

Załącznik nr 2: Autoreferat w języku polskim

1. Imię i nazwisko: Dr. Małgorzata Borowiak
Baylor College Medicine,
McNair Medical Institute,
Stem Cell and Regenerative Medicine Center
Cell and Gene Therapy Center
Molecular and Cellular Biology Department,
1 Baylor Plaza, N1020
Houston, Texas 77031, USA

2. Informacje o wykształceniu oraz uzyskanych tytułach

1995-2000 UAM, Wydział Biologii, kierunek biotechnologia,
studia magisterskie, z wyróżnieniem
Praca magisterska, z wyróżnieniem:
„Wpływ uszkodzonych genotypów wybranych enzymów
detoksykacyjnych na tworzenie się adduktów DNA
indukowanych zanieczyszczeniem środowiska.
Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Szyfter, Zakład Genetyki
Człowieka, PAN

2000-2004 Max Delbrück Centrum Molekularnej Medycyny (MDC) oraz
Frei Uniwersytet, Wydział Biologii, Chemii i Farmacji, Berlin,
Niemcy, studia doktoranckie
Praca doktorska:
„Funkcja ścieżki sygnałowej w wątrobie”
Oryginalny tytuł rozprawy „Met signaling in adult liver”
Promotorzy: Prof. dr Carmen Birchmeier, MDC oraz FU, Berlin
Prof. dr Fritz Rathjen, MDC oraz FU, Berlin

Wyróżnienie: *magna cum laude*

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

12/2004-5/2006 Pracownik naukowy, Zespół Biologii Rozwojowej, MDC, Berlin,
Niemcy

06/2006-06/2008 Postdoctoral Fellow, Laboratorium Prof. dr Douglas Melton' a,
Harvard University, Cambridge, MA, USA
Stypendium RX Foundation oraz HHMI

07/2009-12/2011 Research Associate, Harvard University, Cambridge, MA, USA

01/2012-obecnie Assistant Professor, Kierownik Zespołu: Komórki macierzyste oraz rozwój i choroby trzustki (Stem Cells for pancreas and diabetes)
Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

4. Rozwój zawodowy i naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Po ukończeniu studiów magisterskich na kierunku biotechnologia, na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, rozpoczęłam studia doktoranckie w Instytucie Medycyny Molekularnej im. Maxa Delbrucka oraz Wolnym Uniwersytecie (Frei Universität) w Berlinie, Niemcy. Prace badawcze zmierzające do uzyskania stopnia doktora prowadziłam w zespole Biologii Rozwojowej, kierowanym przez prof. Carmen Birchmeier. W okresie stażu doktorskiego przygotowałam dwie genetycznie modyfikowane linie myszy, w których gen kodujący receptor kinazy tyrozynowej, Met [1], został zmodyfikowany, tak aby umożliwić jego inaktywację w sposób kontrolowany czasowo lub/i przestrzennie (conditional knockout = nokaut warunkowy) oraz by utworzyć chimeryczne białko, gdzie mysia część białka kodująca domenę kinazy została zastąpiona ludzkim odpowiednikiem [2]. Myszy te służyły w badaniach nad regeneracją wątroby u dorosłych zwierząt. W pierwszej fazie projekt aby inaktywować Met użyłam Mx-cre linie, w której ekspresja cre rekombinazy jest pod kontrolą promotora zależnego od interferonu [3]. Wstrzykiwany do myszy interferon, lub zastępczo cząsteczki RNA, indukowały ekspresję cre i prowadziły do mutacji Met, w wątrobie lecz również częściowo w innych organach takich jak jelito czy śledziona. W drugiej fazie projektu, za pomocą cre pod kontrolą promotora genu Albuminy, wyłączyłam gen Met specyficznie tylko w wątrobie [4]. Wykazałam, że Met jest niezbędny do regeneracji wątroby. Bez Met regeneracja wątroby jest

znacząco spowolniona z powodu uszkodzenia procesu proliferacji hepatocytów i prawidłowa masa wątroby nie zostaje odbudowana. Wyłączenie Met powoduje zaburzenia w kilku ścieżkach sygnalizacyjnych. Gdy receptor Met jest nieaktywny, nie dochodzi do aktywującej fosforylacji kinaz białkowych Erk1 oraz Erk2 oraz innych białek, jak np. kinazy Akt, co w efekcie prowadzi do nieprawidłowości w przebiegu cyklu komórkowego. Do tych należy np. niższy poziom ekspresji cyklin D, oraz opóźniona fosforylacja Rb przy jednoczesnej aktywacji inhibitorów cyklu komórkowego, takich jak p27 oraz p21 [5]. W efekcie w mutantach mysich czterokrotnie mniej hepatocytów ulega podziałom komórkowym w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi.

Ponadto wykazałam, że Met chroni wątrobę przed zmianami patologicznymi, a brak Met prowadzi do patologicznej wzmożonej akumulacji lipidów w hepatocytach. Podobne zjawisko obserwowane jest również w patologii człowieka, kiedy to w wyniku uszkodzenia hepatocytów wywołanego różnymi czynnikami np. wirusy czy toksyny, dochodzi do powstawania stłuszczonej wątroby co może następnie prowadzić do marskości wątroby lub raka wątrobowo-komórkowego. Opisywane powyżej nokauty warunkowe wykorzystałam również w badaniach nad rozwojem układu nerwowego w trakcie embriogenezy i regeneracją innych organów. Pracę doktorską napisałam na temat czynników regulujących proliferację hepatocytów podczas odbudowywania prawidłowej masy i regeneracji funkcjonalnej wątroby. Badania te zostały opublikowane w PNAS (lista publikacji, pozycja 1).

5. Rozwój zawodowy i naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam pracę w zespole prof. Carmen Birchmeier w Max-Delbruck Centrum koncentrując się nad mechanizmem komórkowym leżącym u podstaw procesów regeneracji tkanek i organów.

Pytanie jakie postawiłam było następujące: Czy istnieją ścieżki sygnalizacyjne odpowiedzialne za ochronę komórek wątroby przed uszkodzeniami?

Pokazałam, że jedna z cząsteczek sygnalizacyjnych, HGF (ang. hepatocyte growth factor=czynnik wzrostu hepatocytów) [6], ulega aktywacji w odpowiedzi na różne czynniki uszkodzające komórki wątroby, takie jak toksyny, mutageny czy fizyczne uszkodzenia. Używając zmodyfikowane genetycznie myszy, pokazałam, że jeśli ich wątroba pozbawiona jest receptora HGF, jakim jest Met, to myszy te narażone są znacznie bardziej na uszkodzenia komórek wątroby. W efekcie wątroba bez receptora Met łatwo ulega zmianom chorobowym prowadzącym do marskości czy też powstawania nowotworów. Odkryłam również, że w sytuacji kiedy pierwsza linia obrony zawodzi i nie ma receptora Met w komórkach wątroby, inna ścieżka sygnalizacyjna ulega podwyższonej aktywacji. Dziesięciokrotnie wyższy poziom interleukiny 6, IL6 jest obserwowany w wątrobie u myszy z mutacją Met, lecz nigdy w kontrolnej grupie. Ta nadmierna produkcja IL6 jest swoistego rodzaju mechanizmem kompensującym brak Met i próbą chociaż częściowej protekcji komórek wątroby. Analizowałam również regenerację wątroby w myszach pozbawionych zarówno Met jak i receptora IL6, gp130 [7]. Po usunięciu 70% wątroby, u myszy pozbawionych aktywnego Met i gp130 w hepatocytach, regeneracja tego organu zachodzi, ale jest bardzo spowolniona i mało wydajna. Nawet po 4 tygodniach od uszkodzenia, masa wątroby jest ciągle 30% poniżej normy, natomiast w przypadku kontrolnej grupy masa wątroby zostaje odbudowana w ciągu jednego tygodnia. Wyniki tu omówione opublikowałam w Gastroenterology oraz w International Journal of Cancer (lista publikacji, pozycje 4 oraz 6).

