



**Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
Oddział Biologii Rozrodu**

mgr Monika Magdalena Baryła

**Znaczenie prokinetycyny 1 w procesach związanych
z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu
rujowego u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)**

ROZPRAWA DOKTORSKA
składająca się z cyklu artykułów naukowych
w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie zootechnika i rybactwo

Praca doktorska wykonana

w Zespole Mechanizmów Działania Hormonów

Promotor: *prof. dr hab. Agnieszka Waclawik*

Promotor pomocniczy: *dr Piotr Kaczyński*

Badania finansowane ze źródeł Narodowego Centrum Nauki
w ramach projektu PRELUDIUM-18 (2019/35/N/NZ9/03986) oraz ze środków
IRZiBŻ PAN w ramach Funduszu Badań Własnych (18/FBW/2021)

Spis treści

STRESZCZENIE	3
ABSTRACT	5
SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ ..	7
1. WSTĘP	8
HIPOTEZA.....	11
CEL.....	11
ZADANIA BADAWCZE	11
2. MATERIAŁ I METODY	13
2.1. Zwierzęta doświadczalne.....	13
2.2. Metody badawcze	14
2.3. Schematy doświadczeń.....	15
2.4. Określenie profili ekspresji mRNA i białka PROK1 oraz receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym w czasie cyklu rujowego i we wczesnej ciąży (zadanie 1).....	18
2.5. Określenie lokalizacji ekspresji białek PROK1 oraz jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym (zadanie 2)	19
2.6. Zbadanie wpływu sygnałów zarodkowych (E2, PGE2) oraz czynnika luteolitycznego (PGF2 α) na ekspresję mRNA i białek PROK1 oraz receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> (zadanie 3)	19
2.7. Określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak steroidogenezy oraz uwalnianie progesteronu przez ciało żółte (zadanie 4).....	21
2.8. Badanie wpływu PROK1 na żywotność tkanki ciała żółtego oraz apoptozę komórek lutealnych (zadanie 5)	22
2.9. Zbadanie wpływu prokinetycyny 1 na proces angiogenezy w ciałku żółtym (zadanie 6)	22
2.10. Izolacja RNA oraz analiza real-time RT-PCR.....	24
2.11. Western blot.....	25
2.12. ELISA.....	26
2.13. Analiza statystyczna	26
3. WYNIKI	28
3.1. Określenie profili ekspresji mRNA i białek PROK1 oraz jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym w czasie cyklu rujowego i we wczesnej ciąży (zadanie 1).....	28
3.2. Określenie lokalizacji ekspresji białek prokinetycyny 1 oraz jej receptorów w ciałku żółtym (zadanie 2)	28
3.3. Zbadanie wpływu sygnałów zarodkowych (E2, PGE2) oraz czynnika luteolitycznego (PGF2 α) na ekspresję mRNA i białek PROK1 i jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> (zadanie 3)	28

3.4. Określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak steroidogenezy oraz na uwalnianie progesteronu przez ciało żółte (zadanie 4)	30
3.5. Badanie wpływu PROK1 na żywotność tkanki ciała żółtego oraz apoptozę komórek lutealnych (zadanie 5)	30
3.6. Zbadanie wpływu PROK1 na proces angiogenezy w ciałku żółtym (zadanie 6)	31
4. DYSKUSJA	33
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	42
6. PIŚMIENNICTWO	44
Oświadczenia o procentowym wkładzie poszczególnych współautorów w przygotowanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	51

STRESZCZENIE

ZNACZENIE PROKINETYCYNY 1 W PROCESACH ZWIĄZANYCH Z FUNKCJĄ CIAŁKA ŻÓŁTEGO PODCZAS WCZESNEJ CIĄŻY I CYKLU RUJOWEGO U ŚWINI DOMOWEJ (*Sus scrofa domestica* L.)

mgr Monika Magdalena Baryła

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem *prof. dr hab. Agnieszki Waclawik* oraz *dr. Piotra Kaczyńskiego* w Zespole Mechanizmów Działania Hormonów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

Ciałko żółte (CL) jest tymczasowym gruczołem endokrynnym powstającym po owulacji w miejscu pęcherzyka jajnikowego. Syntetyzuje i wydziela progesteron, który jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu wczesnej ciąży, tj. dla implantacji zarodka w macicy oraz rozwoju łożyska. Zaburzenia w funkcjonowaniu CL, zarówno podczas cyklu rujowego/płciowego, jak i podczas ciąży, niosą ze sobą duże ryzyko obniżonej płodności oraz są jedną z przyczyn wysokiej śmiertelności zarodków podczas wczesnej ciąży u wielu gatunków ssaków, w tym również u świni. Ciałko żółte u świni, podobnie jak u krowy i kobiety, w przeciągu kilkunastu dni przechodzi etapy formowania się (wczesna faza lutealna), pełnej funkcjonalności (faza lutealna) oraz regresji (późna faza lutealna), co czyni go wyjątkowo energochłonną jednostką i wymaga od organizmu uruchomienia mechanizmów pozwalających zachować jego stabilność podczas ciąży. Mechanizmy te regulowane są m. in. przez hormony, czynniki wzrostu i cytokiny. Jednak procesy zaangażowane w podtrzymanie działalności ciała żółtego i ich hierarchia nie zostały dotąd w pełni poznane. Wśród cząsteczek potencjalnie zaangażowanych w regulację czynności CL znajduje się peptyd – prokinetycyna 1 (PROK1), którego obecność stwierdzono w tkance ciała żółtego u kobiety oraz krowy. Dotychczas PROK1 nie była badana w ciałku żółtym świni, brakowało też danych dotyczących roli tego czynnika podczas ciąży w tym gruczole u innych gatunków zwierząt. W związku z tym, celem badań było określenie roli PROK1 w regulacji funkcji CL świni domowej podczas cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży.

W ramach niniejszej pracy określono profil ekspresji genu i białka PROK1 oraz jej receptorów w CL podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego. Wykazano, że poziom ekspresji genu i białka PROK1 oraz genu jej receptora 1 (*PROKR1*) wzrastał w ciałku żółtym w okresie, w którym dochodzi do zahamowania regresji CL i podtrzymania jego funkcji podczas wczesnej ciąży. Ekspresja genu receptora 2 prokinetycyny (*PROKR2*) zwiększała się w późnej

fazie lutealnej. Analiza immunohistochemiczna wykazała obecność białek PROK1 i jej receptorów w komórkach steroidogennych oraz w komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych (endotelialnych). W kolejnym etapie badań sprawdzono czy ekspresja genów i białek PROK1 i jej receptorów może być regulowana przez czynniki pochodzenia zarodkowego. U świni głównym sygnałem zarodkowym jest estradiol-17 β (E2). W badaniach przeprowadzonych w ramach prezentowanej pracy doktorskiej wykorzystano model *in vitro*, w którym hodowano tkanki CL oraz model *in vivo*, w którym naśladowano wydzielanie sygnałów przez zarodki. W warunkach *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, że ekspresja genu i/lub białka PROK1 i jej receptora PROKR1 była stymulowana poprzez E2 oraz przez prostaglandynę E2 (PGE2), wydzielaną przez zarodki oraz endometrium podczas wczesnej ciąży. Następnie zbadano czy prostaglandyna F2 α (PGF2 α), która inicjuje proces luteolizy, może regulować ekspresję PROK1 i jej receptorów w CL. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że PGF2 α zwiększyła ekspresję genu *PROK1* w 12. dniu cyklu rujowego. Następnie zbadano wpływ PROK1 na procesy związane z funkcją CL. Wykorzystując model *in vitro*, wykazano, że PROK1 reguluje syntezę i wydzielanie progesteronu przez CL. Ponadto, stymuluje ona proces tworzenia się naczyń krwionośnych w CL oraz zwiększa żywotność oraz redukuje apoptozę komórek lutealnych.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że PROK1 jest istotnym regulatorem funkcji ciała żółtego. Jej produkcja wzrasta w CL w trakcie procesu maczynego rozpoznania ciąży, podczas którego dochodzi do zahamowania luteolizy, a ekspresja PROK1 i PROKR1 regulowana jest przez sygnał zarodkowy (E2) oraz PGE2. Prokinetycyna 1 jest również ważnym czynnikiem zaangażowanym w kontrolowanie funkcji wydzielniczej ciała żółtego poprzez wspieranie procesu steroidogenezy i tworzenia się naczyń krwionośnych, a także hamując apoptozę komórek lutealnych i zwiększając żywotność komórek w CL. Procesy te są kluczowe dla rozwoju ciąży u świni domowej. Wyniki przeprowadzonych badań pogłębiają wiedzę z zakresu biologii rozrodu i w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania nowych technik ograniczających śmiertelność zarodków w newralgicznym okresie ciąży, jakim jest maczyne rozpoznanie ciąży, zagnieżdżenie zarodków oraz rozwój łożyska.

ABSTRACT

ROLE OF PROKINETICIN 1 IN PROCESSES RELATED TO FUNCTION OF PORCINE (*Sus scrofa domestica* L.) CORPUS LUTEUM DURING EARLY PREGNANCY AND THE ESTROUS CYCLE.

MSc Monika Magdalena Baryła

The doctoral thesis was written under the supervision of *prof. dr hab. Agnieszka Waclawik* and *dr. Piotr Kaczyński* in the Group of Hormonal Action Mechanisms of Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn.

The corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland in the ovary that forms after ovulation from the ovarian follicle. It synthesizes progesterone that is necessary during pregnancy establishment, i.e. for embryo implantation and early embryo development. Impaired corpus luteum function during estrus cycle and pregnancy may be related to reduced fertility and high embryonic mortality rates observed during early pregnancy in many mammalian species, including the pig. The corpus luteum in the pig, likewise in human and bovine, undergoes the following phases: formation (early luteal), secretory phase (mid-luteal), and regression (late luteal) during several days, making the CL an exceptionally energy-consuming unit and requiring the activation of specific mechanisms to maintain its stability during pregnancy. These intensive changes involve physiological processes controlled by many different factors including hormones, growth factors, and cytokines. However, the full sequence and hierarchy of molecular events occurring in functioning CL is still unknown. Among molecules potentially involved in the regulation of the luteal activity is prokineticin 1 (PROK1) - the peptide which was shown to be present in the woman and bovine corpus luteum. Until now, PROK1 has not been studied in the porcine CL and there was no data about the expression and the role of PROK1 during early pregnancy in this gland in any species. The present study aimed to determine the role of PROK1 in the porcine corpus luteum function during the estrous cycle and early pregnancy.

The expression profiles of PROK1 and its receptors (PROKR1 and PROKR2) were established in the CL during early pregnancy and the estrous cycle. It was found that the expression levels of the PROK1 gene and protein, along with the gene for its receptor *PROKR1*, increased at the period when the luteal regression is inhibited during early pregnancy. The gene expression of the prokineticin receptor 2 (*PROKR2*) was elevated during the luteal regression (luteolysis). Immunolocalization of the PROK1 and its receptors proteins in the CL indicated their presence in steroidogenic cells as well as in blood vessels.

It was also determined whether the signal secreted by conceptus which in pigs is estradiol-17 β (E2), is capable of regulating the expression of PROK1 and its receptors. An *in vivo* model was used to imitate the secretion of signals by embryos and an *in vitro* model in which luteal tissues were incubated with the hormones. Indeed, E2 alone and together with prostaglandin E2 (PGE2) significantly increased the expression of gene and/or protein PROK1 and PROKR1 in the porcine CL *in vitro* and *in vivo*. Prostaglandin E2 (PGE2) is abundantly secreted at the embryo-maternal interface during pregnancy establishment. Once it was established that the expression of PROK1 and its receptor PROKR1 is stimulated by conceptus signal in pregnancy, it was determined whether their expression during the estrous cycle may be affected by prostaglandin F2 α (PGF2 α) which is a factor initiating the regression of the CL. Obtained results indicated that PGF2 α increased the expression of the *PROK1* gene in luteal tissue collected from gilts on the Day 12 of the estrous cycle. Furthermore, it was determined whether PROK1 may be involved in processes crucial to the CL function. By using *in vitro* models it was shown that PROK1 stimulated steroidogenesis and secretion of progesterone by the CL. Moreover, PROK1 promoted processes of blood vessel formation in the CL, as well as increased luteal cell viability, and attenuated apoptotic changes in luteal cells.

Presented findings are the first describing the novel role of PROK1 as a significant regulator of CL function. Its production increases in the CL during the process of maternal recognition of pregnancy when the luteolysis is inhibited, and moreover PROK1 and PROKR1 expression is regulated by the embryonic signal and PGE2. Prokineticin 1 is also an important factor involved in controlling the secretory function of the CL by promoting steroidogenesis, blood vessel formation, and luteal cell viability and inhibiting apoptosis of luteal cells. Therefore, PROK1 effects on the CL are beneficial for pregnancy establishment and development in the pig. The present results extended the knowledge in the field of biology of reproduction and could be important for the effective improvement of breeding techniques to reduce the embryonic mortality rate during such critical processes as maternal recognition of pregnancy, embryo implantation, and placenta development.

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Rozprawa doktorska składa się z dwóch oryginalnych prac badawczych opublikowanych w roku 2023 i 2024, których tematyka obejmuje rolę prokinetycyny 1 w ciałku żółtym świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w czasie cyklu rujowego oraz we wczesnej ciąży.

PUBLIKACJA 1: BARYŁA M., GORYSZEWSKA-SZCZUREK E., KACZYŃSKI P., BALBONI G., WACŁAWIK A. 2023. Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. *Scientific Reports*, 13(1): 5085. DOI: 10.1038/s41598-023-32132-3

(IF¹ = 3,8; IF² = 4,3; pkt.³ = 140)

PUBLIKACJA 2: BARYŁA M., KACZYŃSKI P., GORYSZEWSKA-SZCZUREK E., WACŁAWIK A. 2024. The regulation of the expression of prokineticin 1 and its receptors and its mechanism of action in the porcine corpus luteum. *Theriogenology*, 226:39-48. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2024.05.044

(IF¹ = 2,4; IF² = 2,5; pkt.³ = 140)

Sumaryczny IF¹ publikacji: 6,2

Sumaryczny IF² publikacji: 6,8

Łączna liczba punktów MEiN³: 280

¹ IF - wskaźnik cytowań (ang. *Impact Factor*) czasopisma z roku wydania pracy wg Web of Science

² IF - 5-letni wskaźnik cytowań czasopisma 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 2024r.

