INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

mgr inż. Katarzyna Buska

Wczesne sygnały obecności zarodków w przedimplantacyjnym okresie ciąży u myszy

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor:

Prof. dr hab. Anna Chełmońska-Soyta

Zakład Terapii Doświadczalnej

Laboratorium Immunologii Rozrodu

Wrocław 2017

Streszczenie

Ciąża jest jednym z najbardziej fascynujących zjawisk biologicznych. Jej utrzymanie i prawidłowy przebieg ściśle zależą od wzajemnych interakcji pomiędzy matką i płodem. Najbardziej krytyczną fazą ciąży jest okres przedimplantacyjny, w którym zostaje osiągniętych wiele etapów rozwojowych, a wolnopływający zarodek jest narażony na dynamiczne zmiany otaczającego go mikrośrodowiska. Wysoki odsetek niepowodzeń ciążowych na etapie przedimplantacyjnym świadczy o ścisłej kontroli prawidłowości dalszego rozwoju zarodków. Jest to związane nie tylko z eliminacją embrionów z wadami rozwojowymi. Kontrola w tym okresie ma również związek z ustaleniem kontaktu matczyno-zarodkowego rozumianego jako synchronizacja rozwoju samego zarodka oraz przygotowania tkanki macicy (błony śluzowej) do jego przyjęcia i zagnieżdżenia. Komunikacja w okresie przedimplantacyjnym odbywa się dzięki aktywności wydzielniczej i bezpośrednim oddziaływaniom komórek nabłonka jajowodu, macicy i zarodka, i może być zdefiniowana jako dwojaki typ sygnałów- oddziaływujących lokalnie i obwodowo. Krótkie sygnały polegają na lokalnej zmianie aktywności transkrypcyjnej i/lub sekrecyjnej komórek endometrium wskutek obecności zarodka w układzie rozrodczym, aktywująca liczne szlaki przekazywania sygnału. Istnieją również przesłanki wskazujące na możliwość ogólnoustrojowej immunoregulacji inicjowanej przez zarodek poprzez amplifikację sygnału przez komórki macicy i jajowodu do komórek układu odpornościowego na obwodzie. Jednak szczególnie w trakcie okresu przedimplantacyjnego oddziaływanie te są słabo poznane.

Głównym celem prowadzonych obecnie badań jest poznanie procesów komórkowych i molekularnych związanych z implantacją zarodka i inwazją trofoblastu do endometrium. Pomoże to w zrozumieniu tego dialogu oraz jego skutków w patologiach związanych z ciążą. Pomimo licznych badań nad globalnym profilem ekspresji genów w endometrium w odpowiedzi na rozwijający się zarodek, hierarchia oddziaływań na poziomie molekularnym wciąż pozostaje słabo poznana.

Hipoteza badawcza niniejszej pracy zakładała, że sygnał zarodkowy mierzony w dwóch kompartmentach: w błonie śluzowej macicy i obwodowo, w komórkach układu odpornościowego, będzie oddziaływał skutecznie jeśli zostanie uruchomiona odpowiednia liczba ścieżek sygnałowych go przekazujących. Pierwszym celem było udzielenie odpowiedzi na pytania jakie są szlaki przekazywania sygnałów zarodkowych i czy różnią się one gdy zarodki wykazują obniżony potencjał rozwojowy.

Drugim celem pracy było porównanie proteomów limfocytów T $CD4^+$ w okresie przedimplantacyjnym jako skutku efektywnej sygnalizacji na obwodzie, jak również określenie, czy informacja o biologicznej jakości zarodka jest rozpoznawana przez obwodowe komórki układu odpornościowego.

Wykonano dwa eksperymenty. Eksperyment pierwszy polegał badaniach przeprowadzonych na dwóch grupach myszy: w ciąży i pseudociąży (kontrola) indukowanej kryciem naturalnym. W 3,5dpc (days *post coitum*) od samic myszy z obu grup pobierano materiał do dalszych analiz: transkryptomu tkanki macicy oraz badań proteomicznych śledzionowych limfocytów $TCD4^+$.

Eksperyment drugi wykonano z zastosowaniem dwóch grup samic myszy po niechirurgicznej transplantacji zarodków (pobieranych od samic dawczyń i hodowanych *in vitro*). Dzięki temu uzyskano model do badania sygnałów zarodkowych w zależności od stanu biologicznego zarodka. Transplantowano odpowiednio: zarodki normalne (kontrola) oraz zarodki hodowane w obecności TNFα (zarodki o obniżonym potencjale biologicznym). Następnie w 3,5dpc od samic myszy z obu grup pobierano materiał do dalszych analiz: transkryptomu tkanki macicy oraz badań proteomicznych śledzionowych limfocytów $TCD4^+$.

Na podstawie przedstawionych wyników można wysnuć następujące wnioski dotyczące wczesnych sygnałów obecności zarodków w przedimplantacyjnym okresie ciąży u myszy.

Obecność zarodka w macicy w okresie przedimplantacyjnym powoduje transkrypcyjne wyciszenie, czyli obniżenie transkrypcji genów głównych szlaków sygnałowych w tkance macicy w trakcie ciąży naturalnej. Przedstawione wyniki wspierają hipotezę, iż zarodek wywołuje lokalną reakcję w rogu macicy poprzez negatywną regulację aktywności szlaków przekazywania sygnału w endometrium. Szlaki sygnałowe aktywnie regulowane przez obecność zarodka w przedimplantacyjnym okresie ciąży to ścieżki NFκB, TGFβ i WNT. Szlak NFκB wydaje się być szczególnie istotny, ponieważ jego zróżnicowaną regulację zaobserwowano zarówno w trakcie ciąży naturalnej jak i eksperymencie z wykorzystaniem transplantacji zarodków o zróżnicowanym potencjale biologicznym. Dodatkowo prezentowane w tej pracy wyniki po raz pierwszy wskazują, że gen Ptgs2 i jego białkowy produkt PTGS2 są indukowane i ekspresjonowane na krótko przed implantacją Może to być wskazaniem, iż ekspresja Ptgs2 jest najwcześniejszym pozytywnym sygnałem rozpoznania zarodka i przygotowania do implantacji u myszy.

Efektem tej pracy jest również stworzenie pierwszej proteomicznej mapy limfocytów T $CD4^+$ myszy CD-1 w 3,5dpc. Ponadto, wykazano, że sygnalizacja w immunologicznym kompartymencie obwodowym jest widoczna przed implantacją zarodka i ma związek

z ekspresją białek cytoszkieletowych oraz immunoregulatorowych w limfocytach $TCD4^+$. Wśród białek o zmienionej ekspresji indukowanej przez obecność zarodków traktowanych TNFα znajdowały się: białka stresu komórkowego, proteiny zaangażowane w regulację stabilności cytoszkieletu i ruchliwości limfocytów, a także białka o funkcji immunomodulującej. Jakość sygnałów zarodkowych przed implantacją jest różna w zależności od „jakości" zarodka, co jest widoczne zarówno w kompartmencie lokalnym (macica) jak i obwodowym (limfocyty T obwodowe).