Następnie zadałam pytanie: Czy funkcje jakie pełni Met podczas regeneracji wątroby są bardziej uniwersalne i obecne również w innych organach i czy możliwe jest znalezienie ogólnego mechanizmu regeneracji z udziałem cząsteczek sygnalizacyjnych, niezbędnych do odtworzenia uszkodzonych lub zniszczonych komórek organizmu? Do tych badań wybrałam inny narząd jakim jest skóra. Z powodu szczególnego narażenia na częste uszkodzenia, epiderma oraz skóra właściwa posiadają bardzo dobrze rozwinięty mechanizm regeneracji. Ponadto, skóra jest przykładem innego rodzaju regeneracji, opartym na aktywacji tylko niewielkiej populacji komórek, a nie jak w przypadku wątroby, prawie wszystkich

komórek. Po zranieniu naskórka oraz skóry właściwej, komórki prekursorowe zwane też tkankowymi komórkami macierzystymi ulegają aktywacji i są źródłem wszystkich typów komórek potrzebnych do zagojenia rany [8]. W celu wyłączenia genu Met specyficznym w skórze użyłam szczepu mysiego z rekombinazą cre pod kontrolą promotora genu K14 (ang. Keratin 14). Gen K14 ulega ekspresji w keratynocytach w epidermie [9]. Odkryłam, że Met ulega aktywacji zaledwie w kilka godzin po zranieniu epidermy wraz ze skórą właściwą. Aktywacja ta zachodzi na poziomie transkrypcyjnym, jak również nieaktywna forma ligandu HGF ulega proteolitycznej aktywacji. W ten sposób, w krótkim czasie po zranieniu, zachodzi aktywacja całej ścieżki sygnalizacyjnej Met. U myszy z wyłączonym genem Met w komórkach epidermy proces regeneracji skóry jest znacząco spowolniony oraz prowadzi do postawania blizn. Trudności te przejawiają się wyraźnym spowolnieniem całego procesu: potrzeba 25 dni u myszy ze zmutowanym genem Met, a 5 dni dla grupy kontrolnej, a także powstawaniem znacznych blizn u mutantów. Na poziomie komórkowym trudności te spowodowane są nieprawidłowościami w proliferacji keratynocytów. Ponadto keratynocyty wykazują zaburzenia w reorganizacji cytoszkieletu komórkowego. Reorganizacje takie są niezbędne dla procesu migracji komórek. W efekcie keratynocyty z wyłączonym genem Met nie mogą migrować i wypełnić miejsca zranienia skóry. Ostatecznie jednak szczątkowa regeneracja skóry zachodzi u mutantów. Dzieje się tak, ponieważ niewielki procent (2-5%) keratynocytów posiada ciągle aktywny Met i tylko te keratynocyty, w których Met nie uległ inaktywacji są zdolne do regeneracji skóry, co implikuje niezbędną funkcję Met w procesie gojenia ran. Jest to pierwszy przykład ścieżki sygnalizacyjnej, bez aktywacji której nie zachodzi gojenie się ran. Wiedza ta może również być potencjalnie zastosowana przy leczeniu trudno gojących się ran. Interesujący jest fakt iż, przebieg procesu gojenia ran u mysich nokautów Met bardzo przypomina regenerację skóry u myszy oraz ludzki z cukrzyca [10]. Odkrycia te zostały opublikowane w *Journal of Cell Biology* (lista publikacji, pozycja 2).

Realizowane projekty badawcze pogłębiły moje zainteresowania nad mechanizmami regeneracji komórek, tkanek oraz organów. Zadałam sobie pytanie:

Czy wszystkie organy/komórki posiadają zdolności regeneracyjne, a jeśli tak, to jakie sygnały regulują ten proces oraz czy można zainicjować regenerację uszkodzonych lub odbudowę utraconych komórek? W tym też okresie po raz pierwszy wyizolowano ludzkie embrionalne komórki macierzyste [11]. Otwierając tym samym nowe możliwości regeneracji uszkodzonych lub odbudowy utraconych komórek czy organów. W 2006 roku dołączyłam do zespołu prof. Douglas Melton'a na Uniwersytecie Harvarda jako „postdoctoral fellow”. Prof. Douglas Melton jest pionierem badań nad zastosowaniem komórek macierzystych, oraz jest współzałożycielem i dyrektorem Instytutu Komórek Macierzystych w obrębie Uniwersytetu Harvarda (Harvard Stem Cell Institute) i laureatem licznych nagród i wyróżnień, takich jak: został ogłoszony jedną ze 100 najbardziej wpływowych osób według magazynu TIME, jednym z 10 największych żyjących myślicieli i wynalazców w rankingu CNN. W czasie mojego pobytu w tym zespole, rozpoczęłam pracę nad metodami i mechanizmem generowania *in vitro* komórek produkujących insulinę z embrionalnych komórek macierzystych, mysich i ludzkich, oraz z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. induced pluripotent stem cells iPSC) [12].

6. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust.2 z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym

6.1 Tytuł osiągnięcia

Różnicowanie mysich oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych w komórki trzustki oraz ich zastosowanie do badań nad rozwojem trzustki.

6.2 Dorobek wchodzący w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku habilitacyjnego

Do dorobku wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku habilitacyjnego włączone są następujące publikacje, składające się na monotematyczny cykl prac o zastosowaniu komórek macierzystych do badań nad rozwojem endodermy oraz komórek prekursorowych trzustki:

1. Malgorzata Borowiak, Rene Maehr, Shuibing Chen, Alice E. Chen, Weiping Tang, Julia O. Fox, Stuart L. Schreiber, Douglas A. Melton *Small molecules efficiently direct differentiation of mouse embryonic stem cells into definitive endoderm. Cell Stem Cell*, 2009 Apr 3; 4 (4):348-58

2009 IF: 23.563, 5-letni IF: 27.361, MNSiW: 50 pkt

Wyróżnione przez edytora i omówione w:

a/ Beverly A. Purnell, *Science*, (2009), 324, (59260), 440-440

b/ Zaret K, *Using Small Molecules to Great Effect in Stem Cell Differentiation*, *Julie Cell Stem Cell* 2009 May 8;4(5):373-4.

2. B. Sneddon*, Malgorzata Borowiak*, Douglas A. Melton: *Self-renewal of ES derived progenitors by organ matched mesenchyme*, *Nature*. 2012 Nov 29;491(7426):765-8.

*equal contribution= równorzędne autorstwo/udział

2012 IF: 38.597, 5-letni IF: 38.159, MNSiW: 50 pkt

3. Alice E. Chen*, Malgorzata Borowiak*, Richard I. Sherwood, Anastasie Kweudjeu, Douglas A. Melton: *Functional evaluation of ES cell-derived endodermal populations reveals differences between Nodal and Activin A-guided differentiation*. *Development*. 2013 Feb 1;140(3):675-86. doi: 10.1242/dev.085431.

*equal contribution= równorzędne autorstwo/udział

2012 IF: 6.208, 5-letni IF: 6.888, MNSiW: 40 pkt

4. Shuibing Chen, Malgorzata Borowiak, Julia Lamenza, René Maehr, Kenji Osafune, Lance Davidow, Kelvin Lam, Lee F. Peng, Stuart L. Schreiber, Lee L. Rubin, Douglas Melton *A small molecule that directs differentiation of human embryonic stem cells-derived endoderm cells to the pancreatic lineage*, *Nature Chemical Biology*, 2009 Apr;5(4):258-65.

2009 IF: 16.058, 5-letni IF: 16.738, MNSiW: 50 pkt

Wyróżnione przez edytora i omówione w:

Yu-Ping Yang and Chris Wright: *Chemicals turn human embryonic stem cells towards beta cells*": *Nature Chemical Biology* 5, 195-196 (2009)

5. Kenji Osafune, Leslie Caron*, Malgorzata Borowiak*, Rita-Joy Martinez, Claire S. Fitz-Gerald, Yasunori Sato, Chad A. Cowan, Kenneth R. Chien, Douglas A. Melton. *Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell line. Nat Biotechnol. 2008 Mar; 26(3):313-5.*

*equal contribution= równorzędne autorstwo/udział
2008 IF: 22.297, 5-letni IF: 32.182, MNSiW: 50 pkt

6. Malgorzata Borowiak* and Douglas A. Melton: *How to make β cells?* Curr Opin Cell Biol. 2009 Dec; 21(6):727-32.

*autor korespondencyjny

2009 IF: 14.153, 5-letni IF: 13.634, MNSiW: 45 pkt

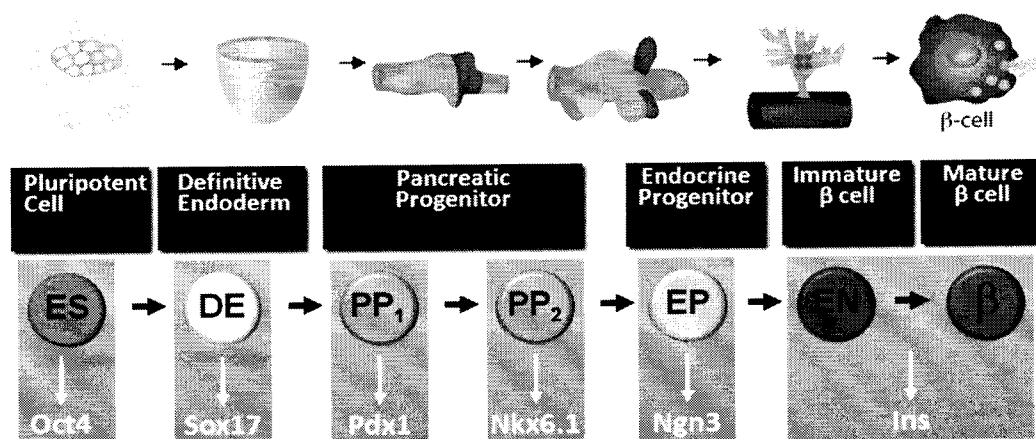
6.3 Osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę habilitacji, omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Pluripotencjalne komórki macierzyste, obejmujące embrionalne oraz indukowane komórki macierzyste, posiadają niezwykły potencjał do nieustannej proliferacji i różnicowania się w każdy z 220 typów komórek w naszym organizmie. Moje zainteresowania komórkami macierzystymi są związane z wykorzystaniem tego wyjątkowego ich potencjału w aplikacjach biotechnologicznych, w sytuacji nieodwracalnego uszkodzenia danego organu kiedy inne metody regeneracji zawodzą. Taką sytuację obserwujemy między innymi w przypadku komórek typu beta w trzustce, które są wysoce wyspecjalizowane w produkcji insuliny. U chorych z insulinozależną cukrzycą typu I, komórki beta ulegają selektywnemu zniszczeniu przez układ immunologiczny, prowadząc do zaburzeń w gospodarce glukozy w organizmie. Obecnie stosowane leczenie polegające na podawaniu insuliny oraz mierzeniu poziomu glukozy we krwi kilka razy dziennie umożliwia normalne funkcjonowanie chorym, jednakże nie prowadzi do wyleczenia, ani też nie zapobiega groźnym komplikacjom. Cukrzyca typu I, gdzie tylko jeden rodzaj komórek ulega zniszczeniu - jest dobrym przykładem choroby, gdzie zróżnicowane

