

dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ
Zakład Endokrynologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, 3 luty 2023 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Joanny Szuszkiewicz

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

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Szuszkiewicz (z d. Najmuła) została wykonana w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Moniki M. Kaczmarek. Przeprowadzone badania zrealizowano w ramach projektów Narodowego Centrum Nauki: OPUS 2014/15/B/NZ9/04932 (kierownik Monika M. Kaczmarek) oraz PRELUDIUM 2016/21/N/NZ9/03443 (kierownik Joanna Szuszkiewicz), Diamentowego Grantu 0041/DIA/2014/43 (kierownik Joanna Szuszkiewicz) oraz Funduszu Badań Własnych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie (22/FBW/2021 i 1/FBW/2022, kierownik Monika M. Kaczmarek). Część badań Doktorantka zrealizowała podczas stypendium Fulbright Junior Research Award na Uniwersytecie Yale.

Tematem przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest określenie roli mikroRNA, będącego jednym z rodzajów niekodującego RNA, w komunikacji matka-zarodek na wczesnych etapach ciąży z wykorzystaniem świni jako zwierzęcia modelowego. Wczesny okres ciąży u ssaków, obejmujący maczyne rozpoznanie ciąży oraz implantację, charakteryzuje się intensywnym dialogiem pomiędzy matką a zarodkiem, a także ogromną dynamiką procesów komórkowych, które warunkują zagnieżdżenie zarodka w błonie śluzowej macicy oraz prawidłowy przebieg ciąży. Okres ten jest niezwykle ważny ze względu na wysoką śmiertelność zarodków obserwowaną w tym czasie. Jedynie zsynchronizowana wymiana cząsteczek sygnalizacyjnych, towarzysząca interakcjom zarodek-matka, gwarantuje prawidłowy przebieg procesów komórkowych - z jednej strony w rozwijającym się zarodku, a z

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

drugiej - w endometrium osiągającym receptywność. Najnowsze badania wskazują, że oprócz molekuł o znanym działaniu, tj. hormony, cząsteczki adhezyjne, cytokiny czy czynniki wzrostu, duży potencjał regulacyjny w okresie ciąży prezentują cząsteczki niekodującego RNA, w tym mikroRNA. Są to krótkie, jednoniciowe cząsteczki RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez wiązanie się do mRNA. Przypisuje im się kluczową rolę w nabywaniu receptywności przez błonę śluzową macicy, implantacji zarodka czy inicjacji i przebiegu porodu. MikroRNA pochodzenia zarodkowego wpływają na proliferację i różnicowanie komórek zarodka oraz ich migrację, natomiast mikroRNA endometrialne są odpowiedzialne za regulację procesów towarzyszących przebudowie błony śluzowej macicy oraz interakcji międzykomórkowej. Należy podkreślić, że mikroRNA mogą być transportowane i oddziaływać na komórki sąsiadujące, bądź nawet znacznie oddalone od miejsca ich syntezy, co nadaje im jeszcze większego znaczenia w komunikacji międzykomórkowej. Transport mikroRNA może odbywać się za pośrednictwem białek, lipoprotein lub pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs, ang. *extracellular vesicles*), które cieszą się w ostatnich latach ogromnym zainteresowaniem badaczy. Te nanocząsteczki zostały zidentyfikowane we wszystkich płynach ustrojowych, w tym w płynie macicznym ludzi i zwierząt. Zdolność EVs do przenoszenia różnych biomolekuł, (białka, kwasy nukleinowe czy lipidy) jest ich ogromnym atutem i uczyniło z nich kluczowy element w kształtowaniu komunikacji międzykomórkowej, w tym interakcji zarodek-matka w okresie wczesnej ciąży. W związku z tym, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że problem badawczy podjęty przez Doktorantkę, dotyczący określenia roli mikroRNA pochodzenia zarodkowego i endometrialnego oddziałującego na drodze auto- i parakrynej, w regulacji procesów istotnych na wczesnych etapach ciąży, jest nowatorski i wpisuje się w aktualny nurt badań o zasięgu międzynarodowym. Uzyskane wyniki niewątpliwie poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat udziału mikroRNA w krytycznym okresie okołoinplantacyjnym u ssaków, ale z drugiej strony dają nadzieję na aplikacyjne wykorzystanie tej wiedzy w zakresie diagnostyki patologii ciąży.

