



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
ul. Wołyńska 33
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 71 87
e-mail: genetyka@up.poznan.pl

WYDZIAŁ MEDYCYNY
WETERYNARYJNEJ I
NAUK O ZWIERZĘTACH

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt



Dr hab. Piotr Pawlak

10.11.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Marty Guzewskiej

wykonanej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie
pod kierunkiem prof. dr hab. Moniki Kaczmarek

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. "*Biogenesis and release of extracellular vesicles during communication between the embryo and the maternal endometrium during early pregnancy in pigs*" to 60-stronicowe opracowanie, na które składają się dwie oryginalne, spójne tematycznie prace naukowe oraz jedna przeglądowa, wszystkie opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o uznanej renomie – Cell Communication and Signalling, FASEB Journal oraz Molecular Reproduction and Development. We wszystkich pracach autorka rozprawy jest pierwszym autorem, przedstawiła także stosowne oświadczenia wykazując własny oraz innych autorów wkład merytoryczny w powstanie prac.

Pracę wykonano pod opieką Pani Profesor Moniki Kaczmarek, która od lat pracuje nad mechanizmami odpowiedzialnymi za komunikację pomiędzy komórkami rozwijającego się zarodka a nabłonkiem macicy, endometrium. Niewątpliwie podjęty w rozprawie problem jest niezwykle interesujący. W biologii rozwoju i rozrodu stale wiele obszarów badawczych, co oczywiste, oczekuje na przełomowe odkrycia wspominając choćby proces owulacji i rekrutacji pęcherzyków jajnikowych, pierwszych oznak i mechanizmów różnicowania komórek w zarodkach przedimplantacyjnych czy właśnie rozpoznania ciąży i implantacji zarodka. Dzięki potężnemu rozwojowi technologicznemu, który umożliwia konstrukcję narzędzi analitycznych o doskonałej precyzji, czułości czy rozdzielczości, możliwe są coraz bardziej dogłębne analizy, także na poziomie pojedynczej komórki.

W 1967 roku Peter Wolf opisał „materiał w postaci drobnych cząstek, ulegający sedimentacji na skutek wirowania przy dużej prędkości i pochodzący z płytek krwi, ale odróżniający się od nienaruszonych płytek krwi”, a więc dziś znaną już frakcję tzw. pęcherzyków zewnątrzkomórkowych – extracellular vesicles - EVs. Dalsze prace wykorzystujące mikroskopię elektronową oraz inne techniki jeszcze w latach 70' pozwoliły je zwizualizować, a także wykazać, że zawierają m.in. lipidy, ATP czy białka. Podstawowe szlaki biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe to wywodzące się z komórek struktury otoczone błoną, w których zidentyfikowano różne typy cząsteczek, np. mikroRNA, długie niekodujące RNA (lnc-RNA), mRNA, białka, DNA, różne klasy lipidów, hormonów i cząsteczek sygnałowych. Ponadto mogą służyć jako biomarkery stanów patofizjologicznych, a poprzez oddziaływanie na inne komórki, wpływają na metabolizm w tkankach lokalnych i odległych. Znany jest także udział EVs w komunikacji międzykomórkowej w okresie okołimplantacyjnym. Aby doszło do implantacji zarodka konieczne są między innymi zmiany w morfologii nabłonka

powierzchniowego endometrium. Sukces reprodukcyjny zależy oczywiście od znacznie większej liczby czynników i wynika z poprawnych procesów biologicznych zarówno po stronie rozwijającego się i różnicującego zarodka, a także matki, na poziomie lokalnym, narządowym oraz centralnym związanym np. z gospodarką hormonalną, a więc aspektach poruszonych w omawianej pracy doktorskiej.