komórki macierzyste mogłyby odbudować utraconą populację komórek typu beta, co byłoby atrakcyjnym rodzajem terapii komórkowej dla pacjentów.

Ponadto, ważnym aspektem badań opartych na komórkach macierzystych, jest fakt, iż różnicowanie ludzkich komórek pluripotencjalnych w komórki trzustki, pozwala na badania nad zarodkowym rozwojem ludzkiej trzustki oraz genami i sygnałami kierującymi tym procesem. W przypadku trzustki istnieje szereg udokumentowanych różnic pomiędzy trzustką u myszy i człowieka. Przykładowo człowiek ma tylko jeden gen insuliny, a mysz dwa. Kolejnym przykładem różnic jest obecność na powierzchni komórek beta różnych białek transportowych GLUT u myszy oraz ludzi [13].

W moich badaniach, aby otrzymać *in vitro* trzustkowe komórki beta produkujące insulinę, wybrałam metodę systematycznego odtwarzania kolejnych etapów rozwoju komórek beta, w ten sposób naśladując niejako rozwój zarodkowy tego organu (Rys. 1). Jako pierwszy etap, komórki macierzyste muszą więc zostać zróżnicowane w komórki listka endodermy, które stanowią pierwotny związek trzustki. Komórki endodermy są multipotencjalne i na kolejnym etapie, poprzez dobranie odpowiedniej kombinacji cząsteczek sygnalizacyjnych, zostają przekształcone w komórki prekursorowe trzustki, charakteryzujące się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Pdx1. Wszystkie rodzaje komórek w trzustce pochodzą z populacji komórek Pdx1 pozytywnych [14]. Podczas rozwoju zarodkowego następuje dalsza specjalizacja tych komórek i wyodrębnia się populacja prekursorów komórek endokrynych, tworzących wyspy Langerhansa w dojrzałej trzustce. Poszczególne etapy rozwoju embrionalnego wraz z genami kierującymi tymi przemianami jednej populacji w drugą zostały ustalone na podstawie wieloletnich badań biologii rozwoju opartej na modelach zwierzęcych (omówione w dorobku naukowym, pozycja 6).



Rys. 1. Rozwój zarodkowy trzustki u myszy oraz *in vitro*. Podczas embriogenezy załazek trzustki powstaje z listka endodermy. Endoderma kolejno różnicuje się w komórki progenitorowe trzustki, a następnie endokrynne komórki prekursorowe. Komórki endokrynne proliferują, i następnie organizują się w wyspy Langerhansa, w skład których wchodzi również produkujące insulinę komórki typu beta. Na wszystkich etapach komórki progenitorowe są otoczone mezenchymą (nie zaznaczoną na tym schemacie). Podobne etapy, przedstawione w uproszczonej formie jako kolorowe kulki, są indukowane podczas procesu *in vitro* różnicowania komórek macierzystych w komórki typu beta. Markery poszczególnych etapów są przedstawione. ES=zarodkowe komórki macierzyste; DE=endoderma, PP=komórki progenitorowe trzustki; EP=endokrynne komórki progenitorowe; EN=komórki endokrynne

6.3.1 Odkrycie i wykorzystanie małych cząsteczek chemicznych indukujących różnicowanie embrionalnych komórek macierzystych w komórki endodermy

Na pierwszym etapie projektu zadałam pytanie, jakie geny ulegają specyficznej ekspresji w przypadku komórek endodermy? Na podstawie analizy komórek endodermalnych wyizolowanych z mysich zarodków (e8.5), ustaliłam „molekularny

podpis endodermy”, składający się z 17 genów. W oparciu o te wyniki oraz literaturę, wybrałam Sox17 (ang. sex determining region Y-box17) jako marker molekularny komórek endodermy [15,16] i skonstruowałam dwie reporterowe linie mysich zarodkowych komórek macierzystych, w których fuzyjny konstrukt genowy zawierał sekwencję kodującą fluorescencyjne białko (GFP lub dsRed) i gen kodujący czynnik transkrypcyjny Sox17. Z pomocą współpracowników, dr. Weiping Tang oraz Prof. Steward Schreiber utworzyłam kolekcje ponad 4000 związków chemicznych, które albo na podstawie danych eksperymentalnych lub struktury chemicznej wykazywały potencjał do regulowania ścieżek sygnalizacyjnych. Ustaliłam optymalne warunki do różnicowania komórek macierzystych w kierunku endodermy takie jak wyjściową liczbę komórek, skład medium, czas inkubacji ze związkami chemicznymi itd. Następnie wykorzystując linię komórkową Sox17-dsRed przeprowadziłam systematyczną analizę biblioteki cząsteczek chemicznych, pod względem ich potencjału do różnicowania komórek macierzystych w komórki endodermy. Kryterium selekcji było następujące: związek musiał indukować ekspresję Sox17 na poziomie minimum 2.5 razy większym niż DMSO (kontrola), nie mógł być toksyczny oraz nie mógł indukować ekspresji markerów innych listków zarodkowych, czyli musiał być specyficzny dla endodermy. Po serii eksperymentów, z początkowej puli ponad 4000 związków wybraliśmy 12, aby ostatecznie zidentyfikować 2 nowe związki chemiczne, które najbardziej wydajnie oraz specyficjnie indukowały ekspresję Sox17 w zarodkowych komórkach macierzystych. Związki te nazwałam IDE 1 oraz 2 (Inducers of Definitive Endoderm). Obecność samych tylko tych związków umożliwia różnicowanie zarodkowych komórek macierzystych w komórki endodermy. Oba związki pochodzą z biblioteki nowo-syntetyzowanych związków, o domniemanej funkcji (na podstawie struktury chemicznej) inhibitorów deacetylazy histonowej (HDAC).

IDE indukują powstawanie komórek endodermy z mysich embrionalnych komórek macierzystych z wydajnością rzędu 80% co jest znacznym postępowaniem w porównaniu z innymi metodami, opartymi na zastosowaniu zrekombinowanych białek, ponieważ te metody charakteryzują się wydajnością na poziomie 40% [17]. Cząsteczki te stymulują powstawanie endodermy również z ludzkich embrionalnych

komórek macierzystych z wydajnością rzędu 60%, co sugeruje, że te same ścieżki sygnalizacyjne są zaangażowane w proces powstawania endodermy u myszy oraz człowieka. Poprzez analizę 17 markerów komórek endodermy za pomocą q-PCR oraz metod immunohistochemicznych, potwierdziłam, że uzyskana za pomocą IDE endoderma jest bardzo zbliżona, jeśli nie identyczna, do endodermy wyizolowanej z mysich embrionów. Ponadto przeprowadziłam funkcjonalną ewaluację chemicznie indukowanej endodermy wykorzystując metody hodowli embrionów *ex vivo* (metoda została omówiona w punkcie 4), która potwierdziła, że zachowuje się ona *in vivo* jak endoderma naturalna.

Odkrycie IDE i badania nad endodermą wygenerowaną *in vitro* zostały opublikowane w Cell Stem Cell (dorobek naukowy, pozycja 1). Praca ta spotkała się z dużym zainteresowaniem, ze względu na możliwość szerokiego zastosowania tych odkryć jak i również, z powodu użytej metodologii podczas badań nad identyfikacją IDE. Listek endodermy podczas rozwoju zarodkowego jest źródłem nie tylko komórek trzustki, lecz także komórek wątroby, płuc, jelit, żołądka, grasicy itd. Odkrycie IDE1 i 2 ma więc potencjalnie szerokie zastosowanie zarówno w badaniach naukowych jak i w praktycznych. IDE są przedmiotem patentu i zaraz po opublikowaniu tych rezultatów otrzymaliśmy wiele próśb o przesłanie cząsteczek IDE oraz szczegółów metodycznych. Firmy biotechnologiczne, StemGent oraz Tocris zajęły się komercjalizacją, produkują i sprzedają obu cząsteczek IDE. Obecnie wraz z moim zespołem badawczym prowadzimy badania nad zrozumieniem mechanizmu działania IDEs.