1. WSTĘP

Ciało żółte (*Corpus luteum*, CL) jest tymczasowym gruczołem dokrewnym funkcjonującym w jajniku po owulacji i produkującym progesteron (P4), hormon niezbędny dla rozwoju, a także podtrzymania ciąży u ssaków (NISWENDER I WSP. 2000). Progesteron jest hormonem steroidowym, którego synteza odbywa się przez dwustopniową konwersję cholesterolu w mitochondriach komórek lutealnych. Proces ten zależny jest od białka transportującego cholesterol, będący substratem tej reakcji, do wnętrza przestrzeni międzybłonowej mitochondriów – STAR (ang. steroidogenic acute regulatory protein). Cholesterol, w reakcji katalizowanej przez enzym desmolazę cholesterolową (CYP11A1), zostaje przekonwertowany do pregnenolonu, który następnie pod wpływem kolejnego enzymu, dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (HSD3B), ulega przemianie do progesteronu. U świni CL stanowi źródło P4 przez niemal cały okres ciąży, podczas gdy u wielu gatunków rolę tę przejmuje w późniejszym okresie łożysko (ZIECIK I WSP. 2018). Gdy po owulacji nie dochodzi do zapłodnienia, ciało żółte ulega regresji (luteolizie) po około 14-16 dniach od wystąpienia objawów rui. Wyróżnia się dwa etapy luteolizy: luteolizę funkcjonalną, podczas której dochodzi do utraty funkcji steroidogennych, czyli spadku syntezy P4, oraz luteolizę strukturalną, która charakteryzuje się zmianami morfologicznymi zachodzącymi w tkance lutealnej, takimi jak gromadzenie kropli lipidowych, zanikanie naczyń krwionośnych, czy apoptoza komórek lutealnych (WILTBANK I WSP. 2012). Wiele czynników działających autokrynnie i parakrynnie bierze udział w regulacji procesu luteolizy. Jednym z najważniejszych czynników luteolitycznych jest prostaglandyna F2 α (PGF2 α), produkowana przez macicę i CL (MOELJONO I WSP. 1977; STOUFFER I WSP. 2013; WACŁAWIK I WSP. 2017; BARISHA I WSP. 2024). Natomiast w przypadku zapłodnienia, funkcjonowanie CL jest podtrzymywane przez sygnały pochodzące od rozwijających się zarodków. U świni głównym sygnałem zarodkowym jest estradiol-17 β (E2), którego wydzielanie przez zarodki wzrasta w okresie tzw. macicznego rozpoznania ciąży (11.-12. dzień ciąży) oraz w okresie implantacji zarodka i rozwoju łożyska (15.-25. dzień ciąży) (BAZER I WSP. 1982; WACŁAWIK I WSP. 2017; SULLIVAN I WSP. 2024). Kolejnym ważnym hormonem odpowiadającym

za utrzymanie funkcjonowania CL jest prostaglandyna E2 (PGE2; CONLEY & FORD 1989; KACZYNSKI I WSP. 2021; GINTHER 2024; SULLIVAN I WSP. 2024), której profil syntezy i sekrecji przez endometrium i zarodki pokrywa się z profilem sekrecji E2 (WACLAWIK I WSP. 2006; WACLAWIK I ZIĘCIK 2007). Pomimo ważnej roli ciała żółtego w okresie wczesnej ciąży, mechanizmy regulujące jego czynność nie zostały w pełni wyjaśnione i stanowią ważny aspekt badań związanych z rozrodem ludzi oraz zwierząt. U świni w okresie wczesnej ciąży obserwuje się zjawisko wysokiej śmiertelności zarodków, którego etiologia nie została dotychczas zupełnie poznana (WACLAWIK I WSP. 2017). Wśród potencjalnych czynników odpowiedzialnych za przerwanie wczesnej ciąży, obserwowane także u innych gatunków zwierząt, wymienia się m. in. dysfunkcyjne ciało żółte (POPE & FIRST 1985; CAMPANILE I WSP. 2007; DOMINGUES I WSP. 2022; LÓPEZ-GATIUS & GARCIA-ISPIERTO 2022).

Wyróżnia się trzy okresy funkcjonowania ciała żółtego: faza formowania, faza lutealna oraz faza regresji. W trakcie tych przemian w obrębie CL zachodzą takie procesy, jak przebudowa tkanek, apoptoza (programowana śmierć komórki) czy angiogeneza (proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych) (REYNOLDS & REDMER 1999; ELMORE 2007). Angiogeneza jest precyzyjnie regulowana w każdej z faz istnienia ciała żółtego przez czynniki angiogenne takie jak: czynnik wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych typu A (VEGFA) działający poprzez swoje receptory (receptor 1 - FLT1, receptor 2 - KDR), angiopoetyny (ANGPT1, ANGPT2) czy angiogenina (ANG). W proces angiogenezy zaangażowane są także tlenek azotu, endotelina oraz czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2) (UCUZIAN I WSP. 2011). Kolejnym czynnikiem zaangażowanym w kontrolę procesu angiogenezy, ale stosunkowo mniej poznanym, jest prokinetycyna 1 (PROK1), określana również jako czynnik wzrostu śródbłonna zależny od gruczołów dokrewnych (*ang.* Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor; EG-VEGF). PROK1 jest peptydem o plejotropowym oddziaływaniu, znanym głównie jako mitogen komórek śródbłonna drobnych naczyń krwionośnych zlokalizowanych przy gruczołach dokrewnych oraz regulator kurczliwości mięśniówki gładkiej jelit (LECOUTER I WSP. 2001, 2004; LI I WSP. 2001). Prokinetycyna 1 należy do rodziny białek AVIT (krótkich peptydów o długości 80-90 aminokwasów,

zawierających sekwencję AVIT). Działa ona za pośrednictwem dwóch receptorów błonowych sprzężonych z białkiem G: PROKR1 i PROKR2 (LIN I WSP. 2002). Powinowactwo PROK1 jest silniejsze do receptora PROKR1 (CHEN I WSP. 2005). Prokinetycyna 1 po związaniu z receptorami aktywuje kaskadę reakcji fosforylacji kinaz aktywowanych mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinases; MAPK) (BROUILLET I WSP. 2010; ALFAIDY 2016).

Wśród danych literaturowych na temat roli PROK1 w żeńskim układzie rozrodczym znajdują się informacje o wzroście ekspresji PROK1 w endometrium kobiet w okresie okołoinplantacyjnym (NGAN I WSP. 2006). Ekspresja PROK1 oraz jej receptora PROKR1 zachodzi również w endometrium i trofoblastach u świni, gdzie w okresie wczesnej ciąży sygnalizacja PROK1-PROKR1 jest mediatorem procesów kluczowych dla ustanowienia ciąży: angiogenezy, proliferacji komórek trofoblastu oraz ich adhezji do endometrium macicy (GORYSZEWSKA I WSP. 2020; 2021; GORYSZEWSKA-SZCZUREK I WSP. 2021). Prokinetycyna 1 ulega stosunkowo wysokiej ekspresji w pęcherzykach jajnikowych oraz CL u ludzi, krów oraz szczurów (FERRARA I WSP. 2003; KISLIOUK I WSP. 2003; 2005; 2007; MASUDA I WSP. 2002). Ekspresja PROK1 zachodzi zarówno w zrębie tkanki jajnika, jak również w pęcherzykach jajnikowych, a także CL i jest zależna od fazy cyklu rujowego/menstruacyjnego (LECOUTER I WSP. 2002; FERRARA I WSP. 2003; FRASER I WSP. 2005; KISLIOUK I WSP. 2007). Mimo, iż wykazano, że ekspresja genu *PROK1* w jajnikach jest dynamiczna (FRASER I WSP. 2005; KISLIOUK I WSP. 2007), to rola jaką odgrywa PROK1 w tym organie nie była dotąd w pełni opisana. Według dostępnej literatury należy przypuszczać, że PROK1 wspiera proces angiogenezy, jednakże profile ekspresji u bydła wskazują, że najwyższy poziom ekspresji PROK1 ma miejsce w późniejszej fazie lutealnej w czasie luteolizy, gdy dochodzi do zahamowania procesu angiogenezy (KISLIOUK I WSP. 2007). Ponadto w literaturze przeważały informacje o ekspresji genów *PROK1* i jej receptorów w jajniku, natomiast poziom ekspresji białek tych czynników nie został dotąd zbadany w przebiegu cyklu rujowego/płciowego lub wczesnej ciąży. W literaturze brakowało dotychczas informacji na temat roli PROK1 i jej receptorów w ciałku żółtym u świni i innych ssaków (w tym człowieka), w czasie jego przedłużonej funkcji związanej z wczesną ciążą.

HIPOTEZA

Dostępne fragmentaryczne dane literaturowe stały się podstawą hipotezy badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej zakładającej, że **prokinetycyna 1 bierze udział w regulacji funkcjonowania ciała żółtego świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie wczesnej ciąży oraz podczas cyklu rujowego.**

CEL

Celem pracy doktorskiej było określenie roli PROK1 w regulacji funkcji ciała żółtego w środkowej i późnej fazie lutealnej cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży u świni domowej.

ZADANIA BADAWCZE

Aby zrealizować cel badawczy zaplanowano następujące zadania badawcze:

1. Określenie profili ekspresji mRNA i białek prokinetycyny 1 oraz jej receptorów w ciałku żółtym w czasie cyklu rujowego i we wczesnej ciąży (*Publikacja 1*, BARYLA I WSP. 2023);
2. Określenie lokalizacji ekspresji białek prokinetycyny 1 oraz jej receptorów w ciałku żółtym (*Publikacja 1*, BARYLA I WSP. 2023);
3. Zbadanie wpływu sygnałów zarodkowych (E2, PGE2) oraz czynnika luteolitycznego (PGF2 α) na ekspresję mRNA i białek prokinetycyny 1 i jej receptorów w ciałku żółtym *in vitro* i *in vivo* (*Publikacja 2*, BARYLA I WSP. 2024);
4. Określenie wpływu prokinetycyny 1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak steroidogeny oraz na uwalnianie progesteronu przez ciało żółte (*Publikacja 1*, BARYLA I WSP. 2023);
5. Zbadanie wpływu prokinetycyny 1 na żywotność tkanki ciała żółtego oraz apoptozę komórek lutealnych (*Publikacja 1*, BARYLA I WSP. 2023);
6. Zbadanie wpływu prokinetycyny 1 na proces angiogenezy w ciałku żółtym poprzez:
 - określenie wpływu PROK1 na formowanie struktur kapilaropodobnych przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych CL (*Publikacja 1*, BARYLA I WSP. 2023);

- określenie wpływu PROK1 na proliferację komórek endotelialnych wyizolowanych z ciała żółtego (*Publikacja 2*, BARYLA I WSP. 2024);
- określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów związanych z procesem angiogenezy: *ANG*, *ANGPT2*, *FGF2*, *FLT1*, *KDR* a także na uwalnianie VEGFA przez tkankę ciała żółtego świni (*Publikacja 1*, BARYLA I WSP. 2023).

2. MATERIAŁ I METODY

Opisane doświadczenia przeprowadzono zgodnie z Ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z dnia 15 stycznia 2015 r. oraz Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych z dnia 22 września 2010 r. Część materiału wykorzystanego w zadaniu 3. pochodziła z materiału badawczego zebranego podczas realizacji poprzedniego projektu zespołu (nr N N311 319135). Materiał zgromadzony i zabezpieczony został na podstawie otrzymanej zgody Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Polska (nr zgody:17/2008).

2.1. Zwierzęta doświadczalne

Tkanki wykorzystane w doświadczeniach pobierane były od dojrzałych płciowo loszek przeznaczonych do uboju w celu przetwórstwa mięsnego (mieszanie ras Pietrain i Duroc) w wieku około 6-7 miesięcy, o zbliżonej masie (100-115 kg) i podłożu genetycznym. Początek drugiej rui uznano za dzień 0 cyklu rujowego. Loszki po drugiej naturalnej rui podzielono na dwie grupy – zwierzęta będące w trakcie cyklu rujowego oraz ciężarne. Loszki z grupy ciężarnej poddano dwukrotnej inseminacji po 12. i 24. godzinach od wykrycia objawów drugiej rui. Kolejny dzień uznawano za pierwszy dzień ciąży. Ciałka żółte pobierano w 9., 12. i 14. dniu cyklu rujowego lub ciąży. Ciężę potwierdzono na podstawie obecności i oceny morfologicznej zarodków (ANDERSON 1978). Dodatkowo określono stężenie progesteronu w osoczu (Publikacja 1, BARYŁA I WSP. 2023).

Zwierzęta przyporządkowane zostały do następujących grup:

- 9. dzień cyklu rujowego (koniec fazy wczesno-lutealnej lub początek fazy środkowo-lutealnej, okres w którym ciała żółte zyskują pełną funkcjonalność) oraz 9. dzień ciąży (faza migracji zarodków)

- 12. dzień cyklu rujowego (faza środkowo-lutealna; faza pełnej funkcjonalności ciałek żółtych) oraz 12. dzień ciąży (proces maczynego rozpoznania ciąży)
- 14. dzień cyklu rujowego (faza późno-lutealnej; początek luteolizy) oraz 14. dzień ciąży (początek implantacji zarodków)

W zadaniu nr 1 wykorzystano ciała żółte pobrane od loszek w 9., 12. oraz 14. dniu cyklu rujowego oraz ciąży. W zadaniu badawczym 2 i 4 oraz części zadania 6, wykorzystano ciała żółte świni w 12. i 14. dniu cyklu rujowego oraz ciąży. Zadanie badawcze 3 podzielone zostało na część *in vitro* oraz część *in vivo*. W części *in vitro* tego zadania dotyczącej analiz związanych z badaniem wpływu czynników luteotropowych wykorzystano CL zwierząt będących w 12. dniu cyklu rujowego, natomiast do analiz związanych z wpływem czynnika luteolitycznego wykorzystano CL od zwierząt będących w 12. i 14. dniu cyklu rujowego, a także 14. dniu ciąży. Do realizacji zadania badawczego 5 oraz części zadania 6 wykorzystano CL pobrane od zwierząt w 12. dniu cyklu rujowego. W części *in vivo* zadania 3, wykorzystano CL pozyskane uprzednio (podczas realizacji innego projektu zespołu) od zwierząt, którym do światła macicy podawano czynniki luteotropowe (E2 i PGE2) w celu naśladowania ich sekrecji przez rozwijające się zarodki.

