

STRESZCZENIE

Implantacja zarodka jest jednym z najbardziej złożonych i intrygujących procesów zachodzących we wczesnej ciąży u ssaków. Ta skoordynowana w czasie i przestrzeni wymiana sygnałów między matką a rozwijającym się zarodkiem wciąż pozostaje przedmiotem wielu badań, gdyż mechanizmy regulujące ten proces nie zostały do końca poznane. Na wczesnym etapie ciąży dochodzi do maczynego rozpoznania ciąży, gdy zarodek sygnalizuje swoją obecność w świetle macicy, uwalniając sygnały zarodkowe (np. estradiol). Powodzenie procesu implantacji opiera się na złożonej wymianie sygnałów. Obecnie prowadzone badania skupiają się na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs), nanostrukturach wydzielanych przez różne komórki (m.in. endometrium i zarodki), które to uznawane są obecnie za ważne mediatory sygnałów uwalnianych podczas wczesnych etapów ciąży.

Uwalniane pęcherzyki różnią się między sobą rozmiarem oraz niesionym ładunkiem molekularnym, co czyni je wyjątkowymi mediatorami sygnałów. Wykazano, że wszystkie komórki wydzielają cząsteczki sygnałowe za pomocą EVs, zapewniając funkcjonalną komunikację międzykomórkową, zarówno na poziomie lokalnym, jak i między bardziej oddalonymi od siebie komórkami. Transportowane cząsteczki bioaktywne (np. białka, miRNA i DNA) uwalnianie są przez komórki podlegające wpływom ze strony różnych sygnałów komórkowych. Dotychczas prowadzone badania potwierdziły również, że cząsteczki mikroRNA (miRNA; np. miR-125b-5p) niesione przez EVs wydzielane przez świńskie zarodki i błonę śluzową macicy mogą wpływać na proliferację, migrację i inne funkcje komórek trofoblastu. Proces uwalniania EVs do przestrzeni zewnątrzkomórkowej obejmuje trzy odrębne etapy: biogenezę, transport wewnątrzkomórkowy i wydzielanie. Mechanizmy nadzorujące biogenezę EVs są złożone i angażują wiele białek oraz szlaków sygnałowych. EVs mogą być generowane na drodze endosomalnej, zależnie od aktywacji kompleksu ESCRT (ang. *endosomal sorting complex required for transport*), co prowadzi do powstania pęcherzyków (ang. *intraluminal vesicles*, ILVs) wewnątrz ciał wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular bodies*, MVBs), a następnie ich fuzji z błoną plazmatyczną i wydzielania. Do formowania EVs dochodzi również podczas bezpośredniego odcinania od błony plazmatycznej. Transport wewnątrzkomórkowy MVBs lub EVs do błony plazmatycznej wymaga interakcji z cytoszkieletem komórki oraz białkami Rab, które należą do rodziny małych GTPaz. Jest to rodzina białek pełniących rolę molekularnych punktów kontrolnych

zawiadujących wewnątrzkomórkowym transportem oraz wydzielaniem pęcherzyków. Pomimo potencjalnie znanych i dobrze opisanych dróg powstawania, transportu i wydzielania EVs, mechanizmy odpowiedzialne za wybór szlaku biogenezy na poziomie komórki wciąż pozostają nieznane.

W niniejszej rozprawie doktorskiej postawiono następującą hipotezę badawczą: Biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na styku komórek zarodka i matki może być regulowana przez hormony oraz miRNA pochodzenia zarodkowego, które biorą udział w komunikacji między zarodkiem a matką we wczesnej ciąży.

Zaangażowanie EVs w procesy zachodzące podczas wczesnej ciąży zostało już opisane u kilku gatunków ssaków, w tym u świni domowej. W niniejszej rozprawie wykazano, że obie strony dialogu zarodek-matka wpływają na siebie, co prowadzi do generowania oraz uwalniania EVs oraz pokrywa się z sekrecją estradiolu (E2) i prostaglandyny E2 (PGE2) podczas macicznego rozpoznania ciąży u świni. Transmisyjna mikroskopia elektronowa potwierdziła obecność EVs na styku komórek zarodka i matki, wskazując wzmożoną komunikację angażującą EVs. Charakterystyczne profile ekspresji genów kodujących białka kompleksu ESCRT w endometrium pokrywały się z pojawieniem się sygnałów zarodkowych E2 i PGE2. Co ciekawe, ekspresja tych genów w zarodkach i trofoblastach miała podobny profil. Ponadto zaobserwowano odwrotne profile ekspresji miR-125b-5p i genów kodujących białka kompleksu ESCRT dla zarodków/trofoblastów. Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano doświadczenia z zastosowaniem trzech modeli in vitro, które umożliwiły obserwacje na poziomie komórkowym. Stosując pierwotne kultury komórkowe, pozyskane z nabłonka powierzchniowego endometrium oraz trofoblastu, potwierdzono zaangażowanie E2, PGE2 lub/i miR-125b-5p w regulację procesów biogenezy i transportu EVs w obu typach komórek, a także uwalniania EVs w komórkach trofoblastu.

Podsumowując, uzyskane wyniki prezentują niepoznany dotąd mechanizm regulujący biogenezę oraz transport EVs zachodzący z udziałem sygnałów zarodkowych i miRNA, który prowadzi do przeprogramowania ścieżek biogenezy EVs w endometrium i w komórkach trofektodermi zarodka, a także wydzielania określonej populacji EVs podczas wczesnej ciąży. Co ważne, eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy wykazały istotną rolę sygnałów zarodkowych jako czynników odpowiedzialnych za wybór szlaku biogenezy i uwalniania EVs podczas wczesnej ciąży.