6.3.2. Rola agonisty kinazy proteinowej C (PKC) podczas różnicowania komórek endodermy w kierunku komórek progenitorowych trzustki *in vitro*.

W kolejnym etapie skoncentrowałam się na pytaniu, jak pokierować endodermą powstałą z embrionalnych komórek macierzystych, tak aby komórki te różnicowały się dalej selektywnie w kierunku trzustki? Stosując podobną metodologię jak w przypadku identyfikacji IDE, z wyjątkiem, że badania przesiewowe były przeprowadzone na ludzki komórkach macierzystych, odkryłam,

że związek chemiczny indolactam V (ILV), promuje różnicowanie endodermy w komórki progenitorowe trzustki, które charakteryzują się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Pdx1. Pdx1-pozytywne komórki prekursorowe są bardziej wyspecjalizowane niż komórki endodermy i podczas rozwoju zarodkowego dają początek wszystkim rodzajom komórek występujących w dojrzałej trzustce, czyli komórkom zewnątrz- oraz wewnątrzwydzielniczym oraz przewodom trzustkowym [18,19]. Natomiast w normalnych warunkach populacje Pdx1-pozytywne nie różnicują się w komórki wątroby czy komórki innych organów pochodzenia endodermalnego, z wyjątkiem żołądka [20]. ILV jest aktywatorem kinazy białkowej typu C i nasze badania po raz pierwszy pokazały funkcję tej ścieżki sygnalizacyjnej w różnicowaniu komórek trzustki. ILV, podobnie jak IDE, działa zarówno na komórki mysie jak i ludzkie, lecz w przeciwieństwie do IDE, aby powstały Pdx1-pozytywne komórki, niezbędny jest udział innych ścieżek sygnalizacyjnych np. aktywowanych przez kwas retinowy [21]. ILV charakteryzuje się dużą specyficznością i działa tylko na etapie różnicowania komórek endodermy w komórki prekursorowe trzustki i nie wykazuje żadnego pozytywnego efektu na różnicowanie komórek macierzystych w endodermę.

Do dzisiaj nie wiadomo jak skutecznie i wydajnie różnicować zarodkowe komórki macierzyste w komórki typu beta, które wydzielają insulinę adekwatnie do stężenia glukozy w ich otoczeniu. Dlatego też, aby funkcjonalnie przetestować uzyskane za pomocą ILV populacje komórek Pdx1-pozytywnych, wstrzyknęliśmy 1-3 milionów komórek zróżnicowanych *in vitro* do myszy pod powierzchnie błony otaczającej nerkę. Do tych badań użyliśmy zmodyfikowane genetycznie myszy z obniżoną aktywnością immunologiczną aby zapobiec odrzuceniu przeszczepu. Wykorzystując różnicę pomiędzy ludzką oraz zwierzęcą insuliną, wykryliśmy obecność ludzkiej insuliny we krwi myszy po 8-12 tygodniach od implantacji komórek. Ponadto, insulina ta była prawidłowo wydzielana w odpowiedzi na wzrost poziomu glukozy we krwi myszy, wskazując iż wstrzyknięte komórki prekursorowe trzustki, z czasem nabywają zdolność do syntezy i regulowanego stężeniem glukozy wydzielania insuliny. Analiza histologiczna oraz immunohistochemiczna pokazała, iż uzyskane tą metodą komórki prekursorowe, gdy zostały wprowadzone do myszy,

różnicują się we wszystkie typy komórek obecne w dojrzałej trzustce, włączając również wydzielające insulin komórki typu beta.

Odkrycia te zostały opublikowane w *Nature Chemical Biology* (dorobek naukowy, pozycja 4). Odkrycia na temat ILV jako stymulatora komórek prekursorowych trzustki zostały omówione przez Yu-Ping Yang i Chris Wright: "Chemicals turn human embryonic stem cells towards beta cells": (*Nature Chemical Biology* 5, 195-196 (2009) doi:10.1038/nchembio0409-195). Istotny, z punktu widzenia biologii, jak i potencjalnej terapii jest również fakt, iż zarówno IDE oraz ILV działa na mysie i ludzkie embrionalne komórki macierzyste oraz indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste.

6.6.3. Poszczególne embrionalne linie komórkowe wykazują różną zdolność do tworzenia endodermy, ektodermy oraz mezodermy.

W trakcie mojej pracy nad różnicowaniem zarodkowych komórek ludzkich w komórki trzustki zaobserwowałam, że poszczególne linie zarodkowe komórek macierzystych mimo prawidłowej ekspresji białek odpowiedzialnych za pluripotencję, różnią się między sobą pod względem zdolności do wytwarzania poszczególnych typów komórek [22]. Wraz z dr. Kenji Osafune, który miał podobną obserwację, scharakteryzowałam ponad 30 ludzkich linii komórkowych pod względem możliwości różnicowania się w komórki trzech listków zarodkowych. W przypadku endodermy oraz ich pochodnych, linie HUES 8 i 4 (HUES, human embryonic stem cells= ludzkie zarodkowe komórki macierzyste) z największą wydajnością różnicują się w komórki trzustki czy jelita. Potwierdziłam te obserwacje o różnorodności pozornie jednakowych linii komórkowych, analizując wydajność różnicowania poszczególnych linii w inny listek zarodkowy, mezoderme, na przykładzie komórek mięśnia sercowego. W tym przypadku również występuje znacząca różnica pomiędzy liniami HUES. Przykładowo HUES 3 jest o 40% bardziej wydajna w różnicowaniu w komórki mięśni szkieletowych serca w porównaniu do HUES8. Na końcu pokazaliśmy, że również w przypadku ektodermy i komórek

neuronalnych istnieją różnice w potencjale do wytwarzania tego rodzaju komórek pomiędzy liniami zarodkowymi komórek macierzystych.

Różnice te najprawdopodobniej są wynikiem zmian epigenetycznych w DNA w poszczególnych liniach i zostały przez nas po raz pierwszy opisane w literaturze. Ponadto, zwracają uwagę na wagę doboru odpowiedniej linii komórkowej przed rozpoczęciem badań naukowych czy klinicznych. Wszystkie testowane przez nas linie komórkowe mogą wytworzyć trzy listki zarodkowe, ale wydajność może różnić się kilkukrotnie pomiędzy poszczególnymi liniami. Odkrycia te zostały opublikowane w czasopiśmie *Nature Biotechnology* (dorobek naukowy, pozycja 5). Później inne zespoły badawcze potwierdziły nasze obserwacje i kontynuowały prace nad zrozumieniem przyczyn tych różnic [23,24]. Zrozumienie przyczyn tej różnorodności ma ogromne znaczenie przy planowaniu terapii opartych na technologii komórek iPS.

6.3.4. Funkcjonalna charakterystyka uzyskanej *in vitro* endodermy oraz różnice pomiędzy endodermą indukowaną białkami Nodal i Activin A.

W trakcie badań nad zastosowaniem związków chemicznych do kierowania procesami różnicowania się embrionalnych komórek macierzystych, dużą uwagę przywiązywałam do charakteryzacji uzyskanych *in vitro* populacji komórkowych. Zainteresowanie to związane było z dwoma zagadnieniami. Po pierwsze, im bardziej populacje wytworzone *in vitro* były zbliżone do naturalnych komórek endodermy występujących podczas rozwoju zarodkowego, tym większe prawdopodobieństwo, że z takiej wyjściowej populacji będzie możliwe otrzymanie prawidłowych, funkcjonalnych komórek trzustki czy wątroby. Po drugie, moim zdaniem równie ważne było scharakteryzowanie jakie komórki, poza endodermą, powstają w wyniku tych manipulacji, gdyż te pozostałe komórki wpływają pozytywnie bądź negatywnie na dalszy rozwój endodermy. Z tego powodu razem z dr. Alice Chen opracowałam metodę pozwalającą na funkcjonalną ewaluację *in vivo*, wygenerowanej *in vitro* endodermy. W tym celu, komórki endodermy zostały wstrzyknięte do rozwijającego się przewodu pokarmowego zarodków mysich w