2.2. Metody badawcze

W trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wykorzystane zostały następujące metody:

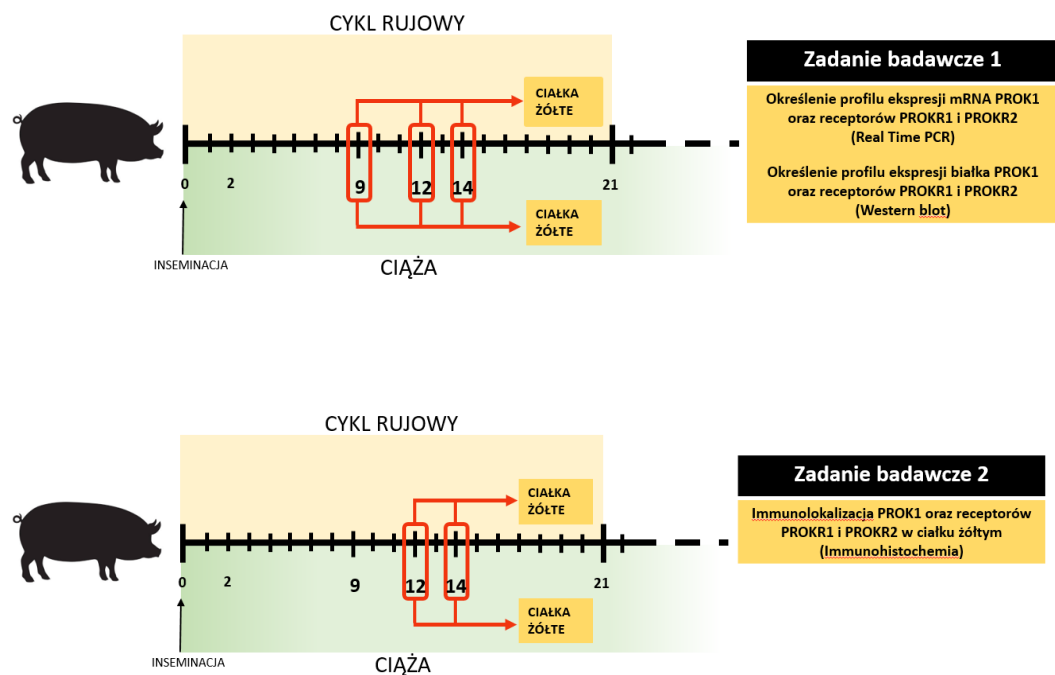
- Analiza ekspresji genów (qPCR; real-time RT-PCR) - zadania nr 1, 3, 4, 6
- Analiza ekspresji białek Western blot - zadania nr 1, 3
- Hodowle *in vitro* eksplantatów ciałek żółtych - zadania nr 3, 4, 5, 6
- Testy immunoenzymatyczne (ELISA) - zadania nr 3, 6
- Test radioimmunoenzymatyczny (RIA) - zadanie nr 4
- Cytometria przepływowa - zadanie nr 5
- Test żywotności tkanek z udziałem Alamar Blue - zadanie nr 5

- Hodowla *in vitro* komórek lutealnych - zadanie nr 5 oraz komórek śródbłónka naczyń krwionośnych - zadanie nr 6
- Test funkcjonalny tworzenia się struktur kapilaropodobnych - zadanie nr 6
- Test funkcjonalny - proliferacja komórek - zadanie nr 6
- Analizy statystyczne - zadania nr 1, 3–6

W dalszej części przedstawiono opis wykorzystanych metod.

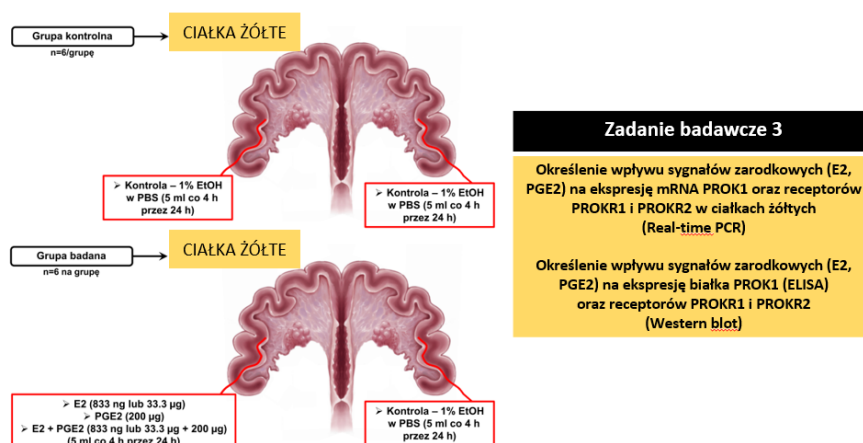
2.3. Schematy doświadczeń

Schematy doświadczeń *ex vivo*



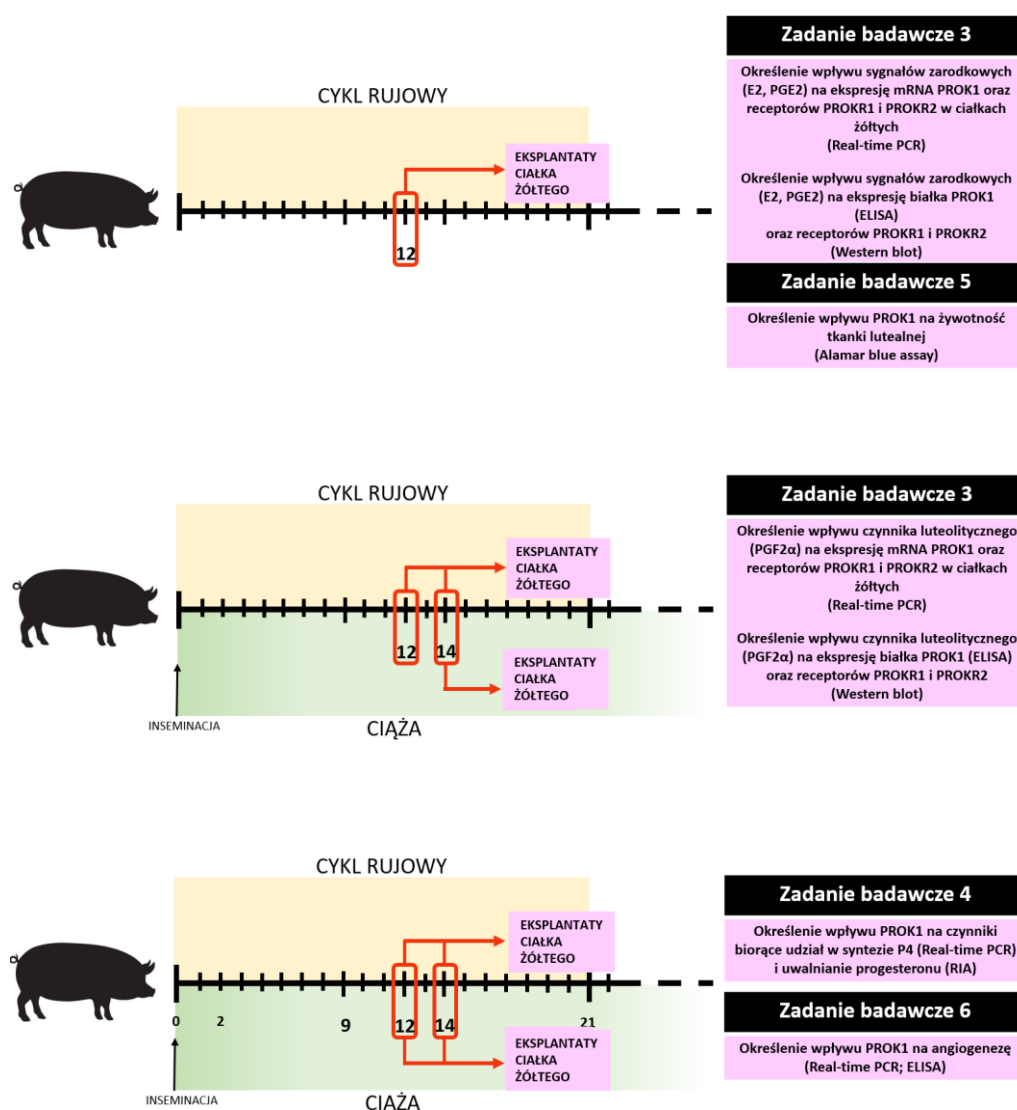
Rycina 1. Schemat przedstawiający pobieranie materiału oraz analizy w doświadczeniach *ex vivo* na ciałkach żółtych. Czerwona strzałka wskazuje dni cyklu rujowego lub ciąży, z których pobierano próby ciałek żółtych. PROK1 – prokinetycyna 1; PROKR1 – receptor 1 prokinetycyny; PROKR2 – receptor 2 prokinetycyny.

Schemat doświadczenia *in vivo*

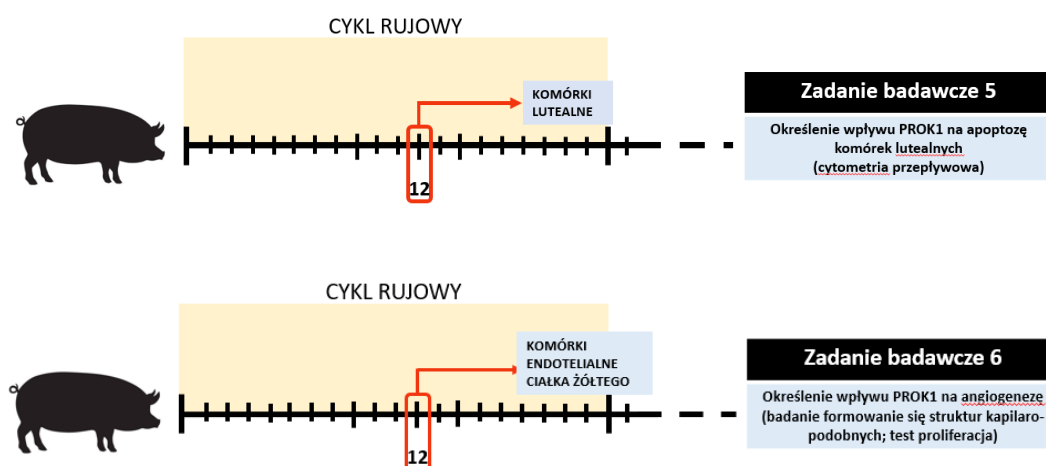


Rycina 2. Schemat przedstawiający procedurę i analizy prowadzone z wykorzystaniem modelu *in vivo*, w którym naśladowano sygnały wydzielane przez zarodki. E2 – estradiol-17 β ; PGE2 – prostaglandyna E2; PROK1 – prokinetycyna 1; PROKR1 – receptor 1 prokinetycyny; PROKR2 – receptor 2 prokinetycyny.

Schematy doświadczeń *in vitro*



Rycina 3. Schemat pobierania materiału oraz wykonania analiz w doświadczeniach *in vitro* przeprowadzonych na tkance ciała żółtego. Czerwoną klamrą zaznaczono dni cyklu rujowego lub ciąży, w których od zwierząt pobrano tkanki ciała żółtego. E2 – estradiol-17β; PGE2 – prostaglandyna E2; PGF2α – prostaglandyna F2α; P4 – progesteron; PROK1 – prokinetycyna 1; PROKR1 – receptor 1 prokinetycyny; PROKR2 – receptor 2 prokinetycyny.



Rycina 4. Schemat pobierania materiału oraz wykonania analiz w doświadczeniach *in vitro* przeprowadzonych na komórkach ciała żółtego. Czerwoną klamrą zaznaczono dni cyklu rujowego, w których pobrano ciała żółte, z których izolowano komórki pierwotne. PROK1 – prokinetycyna 1.

2.4. Określenie profili ekspresji mRNA i białka PROK1 oraz receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym w czasie cyklu rujowego i we wczesnej ciąży (zadanie 1)

W celu określenia profilu ekspresji genu i białka PROK1 oraz PROKR1 i PROKR2 w ciałkach żółtych, wykorzystano dojrzałe płciowo loszki (mieszańce ras Pietrain i Duroc) w wieku około 6-7 miesięcy, o zbliżonej masie i podłożu genetycznym. Pobrane poubojowo jajniki od loszek w 9., 12. i 14. dniu cyklu rujowego lub ciąży i transportowano do laboratorium na lodzie. Materiał przeznaczony do ilościowych analiz ekspresji genów oraz białek pozyskiwano poprzez wynicowanie CL z osłonek i przekładanie tkanek do sterylnych probówek. Tak pobrany materiał zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz. Ekspresję genów zbadano za pomocą metody real-time PCR, natomiast ekspresję białek analizowano metodą Western blot (Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

2.5. Określenie lokalizacji ekspresji białek PROK1 oraz jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym (zadanie 2)

Immunolokalizację białek wykonano za pomocą analizy immunohistochemicznej (Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023). Ciałka żółte pobierano w 12. i 14. dniu cyklu rujowego lub ciąży. Tkanki CL poddano utrwaleniu w 4% paraformaldehydzie, a następnie po odwodnieniu w szeregu alkoholi (70%, 96%, 100%) zatopiono w bloczkach parafinowych. Preparaty krojono na skrawki o grubości 5 μm . W celu odparafinowania skrawki zanurzono w ksylenie. Następnie w celu uwodnienia przeprowadzono przez szereg alkoholi (100%, 96%, 70%). Celem wydobycia antygenów badanych białek z błony komórkowej preparaty poddano procesowi gotowania w buforze cytrynianowym oraz inkubowano z 3% H_2O_2 . Przygotowane w ten sposób skrawki inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami przez dwie godziny (materiały uzupełniające, Tabela 1; BARYLA I WSP. 2023). Następnie, w celu wizualizacji kompleksu antygen-przeciwciało, preparaty inkubowano z tetrachlorkiem 3'3-diaminobenzylidyny (Sigma Aldrich). Jądra komórkowe zostały uwidocznione poprzez barwienie preparatów hematoksyliną. Po procedurze barwienia preparaty odwodniono w szeregu alkoholowym (70%, 96%, 100%) i zamknięto stosując odczynnik do preparatów tkankowych przeznaczonych do obrazowania mikroskopowego DPX (Sigma Aldrich). Potwierdzenie specyficzności użytych przeciwciał wykonano poprzez stosowanie kontroli negatywnych, w których pierwszorzędowe przeciwciała zastąpiono przeciwciałami króliczymi IgG (PROK1 i PROKR2) lub wykonano reakcję z peptydem blokującym (PROKR1). Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu Olympus Provis AX70.

2.6. Zbadanie wpływu sygnałów zarodkowych (E2, PGE2) oraz czynnika luteolitycznego (PGF2 α) na ekspresję mRNA i białek PROK1 oraz receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym *in vivo* i *in vitro* (zadanie 3)

W celu zbadania, czy ekspresja PROK1 oraz jej receptorów PROKR1 i PROKR2 jest regulowana przez sygnały zarodkowe (E2 i PGE2), wykorzystano modele *in vitro* oraz *in vivo*. Szczegółowy opis procedury oraz

doświadczenia zawarty jest w publikacji 2 (BARYLA I WSP. 2024). W doświadczeniu *in vitro* wykorzystano CL pobrane od zwierząt dojrzałych płciowo, będących w 12. dniu cyklu rujowego. Pełny opis doświadczenia znajduje się w Publikacji 2 (BARYLA I WSP. 2024). Z ciałek żółtych wycięto ultracienkie eksplantaty, które poddano preinkubacji z medium kontrolnym w obecności lub bez antagonisty receptora estrogenowego (ICI 182,780) przez 1 godzinę, a następnie, po zmianie medium hodowlanego, przez 18 godzin w obecności lub bez 100 nM E2, 100 nM PGE2, lub PGE2 podawanego łącznie z E2, a także w obecności lub bez antagonisty receptora estrogenowego (ICI 182,780). Po okresie inkubacji eksplantaty CL przemywano w buforze fosforanowym (PBS), a następnie przeniesiono do ciekłego azotu i przechowywano w -80°C do czasu analizy ekspresji genów *PROK1*, *PROKR1* i *PROKR2* metodą real-time PCR oraz białek PROK1 i jej receptorów. Badanie stężenia PROK1 wykonano metodą ELISA, a ekspresję białka PROKR1 i PROKR2 analizowano metodą Western blot.

