UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ: Biologii i Biotechnologii

Dziedzina: nauki ścisłe i biologiczne

Dyscyplina: nauki biologiczne

mgr Grzegorz Tomasz Kopij

Rozprawa doktorska

Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.*)* w okresie implantacji

Impact of visfatin on the transcriptomic and proteomic profile of the luteal cells in domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.) during the implantation period

Praca wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt

Promotor: prof. dr hab. Nina Magdalena Smolińska
Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Praca finansowana z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki:
OPUS 16 (2018/31/B/NZ9/00781)

Olsztyn, 2024

Spis treści

STRESZCZENIE **4**

ABSTRACT **7**

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ **10**

1. WSTĘP **11**

2. Hipoteza badawcza, cele i zakres badań **16**

3. Materiały i metody **17**

3.1. Zwierzęta doświadczalne 17

3.2. Hodowle *in vitro* komórek lutealnych świni 17

3.3. Określenie wpływu wisfatyny na profil transkryptomiczny komórek lutelnych 18

3.3.1. Izolacja RNA 18

3.3.2. Konstruowanie bibliotek, sekwencjonowanie RNA i kontrola jakości odczytów 18

3.3.3. Analiza różnicowa i funkcjonalna genów o zmienionej ekspresji 19

3.3.4. Identyfikacja długich niekodujących RNA, przewidywanych genów docelowych oraz analiza funkcjonalna 20

3.3.5. Analiza zdarzeń alternatywnego składania transkryptów 20

3.3.6. Walidacja wybranych genów oraz długich niekodujących RNA o zmienionej pod wpływem wisfatyny ekspresji metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) 21

3.3.7. Walidacja zdarzeń alternatywnego składania transkryptów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) 21

3.4. Określenie wpływu wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych 22

3.4.1. Izolacja białka 22

3.4.2. Trawienie białek 22

3.4.3. Frakcjonowanie białek metodą chromatografii cieczowej w odwróconej fazie w wysokim pH 23

3.4.4. Analiza spektrometrii mas 24

3.4.5. Analiza danych 24

3.4.6. Analiza funkcjonalna 25

3.4.7. Walidacja wybranych białek o zmienionej ekspresji metodą Western Blot 25

3.4.8. Analiza statystyczna 26

4. Wyniki **27**

4.1. Analiza wpływu wisfatyny na transkryptom komórek lutealnych 27

4.1.1. Wyniki sekwencjonowania następnej generacji 27

4.1.2. Wpływ wisfatyny na ekspresję genów i analiza funkcjonalna 27

4.1.3. Wpływ wisfatyny na ekspresję długich niekodujących RNA i analiza funkcjonalna 28

4.1.4. Analiza wpływu wisfatyny na zdarzenia alternatywnego składania transkryptów 29

4.1.5. Walidacja wyników uzyskanych metodą RNA-Seq 29
4.2. Analiza wpływu wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych 30
4.2.1. Wpływ wisfatyny na ekspresję białek i analiza funkcjonalna 30
4.2.2. Walidacja wyników LC-MS/MS 32
5. Podsumowanie i Wnioski 33
6. Piśmiennictwo 35

STRESZCZENIE

Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji

mgr Grzegorz Tomasz Kopij

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Niny Magdaleny 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 2024:

1) *Visfatin Affects the Transcriptome of Porcine Luteal Cells during Early Pregnancy*. International Journal of Molecular Science, 25(4): 2339, doi.org/10.3390/ijms25042339 **IF[1]=5.6; IF[2]=6.2; MEiN[3]=140**
2) *Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation*. Scientific Reports, 14, 14625, doi.org/10.1038/s41598-024-65577-1

   IF[1]=4.6; IF[2]=4.9; MEiN[3]=140

w których opisane zostały zmiany transkryptomiczne oraz proteomiczne zachodzące w komórkach lutealnych świni domowej pod wpływem wisfatyny w okresie implantacji.

Tkanka tłuszczowa, oprócz gromadzenia zapasów energetycznych, jest także ważnym narządem endokrynnym wydzielającym ponad 600 aktywnie biologicznie substancji nazywanych adipokinami. Zaangażowane są one w kontrolę apetytu i utrzymanie homeostazy energetycznej, a także w regulację funkcji rozrodczych u ludzi i zwierząt. Wisfatyna, nazywana również fosforybozylotransferazą (NAMPT), została opisana po raz pierwszy w 2005 roku. Dotychczas nie zidentyfikowano specyficznego receptora dla tego hormonu. Sugeruje się jednak, że wisfatyna może oddziaływać na tkanki docelowe poprzez aktywację receptora insuliny (INSR). Oprócz tkanki tłuszczowej ekspresję wisfatyny wykazano również, między

innymi, w strukturach osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG) różnych gatunków ssaków, takich jak podwzgórze myszy, przysadki tryków i samic myszy, oraz w wybranych strukturach jajników człowieka, krów i myszy. Może to sugerować, że wisfatyna należy do grupy adipokin zaangażowanych w regulację funkcji żeńskiego układu rozrodczego. Co więcej, zauważono, że koncentracja adipokiny w ludzkiej tkance tłuszczowej jest zależna od statusu hormonalnego i zmienia się w trakcie ciąży. Hormon ten wydaje się wykazywać właściwości plejotropowe. Wisfatyna, podobnie jak inne adipokiny, może działać jako wskaźnik równowagi metabolicznej, a przez to odgrywać ważną rolę w regulacji płodności samic. Sugeruje się, że hormon ten może pełnić istotną funkcję w procesie implantacji i wytwarzania łożyska. Dotychczasowe badania dotyczące wpływu wisfatyny na funkcjonowanie jajników ograniczały się wyłącznie do komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego. Wykazano, że wisfatyna bierze udział w regulacji procesu steroidogenezy w komórkach ziarnistych, a efekt ten związany jest z wpływem na ekspresję genów i białek enzymów steroidogennych. Podobne badania nie były dotychczas prowadzone na innych, aktywnych steroidogenicznie, typach komórek jajnikowych, takich jak komórki lutealne.

Brak danych dotyczących roli wisfatyny w regulacji czynności jajników w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży stał się inspiracją do przeprowadzenia badań dotyczących wpływu tego hormonu na globalną ekspresję genów i białek w komórkach lutealnych jajnika świni.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy zakładającej, że wisfatyna, hormon o działaniu plejotropowym, bierze udział w kontroli funkcjonowania jajników, poprzez regulację ekspresji genów oraz białek w komórkach lutealnych świni domowej w okresie implantacji.

W celu weryfikacji hipotezy zaplanowano następujące zadania badawcze:

1. określenie wpływu wisfatyny na transkryptom i spliceosom komórek lutealnych, w którego zakres wchodziła analiza genów o zmienionych profilach ekspresji (ang. *differentially expressed genes*, DEGs), długich niekodujących RNA (ang. *long non-coding RNAs*, lncRNAs) oraz zdarzeń alternatywnego składania transkryptów (ang. *alternative splicing events*, ASEs) przy użyciu metody Sekwencjonowania Następnej Generacji (NGS, RNA-Seq);

2. określenie wpływu wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych za pomocą Chromatografii Cieczowej Sprzężonej z Tandemową Spektrometrią Mas (LC-MS/MS).

W trakcie badań wykazano, że:

1. wisfatyna wpłynęła na zmianę profilu ekspresji 170 genów przypisanych do 45 adnotacji funkcjonalnych. Adipokina wpłynęła również na zmianę ekspresji 40 lncRNAs a także 168 transkryptów wykazujących alternatywne warianty składania;
2. wisfatyna spowodowała zmianę profilu ekspresji 511 białek przyporządkowanych do 162 adnotacji funkcjonalnych.

Wykazano, że wisfatyna pełni ważną rolę w regulacji funkcji komórek lutealnych regulując ekspresję genów, których produkty zaangażowane są w takie procesy jak: steroidogeneza, proliferacja, angiogeneza, procesy zapalne, regulacja cyklu oraz migracja i adhezja komórek. Analiza profilu proteomicznego komórek lutealnych poddanych działaniu wisfatyny wykazała, że hormon ten poprzez regulację ekspresji odpowiednich białek może być zaangażowany w proces steroidogenezy, lipogenezę, cholesterologenezę oraz regulację szlaku insulinowego. Ponadto wisfatyna regulowała ekspresję białek związanych z procesami proliferacji, apoptozy, angiogenezy i różnicowania komórek, jak również przebudowy tkanek.

Uzyskane wyniki przyczyniły się do pogłębienia wiedzy na temat roli jaką wisfatyna pełni w komórkach lutealnych świni. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że wisfatyna może być istotnym czynnikiem regulującym procesy rozrodcze i prawidłowe funkcjonowanie jajników w okresie implantacji, a tym samym wpływać na prawidłowy przebieg wczesnej ciąży.

Praca finansowana z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki:
OPUS 16 (2018/31/B/NZ9/00781)

[1]IF – wskaźnik cytowań (ang. Impact Factor) czasopisma z roku wydania pracy wg Web of Science

[2]IF – pięcioletni wskaźnik cytowani (ang. Impact Factor) czasopism z roku wydania pracy wg 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 05.01.2024

ABSTRACT

Influence of visfatin on the transcriptomic and proteomic profile of the luteal cells in domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.) during the implantation period.

mgr Grzegorz Tomasz Kopij

The work was conducted under the supervision of prof. dr hab. Nina Magdalena Smolinska at the Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

The doctoral dissertation consists of two papers published in 2024:

1) *Visfatin Affects the Transcriptome of Porcine Luteal Cells during Early Pregnancy*. International Journal of Molecular Science, 25(4): 2339, doi.org/10.3390/ijms25042339 **IF[1]=5.6; IF[2]=6.2; MEiN[3]=140**

2) *Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation*. Scientific Reports, 14, 14625, doi.org/10.1038/s41598-024-65577-1

   IF[1]=4.6; IF[2]=4.9; MEiN[3]=140

in which transcriptomic and proteomic changes occurring in the luteal cells of domestic pigs under the influence of visfatin during the implantation period have been described.

Besides storing energy reserves, adipose tissue is also an important endocrine organ secreting over 600 biologically active substances called adipokines. Some are involved in appetite control, maintaining energy homeostasis, and regulating reproductive functions in humans and animals. Visfatin, also known as nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), was first described in 2005. So far, a specific receptor for this hormone has not been identified. However, it is suggested that visfatin may interact with target tissues by activating the insulin receptor (INSR). In addition to adipose tissue, visfatin expression has been demonstrated in various mammalian hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG) structures, such as the mouse hypothalamus, pituitary glands of both male and female mice, and selected ovarian structures in humans, cows, and mice. This may suggest that visfatin belongs to the group of adipokines involved in regulating the function of the female reproductive system.

Furthermore, it has been noted that the concentration of this adipokine in human adipose tissue depends on hormonal status and changes during pregnancy. This hormone appears to exhibit pleiotropic properties. Like other adipokines, visfatin may act as an indicator of metabolic balance, thus playing an important role in regulating fertility in females. It is suggested that this hormone may play a significant role in the process of implantation and placental formation. Previous studies on the effect of visfatin on ovarian function have been limited to granulosa cells of ovarian follicles. It has been shown that visfatin is involved in regulating the steroidogenesis process in granulosa cells, and this effect is associated with its influence on the expression of steroidogenic enzymes genes and proteins. Similar studies have not yet been conducted in other steroidogenically active types of ovarian cells, such as luteal cells.