dniu 8.75 rozwoju zarodkowego. Na tym etapie rozwoju zarodkowego, w środkowej części przewodu pokarmowego, brzegi są już złączone i przewód jest zamknięty, natomiast końce przewodu pozostają otwarte, umożliwiając depozycję komórek. Ponadto, na tym etapie rozwoju zawiązki narządów układu trawiennego nie są jeszcze wyodrębnione. Embriony były następnie hodowane *ex vivo* przez 48h, i w tym czasie, brzegi przewodu pokarmowego zostają zamknięte na całej długości, a następnie powstają zawiązki trzustki, wątroby i innych organów. Wstrzykiwane komórki były fluorescencyjnie wyznakowane, umożliwiając ich śledzenie podczas dalszego rozwoju przewodu pokarmowego oraz innych organów. W pierwszej fazie pokazałam, że komórki endodermy wyizolowane z innych embrionów, czyli naturalna endoderma zachowywały się zgodnie z oczekiwaniami i były wbudowywane w przewód pokarmowy a tym samym współuczestniczyły w rozwoju zarodka wraz z endoderłą zarodka. W ten sposób potwierdziłam, że opracowana metoda umożliwia rozwój endodermy *ex vivo* oraz śledzenie tego procesu. Następnie pokazałam, iż endoderma indukowana przez cząsteczki IDE 1 oraz 2, posiadają funkcjonalne kompetencje identyczne do tych, które charakteryzują naturalną endoderłę. Chemicznie indukowana endoderma ulega również integracji w rozwijający się przewód pokarmowy i wytwarza zawiązki wątroby. Następnie sprawdziłam czy inne rodzaje komórek zachowują się podobnie po wstrzyknięciu do przewodu pokarmowego. Pluripotencjalne komórki macierzyste czy komórki neuronalne po wstrzyknięciu, ulegały zgrupowaniu w centrum przewodu i z czasem podlegały apoptozie jako, iż nigdy nie integrowały się z przewodem pokarmowym. Także zdolność integracji w rozwijający się przewód pokarmowy jest charakterystyczna tylko dla endodermy, a nie dla dowolnych komórek zróżnicowanych czy pluripotencjalnych komórek macierzystych. Kolejne eksperymenty przyniosły zaskakujące rezultaty. Podczas indukowania różnicowania embrionalnych komórek macierzystych, alternatywą dla cząsteczek chemicznych, są zrekombinowane białka sygnałowe. Badania nad myszami i innymi modelami zwierzęcymi pokazały, że białko Nodal z rodziny białek TGF-beta cząsteczek sygnałowych (ang. Transforming Growth Factor, TGF), jest odpowiedzialne za powstawanie endodermy. W przypadku endodermy

generowanej *in vitro* zwykle stosowana jest Activina A, należąca do tej samej rodziny TGF-beta. Ponadto przyjmuje się, że Activina A aktywuje bardzo podobne ścieżki sygnałowe jak w przypadku białka Nodal [25]. Wybór pomiędzy Activiną i Nodal jest podyktowany jedynie względami praktycznymi przy różnicowaniu komórek macierzystych, ponieważ łatwiej jest wyprodukować Activinę A niż Nodal. Nasze badania z wykorzystaniem opracowanej tu metody wykazały, że tylko endoderma aktywowana przez białko Nodal posiada zdolność do integracji w przewód pokarmowy, natomiast komórki endodermy powstałe w wyniku ekspozycji na Activinę A, zachowywały się tak, jak neuronalne czy niezróżnicowane, pluripotencjalne komórki, czyli pozostawały zgrupowane we świetle przewodu i z czasem obumierały. Ponadto, indukowana przez Nodal, lecz nie przez Activinę A, endoderma wstrzyknięta w różne miejsca w embrionie, w np. w mięśnie kończyn czy mózg, tworzyła miniaturowe przewody pokarmowe, nawet w tak niesprzyjającym otoczeniu i przy braku innych sygnałów charakterystycznych dla przewodu pokarmowego. Obecnie natura tych różnic pomiędzy endoderłą wygenerowaną przez Nodal i Activinę jest nieznana. Uważam, że badania te podkreślają dwa znaczące aspekty. Pierwszy, to konieczność szczegółowej, oraz funkcjonalnej charakteryzacji różnych populacji komórek otrzymanych *in vitro*. Ekspresja jednego czy dwóch białek markerowych może okazać się niewystarczającym czy błędnym kryterium. Ponadto, powstająca w wyniku ekspozycji na Activinę endoderma jest niepełnowartościowa, co może być przyczyną albo nieprawidłowego dalszego rozwoju tej endodermy lub wręcz niemożności jej rozwoju w dojrzałe organy układu trawiennego.

Kolejną różnicę pomiędzy endoderłą indukowaną przez Activinę oraz Nodal, zaobserwowałam podczas dalszej specjalizacji endodermy. Oba rodzaje endodermy różnicowały się dalej z podoba wydajnością w komórki Pdx1-pozytywne, lecz endoderma powstała w wyniku ekspozycji na Nodal generowała komórki o wyższym poziomie ekspresji Pdx1 (Pdx1-high) a indukowana Activiną A, o niskim poziomie ekspresji (Pdx1-low). „Niskie” i „wysokie” populacje zostały wyselekcjonowane używając FACS i po wstrzyknięciu do myszy okazało się, że populacja o wysokim poziomie ekspresji Pdx1 trzy razy częściej generowała

komórki produkujące insulinę. Podobne wyniki otrzymaliśmy, gdy endoderma powstała w wyniku ekspozycji na Nodal lub Activine A, różnicowaliśmy w komórki wątroby. Aktywowana z zastosowaniem Nodal endoderma dwa razy częściej różnicowała się w komórki wątroby. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Development* (dorobek naukowy, pozycja 3).

6.3.5. Mezenchyma trzustkowa umożliwia ekspansję ludzkiej oraz mysiej endodermy oraz endokrynych progenitorowych komórek trzustki

Rozwój organów jest wypadkową dwóch głównych procesów, różnicowania oraz wzrostu. W przeciwieństwie do komórek macierzystych, w komórkach zróżnicowanych podziały komórkowe zachodzą rzadziej. W większości przypadków, im większy stopień zróżnicowania, tym rzadziej obserwowane są podziały komórkowe. Podczas rozwoju trzustki, komórki prekursorowe wysp Langerhansa otoczone są rozwijającymi się komórkami naczyń krwionośnych oraz zarodkową tkanką łączną, mezenchymą. Wcześniejsze badania oparte na nokautach wykazały, że inne populacje komórkowe są niezbędne do prawidłowego rozwoju trzustki [26]. Postawiłam więc hipotezę, że mezenchyma trzustki na odpowiednim etapie rozwoju zarodkowego jest źródłem sygnałów, które stymulują podziały komórkowe endodermy oraz innych komórek prekursorowych wysp Langerhansa. W tym celu tkanka łączna została wyizolowana z trzustki oraz innych endodermalnych organów, np. wątroby, na różnych etapach rozwoju zarodkowego i dojrzałego organu. W rezultacie ustanowiono i scharakteryzowano siedemnaście nowych, różnych mezenchymatycznych linii komórkowych. W następnym etapie przeprowadziłam testy, które z tych linii stymulują proliferację endodermy oraz prekursorów endokrynych komórek trzustki. Z ponad 60 różnych kombinacji zidentyfikowano cztery specyficzne linie mezodermy. Wszystkie cztery linie komórkowe pochodziły z trzustki; dwie z nich umożliwiały znaczącą proliferację mysiej oraz ludzkiej endodermy *in vitro* (przynajmniej dziesięciokrotny wzrost indeksu proliferacji w porównaniu z kontrolą) oraz dwie inne linie, które stymulowały podziały prekursorów endokrynych komórek trzustki

(trzynastokrotny wzrost w stosunku do kontroli). Ekspansję endodermy oraz prekursorów można powtarzać wielokrotnie, i w efekcie ustanowiliśmy linie komórek macierzystych trzustki (dorobek naukowy, pozycja 2). Globalna analiza ekspresji genów (za pomocą mikromacierzy) wykazała, że endoderma zachowuje swoją naturalną charakterystykę nawet po wielokrotnej proliferacji *in vitro*. Nasze badania po raz pierwszy opisały możliwość ekspansji tych populacji komórek. W podobnym czasie ukazała się publikacja innego zespołu, który również opisał proliferację endodermy *in vitro* [27]. Badania te poza aspektem poznawczym mają również zastosowanie praktyczne gdyż ekspansja endodermy i innych typów komórek może okazać się niezbędnym etapem terapii komórkowych w przyszłości. W przypadku cukrzycy, by zapewnić jednej osobie całkowitą niezależność od egzogennej insuliny, trzeba byłoby, zakładając wydajność obecnych metod, zróżnicować komórki rosnące na powierzchni 10 tys. standardowych szalek hodowlanych. Dlatego obecne procedury generowania komórek trzustki z komórek macierzystych wymagają adaptacji, i jedną z potencjalnych możliwości ulepszenia jest ekspansja komórek endodermy lub prekursorów. Obecnie w moim zespole badawczym prowadzimy badania nad identyfikacją sygnału pochodzącego z mezenchymy, który stymuluje proliferację endodermy oraz komórek prekursorowych trzustki. Wstępne wyniki wskazują, że sygnał odpowiedzialny za proliferację prekursorów trzustkowych jest białkiem, ponieważ efekt mitogenny zanika po traktowaniu wysoką temperaturą lub w obecności proteinyazy. Na postanie badania z zastosowaniem mikromacierzy ustaliłam listę białek produkowanych przez mezenchymę które ulegają sekrecji. Następnie wykorzystując taką samą metodologię zawęziłam listę kandydatów do białek których receptory znajdują się na powierzchni komórek progenitorowych trzustki. Kombinacje wytypowanych białek są obecnie dalej analizowane pod względem potencjału do indukowania proliferacji komórek trzustki.

