

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Joanny Szuszkiewicz

pt. „*Rola mikroRNA w komunikacji zarodek-macica na wczesnych etapach ciąży*”.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska mgr Joanny Szuszkiewicz (*de domo* Najmuła) została wykonana w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk (PAN) w Olsztynie pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. Moniki M. Kaczmarek. Podstawą rozprawy doktorskiej są 2 oryginalne prace twórcze oraz 1 przeglądowy artykuł naukowy. Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports* – JCR. Prace oryginalne odpowiednio w *FASEB Journal* ($IF_{5-letni}=6,103$) i *Biology of Reproduction* ($IF_{5-letni}=5,955$) a praca przeglądowa w *International Journal of Molecular Sciences* ($IF_{5-letni}=6,628$). Sumaryczny IF prac jest bardzo wysoki i wynosi 18,686. W pracach oryginalnych Doktorantka jest pierwszym autorem a Jej wkład w te prace, jak wynika z załączonych oświadczeń był znaczący i obejmował opracowanie koncepcji prowadzonych eksperymentów, wykonanie wszystkich bądź większości badań laboratoryjnych, wykonanie analiz bioinformatycznych, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie manuskryptu. W pracy przeglądowej Doktorantka jest drugim autorem i była odpowiedzialna za przygotowanie rozdziału o roli miRNA w interakcji zarodek-endometrium, opracowaniu tabeli i sformułowanie końcowych wniosków oraz redakcję manuskryptu.

Wykonane badania zostały sfinansowane z wielu źródeł, tj. ze środków projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki - projektu OPUS (nr 2014/15/B/NZ9/04932), którego kierownikiem była Pani prof. dr hab. Monika M. Kaczmarek i projektu PRELUDIUM (nr 2016/21/N/NZ9/03443), którym kierowała Doktorantka. Ponadto, Doktorantka była beneficjentką programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Diamentowy Grant (nr 0041/DIA/2014/43). Badania sfinansowano także z Funduszu Badań Własnych Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie (nr 22/FBW/2021, 1/FBW/2022), którymi kierowała Pani prof. dr hab. Monika M. Kaczmarek. Część badań wykonano także podczas zagranicznego stypendium Doktorantki na Uniwersytecie Yale (USA), który realizowała w ramach Programu Fulbrighta w kategorii *Fulbright Junior Research Award*. Na duże uznanie zasługuje aktywność Doktorantki w pozyskiwaniu środków finansowych na badania, kierowanie własnymi projektami i bycie laureatką prestiżowych programów stypendialnych.

Forma rozprawy doktorskiej jest typowa dla tego typu prac, których podstawą są artykuły naukowe. W 57 stronicowym opracowaniu zawarto następujące podrozdziały: streszczenie w języku