Następnie badano czy PGF2 α (czynnik luteolityczny) może kontrolować ekspresję PROK1 i/lub jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w CL. W doświadczeniu *in vitro* z udziałem PGF2 α wykorzystano ciała żółte pobierane od dojrzałych płciowo loszek będących w 12. i 14. dniu cyklu rujowego lub w 14. dniu ciąży. Szczegółowy opis doświadczenia znajduje się w Publikacji 2 (BARYLA I WSP. 2024). Z CL wycięte zostały ultracienkie eksplantaty, które inkubowano w obecności lub bez PGF2 α (100 nM oraz 1 μ M) lub fluprostenolu (1 μ M; FLP), który jest stabilnym analogiem PGF2 α . Po 18 godzinach inkubacji eksplantaty wypłukano w PBS i zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz. Analizy ekspresji genów *PROK1*, *PROKR1* i *PROKR2* przeprowadzono metodą real-time RT PCR. Badanie stężenia PROK1 wykonano metodą ELISA, a ekspresję białka PROKR1 i PROKR2 analizowano metodą Western blot.

W doświadczeniach *in vivo* wykorzystano dojrzałe płciowo loszki (mieszańce ras Pietrain i Duroc) w wieku około 6 miesięcy, o zbliżonej masie i podłożu genetycznym. Loszki po drugim naturalnym cyklu rujowym poddano zabiegowi synchronizacji rui. W 8. – 9. dniu trzeciej rui zwierzętom wykonano chirurgiczny zabieg, polegający na wprowadzeniu do obu rogów macicy kaniuli.

Następnie zwierzęta podzielono na dwie grupy – kontrolną i badaną. Infuzję do światła macicy wykonywano 6 razy w 4-godzinnych odstępach od 11. do 12. dnia cyklu rujowego. Zwierzętom z grupy kontrolnej do obu rogów podawano roztwór soli fizjologicznej zawierający 1% alkoholu etylowego. Loszkom z grupy badanej do jednego z rogów podawano roztwór soli fizjologicznej zawierającej: E2 (833 ng lub 33,3 µg/na infuzję Sigma Aldrich); PGE2 (200 µg/na infuzję; Sigma Aldrich) lub E2 łącznie z PGE2, natomiast do przeciwległego rogu podawano infuzję roztworu kontrolnego (soli fizjologicznej zawierającej 1% alkoholu etylowego). Po zakończeniu doświadczenia (12. dzień cyklu rujowego) od loszek pobrano tkankę lutealną, którą zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz. Ekspresję genów zbadano za pomocą metody real-time RT-PCR. Poziom ekspresji białka PROK1 określono za pomocą metody ELISA, a ekspresję białek receptorów za pomocą metody Western blot.

2.7. Określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak steroidogenezy oraz uwalnianie progesteronu przez ciało żółte (zadanie 4)

W celu określenia wpływu PROK1 na steroidogenezę w ciałku żółtym świni wykonano doświadczenia *in vitro*, w których wykorzystano ciała żółte pobrane od zwierząt w 12. i 14. dniu cyklu rujowego oraz w 12. i 14. dniu ciąży. Pełny opis doświadczenia znajduje się w Publikacji 1 (BARYLA I WSP. 2023). W skrócie, z ciałek żółtych wycięte zostały ultracienkie eksplantaty CL, które poddano preinkubacji z medium kontrolnym w obecności lub bez antagonisty receptora PROKR1 (PC7; 10 µM). Następnie eksplantaty inkubowano w medium zawierającym 40 nM PROK1 w obecności lub bez PC7 (10 µM) przez 18 godzin. Po zakończeniu inkubacji zebrano medium hodowlane, a eksplantaty wypłukano w PBS i zabezpieczono w ciekłym azocie. Medium i tkanki po inkubacji *in vitro* przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz. Metodą real-time RT-PCR wykonano analizę ekspresji genów *STAR*, *HSD3B1* oraz *CYP11A1*. W medium pohodowlanym oznaczono stężenie P4 metodą radioimmunologiczną (RIA) za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu RIA (DIAsource Immuno Assays) zgodnie z zaleceniami producenta.

2.8. Badanie wpływu PROK1 na żywotność tkanki ciała żółtego oraz apoptozę komórek lutealnych (zadanie 5)

Aby określić wpływ PROK1 na żywotność tkanki lutealnej wykonano doświadczenie *in vitro*, w którym wykorzystano ultracienkie eksplantaty ciała żółtego. Pełny opis doświadczenia zamieszczono w Publikacji 1 (BARYLA I WSP. 2023). W skrócie, po 14. godzinach inkubacji eksplantatów w medium kontrolnym oraz w medium z PROK1 (40 nM) w obecności lub bez PC7 do medium podano Alamar Blue i kontynuowano inkubację przez następne 4 godziny. Po inkubacji medium zostało poddane analizie spektrofotometrycznej. Stopień żywotności tkanki oceniano na podstawie wyników absorbancji przy długości fali 570 nm zgodnie z zaleceniami producenta.

Wpływ PROK1 na apoptozę komórek steroidogennych ciała żółtego badano w warunkach *in vitro*. Pełny opis doświadczenia zamieszczono w Publikacji 1 (BARYLA I WSP. 2023). Pierwotne komórki lutealne izolowane od zwierząt w 12. dniu cyklu rujowego hodowano w medium M199 z 10% surowicą cielęcą (NCS) na płytkach 6-dołkowych (4×10^5 /dołek) przez 24 godziny. Następnie komórki inkubowano z medium kontrolnym (1% NCS) oraz medium zawierającym PROK1 (40 nM) w obecności lub bez PC7 (1 μ M) i kontynuowano inkubację komórek przez kolejne 20. godzin. Po inkubacji komórki odklejono od podłoża enzymatycznie i poddano analizie cytometrycznej polegającej na sortowaniu komórek według długości fali emitowanego sygnału fluorescencyjnego. Podział oparto na obecności lub braku w błonie komórkowej białek określanych jako markery apoptozy oraz fluorescencji charakterystycznej dla komórek nekrotycznych. W ten sposób zidentyfikowane zostały trzy populacje komórek lutealnych: żywe, apoptotyczne oraz martwe.

2.9. Zbadanie wpływu prokinetycyny 1 na proces angiogenezy w ciałku żółtym (zadanie 6)

W ramach zadania badawczego, którego celem było określenie wpływu PROK1 na procesy angiogenezy zachodzące w ciałku żółtym świni, wykonano trzy doświadczenia *in vitro*. W dwóch doświadczeniach wykorzystano

pierwotne komórki endotelialne izolowane z CL zwierząt w 12. dnia cyklu rujowego metodą opartą na wirowaniach i filtrowaniu pozwalającym oddzielić komórki śródbłonka od większych komórek lutealnych obecnych w zawieszynie otrzymanej po enzymatycznej defragmentacji tkanki (Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023). W doświadczeniu trzecim wykorzystano ultracienkie eksplantaty CL, których izolacje i inkubacje *in vitro* opisano w Publikacji 1 (BARYLA I WSP. 2023).

Wpływ PROK1 na formowanie struktur kapilaropodobnych przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych ciała żółtego (Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023)

Analizę formowania się struktur kapilaropodobnych wykonano zgodnie z wcześniej opracowanym w zespole protokołem (KACZYNSKI I WSP. 2020, GORYSZEWSKA I WSP. 2020). Komórki śródbłonka naczyń ($3 \times 10^5/\text{ml}$) zawieszono w medium MCDB131 i poddano 20.-minutowej preinkubacji w obecności lub bez PC7 ($1 \mu\text{M}$). Następnie dodano PROK1 (40 nM) i komórki naniesiono na uprzednio przygotowaną płytkę typu μ -slide (Ibidi) pokrytą matrigielem (Corning). Płytkę umieszczono w mikroskopie do analiz przyżyciowych (Carl Zeiss Microscopy). Obserwację prowadzono przez 5 godzin wykonując zdjęcia w 30. minutowych odstępach. Analizę zdjęć wykonano stosując nakładkę Angiogenesis Analyzer dla programu Image J (CARPENTIER 2012). Program wyodrębnił i wygenerował dane liczbowe dla dwudziestu parametrów opisujących proces angiogenezy. Na podstawie otrzymanych pomiarów przygotowana została analiza statystyczna.

Wpływ PROK1 na proliferację komórek endotelialnych wyizolowanych z ciała żółtego (Publikacja 2, BARYLA I WSP. 2024)

Badanie wpływu PROK1 na proliferację komórek endotelialnych prowadzono na płytkach 96-dołkowych zgodnie z protokołem wcześniej stosowanym w zespole (GORYSZEWSKA I WSP. 2020). Komórki ($10^4/\text{dołek}$) hodowano do uzyskania konfluencji 50-60% w medium zawierającym 10% NCS. Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji komórki inkubowano z medium kontrolnym z 1% NCS oraz medium zawierającym PROK1 (40 nM) w obecności lub bez PC7 ($1 \mu\text{M}$), inhibitora kinazy MAPK ($25 \mu\text{M}$; Sigma

Aldrich), inhibitora kinazy AKT (2.5 μ M; Sigma Aldrich) oraz inhibitora kinazy mTOR (50 nM; Sigma Aldrich). Po 24-godzinnej inkubacji dodano odczynnik CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), po upływie 2 godzin określono poziom proliferacji komórek na podstawie odczytu absorbancji przy długości fali 490 nm zgodnie z instrukcją producenta.

Wpływ PROK1 na ekspresję genów czynników angiogennych i sekrecję VEGFA przez tkankę ciąka żółtego świni (Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023)

W doświadczeniu trzecim, w którym wykorzystano ultracienkie eksplantaty CL, zbadano wpływ PROK1 na ekspresję genów związanych z procesem angiogenezy, w tym: *ANG*, *ANGPT2*, *FGF2*, *FLT1*, *KDR* oraz określono wpływ PROK1 na sekrecję VEGFA do medium hodowlanego. Pełny opis metody znajduje się w Publikacji 1 (BARYLA I WSP. 2023). W skrócie, ultracienkie eksplantaty CL hodowano tak jak opisano w podrozdziale 2.6. Analizę ekspresji genów wykonano za pomocą metody real-time RT-PCR, natomiast zawartości VEGFA określono metodą ELISA.

2.10. Izolacja RNA oraz analiza real-time RT-PCR

Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Całkowite RNA wyizolowano przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów. W przypadku prób *ex vivo* zastosowano zestaw i procedurę firmy A&A Biotechnology, natomiast do próbek z doświadczeń *in vitro* użyty został zestaw i procedura firmy Qiagen. Jakość i ilość wyizolowanego materiału oceniona została z wykorzystaniem bioanalizatora Agilent oraz NanoDrop1000. Następnie otrzymane RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji stosując reagenty firmy Life Technologies. Otrzymane cDNA posłużyło jako matryca w reakcji real-time PCR.

Real-time PCR

Analizy real-time PCR dla wszystkich genów wykonano z zastosowaniem sond TaqMan (materiały uzupełniające, Tabela 2, BARYLA I WSP. 2023) stosując odczynniki dostarczone przez producenta. Przeprowadzono następujący program reakcji: wstępna denaturacja (95°C, 10 min), następnie 40 cykli, na które składała się denaturacja (95°C, 15 s), oraz

wydłużanie produktu (60°C, 1 min). Reakcje real-time PCR wykonano z wykorzystaniem systemu Applied Biosystems 7900HT. Poziom ekspresji genów, wyrażony w jednostkach umownych, oszacowano w programie PCR Miner (ZHAO & FERNALD 2005). Do wyliczenia jednostek ekspresji zastosowano następującą formułę:

$$\text{poziom ekspresji genu [AU]} = \frac{1}{(1 + \text{avg eff})^{CT}},$$

gdzie: [AU] – jednostki umowne; avg eff – średnia wydajność reakcji PCR liczona oddzielnie dla każdej próby; CT – numer pierwszego cyklu real-time PCR, w którym wykrywana jest emisja fluorescencji z powstałego produktu PCR.

W celu znormalizowania otrzymanych danych za pomocą programu NormFinder (ANDERSEN I WSP. 2004) wytypowano pary najbardziej stabilnych genów referencyjnych spośród beta aktyny (*ACTB*), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) i cyklofiliny (*PPIA*). Dla prób z doświadczeń *ex vivo* oraz *in vivo* była to para *ACTB* i *PPIA*, a dla eksplantatów po hodowli *in vitro* – *GAPDH* i *PPIA*. Średnie geometryczne wyliczone dla odpowiednich wartości ustalonych par genów referencyjnych posłużyły do znormalizowania uzyskanych danych.

2.11. Western blot

Ciała żółte homogenizowano w buforze do homogenizacji (50 mM/L TRIS-HCl, pH 8.0; 150 mM/L NaCl; 1 mM/L EDTA) zawierającym koktajl z inhibitorami proteaz. Po wirowaniu supernatant przeniesiono do nowych probówek. W supernatancie oznaczono całkowite stężenie białka metodą Bradford (BRADFORD 1976). Następnie, odpowiednią ilość białka (70 µg - badanie ekspresji PROK1 w próbach *ex vivo* oraz 50 µg - badanie ekspresji PROKR1 i PROKR2), rozpuszczono w buforze SDS (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, and 2% β-merkaptioetanol) i poddano denaturacji w temperaturze 95°C przez 4 minuty. Tak przygotowane próby rozdzielono na żelach Tris-Tricine SDS-PAGE (PROK1) lub 10% Tris-Glicyna SDS-PAGE (PROKR1 i PROKR2). Rozdzielone białka poddano transferowi na membrany PVDF o porowatości 0,2 µm (PROK1) lub 0,4 µm (PROKR1 i PROKR2).

Membrany po transferze poddano blokowaniu w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (TBS) zawierającym 0,1% Tween 20 (TBS-T). Membrany inkubowano przez noc w temp. 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi (materiały uzupełniające, Tabela 1; BARYLA I WSP. 2023). Następnego dnia membrany trzykrotnie płukano w buforze TBS-T, po czym inkubowano je w temp. pokojowej w obecności przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą przez 90 minut. W celu detekcji białek GAPDH membrany były trzykrotnie przemywane w buforze TBS-T, ponownie blokowane w 5% odtłuszczonym mleku przez 1,5 godziny, a następnie inkubowane przez noc w 4°C w obecności przeciwciał pierwszorzędowych anty-GAPDH. Następnego dnia membrany po płukaniu w TBS-T były ponownie inkubowane z przeciwciałami drugorzędowymi. Kontrole negatywne otrzymano poprzez zastąpienie przeciwciał pierwszorzędowych immunoglobulinami IgG. Dodatkowo, jako kontrola negatywna dla any-PROKR1, wykonano wiązanie przeciwciał z peptydem blokującym. Kompleksy antygen-przeciwciało zobrazowano stosując wystandaryzowaną procedurę dla alkalicznej fosfatazy w systemie ChemiDoc™ MP Imaging System. Intensywność sygnału chemiluminescencji przyjęto jako umowną jednostkę wartości ekspresji. Normalizacji wyników dokonano poprzez podzielenie wartości ekspresji badanych białek przez wartość ekspresji białka GAPDH (oddzielenie dla każdej próby).

2.12. ELISA

Stężenie PROK1 w homogenatach tkanek uzyskanych z doświadczenia *in vivo* oraz PROK1 i VEGFA w medium po inkubacji eksplantatów ciała żółtego oznaczono za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów ELISA (R&D Systems DY1209 oraz Thermo Fisher Scientific ES25RB) zgodnie z zaleceniami producenta.