Hipoteza badawcza została jasno sformułowana i zakłada, że komunikacja pomiędzy komórkami zarodka i nabłonka błony śluzowej macicy związana jest z biogenezą pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych, zależną i regulowaną przez wydzielane przez zarodek hormony i cząsteczki mikroRNA. Postawiono trzy główne cele badawcze, do których Autorka odnosi się w rozdziale wyniki w formacie, od najbardziej ogólnych po bardziej szczegółowe i dogłębne. W pierwszej kolejności postanowiła zidentyfikować populację EVs na wcześniejszych i późniejszych etapach okołointerakcyjnych, następnie zbadać ekspresję genów związanych biogenezą EVs w liniach komórkowych zarodka i endometrium, a finalnie w warunkach hodowli *in vitro* śledzić procesy odpowiedzialne za indukcję wydzielania pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych prowadzące do komunikacji pomiędzy zarodkiem a komórkami nabłonka macicy. Autorka skupiła się na endosomalnym kompleksie sortującym (ESCRT - endosomal sorting complex required for transport), który składa się głównie z pięciu kompleksów białkowych, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III i kompleksu Vps4, których funkcja różni się i odpowiadają za tworzenie MVB, selekcję ładunku (np. RNA, białek, lipidów) czy organizację uwalniania pęcherzyków.

Opis materiałów i metod jest właściwie tożsamy z tym przedstawionym w oryginalnych pracach twórczych, choć w mojej ocenie mógł być bardziej rozwinięty. W pracach recenzowanych zwykle materiał i metody są pisane dość ogólnie lub powołuje się na już opublikowaną metodykę, a sama praca doktorska poza oczywistym aspektem badawczym najczęściej dotyczy rozwijania warsztatu metodycznego, opracowania lub wdrażania nowych technik analitycznych, dopracowania ich do szczególnych warunków eksperymentalnych. Warto w tym miejscu zostawić ten z pewnością obszerny aspekt pracy doktorskiej, do ewentualnego wykorzystania także przez innych badaczy. W tym miejscu chciałbym zadać pytanie o analizę ekspresji genów, a właściwie względnego poziomu mRNA. W rozdziale napisano, że wykorzystano niektóre geny referencyjne, których stabilność sprawdzono przy użyciu algorytmów NormFinder. Analiza stabilności genów referencyjnych wskazuje na profesjonalne podejście do analiz ilościowych qPCR, zgodnie z wytycznymi MIQE guidelines, a więc opracowania, które ma na celu ujednolicenie metod i zapewnienie powtarzalności publikowanych wyników qPCR. Autorka jednak wskazuje, że bazowała w obliczeniach na kilku genach referencyjnych (strona 26), jednak w pracy oryginalnej wyniki odnoszone są względnie tylko do genu *GAPDH* lub *HPRT*. Warto uzupełnić także ten rozdział, szczególnie gdy ekspresja mRNA genów badanych jest porównywana ze sobą, o kontrolę efektywności reakcji dla poszczególnych genów (m.in. slope i Y-intercept). Inne metody zostały w mojej opinii szczegółowo opisane i zapewniają ewentualnym odbiorcom odwzorowanie technik. Chciałbym zwrócić uwagę na dużą staranność w opracowaniu tabel, rycin, grafik, które są bardzo przejrzyste i ułatwiają czytelnikowi odnalezienie niezbędnych informacji. Schemat doświadczenia, a także inne grafiki są przygotowane bardzo obrazowo i szczegółowo. Tylko w jednym przypadku moją uwagę zwrócił na Fig. nr 1 (strona 14) zarodek opuszczający osłonkę przejrzystą (tzw. hatching embryo), który wydaje się niemal symetrycznie wykluwać w dwóch miejscach pęknięć osłonki. Embriologicznie takie obrazy są albo niezwykle rzadkie, ale w ogóle nie obserwowane, gdyż osłonka przejrzysta pęka w jednym miejscu, w którym obserwuje się przechodzące stopniowo komórki blastocysty. Sugeruję by w podpisie the figury zamienić słowo „divide” na „develop” lub „cleave”, ze względu



na ewentualne błędne zrozumienie podziału zarodka na np. kilka części. Chciałbym podkreślić, że doceniam dużą liczbę technik użytych dla otrzymania wyników i osiągnięcia zakładanych celów. Autorka pracy musiała wykazać się sprawnością w pracy zarówno z tkankami, zwierzętami, hodowlami in vitro, analizami molekularnymi i komórkowymi oraz znajomością narzędzi bioinformatycznych.

