

Autoreferat

Załącznik 3

DR NATALIA ROZWADOWSKA

**INSTYTUT GENETYKI CZŁOWIEKA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

POZNAŃ 2016

Spis treści:

I. Dane wnioskodawcy	3
II. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem miejsca i roku ich uzyskania wraz z tytułem pracy doktorskiej	3
III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
IV. Dorobek naukowy (Web of Science).....	4
V. Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe	5
VI. Omówienie prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe	6
VII. Omówienie innych kierunków badawczych.....	14

I. DANE WNIOSKODAWCY

Natalia Rozwadowska
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE Z PODANIEM MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA WRAZ Z TYTUŁEM PRACY DOKTORSKIEJ

- 1995 – 2000 Uniwersytet Przyrodniczy im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu
kierunek: biotechnologia
Temat pracy magisterskiej: Ocena transkrypcji genów systemu interleukiny-1 w gonadzie męskiej
Promotor: Prof. dr hab. Maciej Kurpisz
- 2005 Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Wydział Lekarski I
Temat pracy doktorskiej: Analiza molekularna genów systemu interleukiny-1 w gonadzie męskiej
Promotor: Prof. dr hab. Maciej Kurpisz
Doktorat z wyróżnieniem.

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 1998-2000 Instytut Genetyki Człowieka PAN
wolontariat; pracownia magisterska
- 2000 – 2006 Instytut Genetyki Człowieka PAN
stanowisko: biolog
- 2006 – 2015 Instytut Genetyki Człowieka PAN
stanowisko: adiunkt
- 2015 – obecnie Instytut Genetyki Człowieka PAN
stanowisko: asystent

W latach 2013-2015 przebywałam na stażu podoktorskim w Stem Cell Institute, University of Alabama Birmingham (UAB), Birmingham, USA

IV. DOROBIEK NAUKOWY (WEB OF SCIENCE)

Jestem autorka 48 publikacji naukowych:

- 34 prac oryginalnych (w tym nie posiadające *Impact Factor* – 3)
- 2 opisów przypadku (w tym nie posiadające *Impact Factor* - 1)
- 6 prac poglądowych (w tym nie posiadające *Impact Factor* – 4)
- 5 rozdziałów w książkach (w tym 4 o zasięgu międzynarodowym)
- 1 pracy pełnotekstowej w suplemencie czasopisma (posiadająca *Impact Factor*)

Dane bibliometryczne (na dzień 31.08.2016)

- Łączny *Impact Factor* publikacji naukowych, zgodnie z rokiem opublikowania: 98,885
- Index Hirscha: 9
- Liczba cytowań/liczba bez autocytowań: 572/535

Wygłosiłam 22 wykłady na konferencjach tematycznych oraz seminariach i jestem współautorka 40 ustnych oraz 60 plakatowych doniesień zjazdowych.

Projekty badawcze

W trakcie swojej pracy naukowej brałam lub biorę udział w realizacji 17 projektów badawczych.

Szczegółowy opis osiągnięć naukowych jest zawarty w załączniku 5 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej oraz popularyzacji nauki).

- V. CYKL PRAC STANOWIĄCYCH SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE (W/G ARTYKUŁU 16.2 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.) ZEBRANYCH POD ZBIORCZYM TYTUŁEM:

Charakterystyka molekularna oraz modyfikacja genetyczna mięśniowych komórek macierzystych w odniesieniu do ich przydatności w terapii regeneracyjnej

1. **Rozwadowska N**, Malcher A, Baumann E, Kolanowski TJ, Ruciński M, Miętkiewski M, Fiedorowicz K, Kurpisz M. *In vitro* culture of primary human myoblasts by using the dextran microcarriers Cytodex3[®] 2016 Jun 8. doi: 10.5603/FHC.a2016.0010. [Epub ahead of print]
IF 1,060; MNiSW 15
2. **Rozwadowska N**, Kolanowski T, Wiland E, Siatkowski M, Pawlak P, Malcher A, Miętkiewski T, Olszewska M, Kurpisz M Characterisation of nuclear architectural alterations during in vitro differentiation of human stem cells of myogenic origin. *PLoS One*. 2013 Sep 3;8(9):e73231.
IF 3,534; MNiSW 40
3. Wiernicki B*, **Rozwadowska N***, Malcher A, Kolanowski T, Zimna A, Rugowska A, Kurpisz M. (2015) Human myoblast transplantation in mice infarcted heart alters the expression profile of cardiac genes associated with left ventricle remodeling. *Int J Cardiol*. 202:710-721.
IF 4,638; MNiSW 40
4. **Rozwadowska N**, Kurpisz M Genetic Modification of Stem Cells in Ex Vivo Gene Therapy. In: Advances in Genetic Research. Vol . 8. Kevin V. Urbano (ed.). NOVA Science Publishers 2012, pp. 1-20.
MNiSW 5
5. **Rozwadowska N**, Kolanowski T, Wacławska A, Fraczek M, Kurpisz M Transgenic line of C2C12 myoblasts with constitutive overexpression of connexin-43 (GJA 1). In: New Frontiers in Heart Disease. Asher Kimchi (ed.).MEDIMOND 2012, pp. 1-8.
MNiSW 5
6. Kolanowski TJ*, **Rozwadowska N***, Malcher A, Szymczyk E, Kasprzak JD, Miętkiewski T, Kurpisz M In vitro and in vivo characteristics of connexin 43-modified human skeletal myoblasts as candidates for prospective stem cell therapy for the failing heart. *Int J Cardiol*. 2014 Apr 15;173(1):55-64.
IF 4,036; MNiSW 40
7. Romaniszyn M, **Rozwadowska N**, Malcher A, Kolanowski T, Walega P, Kurpisz M. Implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of fecal incontinence: result of an experimental pilot study *Techn. Coloproctol*. 2015;19:685-96.
IF 2,320; MNiSW 30

Łączny IF cyklu prac 15.588

* równy współudział autorów

OMÓWIENIE PRAC STANOWIĄCYCH SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Badania prowadzone nad poznaniem funkcji, cytofizjologii i procesem różnicowania komórek macierzystych w chwili obecnej stanowią jeden z wiodących trendów nauki światowej. Jest to tematyka niezwykle obiecująca ponieważ wykorzystanie uzyskanych wyników w praktyce klinicznej obejmuje choroby do tej pory uznawane za niewyleczalne (np. choroby neurodegeneracyjne), choroby cywilizacyjne (np. cukrzyca) czy choroby nowotworowe. Zanim jednak potencjał komórek macierzystych zostanie w pełni wykorzystany konieczne jest przeprowadzenie wielokierunkowych badań podstawowych oraz przedklinicznych na modelach zwierzęcych by w niebudzący zastrzeżeń sposób przejść do badań klinicznych.

Moje zainteresowania naukowe skupiają się na poznaniu właściwości macierzystych komórek mięśni szkieletowych – mioblastów (Mb) w układzie *in vitro* i *in vivo* na modelu myszy NOD-SCID oraz potencjalnym ich wykorzystaniu w terapii regeneracyjnej w odniesieniu do uszkodzonego niedokrwieniem serca i mięśni zwieraczy odbytu.

Dlatego też cel prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe został sformułowany jako:

Uzyskanie populacji macierzystych komórek mięśni szkieletowych optymalnie dla celów regeneracji narządów z uwzględnieniem uszkodzonego serca po zawale i mięśni zwieraczy odbytu.