Podsumowanie:

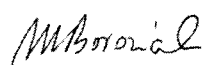
Na przedstawiony dorobek naukowy, który jest podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego składają się następujące badania i odkrycia:

1. Identyfikacja małych cząsteczek chemicznych, IDE1 oraz IDE2, jako stymulatorów różnicowania mysich oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych w endodermę. Opracowanie nowej metodologii różnicowania z wykorzystaniem reporterowych linii zarodkowych komórek macierzystych oraz prostych związków chemicznych.
2. Wykazanie funkcji agonisty kinazy proteinowej C w procesie specjalizacji endodermy w kierunku komórek prekursorowych trzustki.
3. Obserwacja i udokumentowanie różnorodności pomiędzy embrionalnymi ludzkimi liniami komórek macierzystych. Poszczególne linie, w tych samych warunkach, z różną wydajnością różnicują się w komórki trzech listków zarodkowych.
4. Opracowanie metody *ex vivo* pozwalającej na funkcjonalną ewaluację *in vitro* indukowanej endodermy.
5. Pokazanie różnic pomiędzy endodermą indukowaną przez różne białka z rodziny TGF-beta.
6. Wykazanie, że mezenchyma stymuluje długoterminową proliferację komórek prekursorowych trzustki oraz endodermy.

Uzyskane wyniki wskazują, że poprzez modulowanie ścieżkami sygnałowymi możliwe jest kierowanie procesem różnicowania mysich oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych w endodermę oraz komórki trzustki. Proces ten jest wydajny oraz selektywny w porównaniu do innych populacji komórkowych. Uzyskane *in vitro* komórki prekursorowe trzustki przygotowane do wstrzyknięcia do myszy, dojrzewają w funkcjonalne, wydzielające insulinę w odpowiedzi na wzrastające stężenie glukozy we krwi, komórki typu beta. Ponadto, połączenie technologii indukowanych komórek pluripotencjanych pochodzących od pacjentów z cukrzycą wraz z procesem różnicowania *in vitro*, pozwala na stworzenie platformy do badań nad rozwojem choroby, poszukiwań oraz testowania strategii prewencyjnych lub spowalniających przebieg choroby.

Zainteresowania oraz plany:

W następnych latach chciałabym kontynuować badania nad zastosowaniem komórek macierzystych do badań nad rozwojem jak również chorobami trzustki czy wątroby. Sadzę, że komórki macierzyste wraz z indukowanymi komórkami pluripotencjalnym, i w połączeniu z modelami zwierzęcymi i repertuarem metod hodowli *in vitro* oraz biologii molekularnej stwarzają szansę na poznanie nowych aspektów rozwoju i patologii trzustki oraz innych organów. W szczególności chciałabym skoncentrować się na wybranych ścieżkach sygnałowych oraz genach kluczowych dla tych procesów. Obecnie w zespole badawczym, którym kieruję koncertujemy się nad zrozumieniem interakcji pomiędzy różnymi typami komórek w rozwijającej się trzustce. W naszych badaniach wykorzystuję współczesne odkrycia biologii RNA by kierować procesem różnicowania. Ponadto, wykorzystując komórki od pacjentów z cukrzycą, przeprowadzamy badania nad powstawaniem i patologią genetycznych form cukrzycy. Zasadniczym zagadnieniem, który towarzyszy mi podczas mojej pracy naukowej jest pytanie dlaczego pewne organy ssaków potrafią się regenerować a inne nie posiadają takiej zdolności lub w bardzo ograniczonym stopniu, czy i w jaki sposób można regulować lub stymulować ten potencjał regeneracyjny na poziomie molekularnym.



Małgorzata Borowiak
18. 03. 2014

Spis literatury:

1. Rong S, Oskarsson M, Faletto D, Tsarfaty I, Resau JH, et al. (1993) Tumorigenesis induced by coexpression of human hepatocyte growth factor and the human met protooncogene leads to high levels of expression of the ligand and receptor. *Cell Growth Differ* 4: 563-569.
2. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, et al. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98: 600-603.
3. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429.
4. Lee YH, Magnuson MA, Muppala V, Chen SS (2003) Liver-specific reactivation of the inactivated Hnf-1alpha gene: elimination of liver dysfunction to establish a mouse MODY3 model. *Mol Cell Biol* 23: 923-932.
5. McVean M, Weinberg WC, Pelling JC (2002) A p21(waf1)-independent pathway for inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase p34(cdc2) and concomitant G(2)/M arrest by the chemopreventive flavonoid apigenin. *Mol Carcinog* 33: 36-43.
6. Gherardi E, Sharpe M, Lane K, Sirulnik A, Stoker M (1993) Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), the c-met receptor and the behaviour of epithelial cells. *Symp Soc Exp Biol* 47: 163-181.
7. Zohlhofer D, Graeve L, Rose-John S, Schooltink H, Dittrich E, et al. (1992) The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett* 306: 219-222.
8. Abreu-Blanco MT, Watts JJ, Verboon JM, Parkhurst SM (2012) Cytoskeleton responses in wound repair. *Cell Mol Life Sci* 69: 2469-2483.
9. Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105: 533-545.
10. Brem H, Tomic-Canic M (2007) Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117: 1219-1222.
11. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, et al. (2006) Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24: 185-187.
12. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
13. Puri S, Hebrok M (2010) Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell* 18: 342-356.
14. Gu G, Brown JR, Melton DA (2003) Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 120: 35-43.
15. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, et al. (2002) Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 129: 2367-2379.

16. Niimi T, Hayashi Y, Futaki S, Sekiguchi K (2004) SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha1 gene. *J Biol Chem* 279: 38055-38061.
17. Xu X, Browning VL, Odorico JS (2011) Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mech Dev* 128: 412-427.
18. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15: 106-110.
19. Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122: 1409-1416.
20. Larsson LI, Madsen OD, Serup P, Jonsson J, Edlund H (1996) Pancreatic-duodenal homeobox 1 -role in gastric endocrine patterning. *Mech Dev* 60: 175-184.
21. Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, et al. (2003) All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 52: 76-84.
22. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, et al. (2004) Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350: 1353-1356.
23. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467: 285-290.
24. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5: 111-123.
25. Schier AF, Shen MM (2000) Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403: 385-389.
26. Lammert E, Cleaver O, Melton D (2001) Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294: 564-567.
27. Cheng X, Ying L, Lu L, Galvao AM, Mills JA, et al. (2012) Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10: 371-384.

Załącznik nr 4: Wykaz publikacji w języku polskim

4.1 Dane bibliometryczne:

Sumaryczny IF publikacji (wg JCR, według roku publikacji): 162.794

Sumaryczny IF publikacji (wg JCR, rok 2012): 171.195

Całkowita liczba cytowań (wg Google Scholar, luty 2014): 1420

Indeks Hirscha (wg Google Scholar, luty 2014): 9

4.2 Lista publikacji wraz z IF oraz liczbą cytowań:

4.2.1 Publikacje stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego:

1. Malgorzata Borowiak, Rene Maehr, Shuibing Chen, Alice E. Chen, Weiping Tang, Julia O. Fox, Stuart L. Schreiber, Douglas A. Melton *Small molecules efficiently direct differentiation of mouse embryonic stem cells into definitive endoderm. Cell Stem Cell, 2009 Apr 3; 4 (4):348-58*

2009 IF: 23.563, 5-letni IF: 27.361, MNSiW: 50 pkt
liczba cytowań: 210

Udział M.B. w publikacji: projektowanie oraz wykonywanie wszystkich doświadczeń, analiza wyników, samodzielne napisanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Wyróżnione i omówione przez:

- Beverly A. Purnell, Science, (2009), 324, (59260), 440-440
- Zaret K, Using Small Molecules to Great Effect in Stem Cell Differentiation, Cell Stem Cell 2009 May 8;4 (5):373-4.

2. Julie B. Sneddon*, Malgorzata Borowiak*, Douglas A. Melton: *Self-renewal of ES derived progenitors by organ matched mesenchyme*, Nature. 2012 Nov 29;491(7426):765-8.

*equal contribution= równorzędne autorstwo/udział

2012 IF: 38.597, 5-letni IF: 38.159, MNSiW: 50 pkt
liczba cytowań: 28

Udział M.B. w publikacji: projektowanie oraz wykonywanie wszystkich doświadczeń razem z J.B.S, analiza wyników, napisanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

3. Alice E. Chen*, Malgorzata Borowiak*, Richard I. Sherwood, Anastasie Kweudjeu, Douglas A. Melton: Functional evaluation of ES cell-derived endodermal populations reveals differences between Nodal and Activin A-guided differentiation. *Development*. 2013 Feb 1;140(3):675-86.