Wyniki przedstawiono w podziale na logiczne podrozdziały, w których Autorka umiejętnie przedstawia analizy jednocześnie dokonując wstępnych konkluzji, które odzwierciedlają uzyskane wyniki, a w uzasadnionych przypadkach wskazuje na trendy, związki lub sugestie występowania mechanizmów biologicznych, co świadczy o dojrzałości w krytycznym formułowaniu wniosków i chęci poszukiwania odpowiedzi. Bardzo trafionym pomysłem są formułowane podsumowania konkretnych rozdziałów i partii wyników w zwięzłym akapicie. Zwracam uwagę, że w pracach oryginalnych dokumentacja fotograficzna, zarówno mikrofotografii elektronowej czy konfokalnej jest bardzo klarowna, wysokiej jakości, bogata i doskonale ilustruje wyniki.

Dyskusja rozprawy liczy 7 stron, na których Doktorantka czytelnie i zrozumiale omawia uzyskane wyniki jednocześnie odnosząc je do wcześniej publikowanych. Dodatkowo na koniec umieszcza rozdział „Future perspectives”, w który, umiejętnie wskazuje konieczność rozszerzenia badań, potencjalne kierunki w celu pełnego zrozumienia komunikacji pomiędzy zarodkiem, a matką. Z pewnością dużą zaletą pracy jest zakres pracy oraz mnogość technik analitycznych użytych do weryfikacji stawianych hipotez. Choć techniki te są powszechnie używane, a dostępne odczynniki i aparaty zapewniają coraz bardziej powtarzalne i dogłębne, wysokorozdzielcze wyniki, to warsztat badawczy na tym etapie kariery naukowej z pewnością zaprocentuje i zasługuje na docenienie. Na wyróżnienie zasługują także przygotowane przez Autorkę ryciny ilustrujące mechanizmy odpowiedzi komórkowej na wzorce molekularne.

Koniec pracy wieńczy rozdział podsumowanie, w którym sformułowano sześć głównych wniosków, które spójnie nawiązują do uzyskanych wyników. Niewątpliwie badana komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem EV jest istotnym elementem rozwoju wczesnej ciąży. Ujęcie w pracy kilku punktów czasowych umożliwiło śledzenie kinetyki zmian i obrazów molekularnych zachodzących procesów w okresie okołoinplantacyjnym. Szczególnie cenna wydaje się obserwacja zmiany ekspresji genów zaangażowane w biogenezę EVs. Dodatkowo wydzielane przez zarodek hormony wpływają na ekspresję genów w endometrium, a dzięki odpowiednio zaprojektowanym eksperymentom z użyciem cząsteczki mikroRNA (miR-125b-5p) udało się także wykazać, które szlaki przekazywania sygnału pełnią pierwszoplanową rolę. Dodatkowo proponowany mechanizm regulacji ekspresji docelowych genów przez miR-125b-5p w zarodku i w konsekwencji intensyfikacja wydzielania pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych stanowi oryginalne i bardzo wartościowe osiągnięcie. Wszystkie uzyskane wyniki, świadczą, że proces implantacji, dialogu zarodka z tkanką maczyną jest złożony i ukierunkowany w czasie. Nasuwają się bardzo ciekawe dalsze pytania – w jaki sposób wygląda komunikacja na wcześniejszych etapach lub czy możliwe są podobne szlaki przekazywania sygnałów, kiedy zarodek jest jeszcze w osłonce przejrzystej. Ponadto globalne profilowanie epigenetyczne (pełnego obrazu microRNA, metylacji DNA) i transkryptomiczne mogłoby pomóc w pełnym zrozumieniu obrazu komunikacji na styku komórek zarodka i nabłonka błony śluzowej macicy.

Podsumowując uważam, że przedstawiona praca doktorska ma wysoką wartość merytoryczną, udokumentowaną cennymi wynikami, a ponadto została napisana przystępnie, fachowym językiem o bardzo dobrej konstrukcji stylistycznej. Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marii Guzewskiej spełnia warunki stawiane pracom

doktorskim w myśl artykułu 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U Nr 65, poz. 595 z późn.zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Marii Marty Guzewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Ze względu na poziom naukowy pracy, przedstawione mechanizmy biologiczne, poparte uzyskanymi wynikami, a jednocześnie bardzo dobrze zredagowaną pracę oraz wysokiej jakości opublikowanymi pracami oryginalnymi uważam i jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie pracy doktorskiej.

KIEROWNIK KATEDRY

dr hab. Piotr Pawlak