Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii

mgr Kinga Aleksandra Orzechowska

Wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji

ROZPRAWA DOKTORSKA
składająca się z cyklu artykułów naukowych
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Promotor: prof. dr hab. Nina Smolińska

Praca finansowana z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki: OPUS13 (2017/25/B/NZ9/00040) oraz Programu Rozwojowego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: POWR.03.05.00-00-Z310/17 współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

---

Olsztyn 2022

Spis treści

STRESZCZENIE ... 4

ABSTRACT ... 7

Spis publikacji składających się na rozprawę doktorską ... 10

1. Wstęp ... 11

2. Hipoteza badawcza, cele i zakres badań ... 13

3. Materiały i metody ... 14

3.1. Zwierzęta doświadczalne ... 14

3.2. Hodowle *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy świni ... 14

3.3. Określenie wpływu chemeryny na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji ... 15

3.3.1. Izolacja RNA ... 15

3.3.2. Kontrola jakości odczytów sekwencjonowania ... 15

3.3.3. Analiza ekspresji różnicowej genów, ich ontologii oraz ścieżek metabolicznych i sygnałowych ... 16

3.3.4. Identyfikacja oraz analiza ekspresji długich niekodujących RNA ... 16

3.3.5. Identyfikacja oraz analiza miejsc alternatywnego składania RNA ... 17

3.3.6. Walidacja wybranych genów o zmiennej ekspresji oraz długich niekodujących RNA metodą Real-Time PCR (qPCR) ... 17

3.3.7. Walidacja zmian w procesie alternatywnego splicingu metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) ... 18

3.4. Określenie wpływu chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji ... 18

3.4.1. Ekstrakcja białka z tkanek ... 18

3.4.2. Trawienie białek ... 19

3.4.3. Frakcjonowanie peptydów w odwróconej fazie przy wysokim pH ... 20

3.4.4. Spektrometria mas ... 20

3.4.5. Analiza danych ... 21

3.4.6. Analiza funkcjonalna ... 21

3.4.7. Walidacja metodą Western blot ... 22

3.5. Analiza statystyczna ... 23

4. Wyniki ... 23

4.1. Wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji ... 23

4.1.1. Wyniki sekwencjonowania następnej generacji ... 23

4.1.2. Wpływ chemeryny na ekspresję genów kodujących funkcjonalne białka. Adnotacje funkcjonalne ... 24

4.1.3. Identyfikacja oraz analiza ekspresji długich niekodujących RNA ... 25

4.1.4. Modyfikacje alternatywnego składania transkryptów pod wpływem chemeryny 25
4.1.5. Walidacja wyników RNA-seq 26
4.2. Wpływ chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji 27
4.2.1. Białka regulowane przez chemerynę 27
4.2.2. Adnotacje funkcjonalne 27
4.2.3. Walidacja wyników LC-MS/MS 28
5. Ograniczenia badań 29
6. Podsumowanie i wnioski 31
7. Bibliografia 32

Olsztyn 2022

STRESZCZENIE

Wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji

mgr Kinga Aleksandra Orzechowska

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Niny Smolińskiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch prac opublikowanych w roku 2022 (1 – *Biology of Reproduction*. 2022. doi: 10.1093/biolre/ioac063; 2 – *Cells*. 2022. doi: 10.3390/cells11071161), których tematyka dotyczy zagadnień związanych z wpływem chemeryny na zmiany transkryptomiczne oraz proteomiczne błony śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji.

Metabolizm i funkcje rozrodcze organizmu są ze sobą ściśle powiązane. W związku z tym, w ciągu ostatnich lat badania nad funkcjonowaniem tkanki tłuszczowej zyskują coraz większą popularność. Chemeryna jest jedną z wielu adipokin, biologicznie czynnych substancji, wydzielanych przez adipocyty (komórki tkanki tłuszczowej), zaangażowanych w regulację homeostazy energetycznej organizmu. Hormon ten po raz pierwszy został zidentyfikowany w 2003 roku jako ligand trzech receptorów: receptora 1 podobnego do chemokin (ang. chemokine like receptor 1, CMKLR1, zwanego również receptorem chemerynowym 23 – ChemR23), receptora 1 związanego z białkiem G (ang. G protein-coupled receptor-1, GPR1) oraz receptora 2 podobnego do chemokin (ang. C-C chemokine receptor-like 2, CCRL2). Większość obecnej we krwi chemeryny krąży w postaci prohormonu, który w określonych warunkach modyfikowany jest do formy aktywnej biologicznie. Po proteolitycznym rozszczepieniu, chemeryna przekształca się w silnego i wysoce specyficznego agonistę swoich receptorów. Dowiedziono, że chemeryna – hormon sklasyfikowany zarówno jako chemokina jak i adipokina, reguluje wiele procesów fizjologicznych. Chemeryna kontroluje między innymi pobieranie pokarmu, metabolizm składników odżywczych, stany zapalne, reakcje na stres czy rozród. Badania na modelu świni domowej wykazały, że ekspresja chemeryny oraz jej

receptorów (systemu chemerynowego) występuje w strukturach osi podwzgórze-przysadka-gonady, a także w macicy, trofoblastach i zarodkach. Dodatkowo, wykazano zależność pomiędzy poziomem mRNA oraz białek systemu chemerynowego a specyficznym środowiskiem hormonalnym charakterystycznym dla badanego stanu fizjologicznego samicy. Stwierdzono również, że w błonie śluzowej ciężarnych świń, koncentracja białka chemeryny wzrasta w czasie implantacji. Dowiedziono także, że stężenie chemeryny w płynie macicznym wzrasta w okresie matczynego rozpoznania ciąży i implantacji. Powyższe dane mogą sugerować potencjalny udział chemeryny w procesach związanych z implantacją zarodka.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej, że chemeryna poprzez wpływ na transkryptom i proteom błony śluzowej świni kontroluje wytwarzanie wielu czynników istotnych dla prawidłowego przebiegu implantacji. Postawioną hipotezę zweryfikowano poprzez określenie wpływu chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny hodowanych *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy świni domowej w 15-16 dniu ciąży (okres implantacji). W tym celu wykonano następujące zadania badawcze:

1) określono wpływ chemeryny na globalną ekspresję genów błony śluzowej macicy, uwzględniając również zmiany w profilach ekspresji długich niekodujących RNA (ang. *long non-coding RNAs*, lncRNAs) oraz w procesie alternatywnego splicingu (ang. *alternative splicing*, AS) przy użyciu metody Sekwencjonowania Następnej Generacji (NGS, RNA-seq);
2) zbadano wpływ chemeryny na globalną ekspresję białek w błonie śluzowej macicy wykorzystując metodę Chromatografii Cieczowej Sprzężonej z Tandemową Spektrometrią Mas (LC-MS/MS).

W prezentowanych badaniach zidentyfikowano 130 genów wykazujących zmiany ekspresji (ang. *differentially expressed genes*, DEGs) pod wpływem chemeryny. Przypisano je do 73 adnotacji funkcjonalnych. Dodatkowo zaobserwowano 12 lncRNAs o zmienionej, pod wpływem chemeryny, ekspresji. Ponadto, wykryto 386 transkryptów, w obrębie których zidentyfikowano miejsca splicingowe o zmiennym profilu ekspresji. Rezultaty badań proteomu błony śluzowej macicy hodowanej w obecności chemeryny potwierdziły zmiany w ekspresji 352 białek powiązanych z 47 adnotacjami funkcjonalnymi. Analizy ontologiczne powyższych genów oraz białek wykazały ich

powiązanie z procesami migracji i adhezji komórek, angiogenezy, odpowiedzi immunologicznej oraz steroidogenezy.

Uzyskane wyniki przyczyniły się do pogłębienia wiedzy dotyczącej wpływu chemeryny na globalną ekspresję genów oraz białek w komórkach błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji. Można przypuszczać, że chemeryna jest ważnym czynnikiem regulującym prawidłowy przebieg ciąży i proces implantacji zarodka.

Praca finansowana z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki: OPUS13 (2017/25/B/NZ9/00040) oraz Programu Rozwojowego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: POWR.03.05.00-00-Z310/17 współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Olsztyn 2022

ABSTRACT

Chemerin effect on the endometrial transcriptomic and proteomic profile of the domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.) during implantation period

mgr Kinga Aleksandra Orzechowska

The doctoral thesis was written under the supervision of prof. dr hab. Nina Smolińska in the Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

The doctoral thesis comprises two papers published in 2022 (1 - *Biology of Reproduction*. 2022. doi: 10.1093/biolre/ioac063; 2 - *Cells*. 2022. doi: 10.3390/cells11071161), focused on the influence of chemerin on transcriptomic and proteomic changes in the porcine endometrium (*Sus scrofa domestica* L.) during implantation.

It is well known that the body's metabolism and reproductive functions are closely related. Chemerin is one of the many adipokines, biologically active molecules, secreted by adipocytes (adipose tissue cells), involved in the regulation of energy homeostasis. The adipokine was first identified in 2003 as a ligand of three receptors: chemokine like receptor 1 (CMKLR1, ChemR23), G protein-coupled receptor-1 (GPR1), C-C chemokine receptor-like 2 (CCRL2). Serum chemerin circulates as a prohormone, which is modified when necessary to a biologically active form *via* a proteolytic cleavage. Chemerin, a hormone classified as both, a chemokine and an adipokine, regulates numerous physiological processes. It is involved, among others, in the control of food intake, nutrient metabolism, inflammation, stress response and reproduction. Studies on pigs have shown that the expression of chemerin and its receptors (the chemerin system) occurs in the structures of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as well as in the uterus, trophoblasts and embryos. Additionally, mRNA and protein levels of the chemerin system depend on the specific hormonal status of the pig. Moreover, it has been shown that the concentrations of chemerin protein in the endometrium increase during implantation. Additionally, it has been indicated that the hormone concentrations in the

uterine flushings increase during maternal recognition of pregnancy and implantation. The above results may suggest a potential role of chemerin in the processes related to embryo implantation.