2.13. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna danych została przeprowadzona za pomocą oprogramowania GraphPad PRISM w wersjach 9.0.0 (Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023) oraz 10.2.2 (Publikacja 2, BARYLA I WSP. 2024) (GraphPad Software, Inc.). Wyniki uzyskane w zadaniu badawczym 1 poddano

dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) z zastosowaniem testu post hoc Bonferroniego. Dla części *in vivo* oraz wyników części *in vitro* z udziałem PGF2 α w zadaniu badawczym 3 zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem post hoc Tukey'a. Natomiast wyniki części *in vitro* zadania 3, związane z badaniem E2 i PGE2, analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z testem post hoc Tukey'a. Dwuczynnikową analizę wariancji z testem post hoc Tukey'a zastosowano również w analizie wyników zadań badawczych 4 i 6 (analiza ekspresji genów). Jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post hoc Tukey'a została użyta do analizy wyników zadań badawczych 5 i 6 (analiza proliferacji i formowania się struktur kapilaropodobnych), z wyjątkiem analizy żywotności eksplantatów w grupie kontrolnej, gdzie porównanie między początkiem a końcem inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t Studenta. Wszystkie różnice uznawano za statystycznie istotne przy poziomie ufności 95% ($p < 0,05$).

3. WYNIKI

3.1. Określenie profili ekspresji mRNA i białek PROK1 oraz jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym w czasie cyklu rujowego i we wczesnej ciąży (zadanie 1)

Ekspresja mRNA *PROK1* w CL wzrastała w 12. i 14. dniu ciąży w porównaniu do 9. dnia ciąży ($p < 0.05$). Ekspresja białka PROK1 w CL była istotnie wyższa w 14. dniu ciąży w porównaniu do 14. dnia cyklu rujowego ($p < 0.05$), a także 9. dnia ciąży ($p < 0.05$). Ekspresja genu *PROKR1* w CL zwiększała się w 12. i 14. dniu ciąży w porównaniu do dnia 9. ciąży. Badanie ekspresji białka PROKR1 nie wskazało istotnych zmian podczas badanych dni cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. Ekspresja genu *PROKR2* w CL znacząco wzrastała w 14. dniu cyklu w porównaniu do 9. i 12. dnia cyklu rujowego, a także w porównaniu do 14. dnia ciąży ($p < 0.001$). Nie wykazano zmian w profilu ekspresji białka PROKR2 w analizowanych dniach cyklu i ciąży ($p > 0.05$) w tkance lutealnej (Rycina 1, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

3.2. Określenie lokalizacji ekspresji białek prokinetycyny 1 oraz jej receptorów w ciałku żółtym (zadanie 2)

Wyniki analizy immunohistochemicznej wykazały, że zarówno białko PROK1, jak i białka jej receptorów ulegały ekspresji w komórkach lutealnych, a także w komórkach tworzących naczynia krwionośne ciała żółtego. Żadne z białek nie ulegało ekspresji w osłonce CL (Rycina 2, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

3.3. Zbadanie wpływu sygnałów zarodkowych (E2, PGE2) oraz czynnika luteolitycznego (PGF2 α) na ekspresję mRNA i białek PROK1 i jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałku żółtym *in vivo* i *in vitro* (zadanie 3)

Wyniki uzyskane w doświadczeniu *in vitro* wykazały, że ekspresja genu oraz białka PROK1 i PROKR1 w CL jest stymulowana działaniem E2 (100 nM; $p < 0.05$). Ponadto, stymulujący efekt E2 był znoszony po zastosowaniu antagonisty receptora estrogenowego (ICI 182,780), co znaczy, że E2 wpływa na ekspresję PROK1-PROKR1 działając bezpośrednio poprzez swoje receptory.

Nie wykazano wpływu E2 na ekspresję genu i białka PROKR2 w CL świni (Rycina 1, Publikacja 2, BARYLA I WSP. 2024).

Wyniki analizy real-time PCR nie wykazały wpływu PGF2 α , ani FLP na zawartość transkryptów *PROKR1* oraz *PROKR2*, natomiast pod wpływem 100 nM PGF2 α wzrosła ekspresja *PROK1* w eksplantatach ciała żółtego pochodzących od loszek z 12. dnia cyklu rujowego. Analiza Western blot wykazała hamujący wpływ obu dawek PGF2 α oraz FLP na zawartość białka PROKR1 w eksplantatach CL w 15. dniu ciąży ($p < 0.05$) (Rycina 3, Publikacja 2, BARYLA I WSP. 2024).

W doświadczeniu *in vivo* wykazano bezpośredni stymulujący lokalny efekt estradiolu działającego samodzielnie (33.3 μg /infuzję) oraz razem z PGE2 (833 ng E2/ infuzję + 200 μg /infuzję) na ekspresję genu *PROK1* w CL świni. Wykazano także wpływ podawania hormonów na ekspresję białka PROK1 w CL. Był to efekt niezależny od lokalizacji ciałek żółtych (tzn. niezależnie czy CL było zlokalizowane na jajniku przy rogu macicy, do którego podawano hormon czy w jajniku przeciwnym do rogu macicy, do którego podawano hormon). Ekspresja białka PROK1 była istotnie wyższa u zwierząt otrzymujących zarówno E2 (33.3 μg /infuzję), jak i PGE2 (200 μg /infuzję), ale również tych którym podawano E2 (833 ng/infuzję) z PGE2 oraz E2 (33.3 μg /infuzję) z PGE2 w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt otrzymujących wyłącznie placebo ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, odpowiednio). Wykazano stymulujący bezpośredni lokalny efekt estradiolu (33.3 μg /infuzję) działającego samodzielnie oraz w połączeniu z PGE2 na ekspresję genu *PROKR1* ($p < 0.05$) w CL. Działanie E2 i PGE2 (odpowiednio 33.3 μg /infuzję; 200 μg /infuzję) skutkowało większą zawartością ($p < 0.05$) białka PROKR1 w ciałku żółtym w porównaniu do jego zawartości w CL na jajniku przylegającym do rogu macicy otrzymującego infuzję placebo. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji genu i białka PROKR2 pod wpływem E2 działającego samodzielnie, ani w połączeniu z PGE2 (Rycina 2, Publikacja 2, BARYLA I WSP. 2024).

3.4. Określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak steroidogenezy oraz na uwalnianie progesteronu przez ciało żółte (zadanie 4)

Wyniki analizy ekspresji genów wskazały, że PROK1 w eksplantatach CL z 12. dnia ciąży istotnie zwiększała ekspresję genów *STAR*, *HSD3B1* oraz *CYP11A1* ($p<0.0001$; $p<0.0001$; $p<0.05$, odpowiednio). Natomiast w 12. dniu cyklu rujowego obniżała ekspresję *CYP11A1* ($p<0.05$). Analiza zawartości P4 w medium wykazała, że PROK1 zwiększała sekrecję P4 do medium przez eksplantaty CL z 12. i 14. dnia ciąży ($p<0.05$, $p<0.01$, odpowiednio) oraz 14. dnia cyklu rujowego ($p<0.05$). We wszystkich analizach tego zadania PC7 znosił efekt PROK1, wskazując tym samym na zaangażowanie receptora PROKR1 w opisane regulacje (Rycina 3, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

3.5. Badanie wpływu PROK1 na żywotność tkanki ciała żółtego oraz apoptozę komórek lutealnych (zadanie 5)

Metaboliczna aktywność eksplantatów CL nie była istotnie zmieniona między czasem, w którym rozpoczęto doświadczenie, a 18-godziną inkubacją ($100\pm 7.29\%$ vs. $91.32\pm 0.87\%$). Wykazano, że podanie PROK1 i PC7 nie zmniejszyło żywotności eksplantatów w doświadczeniu w porównaniu do kontroli. Prokinetycyna 1 zwiększyła żywotność eksplantatów CL ($p<0.05$) w hodowli *in vitro* względem kontroli po upływie 18 godzin inkubacji, a podanie PROK1 wraz z PC7 zniosło stymulujący efekt badanego czynnika (Rycina 4, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

Badanie wpływu PROK1 na apoptozę komórek lutealnych przeprowadzono poprzez detekcję sygnału jodku propidyny oraz kompleksu FITC-aneksyny V na cytometrze przepływowym. Wyniki wykazały, że PROK1 obniżała ilość apoptotycznych komórek lutealnych ($p<0.05$). Komórki lutealne, podobnie jak eksplantaty ciała żółtego w hodowli *in vitro*, wykazywały również istotnie większą żywotność po inkubacji w obecności PROK1 (40 nM), niż komórki inkubowane z medium kontrolnym ($p<0.05$) (Rycina 5, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

3.6. Zbadanie wpływu PROK1 na proces angiogenezy w ciałku żółtym (zadanie 6)

W celu zbadania wpływu PROK1 na proces angiogenezy, badano formowanie się struktur kapilaropodobnych przez pierwotne komórki śródbłónka naczyń krwionośnych pochodzących z CL. Wyizolowane komórki scharakteryzowano metodą immunofluorescencyjną, wykazując obecność markera komórek endotelialnych - czynnika von Willebrand'a (Materiały uzupełniające Rycina 4, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023). Wyniki analizy z udziałem komórek śródbłónka naczyń krwionośnych, w której badano formowanie się struktur kapilaropodobnych, wykazały, że PROK1 stymulowała ten proces, wpływając korzystnie na 16 z 20 analizowanych parametrów. W szczególności zaobserwowano wzrost liczby węzłów, z których odchodzą trzy rozgałęzienia, liczby węzłów ograniczających segmenty, oraz liczby węzłów tworzących oczka. Dodatkowo, PROK1 zwiększała liczbę segmentów wchodzących w skład oczek, liczbę oczek, całkowitą długość segmentów oraz segmentów wchodzących w skład oczek, a także całkowitą powierzchnię oczek. Zwiększeniu ulegały również liczba segmentów i rozgałęzień, całkowita długość rozgałęzień, średnia odległość między rozgałęzieniami, a także średnia odległość między węzłami w oczkach oraz średni rozmiar oczek ($p<0,05$). Stymulujący efekt PROK1 na tworzenie struktur kapilaropodobnych znoszony był przez PC7 (Rycina 6, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

W kolejnym etapie określenia wpływu PROK1 na proces angiogenezy, badano proliferację pierwotnych komórek śródbłónka naczyń krwionośnych izolowanych z CL. Wykazano, że PROK1 stymuluje proliferację komórek endotelialnych ($p<0,05$). Prokinetycyna 1 stymulowała ten proces przez aktywację szlaków sygnałowych MAPK ($p<0,05$), AKT 1/2 ($p<0,01$) oraz mTOR ($p<0,01$). Ponadto, stymulujący efekt PROK1 znoszony był przez PC7 ($p<0,05$) (Rycina 4, Publikacja 2, BARYLA I WSP. 2024).

Analiza ekspresji genów dowiodła, że PROK1 stymulowała ekspresję genu *ANG* w eksplantatach CL z 12. dnia ciąży ($p<0,01$). Analiza pomiaru stężenia VEGFA w medium pochodzącym wykazała, że pod wpływem PROK1 uwalnianie VEGFA wzrastało w eksplantatach CL pobranych w 12.

dniu ciąży ($p < 0.05$), oraz w 14. dniu cyklu ($p < 0.01$) i 14. dniu ciąży ($p < 0.05$). Stymulujący efekt PROK1 był znoszony po zastosowaniu PC7 (Rycina 7, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023). Nie wykazano wpływu PROK1 na ekspresję mRNA *ANGPT2*, *FGF2*, *FLT1* oraz *KDR* (Rycina 7, Publikacja 1, BARYLA I WSP. 2023).

4. DYSKUSJA

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy opisują rolę prokinetycyny 1 i jej receptorów w procesach kluczowych dla funkcji ciała żółtego świni podczas fazy środkowo-lutealnej (wysoka aktywność lutealna) i w późnej fazie lutealnej (zmniejszona aktywność lutealna) cyklu rujowego, jak również w odpowiadających im dniach ciąży. W badaniach zastosowano modele *ex vivo*, *in vitro* oraz *in vivo*, które umożliwiły poznanie mechanizmu działania PROK1 w CL świni.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że ekspresja mRNA *PROK1* w CL jest podwyższona w fazie środkowo-lutealnej cyklu rujowego, co jest zgodne z wynikami badań dotyczących CL krowy i kobiety (BARYLA I WSP. 2023; FERRARA I WSP. 2003; FRASER I WSP. 2005; KISLIOUK I WSP. 2007). W późnej fazie lutealnej obserwowano spadek ekspresji genu *PROK1* w CL świni, podczas gdy u bydła pozostaje ona wciąż podwyższona w tym okresie (KISLIOUK I WSP. 2007; BARYLA I WSP. 2023). Zwiększona ekspresja *PROK1* oraz jej receptora *PROKR1* w CL krowy w późnej fazie lutealnej może być istotna w regulacji migracji monocytów do ciała żółtego podczas procesu luteolizy. Różnice międzygatunkowe w ekspresji PROK1 w CL świni i krowy mogą wynikać z faktu, iż dzień cyklu rujowego, w którym dochodzi do regresji ciała żółtego u tych zwierząt jest różny. Ponadto, w badaniach dotyczących CL u krowy, autorzy podawali egzogenną PGF2 α co umożliwiło precyzyjne określenie początku luteolizy. Celem opisanych w pracy doktorskiej badań było jednak poznanie fizjologicznych poziomów PROK1 u świni, bez oceny wpływu podawania egzogennie hormonu. Z drugiej strony, opisane w pracy wyniki dotyczące ekspresji genów *PROK1* i podwyższonej ekspresji jej receptora *PROKR2* w okresie luteolizy (BARYLA I WSP. 2023) korespondują z wynikami badań przeprowadzonych na CL krowy, które wykazały, że czynniki stresogenne, charakterystyczne dla procesu luteolizy, takie jak ograniczenie substancji odżywczych, hipoksja oraz wysokie stężenie czynnika wzrostu nowotworów (TNF α), stymulowały ekspresję receptora *PROKR2* w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych CL, ale nie miały wpływu na poziom ekspresji *PROK1* (KISLIOUK I WSP. 2005). Warto nadmienić, że sugeruje się, iż PROK1 działając poprzez PROKR2 może

wykazywać działanie antyapoptotyczne na komórki śródbłónka naczyń krwionośnych w CL krowy (KISLIOUK I WSP. 2005).

