badań fenotypowych.” (1992). *Reumatologia*, T XXX, 3/4, 210-216.
- E.Kontny, J. Nowak, **K. Szczepańska**, M. Ziółkowska, T. Juszczyk, H. Małdykowa, A. Ryżewska, „Zaburzenia fenotypowe limfocytów T i B zależne od wieku chorych z różnym stopniem aktywności choroby.”(1993). *Reumatologia*, T XXXI, 35-43.
- **K. Szczepańska**, "Involvement of interleukin-1 in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats".(1994). *Polish Journal of Immunology*, XIX, 4, 313-325.
- **K.Szczepańska**, „Udział komórek jednojądrowych i interleukiny-1 w patogenezie poadiuwantowego wielostawowego zapalenia u szczurów”. (1994). *Reumatologia*, T XXXII, 2, 125-132.

W roku 1995 odbyłam roczny staż na Uniwersytecie w Newcastle upon Tyne dzięki stypendium przyznanego przez brytyjskie Royal Society. W ramach stażu badałam rolę superantygenów bakteryjnych w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów, określając ekspresję genów dla cytokin typu Th1 i Th2 po stymulacji ludzkich komórek jednojądrowych z krwi obwodowej za pomocą superantygeny SPEA pochodzącego z patogennego szczepu

Streptococcus pyogenes. W powyższych badaniach stosowałam innowacyjną wówczas metodę ilościowej kompetycyjnej RT-PCR, z użyciem standardów wewnętrznych, którą wdrożyłam w Zakładzie Patofizjologii IR po powrocie do kraju. Ten okres mojej działalności naukowej (lata 1996-2000), związany z badaniami nad rolą cytokin w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów, zaowocował 3 publikacjami.

- **Szczepanska, K.**, Chrzanowska-Lightowlers, Z., Degnan, B. A., Diamond, A. G., Robson, T., Ryzewska, A., and Goodacre, J. A. (1999). Th1-type cytokine mRNA in rheumatoid arthritis mononuclear cells induced by streptococcal pyrogenic exotoxin A. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 1022-4.
- Kontny, E., Kurowska, M., **Szczepanska, K.**, and Maslinski, W. (2000). Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *J Leukoc Biol* **67**, 249-58.
- Kontny, E., **Szczepanska, K.**, Kowalczewski, J., Kurowska, M., Janicka, I., Marcinkiewicz, J., and Maslinski, W. (2000). The mechanism of taurine chloramine inhibition of cytokine (interleukin-6, interleukin-8) production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* **43**, 2169-77.

Moje doświadczenie zawodowe wykorzystałam również organizując pracownię biologii molekularnej w Zakładzie Fizjologii Klinicznej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Warszawie i uczestnicząc w prowadzonych tam badaniach nad ekspresją genów receptorów wazopresynowych w przebiegu nadciśnienia, czego efektem było współautorstwo w dwóch publikacjach.

- Gozdz, A., Szczepanska-Sadowska, E., **Szczepanska, K.**, Maslinski, W., and Luszczyk, B. (2002). Vasopressin V1a, V1b and V2 receptors mRNA in the kidney and heart of the renin transgenic TGR(mRen2)27 and Sprague Dawley rats. *J Physiol Pharmacol* **53**, 349-57
- Gozdz, A., Szczepanska-Sadowska, E., Maslinski, W., Kumosa, M., **Szczepanska, K.**, and Dobruch, J. (2003). Differential expression of vasopressin V1a and V1b receptors mRNA in the brain of renin transgenic TGR(mRen2)27 and Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bull* **59**, 399-403.

W roku 2000 rozpoczęłam pracę w Zakładzie Embriologii Wydziału Biologii UW, wracając do moich zainteresowań naukowych z okresu wykonywania pracy magisterskiej, czyli rozwoju przeimplantacyjnego zarodków ssaków. Dzięki zdobytemu wcześniej doświadczeniu wprowadziłam do Zakładu Embriologii techniki biologii molekularnej, co pozwoliło na

rozszerzenie warsztatu badawczego tej jednostki o możliwość badania ekspresji genów we wczesnym okresie rozwoju przedimplantacyjnego.

Moje zainteresowania naukowe skupiły się początkowo na najwcześniejszym okresie rozwoju zarodka ssaka, tuż po zapłodnieniu. Badając mechanizm powstawania bloku przeciwko polispermii na poziomie oolemy wykazałam, że nie uczestniczy w tym procesie białko CD9. Wyniki moich badań zostały opublikowane w 2003 roku.