Podstawą ocenianej dysertacji są dwie oryginalne publikacje naukowe oraz jedna praca przeglądowa, które ukazały się w latach 2020 i 2022 w prestiżowych, recenzowanych czasopismach z bazy JCR (*Journal Citation Reports*):

Szuskiewicz 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; 36(8): e22450.

Cyuel

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; 107(2): 590-604.

Kaczmarek MM, **Najmula J**, Guzewska MM, Przygodzka E. *MiRNAs in the peri-implantation period: contribution to embryo-maternal communication in pigs*. Int J Mol Sci. 2020; 21(6):2229.

Prace są spójne tematycznie i wpisują się w światowy nurt badań z zakresu molekularnych aspektów regulacji wczesnych etapów ciąży u ssaków. Sumaryczny 5-letni współczynnik wpływu (IF, ang. *imapct factor*) czasopism wynosi 17,105, natomiast suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) to 480. Błędnie podano 5-letnie IF oraz punkty MEiN dla czasopism *Biology of Reproduction* oraz *FASEB Journal* (zostały one zamienione), co nie zmienia sumarycznych wartości tych współczynników dla wszystkich publikacji. Prace zawierają obszerne dane uzupełniające (tzw. *Supplementary files*), które częściowo zostały dołączone do polskojęzycznego opracowania rozprawy. Przedłożone publikacje są wieloautorskie - w dwóch pracach jest czterech, a w jednej pięciu autorów. Pani mgr Joanna Szuszkiewicz jest pierwszym autorem w obu pracach doświadczalnych oraz drugim autorem w publikacji przeglądowej. Do wszystkich prac dołączono oświadczenia indywidualnego wkładu współautorów, z których wynika, że Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, wykonywała analizy laboratoryjne i bioinformatyczne, opracowywała oraz interpretowała otrzymane wyniki, przygotowywała manuskrypty do publikacji, a także kierowała projektami, z których częściowo finansowano badania. W związku z tym, znaczący wkład Doktorantki w powstanie każdej z prac nie budzi żadnych wątpliwości. Muszę jednak zwrócić uwagę, że oświadczenia współautorów prac eksperymentalnych zostały załączone w nieodpowiedniej kolejności w stosunku do treści publikacji.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pierwsza publikacja stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej mgr Joanny Szuszkiewicz ukazała się w czasopiśmie *FASEB Journal*. Wykazano w niej, że zarówno zarodek, jak i błona śluzowa macicy, mogą być źródłem EVs krążących w świetle macicy świni w okresie wczesnej ciąży. Następnie scharakteryzowano populację EVs wyizolowanych z płynu macicznego, a za pomocą karty TaqMan Low Density Arrays (TLDA) zidentyfikowano 166 niesionych przez nie mikroRNA, które wykazywały zróżnicowany poziom ekspresji między badanymi dniami ciąży. Przeprowadzone analizy *in silico*

Gusl

dowodły, że zidentyfikowane mikroRNA mogą być zaangażowane w rozwój embrionalny, regulację cyklu komórkowego, proliferację i ruch komórek, czy też śmierć komórkową. Wykorzystując model autotransplantacji *in vitro*, który został opracowany przez Zespół prof. Kaczmarek, przeprowadzono doświadczenie, w którym zaobserwowano pobieranie wyizolowanych z płynu macicznego EVs przez komórki trofoblastu, a następnie badano ich proliferację, migrację i inwazję. W celu lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstawy odpowiedzi komórek trofoblastu na EVs, przeprowadzono analizę transkryptomu za pomocą sekwencjonowania następnej generacji z wielostopniową analizą bioinformatyczną, która wykazała podwyższoną ekspresję 17-tu oraz obniżoną ekspresję 20-tu transkryptów uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej, biosyntezie aminokwasów i cholesterolu, sygnalizacji komórkowej i procesach związanych z rozwojem organizmu. Chciałabym zapytać czy Doktorantka uważa za zasadne przeprowadzenie analogicznych doświadczeń na komórkach endometrium macicy?