The lack of data regarding the role of visfatin in regulating ovarian function during the oestrous cycle and early pregnancy has inspired research on the influence of this hormone on the global gene and protein expression in the luteal cells of pigs.

This study aimed to verify the hypothesis that visfatin, a pleiotropic hormone, participates in the control of ovarian function by regulating gene and protein expression in the luteal cells of domestic pigs during the implantation period.

To verify these assumptions, the following research tasks were planned:

1. determining the effect of visfatin on the transcriptome and spliceosome of luteal cells, including the analysis of genes with altered expression profiles (DEGs), long non-coding RNAs (lncRNAs), and alternative splicing events (ASEs) using Next Generation Sequencing (NGS, RNA-Seq) method;
2. determining the effect of visfatin on the proteomic profile of luteal cells using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

In our studies, we have shown that:

1. Under the influence of visfatin, the expression profile of 170 genes changed. These genes were assigned to 45 functional annotations. Additionally, 40 lncRNAs with altered expression under the influence of this adipokine were demonstrated. We also identified 168 transcripts exhibiting alternative splicing variants under the influence of visfatin.

2. Under the influence of visfatin, 511 proteins showed a diverse expression profile. These proteins were associated with 162 functional annotations.

We have demonstrated that visfatin plays an important role in regulating the function of luteal cells by regulating the expression of genes involved in steroidogenesis, proliferation, angiogenesis, inflammatory processes, cycle regulation, cell migration, and adhesion. Analysis of the proteomic profile of luteal cells exposed to visfatin showed that by regulating the expression of specific proteins, this hormone may be involved in steroidogenesis, lipogenesis, cholesterogenesis, and regulation of the insulin pathway. Additionally, visfatin regulated the expression of proteins associated with proliferation, apoptosis, angiogenesis, cell differentiation and tissue remodelling.

The obtained results contributed to deepening the knowledge about the influence of visfatin on the global gene and protein expression in the luteal cells of pigs. Based on the obtained results, we have shown that visfatin may be an important factor regulating reproductive processes and the proper functioning of the ovaries during the implantation period, and thus the course of pregnancy.

This research was supported by the Polish National Science Center
OPUS 16 2018/31/B/NZ9/00781.

[1]IF – Impact Factor of the journal in the year of publication according to Web of Science

[2]IF – five-year Impact Factor of journals from the year of publication of the work according to Web of Science

[3]Number of points for publication according to the Announcement of the Minister of Education and Science on the list of scientific journals and reviewed materials from international conferences of January 5, 2024

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

1. **Grzegorz Kopij**, Marta Kiezun, Kamil Dobrzyn, Ewa Zaobidna, Barbara Zarzecka, Agnieszka Rak, Tadeusz Kaminski, Barbara Kaminska, Nina Smolinska, **2024.** *Visfatin Affects the Transcriptome of Porcine Luteal Cells during Early Pregnancy*. International Journal of Molecular Sciences, 25(4): 2339, doi.org/10.3390/ijms25042339
   (IF[1]=5.6; IF[2]=6.2; MEiN[3]=140)

2. **Grzegorz Kopij**, Marta Kiezun, Marlena Gudelska, Kamil Dobrzyn, Barbara Zarzecka, Edyta Rytelewska, Ewa Zaobidna, Bianka Swiderska, Agata Malinowska, Agnieszka Rak, Tadeusz Kaminski, Nina Smolinska, **2024.** *Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation*. Scientific Reports, 14, 14625, doi.org/10.1038/s41598-024-65577-1
   (IF[1]=4.6; IF[2]=4.9; MEiN[3]=140)

Sumaryczny IF publikacji z roku wydania = 10.2
Sumaryczny Pięcioletni IF = 11.1
Łączna liczba punktów MEiN = 280

[1]IF – wskaźnik wisfatyn (ang. Impact Factor) czasopisma z roku wydania pracy wg Web of Science

[2]IF – pięcioletni wskaźnik cytowani (ang. Impact Factor) czasopism z roku wydania pracy wg 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 05 stycznia 2024 r.

1. WSTĘP

Jajniki są jednymi z najważniejszych narządów endokrynnych w organizmie samicy. Główną funkcją jajników, poza produkcją komórek rozrodczych jest regulacja przebieg cyklu rujowego i utrzymanie ciąży. Podtrzymanie funkcji ciałka żółtego (CL), w szczególności syntezy progesteronu (P_4), w okresie wczesnej ciąży uzależnione jest od obecności zarodków i właściwego przebiegu procesu matczynego rozpoznania ciąży, który u świni domowej przypada na 12-13 dzień ciąży. W tym okresie, pomiędzy błoną śluzową macicy, zarodkiem i jajnikami, dochodzi do wymiany sygnałów molekularnych, które stanowią m.in. P_4, estrogeny, prostaglandyny, cytokiny (interferony i interleukiny) i czynniki wzrostu (Bazer i Johnson, 2014; Kaczynski i in., 2023; Bazer i Thatcher, 1977; Bazer, 2013). Niezaburzony przebieg matczynego rozpoznania ciąży gwarantuje jej utrzymanie i prawidłowy przebieg. Interakcje pomiędzy zarodkami a macicą odpowiadają również za podtrzymanie funkcji CL, w tym nieprzerwaną produkcję P_4, i zapobiegają luteolizie funkcjonalnej i strukturalnej.

Progesteron jest kluczowym hormonem odpowiedzialnym za utrzymanie ciąży, syntezowanym i wydzielanym głównie przez jajniki. Jego synteza i metabolizm uzależnione są od aktywności białka StAR (ang. *steroidogenesis acute regulatory protein*) oraz enzymów szlaku steroidogenezy t.j. cytochromu P450scc odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu (CYP11A1) i dehydrogenazy Δ5-Δ4-izomerazy 3β-hydroksysteroidowej (3β-HSD) (Miller, 1998; Tuckey, 2005). Progesteron odpowiada za zapewnienie prawidłowych warunków panujących w macicy w wyniku m.in. regulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu matki, przebudowy błony śluzowej oraz wspiera zapłodnienie komórki jajowej, jej implantację oraz rozwój zarodka i płodu. Ponadto P_4 zapewnia całkowitą atonię macicy, co jest kluczowym warunkiem dla przebiegu prawidłowej implantacji zarodka i przebiegu ciąży (Miller, 1998).

Obecność zarodków w macicy świni sygnalizowana jest organizmowi matki poprzez wzmożoną syntezę i sekrecję estradiolu-17β (E_2) i estronu przez zarodki pomiędzy 10-13 i 15-30 dniem ciąży (Bazer i Thatcher, 1977; Geisert i in., 1990). Estrogeny wydzielane przez blastocystę, poprzez działanie luteotropowe, bezpośrednio pobudzają sekrecję P_4 stymulując rozwój CL. Ponadto estrogeny wykazują działanie antyluteolityczne zmniejszając uwalnianie i transport prostaglandyny $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) z macicy do jajników (Väänänen i in., 1997; Weems i in., 2006; Waclawik i in., 2009). Podanie estrogenów świniom w 11-15 dniu cyklu rujowego

skutkuje utrzymaniem funkcjonalnego CL przez okres odpowiadający długości ciąży i wystąpieniem symptomów ciąży rzekomej (Bazer, 1992).

Jak wykazano, estrogeny oraz P_4 są regulatorami syntezy i wydzielania innych istotnych dla funkcjonowania układu rozrodczego hormonów – prostaglandyn: E_2 (PGE_2) i $PGF_{2\alpha}$. Profil ekspresji i wydzielania obu prostaglandyn różni się znacząco w zależności od fazy cyklu i wczesnej ciąży. PGE_2 posiada właściwości luteotropowe. Jej najwyższą koncentrację obserwuje się u świń pomiędzy 13 a 16 dniem ciąży (Waclawik i in. 2009). Domaciczne podanie PGE_2 powodowało wzrost koncentracji P_4 zarówno w osoczu krwi i tkance lutealnej. Ponadto stymulacja tą prostaglandyną nie będących w ciąży owiec i krów przyczyniała się do wydłużenia fazy lutealnej i podtrzymania produkcji P_4 (Christenson i in., 1994). Jak wykazano, efekt ten może być wywołany poprzez aktywację szlaku cyklazy adenylanowej/kinazy białkowej A (cAMP) (Waclawik i in., 2009). Kluczowym momentem ustanowienia ciąży jest dzień 15-16, w którym zarodki zaczynają przylegać do endometrium. Jest to okres gwałtownych zmian obejmujących powstanie trwałego połączenia pomiędzy macicą a zarodkami, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu ciąży. Ponadto, dochodzi do szybkiego rozwoju zarodków oraz struktur odpowiedzialnych za wymianę substancji odżywczych pomiędzy nimi a organizmem matki oraz rozwoju łożyska, co zapewnia prawidłowe wsparcie rozwijających się zarodków. Sygnały hormonalne z rozwijających się zarodków wspierają utrzymanie CL, zapewniając odpowiednią produkcję P_4 niezbędną do podtrzymania ciąży. Okres pomiędzy 12-30 dniem ciąży jest też momentem, w którym obserwuję się najwyższy odsetek utraty ciąży w wyniku niedostatecznej wymiany sygnałów molekularnych pomiędzy organizmem matki a zarodkami (Geisert i Schmitt, 2002). Za utratę ciąży może być odpowiedzialna między innymi, wydzielana przez macicę, $PGF_{2\alpha}$ wykazująca działanie luteolityczne. $PGF_{2\alpha}$ powoduje gwałtowne zahamowanie steroidogenezy, spadek koncentracji P_4 w osoczu oraz luteolizę strukturalną (Bazer i Thacher, 1977). Podwyższony poziom $PGF_{2\alpha}$ był obserwowany w późnej fazie lutealnej cyklu rujowego świń (17 dzień), gdy nie doszło do zapłodnienia. Luteoliza CL w okresie wczesnej ciąży prowadzi, do krwawień, zmian martwiczych oraz skurczów macicy prowadzących do spontanicznych poronień i utraty ciąży (Kraeling i in., 1985; Dante i in., 2013). Jak wskazują dane literaturowe, prawidłowy stosunek obu wymienionych prostaglandyn jest istotnym czynnikiem wpływającym na funkcję CL, przepuszczalność naczyń krwionośnych w macicy, a także na implantację i rozwój zarodków (Bazer i Thacher, 1997; Waclawik i in. 2009; Väänänen i in. 1997). Zachwianie tej

równowagi może prowadzić do zahamowania procesu steroidogenezy, a w konsekwencji do zaburzeń syntezy i sekrecji P_4 przez komórki lutealne.

Poza wspomnianymi powyżej hormonami steroidowymi i prostaglandynami istnieje szereg innych biologicznie aktywnych czynników, które docierając do komórek mogą regulować szlaki syntezy i sekrecji hormonów steroidowych, a także szereg innych procesów, których prawidłowy przebieg jest kluczowy dla właściwego funkcjonowania układu rozrodczego w trakcie cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Kompleksowe poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za regulację procesów matczynego rozpoznania ciąży, implantacji zarodków i utrzymania ciąży jest kluczowe w celu poprawy płodności oraz wartości hodowlanej samic.