*equal contribution= równorzędne autorstwo/udział

2012 IF: 6.208, 5-letni IF: 6.888, MNSiW: 40 pkt
liczba cytowań: 7

Udział M.B. w publikacji: projektowanie oraz wykonywanie części doświadczeń (ryc 3, 4, 5), analiza wyników, pomoc przy przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

4. Shuibing Chen, Malgorzata Borowiak, Julia Lamenzo, René Maehr, Kenji Osafune, Lance Davidow, Kelvin Lam, Lee F. Peng, Stuart L. Schreiber, Lee L. Rubin, Douglas Melton *A small molecule that directs differentiation of human embryonic stem cells-derived endoderm cells to the pancreatic lineage, Nature Chemical Biology, 2009 Apr; 5(4):258-65.*

2009 IF: 16.058, 5-letni IF: 16.738, MNSiW: 50 pkt
liczba cytowań: 267

M.B udział w projekcie polegał na: projektowaniu oraz wykonywanie części doświadczeń, przekazaniu wiedzy na temat różnicowania w kierunku trzustki, analizie wyników, pomocy przy przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

Wyróżnione przez:

Yu-Ping Yang and Chris Wright: "Chemicals turn human embryonic stem cells towards beta cells": *Nature Chemical Biology* 5, 195-196 (2009)

5. Kenji Osafune, Leslie Caron*, Malgorzata Borowiak*, Rita-Joy Martinez, Claire S. Fitz-Gerald, Yasunori Sato, Chad A. Cowan, Kenneth R. Chien, Douglas A. Melton. *Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell line. Nat Biotechnol. 2008 Mar; 26(3):313-5.*

*equal contribution

2008 IF: 22.297, 5-letni IF: 32.182, MNSiW: 50 pkt

liczba cytowań: 396

Udział M.B w publikacji: projektowanie oraz wykonywanie części doświadczeń, analiza wyników: różnicowanie komórek macierzystych, ustalenie i wykonanie części QPCR, wstępna analiza statystyczna, pomoc przy przygotowaniu rycin oraz pisanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

6. Malgorzata Borowiak* and Douglas A. Melton: *How to make β cells?* Curr Opin Cell Biol. 2009 Dec; 21(6): 727-32.

2009 IF: 14.153, 5-letni IF: 13.634, MNSiW: 45 pkt
liczba cytowań: 53

*autor korespondencyjny

M.B. koncepcja oraz przygotowanie manuskryptu. D.A.M. uwagi do manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

4.2.2 Pozostałe publikacje

7. Malgorzata Borowiak, Alistair N. Garratt, Michael Strehle, Thorsten Wuestefled, Christian Trautwein, Carmen Birchmeier. *Met provides essential signals for liver regeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 20; 101(29):10608-13.

2004 IF: 10.452, 5-letni IF: 10.583, MNSiW: 45 pkt
liczba cytowań: 290

Udział w publikacji: M.B. i C.B współautorzy koncepcji, projektowanie doświadczeń, analiza wyników i przygotowanie publikacji. M.B wykonała wszystkie doświadczenia. A.G pomoc przy hodowli komórek oraz pomoc w przygotowaniu publikacji, M.S. pomoc przy tworzeniu konstruktów DNA. T.W. oraz C.T pomoc przy ustaleniu metodologii usunięcia 70% wątroby. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

8. Jolanta Chmielowiec, Malgorzata Borowiak, Markus Morkel, Theresia Stradal, Barbara Munz, Sabine Werner, Jürgen Wehland, Carmen Birchmeier, and Walter Birchmeier. *c-Met is essential for wound healing in the skin.* J. Cell Biol., 2007 Apr 9;177(1):151-62

2007 IF: 9.598, 5-letni IF:10.257, MNSiW: 40 pkt
liczba cytowań: 117

Mój udział w projekcie polegał na: zrobienie Met-flox myszy, projektowaniu oraz wykonywanie części doświadczeń (in situ hybrydyzacji, analizy białek), analizie wyników, pomocy przy przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

9. Arne Giebeler, Mark Boekschoten, Christian Klein, Malgorzata Borowiak, Carmen Birchmeier, Nikolaus Gassler, Herman E. Wasmuth, Micheal Müller, Christain Trautwein, Kondrad L. Streetz, *c-Met Confers Protection Against Chronic Liver Tissue Damage and Fibrosis Progression After Bile Duct Ligation in Mice*, *Gastroenterology*. 2009 Jul; 137(1): 297-308

2009 IF: 12.899, 5-letni IF: 12.432, MNSiW: 50 pkt
liczba cytowań: 32

Udział M.B w publikacji: współ-projektowanie ora analiza wyników, pomoc przy przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

10. Philip Marx-Stoelting, Malgorzata Borowiak, Thomas Knorpp, Carmen Birchmeier, Albrecht Buchmann, Michael Schwarz *Hepatocarcinogenesis in mice with a conditional knockout of the HGF receptor c-Met*. *Int. J. Of Cancer* 2008 Nov 19

2008 IF:4.734 5-letni IF:4.656, MNSiW: 35 pkt
liczba cytowań:12

Udział M.B w publikacji: współ-projektowanie oraz wykonywanie części doświadczeń analiza wyników, uwagi do manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

11. Malgorzata Borowiak: The next generation of Beta cells: replication, stem cell differentiation and the role of small molecules. *Rev Diabet Stud*. 2010 Summer; 7(2):93-104. Epub 2010 Aug 10

2010 IF: 2.1, 5-letni IF: nieustalony, MNSiW: nieustalone pkt., liczba cytowań: 8

Mój udział procentowy szacuję na 100%.

12. Jolanta Chmielowiec and Malgorzata Borowiak*: *In vitro differentiation and expansion of human pluripotent stem cell derived pancreatic progenitors*

Rev Diabet Stud., przyjęty do druku, Maj, 2014

*autor korespondencyjny

2012 IF: 2.135, 5-letni IF: nieustalony, MNSiW: nieustalone pkt, liczba cytowań: 0

M.B. koncepcja oraz przygotowanie manuskryptu. Szacunkowy udział M.B. w projekcie 60%

Wykaz publikacji

M. Borowiak



Małgorzata Borowiak
18. 03. 2014

Załącznik nr 6: Informacje o pozostałych osiągnięciach naukowo-badawczych, dydaktycznych i organizacyjnych

6.1 Nagrody i wyróżnienia

- Stypendium naukowe Wydziału Biologii, UAM, 1996/1997 oraz 1997/1998
- Stypendium naukowe Ministra Edukacji Narodowej, 1998/1999 oraz 1999/2000
- Złoty Medal UAM za osiągnięcia naukowe i działalność studencka 2000
- Stypendium naukowe Niemieckiej Fundacji na Rzecz Nauki, DFG, Niemcy 2001-2003
- Stypendium naukowe fundacji RX, USA, 2006-2007
- Stypendium naukowe HHMI, USA, 2007-2008
- Helmholtz Association Junior Group Leader Award, Niemcy 2011- nie przyjęta
- McNair Medical Institute Scholar Award, Houston, USA, 2011

6.2 Patenty:

1. Compositions and methods for promoting the generation of definitive endoderm

DA Melton, M Borowiak, R Maehr, S Chen, W Tang, JL Fox, SL Schreiber
WO Patent 2,010,091,241 and US Patent App. 12/679,406

Licencja została wykupiona i skomercjalizowana przez firmy biotechnologiczne:
Tocris Biochem oraz StemGent

2. Compositions and methods for promoting the generation of Pdx1+ pancreatic cells

S Chen, DA Melton, M Borowiak, J Lamenzo, SL Schreiber, LF Peng, L Davidow, K Lam, LL Rubin

US Patent App. 12/989,284, 2009

6.3 Staże badawcze oraz współpraca z innymi instytucjami badawczo-naukowymi

6.3.1. Staże krótkoterminowe:

- Biozentrum, Laboratory of Neurobiology, Basel, Szwajcaria, 2002-jedno-miesięczny staż
- Uniwersytet Kliniczny, Department of Gastroenterology, Aachen, Niemcy, 2004- jedno-miesięczny staż

- Uniwersytet Medyczny, Department of Gastroenterology, Hannover, Niemcy, 2005, jedno-miesięczny staż

6.3.2 Współpraca z innymi instytucjami:

Przy badaniach nad regeneracją współpracowałam z:

- Prof. Ermanno Gherardi, MRC, UK- funkcja zrekombinowanych białek HGF w cytoprotekcji cardiomiocytów oraz jako stymulatorów regeneracji serca u myszy, 2004-2006
- Prof. Christian Trautwein, Niemcy- przy badaniach nad regeneracją wątroby, 2003-2006

Przy badaniach nad różnicowaniem komórkach macierzystych w komórki endodermy oraz trzustki współpracowałam z:

- Prof. dr Steward Schreiber, MIT, Boston, USA- przy tworzeniu bibliotek związków chemicznych, 2006-2009
- Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA- służyłam radą przy rozpoczęciu badań z wykorzystaniem, zarodkowych komórek macierzystych oraz współpraca przy późniejszych projektach, 2008-2009
- Betalogics, NJ, USA współpraca na temat różnicowania komórek macierzystych w komórki trzustki, 2010-2011

6.4 Kierowanie i udział w projektach naukowych

- 2007-2009 - Grant Beta Cell Biology Consortium (BCBC): „ Chemical screens into endoderm formation from mouse ES cells”, **główny wykonawca**, kierownik/PI: Prof. Douglas Melton
- 2007-2009 – Grant Eli Lilly: „Differentiation of stem cells into pancreatic lineages”, **współ-kierownik/co-PI**, razem z Prof. D. Melton'em
- 2010-2011 – Grant Helmsley Foundation- T1D Division „ Generation of human pluripotent stem cells report cells lines for pancreatic differentiation”, **współ-kierownik/co-PI**, razem z Prof. D. Melton'em
- 2012-2013 - Grant własny, NIH (P30-DK079638) „Microenvironment in expansion and maturation of human pluripotent derived pancreatic progenitors”, **kierownik grantu**
- 2012-2014 - Grant własny, McNair Medical Institute, „Pluripotent stem cell in diabetes”, **kierownik grantu**

6.5. Udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych

6.5.1 Autorstwo/współautorstwo 20 doniesień zjazdowych, i uczestnictwo w następujących konferencjach:

- Kultura fizyczna w promocji i doskonaleniu zdrowia, Gorzów 1966 "Wpływ wybranych czynników środowiskowych na wiedzę żywieniową młodzieży szkół średnich w profilaktyce osteoporozy"
- Student Association Meeting, Gdańsk, 1998 oraz 1999, "Construction of infectious cDNA of PSTVd carrying a green fluorescent protein"
- Biotechnology Student Meeting, Łódź, 1999
- FEBS Congress, 2000, Athens, Grecja, „Polymorphism of detoxifying enzymes in children living in Upper Silesia”
- FASEB Research Conference on Tyrosine Kinase Signal Transduction Snowmass, USA, 2001, "Conditional inaction of tyrosine kinase receptor c-Met in mice"
- FASEB Conference "Growth factor receptor tyrosine kinases in mitogenesis, morphogenesis and tumorigenesis", Tuscon, USA, 2003, "Conditional inaction of tyrosine kinase receptor c-Met in mice"
- FASEB Research Conference, Mechanism of Liver Growth and Development, Snowmass, USA, 2004: "Liver regeneration without Met signaling"
- Volkswagen Scientific Foundation Meeting, Dresden, Niemcy, 2003: "Function of Met signaling during axon projection"
- DFG Graduate Student Symposium, Berlin 2004: "Met signaling during liver regeneration and homeostasis"
- European Diabetes Consortium Meeting, Strasbourg, Francja, 2006
- Beta Cell Biology Consortium (BCBC), Investigator Retreat, Washington, USA, 2007 oraz 2008, "Small molecule screen towards definitive endoderm"
- BCBC Investigator Retreat, Chantilly, USA, 2009 "Directed differentiation of embryonic stem cells towards pancreatic progenitors using small molecules"
- Boston System Biology Meeting, 2011, „Small molecule inducers of endocrine progenitors"
- Helmsley Investigation Meeting, New York, USA, 2010 „Directing mouse nad human embryonic stem cells differentiation toward pancreatic endocrine progenitors using chemical approaches"
- Helmsley Investigation Meeting, New York, USA, 2010 „Creation of human ES cell reproter lines for differentiation to beta cells"
- ADA, 70th Scientific Sessions, Orlando, USA, 2010 "
- ISSCR, 11th Annual Meeting, Yokohama, Japonia, 2012
- ADA, 73rd Annual Meeting Chicago, USA, 2012
- CAGT Annual Meeting, Galveston, USA, 2012 "Molecular signature of human stem cell derived pancreatic cells" oraz "Pancreatic niche in expansion and maturation of beta cells"

- CAGT Annual Meeting, Galveston, 2013 “Strategies for late stage differentiation to generate mature beta cells”
- CAGT Annual Meeting, Galveston, 2013 “Lineage tracing in pancreatic endocrine progenitor cell development”

6.5.2 Seminaria/wykłady- zaproszenia

Zaproszenia do wygłoszenia wykładu/seminarium na temat regeneracji:

- Luty 2005, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej (IIMCB) Warszawa: „Met as a part of general, defensive response to tissue injury”.
- Marzec 2005, Karolinska Medical Institute, Stockholm, Szwecja: „Liver regeneration: lesson from Met conditional knockout”
- Maj 2005, Cambridge University, UK: “Function of Met in adult liver”
- Czerwiec 2005, MRC (Medical Research Council), Cambridge, UK: “Role of Met during response to tissue injury and regeneration”
- Grudzień 2005, UPenn, Philadelphia, USA: “Function of Met signaling during regeneration of adult organs”
- Grudzień 2005, Harvard University, Cambridge, USA: “Regeneration without Met signaling”

Wykłady i seminaria na temat komórek macierzystych:

- Maj 2006, BCBC Consortium Meeting, Washington, USA: “Chemical screens into pancreatic lineage”
- Październik 2008, BCBC Principal Investigator Meeting, Washington, USA: “How to make beta cells”
- Maj 2009, BCBC Principal Investigator Meeting, Washington, USA: “Generation of beta cells in vitro”
- Lipiec 2008, Eli Lilly Pharma Company, Indianapolis, USA: “Small molecules induce differentiation of embryonic stem cells into pancreatic lineage”
- Październik 2009, SysCode Meeting, Harvard Medical School, Boston, USA „Pancreatic Islet Design and Engineering”
- Czerwiec 2010, SysCode Meeting, Harvard Medical School, Boston, USA „Strategies for pancreatic differentiation”
- Kwiecień 2009, Uniwersytet im. Adam Mickiewicza, Poznań: „How to make mature cells: capacity of mature and embryonic stem cells to regenerate damaged tissue”
- Kwiecień-Maj 2010, Politechnika, Gdańsk, Wydział Chemii, seria wykładów na temat biologii komórek macierzystych i ich zastosowania w medycynie.
- Czerwiec 2010, American Diabetes Association Annual Meeting, Miami, USA: “Small molecules in generation of definitive endoderm and pancreatic progenitors from embryonic stem cells”

- Styczeń 2011, Irvine University, Stem Cell Institute, Irvine, USA: "Generation of renewable source of pancreatic beta cells"
- Styczeń 2011 Society for Laboratory Automation and Screening Meeting, Palm Springs, USA, "Small molecules for pancreatic differentiation"
- February 2011, Washington University, Department of Developmental Biology, St. Louis, USA: "Generation of renewable source of pancreatic beta cells"
- Marzec 2011: Max Delbrück Centrum, Berlin, Niemcy: "Generation of renewable source of pancreatic beta cells"
- Luty 2014: Developmental Biology Graduate program at BCM and MDAnderson, Houston, TX, USA "Strategies for late stage differentiation to generate mature beta cells"
- Luty 2014, Northwest Medical Center, Houston, TX, USA, "Stem cells practical application, present and future".

6.6. Udział w profesjonalnych organizacjach:

Beta Cell Biology Consortium (BCBC) 2007-2012

SysCode Miedziodyscyplinarny zespół badawczy, 2008-2012

International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2010-obecnie

American Diabetes Association 2010-obecnie

6.7 Dydaktyka

6.7.1 Zajęcia:

Rok akademicki 2004/2005: współprowadząca ćwiczenia przedmiotu „Mouse Genetics”, Uniwersytet Frei, Berlin, Niemcy

Rok akademicki 2007/2008: współprowadząca zajęcia z przedmiotów „Introduction to Stem Cells”. Harvard University, Cambridge, USA

Od 2013 roku organizator co-miesięcznego seminarium dla Centrum Komórek Macierzystych oraz Medycyny Regeneracyjnej

6.7.2 Bezpośrednia praca ze studentami:

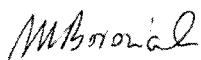
- Jessica Hightower- praca licencjacka, Harvard University, promotor pomocniczy, styczeń 2007-czerwiec 2009
- Sikes Aaron, SMART program student, Harvard University, opiekun naukowy, czerwiec 2009- październik 2010
- Jana Hrvatanova, Harvard University, opiekun naukowy- czerwiec 2010- październik 2011

- Marissa Ann Rudy, praca doktorska, Baylor College of Medicine, promotor wrzesień 2013-obecnie
- Cynthia Kim, praca doktorska, Baylor College of Medicine, promotor pomocniczy, styczeń 2013-obecnie

6.8. Recenzowanie artykułów i projektów

Ad hoc recenzent dla: PLOS One, Stem Cells, Stem Cells and Development, The Review in Diabetic Studies

Edytor specjalnego wydania RDS na temat regeneracji trzustki, wiosna 2014



Małgorzata Borowiak
18. 03. 2014