polskim i angielskim, wykaz najczęściej stosowanych skrótów, wstęp, hipoteza i cele badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja, perspektywy dalszych badań, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Do rozprawy załączono kopie trzech publikacji wraz z oświadczeniami autorów. Kolejność prac oryginalnych jest zmieniona względem ich przywoływania w opracowaniu, co czasami utrudnia odnalezienie właściwej ryciny. Także oświadczenia autorów są załączone w niepoprawnej kolejności.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy poznania roli krótkich, niekodujących cząsteczek RNA - mikroRNA (miRNA) w komunikacji między zarodkiem i matką. Matczyne rozpoznanie ciąży i implantacja zarodków, ze względu na swoje skomplikowanie i trudność badania, stanowią jedne z najmniej poznanych ale i najbardziej fascynujących procesów zachodzących we wczesnych etapach ciąży. Zespół, z którego wywodzi się Doktorantka, od wielu lat zajmuje się poznaniem kluczowych mechanizmów dla ustanowienia ciąży i ma wielkie osiągnięcia w tym zakresie. Badania prowadzone są na modelu świni domowej, która jest nie tylko podstawowym gatunkiem gospodarskim ale także ważnym organizmem biomodelowym. Wcześniejsze badania realizowane przez Panią prof. dr hab. Monikę Kaczmarek wraz z zespołem dostarczyły wielu cennych danych na temat profilu ekspresji miRNA zaangażowanych w regulację genów kluczowych dla prawidłowej komunikacji zarodek-matka podczas ciąży. Badania Doktorantki poszerzają to zagadnienie o miRNA obecne w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs), które stanowią ważny element w komunikacji międzykomórkowej. Do tej pory wiedza o udziale pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w w/w procesy była ograniczona. Podjęta tematyka rozprawy doktorskiej jest zatem nowatorska i wartościowa z punktu widzenia poznawczego a w przyszłości nawet aplikacyjnego, w kontekście wykorzystania miRNA jako biomarkerów w diagnostyce powikłań ciąży.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim, które bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę pracy doktorskiej i przedstawiają najważniejsze wyniki. W ok. 6-stronnicowym *Wstępie* Doktorantka opisuje okres okołomplantacyjny ciąży ssaków, ze szczególnym odniesieniem do świni domowej oraz funkcje i znaczenie miRNA oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na wczesnych etapach ciąży. Rozdział jest dość krótki ale nie stanowi to problemu ze względu na zamieszczenie w rozprawie pracy przeglądowej, która stanowi bardzo szczegółowe i kompleksowe ujęcie omawianej tematyki. Cenne jest opracowanie Tabeli 1 w artykule, która pozwala na zapoznanie się z kluczowymi miRNA, które zidentyfikowano na różnych etapach rozwoju zarodków świni i w różnym materiale badawczym. W mojej ocenie warto byłoby umieścić prace przeglądową w rozprawie jako pierwszą, bo skłaniałby to czytelnika do jej przeczytania w pierwszej kolejności. Wątek śmiertelności zarodków świni, który stanowi punkt wyjścia do prowadzenia badań w tej tematyce jest potraktowany na początku *Wstępu* bardzo skrótowo. Odniesiono się do z pewnością ważnych prac ale dwie z nich pochodzą z lat 80.XX wieku. Czy szeroko zakrojone badania i postęp jakiego dokonano w ostatnich latach w prowadzeniu hodowli i opiece weterynaryjnej świni polepszył przeżywalność zarodków i płodów czy wręcz odwrotnie, stosowanie intensywnej selekcji ukierunkowanej na zwiększenie produktywności sprawia, że problem zamieralności zarodków świni jest ciągle na tym samym poziomie? Będę wdzięczna za odniesienie się do najnowszych danych na ten temat w trakcie obrony. Podrozdział dotyczący miRNA jest bardzo dobrze opisany. Doktorantka dostrzega złożoność oddziaływań miRNA-mRNA, co z pewnością przełożyło się później na wnikliwą interpretację uzyskanych wyników. W dalszej części *Wstępu* można było przedstawić bardziej szczegółową klasyfikację zewnątrzkomórkowego miRNA (ECmiRNA - extracellular miRNA).

Doktorantka od razu przeszła do omawiania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako głównego transportera miRNA. Warto zaznaczyć, że wolne krążące miRNA są stabilne i mogą także odgrywać rolę w komunikacji międzykomórkowej. Ich obecność należy mieć na uwadze dobierając odpowiednie metody i zestawy do izolacji miRNA. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich udział w komunikacji międzykomórkowej podczas ciąży zostały dobrze przedstawione.

W kolejnym rozdziale Doktorantka prezentuje dość ogólnie sformułowaną hipotezę badawczą, mówiącą o tym, że miRNA pochodzenia zarodkowego i endometrialnego na drodze auto- i parakrynnie regulują procesy istotne podczas wczesnej ciąży. W celu jej weryfikacji zaplanowano dwa zadania badawcze – pierwsze dotyczyło oceny zaangażowania EVs i niesionych przez nie miRNA w komunikacji międzykomórkowej pomiędzy zarodkiem i matką na wczesnych etapach ciąży, drugie miało na celu określenie wpływu wybranych miRNA niesionych przez EVs na funkcje trofoblastu. W żadnym miejscu w tym podrozdziale nie odniesiono się do gatunku/-ów, na którym prowadzono badania. Podjęty problem naukowy uznaję za oryginalny i o dużym znaczeniu poznawczym.