Druga praca, opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Biology of Reproduction*, poświęcona jest wpływowi dwóch transportowanych przez EVs mikroRNA, miR-26a-5p i miR-125b-5p, na funkcje komórek trofoblastu. Doświadczenia przeprowadzono na komórkach pierwotnych trofoblastu świni oraz linii komórkowej JEG3, które transfekowano wybranymi mimikami. Wykonano następnie analizę *in silico*, która pozwoliła wytypować geny związane z rozwojem zarodkowym, potencjalnie regulowane przez wybrane mikroRNA. W celu wzmocnienia predykcji genów docelowych, wykonano kolejne analizy bioinformatyczne z zastosowaniem programów TargetScan 7.2, DIANA-microT v5, miRDB i RNAhybrid, które pozwoliły ocenić prawdopodobieństwo interakcji miRNA-mRNA i wybrać 5 potencjalnych genów docelowych dla miR-26a-5p oraz 6 dla miR-125b-5p. W przypadku miR-26a-5p, jego dostarczenie do komórek trofoblastu świni spowodowało obniżenie ekspresji tylko jednego genu *SMAD1* oraz brak wpływu na komórki JEG3, przy bardzo podobnych właściwościach sekwencji rozpoznającej miRNA w obrębie 3'UTR *SMAD1* świni i człowieka. Bardziej znaczący wpływ wywołała transfekcja komórek trofoblastu przez miR-125b-5p. W obu wykorzystywanych modelach komórkowych *in vitro*, zaobserwowano wpływ na ekspresję 4 z 6 wytypowanych genów. Do dalszych analiz wybrano *SMAD1* i *FGFR2*, a za pomocą systemu reporterowego lucyferazy wykazano wiązanie miR-26a-5p do regionu 3'UTR *SMAD1* oraz miR-125b-5p do regionu 3'UTR *FGFR2* oraz negatywną regulację docelowych transkryptów. Za pomocą testów funkcjonalnych potwierdzono procesy potencjalnie regulowane przez

Gruka

oba mikroRNA, tzn. miR-26a-5p stymulowało proliferację oraz zmniejszało powinowactwo komórek trofoblastu świni do lamininy, natomiast miR-125b-5p zmniejszało ich migrację. Badane mikroRNA nie wpłynęły na analogiczne procesy w komórkach linii JEG3.

Trzecia publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej to praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Podsumowuje ona aktualny stan wiedzy w zakresie regulacyjnej roli mikroRNA w okresie okołoinplantacyjnym u świni i stanowi doskonałe wprowadzenie do poruszanych problemów badawczych. Szczegółowo opisano w niej biogenezę i funkcje mikroRNA, przedstawiono jego syntezę w zarodkach i błonie śluzowej macicy świni oraz zaangażowanie w procesy wpływające na dialog pomiędzy zarodkiem a matką. Wykazano, że zarówno krążące miRNA, jak i transportowane przez EVs, stanowią niezwykle ważny i wciąż mało poznany element regulacji ekspresji genów we wczesnej ciąży u świni.

Lektura powyższych publikacji była dla mnie satysfakcjonująca, ale także inspirująca. Jestem pod ogromnym wrażeniem logicznego i przemyślanego doboru metod badawczych oraz tematyki przeprowadzonych doświadczeń. Doskonałym uzupełnieniem opublikowanych już wyników są badania rozpoczęte podczas stypendium Fulbright Junior Research Award na Uniwersytecie Yale. Mam ogromną nadzieję, że Doktorantka będzie miała możliwość ich kontynuacji w przyszłości. Zarówno strona merytoryczna, jak i wartość naukowa uzyskanych wyników zostały poddane wnikliwej ocenie Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku, co znacznie ułatwia moją rolę jako recenzenta. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że rezultaty pracy doktorskiej mgr Joanny Szuszkiewicz mają charakter nowatorski, a nawet pionierski, w dziedzinie biologii rozrodu zwierząt. Chciałabym jednak prosić Doktorantkę o przedstawienie możliwości wykorzystania otrzymanych przez nią wyników badań konkretnie w rozrodzie świni.

OMÓWIENIE OPRACOWANIA W JĘZYKU POLSKIM

Opracowanie w języku polskim obejmuje 58 stron i zawiera: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, hipotezę oraz cele badawcze, obszerną część metodyczną, wyniki badań, dyskusję, perspektywy dalszych badań, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię (125 pozycji). Dołączono również publikacje wraz z materiałami dodatkowymi oraz oświadczenia

Grucio

wszystkich współautorów prac, z których wynika wiodący udział Doktorantki w omawianych publikacjach.

Wstęp jest napisany w sposób przejrzysty i klarowny. Przedstawia wyczerpująco dotychczasowy stan wiedzy z zakresu komunikacji matka-zarodek w okresie wczesnej ciąży, ze szczególnym uwzględnieniem roli mikroRNA w tym procesie. Znaczną część rozdziału poświęcono EVs jako jednemu z nowych sposobów komunikacji międzykomórkowej, podkreślając ich ogromny potencjał związany z niesionym ładunkiem biologicznym, w tym cząsteczkami mikroRNA. Sposób prezentacji problematyki badawczej przez Doktorantkę świadczy o Jej dojrzałości naukowej oraz pełnym zrozumieniu podejmowanego problemu badawczego. Niemniej jednak, zabrakło mi krótkiej informacji, w których dniach ciąży u świni mają miejsce kluczowe wydarzenia okresu okołoinplantacyjnego, tj. maczyne rozpoznanie ciąży, migracja zarodków, zmiana ich kształtu czy implantacja. Informacje zawarte we *Wstępie* prowadzą jasno do hipotezy badawczej, którą Doktorantka sformułowała poprawnie, odnosząc się do wcześniejszych wyników badań uzyskanych przez Zespół. Przedstawiła również wynikające z hipotezy dwa szczegółowe cele dotyczące oceny zaangażowania mikroRNA niesionych przez EVs w komunikacji pomiędzy matką a zarodkiem we wczesnej ciąży oraz wpływu wybranych mikroRNA na funkcje trofoblastu.

Ambitne cele pracy zostały zrealizowane przez Doktorantkę dzięki nowoczesnym metodom badawczym oraz zaawansowanym analizom bioinformatycznym, które zostały opisane w rozdziale *Materiały i metody*. Przeprowadzone analizy *ex vivo*, *in vitro* oraz *in silico* zostały zaplanowane adekwatnie do postawionych celów pracy. Jestem pod ogromnym wrażeniem doskonałego opanowania przez mgr Joannę Szuszkiewicz różnorodnych metod badawczych. Doktorantka wykorzystwała hodowlę *in vitro* komórek trofoblastu świni, linii komórkowych JEG3, RL95 i HEK-293T, transfekcję tych komórek, oraz testy funkcjonalne (migracji, proliferacji i przylegania), mikroskopię konfokalną, analizę ekspresji genów metodą real-time PCR, analizę ekspresji białek metodą Western-blot, metody izolacji i charakterystyki EVs, a także sekwencjonowania następnej generacji z wielostopniową bioinformatyczną analizą danych. Pragnę zwrócić uwagę, że metoda oznaczania stężenia białka, o której wspomniano na stronie 19 i 21 opracowania, została opisana przez Marion M. Bradford (*Anal Biochem* 1976;72:248-54), zatem w języku polskim powinna brzmieć „metoda Bradford”, a nie „Bradforda”. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego do izolacji EVs wybrała metodę ultrawirowania i czy sprawdzała wydajność tej metody?

Gneci

Równie przejrzyste jak metody badawcze przedstawiono uzyskane wyniki. Treść rozdziału *Wyniki* jest zgodna z zawartością publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej i w adekwatny sposób odnosi się do poszczególnych rycin i tabel w nich zawartych. Kolejny rozdział *Dyskusja* jest rzeczowy, napisany w sposób logiczny i wyjaśniający wszystkie pojawiające się problemy badawcze. Następną część opracowania polskojęzycznego stanowi rozdział *Perspektywy dalszych badań*, w którym Doktorantka opisała zapoczątkowane na Uniwersytecie Yale badania nad rolą miR-23b-3p w komórkach ludzkiego i świnińskiego trofoblastu. Analizowała ona wpływ wybranego mikroRNA na rozkład sił trakcyjnych w komórkach trofoblastu hodowanych w postaci sferoidów, wykazując jego potencjalny wpływ na proces implantacji.

W *Podsumowaniu i wnioskach* przedstawiono czytelny schemat podsumowujący najważniejsze wyniki rozprawy, co znacznie ułatwia czytelnikowi odnalezienie się w ogromie prezentowanych wyników. Polskojęzyczne opracowanie zamyka 7 syntetycznych wniosków, które jednoznacznie wskazują, że Doktorantka z sukcesem zrealizowała założone cele, a uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat roli miRNA w kształtowaniu oddziaływania matka-zarodek we wczesnej ciąży oraz mają duży potencjał badawczy. Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Szuszkiewicz uznaje: (1) wykazanie, że EVs ze światła macicy ciężarnej świni o potencjalnym pochodzeniu zarodkowym i endometrialnym, a także transportowane przez nie mikroRNA, są ważnym elementem komunikacji pomiędzy matką a zarodkiem; (2) wykazanie zdolności EVs izolowanych z płynu macicznego ciężarnej świni do regulacji transkryptomu zarodka oraz procesów związanych z jego rozwojem i implantacją; (3) potwierdzenie, że zarodkowe miR26a-5p i miR-125b-5p mogą być transportowane przez EVs i regulują procesy o kluczowym znaczeniu podczas wczesnej ciąży, tj. proliferacja, przyleganie czy migracja.

Pod względem językowym i edytorskim ta część rozprawy jest napisana poprawnie. Doktorantka nie uniknęła jednak drobnych błędów stylistycznych i interpunkcyjnych, np.:

- strona 12, 4 linia: „śmiertelność zarodów”
- strona 18, 6 linia: „... ich potencjalny udziału w komunikacji ...”
- strona 18, 17 linia: „... hipotezę badawczą postawiono zweryfikować ...”
- strona 22, 15 linia: „Aby ocenić wpływu ...”
- strona 27, 1 linia: „... znaną liczbę sferoid umieszczono ...”
- strona 28, 24 linia: „... jej zarastanie w przez następne 24 godziny ...”

- strona 34, 18 linia: „... zmienna w czasie ilości miRNA ...”
- strona 35, 13 linia: „... zapobiegając niepożądaną inwazją zarodków ...”

PODSUMOWANIE

Rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Szuszkiewicz oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona wartościowe dzieło naukowe o znaczącym wkładzie w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat roli mikroRNA w regulacji interakcji matka-zarodek na wczesnych etapach ciąży u ssaków. Uzyskane wyniki są nowatorskie, oryginalne i kompleksowe, co potwierdza ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością przedmiotowego piśmiennictwa, umiejętnością wykorzystania zaawansowanych technik badawczych oraz analiz bioinformatycznych, zdolnością do poprawnego opracowania i przedstawienia wyników badań oraz prawidłowego wnioskowania i przygotowania publikacji do druku, co predysponuje Ją do dalszej pracy naukowej. Uwagi zawarte w niniejszej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Rola mikroRNA w komunikacji zarodek-macica na wczesnych etapach ciąży” spełnia warunki określone w art. 179 ust. 2 i 3 *Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669), w zw. Z art. 20 ust.5 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz.595 z późn. zm.) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Joanny Szuszkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego ws. nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.**

Mając na uwadze wysoką wartość naukową dysertacji i nowatorstwo uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej, co uzasadniam w osobnym wniosku.



dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