- Komorowski, S., **Szczepanska, K.**, and Maleszewski, M. (2003). Distinct mechanisms underlie sperm-induced and protease-induced oolemma block to sperm penetration. *Int J Dev Biol* **47**, 65-9.

W ciągu następnych lat mojej działalności zawodowej uczestniczyłam w szeregu badań prowadzonych w Zakładzie Embriologii oraz Zakładzie Cytologii UW, związanych z określaniem ekspresji genów podczas rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy a także, w ramach współpracy z The CReATe Fertility Centre w Toronto, przedimplantacyjnych zarodków ludzkich. Efektem moich badań było współautorstwo w 5 publikacjach.

- Archacka, K., Ajduk, A., Pomorski, P., **Szczepanska, K.**, Maleszewski, M., and Ciemerych, M. A. (2008). Defective calcium release during in vitro fertilization of maturing oocytes of LT/Sv mice. *Int J Dev Biol* **52**, 903-12
- Bielak-Zmijewska, A., Kolano, A., **Szczepanska, K.**, Maleszewski, M., and Borsuk, E. (2008). Cdc42 protein acts upstream of IQGAP1 and regulates cytokinesis in mouse oocytes and embryos. *Dev Biol* **322**, 21-32.
- Ciemerych, M. A., Yu, Q., **Szczepanska, K.**, and Sicinski, P. (2008). CDK4 activity in mouse embryos expressing a single D-type cyclin. *Int J Dev Biol* **52**, 299-305.
- Balakier, H., Xiao, R., Zhao, J., Zaver, S., Dziak, E., **Szczepanska, K.**, Opas, M., Yie, S., and Librach, C. (2013). Expression of survivin in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril* **99**, 518-25.
- Krupa, M., Mazur, E., **Szczepanska, K.**, Filimonow, K., Maleszewski, M., and Suwinska, A. (2014). Allocation of inner cells to epiblast vs. primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8-->16- and 16-->32

cells). *Dev Biol* **385**, 136-48.

Głównym nurtem moich zainteresowań naukowych stała się polaryzacja komórek, zarówno podczas oogenezy jak i w trakcie rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy. Badania dotyczące roli białek polaryzacyjnych PAR w czasie przebiegu mejozy w oocycie myszy prowadziłam jako kierownik grantu finansowanego przez KBN. Udowodniłam, że białko LKB1, analog białka polaryzacyjnego Par4, zlokalizowane jest na wrzecionie podziałowym oocyty, przez co uczestniczy w polaryzacji oocyty i regulacji przebiegu asymetrycznego podziału komórki, podobnie jak białka Par3 i Par6. Wyniki moich badań zostały opublikowane w 2005 roku, wpisując się w nurt badań nad mechanizmem migracji wrzeciona podziałowego podczas oogenezy u ssaków.

- **Szczepanska, K.**, and Maleszewski, M. (2005). LKB1/PAR4 protein is asymmetrically localized in mouse oocytes and associates with meiotic spindle. *Gene Expr Patterns* **6**, 86-93.

W następnych latach rozszerzyłam moje zainteresowania naukowe dotyczące polaryzacji komórek, badając mechanizm wyodrębniania się pierwszych linii komórkowych podczas przedimplantacyjnego rozwoju zarodka myszy. Wyniki moich badań na ten temat stanowią przedmiot Osiągnięcia przedstawionego do oceny (4 publikacje) i zostały szczegółowo omówione w punkcie 4c.

- **Szczepanska, K.**, Stanczuk, L., and Maleszewski, M. (2011a). Isolated mouse inner cell mass is unable to reconstruct trophectoderm. *Differentiation* **82**, 1-8.
- **Szczepanska, K.**, Stanczuk, L., and Maleszewski, M. (2011b). Oct4 protein remains in trophectoderm until late stages of mouse blastocyst development. *Reprod Biol* **11**, 145-56.
- Kondratiuk, I., Bazydło, K., Maleszewski, M., and **Szczepanska, K.** (2012). Delay of polarization event increases the number of Cdx2-positive blastomeres in mouse embryo. *Dev Biol* **368**, 54-62.
- Humiecka, M., Szpila, M., Klos, P., Maleszewski, M., and **Szczepanska, K.** (2017). Mouse blastomeres acquire ability to divide asymmetrically before compaction. *PLoS One* **12**, e0175032

K. Szczepanska