Rozdział *Materiały i Metody* rozpoczyna się od ryciny obrazującej schemat przeprowadzonych doświadczeń. Bardzo dobrze ilustruje ona ogromny zakres metodyczny pracy. Wykonano analizy *ex vivo*, *in vitro* i *in silico* z zastosowaniem szeregu metod badawczych. Materiał badawczy to głównie pobrane poubojowo wypłuczyny macicy, zarodki oraz endometrium ciężarnych loszek w wybranych dniach po inseminacji. Z zarodków preparowano także trofoblast oraz pierwotne komórki trofoblastu. Część eksperymentów przeprowadzono także na liniach komórkowych dostępnych komercyjnie, tj. JEG-3, RL-95 i HEK-293T. Wiadomo, że linia JEG-3 wywodzi się z ludzkiego guza trofoblastycznego i opisywana jest jako hipertriploidalna. Wykazuje ona odmienny profil ekspresji genów, białek i miRNA w porównaniu do innych podobnych linii komórkowych. Czy brano to pod uwagę w planowaniu eksperymentów z użyciem tej linii? W pracy zastosowywano cały wachlarz metod badawczych, tj. prowadzenie hodowli komórkowych *in vitro*, barwienia immunohistochemiczne, izolacja EVs, metody Western blot, RTqPCR, RNA-Seq, i TLDA, testy „gojenia rany”, inwazyjności, migracji, przylegania i proliferacji komórek, transfekcje komórek, test reporterowy lucyferazy, mikroskopię elektronową, konfokalną i sił trakcyjnych oraz szereg różnorodnych analizy *in silico* (m. in. identyfikacja procesów i ścieżek biologicznych, analiza interakcji miRNA-mRNA). Bardzo ciekawym układem eksperymentalnym jest opracowanie autorskiego modelu, w którym EVs i komórki trofoblastu, izolowane od tego samego osobnika wykorzystano w doświadczeniu *in vitro* do oceny wpływu EVs na komórki trofoblastu. Mając na uwadze dobrze opisaną w ostatnich latach obecność miRNA w dodatkach do mediów hodowlanych, głównie w FBS/NBS ale także w mediach pozbawionych surowicy, proszę o wyjaśnienie jakie stosowano metody normalizacji/walidacji oceny wpływu wyłącznie EVs na zmiany transkryptomu komórek pTr czy obecności miRNA pochodzącego wyłącznie z EVs. Do wizualizacji kwasów nukleinowych w EVs zastosowano barwienie oranżem tiazolowym (TO). Wiadomo, że TO wiąże się specyficznie z dsDNA i dsRNA. Czy podjęto także próby wizualizacji miRNA za pomocą sond molekularnych? Wszystkie analizy zostały przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi przepisami. Materiał zwierzęcy pobierano zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Prace wymagające użycia mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczone do kat. I zostały zgłoszone do Ministerstw Środowiska (nr 01.2.-118/2017). Podsumowując, z wielkim uznaniem odnoszę się do zastosowania tak różnorodnych, kompleksowych metod badawczych i doceniam szerokie kompetencje badawcze Doktorantki.

W następnym rozdziale Doktorantka omawia najważniejsze *Wyniki*, które zostały przedstawione w kolejności, odpowiednio dla publikacji nr 1 i nr 2 (jak wspomniano wcześniej kolejność załączenia prac w dalszej części rozprawy jest zmieniona).

Publikacja 1: Szuszkiewicz J, Myszczyński K, Reliszko ZP, Heifetz Y, Kaczmarek MM. Early steps of embryo implantation are regulated by exchange of extracellular vesicles between the embryo and the endometrium. *FASEB J.* 2022 Aug;36(8):e22450.

Publikacja 2: Szuszkiewicz J, Nitkiewicz A, Drzewiecka K, Kaczmarek MM. miR-26a-5p and miR-125b-5p affect trophoblast genes and cell functions important during early pregnancy. *Biol Reprod.* 2022 Aug 9;107(2):590-604.

W tej części nie pokazano wyników niepublikowanych dotyczących miR-23b-3p, które zostały przywołane w rozdziale *Perspektywy dalszych badań*. Wyniki zostały opublikowane w uznanych czasopismach z listy JCR i z pewnością przeszły już wnikliwą ocenę recenzencką. Na uznanie zasługuje kompleksowość przeprowadzonych badań oraz ilość uzyskanych wyników. Szczególnie doceniam, że w dobie łatwego generowania wielu wyników z zastosowaniem metod opartych o sekwencjonowanie nowej generacji czy wyłącznie analiz *in silico*, Doktorantka dokonała ogromnego trudu i zastosowała szereg metod, aby wykazać eksperymentalnie istnienie interakcji miRNA-mRNA oraz wpływ wybranych miRNA na funkcjonowanie badanych komórek.

Po przeczytaniu tej części rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

- a. Jakimi kryteriami posługiwano się w wyborze markerów EVs i jak można wytłumaczyć stosunkowo słaby prążek dla CD63 w Western blot, szczególnie w 14 dniu ciąży, w porównaniu do bardzo intensywnych sygnałów dla tego markera w barwieniu immunofluorescencyjnym?
- b. Czy liczba zidentyfikowanych miRNA jak i takich podlegających zróżnicowanej ekspresji w EVs jest porównywalna do innych danych? W jaki sposób dokonano ilościowych przeliczeń w eksperymentach kiedy dodawano EVs do komórek, mając na uwadze zróżnicowanie liczby kopii różnych miRNA w pęcherzykach?
- c. Wpływ EVs na funkcjonowanie komórek trofoblastu czy zmienny poziom ekspresji miRNA był zwykle bardziej dostrzegalny w późniejszych dniach ciąży. Czy może być to podyktowane bardziej zmianami fizjologicznymi czy wynika z potrzeby ilościowego nagromadzenia się miRNA wywodzących się z EVs?
- d. Jak można wytłumaczyć brak wpływu dostarczanych miRNA (miR-26a-5p, miR-125b-5p) na ekspresję a czasami nadekspresję wybranych genów w linii JEG-3? Czy wysoka triploidalność tej linii a zatem duża nadekspresja genów, może być za to odpowiedzialna?

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

- a. Opracowanie modelu autotransplantacji *in vitro*, w którym wykorzystano EVs i komórki trofoblastu od tego samego zwierzęcia.
- b. Dokonanie kompleksowej charakterystyki EVs pozyskanych ze światła macicy we wczesnych etapach ciąży świni.
- c. Wykazanie, że EVs obecne w świetle macicy świni mogą wpływać na komórki trofoblastu *in vitro*, modulując ich wzrost, rozwój oraz transkryptom.

- d. Opisanie szeregu interakcji pomiędzy miRNA obecnymi w EVs a genami podlegającymi ekspresji w komórkach trofoblastu i zarodka, co może wskazywać na możliwy auto- i parakrynnny wpływ EVs na rozwijający się zarodek.
- e. Wykazanie, że miR-26a-5p i miR-125b-5p wpływają na ekspresję wybranych genów docelowych i kodowanych przez nie białek w komórkach trofoblastu oraz wybrane funkcje (prolifерacja, przyleganie, migracja) tych komórek. Cenne jest wskazanie dwóch genów *SMAD1* i *FGFR2* jako kluczowych dla w/w procesów.

W kolejnym rozdziale *Dyskusja* Doktoranta umiejętnie konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi pochodzącymi z innych zespołów badawczych i przywołuje najnowsze pozycje literaturowe. Bardzo cenne jest odwołanie do danych uzyskanych w badaniach człowieka, gdyż daje to możliwość szerszych rozważań nad fizjologią i patologią łożyska i ciąży wybranych ssaków. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę prowadzenia badań na różnych gatunkach zwierząt, ze względu na istniejące różnice gatunkowe. Bardzo interesujący jest kolejny rozdział – *Perspektywy dalszych badań*, który świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań dają możliwość prowadzenia wielu analiz *in silico* i co najcenniejsze pozwalają na projektowanie nowych eksperymentów. Przykładem są już rozpoczęte badania nad miR-23b-3p, którego nadekspresja w endometrium jest związana z nieprawidłowościami podczas implantacji zarodków ludzkich a ekspresja zidentyfikowana w komórkach świni. Doktorantka stosując nowe podejścia badawcze, m.in. rozkład sił trakcyjnych w komórkach trofoblastu czy zastosowanie kokultury komórek trofoblastu i nabłonka endometrium macicy uzyskała wiele cennych wyników wstępnych wskazujących na zaangażowanie miR-23b-3p w funkcjonowanie komórek trofoblastu i nabłonka macicy.

Rozprawę doktorską kończy 7 rozbudowanych *Wniosków*, które w pełni odpowiadają na wcześniej postawioną hipotezę badawczą. Cennym uzupełnieniem tego rozdziału jest schemat podsumowujący uzyskane w pracy wyniki.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane za pomocą nowoczesnych, kompleksowych metod badawczych, które od Doktorantki wymagały ogromnej pracowitości i skrupulatności. Uzyskano szereg wartościowych i oryginalnych wyników, które stanowią istotny wkład w badania nad rolą miRNA w rozrodzie ssaków. Dowiedziono, że miRNA obecne w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych stanowią ważny element w komunikacji między zarodkiem a matką podczas wczesnych etapów ciąży. Uzyskane wyniki są niezwykle ważne ze względów poznawczych i otwierają nowe perspektywy badań w zakresie aplikacyjnego wykorzystania miRNA w rozrodzie świń. Mogą także stanowić cenny materiał porównawczy w badaniach nad niepowodzeniami ciąży człowieka. Na uznanie zasługuje opublikowanie wyników badań w prestiżowych czasopismach naukowych, o wysokim współczynniku oddziaływania – *FASEB Journal*, *Biology of Reproduction* i *International Journal of Molecular Sciences*. Warto zaznaczyć, że rozprawa doktorska została bardzo starannie przygotowana od strony edytorskiej.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Rola mikroRNA w komunikacji zarodek-macica na wczesnych etapach ciąży*” autorstwa Pani mgr Joanny Szuszkiewicz spełnia wszystkie wymogi formalne określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), zgodnie z art. 179 ust. 2 i 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku - Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie

wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Joanny Szuszkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zakres i wysoki poziom przeprowadzonych badań, duże walory poznawcze uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w prestiżowych czasopismach naukowych wnoszę również o wyróżnienie rozprawy.

Izabela Szeresz.

Poznań, dn. 30 stycznia 2023r.