We hypothesized that chemerin might affect the transcriptome and proteome of the porcine endometrium, and in consequence, influence the production of many factors essential for a proper course of gestation and embryo development. The aim of this study was to determine the chemerin effect on the endometrial transcriptomic and proteomic profiles of the domestic pig during implantation (15 to 16 days of pregnancy). The assumed aim of the research was achieved by the accomplishment of the following tasks:

1) the chemerin effect on the global gene expression in the porcine endometrium, including changes in the long non-coding RNAs (lncRNAs) expression profiles and alternative spliced (AS) events was determined using Next Generation Sequencing (NGS, RNA-seq);
2) the effect of chemerin on the global protein expression in the porcine endometrium was determined using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

In the present study, we identified 130 differentially expressed genes (DEGs) under the influence of chemerin. DEGs were assigned to 73 functional annotations. Twelve identified lncRNAs indicated a difference in the expression profile after chemerin administration. Additionally, we detected 386 differentially AS events. As a result of the proteomic analysis, we identified 352 differentially regulated proteins (DRPs) which were associated with 47 functional annotations. Ontology analyses have indicated the participation of the above genes and proteins in the processes of cell migration and adhesion, angiogenesis, immune response and steroidogenesis.

The obtained results provide a basis for a better understanding of the influence of chemerin on the global expression of genes and proteins in the porcine endometrium during the implantation period. It can be assumed that chemerin is an crucial factor regulating the proper course of gestation and embryo implantation.

This work was financed by the National Science Center (Poland), as a part of research project OPUS13 (no. 2017/25/B/NZ9/00040) and the “Development Program of the University of

Warmia and Mazury in Olsztyn", POWR.03.05.00-00-Z310/17, co-financed by the European Union under the European Social Fund.

Spis publikacji składających się na rozprawę doktorską

Rozprawa doktorska składa się z dwóch prac opublikowanych w 2022 roku, których tematyka dotyczy zagadnień związanych z wpływem chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej świni w okresie implantacji:

1) **Kinga Orzechowska**, Grzegorz Kopij, Łukasz Paukszto, Kamil Dobrzyń, Marta Kieżun, Jan Jastrzębski, Tadeusz Kamiński, Nina Smolińska. 2022. Chemerin effect on transcriptome of the porcine endometrium during implantation determined by RNA-Sequencing. *Biology of Reproduction*. https://doi.org/10.1093/biolre/ioac063.
[1]IF = 4,285, [2]pięcioletni IF = 4,307, [3]MEiN = 200

2) **Kinga Orzechowska**, Kamil Dobrzyń, Marta Kieżun, Agata Malinowska, Bianka Świderska, Tadeusz Kamiński, Nina Smolińska. 2022. Chemerin effect on the endometrial proteome of the domestic pig during implantation obtained by LC-MS/MS analysis. *Cells*.
https://doi.org/10.3390/cells11071161.
[1]IF = 6,600, [2]pięcioletni IF = 6,663, [3]MEiN = 140

Razem:
IF[1] = 10,885
pięcioletni IF[2] = 10,97
Liczba punktów MEiN[3] = 340

[1] IF - wskaźnik cytowań (ang. Impact Factor) czasopisma z roku wydania wg bazy Web of Science
[2] pięcioletni IF - wskaźnik cytowań (ang. Impact Factor) czasopisma z pięciu ostatnich lat wg bazy Web of Science
[3] Liczba punktów za publikację wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 21 grudnia 2021 roku

1. Wstęp

Utrzymanie ciąży wymaga wielu ściśle zintegrowanych sygnałów wymienianych pomiędzy błoną śluzową macicy a zarodkami (GEISERT i in. 1982; ROBERTS i in. 1993). Ta swoista sygnalizacja molekularna między zarodkiem a środowiskiem matczynym ma kluczowe znaczenie dla jego wzrostu i rozwoju oraz rozpoznania ciąży i implantacji (BAZER i in. 2009). Wszelkie nieprawidłowości w tym okresie mogą prowadzić do zaburzonej produkcji składników odżywczych i wymiany sygnałów hormonalnych oraz skutkować niepowodzeniem w utrzymaniu ciąży (GEISERT I YELICH 1997). Pomyślna implantacja zależy m.in. od intensywnej przebudowy tkanek oraz receptywności błony śluzowej macicy w okresie implantacji. Pełne zrozumienie mechanizmów molekularnych rządzących implantacją zarodków ma kluczowe znaczenie dla ograniczenia zjawiska przedwczesnego obumierania embrionów oraz poprawy płodności i zdrowia reprodukcyjnego świń. Wykazano, że w procesie implantacji bierze udział szereg związków stanowiących sygnały matczyno-płodowe, takich jak progesteron, estrogeny, prostaglandyny, interleukiny, interferony i czynniki wzrostu (BAZER I JOHNSON 2014). Oprócz powyższych molekuł, w środowisku macicy znajduje się wiele innych unikalnych białek kontrolujących przebieg implantacji zarodka. Wiele badań wykazało, że hormony wytwarzane przez tkankę tłuszczową, takie jak leptyna (CASTELLUCCI i in. 2000) czy adiponektyna (DOBRZYN i in. 2018) również biorą udział w regulacji funkcji rozrodczych.

Powszechnie wiadomo, że metabolizm i funkcje rozrodcze organizmu są ze sobą ściśle powiązane (SCHNEIDER 2004). Tkanka tłuszczowa pełni funkcje endokrynne, wydzielając liczne adipokiny zaangażowane w różnorodne procesy fizjologiczne, w tym rozród. Jednym z wielu białek aktywnych biologicznie wydzielanych przez tkankę tłuszczową, zaangażowanych w regulację homeostazy energetycznej jest, zidentyfikowana w 2003 roku, chemeryna (HELFER I WU 2018). Hormon ten jest kodowany przez gen *RARRES2* (ang. *retinoic acid receptor responder 2*), który u ludzi zlokalizowany jest na chromosomie 7 (MEDER i in. 2003). Powyższy gen koduje nieaktywną prochemerynę, składającą się ze 163 aminokwasów (16 kDa). Prochemeryna krąży we krwi i w razie potrzeby modyfikowana jest do aktywnej biologicznie chemeryny (ZABEL i in. 2005). Chemeryna pełni wszechstronne funkcje fizjologiczne poprzez wiązanie się z trzema receptorami należącymi do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G: receptor 1 podobny do chemokin (ang. *chemokine like receptor 1*,

CMKLR1, zwany również receptorem chemerynowym 23 – ChemR23), receptor 1 związany z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptor-1*, GPR1) oraz receptor 2 podobny do chemokin (ang. *C-C chemokine receptor-like 2*, CCRL2) (HELFER I WU 2018). Ekspresja chemeryny i jej receptorów (systemu chemerynowego) występuje w wielu tkankach różnych gatunków, w tym ludzi, gryzoni, bydła i świń (WITTAMER i in. 2003; KENNEDY I DAVENPORT 2018). Wykazano, że chemeryna jest obecna w strukturach osi podwzgórze-przysadka-gonady, a także w macicy, trofoblastach i zarodkach świni (SMOLINSKA i in. 2019; GUDELSKA i in. 2020; KISIELEWSKA i in. 2020A, 2020B; RYTELEWSKA i in. 2020). Powyższe badania wskazują również, że ekspresja systemu chemerynowego zmienia się w różnych fazach cyklu rujowego i wczesnej ciąży.

Wyniki najnowszych badań sugerują, że chemeryna może być ważnym czynnikiem regulującym funkcje rozrodcze. Badania *in vitro* na ludziach, świniach, gryzoniach i bydle wykazały, że chemeryna kontroluje procesy zachodzące w jajnikach, w tym angiogenezę, steroidogenezę, apoptozę, proliferację komórek i dojrzewanie oocytów (WANG i in. 2012; REVERCHON i in. 2012, 2014; KIM i in. 2013; MAKOWCZENKO i in. 2020; RYTELEWSKA i in. 2021A, 2021B). GUDELSKA i in. (2020) potwierdzili obecność mRNA i białek systemu chemerynowego w błonie śluzowej i mięśniowej macicy oraz zarodkach i trofoblastach świń. Wykazano również, że w błonie śluzowej macicy ciężarnych świń koncentracja białka chemeryny wzrasta w 15 dniu ciąży i osiąga najwyższy poziom pod koniec implantacji, w dniach 27-28. Dodatkowo dowiedziono, że stężenie chemeryny w płynie macicznym wzrasta w czasie matczynego rozpoznania ciąży i implantacji w porównaniu do cyklu rujowego i wczesnych okresów ciąży (GUDELSKA i in. 2020). Obecność receptorów chemeryny w macicy świni potwierdza, że tkanka ta jest wrażliwa na działanie tej adipokiny. Wykazano, że chemeryna moduluje syntezę i wydzielanie hormonów steroidowych w jajnikach i macicy (RYTELEWSKA i in. 2021a, GUDELSKA i in. 2022). Rezultaty powyższych badań mogą sugerować potencjalną rolę chemeryny w procesach związanych z implantacją zarodka. Brakuje jednak szczegółowych informacji dotyczących roli tego hormonu w macicy w okresie implantacji.