W czasie poszukiwań regulatorów syntezy i sekrecji hormonów steroidowych oraz procesów rozrodczych uwagę zwrócono na tkankę tłuszczową. Otyłość lub niedowaga mogą silnie korelować z zaburzeniami hormonalnymi i metabolicznymi prowadząc do występowania takich schorzeń jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, awitaminoza, nowotwory czy też zaburzenia płodności. Tkanka tłuszczowa oprócz funkcji magazynującej energię jest również największym narządem endokrynnym wydzielającym wiele różnych hormonów/substancji biologicznie aktywnych odpowiedzialnych za regulację funkcji narządów docelowych. Jedną z grup czynników wytwarzanych przez tkankę tłuszczową są adipokiny, związki uznawane za jedne z ważniejszych regulatorów odżywiania, utrzymania homeostazy energetycznej, angiogenezy czy insulinowrażliwości. Stały się one również kluczowymi biomarkerami w rozwoju schorzeń zespołu metabolicznego takich jak cukrzyca, choroby układu krążenia, czy też stanów zapalnych wywołanych otyłością (Lehr i in. 2012). Wyniki badań na przestrzeni ostatnich lat wskazują, że mogą one wpływać również na procesy rozrodcze.

Wisfatyna (NAMPT), hormon należący do grupy adipokin, została opisana po raz pierwszy u myszy w 2005 roku jako białko wydzielane przez tkankę tłuszczową (Fukuhara i in. 2005). Hormon ten ma masę molekularną wynoszącą 52 kDa i występuje w organizmie w dwóch izoformach: wewnątrz- (iNAMPT) i zewnątrzkomórkowej (eNAMPT). Pierwsza z nich, wewnątrzkomórkowa, odpowiada za przekształcanie nikotynoamidu do mononukletydu nikotynoamidowego w szlaku biosyntezy NAD^+. Forma zewnątrzkomórkowa posiada właściwości insulinomimetyczne i działa jako hormon cytokinowy (Adeghate, 2008). Wisfatyna, podobnie jak inne adipokiny, wykazuje działanie plejotropowe (Dupont i in. 2015; Reverchon i in. 2014). Hormon zaangażowany jest w regulację procesów zapalnych,

apoptotycznych, proliferacyjnych, angiogennych i różnicowania komórek. Wisfatyna uczestniczy również w utrzymaniu homeostazy energetycznej (Adya i in. 2008; Pavlová i in. 2015; Revollo i in. 2007; Stofkova 2010). W układzie rozrodczym jej ekspresję stwierdzono w komórkach otaczających oocyty jak i w samych oocytach, komórkach ziarnistych, osłonki wewnętrznej, stromy, komórkach nabłonkowych jajników, nabłonka owodni oraz komórkach mezenchymalnych zarodka (Ognjanovic i Bryant-Greenwood, 2002; Choi i in. 2012; Reverchon i in. 2013, 2016). Wcześniejsze badania naszego zespołu potwierdziły, że ekspresja genu i białka NAMPT zachodzi w komórkach przysadki, podwzgórza, pęcherzyków jajnikowych i komórkach lutealnych dojrzałych i niedojrzałych płciowo świń. Profile ekspresji zarówno genu, jak i białka zależały od fazy cyklu rujowego lub okresu ciąży (Kaminski i in. 2021; Mlyczynska i in., 2023a, b; Szymanska i in., 2023). Wyniki prowadzonych badań wykazały modulujący wpływ NAMPT na regulację procesów rozrodczych. Stwierdzono, że adipokina ta może zwiększać kompetencje rozwoje oocytów i ich zdolność do zapłodnienia, a także prawdopodobieństwo implantacji i placentacji u myszy i ludzi (Mazaki-Tovi i in. 2009; Choi i in. 2012; Reverchon i in. 2014). Zwiększała ona również syntezę E_2, P_4, jak również zdolności proliferacyjne komórek ziarnistych u ludzi, bydła i myszy (Choi i in., 2012; Reverchon i in. 2013, 2016). Ponadto stymulacja adipokiną może regulować procesy steroidogenezy w jajnikach poprzez regulację ekspresji enzymów m.in. StAR, CYP11A1 i 3βHSD (Reverchon i in. 2013, 2016; Diot i in, 2015; Mlyczynska i in. 2022). Wisfatyna stymulowała sekrecję PGE_2, obniżała $PGF_{2\alpha}$ oraz wpływała na syntezę P_4 poprzez oddziaływanie ze szlakami kinaz MAP i AMP w komórkach lutealnych (Mlyczynska i in. 2022). Stymulujący wpływ NAMPT na wyżej wymienione procesy ulegał zniesieniu po zastosowaniu jej blokera – FK866 (Mlyczynska i in. 2022). Wykazano również, że ekspresja i sekrecja wisfatyny uzależniona jest od statusu hormonalnego zwierząt. Stymulacja ludzkich komórek ziarnistych gonadotropiną kosmówkową (hCG) i PGE_2 powodowała wzrost ekspresji genu NAMPT (Shen i in., 2010). Ponadto wpływ hormonu luteinizującego i insuliny powodował zmiany ekspresji białka NAMPT w komórkach granulozy, osłonki pęcherzyka jajnikowego oraz komórek lutealnych jak również jej koncentracji w mediach pohodowlanych (Mlyczynska i in. 2023a, b). Jak dotąd nie poznano zarówno receptora, jak i mechanizmu działania NAMPT na komórki docelowe. Przypuszcza się, że wisfatyny wywiera wpływ poprzez fosforylację receptora insulinowego, jednak nie konkuruje z insuliną o wiązanie do tego samego centrum aktywnego (Grolla i in., 2016). Jako inne potencjalne receptory dla

NAMPT wyróżnia się receptor chemokin typu 5 (CCR5) (van den Bergh i in., 2012) oraz receptor *toll*-podobny 4 (TLR4) (Camp i in., 2015).

Wyniki powyższych badań wskazują, że wisfatyna może pełnić istotną rolę w regulacji procesów rozrodczych w organizmie samicy. Wciąż jednak nie zostały poznane mechanizmy, poprzez które może ona oddziaływać na komórki jajników w trakcie cyklu rujowego oraz w okresie implantacji. Dlatego też celem niniejszej pracy było określenie wpływu wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutelanych świni w 15-16 dniu ciąży.

2. Hipoteza badawcza, cele i zakres badań

Prawidłowe funkcjonowanie jajników jest kluczowym warunkiem zachowania homeostazy hormonalnej w trakcie całego życia samicy ze szczególnym uwzględnieniem okresu ciąży. W trakcie życia jajniki przechodzą strukturalne przemiany w budowie jak i profilu sekrecji wielu hormonów. Jak wykazano w szeregu badań ekspresja genu oraz sekrecja białka wisfatyny ulega zmianom w trakcie cyklu rujowego i wczesnej ciąży u różnych zwierząt gospodarczych, a także w ciąży i w trakcie cyklu menstruacyjnego u kobiet. Wisfatyna wykazuje regulujący wpływ na syntezę i sekrecję hormonów steroidowych oraz aktywację szlaków sygnałowych w jajnikach. Hipoteza badawcza niniejszej rozprawy doktorskiej zakłada, że wisfatyna wpływa na transkryptom i proteom komórek lutealnych świni domowej może regulować wytwarzanie wielu czynników kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania jajników w okresie implantacji. W celu weryfikacji hipotezy przeprowadzono:

1. analizę profilu transkryptomicznego komórek lutealnych świń wyizolowanych w 15-16 dniu ciąży i poddanych działaniu wisfatyny. W przeprowadzonym doświadczeniu określono poziomy ekspresji genów, zdarzenia alternatywnego składania transkryptów oraz profile ekspresji długich niekodujących RNA z użyciem metody Sekwencjonowania Następnej Generacji (NGS, RNA-Seq);

2. określono wpływ wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych świń wyizolowanych w 15-16 dniu ciąży i poddanych działaniu wisfatyny. Profil proteomiczny określony został z wykorzystaniem Chromatografii Cieczowej Sprzężonej z Tandemową Spektrometrią Mas (LC-MS/MS).

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia zostały przeprowadzone na komórkach lutealnych wyizolowanych z jajników pięciu loszek w wieku 7-8 miesięcy o masie 130-150 kg będących w 15-16 dniu ciąży. Zwierzęta były obserwowane codziennie w celu określenia pierwszego dnia cyklu rujowego. Krycie następowało naturalnie w 1-2 dniu cyklu rujowego. Dzień po inseminacji określono jako pierwszy dzień ciąży. Jajniki zostały pobrane poubojowo i przetransportowane do laboratorium w sterylnym roztworze soli fizjologicznej buforowanym fosforanem (PBS). Ciąża została potwierdzona poprzez obecność zarodków w rogach macicy oraz ich ocenę morfologiczną. Zgodnie z polską (Dziennik Ustaw, 2015, ust. 266) i europejską (Dyrektywa 2010/63/EU) ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, do przeprowadzenia doświadczenia nie była wymagana zgoda komisji etycznej.

3.2. Hodowle *in vitro* komórek lutealnych świni

Hodowle komórkowe przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Rytelewską i in (2021) ze zmianami. W celu wyizolowania komórek lutealnych, ciałka żółte zostały poddane trawieniu enzymatycznemu (4-6 razy) przy użyciu 0,1% roztworu kolagenazy typu V zawieszonej w zrównoważonym roztworze soli Hanksa (HBSS) (Sigma Aldrich, USA). Zawiesina wyizolowanych komórek została odwirowana (300×g, 10 min., 37°C). W celu oczyszczenia komórki płukano w medium F-12 a następnie ponownie wirowano. Procedurę powtarzano trzykrotnie. W celu usunięcia agregatów komórek oraz resztek niestrawionej tkanki zawiesinę filtrowano przez sterylne, nylonowe sito (70 μm; Greiner, Austria). Komórki liczono oraz określono ich żywotność poprzez barwienie przyżyciowe błękitem trypanu (Sigma Aldrich, USA). Żywotność komórek lutealnych po izolacji wynosiła 96,76% ± 1,3%. Uzyskane komórki lutealne zostały rozcieńczone do koncentracji 2×10^6/2ml w sterylnym medium F-12 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (Sigma Aldrich, USA), 0,1% surowiczej albuminy bydlęcej (BSA) (MP Biomedical, USA) i mieszaniny antybiotyków (1% antibiotic-antimykotic soulution; Sigma Aldrich, USA). Komórki poddano 48-godzinnej preinkubacji w inkubatorze o podwyższonej wilgotności (37°C; 95% powietrza, 5% CO_2). Po okresie preinkubacji medium zastąpiono świeżym, a komórki inkubowano w obecności wisfatyny w

stężeniu 100 ng/ml (nr kat. 8424-VF, R&D Systems, USA) przez kolejne 24 godziny. Dawka została wybrana na podstawie Reverchon i in. (2016). Grupę kontrolną stanowiły komórki inkubowane w czystym medium bez dodatku czynnika. Żywotność komórek po hodowli oraz potencjalną toksyczność czynnika badanego określono przy użyciu testu AlamarBlue™ (Thermo Fisher Scientific, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Średnia redukcja AlamarBlue™ w hodowli komórek traktowanych wisfatyną wynosiła 107.93 ± 2.91%, w porównaniu do grupy kontrolnej. Wynik potwierdził, że zarówno warunki hodowli, jak i czynnik badany nie wpływają negatywnie na żywotność hodowanych komórek.

3.3. Określenie wpływu wisfatyny na profil transkryptomiczny komórek lutelnych

3.3.1. Izolacja RNA

Po zakończonej hodowli medium usunięto, a z komórek lutealnych (n=5 dla obu grup) wyizolowano całkowite RNA przy użyciu odczynnika Extrazol (BLIRT, Polska), zgodnie z instrukcją producenta. Czystość i koncentracja otrzymanego RNA zostały zmierzone spektrometrycznie przy długości fali 260 do 280 nm z wykorzystaniem czytnika Infinite M200 Pro (Tecan, Szwajcaria). Do dalszych analiz wykorzystano tylko próby, w których stosunek A260/280 przekraczał wartość 1,8. Dla prób spełniających ten warunek określono integralność RNA (ang. *RNA integrity number*, RIN) przy użyciu Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technology, USA). Tylko próby o RIN > 8 zostały wykorzystane do sekwencjonowania RNA-Seq oraz walidacji otrzymanych wyników z użyciem łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) oraz odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR).

3.3.2. Konstruowanie bibliotek, sekwencjonowanie RNA i kontrola jakości odczytów

Zgodnie z procedurą zestawu Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (Illumina, USA) z prób usunięto rybosomalne RNA (rRNA). Pozostałe RNA zostało pofragmentowane, a następnie, przy użyciu TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, USA), pofragmentowane RNA zostało przepisane na cDNA z użyciem oligonukleotydów poly(dT). Otrzymane dwuniciowe fragmenty cDNA poddano procesom naprawy końców (ang. *A-tailing*) oraz przyłączania adapterów. Tak przygotowane sekwencje posłużyły do amplifikacji bibliotek

cDNA metodą PCR. Kontrolę ilościową i jakościową sekwencjonowania przeprowadzono za pomocą Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chip. Sekwencjonowanie transkryptomu komórek lutelanych świni przeprowadzono z użyciem platformy Illumina's NovaSeq 6000 (Illumina, USA). W rezultacie wygenerowano sparowane odczyty długości 2×150 nt z minimalną głębokością odczytu 40 mln par zasad na próbę. Za pomocą programu Cutadapt (wersja 1.9) (MARTIN 2011) usunięto odczyty zawierające reszty adapterów oraz sekwencje o niskim współczynniku jakości odczytu (QPhred score ≤ 20; odczyty zawierające więcej niż 5% nierozpoznanych nukleotydów). W rezultacie otrzymano odczyty sekwencji o wysokiej jakości poddanych ocenie za pomocą programu FastQC (wersja 0.11.9) (ANDREWS 2010). Następnie odczyty zmapowano do referencyjnego genomu świni domowej (Sscrofa 11.1 wersja 96) przy użyciu oprogramowania HISAT2 (wersja 2.0.4.) (Kim i in. 2015). Za pomocą programu StringTie (wersja 1.3.4d) (Pertea i in. 2015) wyniki RNA-Seq dopasowano do potencjalnych aktywnych miejsc transkrypcyjnych (ang. *transcript active regions*, TARs) oraz określono ich liczbę. Następnie, przy użyciu oprogramowania gffcompare (wersja 0.9.8) (Pertea i in. 2015), zrekonstruowano kompleksowy transkryptom dla wszystkich analizowanych prób.

3.3.3. Analiza różnicowa i funkcjonalna genów o zmienionej ekspresji

Oprogramowanie DESeq2 (wersja 1.34.0) (Love i in. 2014) i edgerR (Robinson i in. 2010) posłużyło do porównania poziomów ekspresji genów oraz długich niekodujących RNA pomiędzy grupami i próbami. Jako próg odcięcia przyjęto wartości logarytmu o podstawie 2 z bezwzględną krotnością zmian (ang. *fold change*; FC) i progu istotności $p<0,05$ ($\log_2(FC) \geq |0,56|$; $p<0,05$). Analizy funkcjonalne dla genów o zmienionej ekspresji wykonano przy użyciu programu g:Profiler, którego funkcje oparte zostały na bazach danych Gene Ontology (GO) oraz Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Ashburner i in. 2000; Reimand i in. 2016; Kanehisa i in. 2017). Jako istotnie wzbogacone procesy i szlaki uznano te, których skorygowana wartość wynosiła $p < 0,05$.

3.3.4. Identyfikacja długich niekodujących RNA, przewidywanych genów docelowych oraz analiza funkcjonalna

W celu identyfikacji długich niekodujących RNA (lncRNA) z uzyskanych transkryptów usunięto sekwencje pokrywające się ze znanymi sekwencjami mRNA, znane lncRNA oraz fragmenty krótsze niż 200 par zasad. Następnie, przy użyciu oprogramowania Coding Potencial Calculator (wersja 0.9-r2; CPC) (Kang i in. 2017) oraz Coding-Non-Coding Index (wersja 2.0; CNCI) (Sun i in, 2013) wykluczono transkrypty wykazujące właściwości kodujące białka oraz ulegające transkrypcji. Transkrypty o paramaterach CPC < 0,5 i CNCI < 0 opisano jako lncRNA. W celu identyfikacji lncRNA o zmienionej pod wpływem wisfatyny ekspresji wykorzystano oprogramowanie StringTie i HISAT2, a następnie porównano otrzymane sekwencje z sekwencją genomu referencyjnego przy użyciu pakietu gffcompare (Kim i in., 2015; Pertea i in., 2015; Yates i in., 2020). Transkrypty niewykazujące pokrycia lub nakładające się na znane sekwencje genów przyporządkowane zostały do kategorii „novel lncRNA". Następnie określono potencjalne funkcjonalne działanie lncRNA poprzez oddziaływanie *cis* i *trans* pomiędzy lncRNA a sąsiadujących z nimi genami (ang. *target genes*). Analizy GO i KEGG wykonano dla odpowiadających lncRNA genów sąsiadujących. W celu identyfikacji lncRNA o zróżnicowanej ekspresji (and. *differantialy expressed long non-coding RNA;* DELs) pomiędzy grupą kontrolną a traktowaną wisfatyną wykorzystano program DESeq2. Jako istotne uznano DELs o wartości $p < 0,05$.

3.3.5. Analiza zdarzeń alternatywnego składania transkryptów

Analizę zdarzeń alternatywnego składania transkryptów pod wpływem wisfatyny przeprowadzono przy użyciu oprogramowania rMATS (wersja 4.1.1.) (Shen i in., 2014). Sekwencje o długości 120 par zasad zostały wykorzystane do oszacowania odsetka włączania alternatywnego wariantu transkryptu (ang. *percentage of splicing inclusion*, PSI) do podstawowego transkryptu genu. Za zmiany istotne uznano te, dla których oczekiwana proporcja błędów I rodzaju (ang. *false discovered ratio*, FDR) była mniejsza niż 0,05, a bezwzględna wartość PSI($|\Delta PSI|$) była większa niż 0,1. Zidentyfikowane, istotne statystycznie zdarzenia alternatywnego składania wariantów transkryptu zostały przyporządkowane do jednej z pięciu kategorii: alternatywne miejsce akceptorowe (A3SS), alternatywne miejsce

donorowe (A5SS), wzajemnie wykluczające się eksony (MXE), retencja intronu (RI), lub pominięcie eksonu (SE).

3.3.6. Walidacja wybranych genów oraz długich niekodujących RNA o zmienionej pod wpływem wisfatyny ekspresji metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Wyniki otrzymane podczas analizy RNA-Seq zostały zweryfikowane z użyciem metody qPCR, przy użyciu AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, USA). Procedurę walidacji przeprowadzono dla ośmiu wybranych genów oraz dwóch lncRNA o istotnie zmienionej ekspresji (n=5 dla obu grup). Mieszanina reakcyjna, w końcowej objętości 20 µl, zawierała 12.5 µl Sensitive RT HS-PCR Mix SYBR (A&A Biotechnology, Polska), barwnik referencyjny ROX (0.24 µl), startery sensowny i antysensowny oraz wodę wolną od RNAz. Sekwencje starterów oraz warunki reakcji zostały przedstawione w tabeli (publikacja 1, Tabela uzupełniająca S6). Matrycę do reakcji stanowiło RNA pochodzące z prób, które zostały wykorzystane do analiz RNA-Seq. Wszystkie reakcje przeprowadzono w duplikatach. Jako geny referencyjne wykorzystano geny dehydrogenazy 3-fosfogliceroaldehydu *(GAPDH)* oraz aktyny (*ACTB)*. W celu wykluczenia amplifikacji produktów niespecyficznych przeprowadzono reakcje dla kontroli negatywnych, gdzie matryca została zastąpiona wodą wolną od RNaz (ang. *no template control*, NTC). Specyficzność produktów otrzymanych w reakcji potwierdzono wykreślając krzywą topnienia oraz rozdzielając produkty qPCR w żelu agarozowym i potwierdzając oczekiwaną masę molekularną produktu. Względną ekspresję badanych DEGs i DELs przeprowadzono metodą komparatywną (ΔΔCT) (Livak i Schmittgen, 2001). Średnia geometryczna obu genów referencyjnych posłużyła do normalizacji wyników ekspresji badanych genów.

3.3.7. Walidacja zdarzeń alternatywnego składania transkryptów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Wyniki otrzymane w trakcie analizy zdarzeń alternatywnego składania transkryptów zostały potwierdzone z zastosowaniem metody PCR dla sześciu wybranych genów

spełniających kryteria zmienności zdarzeń alternatywnego spliecingu (DASs). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu zestawu StartWarm HS-PCR Mix (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) i urządzenia Labcycler 48 s (Syngen Biotech, Wrocław, Polska). W skład mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 25 µL wchodziło: 12.5 µL of Hot Start PCR Mix, 400 nM każdego ze starterów (sensownego i antysensownego), 15 ng cDNA oraz woda wolna od RNA-az. W celu wykluczenia amplifikacji produktów niespecyficznych przeprowadzono reakcje dla kontroli negatywnych, gdzie matryca została zastąpiona wodą wolną od RNaz (ang. *no template control*, NTC). Sekwencje starterów oraz warunki reakcji zostały przedstawione w tabeli (publikacja 1, Tabela uzupełniająca S6). Końcowe produkty reakcji rozdzielono w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Niemcy).

3.4. Określenie wpływu wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych

3.4.1. Izolacja białka

Izolację białka z komórek lutealnych (n=4 dla obu grup) przeprowadzono przy użyciu buforu litycznego składającego się z 30 mM Tris-HCL (pH 8), 8 M mocznika i 2% roztworu CHAPS. Komórki inkubowano z buforem litycznym w 4˚C przez 45 minut. Próby intensywnie wytrząsano co 15 minut. Następnie próby odwirowano (10 000 × g, 5 minut, 4°C). Koncentrację białka oznaczono z wykorzystaniem metody Bradford. Próby przechowywano w -80°C do czasu wykonania dalszych analiz.

3.4.2. Trawienie białek

Analizę proteomiczną wykonano w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Próby poddano trawieniu zgodnie z protokołem Filtred-Aided Sample Preparation (FASP) (Wiśniewski, 2019) z modyfikacjami. W celu zredukowania mostków cysteinowych, 150 µg białka inkubowano w 20 mM roztworze tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP; 1 godzina w 60°C). Następnie za pomocą filtra Vivacon (Sartorius Stedim Biotech, Niemcy) usunięto białka o masie molekularnej 30 kDa. Próby wirowano (14 000 × g, 20 minut,) i przemywano roztworem mocznika. Następnie próby inkubowano w 50 nM roztworze s-metanotiosulfonianu metylu (MMTS) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane próby zostały poddane

oczyszczeniu poprzez trzykrotne przepłukanie roztworem 8 M mocznika w 100 mM TEAB. Trawienie obejmowało całonocną inkubację prób przy użyciu 5 µg trypsyny (Promega, Niemcy) w 37°C. Po inkubacji białka wypłukano z filtrów poprzez dwukrotne przepłukanie buforem 100 nM TEAB i jednokrotnym przepłukaniem roztworu 500 nM NaCl. Koncentrację białek oszacowano z użyciem zestawu Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo Fisher Scientific, USA). Następnie 30 µg białka z każdej próby poddano znakowaniu z użyciem odczynnika TMTpro 16plex (Thermo Fisher Scientific) zawieszonego w 50 µL acetonitrylu (ACN). Standard wewnętrzny przygotowano poprzez wymieszanie w równych proporcjach koncentratu białek z każdej próby. Reakcję znakowania zatrzymano poprzez dodanie 8 µL 5% roztworu hydroksyloaminy, a następnie określono stopień wyznakowania. Białka odsalano przy użyciu kolumn 30 mg Oasis HLB (Waters, USA). Kolumny zostały aktywowane w 1 mL metanolu a następnie przemyte 1.5% ACN i 0.1% kwasem mrówkowym (FA). Na kolumny naniesiono próby, przemyto w 90% ACN i 0.1% FA, osuszono i zawieszono w roztworze 2% ACN w 10 nM wodorotlenku amonu.

3.4.3. Frakcjonowanie białek metodą chromatografii cieczowej w odwróconej fazie w wysokim pH

Frakcjonowanie białek znakowanych TMT wykonano przy użyciu chromatografii cieczowej w odwróconej fazie w wysokim pH na kolumnach XBrigdge Peptide BEH C18 (4.6 × 250 mm, 130 Å, 5 µm, Waters, USA). Rozdział frakcji przeprowadzono z wykorzystaniem systemu Waters Acquity UPLC H-class przez 100 minut i prędkości przepływu 0.8 ml/min. Fazy rozdziału stanowiły woda (A), ACN (B) i 100 mM roztwór AH (C). Stężenie roztworu C podczas całej procedury frakcjonowania stanowiło 10%. Frakcje zbierano co minutę licząc od czwartej minuty od rozpoczęcia procedury. Gradient rozpuszczalnika B zmieniał się następująco: 5-8% przez 3 minuty, 8-15% przez 8 minut, 15-25% przez 35 minut, 25-33% przez 15 minut, 33-50% przez 16 minut, 50-90% przez 8 minut. Frakcjonowanie wstrzymano (wstrzymanie izokratyczne) w 90% roztworze B przez 4 minuty, a następnie kolumny stabilizowano przez 2 minuty w 2% roztworze B. Frakcje osuszono i zrekonstruowano w roztworze Evosep (Evosep Biosystem, Dania) poprzez mieszanie i sonifikację.

3.4.4. Analiza spektrometrii mas

Uzyskane frakcje analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas przy użyciu systemu Evosep One (Evosep Biosysytem, Dania) bezpośrednio połączonego ze spektrometrem mas Orbitrap exploris 480 (Thermo Fisher, Niemcy). Każdą frakcję o objętości 20 µL naniesiono na kolumnę Evotips C18 (Evosep Biosystem, Dania) zgodnie z opisem (Nynca i in., 2023). Rozdział chromatograficzny prowadzono przez 44 minuty przy prędkości przepływu 500 nl/min w kolumnach gradientowych EV1106 (Dr Maisch C18 AQ, kulki 1.9 µm, 150 µm ID, długość 15 cm, Evosep Biosystems, Dania). Odczyty zebrano w trybie akwizycji zależnej od danych. Rozdzielczość MS1 została ustalona na 60 000 z automatycznym czasem zbierania jonów w zakresie 300-1 700 m/z (stosunek masy do ładunku) i normalizacji 300% dla automatycznej kontroli wzmocnienia (AGC) (*ang. automated gain control)*. Rozdzielczość MS2 została ustalona na 30 000 przy standardowej znormalizowanej wartości docelowej AGC, automatycznym maksymalnym czasie zbierania jonów i 25 najlepszych prekursorach w oknie izolacji wynoszącym 1,2 m/z branych pod uwagę w analizie MS/MS. Wykluczenie dynamiczne ustawiono na 20 s z dopuszczalną tolerancją masy ± 10 ppm, progiem intensywności prekursora na poziomie 5^{e3} i progiem dopasowania prekursora na poziomie 70%. Prekursory fragmentowano przy znormalizowanej energii zderzenia wynoszącej 30%. Napięcie rozpylania zdefiniowano na 2,1 kV, poziom lejka RF na 40, a temperaturę podgrzewanej kapilary na 275°C.

3.4.5. Analiza danych

Analizę uzyskanych danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MaxQuant/Andromeda (wersja 2.0.1.0) (Tyanova i in., 2016A) i bazy Uniprot (wersja 2022_02) dla wszystkich zdeponowanych białek *Sus scrofa*. Podczas analizy uwzględniono przypuszczalne zmiany w strukturze białka wywołane przez enzym wykorzystany do trawienia (trypsyna) oraz potencjalne modyfikacje polegające na stałej metylotionylacji cystein (Mehylthio) i zmiennym utlenianiu metioniny (Oxidation). Analizę ilościową przeprowadzono na podstawie odczytów jonów reporterowych. Współczynnik korekcji dla TMTpro 16plex ustalono według zaleceń producenta. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu

odwróconej bazy danych z punktem FDR ustalonym na poziomie niższym niż 0,01. Przy użyciu oprogramowania Perseus (wersja 1.6.15) (Tyanova i in. 2016) usunięto wyniki pokrywające się z odwróconą bazą danych oraz białka zidentyfikowane tylko częściowo lub zanieczyszczone. Wartości reporterowe dla izobarycznych znaczników masy (ang. *tandem mass tag*, TMT) znormalizowano a następnie wartości te zostały przekształcone logarytmicznie (log_2). Białka z odczytami mniejszymi niż trzy na próbę w jednym powtórzeniu biologicznym zostały zastąpione wartościami z rozkładu normalnego (szerokość rozkładu 0,3 i przesunięcie 1,8). Następnie sygnały reporterowe zostały znormalizowane metodą *internal refernce scaling* (IRS) (Plubell i in., 2017). Próg istotności statystycznej ustalono dla $p < 0,05$ i $FC \geq 1,1$.

3.4.6. Analiza funkcjonalna

Analiza funkcjonalna białek wykazujących zmienioną ekspresję (ang. *differntially regulated proteins,* DRPs) po wpływem wisfatyny została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania String (wersja 11.5) wykorzystującego bazy danych GO i KEGG (Szklarczyk i in., 2019, 2023). Za istotne uznano wyniki dla normalizowanej wartości $p < 0,05$ (p-adjusted $< 0,05$).

3.4.7. Walidacja wybranych białek o zmienionej ekspresji metodą Western Blot

Weryfikację wyników otrzymanych w analizie LC-MS/MS przeprowadzono przy użyciu metody Western Blot dla pięciu wybranych białek wykazujących zmiany w ekspresji pod wpływem wisfatyny: *dezintegryna i metaloproteinaza z motywem trombospondyny typu 1* (ADAMTS1), *14α-demetylaza sterolowa* (CYP51A1), *inhibina β-A* (INHBA), *notch receptor 3* (NOTCH3), oraz syntaza *prostaglandyny E_2* (mPGES2). Komórki lutealne, z których wyizolowano białka do weryfikacji metodą Western Blot, pochodziły z tych samych hodowli, które zostały przeprowadzone w celu uzyskania materiału do analiz LC-MS/MS (n=4). Białko wyizolowano przy użyciu T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich, USA). Lizaty oczyszczono poprzez wirownie (10000×g, 5 min, 4°C). Procedurę analizy Western Blot przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez (Smolinska i in., 2019) z modyfikacjami. Do analizy wykorzystano 20 µg białka. Próby poddano rozdziałowi elektroforetycznemu SDS-PAGE w żelu poliakrylamidowym (12.5% dla ADAMTS1, CYP51A1, INHBA, mPGES2, oraz 10% dla

NOTCH3) z wykorzystaniem zestawu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Rozdzielone białka przeniesiono na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) (Roche Diagnostic, Niemcy) metodą transferu półsuchego (semi-dry). W celu uniknięcia niespecyficznych wiązań membrany blokowano w 5% roztworze BSA w buforze TBST. Następnie membrany inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi: ADAMTS1 (1:250, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, #720329); CYP51A1 (1:250, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, #PA5-59516); INHBA (1:250; Thermo Fisher Scientific, Bioss, #BS-1774R), NOTCH3 (1:250, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, #PA5-89283) oraz PTGES2 (1:250; FineTest, Wuhan, Chiny, FNab06917). Jako białko referencyjne wykorzystano *TATA-binding protein* (TBP, 1:5000; Lifespan Biosciences, LS-C358352). Po inkubacji membrany płukano w buforze TBST. Następnie membrany inkubowano przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej z dodatkiem drugorzędowych przeciwciał kozich skierowanych przeciw antygenom króliczym (AP156P; Merck Millipore, USA) skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1:5000 dla wszystkich analizowanych białek). Wizualizację immunokompleksów przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, USA) i aparatu Azure 280 Imaging System (Azure Biosystems, USA).

3.4.8. Analiza statystyczna

Analizę gęstości optycznej przeprowadzono z użyciem oprogramowania Image Studio Lite v.5.2 (LI-CORE, USA). Analizę statystyczną pomiarów wykonano z użyciem programu Statistica (Statsoft Inc., USA) wykorzystując test t-Studenta. Dane zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne z wartością błędu standardowego średniej (S.E.M.) dla czterech niezależnych pomiarów (n=4). Jako istotne przyjęto wartości $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Analiza wpływu wisfatyny na transkryptom komórek lutealnych

4.1.1. Wyniki sekwencjonowania następnej generacji

Wyniki sekwencjonowania zostały zdeponowane w bazie danych European Nucleotide Archive (https://www.ebi.ac.uk/ena) pod numerem dostępowym PRJEB61451. Całkowita liczba odczytów uzyskanych podczas sekwencjonowania dla grup kontrolnych (n=5) i poddanych działaniu wisfatyny (n=5) wyniosła 579 987 746 (średnio 57,99 mln odczytów na próbę). Liczba odczytów przypisanych do genomu referencyjnego *Sus scrofa* (wersja 11.1.96) wyniosła 474 172 478. Uśredniony rozkład procentowy odczytów dla prób przedstawiał się następująco: 43,81% odczytów przypisano do regionów kodujących, 19,38% odczytów znajdowało się regionach niepodlegających translacji a 31,86% w sekwencjach intronowych. 4,95% odczytów przyporządkowano do obszarów międzygenowych (publikacja 1, tabela uzupełniająca S1).

4.1.2. Wpływ wisfatyny na ekspresję genów i analiza funkcjonalna

Analiza zmian w transkryptomie komórek lutealnych wykazała 189 TARs o ekspresji zmienionej pod wpływem wisfatyny, z czego 170 zidentyfikowano jako DEGs. Wśród nich 71 genów wykazało obniżoną, a 99 podwyższoną ekspresję w obecności adipokiny. Wyniki zostały przedstawione na rycinie 1A w publikacji 1. Wartości $\log_2$FC dla wszystkich zidentyfikowanych DEGs wahały się od −11.48 (*ENSSSCG00000012470*) do 11.92 (*ENSSSCG00000039280*) (publikacja 1, tabela uzupełniająca S2).

Analiza funkcjonalna GO pozwoliła na przypisanie 135 DEGs do 45 procesów w trzech głównych kategoriach: 14 procesów przyporządkowano do kategorii „komponenty komórkowe” (CC), 12 do kategorii „funkcje molekularne” (MF), natomiast 19 procesów przypisano do kategorii „procesy biologiczne” (BP) (publikacja 1, rycina 2A i B). W kategorii CC najwięcej DEGs zostało przypisanych do podkategorii: „składnik komórkowy” (GO:0005575; 110 DEGs), „komórkowa jednostka anatomiczna” (GO:0098590; 108 DEGs), „błona” (GO:0016020; 68 DEGs), „obwód komórkowy” (GO0071944; 47 DEGs), oraz „błona plazmatyczna” (GO:0005886; 40 DEGs), co podkreśla istotny wpływ wisfatyny na organizację

struktur komórkowych. W kategorii MF największa ilość DEGs została przypisana do takich funkcji jak: „aktywność transportera” (GO:0005215; 19 DEGs), „aktywność transportera międzybłonowego” (GO:0022857; 17 DEGs), „aktywność jednoatomowego transportera międzybłonowego” (GO:0015075; 13 DEGs) oraz „aktywność międzybłonowego transportera cząsteczek nieorganicznych” (GO:0051032; 11 DEGs). Na podstawie adnotacji, można przypuszczać, że wisfatyna odgrywa ważną rolę zarówno w komunikacji wewnątrz- jak i międzykomórkowej. W kategorii BP największa liczba DEGs została przyporządkowana do podkategorii „procesy komórkowe” (GO:0009987; 92 DEGs), „regulacja biologiczna” (GO:0065007; 69 DEGs), „regulacja procesów biologicznych” (GO:0050789; 65 DEGs), „regulacja procesów komórkowych” (GO:0050794; 62 DEGs), oraz „procesy organizmu wielokomórkowego” (GO:0032501; 49 DEGs). Opisane procesy świadczą o tym, że wisfatyna może pełnić ważną rolę w regulowaniu złożonych procesów biologicznych na wielu płaszczyznach. Wizualizacja wybranych procesów wzbogaconych przez DEGs została przestawiona na rycinie 3 w publikacji 1. Podczas analizy wzbogacenia szlaków komórkowych przez zidentyfikowane DEGs zidentyfikowano siedem genów przypisanych do szlaku „neuroaktywne oddziaływanie ligand-receptor” (publikacja 1, tabela uzupełniająca S3), których ekspresja uległa zmianie pod wpływem wisfatyny (publikacja 1, rycina 4).

4.1.3. Wpływ wisfatyny na ekspresję długich niekodujących RNA i analiza funkcjonalna

W doświadczeniu zidentyfikowano 767 lncRNAs, z których 40 wykazywało zróżnicowaną ekspresję pod wpływem wisfatyny. Wśród 40 zidentyfikowanych DELs, 3 transkrypty zostały opisane jako „znane”, natomiast 37 jako „nowe”, których sekwencje nie zostały wcześniej zdeponowane w żadnych bazach danych. Spośród zidentyfikowanych DELs, 23 wykazywało wzrost, natomiast 17 obniżenie ekspresji pod wpływem wisfatyny. Wartości $\log_2$FC dla zidentyfikowanych DELs wahały się od −22.21 (*MSTRG.10127.1*) to 23.72 (*MSTRG.579.3*) (publikacja 1, tabela uzupełniająca S4). Podczas analizy nie wykazano statystycznie istotnych interakcji DEGs - DELs. Dalsza analiza została przeprowadzona tylko dla istotnych interakcji pomiędzy DELs a ich genami docelowymi (ang. *target genes*).

Zidentyfikowano 68 interakcji typu *cis* (działające na ekspresję genów na tym samym allelu chromosomowym) pomiędzy DELs a ich genami docelowymi. Analiza bioinformatyczna nie wykazała interakcji *trans.* Zidentyfikowane kategorie GO, które zostały wzbogacone przez ujawnione DELs zostały przedstawione w publikacji 1 na rycinie 5A. Analiza funkcjonalna

wykazała, że DELs, wykazujące cis-interakcje z ujawnionymi genami docelowymi wzbogaciły 31 procesów GO, w trzech kategoriach: BP, CC i MF (publikacja 1, rycina 5 B). Analiza z użyciem bazy KEGG wykazała wzbogacenie siedmiu szlaków funkcjonalnych, spośród których tylko jeden spełnił warunki istotności statystycznej: ($p > 0,05$): „naprawa przez wycinanie zasady" (map03410). Do walidacji wybrano dwa niezidentyfikowane DELs *MSTRG.515.2* dla którego genem docelowym był *binding epidermal growth factor domains 1* (*CCBE1*) oraz *MSTRG.10127.1* z genem docelowym *cyclin B1 interacting protein 1* (*CCNB1IP1*), które mogą być potencjalnie zaangażowane w regulację cyklu komórkowego i procesów angiogenezy oraz formowanie blastocysty.

4.1.4. Analiza wpływu wisfatyny na zdarzenia alternatywnego składania transkryptów

W doświadczeniu zidentyfikowano łącznie 37 460 zdarzeń alternatywnego składania transkryptów, spośród których 168 wykazywało istotną statystycznie zmianę frekwencji w obecności wisfatyny (publikacja 1, tabela uzupełniająca S5). Ujawnione DASs zostały przyporządkowane do jednej z pięciu kategorii: A3SS – 17 zdarzeń, A5SS – 8 zdarzeń, MXE – 13 zdarzeń, RI – 21 zdarzeń oraz SE – 109 zdarzeń (publikacja 1, rycina 6). Do walidacji zostały wybrane geny *F-Box protein 15* (*FBXO15*); *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class N* (*PIGN*); *peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase* (*PAM*); *cleavage and polyadenylation-specific factor 7* (*CPSF7*); *cell division cycle 45* (*CDC45*); oraz *reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs* (*RECK*).

4.1.5. Walidacja wyników uzyskanych metodą RNA-Seq

W celu potwierdzenia prawidłowości i dokładności metody wysokoprzepustowej przeprowadzono eksperymenty walidacyjne. Prawidłowość analiz DEGs i DEL dla ośmiu wybranych DEGs (*interleukin 17C - IL17C*; *chemokine-like receptor 1 - CMKLR1*; *cyclin A1 - CCNA1*, *occludin – OCLN*, *hypocretin receptor 1 - HCRTR1*, *cytochrome P450 family 2 subfamily C member 49 - CYP2C49*, *neuromedin U receptor 2 - NMUR2*, oraz *insulin receptor substrate 4 - IRS4*), oraz dwóch wybranych DELs (*MSTRG.515.2* i *MSTRG.10127.1*) i odpowiadających im genów docelowych (*CCBE1* i *CCNB1IP1*) potwierdzono z użyciem metody qPCR. Prawidłowość analizy DASs dla sześciu wybranych DASs (*FBXO15*, *PIGN*, *PAM*, *CPSF7*, *CDC45* i *RECK*) potwierdzono metodą RT-PCR.

Na podstawie wyników uzyskanych metodą qPCR, w grupie komórek poddanych działaniu wisfatyny stwierdzono podwyższoną ekspresję genów *IL17C*, *CMKLR1*, *CCNA1*, oraz *MSTRG.515.2* oraz obniżenie ekspresji w przypadku genów *OCLN*, *HCRTR1*, *CYP2C49, NMUR*, *IRS4* oraz *MSTRG.10127.1*. Uzyskane wyniki odpowiadały profilom ekspresji obserwowanym w analizie wysokoprzepustowej. Analiza wyników RT-PCR potwierdziła wyniki analizy DASs. W grupie komórek lutealnych traktowanych wisfatyną stwierdzono częstsze występowanie zdarzeń alternatywnego składania transkryptów dla genów *RECK*, *FBXO15* i *PAM*, natomiast dla genów *CDC45*, *PIGN* i *CPSF7* zdarzenia te zachodziły częściej w grupie kontrolnej.

4.2. Analiza wpływu wisfatyny na profil proteomiczny komórek lutealnych

4.2.1. Wpływ wisfatyny na ekspresję białek i analiza funkcjonalna

Surowe, nieobrobione wyniki uzyskane w trakcie analizy LC-MS/MS zostały zdeponowane w bazie ProteomeXchange Consortium via the PRIDE pod numerami dostępowymi PXD047445 i 10.6019/PXD047445. Analiza wykazała obecność 511 białek o ekspresji zmienionej pod wpływem wisfatyny (DRPs) (publikacja 2, tabela uzupełniająca S2). Wśród zidentyfikowanych białek wykazano 276 białek o ekspresji zwiększonej, natomiast 235 o ekspresji obniżonej pod wpływem wisfatyny. Wartości FC dla istotnych DRPs wahały się od -2.07 (MSANTD3) do 2.59 (ANKRD17). Powyższe wyniki zostały przedstawione w formie graficznej na rycinie 1 w publikacji 2.

Analizę funkcjonalną dla 511 ujawnionych DRPs przeprowadzono z użyciem oprogramowania String, co pozwoliło przyporządkąwać je do 162 procesów zgrupowanych w jednej z trzech następujących kategorii ontologicznych: BP – 86 procesów, CC – 65 procesów, MF – 11 procesów (publikacja 2, rycina 2).

W kategorii BP najwięcej DRPs przypisano do następujących procesów: „procesy komórkowe” (GO:0009987; 361 DRPs), „procesy metaboliczne” (GO:0008152; 227 DRPs), „procesy metaboliczne substancji organicznych” (GO:0071704; 210 DRPs), „postawowe procesy meatobliczne” (GO:0044238; 200 DRPs), „komórkowe procesy meatboliczne” (GO:0044237; 194 DRPs), „procesy metaboliczne związków azotowych” (GO:0006807; 178 DRPs), oraz „procesy metaboliczne makrocząsteczek” (GO:0043170; 160 DRPs). Do najciekawszych procesów wzbogaconych przez DRPs w kategorii BP należą: „procesy

biosyntezy lipidów" (GO:0008610; 14 DRPs), „procesy metabolizmu kwasów tłuszczowych" (GO:0006631; 11 DRPs), oraz „proces metabolizmu prostaglandyn" (GO:0006693; 4 DRPs). 14 DRPs przypisano do podkategorii „procesy regulacji apoptozy" (GO:0042981). Podczas analizy DRPs zostały przypisane do kategorii „pozytywna regulacja procesów rozrodczych" (GO:2000243; 4 DRPs) i „rozwój pęcherzyków jajnikowych" (GO:0001541; 2 DRPs). Ponadto, 19 DRPs wzbogaciło terminy „regulacja procesów rozwojowych" (GO:0050793; 19 DRPs) z czego 7, 5 i 3 DRPs przypisane zostały do kategorii: „rozwój zarodka" (GO:0009790), „morfogeneza zarodka" (GO:0048598) i „rozwój zarodka kręgowców" (GO:0043009). Wybrane, wzbogacone przez DRPs procesy GO zostały przedstawione w publikacji 2 na rycinie 3.

W kategorii CC najwięcej DRPs przyporządkowanych zostało do kategorii „komórkowa jednostka anatomiczna" (GO:0110165; 409 DRPs), „anatomiczne organelle wewnątrzkomórkowe" (GO:0005622; 376 DRPs), „organella cytoplazmatyczne" (GO:0043226; 332 DRPs), „cytoplazma" (GO:0005737; 330 DRPs), „organella otoczone błoną" (GO:0043227; 294 DRPs) oraz „wewnątrzkomórkowe organella otoczone błoną" (GO:0043231; 288 DRPs). Wybrane wzbogacone przez DRPs procesy GO zostały przedstawione w publikacji 2 na rycinie 2.

W kategorii MF najwięcej DRPs przypisano do procesów: "wiązanie RNA" (GO:0005488; 305 DRPs), „wiązanie białek" (GO:0005515; 176 DRPs), „wiązanie organicznych cyklicznych związków" (GO:0097159; 147 DRPs) oraz „wiązanie związków heterocyklicznych" (GO:1901363; 146 DRPs). Wybrane, wzbogacone przez DRPs procesy GO zostały przedstawione w publikacji 2 na rycinie 2.

Analiza KEGG wykazała, że DRPs uczestniczą w 17 szlakach komórkowych (publikacja 2, tabela uzupełniająca S3): „szlak metaboliczny" (KEGG:ssc01100; 46 DRPs), „szlak rybosomalny" (KEGG:ssc03010; 22 DRPs), „stwardnienie zanikowe boczne" (KEGG:ssc05014; 21 DRPs), „choroba Alzheimera" (KEGG:ssc05010; 17 DRPs), „choroba Huntingtona" (KEGG:ssc05016; 16 DRPs), „choroba Parkinsona" (KEGG:ssc05012; 15 DRPs), „szlak endocytozy" (KEGG:ssc04144; 13 DRPs), „choroba prionowa" (KEGG:ssc05020; 13 DRPs), „szlak infekcji salmonellą" (KEGG:ssc05132; 11 DRPs), „szlak przekształcania białek w siateczce śródplazmatycznej" (KEGG:ssc04141; 11 DRPs), „regulacja cyotoszkieletu aktynowego" (KEGG:ssc04810; 11 DRPs), „szlak metabolizmu węgla" (KEGG:ssc01200; 10 DRPs), „niealkoholowe stłuszczenie wątroby" (KEGG:ssc04932; 10

DRPs), „szlak nekropoptyczny” (KEGG:ssc04217; 9 DRPs), „insulinowy szlak sygnałowy” (KEGG:ssc04910; 9 DRPs), „szlak proteasomowy” (KEGG:ssc03050; 6 DRPs) oraz szlak infekcji bateryjnej komórek nabłonkowych” (KEGG:ssc05100; 6 DRPs). Wizualizacja analizy przestawiona została w publikacji 2 na rycinach 4 i 5.

4.2.2. Walidacja wyników LC-MS/MS

W celu potwierdzenia prawidłowości i dokładności metody wysokoprzepustowej przeprowadzono eksperyment walidacyjny dla pięciu wybranych białek (ADAMTS1, CYP51A1, NOTCH3, INHBA i mPGES2) wykazujących zmiany ekspresji pod wpływem wisfatyny. Analiza wyników uzyskanych metodą Western Blot potwierdziła stymulujący wpływ wisfatyny na ekspresję białek ADAMTS1, CYP51A1 oraz NOTCH3 i obniżenie ekspresji INHBA i mPGES2, co było zgodne z wynikami otrzymanymi metodą LC-MS/MS (publikacja 2, rycina 6).

5. Podsumowanie i Wnioski

Przeprowadzane badania umożliwiły weryfikację postawionych w pracy hipotezy. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wisfatyna wpływa na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych. Otrzymane wyniki przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat roli wisfatyny w komórkach lutealnych świni w okresie implantacji. Metody wysokoprzepustowe zastosowane w badaniach pozwoliły na scharakteryzowanie, z użyciem narzędzi bioinformatycznych, zmian w profilach transkryptomicznych i proteomicznych zachodzących w komórkach lutealnych w obecności badanej adipokiny. Uzyskane wyniki umożliwiły określenie genów i białek, a tym samym także procesów i szlaków regulacyjnych, na które potencjalnie może wpływać wisfatyna. Szczegółową dyskusję uzyskanych wyników przedstawiono w dołączonych do pracy publikacjach.

Uzyskane w trakcie badań wyniki pozwoliły na skonstruowanie następujących wniosków:

1. wisfatyna poprzez wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w procesy istotne dla funkcjonowania komórek lutealnych, takich jak regulacja cyklu komórkowego, migracja, proliferacja i adhezja komórek, oraz na ekspresję białek związanych z procesami proliferacji komórek jajników, różnicowania, angio- i waskulogenezy i apoptozy pełni istotną rolę w rozwoju jajników oraz funkcjonowaniu tego gruczołu w czasie wczesnej ciąży;

2. wpływ adipokiny na ekspresję białek związanych z syntezą hormonów stroidowych, a także białek regulujących procesy lipogenezy oraz cholesterologenezy wskazuje na jej udział w regulacji procesu steroidogenezy oraz prawidłowego funkcjonowania jajników.

Wisfatyna poprzez działanie na wiele genów i białek związanych z funkcjonowaniem układu rozrodczego reguluje komórek lutealnych, co bezpośrednio przekłada się na utrzymanie fizjologicznej funkcjonalności jajników. Wpływ wisfatyny na ekspresję genów i białek może przekładać się również na modyfikację szeregu szlaków metabolicznych, co

z kolei może pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów koordynujących funkcje komórek lutealnych i jajników w okresie implantacyjnym. Uzyskane wyniki potwierdziły postawioną hipotezę, co toruje drogę do dalszych badań nad rolą wisfatyny w układzie rozrodczym. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że adipokina może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu ciąży i rozwoju zarodka w okresie implantacji poprzez zapewnienie właściwego przebiegu procesów fizjologicznych charakterystycznych dla tego okresu. Poznanie tych interakcji molekularnych, w dalszej perspektywie, może pozwolić na wykorzystanie wisfatyny w terapiach związanych z leczeniem zaburzeń rozrodu.

6. Piśmiennictwo

Adeghate, E. 2008. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Current medicinal chemistry* 15: 1851–1862.

Adya, R., B. K. Tan, A. Punn, J. Chen, and H. S. Randeva. 2008. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovascular research* 78: 356–365.

Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, et al. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* 25: 25.

Bazer, F. W. 1992. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 199: 373–384.

Bazer, F. W. 2013. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4: 23.

Bazer, F. W., and W. W. Thatcher. 1977. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 14: 397–401.

van den Bergh, R., S. Morin, H. J. Sass, S. Grzesiek, M. Vekemans, E. Florence, H. T. T. Tran, et al. 2012. Monocytes contribute to differential immune pressure on R5 versus X4 HIV through the adipocytokine visfatin/NAMPT. *PloS one* 7.

Camp, S. M., E. Ceco, C. L. Evenoski, S. M. Danilov, T. Zhou, E. T. Chiang, L. Moreno-Vinasco, et al. 2015. Unique Toll-Like Receptor 4 Activation by NAMPT/PBEF Induces NFκB Signaling and Inflammatory Lung Injury. *Scientific reports* 5.

Choi, K. H., B. S. Joo, S. T. Sun, M. J. Park, J. Bin Son, J. K. Joo, and K. S. Lee. 2012. Administration of visfatin during superovulation improves developmental competency of oocytes and fertility potential in aged female mice. *Fertility and sterility* 97.

Diot, M., M. Reverchon, C. Ramé, Y. Baumard, and J. Dupont. 2015. Expression and effect of NAMPT (visfatin) on progesterone secretion in hen granulosa cells. *Reproduction (Cambridge, England)* 150: 53–63.

Dupont, J., X. Pollet-Villard, M. Reverchon, N. Mellouk, and R. Levy. 2015. Adipokines in human reproduction. *Hormone molecular biology and clinical investigation* 24: 11–24.

Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, et al. 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science (New York, N.Y.)* 307: 426–430.

Geisert, R. D., M. T. Zavyt, R. J. Moffattt, R. M. Blair, and T. Yellin. 1990. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy inn pigs. *J. Reprod. Fert*: 293–305.

Geisert, R., and R. Schmitt. 2002. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *Journal of Animal Science*.

Grolla, A. A., C. Travelli, A. A. Genazzani, and J. K. Sethi. 2016. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *British Journal of Pharmacology* 173: 2182–2194.

Kaminski, T., M. Kiezun, E. Zaobidna, K. Dobrzyn, B. Wasilewska, E. Mlyczynska, E. Rytelewska, et al. 2021. Plasma level and expression of visfatin in the porcine hypothalamus during the estrous cycle and early pregnancy. *Scientific reports* 11.

Kanehisa, M., M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato, and K. Morishima. 2017. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research* 45: D353–D361.

Kang, Y. J., D. C. Yang, L. Kong, M. Hou, Y. Q. Meng, L. Wei, and G. Gao. 2017. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic acids research* 45: W12–W16.

Kim, D., B. Langmead, and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* 12: 357–360.

Lehr, S., S. Hartwig, and H. Sell. 2012. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics. Clinical applications* 6: 91–101.

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

Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15.

Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17: 10–12.

Mazaki-Tovi, S., R. Romero, J. P. Kusanovic, E. Vaisbuch, O. Erez, N. G. Than, T. Chaiworapongsa, et al. 2009. Visfatin in human pregnancy: Maternal gestational diabetes vis-à-vis neonatal birthweight. *Journal of Perinatal Medicine* 37: 218–231.

Miller, W. L. 1998. Steroid Hormone Biosynthesis and Actions in the Materno Fetoplacental Unit. *Clinics in Perinatology* 25: 799–817.

Mlyczyńska, E., P. Kurowska, E. Rytelewska, E. Zaobina, K. Pich, M. Kieżun, K. Dobrzyń, et al. 2023a. Expression of visfatin in the ovarian follicles of prepubertal and mature gilts and in vitro effect of gonadotropins, insulin, steroids, and prostaglandins on visfatin levels. *Theriogenology* 211: 28–39.

Mlyczyńska, E., E. Zaobidna, E. Rytelewska, K. Dobrzyń, M. Kieżun, G. Kopij, K. Szymańska, et al. 2023b. Expression and regulation of visfatin/NAMPT in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science* 250: 107212.

Mlyczynska, E., E. Zaobidna, E. Rytelweska, N. Respekta, G. Kopij, Dobrzyń Kamil, M. Kiezun, et al. 2022. Visfatin effect on progesterone synthesis in the porcine corpus

luteum during the estrous cycle via activation of MAPK and AMPK signalling pathways. 25th ESDAR Conference, Reproduction in Domestic Animals, Thessaloniki, Greece.

Nynca, J., A. Malinowska, B. Świderska, J. Wiśniewska, S. Dobosz, and A. Ciereszko. 2023. Triploidization of rainbow trout affects proteins related to ovary development and reproductive activity. *Aquaculture* 565: 739145.

Ognjanovic, S., and G. D. Bryant-Greenwood. 2002. Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187: 1051–1058.

Pavlová, T., J. Novák, and J. Bienertová-Vašků. 2015. The role of visfatin (PBEF/Nampt) in pregnancy complications. *Journal of Reproductive Immunology* 112: 102–110.

Pertea, M., G. M. Pertea, C. M. Antonescu, T. C. Chang, J. T. Mendell, and S. L. Salzberg. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature biotechnology* 33: 290–295.

Plubell, D. L., P. A. Wilmarth, Y. Zhao, A. M. Fenton, J. Minnier, A. P. Reddy, J. Klimek, et al. 2017. Extended Multiplexing of Tandem Mass Tags (TMT) Labeling Reveals Age and High Fat Diet Specific Proteome Changes in Mouse Epididymal Adipose Tissue. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 16: 873–890.

Reimand, J., T. Arak, P. Adler, L. Kolberg, S. Reisberg, H. Peterson, and J. Vilo. 2016. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic acids research* 44: W83–W89.

Reverchon, M., M. Cornuau, L. Cloix, C. Ramé, F. Guerif, D. Royère, and J. Dupont. 2013. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Molecular human reproduction* 19: 313–326.

Reverchon, M., C. Ramé, M. Bertoldo, and J. Dupont. 2014. Adipokines and the Female Reproductive Tract. *International Journal of Endocrinology* 2014.

Reverchon, M., C. Rame, A. Bunel, W. Chen, P. Froment, and J. Dupont. 2016. VISFATIN (NAMPT) Improves In Vitro IGF1-Induced Steroidogenesis and IGF1 Receptor Signaling Through SIRT1 in Bovine Granulosa Cells. *Biology of reproduction* 94.

Revollo, J. R., A. Körner, K. F. Mills, A. Satoh, T. Wang, A. Garten, B. Dasgupta, et al. 2007. Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in β Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. *Cell Metabolism* 6: 363–375.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140.

Rytelewska, E., M. Kiezun, K. Kisielewska, M. Gudelska, K. Dobrzyn, B. Kaminska, T. Kaminski, and N. Smolinska. 2021. Chemerin as a modulator of ovarian steroidogenesis in pigs: an in vitro study. *Theriogenology* 160: 95–101.

S., A. 2023. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence.

Shen, C. J., E. M. Tsai, J. N. Lee, Y. L. Chen, C. H. Lee, and T. F. Chan. 2010. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertility and sterility* 93: 1844–1850.

Shen, S., J. W. Park, Z. X. Lu, L. Lin, M. D. Henry, Y. N. Wu, Q. Zhou, and Y. Xing. 2014. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: E5593–E5601.

Smolinska, N., M. Kiezun, K. Dobrzyn, E. Rytelewska, K. Kisielewska, M. Gudelska, E. Zaobidna, et al. 2019. Expression of Chemerin and Its Receptors in the Porcine Hypothalamus and Plasma Chemerin Levels during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 3887* 20: 3887.

Stofkova, A. 2010. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. *Endocrine regulations* 44: 25–36.

Sun, L., H. Luo, D. Bu, G. Zhao, K. Yu, C. Zhang, Y. Liu, et al. 2013. Utilizing sequence intrinsic composition to classify protein-coding and long non-coding transcripts. *Nucleic Acids Research* 41: e166–e166.

Szklarczyk, D., A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, et al. 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research* 47: D607–D613.

Szklarczyk, D., R. Kirsch, M. Koutrouli, K. Nastou, F. Mehryary, R. Hachilif, A. L. Gable, et al. 2023. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research* 51: D638–D646.

Szymanska, K., E. Zaobidna, E. Rytelewska, E. Mlyczynska, P. Kurowska, K. Dobrzyn, M. Kiezun, et al. 2023. Visfatin in the porcine pituitary gland: expression and regulation of secretion during the oestrous cycle and early pregnancy. *Scientific Reports 2023 13:1* 13: 1–13.

Tuckey, R. C. 2005. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26: 273–281.

Tyanova, S., T. Temu, and J. Cox. 2016a. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols 2016 11:12* 11: 2301–2319.

Tyanova, S., T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, and J. Cox. 2016b. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods 2016 13:9* 13: 731–740.

Väänänen, J. E., B. Li Pak Tong, C. C. M. Väänänen, I. H. Y. Chan, B. H. Yuen, and P. C. K. Leung. 1997. Interaction of prostaglandin F2alpha and gonadotropin-releasing hormone on progesterone and estradiol production in human granulosa-luteal cells. *Biology of reproduction* 57: 1346–1353.

Waclawik, A., H. N. Jabbour, A. Blitek, and A. J. Ziecik. 2009. Estradiol-17beta, prostaglandin E2 (PGE2), and the PGE2 receptor are involved in PGE2 positive feedback loop in the porcine endometrium. *Endocrinology* 150: 3823–3832.

Weems, C. W., Y. S. Weems, and R. D. Randel. 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal* 171: 206–228.

Wiśniewski, J. R. 2019. Filter Aided Sample Preparation - A tutorial. *Analytica chimica acta* 1090: 23–30.

Yates, A. D., P. Achuthan, W. Akanni, J. Allen, J. Allen, J. Alvarez-Jarreta, M. R. Amode, et al. 2020. Ensembl 2020. *Nucleic acids research* 48: D682–D688.

Olsztyn, 28.06.2024

mgr Grzegorz Tomasz Kopij
nauki biologiczne

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „Visfatin affects the transcriptome of porcine luteal cells during early pregnancy" (Kopij G., Kieżun M., Dobrzyń K., Zaobidna E., Zarzecka B., Rak A., Kamiński T., Kamińska B., Smolińska N. 2024. International Journal of Molecular Science, 25(4): 2339. https://doi.org/10.3390/ijms25042339) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników, analizie formalnej i redagowaniu tekstu, przygotowaniu manuskryptu oraz udzieleniu odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacji.

Grzegorz Kopij

Olsztyn, 27.06.2024

dr Marta Kieżun

dr Kamil Dobrzyń

dr Ewa Zaobidna

mgr inż. Barbara Zarzecka

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ

prof. dr hab. Tadeusz Kamiński

dr hab. Barbara Kamińska, prof. UWM

prof. dr hab. Nina Smolińska

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „Visfatin Affects the Transcriptome of Porcine Luteal Cells during Early Pregnancy" (Kopij G., Kieżun M., Dobrzyń K., Zaobidna E., Zarzecka B., Rak A., Kamiński T., Kamińska B., Smolińska N. 2024. International Journal of Molecular Science, 25(4): 2339. https://doi.org/10.3390/ijms25042339)
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na:

- dr Marta Kieżun: przeprowadzeniu badań;
- dr Kamil Dobrzyń: przeprowadzeniu badań;
- dr Ewa Zaobidna: walidacji wyników i weryfikacja danych;
- mgr inż. Barbara Zarzecka: walidacji wyników;
- dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ: redagowaniu tekstu, analizie formalnej tekstu oraz pozyskaniu finansowania;
- prof. dr hab. Tadeusz Kamiński: redagowaniu tekstu, analizie formalnej tekstu oraz pozyskaniu finansowania;
- dr hab. Barbara Kamińska, prof. UWM: redagowaniu tekstu oraz analizie formalnej tekstu;

- prof. dr hab. Nina Smolińska: współudział w opracowaniu koncepcji, przeprowadzanie badań, weryfikacji danych, przygotowaniu manuskryptu, redagowaniu tekstu, analizie formalnej tekstu, nadzorze merytorycznym oraz pozyskaniu finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgra Grzegorza Kopija jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w.w. pracy wykazuje indywidualny wkład mgra Grzegorz Kopija polegający na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników, analizie formalnej tekstu oraz przygotowaniu manuskryptu.

dr Marta Kieżun Marta Kieżun

dr Kamil Dobrzyń Kamil Dobrzyń

dr Ewa Zaobidna Ewa Zaobidna

mgr inż. Barbara Zarzecka Barbara Zarzecka

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ Agnieszka

prof. dr hab. Tadeusz Kamiński

dr hab. Barbara Kamińska, prof. UWM Barbara Kamińska

prof. dr hab. Nina Smolińska Nina Smolińska

Olsztyn, 28.06.2024

mgr Grzegorz Tomasz Kopij
nauki biologiczne

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation" (Kopij G., Kieżun M., Gudelska M., Dobrzyń K., Zarzecka B., Rytelewska E., Zaobidna E., Świderska B., Malinowska A., Rak A., Kamiński T., Kamińska B., Smolińska N. 2024. Scientific Reports 14, 14625, doi.org/10.1038/s41598-024-65577-1) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników, analizie formalnej i redagowaniu tekstu, przygotowaniu manuskryptu oraz udzieleniu odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacji.

Grzegorz Kopij

Olsztyn, 27.06.2024

dr Marta Kieżun

dr Marlena Gudelska

dr Kamil Dobrzyń

mgr inż. Barbara Zarzecka

dr Edyta Rytelewska

dr Ewa Zaobidna

mgr Bianka Świderska

dr Agata Malinowska

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ

prof. dr hab. Tadeusz Kamiński

prof. dr hab. Nina Smolińska

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation" (Kopij G., Kieżun M., Gudelska M., Dobrzyń K., Zarzecka B., Rytelewska E., Zaobidna E., Świderska B., Malinowska A., Rak A., Kamiński T., Kamińska B., Smolińska N. 2024. Scientific Reports 14, 14625, doi.org/10.1038/s41598-024-65577-1) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na:

- dr Marta Kieżun: przeprowadzeniu badań;
- dr Marlena Gudelska: walidacji wyników;
- dr Kamil Dobrzyń: przeprowadzeniu badań;
- mgr inż. Barbara Zarzecka: walidacji wyników;
- dr Edyta Rytelewska: walidacji wyników;
- dr Ewa Zaobidna: walidacji wyników i weryfikacja danych;
- mgr Bianka Świderska: preparatyka i pomiar LC-MS/MS, współudział w analizie danych;

- dr Agata Malinowska: współudział w zarządzaniu danymi i analizie;
- dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ: redagowaniu tekstu, analizie formalnej tekstu oraz pozyskaniu finansowania;
- prof. dr hab. Tadeusz Kamiński: redagowaniu tekstu, analizie formalnej tekstu oraz pozyskaniu finansowania;
- prof. dr hab. Nina Smolińska: współudziale w opracowaniu koncepcji, przeprowadzaniu badań, weryfikacji danych, przygotowaniu manuskryptu, redagowaniu tekstu oraz analizie formalnej tekstu, nadzorze merytorycznym oraz pozyskaniu finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgra Grzegorza Kopija jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w.w. pracy wykazuje indywidualny wkład mgra Grzegorza Kopija polegający na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników, analizie formalnej tekstu oraz przygotowaniu manuskryptu.

dr Marta Kieżun

dr Marlena Gudelska

dr Kamil Dobrzyń

mgr inż. Barbara Zarzecka

dr Edyta Rytelewska

dr Ewa Zaobidna

mgr Bianka Świderska

dr Agata Malinowska

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ

prof. dr hab. Tadeusz Kamiński

prof. dr hab. Nina Smolińska