Cel ten był realizowany poprzez:

Etap badań podstawowych:

- opracowanie wydajnego systemu izolacji i hodowli i oceny mioblastów ludzkich (hMb) wraz z możliwością zastosowania hodowli wielkoskalowych na nośnikach dextranowych
- ocenę profilu ekspresji oraz procesu różnicowania hMb z uwzględnianiem zmian architektury wewnątrzjądrowej jako elementu regulacji epigenetycznej
- modyfikację genetyczną hMb w celu uzyskania egzogennej ekspresji czynników wspomagających funkcje mioblastów *in situ*
- ocenę funkcjonalną uzyskanych populacji genetycznie modyfikowanych hMb *in vitro*

Etap badania przedklinicznych:

- opracowanie modelu pozawałowego serca na szczepie immunokompromisowanych myszy (NOD-SCID)
- ocenę przydatności uzyskanych populacji hMb w regeneracji uszkodzonego zawałem serca
- ocenę wpływu terapii komórkowej na profil ekspresji wybranych genów w sercu mysim
- ocenę biomarkerów korelujących z efektywnością terapii komórkowej w surowicy
- ocenę wpływu zastosowania egzogennej ekspresji białek w hMb na poprawę efektywności terapii

Etap badania klinicznych I fazy:

- weryfikację przydatności mioblastów do regeneracji uszkodzonych mięśni zwieraczy odbytu

Macierzyste komórki mięśni szkieletowych już od ponad dekady stanowią jeden z rodzajów komórek, które potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w terapiach regeneracyjnych¹. Moje zainteresowanie tym typem komórek zaczęło się już w roku 2002 kiedy opracowałam protokół izolacji i hodowli mioblastów ludzkich². Opracowana metoda izolacji i hodowli mioblastów została zastosowana do przygotowywania preparatów komórkowych wykorzystanych w dwóch badaniach klinicznych I fazy oceniających bezpieczeństwo ich stosowania w terapii pozawałowego miokardium zarówno poprzez bezpośrednie podania do mięśnia sercowego³ jak i poprzez małoinwazyjne podanie przezskórne⁴. W przeciągu następnych lat pod moją opieką powstały trzy prace magisterskie (mgr Małgorzaty Pupeckiej (2005); mgra Zbigniewa Czyża (2007) oraz mgra Grzegorza Cinciały (2010) załącznik 5, część III, pkt J), które w kompleksowy sposób oceniały uzyskiwane populacje komórek zarówno pod względem ekspresji genów na poziomie mRNA jak i białka, a także wpływu właściwości adhezyjnych komórek na charakterystykę uzyskiwanych populacji hMb (metoda izolacji typu pre-plate). Efektem tych prac jest opracowany i stosowany do tej pory panel rutynowej oceny jakościowej uzyskiwanych populacji mioblastów ludzkich składający się z: cytometrycznej analizy obecności antygenu CD56; immunocytofluorescencyjnej oceny obecności desminy (DES) jako markera komórek miogenicznych i MYH2 (ang. *myosin heavy chain 2*) - ciężkiego łańcucha miozyny jako markera obecności komórek na dalszym etapie różnicowania oraz ocena poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny MRF (ang. *myogenic regulatory factor* – miogenne czynniki regulatorowe) metodą PCR w czasie rzeczywistym (MYOG -miogenina, MYF4 – czynnik miogeniczny 4; ang. *myogenic factor 4*, MYF6– czynnik miogeniczny 6; ang. *myogenic factor 6*).

Kolejnym etapem optymalizacji hodowli *in vitro* mioblastów była próba wykorzystania nośników dekstranowych Cytodex3® w celu ograniczenia zarówno powierzchni jak i ilości mediów hodowlanych stosowanych przy hodowlach wielkoskalowych koniecznych w zastosowaniach klinicznych. Proponowana liczba komórek podawanych w terapiach regeneracyjnych waha się od 10^7 do 10^9 odpowiednio dla terapii blizny pozawałowej serca czy dystrofii mięśniowych. Niestety, pomimo obiecujących wyników uzyskanych przez innych autorów dla ustalonych linii mysich mioblastów C2C12 oraz mioblastów ludzkich uzyskanych od niemowląt, w przeprowadzonych badaniach zdecydowanie bardziej korzystne warunki hodowli zapewniała hodowla na tradycyjnym podłożu (naczynia typu T-flask)^{5,6}. Liczba mioblastów uzyskanych z hodowli tradycyjnej była ponad 10-krotnie wyższa niż przy wykorzystaniu nośników Cytodex3®. Ponadto komórki hodowane na nośnikach wykazywały bardziej nasiloną ekspresję markerów starzenia (ocenione na podstawie ekspresji SA-B-galaktozydazy), mniejszy potencjał proliferacyjny (zmniejszona obecność markera Ki67) oraz zwiększoną liczbę komórek zatrzymanych w fazie G0 (ocena cyklu komórkowego przy pomocy cytometru przepływowego). Wyniki te zostały podsumowane w pracy:

1. Rozwadowska N, Malcher A, Baumann E, Kolanowski TJ, Rucinski M, Miętkiewski T, Fiedorowicz K, Kurpisz M. In vitro culture of primary human myoblasts by using the

dextran microcarriers Cytodex3® Folia Histochem Cytobiol. 2016 Jun 8. doi: 10.5603/FHC.a2016.0010.

Ocena bezpieczeństwa stosowanych w medycynie regeneracyjnej preparatów komórkowych wymaga przeprowadzenia wielu badań w układzie *in vitro*, zatem zainteresowania swoje skierowałam na poznanie podstawowych mechanizmów uruchamianych w trakcie różnicowania hMb *in vitro*. Będąc kierownikiem projektu *Pozycjonowanie chromosomów w różnicujących się komórkach macierzystych pochodzenia mięśniowego*; NN 401 097 937; (2009-2012) miałam możliwość porównania ekspresji genów przy pomocy technik wysoceprzepustowych (Affimetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST) w aktywnie proliferujących mioblastach (hMb) w odniesieniu do miotub (hMc) – wielojądrzastych komórek mięśniowych uzyskiwanych po przeprowadzeniu różnicowania w warunkach *in vitro*. Kluczową częścią realizowanego projektu była analiza zmian wewnątrzjądrowej architektury w trakcie różnicowania mioblastów jako jednego z elementów epigenetycznej regulacji ekspresji genów w trakcie tego procesu i próba korelacji tych zmian z profilem ekspresji uzyskanym z mikromacierzy. Analiza obrazów 3D uzyskanych przy pomocy mikroskopii konfokalnej wraz z analizą bioinformatyczną wykazała, iż w trakcie różnicowania następuje zmiana zarówno kształtu jak i objętości jąder komórkowych. Objętość jąder komórkowych uległa zmniejszeniu (prawdopodobnie poprzez zwiększenie ilości heterochromatyny) przy jednoczesnym spłaszczeniu jąder komórkowych w miotubach. Ustalono, iż w trakcie procesu miogenezy *in vitro* więcej genów ulegało wyciszeniu niż zostało aktywowanych (dane z mikromacierzy) co było skorelowane z przemieszczaniem się centromerów (ocena przy pomocy techniki 3D FISH) wybranych chromosomów w okolicy peryferii jądra komórkowego. Wykazano ponadto, iż w przypadku chromosomu 7 gdzie zostało zmapowanych więcej genów ulegających aktywacji niż wyciszeniu nie dochodziło do jego repozycji w trakcie różnicowania. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy:

2. Rozwadowska N, Kolanowski T, Wiland E, Siatkowski M, Pawlak P, Malcher A, Mietkiewski T, Olszewska M, Kurpisz M. Characterisation of nuclear architectural alterations during *in vitro* differentiation of human stem cells of myogenic origin. PLoS One. 2013 Sep 3;8(9):e73231.

W ramach projektu granowego powstała również wyróżniona praca doktorska dr Tomasza Kolanowskiego pt. *Zmiany architektury jądrowej i transkryptomu w procesie różnicowania ludzkich komórek macierzystych pochodzenia miogenneego*. We wspomnianym powyżej przewodzie doktorskim pełniłam rolę promotora pomocniczego.

Odpowiednio scharakteryzowana populacja miogennych komórek macierzystych została zastosowana do terapii regeneracyjnej w immunokompromisowanym mysim modelu pozawałowego mięśnia sercowego. Określono wpływ transplantacji mioblastów zarówno na profil ekspresji genów w miokardium jak i na poziom osoczowego markera prognostycznego niewydolności serca NT-pro-BNP. Wykazano, iż poziom NT-pro-BNP w surowicy myszy koreluje odwrotnie proporcjonalnie z funkcją skurczową serca ocenianą echokardiograficznie (LVFAC –

ang. *Left Ventricular Fractional Area Change* – zmiana pola powierzchni lewej komory serca). Poziom tego hormonu peptydowego uległ podwyższeniu ponad trzykrotnie 21 dni po mikrochirurgicznej indukcji zawału podczas gdy transplantacja komórek obniżała jego poziom w surowicy do poziomu zbliżonego do oznaczanego w surowicy zdrowych myszy. Szczegółowa analiza ekspresji genów w tkance serca myszy potwierdziła niższą ekspresję genu *Nppa* (ang. *Natriuretic Peptide A*, peptyd natiuretyczny A), *Ctgf* (ang. *Connective Tissue Growth Factor* – czynnik wzrostu tkanki łącznej), *Gata4* (ang. *GATA Binding Protein 4* – czynnik 4 wiążący się do motywu GATA) u myszy poddanych terapii komórkowej. Potencjalnie może to świadczyć o wpływie transplantacji komórek na zahamowanie patologicznej przebudowy mięśnia sercowego spowodowanej niedokrwieniem. Ponadto, obniżenie na poziomie zarówno mRNA i białka współczynnika ekspresji Pbl/Serca2a potwierdziło korzystny wpływ terapii komórkowej na funkcje skurczowe serca ponieważ jak wynika z badań Kloss i wsp. wyższy współczynnik Pbl/Serca2a koreluje z obniżoną funkcją skurczową serca⁷.

Uzyskane wyniki te podsumowuje praca:

3. Wiernicki B*, Rozwadowska N*, Malcher A, Kolanowski T, Zimna A, Rugowska A, Kurpisz M. (2015) *Human myoblast transplantation in mice infarcted heart alters the expression profile of cardiac genes associated with left ventricle remodeling*. Int J Cardiol. 202;710-721.

Badania te zostały wykonane pod moją opieką przez mgr Bartosza Wiernickiego, który za swoją pracę magisterską został wyróżniony w konkursie "Nagroda Miasta Poznania za wyróżniającą się pracę magisterską".

Analizując pierwsze wyniki z uzyskane z doświadczeń przeprowadzonych na modelu zwierzęcym jak i przeprowadzonych badań klinicznych uznałam, iż niezwykle ważne byłoby wzmocnienie efektu terapeutycznego osiąganego przy zastosowaniu natywnych komórek macierzystych. W związku z tym równolegle moje zainteresowania obejmowały wykorzystanie technik inżynierii genetycznej w celu wprowadzenia do mioblastów ekspresji egzogennych białek potencjalnie mogących wspomóc terapię. Przegląd możliwości jakie daje modyfikacja genetyczna komórek macierzystych, ze szczególnym uwzględnieniem terapii genowej *ex vivo*, zawarłam w pracy poglądowej:

4. Rozwadowska N, Kurpisz M *Genetic Modification of Stem Cells in Ex Vivo Gene Therapy*. Advances in Genetic Research. Vol . 8. Kevin V. Urbano (ed.). NOVA Science Publishers 2012, pp. 1-20.

Omówione w niej zostały zarówno zasady przygotowania konstrukcji genowych jak i rodzaje wektorów stosowanych przy modyfikacji komórek macierzystych oraz główne kierunki rozwoju tego typu terapii. Zdając sobie sprawę z potencjału takiego podejścia podjęłam próbę wprowadzania technologii modyfikacji genetycznej mioblastów w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych.

Pierwsze doświadczenia zostały wykonane na ustalonej linii mioblastów mysich C2C12. Wykorzystując technikę lipofekcji do komórek została wprowadzona sekwencja kodująca

koneksynę-43 (GJA1) – białka budującego połączenia szczelinowe (ang. *Gap Junction*) i odpowiadającego za sprzężenie elektrofizjologiczne kardiomiocytów w miokardium. Przesłanką do wprowadzania egzogennej ekspresji GJA1 było obserwowane w próbach klinicznych epizody arytmii występujące po podaniu mioblastów, co prawdopodobnie spowodowane było brakiem sprzężenia implantowanych komórek z tkanką serca^{2,3}. Uzyskana linia mioblastów mysich wykazywała 7-9-krotną nadekspresję mRNA dla koneksyny-43, co więcej nadekspresja ta utrzymywała się również po różnicowaniu *in vitro* w miotuby. Zwiększona ekspresję oznaczono także na poziomie białka a test funkcjonalny – tzw. *scrape-loading* z wykorzystaniem odpowiednio dobranych barwników fluorescencyjnych potwierdził zwiększoną liczbę funkcjonalnych połączeń szczelinowych w modyfikowanych komórkach. Ponieważ dane literaturowe wskazywały zwiększoną ilość koneksyny zarówno jako czynnik pro- jak i anty-apoptotyczny kluczowym elementem badań było ustalenie czy w warunkach standardowych, ale także w warunkach nieoptymalnych (np. stresu oksydacyjnego) zwiększona liczba połączeń szczelinowych nie będzie negatywnie wpływała na stan mioblastów. Wykazano, iż wprowadzenie koneksyny-43 nie zmieniło mioblastów C2C12 w warunkach standardowych natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego wykazano, iż nadekspresja GJA1 wykazuje właściwości cytoprotekcyjne zwiększając procent komórek żywych z 68% do ponad 80%. Wyniki te będące wstępem do badań na pierwotnych mioblastach ludzkich zostały opublikowane w pracy:

5. Rozwadowska N, Kolanowski T, Wacławska A, Fraczek M, Kurpisz M *Transgenic line of C2C12 myoblasts with constitutive overexpression of connexin-43 (GJA 1)*. In: New Frontiers in Heart Disease. Asher Kimchi (ed.). MEDIMOND 2012, pp. 1-8.

Po przeprowadzeniu badań wstępnych na ustalonej linii komórkowej mogłam przejść do prac na komórkach docelowych czyli pierwotnych mioblastach ludzkich (hMb). W przeciągu następnych lat pod moja opieką wykonano prace magisterskie (M. Krupka (2007), A. Janeczek (2011), A. Zimna (2013)) oceniające wpływ wprowadzenia nadekspresji czynników proangiogennych – VEGF, FGF4, PlGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* - czynnik wzrostu śródbłónka naczyń; ang. *Fibroblast Growth Factor 4* – fibroblastowy czynnik wzrostu 4, ang. *Placental Growth Factor* – łożyskowy czynnik wzrostu), czy eNOS (ang. *Endothelial Nitric Oxide Synthase* – śródbłónkowa syntaza tlenu azotu) na komórki mysiej linii C2C12 oraz na mioblasty ludzkie. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji tych prac zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym a skrócony opis uzyskanych wyników umieszczono w opisie osiągnięć nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (pkt VII autoreferatu)^{8,9}. Jednocześnie kontynuowano ewaluację skutków wprowadzenia nadekspresji genu GJA1 do hMb w perspektywie mając wykorzystanie tego układu doświadczalnego w badaniach klinicznych. Taka terapia mogłaby wyeliminować podstawowy niekorzystny efekt uboczny terapii jakim były zjawiska arytmii obserwowane u pacjentów po implantacji. W przypadku mioblastów ludzkich najbardziej efektywną metodą wprowadzania obcego DNA była elektroporacja. Po wprowadzeniu sekwencji kodującej genu koneksyny-43 do mioblastów potwierdzono jego nadekspresję na poziomie

zarówno mRNA jak i białka równocześnie potwierdzając funkcjonalność nowotworzonych połączeń szczelionowych (test *scrape-loading*). W przypadku ludzkich mioblastów ludzkich nie wykazano cytoprotekcyjnego charakteru białka GJA1, a obniżenie żywotności komórek przypisano raczej samemu procesowi elektroporacji. Zauważono, że nadekspresja koneksyny-43 powodowała zwiększoną zdolność mioblastów do fuzji i tworzenia wielojądrzastych miotub *in vitro*. Zostało to także potwierdzone na poziomie molekularnym gdzie nadekspresja GJA1 powodowała podwyższenie ekspresji genu MYOG oraz MYH2 – aktywowanych w zróżnicowanych miotubach. W kolejnych doświadczeniach populacje mioblastów wykazujących wymuszoną ekspresję GJA1 wykorzystano w badaniach przedklinicznych na modelu pozawałowego miokardium w myszach NOS-SCID. Wykazano, iż zarówno terapia z wykorzystaniem mioblastów natywnych jak i modyfikowanych hamuje proces obniżania parametrów funkcji mięśnia sercowego powodowanego przez zawał w odniesieniu do grupy kontrolnej. Obecność koneksyny-43 powodowała, że efekt terapii utrzymywał się dłużej podczas gdy efekt terapeutyczny mioblastów natywnych był widoczny tylko w pierwszym miesiącu po przeszczepie. Podsumowanie uzyskanych wyników zostało opublikowane w pracy:

6. Kolanowski TJ*, Rozwadowska N*, Malcher A, Szymczyk E, Kasprzak JD, Mietkiewski T, Kurpisz M *In vitro and in vivo characteristics of connexin 43-modified human skeletal myoblasts as candidates for prospective stem cell therapy for the failing heart. Int J Cardiol. 2014 Apr 15;173(1):55-64.*

Praca ta została wyróżniona nagrodą dla dra Tomasza Kolanowskiego przyznawaną przez Oddział Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w obszarze nauk medycznych w ramach III edycji konkursu na najlepszą oryginalną pracę twórczą doktoranta opublikowaną w roku 2014. Badania te są kontynuowane przez mgr Annę Rugowską w ramach projektu PRELUDIUM na modelu szczurzym we współpracy z Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, gdzie możliwa jest ocena wpływu wprowadzonej ekspresji GJA1 na potencjał arytmogenny transplantowanych mioblastów z wykorzystaniem aparatury do oceny telemetrycznej zaburzeń rytmu serca.

Jednocześnie z prowadzeniem badań podstawowych i przedklinicznych wykorzystujących mioblasty przygotowywałam preparaty komórkowe do badań klinicznych I fazy oceniających bezpieczeństwo proponowanych terapii. Wspomniane powyżej próby kliniczne zastosowania mioblastów w terapii uszkodzonego serca wykazały, iż proponowane podejście jest nie tylko bezpieczne dla pacjentów, ale może nieznacznie polepszać funkcje serca. Podsumowanie przeprowadzonych prób klinicznych I fazy w odniesieniu do regeneracji mięśnia sercowego zawarłam w punkcie VII niniejszego autoreferatu.

Kolejnym celem terapeutycznym była regeneracja uszkodzonych mięśni zwieraczy odbytu. Zaburzenie tej podstawowej czynności fizjologicznej dotyka 3-5% dorosłej populacji i jest związane z drastycznym pogorszeniem jakości życia chorych, a także może skutkować silną depresją oraz wycofaniem z życia społecznego. We współpracy z Collegium Medicum Uniwersytetu

Jagiellońskiego zdecydowano o przeprowadzeniu pilotażowej próby terapii regeneracyjnej mięśni zwieracza z zastosowaniem autologicznych hMb. Po uzyskaniu zachęcających wyników świadczących o efektywności terapii podjęto rekrutację kolejnych pacjentów¹⁰. Transplantacja komórek macierzystych została zaproponowana pacjentom z zachowanym, prawidłowym unerwieniem mięśni zwieraczy przy jednoczesnej średnio do silnie nasilonej dysfunkcji defekacji. Wyniki wykazały, iż transplantacja mioblastów powodowała subiektywną, oraz obiektywną ocenianą z wykorzystaniem elektromiografu poprawę funkcji zwieraczy u części pacjentów. Ponieważ preparaty komórkowe mają charakter autologiczny, uzyskiwane zawiesiny komórek wykazywały pewną zmienność, pomimo zastosowania zoptymalizowanego systemu izolacji hMb. Zmienność ta może się przyczyniać do uzyskanych zróżnicowanych efektów zarówno w aspekcie ogólnej poprawy funkcji mięśni zwieraczy (ponad połowa pacjentów) jak i utrzymania pozytywnego wpływu transplantacji w czasie 12 miesięcy (ok. 40% pacjentów). Wyniki tej próby klinicznej zostały opublikowane w pracy:

7. Romaniszyn M, Rozwadowska N, Malcher A, Kolanowski T, Walega P, Kurpisz M. *Implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of fecal incontinence: results of an experimental pilot study.* Tech Coloproctol. 2015 Nov;19(11):685-96.

W chwili obecnej została zakończona kolejna próba kliniczna I fazy z wykorzystaniem mioblastów modyfikowanych genem GJA1 w terapii pozawałowego serca. Podsumowanie wyników wygląda obiecująco, a pierwsze analizy potwierdziły antyarytmogenny charakter przygotowywanych preparatów.

Podsumowując, w trakcie realizacji postawionych w osiągnięciu naukowym celów uzyskano następujące wyniki:

1. Etap badań podstawowych:

- uzyskana wg. procedur populacja hMb wykazuje ekspresję CD56 (ok 80-90%) oraz desminy (70-80%)
- zastosowanie 20% suplementacji surowicy płodowej bydlęcej oraz FGF2 (ang. *fibroblast growth factor 2* – fibroblastowy czynnik wzrostu 2) w hodowli *in vitro* umożliwia uzyskanie do 10⁹ hMb z 1cm³ tkanki mięśniowej
- wykorzystanie nośników dekstranowych Cytodex3 do hodowli hMb prowadzi do nasilonej apoptozy i wcześniejszego starzenia komórkowego
- w czasie różnicowania *in vitro* mioblastów architektura jądra komórkowego ulega zmianie dotyczącej kształtu i objętości
- globalne zmiany ekspresji genów są skorelowane z przemieszczaniem się centromerów chromosomów bliżej peryferiom jądra komórkowego i stanowią jeden z elementów epigenetycznej regulacji ekspresji
- nadekspresja koneksyny-43 (GJA1) w linii mioblastów mysich C2C12 oraz hMb umożliwia wytworzenie funkcjonalnych połączeń szczelinowych pomiędzy komórkami dodatkowo wpływając na potencjał do fuzji w miotuby

2. Etap badań przedklinicznych

- przeprowadzenie zabiegu podwiązania odnogi tętnicy wieńcowej powoduje wytworzenie blizny pozawałowej i upośledzenie funkcji serca (spadek LVFAC-SAX z 60% do ok. 30-40%) oraz wzrost poziomu NT-pro-BNP w surowicy
- transplantacja hMb powoduje obniżenie poziomu NT-pro-BNP w surowicy a jego poziom jest odwrotnie proporcjonalny do funkcji skurczowej serca
- transplantacja hMb wpływa na zmianę profilu ekspresji genów w tkance serca (obniżenie poziomu transkrypcji NT-pro-BNP, CTGF i GATA4)
- transplantacja hMb-GJA1 zapobiega pogorszeniu funkcji skurczowej serca a efekt terapeutyczny utrzymuje się dłużej w porównaniu do natywnych hMb

3. Etap badań klinicznych I fazy

- zastosowanie autologicznych hMb w terapii uszkodzenia zwieraczy odbytu jest bezpieczne a w połowie przypadków odnotowano regenerację mięśni stosując obiektywne metody oceny

Przeprowadzone badania przyczyniły się do opracowania protokołu izolacji i hodowli hMb na skalę wymaganą przy przygotowywaniu preparatów dla celów terapii regeneracyjnej a opracowanie metod efektywnych modyfikacji genetycznej pierwotnych zawiesin komórkowych łącznie z możliwością weryfikacji ich w modelu przedklinicznym stanowi podstawę do planowania i podejmowania prób klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

¹ Seidel M, Borczyńska A, **Rozwadowska N**, Kurpisz M. Cell-based therapy for heart failure: skeletal myoblasts. *Cell Transplant* 2009; 18(7):695-707

² **Rozwadowska N**, Fiszer D, Siminiak T, Kalawski R, Kurpisz M. Evaluation of *in vitro* culture of human myoblasts for tissue autotransplants to the post-infarcted heart. *Pol Heart J* 2002; 57(9):233-237.

³ Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O., Rzeźniczak J, **Rozwadowska N**, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004; 148(3):531-537.

⁴ Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, **Rozwadowska N**, Kalmucki P, Kurpisz M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; 26(12):1188-1195.

⁵ Pacak CA, Eddy MT, Woodhull L, Wang KR, Alpatov I, Fullen S, Dowd RP, Choi YH, Cowan DB. Microcarrier-based expansion of adult murine side population stem cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e55187.

⁶ Boudreault P, Tremblay JP, Pépin MF, Garnier A. Scale-up of a myoblast culture process. *J Biotechnol*. 2001 Sep 13;91(1):63-74.

⁷ Koss KL, Grupp IL, Kranias EG. The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol*. 1997;92 Suppl 1:17-24.

⁸ Janeczek A, Zimna A, **Rozwadowska N**, Fraczek M, Kucharzewska P, Ruciński M, Mietkiewski T, Kolanowski T, Malcher A, Kurpisz M. Genetically modified human myoblasts with eNOS may improve regenerative ability of myogenic stem cells to infarcted heart. *Kardiologia Pol.* 2013;71(10):1048-58.

⁹ Zimna A, Janeczek A, **Rozwadowska N**, Fraczek M, Kucharzewska P, Rucinski M, Mietkiewski T, Kurpisz M. Biological properties of human skeletal myoblasts genetically modified to simultaneously overexpress the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor-4. *J Physiol Pharmacol*. 2014 Apr;65(2):193-207.

¹⁰ Romaniszyn M, **Rozwadowska N**, Nowak M, Malcher A, Kolanowski T, Walega P, Richter P, Kurpisz M. (2013) Successful implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of faecal incontinence due to external sphincter rupture. *Int J Colorectal Dis*. 28(7):1035-6

VII. OMÓWIENIE INNYCH KIERUNKÓW BADAWCZYCH

Poszukiwanie genów zasocjowanych z zaburzeniami spermatogenezy u niepłodnych mężczyzn

Badania dotyczące ekspresji genów zaangażowanych w proces spermatogenezy rozpoczęłam w czasie realizacji pracy magisterskiej a następnie kontynuowałam podczas wykonywania pracy doktorskiej. Regulacja immunologiczna na terenie gonady męskiej jest niezmiernie ważna dla zachowania płodności i jakości gamet, ponieważ z jednej strony zapewnia separacje antygenów komórek gametogenicznych i zabezpieczenie przed wystąpieniem reakcji autoimmunologicznych, z drugiej zachowanie odpowiedniego statusu ochronnego przeciwko potencjalnym patogenom. Początkowo skupiałam się na analizie ekspresji genów z rodziny interleukiny-1 (IL-1). Na przeprowadzenie tych badań został przyznany przez ówczesną instytucję finansującą naukę (Komitet Badań Naukowych) grant promotorski, którego byłam głównym wykonawcą. Analizy przeprowadzane były na populacjach komórek izolowanych z prawidłowej gonady męskiej (komórki gametogeniczne i interstycjalne), a także na homogenatach tkankowych z zachowaną spermatogenezą jak i od pacjentów z upośledzoną powstawaniem gamet (MA – ang. *Maturation Arrest* - blok dojrzewania; SCOS – ang. *Sertoli Cell Only Syndrome* - zespół samych komórek Sertolego - SCOS). Wykazano, iż w zależności od kompartmentu jądra geny rodziny IL-1 ulegają ekspresji wg ściśle określonego schematu. We wnętrzu kanalik przeważa ekspresja formy alfa (IL-1 α) natomiast komórki interstycjalne są głównym źródłem formy beta (IL-1 β). Badania homogenatów tkankowych wykazały, iż ocena ekspresji antagonisty receptorowego IL-1 (IL-1RA ang. *IL-1 receptor antagonist*), w szczególności w odniesieniu do poziomu IL-1 α , może służyć celom prognostyczno-diagnostycznym. Na jego podstawie można określić czy w nabłonku plemnikotwórczym znajdują się pomejotyczne komórki płciowe. Badania te zostały docenione na przez Rade Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Poznaniu (wyróżnienie doktoratu) jak i na forum krajowym (Nagroda Prezesa Rady Ministrów za wyróżnioną pracę doktorską 2007). Na prezentację wyników oraz uczestnictwo w konferencji organizowanej w Seattle, USA (2005) przez American Society of Andrology uzyskałam przyznawane stypendium konferencyjne przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej. Jednocześnie została przyznana mi przez organizatorów konferencji (ASA) nagroda - Lalor Foundation Travel Award.

1. **Rozwadowska N**, Fiszer D, Jedrzejczak P, Kosicki W, Kurpisz M. Interleukin-1 superfamily genes expression in normal or impaired human spermatogenesis. *Genes Immun* 2007; 8(2):100-107.
IF 4,088; MNiSW 30
2. **Rozwadowska N**, Fiszer D, Kurpisz M. Function of the interleukin-1 gene system in immunomodulation, apoptosis and proliferation in the male gonad. *Post Hig Med Dosw (online)* 2005; 59:56-67.
MNiSW 5
3. Fiszer D, **Rozwadowska N**, Kurpisz M. Unique immune environment in male gonad. *Curr Trends Immunol* 2004; 6:199-207
4. Fiszer D, **Rozwadowska N**, Łukaszyk A, Słomski R, Kurpisz M. Quantitative mRNA analysis of IL-1 gene

system in human testis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:389-398.

IF 2,088 MNiSW 35

5. **Rozwadowska N**, Fiszer D, **Kurpisz M**. Interleukin-1 gene system in physiology of human testis. *Post Biochem* 2003; 49:194-201
6. **Rozwadowska N**, Fiszer D, Kurpisz M. Interleukin-1 system in testis – quantitative analysis. Expression of immunomodulatory genes in male gonad. *Adv Exp Med Biol* 2001; 495:177-180.
7. Kurpisz M, Fiszer D, **Rozwadowska N**. Elementy immunomodulacji na terenie gonady męskiej. *PAN, Działalność naukowa – wybrane zagadnienia*, 2001; 12:144-145.

Jako kontynuację badań środowiska immunologicznego jądra męskiego prowadzono ocenę ekspresji genów należących do nadrodziny IL-1 - IL-18 wraz z receptorami. W tym przypadku udało się nam wykazać, jako pierwszym na świecie, obecność klasycznych transkryptów dla IL-18RAP (IL-18 receptor accessory protein) w gonadzie męskiej, a także alternatywnie składanych form mRNA dla tego białka.

1. Fiszer D, **Rozwadowska N**, Rychlewski L, Kosicki W, Kurpisz M. Identification of IL-18RAP mRNA truncated splice variants in human testis and the other human tissues. *Cytokine* 2007; 39:178-183
IF 2,169; MNiSW 25

Pozostając nadal w tematyce regulacji fizjologii gonady męskiej została poddana analizie ekspresja genów *IL-6* (ang. *Interleukin-6* - interleukina 6), *IL-10* ((ang. *Interleukin-10* - interleukina 10), oraz *TNF- α* (ang. *Tumor Necrosis Factor Alpha* – czynnik martwicy nowotworu alfa) wraz z jego receptorami. Najwyższy poziom mRNA dla *IL-6* wykazywały homogenaty tkanek nowotworu jądra. Co ciekawe, poziom mRNA zarówno *IL-6* jak i *TNF- α* był wyższy w tkance pochodzącej od pacjentów z zahamowaną spermatogenezą w odniesieniu do poziomów oznaczanych w gonadzie o prawidłowej histologii. Poziom ekspresji *IL-10* utrzymywał się na stosunkowo stałym poziomie we wszystkich badanych próbach. Wykazano także, że pochodzące z prawidłowej gonady komórki interstycjalne wykazują znacznie wyższą ekspresję cytokin *IL-6* i *IL-10* w porównaniu z komórkami gametogenicznymi. Znalezione różnice potwierdzają wcześniejsze obserwacje, iż środowisko immunologiczne gonady jest bardzo dynamiczne i ulega zmianie w momencie wystąpienia zaburzeń procesu tworzenia gamet.

1. Białas M, Fiszer D, **Rozwadowska N**, Kosicki W, Jedrzejczak P, Kurpisz M. The role of IL-6, IL-10, TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol* 2009; 62(1):51-59.
IF 2,172 MNiSW 30

Analogicznie do analizy ekspresji genów powiązanych ze statusem immunologicznym gonady męskiej, analizowano ekspresję genów zaangażowanych w prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy.

Badano ekspresję genów kluczowych na etapie utrzymania i inicjacji różnicowania populacji spermatogonialnych komórek macierzystych (ang. SSC – *Spermatogonial Stem Cell*) – układ C-

KIT/SCF (ang. *v-kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog* - receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; ang. *Stem Cell Factor* - czynnik promujący komórki macierzyste) oraz genu CREM (ang. *cAMP Responsive Element Modulator* - czynnik wiążący się do motywu odpowiadającego na cAMP) - strategicznego genu pomejotycznego - regulującego geny zaangażowane w spermiogenezę. W tych analizach uwzględniono także grupę pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem jądra.

Białka zaangażowane w regulację utrzymania i różnicowania populacji komórek macierzystych w nabłonku plemnikotwórczym są kluczowe dla utrzymania spermatogenezy po okresie dojrzewania przez całe życie mężczyzny. W prowadzonych badaniach wykazano, iż poziom ekspresji genu *C-KIT* zgodnie z oczekiwaniami jest najniższy u pacjentów z SCOS. Poziom mRNA dla tego białka pozostaje na tym zbliżonym poziomie u pacjentów z blokiem spermatogenezy oraz z zachowaną spermatogenezą. Obserwujemy takie zależności, ponieważ obraz kanalika plemnikotwórczego pacjentów zdrowych i z blokiem spermatogenezy nie różni się pomiędzy sobą obecnością komórek macierzystych zakotwiczonych w nabłonku. Choroby rozrostowe jąder często wywodzą się z komórek na bardzo wczesnym etapie różnicowania (np. seminoma) i zgodnie z przewidywaniami obserwowana ekspresja genu *C-KIT* homogenatach tkankowych była wysoka. Nie obserwowano różnic pomiędzy poziomem ekspresji genu *SCF* pomiędzy pacjentami.

Ponieważ temat komórek macierzystych, w tym także spermatogonialnych, jest wiodącym w moich zainteresowaniach naukowych powierzono mi przygotowanie rozdziału traktującym o ich pochodzeniu, charakterystyce i potencjalnym wykorzystaniu.

1. Bialas M, Borczyńska A, **Rozwadowska N**, Fiszer D, Kosicki W, Jedrzejczak P, Kurpisz M. SCF and c-kit expression profiles in male individuals with normal and impaired spermatogenesis. *Andrologia*. 2010;42(2):83-91
2. **Rozwadowska N**, Kurpisz M. Pochodzenie komórek germinalnych, komórki macierzyste nabłonka plemnikotwórczego. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. M. Piasecka (red.). Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, 2013, pp. 225-233.

IF 1,244; MNiSW 15

MNiSW 4

Zasadniczą rolę czynnika Crem w procesie spermatogenezy udowodniono na mysim modelu pozbawionym ekspresji tego białka. Myszy te jednoznacznie wykazują blok spermatogenezy po etapie mejozy¹. Transkrypty genu *CREM* tworzą grupę ponad 50 czynników stanowiących system aktywatorów jak i represorów regulujących ekspresję genów zawierających sekwencje CRE. Analizując formy aktywatorów CREM01 oraz CREM02 ulegające ekspresji tylko w gonadzie (transkrypcja z promotorów P3 i P4) wykazano, iż w gonadzie ludzkiej zdecydowana większą aktywność wykazuje promotor P4, a aktywność obu promotorów ograniczona do komórek gametogenicznych (brak ekspresji CREM0 w homogenatach pochodzących od pacjentów z SCOS oraz we frakcji komórek interstycjalnych). Dodatkowo wykazano, iż izoforma CREM0 zawierająca ekson γ - wcześniej opisywana jako charakterystyczna dla procesu nieprawidłowej spermatogenezy - ulega ekspresji również w homogenatach tkankowych z zachowaną

spermatogenezą oraz w izolowanych z prawidłowego jądra komórkach gametogenicznych. Ekspresja badanych form CREM θ w homogenatach pochodzących z guzów wykazała niska obecność wszystkich transkryptów potwierdzając tym samym obniżone występowanie w nowotworach, w stosunku do gonady prawidłowej, komórek gametogenicznych na dalszych etapach różnicowania.

1. Fiszer D, Białas M, **Rozwadowska N**, Kosicki W, Jędrzejczak P, Kurpisz M. CREM activator isoforms in normal and impaired human spermatogenesis analysis by Real-Time RT-PCR. *Arch Androl* 2007; 53(5):257-265.

IF 0,808 MNiSW 10

Po serii publikacji dotyczących analizy ekspresji zdefiniowanych genów w związku z nowymi możliwościami metodycznymi, zdecydowano się na wykorzystanie technik wysoceprzepustowych (Affymetrix Human Gene 1.0 ST) do porównania globalnej ekspresji genów w gonadzie o różnym stopniu upośledzenia spermatogenezy w odniesieniu do tkanki prawidłowej. Projekt ten został powierzony mgr Agnieszce Malcher, której praca doktorska była wykonywana pod moja opieką jako promotora pomocniczego. Na część badań zawartych w rozprawie doktorantka otrzymała grant PRELUDIUM. Praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową IGCz PAN a przedstawione wyniki na Kongresie PTG uhonorowane nagrodą Złotej Helisy. Uzyskane dane potwierdziły wyniki uzyskane przez innych autorów korzystających ze starszego typu macierzy i jednocześnie pozwoliły zidentyfikować nowe geny, których ekspresja spadała u pacjentów niepłodnych (*AKAP4* – ang. *A-Kinase Anchoring Protein 4*, *UBQLN3* – ang. *Ubiquilin 3* – ubikwilina 3, *CAPN11* – ang. *Calpain 11* – kalpaina 11, *GGN* – ang. *Gametogenetin* - gametogentyna, *SPACA4* – ang. *Sperm Acrosome Associated 4* – białko związane z akrosomem plemnika 4, *SPATA3* – ang. *Spermatogenesis Associated 3* – białko związane ze spermatogenezą 3, *FAM71F1* – ang. *Family With Sequence Similarity 71 Member F1* - białko F1 z rodziny białek podobnych 71), a także zestaw genów, których ekspresja była podwyższona u pacjentów, u których tworzenie gamet było zahamowane na dalszych etapach spermatogenezy (*WBSR28* ang. *Williams-Beuren Syndrome Chromosome Region 28* – białko 28 regionu chromosomu zasocjowanego z zespołem Williamsa-Beurena, *ADCY10* ang. *Adenylate Cyclase 10 (Soluble)* – 10 cyklaza adenylowa (forma rozpuszczalna), *TMEM225* ang. *Transmembrane Protein 225* – 225 białko transbłonowe, *SPATS1* ang. *Spermatogenesis Associated Serine Rich 1* – białko bogate w seryne związane ze spermatogenezą 1, *FSCN3* ang. *Fascin Actin-Bundling Protein 3* – fascyna 3 łącząca aktynę, *GTSF1L* ang. *Gametocyte Specific Factor 1-Like* – białko podobne do czynnika specyficznego dla gametocytów, *GSG1* – ang. *Germ Cell Associated 1* – białko 1 związane z komórkami germinialnymi). Dane te zostały potwierdzone przy pomocy PCR w czasie rzeczywistym oraz w większości na poziomie białka (technika blotowania typu Western oraz immunohistochemii). Realizacja tego projektu zaowocowała zaproponowaniem szeregu nowych genów mogących służyć

do stworzenia panelu diagnostycznego umożliwiającego globalną ocenę zaawansowania spermatogenezy i dobraniem odpowiednio do klasyfikacji rozwiązania terapeutycznego.

1. Malcher A, **Rozwadowska N**, Stokowy T, Kolanowski T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. *Fertil Steril*. 2013 Dec;100(6):1686-94.e1-7

IF 4,21;5 MNiSW 45

2. Malcher A, **Rozwadowska N**, Stokowy T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. The gene expression analysis of paracrine/autocrine factors in patients with spermatogenetic failure compared with normal spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Dec;70(6):522-8.

IF 2,668 MNiSW 20

Nadekspresja genów kodujących czynniki proangiogenne do mioblastów w celu pobudzenia tworzenia naczyń

Badania prowadzone nad wymuszeniem ekspresji czynników proangiogennych w mioblastach mają na celu wzbogacenie terapii komórkowej o dodatkowy czynnik wspomagający tworzenie naczyń krwionośnych w tkance docelowej. Stanowią one kompleksowe podejście do terapii komórkowej w połączeniu z badaniami przedstawionymi w osiągnięciu habilitacyjnym. Badania prowadzono *in vitro* zarówno na linii mysich mioblastów (C2C12) jak i na pierwotnych mioblastach ludzkich - hMb. Projekt zapoczątkowano we współpracy z Zakładem Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Bazując na linii C2C12 uzyskano linię komórkową o przejściowej ekspresji VEGF/FGF-4 oraz linię wykazującą stabilną ekspresję wprowadzonych białek. Wykazano, iż wprowadzenie czynników proangiogennych powoduje zwiększoną proliferację mioblastów, w szczególności linii o stabilnej ekspresji VEGF/FGF, a test funkcjonalny *in vitro* z wykorzystaniem komórek HUVEC (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* – komórki śródbłonkowe naczyń pępowinowych) potwierdził angiogenny potencjał tak przygotowanych komórek. Analiza ekspresji genów związanych z miogenezą wykazała, że wprowadzona nadekspresja VEGF/FGF-4 nie wpływa na geny związane z wczesnymi etapami rozwoju komórek miogennych. Zauważano, także tendencję do obniżenia ekspresji genów uruchamianych na późniejszym etapie miogenezy. Po uzyskaniu zachęcających wyników na ustalonej linii mioblastów mysich skupiono się na weryfikacji wypracowanego modelu nadekspresji VEGF/FGF-4 na pierwotnych zawiesinach mioblastów ludzkich. Uzyskane w ten sposób mioblasty nie odbiegały właściwościami biologicznymi od mioblastów natywnych pod względem aktywności proliferacyjnej, ekspresji genów zaangażowanych w miogenezę oraz odpornością na stres oksydacyjny. Potencjał angiogennej populacji został potwierdzony badaniami funkcjonalnymi *in vitro*. Wykazano, iż medium hodowlane kondycjonowane przez modyfikowane mioblasty z powodzeniem stymuluje wzrost kapilar naczyniowych.

Synteza VEGF a tym samym angiogeneza może być stymulowana także poprzez związki niskocząsteczkowe takie jak tlenek azotu (NO), który jest produktem reakcji przeprowadzanej

przez enzym - endotelialną syntazę tlenu azotu (eNOS). Zastosowanie nadekspresji eNOS umożliwiłoby wykorzystanie proangiogenego działania NO, ale także zgodnie wcześniejszymi doniesieniami może mieć działanie kardioprotekcyjne na pozawałowe miokardium². Doświadczenia zostały wykonane zarówno na linii C2C12 jak i na pierwotnych zawiesinach mioblastów ludzkich. Po potwierdzeniu nadekspresji eNOS na poziomie białka wykazano, iż populacja komórek modyfikowanych genetycznie nie wykazuje różnic pod względem proliferacji ani profilu ekspresji genów miogennych (miogenina, MyoD – ang. *Myogenic Differentiation 1* – miogenny czynnik różnicowania, MRF4(MYF6) ang. *Myogenic Factor 6* – czynnik miogenny 6, MEF2 *Myocyte Enhancer Factor* – czynnik wzmacniający związany z miocytami; oraz MYF5 ang. *Myogenic Factor 5* - czynnik miogenny 5) w porównaniu do linii wyjściowych. Komórki HUVEC poddane działaniu medium znad komórek z nadekspresją eNOS tworzyły wydajnie kapilary w warunkach hodowli 3D potwierdzając potencjał proangiogeny NO. Wykorzystanie komórek modyfikowanych eNOS w terapii uszkodzonego miokardium może zapewnić, przy jednoczesnej stymulacji tworzenia naczyń, ograniczenie obszaru blizny i zwiększyć szanse na bardziej wydajną regenerację serca. Badania te były prowadzone pod moja opieką w ramach przygotowania prac magisterskich przez Panią Agnieszkę Janeczek oraz Agnieszkę Zimną. Mgr Agnieszka Zimna na kontynuację badań dotyczących indukcji angiogenezy oraz wpływu warunków niedotleniania mięśnia sercowego uzyskała grant NCN PRELUDIUM. W chwili obecnej mgr Agnieszka Zimna jest na ostatnim etapie przygotowywania rozprawy doktorskiej, której głównym tematem jest ocena wpływu na mioblasty nadekspresji czynników proangiogenych w warunkach hipoksji - czyli obniżonej podaży tlenu w tkance

1. Bialas M, Krupka M, Janeczek A, **Rozwadowska N**, Frączek M, Kotlinowski J, Kucharzewska P, Lackowska B, Kurpisz M. Transient and stable transfections of mouse myoblasts with genes coding for pro-angiogenic factors. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62(2):219-228
2,267 MNiSW 25
2. Zimna A, Janeczek A, **Rozwadowska N**, Frączek M, Kucharzewska P, Rucinski M, Mietkiewski T, Kurpisz M. Biological properties of human skeletal myoblasts genetically modified to simultaneously overexpress the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor-4. *J Physiol Pharmacol*. 2014 Apr;65(2):193-207
IF 2,386 MNiSW 25
3. Janeczek A, Zimna A, **Rozwadowska N**, Frączek M, Kucharzewska P, Ruciński M, Mietkiewski T, Kolanowski T, Malcher A, Kurpisz M. Genetically modified human myoblasts with eNOS may improve regenerative ability of myogenic stem cells to infarcted heart. *Kardiologia Pol.* 2013;71(10):1048-58.
IF 0,519 MNiSW 15

Próby kliniczne I fazy w wykorzystaniu macierzystych komórek mięśni szkieletowych

Niewydolność serca spowodowana niedokrwieniem jest jednym z głównych problemów medycznych w krajach wysokorozwiniętych. Rutynowe sposoby leczenia nie zapewniają odzyskania kurczliwości przez uszkodzone partie mięśnia sercowego. Jednym ze skutków poszukiwania nowych terapii było zaproponowanie transplantacji komórek macierzystych w celu

wspomożenia funkcji skurczowej uszkodzonego serca. Jako członek zespołu miałam okazję uczestniczyć w dwóch badaniach klinicznych I fazy oceniających bezpieczeństwo zastosowania autologicznych komórek macierzystych mięśni szkieletowych. W tym celu zastosowano dwa podejścia terapeutyczne: podanie preparatów komórkowych jako dodatkowej terapii przy wykonywaniu zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego oraz przezskórne dosercowe podanie komórek przy wykorzystaniu systemu cewników TransAccess®. W obu przypadkach komórki zostały zaimplantowane w okolice blizny pozawałowej. Przeprowadzone badania wskazały na bezpieczeństwo stosowanych procedur ze szczególnym naciskiem na profilaktyczne zastosowanie leków przeciwaritmicznych. Obserwowane u pierwszych pacjentów poddanych terapii epizody arytmii były prawdopodobnie spowodowane brakiem sprzężenia elektrofizjologicznego mioblastów z tkanką serca. Wykazano, iż w większości przypadków nastąpiła poprawa funkcji skurczowej serca w wyniku zastosowanej terapii komórkowej, która utrzymywała się nawet do 12 miesięcy po przeprowadzeniu zabiegu. Minister Zdrowia w roku 2007 przyznał Nagrodę Zespołową za cykl 5 publikacji dotyczących zastosowania inżynierii komórkowej do regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego.

Podjęto też próbę zastosowania terapii komórkowej u pacjenta ze zdiagnozowaną kardiomiopatią o podłożu nie-niedokrwiennym. W tym przypadku podano mioblasty do tkanki lewej komory. Epizody arytmiczne pojawiły się około dnia 10 po zabiegu operacyjnym i zostały zniwelowane farmakologicznie, a pacjent zastał poddany implantacji kardiowertera-defibrylatora (ICD). W tym przypadku poprawa związana z zastosowaną terapią była bardzo znacząca i obejmowała znaczne zwiększenie frakcji wyrzutowej (z 26% do 40%) oraz obniżenie poziomu NT-pro-BNP (z 5337 pg/mL do 198 pg/mL) oraz ogólną zmianę klasyfikacji niewydolności serca z NYHA III na NYHA I.

1. Seidel M, Borczyńska A, **Rozwadowska N**, Kurpisz M. Cell-based therapy for heart failure: skeletal myoblasts. *Cell Transplant* 2009; 18(7):695-707
IF 5,126; MNiSW 25
2. Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, **Rozwadowska N**, Kalmucki P, Kurpisz M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; 26(12):1188-1195.
IF 7,341 MNiSW 50
3. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzeźniczak J, **Rozwadowska N**, Kalmucki P, Kurpisz M. Autologous transplantation of skeletal myoblasts in the treatment of postinfarction left heart dysfunction: three-month follow-up. *Kardiologia Polska* 2004; 60:1-71-76.
MNiSW 4
4. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzeźniczak J, **Rozwadowska N**, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004; 148(3):531-537.
IF 3,618 MNiSW 35
5. Sokal A, Przybylski R, Zembala M, **Rozwadowska N**, Białas M, Lenarczyk R, Niklewski T, Miszalski-Jamka K, Sredniawa B, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblasts transplantation in non-ischaemic cardiomyopathy - a case report. *Kardiologia Polska*. 2010;68(7):856-9.
IF 0,523 MNiSW 15

Poznanie patomechanizmu oraz próba korekcji fenotypu komórek pochodzących od pacjentów z ataksją Friedreicha

W badaniach prowadzonych w tym kierunku miałam okazję uczestniczyć odbywając staż podoktorski w Stanach Zjednoczonych w latach 2013-2015 w Stem Cell Institute, University of Alabama Birmingham (UAB), Birmingham, USA.

Ataksja Friedreicha (FRDA) należy do chorób neurodegeneracyjnych i jest najczęściej występującą dziedziczną ataksją. Bezpośrednią przyczyną choroby jest wyciszenie ekspresji mitochondrialnego białka - frataksyny (FXN), którego funkcja jest związana z homeostazą żelaza. Wyciszenie genu *FXN* jest spowodowane przez patologiczną ekspansję powtórzeń GAA występujących w intronie pierwszym tego genu. Badania, w których mogłam uczestniczyć miały na celu poznanie mechanizmu oraz próbę korekcji fenotypu poprzez zastosowanie edycji genomu komórek uzyskanych od pacjentów z FRDA.

Analizie poddano 18 linii fibroblastów FRDA oraz 17 linii kontrolnych. Przeprowadzono analizę ekspresji genu *FXN* na poziomie mRNA (metodą SYBR green oraz z wykorzystaniem sond typu TagMan) oraz białka (blotowanie typu Western). Wykazano, iż poziom FXN koreluje najsilniej z długością krótszego allelu *FXN*. Kluczowym eksperymentem było zastosowanie technik NGS - RNA-seq (ang. next genome sequencing) do poznania transkryptomu linii komórek FRDA w odniesieniu do linii kontrolnych. Wykazano, iż wyciszenie spowodowane przez ekspansję powtórzeń GAA dotyczy tylko locus FXN i nie obejmuje sąsiadujących sekwencji. Potwierdzono to także badając potranslacyjne modyfikacje białek histonowych – wykazując zwiększoną obecność H3K9me3 (represja) tylko w loci FXN w liniach uzyskanych od chorych. Oparta na RNA-seq analiza pre-mRNA wykazała defekt w wydłużeniu transkryptów frataksyny u pacjentów z ataksją Friedreicha w porównaniu do osób zdrowych. Analiza znaków epigenetycznych charakterystycznych dla elongacji (H4K20me1) nałożonych na histony w loci FXN wykazała ich obniżone występowanie na odcinkach chromatyny za patologicznymi powtórzeniami GAA jednocześnie potwierdzając obecność zwiększonej ilości modyfikacji K20me3 (konstytutywnie wyciszona chromatyna) przy zmniejszonej obecności H4K5ac (aktywna chromatyna).

Podjęta próba korekcji była oparta na zastosowaniu specjalnie zaprojektowanych białkowych palców cynkowych połączonych z nukleazą (ang. ZFN – Zinc Finger Nucleases) umożliwiającymi precyzyjne usunięcie z intronu 1 powtórzeń GAA. Dzięki takiemu podejściu udało się przywrócić epigenetyczny stan loci FXN zbliżony do znajdowanego u osób zdrowych (zmiana wzoru metylacji histonów) a tym samym ponieść poziom ekspresji frataksyny. Badania przeprowadzono na nieśmiertelnych limfocytach i fibroblastach pacjentów. Uzyskane skorygowane fibroblasty posłużyły następnie do uzyskania linii komórek pluripotentnych (iPSC), z których w wyniku różnicowania *in vitro* uzyskano komórki nerwowe pacjentów FRDA o prawidłowym fenotypie (prawidłowy poziom ekspresji frataksyny oraz wewnątrzkomórkowy poziom ATP).

1. Li Y, Lu Y, Polak U, Lin K, Shen J, Farmer J, Seyer L, Bhalla AD, **Rozwadowska N**, Lynch DR, Butler JS, Napierala M. Expanded GAA repeats impede transcription elongation through the FXN gene and induce transcriptional silencing that is restricted to the FXN locus. *Hum Mol Genet.*;24(24):6932-43
IF 6,393 MNiSW 40
2. Li Y, Polak U, Bhalla AD, **Rozwadowska N**, Butler JS, Lynch DR, Dent SY, Napierala M. Excision of Expanded GAA Repeats Alleviates the Molecular Phenotype of Friedreich's Ataxia. *Mol Ther.*;23(6):1055-65.

IF 6,938 MNiSW 40

Nowe kierunki badawcze

Uzupełnieniem do prowadzonych badań nad wykorzystaniem mioblastów w terapii regeneracyjnej serca jest pozyskanie indukowanych komórek pluripotentnych (iPSC ang. *induced Pluripotent Stem Cells*) z hMb i ich różnicowanie w kierunku kardiomiocytów. Wcześniejsze badania wykazały, iż populacja wyjściowa z której uzyskuje się komórki iPS wpływa na potencjał do różnicowania w zdefiniowanym kierunku. Mając to na uwadze wydaje się że dla uzyskania autologicznych kardiomiocytów najlepszym materiałem wyjściowym będą mioblasty szkieletowe. Odbываяc staż w Stem Cell Institute, UAB, USA opracowałam protokół uzyskania komórek iPS przy użyciu wektorów nieintegrujących oraz wydajną metodę różnicowania *in vitro* iPSC w kardiomiocyty wykorzystując inhibitory i aktywatory ścieżki sygnałowej Wnt.

W chwili obecnej koordynuję zadania badawcze przypisane do IGCz PAN w ramach projektu STRATEGMED (*Niskocząsteczkowe modulatory epigenetyczne jako aktywatory pluripotencji komórek dla potrzeb medycyny regeneracyjnej; NCBI R STRATEGMED1/233624/5/NCBR/2014*) realizowanego w ZBRiKM. Projekt ten zakłada opracowanie przy pomocy algorytmu genetycznego (będącego metodą wysoceprzepustową) nowych metod indukcji pluripotencji w mioblastach uzyskanych z mięśni szkieletowych. wykorzystując związki niskocząsteczkowe. Drugi etap zakłada uzyskanie z iPSC na drodze różnicowania - kardiomiocytów. Podstawą tego projektu jest przygotowanie linii reporterowych mioblastów zawierających pod wybranymi promotorami (OCT4/SOX2 dla uzyskania iPS; ACTC dla uzyskania kardiomiocytów) białka zielonej lub czerwonej fluorescencji. Algorytm genetyczny stanowiący kluczowy etap realizacji projektu wymaga utworzenia banku komórek (2×10^8 iPS oraz 5×10^7 mioblastów/cykl czyli w sumie ok. 4×10^9 iPS oraz 10^9 mioblastów) umożliwiającego wykorzystanie zjawiska ewolucji *in vitro* do uzyskania nowych wydajnych i protokołów de- i redyferencjacji, które będą możliwe do zastosowania w badaniach klinicznych (w założeniu odróżnicowanie i następne różnicowanie komórek będzie oparte tylko na związkach chemicznych).

Równie ważna jest dla mnie realizacja projektu finansowanego przez NCN (*Badania nad cytoprotekcyjną rolą antyoksydantów wobec ludzkiej komórki mięśniowej rezerwuaru tkankowego (mioblasty) w warunkach in vitro i in situ; NCN 2014/13/B/NZ3/04646*) umożliwiająca kontynuację kluczowego dla mnie zagadnienia jakim jest uzyskanie preparatów komórkowych spełniających wymogi stawiane terapii regeneracyjnej. W toku badań zostały zaplanowane doświadczenia

mające na celu polepszenie przeżywalności mioblastów poprzez stworzenie odpowiedniego środowiska-niszy, która umożliwi wydajną implantację komórek in situ (zastosowanie antyoksydantów, nadekspresja dysmutazy ponadtlenkowej ecSOD).

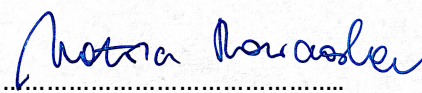
Uzupełnieniem powyższych badań jest współpraca w ramach wielośrodkowego Programu Badań Stosowanych (*Molekularne obrazowanie (z zastosowaniem nanotechnologii) dla monitorowania implantowanych komórek macierzystych i ich funkcji regeneracyjnych; NCBIr; PBS3 nr 247019*). Celem tego projektu jest uzyskanie nowych środków kontrastujących opartych na nanocząstkach mających zastosowanie w obrazowaniu molekularnym, które umożliwiłyby monitorowanie implantacji oraz długotrwałego zasiedlania mięśnia sercowego przez komórki zastosowane w terapii regeneracyjnej.

Kierunek badań zaplanowany w trakcie realizacji powyższych projektów ma szanse znacznie wpłynąć na rozwój terapii regeneracyjnej zarówno z wykorzystaniem autologicznych mioblastów pacjentów czy autologicznych kardiomiocytów uzyskanych z linii komórek pluripotentnych. Dodatkowo wykorzystanie technik obrazowania pozwoli na opracowanie schematu implantacji komórek w możliwie najkorzystniejszym terapeutycznie schemacie.

Podsumowanie

Jestem autorka 48 publikacji naukowych, brałam lub biorę udział w realizacji 17 projektów grantowych. Jestem laureatka FNP (Stypendium dla Młodych Naukowców – START 2007-2008), otrzymałam prestiżową Nagrodę Prezesa Rady Ministrów za wyróżniającą się pracę doktorską (2007) oraz stypendium Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Młodych Naukowców (2009-2012). W czasie mojej pracy naukowej opiekowałam się 13 magistrantami, a także byłam promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich (obydwie uzyskały wyróżnienie Rady Naukowej IGCz PAN). Obecnie, pod moją opieką naukową znajduje się troje doktorantów na różnym stopniu zaawansowania przygotowania pracy doktorskiej.

Poznań, 31.08.2016



dr Natalia Rozwadowska

PIŚMIENNICTWO

¹Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature*. 1996 Mar 14;380(6570):162-5.

²de Waard MC, van der Velden J, Boontje NM, Dekkers DH, van Haperen R, Kuster DW, Lamers JM, de Crom R, Duncker DJ. Detrimental effect of combined exercise training and eNOS overexpression on cardiac function after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 May;296(5):H1513-23