2. Hipoteza badawcza, cele i zakres badań

W błonie śluzowej macicy w trakcie implantacji dochodzi do szeregu zmian na poziomie molekularnym. Zmienia się wówczas ekspresja i sekrecja czynników biorących udział w procesie implantacji zarodka. Chemeryna jako jedna z adipokin bierze udział w kontrolowaniu funkcji rozrodczych samic. Wykazano, że ekspresja tego hormonu u świń zmienia się w trakcie cyklu rujowego oraz we wczesnej ciąży. Dodatkowo chemeryna moduluje syntezę i wydzielanie hormonów steroidowych w jajniku oraz macicy. Jednakże do tej pory nie poznano roli tej adipokiny w procesie implantacji u świń. Dlatego też celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej, że chemeryna poprzez wpływ na transkryptom i proteom błony śluzowej świni kontroluje wytwarzanie wielu czynników istotnych dla prawidłowego przebiegu implantacji. Postawioną hipotezę zweryfikowano poprzez:

1) określenie wpływu chemeryny na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji (15-16 dzień ciąży), w tym poziom ekspresji genów, interakcje długich niekodujących RNA (lncRNAs) z genami kodującymi białka oraz proces alternatywnego składania transkryptów (alternatywny splicing) metodą Sekwencjonowania Następnej Generacji (NGS, RNA-seq);
2) zbadanie wpływu chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji (15-16 dzień ciąży) metodą Chromatografii Cieczowej Sprzężonej z Tandemową Spektrometrią Mas (LC-MS/MS).

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Eksperyment przeprowadzono na pięciu dojrzałych płciowo loszkach, mieszańcach towarowych, w wieku 7-8 miesięcy, o wadze 120-130 kg, będących w 15-16 dniu ciąży (okres implantacji). Zwierzęta były hodowane w standardowych warunkach utrzymania i żywienia. Ciąże uzyskano poprzez naturalne krycie w trakcie rui. Dzień po kopulacji został wskazany jako pierwszy dzień ciąży. Macice pobrano natychmiast po uboju i transportowano do laboratorium w sterylnej, buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS). Sukces zapłodnienia oraz stopień zaawansowania ciąży potwierdzano poprzez obecność i ocenę morfologiczną zarodków. Skrawki błony śluzowej macicy przeznaczone do analizy metodą NGS i LC-MS/MS zostały pobrane od tych samych zwierząt i w tym samym czasie.

3.2. Hodowle *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy świni

Hodowle skrawków macicy przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną przez SMOLINSKĄ i in. (2016). Skrawki błony śluzowej preinkubowano przez 2 godziny w fiolkach umieszczonych na platformie łaźni wodnej z funkcją wytrząsania (37°C, 95% O_2, 5% CO_2). Po preinkubacji, skrawki inkubowano w świeżym medium z dodatkiem chemeryny w stężeniu 400 ng/ml (cat. no. 268e10032; RayBiotech Life, USA) przez kolejne 24 godziny. Próby kontrolne hodowane były bez dodatku hormonu. Zastosowaną koncentrację chemeryny wybrano na podstawie stężenia tego hormonu w płynie macicznym świń w okresie implantacji (GUDELSKA i in. 2020). Wszystkie hodowle przeprowadzono w duplikatach, w pięciu niezależnych eksperymentach (n=5). Na koniec każdego doświadczenia, skrawki zbierano i przechowywano w –80°C do czasu dalszych analiz. Żywotność komórek skrawków błony śluzowej macicy badano mierząc aktywność dehydrogenazy mleczanowej (ang. *lactate dehydrogenase,* LDH,) zgodnie z metodyką przedstawioną przez DOBRZYNIA i in. (2021). Wyniki średniej aktywność LDH w hodowanych tkankach potwierdziły, iż zarówno warunki hodowli tkankowej, jak i chemeryna nie miały toksycznego wpływu na żywotność komórek.

3.3. Określenie wpływu chemeryny na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji

3.3.1. Izolacja RNA

Całkowite RNA wyizolowano przy użyciu zastawu Qiagen RNeasy Kit i oczyszczono z pozostałości DNA wykorzystując Qiagen RNase-Free DNase Set (Qiagen, Niemcy). Czystość oraz koncentracja otrzymanego RNA została zmierzona przy użyciu urządzenia Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Integralność wyizolowanego RNA (ang. *RNA Integrity Number*, RIN) określono z zastosowaniem elektroforezy mikrokapilarnej Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology, USA). Następnie wyizolowane całkowite RNA wykorzystano do stworzenia bibliotek cDNA przy użyciu zestawu TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero H/M/R Kit (Illumina, USA) z odpowiednimi parami adapterów dla każdej próbki. Po oczyszczeniu i fragmentacji materiału genetycznego zsyntetyzowano cDNA wykorzystując oligonukleotydy poli(dT). Amplifikowane biblioteki cDNA posłużyły do zsekwencjonowania transkryptomu błony śluzowej macicy w sekwenatorze NovaSeq 6000 (Illumina, USA). Otrzymano sekwencje o sparowanych końcach i długości 2 x 151 nukleotydów (nt).

3.3.2. Kontrola jakości odczytów sekwencjonowania

Kontrolę jakości uzyskanych odczytów przeprowadzono z użyciem programu FASTQC (wersja 0.11.8) (ANDREWS 2010). Kolejnym krokiem było zastosowanie programu Trimmomatic (wersja 0.39) w celu usunięcia adapterów, ogonów poli-A, odczytów krótszych niż 50 nt oraz tych o niskim współczynniku jakości sekwencji (Phred<20) (BOLGER i in. 2014). Odczyty, które pozytywnie przeszły kontrolę zostały przycięte do równych segmentów o długości 120 nt i zmapowane do genomu świni domowej (Sscrofa11.1.99) za pomocą oprogramowania STAR (wersja 2.7.1a) (DOBIN i in. 2013). Program StringTie (wersja 2.1.1) posłużył do wyznaczenia sekwencji transkryptów genomu świni oraz profili ekspresji zarówno znanych genów kodujących białka, jak i nowych transkrypcyjnie aktywnych regionów (ang. *transcription active regions*, TARs) (PERTEA i in. 2015). W wyniku przyrównania odczytów do genomu referencyjnego uzyskano dane dotyczące globalnej ekspresji genów dla każdego powtórzenia biologicznego w grupie kontrolnej i poddanej działaniu chemeryny.

3.3.3. Analiza ekspresji różnicowej genów, ich ontologii oraz ścieżek metabolicznych i sygnałowych

Różnice w ekspresji genów w próbach badanych i kontrolnych określono wykorzystując model liniowy ujemnego rozkładu dwumianowego będącego elementem oprogramowania DESeq2 (LOVE i in. 2014). Dodatkowo, przy użyciu biblioteki *Surrogate Variable Analysis* (SVA) zastosowano tzw. korekcję *batch effect*, eliminującą niepożądaną zmienność indywidualną prób spowodowaną przez nieznane, niebiologiczne czynniki (LEEK i in. 2020). Do oceny ekspresji genów w błonie śluzowej macicy, zmieniających się pod wpływem chemeryny, zastosowano procedurę Benjaminiego-Hochberga. Próg istotności został ustalony na poziomie $p<0,05$. Geny, których ekspresje spełniały powyższe kryterium zostały zakwalifikowane jako geny o zmienionej pod wpływem chemeryny ekspresji. Analiza funkcjonalna genów oraz przypisanie ich do szlaków metabolicznych zostały wykonane w oprogramowaniu g.Profiler (REIMAND i in. 2016) bazując na następujących bazach danych: Gene Ontology (ontologia genów; GO) (ASHBURNER i in. 2000), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (KANEHISA i in. 2017) oraz Human Phenotype Ontology (HP) (ROBINSON i in. 2008). Istotność procesów GO oraz ścieżek KEGG została zweryfikowana na podstawie skorygowanej wartości $p<0,05$. Graficzna wizualizacja zmian ekspresji i adnotacji funkcjonalnych została sporządzona przy pomocy bibliotek programu Bioconductor: ggplot2 (WICKHAM 2009), GOplot (WALTER i in. 2015) i circlize (GU i in. 2014) oraz spersonalizowanego skryptu w oprogramowaniu R (wersja 3.6.3) (R CORE TEAM 2018).

3.3.4. Identyfikacja oraz analiza ekspresji długich niekodujących RNA

W celu identyfikacji lncRNAs o zmienionej pod wpływem chemeryny ekspresji, wykorzystano metodykę opisaną przez PAUKSZTO i in. (2019). Na początku usunięto transkrypty kodujące białka. Pozostałe sekwencje RNA zostały przefiltrowane pod względem poziomu ekspresji. W kolejnych krokach usunięto sekwencje krótsze niż 200 nt oraz posiadające strukturę jednoeksonową. Następnie oceniono transkrypty pod kątem potencjału kodowania białek i wyeliminowano sekwencje wykazujące możliwość translacji. Powyższe czynności wykonano za pomocą programów: Coding Potential

Calculator (CPC) (KANG i in. 2017), PLEK (LI i in. 2014) i FlExible Extraction of lncRNAs (FEELnc) (WUCHER i in. 2017). W rezultacie otrzymano listę lncRNAs, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem chemeryny. Pary skorelowanych lncRNAs oraz DEGs zostały wybrane na podstawie porównania profili ich ekspresji w oparciu o współczynnik korelacji Pearsona oraz odległość euklidesową par lncRNAs-gen ($|r2|>0.8$; $p<0,05$).

3.3.5. Identyfikacja oraz analiza miejsc alternatywnego składania RNA

Określenia miejsc splicingowych wykazujących zmienność pod wpływem chemeryny dokonano z użyciem metody rMATS v.2 (SHEN i in. 2014). Próg istotności statystycznej ustalono dla skorygowanej wartości $p<0,05$. Do oszacowania zmienności ekspresji miejsc splicingowych użyto odczyty o długości 120 nt. Za zdarzenia splicingowe uznano te, które różniły się istotnie statystycznie przy porównaniu grupy kontrolnej i poddawanej działaniu chemeryny. Wyróżniono 5 typów zdarzeń alternatywnego splicingu: alternatywne miejsce akceptorowe (A3SS), alternatywne miejsce donorowe (A5SS), wzajemnie wykluczające się eksony (MXE), zatrzymanie intronu (RI) i pominięcie eksonu (SE). Wyniki dotyczące zdarzeń splicingowych zostały zwizualizowane przy użyciu ggplot2, pakietu maser R Bioconductor (VEIGA 2021) oraz samodzielnie opracowanego skryptu.

3.3.6. Walidacja wybranych genów o zmiennej ekspresji oraz długich niekodujących RNA metodą Real-Time PCR (qPCR)

W celu potwierdzenia dokładności i powtarzalności wysokoprzepustowej metody NGS, przeprowadzono walidację wybranych DEGs oraz lncRNAs metodą qPCR wykorzystując urządzenie AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technology, USA). Reakcje qPCR wykonano z użyciem RNA użytego do sekwencjonowania. Sekwencje starterów oraz warunki reakcji qPCR zamieszczono w tabeli (publikacja 1, tabela 1). Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 20 µl zawierała: 12.5 µl Sensitive RT HS-PCR Mix SYBR (A&A Biotechnology, Polska), 0.24 µl ROX (barwnik referencyjny), cDNA, startery sensowny i antysensowny oraz wodę wolną od RNAaz. Każdą reakcję przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Geny *GAPDH* (ang. *Glyceraldehyde-3-*

Phosphate Dehydrogenase) i *PPIA* (ang. *Peptidylprolyl Isomerase A*) zostały użyte jako geny referencyjne. Kontrolę negatywną (ang. *no template control* – NTC) stanowiła reakcja, w której cDNA zastąpiono wodą wolną od nukleaz. W celu potwierdzenia specyficzności przeprowadzonych reakcji wykonano analizę krzywych topnienia oraz elektroforezę produktów reakcji qPCR w żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Niemcy). Analiza względnej ekspresji walidowanych DEGs/lncRNAs została przeprowadzona w oparciu o metodę komparatywną ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK I SCHMITTGEN 2001). Średnia geometryczna wartości Ct dla obu genów referencyjnych posłużyła do normalizacji wyników badanych transkryptów.

3.3.7. Walidacja zmian w procesie alternatywnego splicingu metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Do walidacji zmian w procesie alternatywnego składania transkryptów wykazujących modyfikacje pod wpływem chemeryny wybrano geny *CD44* oraz *SELENOI* charakteryzujące się pominięciem eksonu. Reakcję PCR przeprowadzono w urządzeniu Labcycler 48 s (Syngen Biotech, Polska) używając StartWarm HS-PCR Mix (A&A Biotechnology, Polska). W skład mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 25 µl wchodziło: 12.5 µl Hot Start PCR Mix, 200 nM każdego ze starterów (sensownego i antysensownego), woda wolna od RNAaz oraz 20 ng lub 30 ng cDNA dla, odpowiednio, *CD44* i *SELENOI*. Warunki reakcji oraz sekwencje starterów zostały opisane w tabeli (publikacja 1, tabela 1). Produkty reakcji PCR dla genów *CD44* i *SELENOI* analizowano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Niemcy).

3.4. Określenie wpływu chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji

3.4.1. Ekstrakcja białka z tkanek

Ekstrakcja białka została przeprowadzona poprzez homogenizację 15-20 mg tkanki w 150-200 µl buforu lizującego (30 mM Tris-HCl (pH=8), 8 M mocznik i 2% CHAPS). Homogenaty inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie wirowano przez 5 minut (10 000 x *g* w 4°C). Zawartość białka w supernatantach oznaczono metodą

Bradforda i odczytano z krzywej wzorcowej utworzonej w oparciu o wartości absorbancji znanych rozcieńczeń roztworu albuminy surowicy bydlęcej (BSA). Próby przechowywano w –80°C do momentu wykonania dalszych analiz.

3.4.2. Trawienie białek

Analizę proteomiczną wykonano w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Każdą próbę (kontrola + chemeryna; n=4) oraz standard wewnętrzny w ilości 100 µg rozcieńczono 8 M roztworem mocznika w 200 mM buforze wodorowęglanu trietyloamonowego (TEAB, pH=8,5) do objętości 200 µl. Mostki cysteinowe zredukowano przez inkubację z 20 mM tris(2-karboksyetylo)fosfiną (TCEP; 1 godzina w 37°C). Białka przeniesiono do filtra Vivacon z odcięciem masy cząsteczkowej 30 kDa (Sartorius Stedim, Polska) i trawiono zgodnie z protokołem Filter-aided sample Preparation (FASP) z niewielkimi modyfikacjami. Próbki wirowano przy 14 500 x *g* przez 30 min, przemywano 100 µl roztworem mocznika, następnie przeprowadzono 15-minutową inkubację w temperaturze pokojowej z 50 mM s-metanotiosulfonianem metylu (MMTS). Białka kolejno przemyto 3-krotnie 8 M buforem mocznikowym i 200 mM TEAB. Po każdym, pojedynczym płukaniu próbki wirowano do czasu wysuszenia filtra. Trawienie przeprowadzono przy użyciu mieszanki trypsyna/LysC (Promega, USA) w stosunku enzym-białko 1:25 przez noc w 37°C. Peptydy eluowano poprzez 2-krotne przemycie 200 mM TEAB i 1-krotne przemycie 500 mM NaCl. Wysuszone peptydy ponownie zawieszono w 85 µl 200 mM buforu TEAB i znakowano znacznikami TMT10plex (Thermo Fisher Scientific, USA) w 41 µl acetonitrylu (ACN) przez 1 godzinę na wytrząsarce. Standardy wewnętrzne zostały wyznakowane przy użyciu TMT10-126 Label Reagent. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie 8 µl 5% hydroksyloaminy. Następnie sprawdzono skuteczność znakowania, a połączone próbki dla każdego zestawu izobarycznych znaczników masy (ang. *tandem mass tag*, TMT) zostały odsolone przy użyciu dwóch 30 mg kolumn Oasis HLB (Waters, USA). W skrócie, kolumny wstępnie kondycjonowano w 1 ml metanolu i 1 ml wody. Po załadowaniu próby i przepłukaniu 1 ml wody, peptydy wymyto z kolumn za pomocą 400 µl 80% ACN i 0,1% kwasu mrówkowego (FA). Próbki osuszono i ponownie zawieszono w 500 µl 10 mM wodorotlenku amonu.

3.4.3. Frakcjonowanie peptydów w odwróconej fazie przy wysokim pH

Peptydy znakowane TMT, frakcjonowano stosując chromatografię w wysokim pH w układzie faz odwróconych na kolumnie XBridge Peptide BEH C18 (4,6 x 250 mm, 130 Å, 5 µm; Waters, USA). Rozdział prowadzono przy przepływie 1 ml/min przez 27 minut stosując system Waters Acquity UPLC H-class. Fazy ruchome składały się z wody (A), ACN (B) i 100 mM roztworu wodorotlenku amonu (C). Procent fazy C utrzymywano na stałym poziomie 10% w całym gradiencie. Frakcje zbierano co 1 minutę począwszy od trzeciej minuty rozdziału. Zastosowano następujący gradient rozpuszczalnika B: 3-5% przez 0,5 min, 5-22% przez 17 min, 22-28% przez 2 minuty, 28-45% przez 1,5 min, 45-90% przez 0,5 min, 90% przez 2,5 min (zatrzymanie izokratyczne) i końcowe równoważenie kolumny przy 3% przez 3 min. Profil elucji peptydów monitorowano za pomocą detektora UV przy długości fali 214 nm. Frakcje w ilości 25 z każdego zestawu TMT osuszono w koncentratorze próżniowym Speedvac i przed analizą LC-MS/MS rozpuszczono w 100 µl 0,1% kwasu trifluorooctowego (TFA) i 2% ACN.

3.4.4. Spektrometria mas

Frakcje analizowano przy użyciu systemu LC-MS/MS składającego się z chromatografu ACQUITY UPLC M-Class System (Waters, USA) bezpośrednio sprzężonego ze spektrometrem mas QExactive (Thermo Scientific, USA). Peptydy naniesiono na prekolumnę C18 (180 µm x 20 mm; Waters, USA) przy użyciu roztworu wodnego 0,1% FA jako fazy ruchomej, a następnie wykonano rozdział na kolumnie nanoAcquity BEH C18 (75 µm x 250 mm, 1,7 µm; Waters, USA) stosując gradient ACN (0-35% ACN w 160 min) w obecności 0,1% FA przy przepływie 250 nl/min. Akwizycję danych przeprowadzono przy użyciu metody *data-dependent* z fragmentancją 12 najbardziej intensywnych jonów prekursorowych (fragmentacja typu CID, normalizowana energia kolizyjna 27). Pełne skany MS obejmujące zakres 300-1600 m/z (stosunek masy do ładunku) wykonywano w rozdzielczości 70 000 przy maksymalnym czasie zbierania jonów (ang. *maximum injection time*) 60 ms i wartości AGC target 1e6. Skany MS2 uzyskano przy maksymalnym czasie zbierania jonów 120 ms i wartości AGC target 5e5 w rozdzielczości 35 000. Okienko izolacji jonów (ang. *isolation window*)

zostało ustawione na 1,2 m/z, a czas wykluczenia jonu z pomiaru (ang. *dynamic exclusion*) na 30 sekund.

3.4.5. Analiza danych

Rekalibrację offline oraz identyfikację peptydów i białek przeprowadzono w pakiecie oprogramowania MaxQuant/Andromeda (wersja 1.6.17.0) (TYANOVA i in. 2016A) z wykorzystaniem pełnej bazy danych Uniprot dotyczącej *Sus scrofa* (wersja 2020_10). Wyszukiwanie obejmowało peptydy generowane przez trypsynę i LysC, jako modyfikację stałą ustawiono metylotionylację cystein (Mehylthio), a jako zmienną – oksydację metioniny. Oprogramowanie ustawiono na analizę ilościową na podstawie wysokości jonów reporterowych (ang. *reporter MS2 quantification*). Współczynniki korekcji TMT 10plex zostały określone dla każdego zestawu zgodnie z instrukcją producenta. Statystyczną walidację danych (FDR) wykonano na podstawie wyników uzyskanych z bazy odwróconej. Zidentyfikowane grupy białek (ProteinGroups) wraz z danymi ilościowymi były analizowane z użyciem oprogramowania Perseus (wersja 1.6.13) (TYANOVA i in. 2016B). Identyfikacje z odwróconej bazy danych oraz zanieczyszczenia zostały usunięte. Intensywności jonów reporterowych TMT normalizowano metodą *Internal Reference Scaling* (IRS) (PLUBELL i in. 2017). Intensywności reporterowe zostały logarytmowane (log2), a następnie wykluczono białka nie posiadające co najmniej 3 sygnałów w przynajmniej 1 grupie analitycznej. Brakujące wartości zastąpiono danymi z rozkładu normalnego (szerokość rozkładu 0,3; przesunięcie 1,8) oddzielnie dla każdej kolumny. Próg istotności dla wartości p wynikający z testu t-Studenta wynosił 0,05, a odcięcie krotności zmiany wynosiło ± 1,2.

3.4.6. Analiza funkcjonalna

Analizę funkcjonalną białek o zmienionej ekspresji pod wpływem chemeryny wykonano przy użyciu programu g:Profiler (REIMAND i in. 2016) wykorzystującego bazy danych GO (ASHBURNER i in. 2000) oraz KEGG (KANEHISA i in. 2017) ($p<0,05$).

3.4.7. Walidacja metodą Western blot

W celu walidacji wyników uzyskanych metodą LC-MS/MS, przeprowadzono analizę Western blot czterech wybranych białek o ekspresji zmienionej pod wpływem chemeryny (ang. *Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 5*, IFIT5*;* ang. *Aconitase 1,* ACO1; ang. *Transforming Growth Factor Beta 1*, TGFβ1; ang. *Membrane-associated Progesterone Receptor Component 1*, PGRMC1). Próby izolowano przez homogenizację tkanek w buforze litycznym T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), wzbogaconym w inhibitory proteaz (Sigma-Aldrich, USA). Następnie, uzyskane lizaty wirowano przez 5 minut w 4°C (10 000 x *g*). Analizę Western blot przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez SMOLINSKĄ i in. (2019), z modyfikacjami. Do 40 µg próby białka dodano bufor obciążający (100 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0.2% błękit bromofenolowy, 200 mM ditiotreitol, pH=6,8) i inkubowano przez 3 minuty w 99,9°C. Następnie, przeprowadzono rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE w 12,5% żelu poliakrylamidowym. Kolejny etap stanowił transfer rozdzielonych białek z żelu na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) (Roche Diagnostics, Niemcy). W celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał, membrany inkubowano przez 1 godzinę w 5% roztworze BSA w TBST w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w buforze TBST (3 x 5 minut), membrany inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciw: IFIT5 (1:500; ab220954; Abcam, Wielka Brytania), ACO1 (1:1000; orb330127; Biorbyt, Wielka Brytania), TGFβ1 (1:500; PA1-29032; Thermo Fisher Scientific, USA), PGRMC1 (1:500; sc-393015; Santa Cruz Biotechnology, USA), oraz aktynie (1:2000; A2066; Sigma-Aldrich, USA). Białko aktyny zostało użyte jako białko referencyjne. Po całonocnej inkubacji w 4°C, membrany wypłukano w buforze TBST (3 x 5 minut), a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową: kozimi antykróliczymi (AP156P; Merck Millipore, USA) w celu detekcji IFIT5, ACO1, TGFβ1 (1:5000) i aktyny (1:20000) oraz kozimi antymysimi dla PGRMC1 (1:5000; 115-035-003; Jackson ImmunoResearch, USA) (90 minut, temperatura pokojowa). Na koniec membrany ponownie płukano w buforze TBST (3 x 5 minut) i inkubowano z Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, USA) zgodnie z wytycznymi producenta. Immunokompleksy wizualizowano z użyciem Azure 280

Imaging System (Azure Biosystems, USA). Wyniki analizowano mierząc gęstość optyczną immunokompleksów w programie Image Studio Lite v.5.2 (LI-COR, USA).

3.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica (Statsoft Inc., USA) wykorzystując test t-Studenta. Wyniki zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy średniej (S.E.M.) z pięciu niezależnych obserwacji (n=5). Wartości przyjmowano za istotne statystycznie przy $p<0,05$.

4. Wyniki

4.1. Wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji

4.1.1. Wyniki sekwencjonowania następnej generacji

Dane uzyskane w wyniku sekwencjonowania zostały zdeponowane w bazie European Nucleotide Archive (https://www.ebi.ac.uk/ena) i posiadają numer akcesyjny PRJEB48472. W wyniku sekwencjonowania RNA-seq (5 badanych i 5 kontrolnych bibliotek) uzyskano łącznie 719 702 896 odczytów ze sparowanymi końcami (publikacja 1, tabela 2). Po wstępnej obróbce (długość co najmniej 120 pz, wynik jakości Phred>20) i usunięciu sekwencji adaptorowych uzyskano 592 243 736 odczytów, z których 529 361 378 zostało zmapowanych do genomu referencyjnego świni (Sscrofa 11.1.99). Średni rozkład procentowy odczytów, uwzględniając lokalizację i strukturę genów, był następujący: 22,71% odczytów przypisano do regionów kodujących, 12,66% do regionów niepodlegających translacji, 38,88% do intronów i 24,76% do obszarów międzygenowych (Publikacja 1, Tabela 2). Ponadto, zidentyfikowano 28 159 TARs. Po zastosowaniu korekcji „batch effect", przy użyciu bibliotek DESeq i SVA wykryto 165 TARs o zmienionej ekspresji ($p<0,05$) (publikacja 1, tabela uzupełniająca S2).

4.1.2. Wpływ chemeryny na ekspresję genów kodujących funkcjonalne białka. Adnotacje funkcjonalne

Wśród 165 TARs, w eksperymencie zidentyfikowano 130 DEGs i 35 niekodujących transkryptów o zmienionej ekspresji. Profile ekspresji wszystkich DEGs zwizualizowano na rycinie 1 (publikacja 1, rycina 1). Spośród wszystkich DEGs, w próbach poddawanych działaniu chemeryny, 58 wykazywało wzrost ekspresji, natomiast 72 obniżenie ekspresji. Wartości zlogarytmowanej krotności zmiany ekspresji (log_2FC) dla DEGs wahały się od -6,999 (*APOBEC2*) do 8,399 (*GH1*) (publikacja 1, tabela uzupełniająca S2). Do analizy GO zostało przypisanych 108 DEGs. Geny podzielono na trzy główne kategorie: funkcje biologiczne (BP), komponenty komórkowe (CC) i funkcje molekularne (MF). DEGs przypisano do 66 podkategorii znajdujących się w bazie GO, z czego 50 zostało przypisanych do kategorii BP, 7 do CC i 9 do kategorii MF (publikacja 1, tabela uzupełniająca S3).

Największą ilość DEGs z kategorii BP przypisano do podkategorii: „pozytywna regulacja procesów biologicznych" (GO:0048518; 54 DEGs), „odpowiedź na stres" (GO:0006950; 38 DEGs), „procesy układu odpornościowego" (GO:0002376; 38 DEGs) i „odpowiedź na bodziec zewnętrzny" (GO:0009605; 38 DEGs) (publikacja 1, rycina 2). Dodatkowo, spośród podkategorii BP, do których zostały przypisane DEGs, istotne biologicznie wydają się: „odpowiedź obronna" (GO:0006952; 28 DEGs), „odpowiedź na cytokiny" (GO:0034097; 16 DEGs), „wytwarzanie cytokin" (GO0001816; 14 DEGs) i „wrodzona odpowiedź immunologiczna" (GO:0045087; 11 DEGs) (publikacja 1, rycina 3A).

Większość genów przyporządkowanych do kategorii CC została przypisana do podkategorii „cytoplazma" (GO:0005737; 63 DEGs) i „mitochondrium" (GO:0005739; 19 DEGs). Dodatkowo białka kodowane przez DEGs zakwalifikowały się między innymi jako komponenty komórkowe „kompleksu gonadotropiny przysadkowej", „kompleksu hormonu folikulotropowego" oraz „kompleksu lamininy-5" (publikacja 1, rycina 3B).

Podkategorią GO w kategorii MF, do której przypisano największą liczbę DEGs była „sygnalizacja wiązania receptora" (GO:0005102; 110 DEGs). Co więcej, wśród kategorii MF wyróżniono geny związane z „aktywnością hormonu folikulotropowego" (GO:0016913; 2 DEGs), „wiązaniem z receptorem chemokin CXCR3" (GO:0048248; 3 DEGs) oraz „aktywnością chemokin" (GO:0008009; 5 DEGs).

Wzbogacona analiza ścieżek metabolicznych KEGG ujawniła modulację czterech ścieżek sygnałowych aktywowanych przez białka kodowane przez DEGs (publikacja 1, tabela uzupełniająca S3). Analiza KEGG wykazała wpływ chemeryny na dobrze udokumentowane szlaki, m.in. zaangażowane w „zapalenie wątroby typu C" (KEGG:05160, 7 DEGs) i „interakcja receptorów cytokin" (KEGG: 04060, 9 DEGs) (publikacja 1, rycina 4).

4.1.3. Identyfikacja oraz analiza ekspresji długich niekodujących RNA

W procedurze identyfikacji lncRNAs wykazano 12 transkryptów o zmienionym pod wpływem chemeryny profilu ekspresji. Trzy z nich zostały oznaczone identyfikatorem genu ENSEMBL, pozostałe dziewięć lncRNAs posiadało nieznaną sekwencję. Porównując profile ekspresji, 66 par lncRNAs-DEGs wykazało wysoki (ponad 0,8) współczynnik korelacji Pearsona (publikacja 1, tabela uzupełniająca S4). Dwa DEGs (*NBN*, *BCS1L*) skorelowane z lncRNAs są zaangażowane w „ograniczenie wzrostu wewnątrzmacicznego" (HP:0001511). Kolejne dwa (*ABI3BP*, *IL7R*) zakwalifikowały się do kategorii GO „odpowiedź obronna" (GO:0006952) i „proliferacja populacji komórek" (GO:0008283). Wspomniane DEGs miały podobne profile ekspresji z tym samym nieznanym lncRNA MSTRG.7893, co sugeruje potencjalną funkcję regulacyjną tego lncRNA w odpowiedzi na działanie chemeryny.

4.1.4. Modyfikacje alternatywnego składania transkryptów pod wpływem chemeryny

W badaniu potwierdzono 386 zróżnicowanych zdarzeń alternatywnego składania obejmujących 321 TARs (publikacja 1, rycina 5). Wykryte zdarzenia sklasyfikowano jako: A3SS – 42 przypadki, A5SS – 43 przypadki, MXE – 53 przypadki, RI – 9 przypadków i SE – 239 przypadków. Modyfikacje składania transkryptów zwizualizowano na wykresie (publikacja 1, rycina 5A). Geny *NF2* i *PDGFB* powiązano z „nieprawidłową aktywnością hormonu folikulotropowego" (HP:0030346). Chemeryna wpłynęła na modyfikacje splicingowe w obrębie obu genów. W genie *CD44*, pod wpływem chemeryny wystąpiły 2 zdarzenia splicingowe SE i 3 MXE, które miały wyższy procent splicingowej inkluzji na połączeniu ekson-intron w obrębie transkryptów

kontrolnych. Wśród genów odgrywających istotną rolę w steroidogenezie oraz odpowiedzi na hormony steroidowe, wykazujących modyfikacje splicingu pod wpływem chemeryny, zidentyfikowano *CYP1A1*, *HSD17B7*, *CYP7A1* i *FOXP1*. Analiza wykazała, że w próbach kontrolnych występowało wiele alternatywnych form splicingu w regionie UTR (ekson 1 i intron 1) genu *HSD17B7*, przy czym próby inkubowane z chemeryną posiadały tylko 1 dominujący wariant tego genu. Analizując *CYP1A1* wykryto 2 alternatywne warianty. W eksonie 2 genu *CYP1A1* zaobserwowano zdarzenie splicingowe (A3SS), które wydłuża transkrypt o dodatkowe 3 nukleotydy kodujące serynę. Powyższa modyfikacja była hamowana pod wpływem chemeryny, czego konsekwencją była krótsza sekwencja kodująca gen *CYP1A1*.

4.1.5. Walidacja wyników RNA-seq

Do walidacji uzyskanych wyników RNA-seq wykorzystano osiem DEGs (*prolactin – PRL, glycoprotein hormones alpha polypeptide – CGA, interleukin 7 receptor – IL7R, nicotinamide phosphoribosyltransferase – NAMPT, integrin subunit beta 8 – ITGβ8, follicle stimulating hormone subunit beta – FSHβ, growth hormone 1 – GH1, laminin subunit alpha 3 – LAMA3*) i pięć lncRNAs (*MSTRG.15659.1, MSTRG.22235.1, ENSSSCG00000043763, MSTRG.14190.1, MSTRG.14192.1*), których zmiany w ekspresji określono metodą qPCR. W skrawkach błony śluzowej macicy inkubowanych z chemeryną, ekspresja transkryptów *PRL*, *CGA, IL7R, NAMPT*, *ITGβ8*, *FSHβ*, *GH1*, *MSTRG.15659,1*, *MSTRG.22235.1*, *ENSSSCG00000043763*, *MSTRG.14190.1* i *MSTRG.14192,1* była podwyższona, podczas gdy poziom genu *LAMA3* był obniżony w porównaniu do kontroli. Tendencje do modyfikacji alternatywnego splicingu pomiędzy grupami w obrębie *CD44* i *SELENOI* zostały potwierdzone metodą PCR. Chemeryna powodowała częstsze występowanie modyfikacji SE w zakresie *CD44*. Odwrotny efekt został zaobserwowany w przypadku genu *SELENOI*, gdzie zjawisko pominięcia eksonu występowało tylko w transkryptach pochodzących z prób kontrolnych. Wzorce ekspresji wybranych DEGs, lncRNAs i modyfikacji alternatywnego splicingu były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą RNA-Seq (publikacja 1, ryciny 5B, 6 i 7). Wyniki walidacji potwierdziły prawidłowość i dokładność metody wysokoprzepustowej zastosowanej w niniejszym badaniu.

4.2. Wpływ chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji

4.2.1. Białka regulowane przez chemerynę

Dane uzyskane dzięki analizie LC-MS/MS zostały zdeponowane w bazie PRIDE (PEREZ-RIVEROL i in. 2022) pod numerem dostępowym PXD031795. W badaniu zidentyfikowano całkowitą liczbę 1499 białek (publikacja 2, tabela uzupełniająca S1). Po względnej ocenie ilościowej, do wyników zastosowano filtry (odcięcie krotności zmiany 1,2 i $p<0,05$) w wyniku czego uzyskano ostateczną listę 352 białek regulowanych przez chemerynę (ang. *differetially regulated proteins*, DRPs). DRPs zwizualizowano na wykresie (publikacja 2, rycina 1). Spośród wszystkich zidentyfikowanych DRPs, 164 zwiększyło, natomiast 188 zmniejszyło swój poziom (publikacja 2, tabela uzupełniająca S2). Wartości krotności zmian dla DRPs wahały się od -2,16 (SCD5) do 3,01 (HLA-DQB1).

4.2.2. Adnotacje funkcjonalne

Aby odkryć możliwe funkcje 352 oznaczonych DRPs zidentyfikowanych w skrawkach błony śluzowej świń inkubowanych w obecności chemeryny, białka podzielono na trzy główne kategorie: BP, CC i MF (publikacja 2, tabela uzupełniająca S3). DRPs przypisano do 47 podkategorii z bazy GO ($p<0,05$). W obrębie tych podkategorii, 24 DRPs przypisano do kategorii BP, 14 do CC, a 9 do kategorii MF (publikacja 2, rycina 2).

Większość DRPs z kategorii BP przypisano do podkategorii „ruchliwość komórek" (GO:0048870; 43 DRPs), „lokalizacja komórki" (GO:0051674; 43 DRPs), „migracja komórek" (GO:0016477; 42 DRPs) oraz „proces metabolizmu kwasu karboksylowego" (GO:0019752; 29 DRPs). W kategorii BP istotne biologicznie wydają się DRPs przypisane do podkategorii: „adhezja komórkowa leukocytów" (GO:0007159; 11 DRPs), „regulacja migracji komórek" (GO:0030334; 23 DRPs) i „regulacja proliferacji limfocytów T" (GO:0042129; 6 DRPs) (publikacja 2, rycina 3).

Większość białek w kategorii CC została przypisana do podkategorii „połączenia komórkowe" (GO:0030054; 44 DRPs) i „połączenie przylegania" (GO:0070161; 31 DRPs). Co więcej, ujawnione białka były komponentami

komórkowymi związanymi między innymi z „połączeniami komórka-komórka” oraz „cytoszkieletem”.

Największą ilość DRPs w kategorii MF przypisano do podkategorii „wiązanie identycznych białek” (GO:0042802; 59 DRPs). Kategoria MF obejmowała również DRPs przypisane do podkategorii: „wiązanie fosfolipidów” (GO:0005543; 19 DRPs), „wiązanie kompleksu zawierającego białko” (GO:0044877; 15 DRPs) i „strukturalny składnik cytoszkieletu” (GO:0005200; 5 DRPs).

Analiza KEGG wykazała aktywację dwóch ścieżek sygnałowych, w których biorą udział zidentyfikowane DRPs. Ujawnione DRPs były związane ze szlakami: „kardiomiopatia przerostowa” (KEGG:05410; 9 DRPs) i „kardiomiopatia rozstrzeniowa” (KEGG:05414; 6 DRPs), które były modulowane pod wpływem chemeryny.

4.2.3. Walidacja wyników LC-MS/MS

Aby zweryfikować wyniki otrzymane metodą LC-MS/MS, do analizy Western blot wybrano cztery DRPs. Wykazano, że pod wpływem chemeryny w błonie śluzowej macicy poziom białka IFIT5 i TGFβ1 był podwyższony. Dodatkowo, chemeryna obniżała ekspresję białka ACO1 i PGRMC1 ($p<0,05$). Profile ekspresji wybranych DRPs były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą LC-MS/MS (publikacja 2, rycina 4). Walidacja wyników potwierdziła prawidłowość i dokładność zastosowanej w niniejszym badaniu metody LC-MS/MS.

5. Ograniczenia badań

Do ograniczeń przeprowadzonego eksperymentu należy zaliczyć fakt, iż badanie zostało przeprowadzone na skrawkach błony śluzowej macicy świni w 15-16 dniu ciąży. W związku z tym, wnioski płynące z uzyskanych wyników są ograniczone i można je odnieść wyłącznie do warunków hodowli *in vitro*. Nie ma pewności, że te same wnioski można byłoby sformułować po wykonaniu eksperymentu z wykorzystaniem chemeryny w naturalnych warunkach na żywym organizmie świni. Wykorzystany model eksperymentalny nie odwzorowuje w pełni środowiska panującego w macicy, m.in. wzajemnych interakcji różnych typów komórek błony śluzowej oraz warstw komórek mięśniowych. Warto zaznaczyć, że na regulację funkcjonowania komórek macicy mają wpływ także lokalnie działające molekuły, takie jak: progesteron, estrogeny, prostaglandyny, interleukiny, interferony czy czynniki wzrostu. W przypadku ciąży, należy brać również pod uwagę występowanie swoistych sygnałów molekularnych wysyłanych przez zarodki kontaktujące się z organizmem matczynym. Dlatego też nie można przewidywać jednakowych rezultatów w przypadku przeprowadzenia badań *in vivo*. Hodowle tkankowe są modelem badawczym, który stanowi pewien kompromis pomiędzy hodowlami komórkowymi a warunkami naturalnymi, ponieważ uwzględnia mieszaninę różnych typów komórek, które fizjologicznie występują w błonie śluzowej macicy. Niemniej jednak, uzyskane w warunkach *in vitro* wyniki należałoby w dalszej kolejności potwierdzić w badaniach *in vivo*.

Analizując wyniki uzyskane w obu pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej można zaobserwować niespójność pomiędzy poziomem ekspresji genów oraz białek wykazujących zmiany pod wpływem chemeryny. Różnice w poziomie transkryptów i odpowiadających im białek są często obserwowanym zjawiskiem i mogą być skutkiem wielu skomplikowanych procesów regulacyjnych. SCHWANHÄUSSER i in. (2011) stwierdzili, że różnice w ekspresji genów u ssaków odpowiadają tylko za 40% różnic w koncentracji białek, a współczynnik determinacji (R^2) między zawartością mRNA i białka wynosi jedynie 0,41. Autorzy sugerują, że ekspresja białek może być regulowana głównie przez wydajność translacji. Przedstawiony mechanizm może być korzystny dla metabolizmu komórki ze względu na oszczędność substratów do syntezy białek oraz minimalizację wydatku energetycznego związanego z procesem translacji. Rozbieżności między ekspresją genów i białek mogą również wynikać z różnic

w stabilności transkryptów i białek, regulacji transkrypcyjnej i potranskrypcyjnej, zahamowania procesów potranskrypcyjnych poprzez wysoką zawartość mRNA lub obniżenie poziomu ekspresji genów z powodu wysokiego stężenia białka. Znane jest również zjawisko degradacji mRNA indukowanej przez miRNA (LIU 2008; DE SOUSA ABREU i in. 2009; GRY i in. 2009). W związku z powyższym, fakt pojawienia się określonego transkryptu nie odzwierciedla obecności kodowanego przez niego białka a jest jedynie wskaźnikiem, który determinuje zdolność komórki do produkcji odpowiedniego białka.

6. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania umożliwiły realizację postawionych celów pracy oraz poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat fizjologicznej roli chemeryny w błonie śluzowej świń w okresie implantacji. Dzięki sekwencjonowaniu następnej generacji RNA-seq oraz zastosowaniu narzędzi bioinformatycznych zbadano ekspresję genów oraz charakterystykę transkryptów genomu błony śluzowej macicy świni poddanej działaniu chemeryny. Uzyskane wyniki dostarczyły informacji na temat zmian w transkryptomie komórek pod wpływem chemeryny, w tym dotyczących regulacji ekspresji genów, długich niekodujących RNA oraz procesu alternatywnego splicingu. Z wykorzystaniem metody chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas oraz zastosowaniu narzędzi bioinformatycznych wykazano wpływ chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni podczas implantacji. Szczegółową dyskusję uzyskanych wyników przedstawiono w publikacji 1 i 2.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1) Chemeryna wpływa na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni, kontrolując ekspresję wielu genów i białek kluczowych w procesie implantacji. Chemeryna bierze udział w kontroli migracji i adhezji komórek, angiogenezy, odpowiedzi immunologicznnej, steroidogenezy oraz wrażliwości tkanki na progesteron. Ponadto wydaje się, że chemeryna może być ważnym czynnikiem związanym z dysfunkcją komórek śródbłonka w patogenezie stanu przedrzucawkowego.

2) W świetle przedstawionych wyników sugeruje się, że chemeryna jest ważnym ogniwem hormonalnym łączącym procesy metaboliczne, odpornościowe i rozrodcze zachodzące w błonie śluzowej świni w okresie implantacji. Jednak dokładny mechanizm działania chemeryny w układzie rozrodczym samicy wymaga dalszych, szczegółowych badań molekularnych.

7. Bibliografia

Andrews, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [WWW Document]. Babraham Bioinforma. URL https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ (accessed 2.4.21).

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: Tool for the unification of biology. Nat. Genet. https://doi.org/10.1038/75556

Bazer, F.W., Johnson, G.A., 2014. Pig blastocyst-uterine interactions. Differentiation 87, 52–65. https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.11.005

Bazer, F.W., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Wu, G., 2009. Comparative aspects of implantation. Reproduction 138, 195–209. https://doi.org/10.1530/REP-09-0158

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Castellucci, M., De Matteis, R., Meisser, A., Cancello, R., Monsurrò, V., Islami, D., Sarzani, R., Marzioni, D., Cinti, S., Bischof, P., 2000. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. Mol. Hum. Reprod. 6, 951–958. https://doi.org/10.1093/MOLEHR/6.10.951

De Sousa Abreu, R., Penalva, L.O., Marcotte, E.M., Vogel, C., 2009. Global signatures of protein and mRNA expression levels. Mol Biosyst.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Dobrzyn, K., Kiezun, M., Szeszko, K., Kisielewska, K., Rytelewska, E., Gudelska, M., Zaobidna, E., Bors, K., Kopij, G., Szymanska, K., Kaminska, B., Kaminski, T., Smolinska, N., 2021. Orexin B affects the transcriptome of incubated in vitro porcine

endometrial explants from the early-implantation period. Reprod. Domest. Anim. 56, 239–253. https://doi.org/10.1111/RDA.13700

Dobrzyn, K., Smolinska, N., Kiezun, M., Szeszko, K., Rytelewska, E., Kisielewska, K., Gudelska, M., Kaminski, T., 2018. Adiponectin: A New Regulator of Female Reproductive System. Int. J. Endocrinol. https://doi.org/10.1155/2018/7965071

Geisert, R.D., Brookbank, J.W., Michael Roberts, R., Bazer, F.W., 1982. Establishment of pregnancy in the pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. Biol. Reprod. 27, 941–955. https://doi.org/10.1095/biolreprod27.4.941

Geisert, R.D., Yelich, J. V, 1997. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. J. Reprod. Fertil. Suppl. 52, 133–149.

Gry, M., Rimini, R., Strömberg, S., Asplund, A., Pontén, F., Uhlén, M., Nilsson, P., 2009. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. BMC Genomics 10, 1–14.

Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., Brors, B., 2014. circlize Implements and enhances circular visualization in R. Bioinformatics 30, 2811–2812. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU393

Gudelska, M., Dobrzyn, K., Kiezun, M., Kisielewska, K., Rytelewska, E., Kaminski, T., Smolinska, N., 2022. Chemerin affects P4 and E2 synthesis in the porcine endometrium during early pregnancy. Int. J. Mol. Sci. 23, 945. https://doi.org/10.3390/IJMS23020945

Gudelska, M., Dobrzyn, K., Kiezun, M., Rytelewska, E., Kisielewska, K., Kaminska, B., Kaminski, T., Smolinska, N., 2020. The expression of chemerin and its receptors (CMKLR1, GPR1, CCRL2) in the porcine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy and in trophoblasts and conceptuses. Animal 14, 2116–2128. https://doi.org/10.1017/S175173112000097X

Helfer, G., Wu, Q.F., 2018. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. J. Endocrinol. 238, R79–R94. https://doi.org/10.1530/JOE-18-0174

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K., 2017. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res. 45,

D353–D361. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092

Kang, Y.J., Yang, D.C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y.Q., Wei, L., Gao, G., 2017. CPC2: A fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. Nucleic Acids Res. 45, W12–W16. https://doi.org/10.1093/nar/gkx428

Kennedy, A.J., Davenport, A.P., 2018. International union of basic and clinical pharmacology CIII: Chemerin receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) nomenclature, pharmacology, and function. Pharmacol. Rev. 70, 174–196. https://doi.org/10.1124/pr.116.013177

Kim, J.Y., Xue, K., Cao, M., Wang, Q., Liu, J., Leader, A., Han, J.Y., Tsang, B.K., 2013. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. Endocrinology 154, 2912–2923. https://doi.org/10.1210/EN.2013-1001

Kisielewska, K., Rytelewska, E., Gudelska, M., Kiezun, M., Dobrzyn, K., Bogus-Nowakowska, K., Kaminska, B., Smolinska, N., Kaminski, T., 2020a. Expression of chemerin receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2 in the porcine pituitary during the oestrous cycle and early pregnancy and the effect of chemerin on MAPK/Erk1/2, Akt and AMPK signalling pathways. Theriogenology 157, 181–198. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.07.032

Kisielewska, K., Rytelewska, E., Gudelska, M., Kiezun, M., Dobrzyn, K., Bogus-Nowakowska, K., Kaminska, B., Smolinska, N., Kaminski, T., 2020b. Relative abundance of chemerin mRNA transcript and protein in pituitaries of pigs during the estrous cycle and early pregnancy and associations with LH and FSH secretion during the estrous cycle. Anim. Reprod. Sci. 219, 106532. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106532

Leek, J., Johnson, W., Parker, H., Fertig, E., Jaffe, A., Zhang, Y., Storey, J., Torres, L., 2020. sva: Surrogate Variable Analysis. R package version 3.38.0. [WWW Document]. URL https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/sva.html (accessed 2.19.21).

Li, A., Zhang, J., Zhou, Z., 2014. PLEK: A tool for predicting long non-coding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme. BMC Bioinformatics 15, 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-311

Liu, J., 2008. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods 25, 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Makowczenko, K.G., Jastrzebski, J.P., Szeszko, K., Smolinska, N., Paukszto, L., Dobrzyn, K., Kiezun, M., Rytelewska, E., Kaminska, B., Kaminski, T., 2020. Transcription analysis of the chemerin impact on gene expression profile in the luteal cells of gilts. Genes (Basel). 11, 651. https://doi.org/10.3390/GENES11060651

Meder, W., Wendland, M., Busmann, A., Kutzleb, C., Spodsberg, N., John, H., Richter, R., Schleuder, D., Meyer, M., Forssmann, W.G., 2003. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. FEBS Lett. 555, 495–499. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01312-7

Paukszto, L., Mikolajczyk, A., Szeszko, K., Smolinska, N., Jastrzebski, J.P., Kaminski, T., 2019. Transcription analysis of the response of the porcine adrenal cortex to a single subclinical dose of lipopolysaccharide from Salmonella Enteritidis. Int. J. Biol. Macromol. 141, 1228–1245. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.067

Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., García-Seisdedos, D., Hewapathirana, S., Kamatchinathan, S., Kundu, D.J., Prakash, A., Frericks-Zipper, A., Eisenacher, M., Walzer, M., Wang, S., Brazma, A., Vizcaíno, J.A., 2022. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. Nucleic Acids Res. 50, D543–D552. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1038

Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T., Salzberg, S.L., 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. Nat. Biotechnol. 33, 290–295. https://doi.org/10.1038/nbt.3122

Plubell, D.L., Wilmarth, P.A., Zhao, Y., Fenton, A.M., Minnier, J., Reddy, A.P., Klimek, J., Yang, X., David, L.L., Pamir, N., 2017. Extended multiplexing of Tandem Mass Tags (TMT) labeling reveals age and high fat diet specific proteome changes in mouse epididymal adipose tissue. Mol. Cell. Proteomics 16, 873–890.

https://doi.org/10.1074/MCP.M116.065524

R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing [WWW Document]. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. URL https://www.r-project.org/

Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., Vilo, J., 2016. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). Nucleic Acids Res. 44, W83–W89. https://doi.org/10.1093/nar/gkw199

Reverchon, M., Bertoldo, M.J., Ramé, C., Froment, P., Dupont, J., 2014. CHEMERIN (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. Biol. Reprod. 90, 1–15. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117044

Reverchon, M., Cornuau, M., Ram, C., Guerif, F., Royre, D., Dupont, J., 2012. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Hum. Reprod. 27, 1790–1800. https://doi.org/10.1093/humrep/des089

Roberts, R., Xie, S., Trout, W., 1993. Embryo-uterine interactions in pigs during week 2 of pregnancy. J. Reprod. Fertil. 48, 171–186.

Robinson, P.N., Köhler, S., Bauer, S., Seelow, D., Horn, D., Mundlos, S., 2008. The Human Phenotype Ontology: A Tool for Annotating and Analyzing Human Hereditary Disease. Am. J. Hum. Genet. 83, 610. https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2008.09.017

Rytelewska, E., Kiezun, M., Kisielewska, K., Gudelska, M., Dobrzyn, K., Kaminska, B., Kaminski, T., Smolinska, N., 2021a. Chemerin as a modulator of ovarian steroidogenesis in pigs: an in vitro study. Theriogenology 160, 95–101. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.040

Rytelewska, E., Kiezun, M., Zaobidna, E., Gudelska, M., Kisielewska, K., Dobrzyn, K., Kaminski, T., Smolinska, N., 2021b. Chemerin as a modulator of angiogenesis and apoptosis processes in the corpus luteum of pigs: an in vitro study. Biol. Reprod. 105, 1002–1015. https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAB126

Rytelewska, E., Kisielewska, K., Kiezun, M., Dobrzyn, K., Gudelska, M., Rak, A., Dupont, J.J., Kaminska, B., Kaminski, T., Smolinska, N., 2020. Expression of

chemerin and its receptors in the ovaries of prepubertal and mature gilts. Mol. Reprod. Dev. 87, 739–762. https://doi.org/10.1002/mrd.23391

Schneider, J.E., 2004. Energy balance and reproduction. Physiol. Behav. 81, 289–317. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.007

Schwanhüusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M., 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. Nat. 2011 4737347 473, 337–342. https://doi.org/10.1038/nature10098

Shen, S., Park, J.W., Lu, Z.X., Lin, L., Henry, M.D., Wu, Y.N., Zhou, Q., Xing, Y., 2014. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, E5593–E5601. https://doi.org/10.1073/pnas.1419161111

Smolinska, N., Dobrzyn, K., Kiezun, M., Szeszko, K., Maleszka, A., Kaminski, T., 2016. Effect of adiponectin on the steroidogenic acute regulatory protein, P450 side chain cleavage enzyme and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression, progesterone and androstenedione production by the porcine uterus during early pregnancy. J. Physiol. Pharmacol. 67, 443–456.

Smolinska, N., Kiezun, M., Dobrzyn, K., Rytelewska, E., Kisielewska, K., Gudelska, M., Zaobidna, E., Bogus-Nowakowska, K., Wyrebek, J., Bors, K., Kopij, G., Kaminska, B., Kaminski, T., 2019. Expression of chemerin and its receptors in the porcine hypothalamus and plasma chemerin levels during the oestrous cycle and early pregnancy. Int. J. Mol. Sci. 20, 3887. https://doi.org/10.3390/ijms20163887

Tyanova, S., Temu, T., Cox, J., 2016a. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat. Protoc. 2016a 1112 11, 2301–2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., 2016b. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat. Methods 2016b 139 13, 731–740. https://doi.org/10.1038/nmeth.3901

Veiga, D.F.T., 2021. Mapping Alternative Splicing Events to pRoteins. R package version 1.8.0 [WWW Document]. URL https://github.com/DiogoVeiga/maser (accessed 10.22.21).

Walter, W., Sánchez-Cabo, F., Ricote, M., 2015. GOplot: An R package for visually combining expression data with functional analysis. Bioinformatics 31, 2912–2914. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV300

Wang, Q., Kim, J.Y., Xue, K., Liu, J.Y., Leader, A., Tsang, B.K., 2012. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. Endocrinology 153, 5600–5611. https://doi.org/10.1210/en.2012-1424

Wickham, H., 2009. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3_6

Wittamer, V., Franssen, J.D., Vulcano, M., Mirjolet, J.F., Le Poul, E., Migeotte, I., Brézillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., Mantovani, A., Sozzani, S., Vassart, G., Parmentier, M., Communi, D., 2003. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. J. Exp. Med. 198, 977–985. https://doi.org/10.1084/jem.20030382

Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A., Lohi, H., Cirera, S., Fredholm, M., Botherel, N., Leegwater, P.A.J., Le Béguec, C., Fieten, H., Johnson, J., Alföldi, J., André, C., Lindblad-Toh, K., Hitte, C., Derrien, T., 2017. FEELnc: A tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. Nucleic Acids Res. 45, 57. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1306

Zabel, B.A., Allen, S.J., Kulig, P., Allen, J.A., Cichy, J., Handel, T.M., Butcher, E.C., 2005. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. J. Biol. Chem. 280, 34661–34666. https://doi.org/10.1074/jbc.M504868200