Wcześniejsze badania systemu PROK1-PROKR w jajniku u ssaków dotyczyły przede wszystkim ekspresji genów. W ramach prezentowanej pracy doktorskiej zbadany został także profil ekspresji białka PROK1 oraz jej receptorów. Profile ekspresji mRNA i białka PROK1 były podobne. Zarówno poziomy mRNA, jak i białka PROK1 były wyższe w CL pochodzącym z 14. dnia ciąży w porównaniu do 9. dnia ciąży. Pomimo zmian w zawartości mRNA receptorów *PROKR1* i *PROKR2* podczas środkowej i późnej fazy lutealnej oraz w 14. dniu ciąży, ekspresja białek PROKR1 i PROKR2 nie ulegała istotnym zmianom w badanych okresach. Rozbieżności między poziomami mRNA i białek dla PROK1 oraz jej receptorów w CL świni mogą wynikać z faktu, że transkrypcja i translacja nie zawsze bezpośrednio korelują ze sobą. Synteza białka z określonej liczby kopii mRNA może być wzmocniona lub zahamowana w zależności od różnych mechanizmów molekularnych opisanych w literaturze (GRY I WSP. 2009; MAIER I WSP. 2009). Ponadto, rozbieżności między ekspresją mRNA i białka mogą być spowodowane przesunięciem czasowym pomiędzy syntezą mRNA a syntezą białka. Najprawdopodobniej maksymalna ekspresja mRNA *PROK1* w 12. dniu ciąży skutkowałą największą ekspresją białka PROK1 nieco później, w 14. dniu ciąży. Podobnie w przypadku zwiększonej ilości transkryptu *PROKR2* w CL świni w 14. dniu cyklu rujowego, możliwe jest, że do zwiększonej ekspresji białka doszło w późniejszym dniu cyklu rujowego. Innym wyjaśnieniem rozbieżności pomiędzy ekspresją genu i białka PROK1 oraz jej receptorów może być fakt, że technika Western blot jest metodą półilościową. Jej dokładność i czułość jest niższa niż qPCR, która jest metodą ilościową. W związku z tym subtelne różnice pomiędzy poziomami ekspresji mogły pozostać niezauważalne.

Pomimo doniesień na temat ekspresji PROK1 w CL u różnych gatunków ssaków, badania przedstawione w niniejszej pracy są pierwszymi, które dotyczą profili ekspresji genu i białka PROK1 oraz jej receptorów w ciałku żółtym podczas wczesnej ciąży. Zawartość transkryptu i białka PROK1 zwiększała się w CL podczas ciąży, w okresie macicznego rozpoznania ciąży przez organizm samicy oraz implantacji zarodka (BARYLA I WSP. 2023). Sugeruje to, że rola

PROK1 w ciałku żółtym może być szczególnie istotna w mechanizmach luteotropowych/antyluteolitycznych, zapewniających przedłużoną funkcję ciała żółtego (BARYLA I WSP. 2023). Zwiększoną ekspresję PROK1 w okresie wczesnej ciąży zaobserwowano także w endometrium u świni oraz u kobiet w czasie implantacji zarodka (EVANS I WSP. 2008; HOFFMANN I WSP. 2009; GORYSZEWSKA I WSP. 2020).

Sygnały wydzielane przez rozwijające się zarodki są kluczowe dla wywołania fizjologicznej odpowiedzi organizmu matki, tworząc odpowiednie środowisko dla ustanowienia i rozwoju ciąży. W okresie tzw. maczynego rozpoznania ciąży (między 11. a 12. dniem) oraz w okresie implantacji zarodków i rozwoju łożyska (między 15. a 25. dniem), zarodki świni wydzielają zwiększone ilości estrogenów, głównie E2 (PERRY I WSP. 1973; BAZER & THATCHER 1977, BAZER I WSP. 1982) oraz PGE2 (WACLAWIK I WSP. 2007). Prostaglandyna E2 dociera do jajników, gdzie podobnie jak E2 uczestniczy w procesach zapobiegających regresji ciała żółtego (CHRISTENSON I WSP. 1994; WACLAWIK I WSP. 2008). Poprzednie badania naszego zespołu wykazały, że PGE2 wzmacnia wpływ sygnału zarodkowego (E2) działającego w endometrium świni we wczesnej ciąży (KACZYNSKI I WSP. 2021). Z uwagi na wzrost ekspresji mRNA *PROK1* i *PROKR1* oraz wzrost ekspresji białka PROK1 w CL w okresie maczynego rozpoznania ciąży (BARYLA I WSP. 2023), celem dalszych badań było określenie czy E2 i PGE2 regulują ekspresje PROK1 oraz PROKR1 w CL świni. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej na modelu *in vivo*, w którym naśladowano wydzielanie sygnałów zarodkowych (E2 i PGE2), wykazały, że hormony te zwiększają ekspresję mRNA i białka PROK1 oraz PROKR1 w CL świni (BARYLA I WSP. 2024). Wyniki te są zgodne z rezultatami naszych poprzednich badań, w których wskazaliśmy, że ekspresja mRNA *PROK1* i *PROKR1* jest stymulowana przez E2 w endometrium świni *in vivo* (GORYSZEWSKA I WSP. 2021). Dalsze badania przeprowadzone na modelu *in vitro*, w którym prowadzono hodowle tkankowe eksplantatów ciała żółtego, wykazały, że E2 reguluje ekspresję PROK1 w CL działając poprzez receptory estrogenowe (BARYLA I WSP. 2024). W poprzednich badaniach wykazano, że podobna regulacja PROK1 przez sygnały zarodkowe zachodzi w różnych tkankach (BROUILLET I WSP. 2012; GORYSZEWSKA I WSP.

2021). Wyniki te korespondują z naszymi wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi stymulującego wpływu sygnału zarodkowego (E2) na ekspresję PROK1 w endometrium świni *in vitro* (GORYSZEWSKA I WSP. 2021). Ponadto, wykazano, że ludzki sygnał zarodkowy (gonadotropina kosmówkowa, hCG) stymuluje ekspresję PROK1 i jej receptorów w łożysku (BROUILLET I WSP. 2012). Regulacja ekspresji PROK1 i PROKR1 w CL przez sygnały zarodkowe (E2 i PGE2) sugeruje istotną rolę PROK1 w mechanizmach ochrony ciała żółtego przed luteolizą, które zbadano i opisano w niniejszej pracy doktorskiej. Prezentowane wyniki, uzyskane z wykorzystaniem modeli *in vitro* oraz *in vivo*, wykazały brak regulacji ekspresji genu i białka PROKR2 w CL świni przez E2 i PGE2 (BARYLA I WSP. 2024). W związku z tym można przypuszczać, że receptor ten nie odgrywa istotnej roli w CL we wczesnej ciąży (BARYLA I WSP. 2023).

Znaczący wzrost poziomu białka PROKR2 w tkance lutealnej zaobserwowano jednak we wczesnym etapie luteolizy (BARYLA I WSP. 2023), co może sugerować udział czynników luteolitycznych w tej regulacji. Prostaglandyna F2 α jest uważana za główny czynnik inicjujący luteolizę u ssaków (MCCRACKEN I WSP. 1999). U świni, po związaniu z receptorem PTGFR, PGF2 α inicjuje proces luteolizy funkcjonalnej po 12. dniu cyklu rujowego (MOELJONO I WSP. 1977; DIAZ & WILTBANK 2005; DE RENSIS I WSP. 2012; CHANG I WSP. 2018;). Wyniki badań przeprowadzonych w prezentowanej pracy doktorskiej na modelu *in vitro* ultracienkich eksplantatów CL inkubowanych z PGF2 α lub jej stabilnym analogiem (fluprostenolem), wykazały stymulujący wpływ PGF2 α na ekspresję genu *PROK1* w eksplantatach ciała żółtego pobranych od loszek w 12. i 14. dniu cyklu rujowego (BARYLA I WSP. 2024). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, według których w CL krowy, w odpowiedzi na PGF2 α *in vivo* ekspresja genu *PROK1* wzrosła, co sugeruje, że PROK1 może odgrywać rolę w procesie luteolizy poprzez zwiększenie migracji leukocytów do ulegających regresji ciałek żółtych (KISLIOUK I WSP. 2007). Co ciekawe, w grupach kontrolnych zaobserwowano znacznie wyższe poziomy białka PROK1 w eksplantatach tkanki lutealnej pobranej od loszek w 14. dniu ciąży w porównaniu z 14. dniem cyklu rujowego (BARYLA I WSP. 2024). Wynik ten jest zgodny z profilem ekspresji PROK1 w CL

świni omawianym wyżej, wskazującym na podwyższoną ekspresję białka PROK1 w CL świni pobranych w 14. dniu ciąży w porównaniu z 14. dniem cyklu rujowego (BARYLA I WSP. 2023). Natomiast w przeciwieństwie do wcześniejszych wyników badań uzyskanych u bydła (KISLIOUK I WSP. 2007), wyniki pracy doktorskiej wykazały, że PGF2 α nie wpływała na ekspresję mRNA i białka PROKR1 *in vitro* w tkance ciała żółtego świni pobranej podczas fazy lutealnej. Stwierdzono również, że PGF2 α nie regulowała ekspresji PROKR2 w CL *in vitro* (BARYLA I WSP. 2024). Wcześniejsze badania wykazały również, że ekspresja mRNA *PROKR2* w ciałku żółtym krowy nie ulegała zmianie w odpowiedzi na podawanie egzogennej PGF2 α *in vivo* (KISLIOUK I WSP. 2007).

Kolejnym etapem badań niniejszej pracy doktorskiej była immunolokalizacja białek PROK1 oraz jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w CL świni podczas cyklu rujowego oraz ciąży. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały obecność badanych białek w komórkach steroidogennych oraz naczyniach krwionośnych w CL świni w środkowej i późnej fazie lutealnej oraz we wczesnej ciąży (BARYLA I WSP. 2023). Rezultaty tych badań sugerują, że PROK1 działa w tkance lutealnej świni w sposób autokrynnny i/lub parakrynnny. Podobne wyniki dotyczące lokalizacji PROK1 opisano dla CL u bydła oraz u ludzi (FERRARA I WSP. 2003; FRASER I WSP. 2005; KISLIOUK I WSP. 2007). Wspólna lokalizacja PROK1 i jej receptorów w naczyniach krwionośnych oraz komórkach steroidogennych sugeruje istotny wpływ PROK1 na kluczowe procesy związane z funkcją CL, takie jak steroidogeneza i angiogeneza.

Podwyższony poziom ekspresji PROK1 oraz PROKR1 w ciałku żółtym świni podczas wczesnej ciąży oraz ich regulacja przez sygnały zarodkowe w okresie macicznego rozpoznania ciąży sugerują jej ważną rolę w czynności wydzielniczej CL. W związku z tym, celem kolejnych badań w prezentowanej pracy doktorskiej było zbadanie czy PROK1 jest zaangażowana w procesy kluczowe dla funkcji CL, takie jak steroidogeneza, regulacja apoptozy komórek lutealnych i angiogeneza. Wykorzystując model ultracienkich eksplantatów ciała żółtego wykazano, że PROK1 stymulowała ekspresję czynników zaangażowanych w steroidogenezę (*HSD3B1*, *STAR* i *CYP11A1*) oraz zwiększała wydzielanie P4 przez tkankę CL pobraną w 12. dniu ciąży *in vitro*. Ponadto, uwalnianie P4 przez eksplantaty CL było zwiększone przez PROK1

także w 14. dniu ciąży i 14. dniu cyklu rujowego (BARYLA I WSP. 2023). Może to wynikać z faktu, że pomiar ekspresji genów i wydzielania P4 został przeprowadzony w tym samym czasie. Do wzrostu sekrecji P4 mogło dojść w tkance pobranej w 14. dniu ciąży/cyklu rujowego w późniejszym czasie. Innym możliwym wyjaśnieniem jest pośrednia regulacja syntezy P4 w CL przez PROK1 w 14. dniu ciąży/cyklu rujowego poprzez mechanizmy takie jak: wychwyt lub magazynowanie cholesterolu lub LDL, metabolizm P4 lub działanie VEGFA indukowanego przez PROK1, które poprzez wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych może zwiększać dostępność substratów do produkcji P4. Kolejną przyczyną zwiększonego wydzielania P4 przez tkankę ciała żółtego ulegającego regresji w 14. dniu cyklu rujowego mogło być to, że potencjalny efekt PROK1 został utrzymany, ponieważ tkanka lutealna została oddzielona od sygnałów luteolitycznych oddziałujących w warunkach *in vivo*. Z drugiej strony wyniki dotyczące ekspresji genów czynników zaangażowanych w steroidogenezę i sekrecję P4 przez eksplantaty CL pobranych w 12. dniu ciąży były zgodne. Prezentowane wyniki jako pierwsze dokumentują wpływ PROK1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak syntezy P4 oraz na produkcję P4 przez tkankę lutealną, co dotychczas nie zostało zbadane u żadnego z gatunków zwierząt. Wcześniejsze badania, w których wykorzystano linię komórkową ludzkich komórek granulozy poddanych luteinizacji (SVOG) sugerowały, że steroidogeneza i zwiększona ekspresja genu *PROK1* mogą być ze sobą powiązane (KISLIOUK I WSP. 2003). Nie przeprowadzono jednak doświadczeń w celu zbadania tej regulacji (KISLIOUK I WSP. 2003). Ponadto, wykazanie stymulującego wpływu PROK1 na ekspresję genów *STAR* i *HSD3B1* jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi zwiększonych poziomów mRNA dla tych genów w CL świni w 14. dniu ciąży (PRZYGRODZKA I WSP. 2016).

Wyniki dalszych badań prowadzonych w ramach prezentowanej pracy doktorskiej wykazały, że PROK1 hamuje apoptozę komórek lutealnych świni i zwiększa ich żywotność, wspierając tym samym funkcję sekrecyjną CL podczas wczesnej ciąży, gdy obserwuje się podwyższone poziomy PROK1 (BARYLA I WSP. 2023). Nasilony proces apoptozy, będącej rodzajem programowanej śmierci komórki, związany jest z luteolizą. Jednak apoptoza jest

również istotnym procesem w rozwijającym się ciałku żółtym, w którym zachodzą dynamiczne zmiany w przebudowie tkanki. Efekt antyapoptotyczny PROK1 został wykazany również wcześniej, ale w badaniach z udziałem innego typu komórek, tj. w komórkach śródbłona naczyń krwionośnych w CL u bydła (KISLIOUK I WSP. 2005).

Prokinetyna 1 jest znana jako czynnik stymulujący angiogenezę w różnych tkankach (LECOUTER I WSP. 2001; 2003; PODLOVNI I WSP. 2006; BROUILLET I WSP. 2010; GORYSZEWSKA I WSP. 2020; 2021). Intensywność procesów angiogenezy w CL jest większa niż w jakimkolwiek innym organie, a jej dynamika jest porównywalna do tej, obserwowanej w szybko rosnących guzach nowotworowych. Komórki lutealne zużywają od dwóch do sześciu razy więcej tlenu na jednostkę masy niż wątroba, nerki, czy nawet serce (NISWENDER I WSP. 2000). Z tego powodu powstające naczynia krwionośne formują się blisko błon komórkowych komórek lutealnych (60%) lub w przestrzeni śródmiąższowej (29%) ciałka żółtego. W prezentowanej pracy doktorskiej wykazano, że PROK1 działając przez PROKR1 zwiększa formowanie się struktur kapilaropodobnych przez komórki endotelialne wyizolowane z ciałka żółtego, co świadczy o tym, że jest ona istotnym czynnikiem regulującym proces angiogenezy w CL świni (BARYLA I WSP. 2023). Otrzymane wyniki dotyczące stymulacji procesu angiogenezy przez PROK1 w CL są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, potwierdzającymi udział PROK1 w angiogenezie (LECOUTER I WSP. 2001; GORYSZEWSKA I WSP. 2020; GORYSZEWSKA-SZCZUREK I WSP. 2021). Wcześniejsze badania wykazały, że w gruczołach dokrewnych PROK1 reguluje tworzenie mikronaczyń poprzez zwiększenie przeżywalności, migracji i fenestracji komórek endotelialnych (BROUILLET I WSP. 2010). Ponadto, badania *in vivo* potwierdziły proangiogenną rolę PROK1, ponieważ jej podawanie do jajników szczurów zwiększyło intensywność angiogenezy (LECOUTER I WSP. 2001). Wyniki kolejnych badań przeprowadzonych w ramach prezentowanej pracy doktorskiej wykazały, że PROK1, działając poprzez swój receptor (PROKR1), zwiększa proliferację komórek endotelialnych izolowanych z CL od loszek w 12. dniu cyklu rujowego (BARYLA I WSP. 2024). Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, które charakteryzują PROK1 jako mitogen komórek śródbłona

naczyń krwionośnych w różnych tkankach (LECOUTER I WSP. 2003; PODLOVNI I WSP. 2006; LEE I WSP. 2009; BROUILLET I WSP. 2010; GORYSZEWSKA I WSP. 2020; 2021). Zastosowanie specyficznych inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych pozwoliło wykazać, że sygnalizacja PROK1–PROKR zwiększa proliferację komórek endotelialnych w CL poprzez aktywację szlaków MAPK, kinaz AKT oraz mTOR (BARYŁA I WSP. 2024). Wyniki te są zgodne z naszymi wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że PROK1 indukuje proliferację komórek endotelialnych w endometrium świni poprzez fosforylację kinaz MAPK, PI3K i AKT oraz wpływa na szlak mTOR (GORYSZEWSKA I WSP. 2020).

Wyniki badań niniejszej pracy doktorskiej sugerują również, że PROK1 reguluje angiogenezę pośrednio, zwiększając ekspresję genu *ANG* oraz sekrecję VEGFA w tkance lutealnej świni. Co ciekawe, uzyskane wyniki wykazały, że PROK1 zwiększała sekrecję VEGFA w ciałku żółtym świni podczas cyklu rujowego na początku luteolizy (14. dzień cyklu), prawdopodobnie zwiększając w ten sposób przepuszczalność naczyń krwionośnych i ułatwiając migrację komórek układu immunologicznego w czasie luteolizy do CL (KISLIOUK I WSP. 2007). Natomiast, w przypadku svin ciężarnych, PROK1 stymulowała sekrecję VEGFA przez tkankę lutealną w 12. i 14. dniu. Może to sugerować różne role PROK1 w zależności od stanu fizjologicznego. Podczas cyklu rujowego PROK1 może brać udział w procesach kontrolujących luteolizę, podczas gdy w ciąży PROK1 może wspierać mechanizmy odpowiedzialne za proces angiogenezy w funkcjonującym CL. Ponadto, uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że PROK1 zwiększa ekspresję mRNA *VEGFA* w komórkach steroidogennych CL u bydła (KISLIOUK I WSP. 2005). Podobna zależność między PROK1 a sekrecją VEGFA została również wykazana w endometrium *in vitro* u świni (GORYSZEWSKA I WSP. 2020).

Podsumowując, wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej charakteryzują rolę PROK1 w ciałku żółtym świni podczas środkowej i późnej fazy lutealnej cyklu rujowego oraz we wczesnej ciąży (Ryc. 8, BARYŁA I WSP. 2023, Ryc. 5, BARYŁA I WSP. 2024). Uzyskane wyniki sugerują, że podczas ochrony CL przed luteolizą, w dniach 12.–14. ciąży, dochodzi do wzrostu ilości mRNA lub/i białka PROK1 oraz PROKR1 pod

wpływem sygnałów zarodkowych (E2 i PGE2). Prezentowane wyniki wskazują, że PROK1, której poziom w CL wzrasta w środkowej fazie lutealnej cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży, działając za pośrednictwem swojego receptora (PROKR1), zwiększa żywotność komórek lutealnych, hamuje ich apoptozę, stymuluje proces steroidogenezy poprzez zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w syntezę progesteronu (*STAR*, *HSD3B1* i *CYP11A1*) oraz podnosi syntezę progesteronu w CL (Ryc. 8, BARYŁA I WSP. 2023). Sygnalizacja PROK1–PROKR1 stymuluje również proces angiogenezy w sposób bezpośredni, poprzez wzrost proliferacji oraz tworzenia się struktur kapilarnych przez komórki śródbłónka naczyń krwionośnych w ciałku żółtym. Wykazano, że PROK1 może stymulować angiogenezę poprzez aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych związanych z MAPK, AKT, i mTOR. Ponadto, PROK1 może również wpływać na proces angiogenezy w sposób pośredni, poprzez zwiększanie sekrecji VEGFA i ekspresji mRNA angiogeniny w tkance lutealnej. Ponadto, wykazanie, że czynnik luteolityczny (PGF2 α) zwiększa ekspresję genu *PROK1* w CL, sugeruje jej potencjalną rolę w procesie luteolizy. Powyższe wyniki wskazują, że PROK1 jest istotnym regulatorem funkcji CL świni w środkowej fazie lutealnej cyklu rujowego oraz we wczesnej ciąży. Realizacja przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badań w znaczny sposób przyczynia się do wzbogacenia wiedzy na temat czynników odpowiedzialnych za funkcjonowanie ciała żółtego, którego czynność sekrecyjna jest krytyczna dla rozwoju wczesnej ciąży u ssaków.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Najważniejszymi osiągnięciami niniejszej pracy doktorskiej było wykazanie, że:

1. Ekspresja genu i białka prokinetycyny 1 oraz genu jej receptora PROKR1 w ciałku żółtym świni wzrasta w okresie zahamowania regresji ciała żółtego podczas wczesnej ciąży.
2. W okresie luteolizy następuje wzrost ekspresji genu *PROKR2* w porównaniu z ekspresją tego genu w fazie środkowo-lutealnej oraz 14. dniem ciąży.
3. Białka PROK1 oraz receptorów PROKR1 i PROKR2 ulegają ekspresji w komórkach steroidogennych oraz naczyniach krwionośnych ciała żółtego.
4. Estradiol-17 β (główny sygnał zarodkowy) oraz jego jednoczesne działanie z prostaglandyną E2 stymuluje ekspresję PROK1 oraz jej receptora PROKR1 w ciałku żółtym *in vitro* oraz *in vivo*.
5. Ekspresja genu i białka PROKR2 nie jest regulowana przez E2 w ciałku żółtym świni. Nie ulega też zmianom ekspresji w okresie wczesnej ciąży.
6. Prostaglandyna F2 α (czynnik luteolityczny) zwiększa ekspresję genu *PROK1* w 12. i 14. dniu cyklu rujowego w ciałku żółtym świni.
7. Prokinetycyna 1 stymuluje syntezę progesteronu, m. in. poprzez wpływ na ekspresję genów czynników uczestniczących w procesie steroidogenezy: *STAR*, *HSD3B1* oraz *CYP11A1* w 12. dniu ciąży.
8. Prokinetycyna 1 hamuje proces apoptozy komórek lutealnych oraz zwiększa żywotność komórek lutealnych i tkanki ciała żółtego świni.
9. Prokinetycyna 1 wykazuje bezpośredni stymulujący wpływ na proces angiogenezy w ciałku żółtym świni przez zwiększenie proliferacji oraz stymulację formowania się struktur kapilaropodobnych przez komórki śródbłónka naczyń krwionośnych.
10. Prokinetycyna 1 zwiększa proces proliferacji komórek endotelialnych ciała żółtego przez aktywację szlaków sygnałowych MAPK, AKT 1/2 oraz mTOR
11. Prokinetycyna 1 stymuluje również proces angiogenezy, w sposób pośredni, przez zwiększenie ekspresji genu angiogeniny 1 oraz uwalnianie VEGFA przez ciało żółte.

WNIOSKI:

1. Regulacja ekspresji PROK1 i PROKR1 w ciałku żółtym przez sygnały zarodkowe (E2 i PGE2) sugeruje istotną rolę PROK1 w mechanizmach ochrony ciała żółtego przed luteolizą we wczesnej ciąży u świni.
2. Uzyskane wyniki wskazują, że prokinetycyna 1 syntezowana i wydzielana w ciałku żółtym świni w zwiększonej ilości w środkowej fazie lutealnej cyklu rujowego oraz podczas wczesnej ciąży, jest istotnym czynnikiem zaangażowanym w procesy związane z funkcjonowaniem ciała żółtego, takie jak synteza progesteronu, angiogeneza, apoptoza komórek lutealnych, stymulacja żywotności komórek lutealnych i tkanki lutealnej.

6. PIŚMIENNICTWO

- ALFAIDY, N. (2016) Prokineticin1 and pregnancy. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 77, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.014>
- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L., ORNTOFT, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer. Res.* 64, 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- ANDERSON, L. L. (1978) Growth, protein content and distribution of early pig embryos. *Anat. Rec.* 190, 143–154
- BARYLA, M., GORYSZEWSKA-SZCZUREK, E., KACZYNSKI, P., BALBONI, G., WACLAWIK, A. (2023) Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. *Sci. Rep.* 13, 5085. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32132-3>
- BARYLA, M., KACZYNSKI, P., GORYSZEWSKA-SZCZUREK, E., WACLAWIK, A. (2024) The regulation of the expression of prokineticin 1 and its receptors and its mechanism of action in the porcine corpus luteum. *Theriogenology* 226, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.05.044>
- BAZER, F. W., THATCHER, W. W. (1977) Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂α by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 14(2), 397–400. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(77\)90185-X](https://doi.org/10.1016/0090-6980(77)90185-X)
- BAZER, F. W., GEISERT, R. D., THATCHER, W. W., ROBERTS, R. M. (1982) The establishment and maintenance of pregnancy in D J A Cole and G R Foxcroft (Editors), *Control of Pig Reproduction* Butterworths, London, pp 227—252.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7(72), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BROUILLET, S., HOFFMANN, P., BENHAROUGA, M., SALOMON, A., SCHAAL, J-P., FEIGE, J-J., ALFAIDY, N. (2010) Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 2832–2843. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0059>
- BROUILLET, S., HOFFMANN, P., CHAUVET, S., SALOMON, A., CHAMBOREDON, S., SERGENT, F., I WSP. (2012) Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell. Mol. Life. Sci.* 69, 1537–1550.
- CARPENTIER, G. (2012) Contribution: Angiogenesis analyzer. *ImageJ News* 5

- CAMPANILE, G., DI PALO, R., NEGLIA, G., VECCHIO, D., GASPARRINI, B., PRANDI, A., GALIERO, G., D'OCCHIO, M. J. (2007) Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* 67(8), 1393-1398. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.001>
- CHANG, J., FRANDSEN, S., D'ANNIBALE-TOLHURST, M., PALUMBO, N., GADSBY, J. (2018) Prostaglandin (PTG) E and F receptors in the porcine corpus luteum; effect of tumor necrosis factor-alpha. *Anim. Reprod. Sci.* 195, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.017>
- CHEN, J., KUEI, C., SUTTON, S., WILSON, S., YU, J., KAMME, F., MAZUR, C., LOVENBERG, T., LIU, C. (2005) Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol. Pharmacol.* 67, 2070–2076. <https://doi.org/10.1124/mol.105.011619>
- CHRISTENSON, L. K., FARLEY, D. B., ANDERSON, L. H., FORD, S. P. (1994) Luteal maintenance during early pregnancy in the pig: role for prostaglandin E2. *Prostaglandins* 47, 61–75. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0090-6980(94)90075-2)
- CONLEY, A. J., FORD, S. P. (1989) Direct luteotrophic effect of oestradiol-17 beta on pig corpora lutea. *J. Reprod. Fertil.* 87, 125–131.
- DE RENSIS, F., SALERI, R., TUMMARUK, P., TECHAKUMPHU, M., KIRKWOOD, R. N. (2012) Prostaglandin F2alpha and control of reproduction in female swine: a review. *Theriogenology* 77, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.035>
- DIAZ, F. J., WILTBANK, M. C. (2005) Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2α of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28, 172–189. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.08.002>
- DOMINGUES, R. R., ANDRADE, J. P. N., CUNHA, T. O., MADUREIRA, G., MOALLEM, U., GOMEZ-LEON, V., MARTINS, J. P. N., WILTBANK, M. C. (2022) Is pregnancy loss initiated by embryonic death or luteal regression? Profiles of pregnancy-associated glycoproteins during elevated progesterone and pregnancy loss. *JDS Commun.* 4(2), 149-154. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0282>
- ELMORE, S. (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- EVANS, J., CATALANO, R. D., MORGAN, K., CRITCHLEY, H. O. D., MILLAR, R. P., JABBOUR, H. N. (2008) Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 149, 2877–2887. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1633>
- FERRARA, N., FRANTZ, G., LECOUTER, J., DILLARD-TELM, L., PHAM, T., DRAKSHARAPU, A., GIORDANO, T., PEALE, F. (2003) Differential expression

of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (vegf) and endocrine gland-derived vegf in normal and polycystic human ovaries. *Am. J. Pathol.* 162, 1881–1893. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64322-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64322-2)

FRASER, H. M., BELL, J., WILSON, H., TAYLOR, P. D., MORGAN, K., ANDERSON, R. A., DUNCAN, W. C. (2005) Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 427–434. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0843>

GINTHER, O. J. (2024) Uteroovarian pathway for embryo-empowered maintenance of the corpus luteum in farm animals. *Theriogenology* 1:216, 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.028>

GORYSZEWSKA, E., KACZYNSKI, P., BALBONI, G. & WACLAWIK, A. (2020) Prokineticin 1-prokineticin receptor 1 signaling promotes angiogenesis in the porcine endometrium during pregnancy. *Biol. Reprod.* 103, 654–668. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa066>

GORYSZEWSKA, E., KACZYNSKI, P., BARYLA, M., WACLAWIK, A. (2021) Pleiotropic role of prokineticin 1 in the porcine endometrium during pregnancy establishment and embryo implantation. *Biol. Reprod.* 104, 181–196. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa181>

GORYSZEWSKA-SZCZUREK, E., BARYLA, M., KACZYNSKI, P., WACLAWIK, A. (2021) Prokineticin 1-prokineticin receptor 1 signaling in trophoblast promotes embryo implantation and placenta development. *Sci. Rep.* 11, 13715. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93102-1>

GRY, M. I WSP. (2009) Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-365>

HOFFMANN, P., SAOUDI, Y., BENHAROUGA, M., GRAHAM, C. H., SCHAAAL, J-P., MAZOUNI, C., FEIGE, J-J., ALFAIDY, N. (2009) Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J. Cell Mol. Med.* 13, 2224–2235. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x>

KACZYNSKI, P., GORYSZEWSKA, E., BARYLA, M. & WACLAWIK, A. (2020) Prostaglandin F2alpha stimulates angiogenesis at the embryo-maternal interface during early pregnancy in the pig. *Theriogenology* 142, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.046>

KACZYNSKI, P., BAUERSACHS, S., GORYSZEWSKA, E., BARYLA, M., WACLAWIK, A. (2021) Synergistic action of estradiol and PGE2 on endometrial transcriptome in vivo resembles pregnancy effects better than estradiol alone. *Biol. Reprod.* 104(4), 818-834. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa230>

- KISLIOUK, T., LEVY, N., HURWITZ, A., MEIDAN, R. (2003) Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3700–3707. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030492>
- KISLIOUK, T., PODLOVNI, H., SPANEL-BOROWSKI, K., OVADIA, O., ZHOU, Q-Y., MEIDAN, R. (2005) Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: Expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* 146, 3950–3958. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0297>
- KISLIOUK, T., FRIEDMAN, A., KLIPPER, E., ZHOU, Q-Y., SCHAMS, D., ALFAIDY, N., MEIDAN, R. (2007) Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol. Reprod.* 76, 749–758. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054734>
- LECOUTER, J., KOWALSKI, J., FOSTER, J., HASS, P., ZHANG, Z., DILLARD-TELM, L., FRANTZ, G., RANGELL, L., DEGUZMAN, L., KELLER, G. A., PEALE, F., GURNEY, A., HILLAN, K. J., FERRARA, N. (2001) Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412, 877–884. <https://doi.org/10.1038/35091000>
- LECOUTER, J., FERRARA, N. (2002) EG-VEGF and the concept of tissue-specific angiogenic growth factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13(1), 3-8. <https://doi.org/10.1006/scdb.2001.0284>
- LECOUTER, J., FERRARA, N. (2003) EG-VEGF and Bv8A novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 276–282. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(03\)00110-5](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(03)00110-5)
- LECOUTER, J., LIN, R. U. I., FERRARA, N. (2004) EG-VEGF: A novel mediator of endocrine-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014, 50–57. <https://doi.org/10.1196/annals.1294.005>
- LEE, Y. L., CHAN, Y. L., CHOW, W. N., NG, E. H., LEE, K. F., YEUNG, W. S., I WSP. (2009) Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulates proliferation and tube formation in human uterine microvascular endothelial cell through the mitogen-activated protein kinase but not through the Akt pathway. *Fertil. Steril.* 91, 2163–2171. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.076>
- LI, M., BULLOCK, C. M., KNAUER, D. J., EHLERT, F. J., ZHOU, Q. Y. (2001) Identification of two prokineticin cDNAs: Recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 59, 692–698. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.692>
- LIN, D. C., BULLOCK, C. M., EHLERT, F. J., CHEN, J-L., TIAN, H., ZHOU, Q-Y. (2002) Identification and molecular characterization of two closely related

G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 277, 19276–19280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202139200>

LÓPEZ-GATIUS, F., GARCIA-ISPIERTO, I. (2022) Clinical overview of luteal deficiency in dairy cattle. *Animals (Basel)* 12(15), 1871. <https://doi.org/10.3390/ani12151871>

MAIER, T., GUELL, M., SERRANO, L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966–3973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>

MASUDA, Y., TAKATSU, Y., TERAOKA, Y., KUMANO, S., ISHIBASHI, Y., SUENAGA, M., ABE, M., FUKUSUMI, S., WATANABE, T., SHINTANI, Y., YAMADA, T., HINUMA, S., INATANI, N., OHTAKI, T., ONDA, H., FUJINO, M. (2002) Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 396–402. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00239-5)

MCCRACKEN, J. A., CUSTER, E. E., LAMSA, J. C. (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79(2), 263–323. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.263>

MOELJONO, M. P., THATCHER, W. W., BAZER, F. W., FRANK, M., OWENS, L. J., WILCOX, C. J. (1977) A study of prostaglandin F₂α as the luteolysin in swine: II Characterization and comparison of prostaglandin F, estrogens and progesterone concentrations in uteroovarian vein plasma of nonpregnant and pregnant gilts. *Prostaglandins* 14, 543–555. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(77\)90268-4](https://doi.org/10.1016/0090-6980(77)90268-4)

NGAN, E. S., LEE, K. Y., YEUNG, W. S. B., NGAN, H. Y. S., NG, E. H. Y., HO, P. C. (2006) Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* 147, 88–95. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0543>

NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., SILVA, P. J., ROLLYSON, M. K., MCINTOSH, E. W. (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1–29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>

PERRY, J. S., HEAP, R. B., AMOROSO, E. C. (1973) Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature.* 245, 45–47.

PODLOVNI, H., OVADIA, O., KISLIOUK, T., KLIPPER, E., ZHOU, Q.Y., FRIEDMAN, A. I. WSP. (2006) Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell. Physiol. Biochem.* 18, 315–326. <https://doi.org/10.1159/000097609>

- POPE, W. F., FIRST, N. L. (1985) Factors affecting the survival of Pig embryos. *Theriogenology* 23, 91–105. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(85\)90075-5](https://doi.org/10.1016/0093-691x(85)90075-5)
- PRZYGRÓDZKA, E., KACZMAREK, M. M., KACZYŃSKI, P., ZIECIK, A. J. (2016) Steroid hormones, prostanoids, and angiogenic systems during rescue of the corpus luteum in pigs. *Reproduction* 151(2): 135–147. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0332>
- REYNOLDS, L. P., REDMER, D. A. (1999) Growth and development of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 181–191.
- STOUFFER, R. L., BISHOP, C. V., BOGAN, R. L., XU, F., HENNEBOLD, J. D. (2013) Endocrine and local control of the primate corpus luteum. *Reprod. Biol.* 13(4), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.08.002>
- SULLIVAN, R. A., LUCAS, C., G., SPONCHIADO, M., EITEL, E. K., SPATE, L. D., LUCY, M. C., SMITH, M. F., WELLS, K. D., PRATHER, R. S., GEISERT, R. D. (2024) Conceptus estrogen and prostaglandins provide the maternal recognition of pregnancy signal to prevent luteolysis during early pregnancy in the pig. *Biol. Rep.* 111(4), 890–905. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioae104>
- UCUZIAN, A. A., GASSMAN, A. A., EAST, A. T., GREISLER, H. P. (2011) Molecular Mediators of Angiogenesis. *J. Burn Care Res* 31(1): 158. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181c7ed82>.
- WACLAWIK, A., RIVERO-MULLER, A., BLITEK, A., KACZMAREK, M. M., BROKKEN, L. J. S., WATANABE, K., RAHMAN, N. A., ZIECIK, A. J. (2006) Molecular cloning and spatiotemporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology* 147(1), 210–221. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0880>
- WACLAWIK, A., ZIECIK, A. J. (2007) Differential expression of prostaglandin (PG) synthesis enzymes in conceptus during peri-implantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/PG 9-ketoreductase in the pig. *J. Endo.* 194, 499–510. <https://doi.org/10.1677/joe-07-0155>
- WACLAWIK, A., KACZMAREK, M. M., KOWALCZYK, A. E., BOGACKI, M., ZIECIK, A. J. (2008) Expression of prostaglandin synthesis pathway enzymes in the porcine corpus luteum during the oestrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* 70, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.03.008>
- WACLAWIK, A., KACZMAREK, M. M., BLITEK, A., KACZYŃSKI, P., ZIECIK, A. J. (2017) Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 842–855. <https://doi.org/10.1002/mrd.22835>
- WILTBANK, M. C., SALIH, S. M., ATLI, M. O., LUO, W., BORMANN, C. L., OTTOBRE, J. S., VEZINA, C. M., MEHTA, V., DIAZ, F. J., TSAI, S. J., SARTORI,

- R. (2012) Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim. Reprod.* 9(3), 242-259.
- ZHAO, S., FERNALD, R. D. (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* 12, 1047–1064. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047>
- ZIECIK, A. J., PRZYGRODZKA, E., JALALI, B. M., KACZMAREK, M. M. (2018) Regulation of the porcine corpus luteum during pregnancy. *Reproduction* 156, R57–R67. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0662>

**Oświadczenia o procentowym wkładzie poszczególnych
współautorów w przygotowanie publikacji wchodzących
w skład rozprawy doktorskiej
oraz
kopie oryginalnych prac badawczych**

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Baryła, M., Goryszewska-Szczurek, E., Kaczynski, P., Balboni G., Wacławik A. Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. **Scientific Reports** 2023;13, 5085. doi: 10.1038/s41598-023-32132-3

powstała w wyniku określonego poniżej, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

Baryła M. - 50%, wykonanie większości doświadczeń laboratoryjnych, współudział w opracowaniu koncepcji i planowaniu badań, pozyskanie funduszy na badania, zarządzanie projektem, z którego finansowano badania, udział w analizie i interpretacji wyników, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu i praca nad końcową wersją manuskryptu

Goryszewska-Szczurek E. – 13%, udział w przeprowadzeniu doświadczeń laboratoryjnych oraz w analizie wyników, udział w badaniu procesu angiogenezy, współudział w przygotowaniu manuskryptu i praca nad jego końcową wersją

Kaczyński P. - 12%, udział w analizie wyników badań, współudział w przygotowaniu manuskryptu i praca nad jego końcową wersją

Balboni G. - 2%, podzielenie się ekspertyzą dotyczącą antagonisty receptora prokinetycyny 1 i zaakceptowanie końcowej wersji manuskryptu

Wacławik A. - 23%, opracowanie koncepcji badań, nadzór merytoryczny nad przygotowaniem projektu badań i realizacją badań, analiza i interpretacja wyników, udział w optymalizacji doświadczeń laboratoryjnych, współudział w przygotowaniu manuskryptu i praca nad jego końcową wersją

Wszyscy autorzy wyrażają zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji do rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Baryły.

	Date	Signature
Monika Baryła	12.11.2024	Monika Baryła
Ewelina Goryszewska-Szczurek	12.11.2024	Ewelina Goryszewska-Szczurek
Piotr Kaczyński	12.11.2024	Piotr Kaczyński
Gianfranco Balboni	OCTOBER 31, 2024	Gfco Balboni
Agnieszka Wacławik	12.11.2024	Agnieszka Wacławik

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Baryła M, Kaczynski P, Goryszewska-Szczurek E, Waclawik A. The regulation of the expression of prokineticin 1 and its receptors and its mechanism of action in the porcine corpus luteum. Theriogenology 2024;226,39-48. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.05.044

powstała w wyniku określonego poniżej, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

Baryła M. - 55%, wykonanie doświadczeń laboratoryjnych, wizualizacja wyników, współudział w analizie i interpretacji wyników, współudział w opracowaniu metodologii, pozyskanie funduszy na badania, zarządzanie projektem, nadzór administracyjny nad projektem, współudział w opracowaniu koncepcji badań; zarządzanie przechowywaniem danych, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu i praca nad końcową wersją manuskryptu

Kaczyński P. - 11%, współudział w opracowaniu metodologii, w analizie i interpretacji wyników, walidacji wyników, analizie formalnej, praca nad końcową wersją manuskryptu

Goryszewska-Szczurek E. - 11%, współudział w opracowaniu metodologii, w analizie i interpretacji wyników, walidacji wyników, analizie formalnej, praca nad końcową wersją manuskryptu

Waclawik A. - 23%, opracowanie koncepcji badań, nadzór merytoryczny nad badaniami, udział w opracowaniu metodologii i wykonaniu części doświadczeń laboratoryjnych, pozyskanie funduszy na badania, analiza i interpretacja wyników, formalna analiza wyników, opracowanie planu zarządzania danymi, edycja manuskryptu, praca nad końcową wersją manuskryptu.

Wszyscy autorzy wyrażają zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji do rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Baryły.

	Data	Podpis
Monika Baryła	28.10.2024	Monika Baryła
Piotr Kaczyński	28.10.2024	Piotr Kaczyński
Ewelina Goryszewska-Szczurek	28.10.2024	Ewelina Goryszewska-Szczurek
Agnieszka Waclawik	28.10.2024	Agnieszka Waclawik



OPEN Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function

Monika Baryla¹, Ewelina Goryszewska-Szczurek¹, Piotr Kaczynski¹, Gianfranco Balboni² & Agnieszka Waclawik¹✉

Prokineticin 1 (PROK1) is a pleiotropic factor secreted by endocrine glands; however, its role has not been studied in the corpus luteum (CL) during pregnancy in any species. The present study aimed to investigate the contribution of PROK1 in regulating processes related to porcine CL function and regression: steroidogenesis, luteal cell apoptosis and viability, and angiogenesis. The luteal expression of *PROK1* was greater on Days 12 and 14 of pregnancy compared to Day 9. PROK1 protein expression during pregnancy increased gradually and peaked on Day 14, when it was also significantly higher than that on Day 14 of the estrous cycle. Prokineticin receptor 1 (*PROKR1*) mRNA abundance increased on Days 12 and 14 of pregnancy, whereas *PROKR2* elevated on Day 14 of the estrous cycle. PROK1, acting via PROKR1, stimulated the expression of genes involved in progesterone synthesis, as well as progesterone secretion by luteal tissue. PROK1–PROKR1 signaling reduced apoptosis and increased the viability of luteal cells. PROK1 acting through PROKR1 stimulated angiogenesis by increasing capillary-like structure formation by luteal endothelial cells and elevating angiogenin gene expression and VEGFA secretion by luteal tissue. Our results indicate that PROK1 regulates processes vital for maintaining luteal function during early pregnancy and the mid-luteal phase.

The corpus luteum (CL) is an important endocrine gland for pregnancy establishment in mammals¹, and its main function is production of progesterone (P4), a hormone necessary for the development and maintenance of pregnancy. Progesterone synthesis is controlled by steroidogenic acute regulatory protein (STAR); side-chain cleavage cytochrome P450 (CYP11A1); and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (HSD3B1).

The proper function of the CL is very important in pigs because it is a major source of progesterone during the entire pregnancy². The lack of fertilization results in CL regression on days 14–16 post ovulation. During pregnancy, CL function is maintained by luteoprotective and luteotrophic factors such as estradiol-17 β and prostaglandin E2³. Previous reports have indicated a high rate of embryo mortality in pigs during early pregnancy; however, the etiology of this phenomenon is not yet fully understood⁴. CL dysfunction has been suggested as one of the reasons for increased embryonic mortality in pigs⁵.

Several processes are involved in CL formation, luteal lifespan, and CL regression, including tissue remodeling, apoptosis, and angiogenesis associated with endothelial cells^{6,7}. Angiogenesis in luteal tissue is tightly regulated during different phases of the CL lifespan. The main angiogenic factor in the CL is vascular endothelial growth factor A (VEGFA)⁸. However, prokineticin 1 (PROK1), known as endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), may also stimulate angiogenesis^{9–11}. It is worth highlighting that PROK1 does not share sequence similarity with VEGFA¹². Prokineticin 1 in mammals exerts pleiotropic, tissue-dependent effects, but the most recognized are the mitogenic effects on the endothelial cells of microvessels proximal to endocrine glands and on smooth muscle contractivity in intestines^{9,13,14}. This short-amino acid chain protein belongs to the AVIT family and acts by binding to one of two receptors: prokineticin receptor 1 (PROKR1) and 2 (PROKR2)¹⁵. However, PROK1 has a higher affinity for PROKR1 than for PROKR2¹⁶. Both receptors act through the recruitment of different G-proteins (Gi, Gq and/or Gs) and can induce the signaling pathway of protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, phosphoinositide 3 kinase or protein kinase B¹⁷. Nonetheless, PROK1 acting through one of its receptors can have different effects; for example, PROK1–PROKR1 signaling affects the growth of fetal endothelial cells, while PROK1–PROKR2 signaling induces endothelial cell permeability¹⁸.

¹Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland. ²Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Cittadella Universitaria, 09042 Monserrato, Cagliari, Italy. ