

Streszczenie

Matczyne rozpoznanie ciąży i następująca po nim implantacja zarodków są jednymi z najbardziej skomplikowanych i najmniej poznanych procesów zachodzących we wczesnej ciąży u ssaków. Skoordynowana i sekwencyjnie występująca na tym etapie wymiana sygnałów między zarodkiem a matką dokonuje się przy udziale wielu biologicznie czynnych molekuł i jest niezbędna dla ustanowienia i prawidłowego przebiegu ciąży. Złożoność tych procesów a także dynamika zmian zachodzących w określonym miejscu i czasie na poziomie mRNA i białka wskazuje na zaangażowanie precyzyjnie i szybko działających cząsteczek regulatorowych – niekodujących RNA.

Jednym z rodzajów niekodujących RNA, o szerokim potencjale regulacyjnym, są mikroRNA (miRNA). Cząsteczki te przyłączając się do sekwencji genu docelowego, powodują zwykle obniżenie jego ekspresji. Co ciekawe, miRNA mogą działać nie tylko w miejscu swojej syntezy, ale też być transportowane wewnątrz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs), spełniając swoją funkcję w komórkach docelowych. Tym samym EVs traktowane są jako element nowego sposobu komunikacji międzykomórkowej. Niewiele jednak wiadomo na temat ich udziału w molekularnym dialogu zarodkowo-matczynym oraz roli jakiej w nim pełnią.

W niniejszej pracy doktorskiej postanowiono zweryfikować hipotezę, że miRNA pochodzenia zarodkowego i endometrialnego, na drodze auto- i parakrynej regulują procesy istotne podczas wczesnej ciąży.

W wyniku przeprowadzonych badań, zidentyfikowano i scharakteryzowano za pomocą szeregu metod EVs obecne w świetle macicy świni podczas wczesnej ciąży. Ponadto, scharakteryzowano cargo niesione przez EVs, potwierdzając obecność dojrzałych miRNA pochodzenia zarówno zarodkowego, jak i endometrialnego, o profilu zmieniającym się wraz z rozwojem ciąży. W hodowli pierwotnych komórek trofoblastu świni (pTr) z zastosowaniem autorskiego modelu autotransplantacji EVs *in vitro* wykazano, że EVs zmniejszają tempo migracji oraz inwazji komórek pTr, a zwiększają ich proliferację. Zbadano również zmiany transkryptomu komórek pTr w odpowiedzi na EVs, stosując wysokoprzepustową metodę sekwencjonowania nowej generacji - RNA-Seq. Stosując analizy *in silico* zidentyfikowano procesy i ścieżki biologiczne, w które zaangażowane są miRNA niesione przez EVs

podczas wczesnej ciąży, a także geny, których ekspresja uległa zmianie w komórkach pTr po inkubacji z EVs. Dodatkowo, wytypowano interakcje miRNA-mRNA mogące zachodzić w zarodku podczas wczesnej ciąży i przedstawiono interakcje miRNA-mRNA, które zaobserwowano podczas hodowli komórek pTr w obecności EVs. Okazało się, że miRNA przenoszone przez EVs, które są obecne w świetle macicy podczas wczesnej ciąży u świni, mogą w sposób auto- i parakrynnny modulować transkryptom zarodka, wpływając na jego wzrost, rozwój i implantację.

Autokrynnne działanie miRNA testowano dodatkowo wykorzystując mimiki miR-26a-5p, miR-125b-5p oraz kontrolny. Analizy bioinformatyczne pozwolił wytypować geny docelowe dla badanych miRNA, co w kolejnych doświadczeniach testowano w warunkach *in vitro*. miR-26a-5p obniżył ekspresję SMAD1, zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka w komórkach pTr. Bezpośrednia interakcja miR-26a-5p-SMAD1 została potwierdzona przeciwnymi profilami ekspresji *ex vivo* w zarodkach/trofoblastach świni, a także w teście reporterowym lucyferazy. miR-125b-5p obniżył ekspresję 4 z 6 testowanych genów na poziomie transkryptu (*STAT3*, *FGFR2*, *IL6R* i *LIFR*) oraz białka (IL6R) w komórkach pTr. Analiza profili *ex vivo* w zarodkach/trofoblastach świni oraz test reporterowy lucyferazy wskazały bezpośrednie oddziaływanie między miR-125b-5p i *FGFR2*. Nie zaobserwowano różnicy w proliferacji komórek pTr transfekowanych miR-125b-5p, natomiast miR-26a-5p wpłynął na nią stymulująco. Dostarczenie miR-26a-5p znacząco zmniejszyło powinowactwa komórek pTr do białka macierzy zewnątrzkomórkowej - lamininy. Ocena wpływu nadekspresji obu miRNA na migrację komórek wykazała, że tylko miR-125b-5p oddziałuje na ruch komórek pTr, zmniejszając ich migrację. Oba miRNA testowano również na modelu linii komórkowej ludzkiego trofoblastu, aby zidentyfikować ewolucyjnie zachowane funkcje.

Złożona natura komunikacji zarodek-matka nie jest ograniczona jedynie do interakcji miRNA-mRNA. Niemniej jednak, jak wykazano w niniejszej rozprawie doktorskiej, miRNA mogą być istotnym elementem molekularnego dialogu zachodzącego podczas wczesnej ciąży, wpływając na funkcje komórek trofoblastu. Prezentowane wyniki badań dostarczają ważnych informacji na temat udziału miRNA i transportujących je EVs w regulacji wczesnych etapów ciąży, zależnych od procesów komórkowych, takich jak proliferacja, przyleganie, migracja i inwazja.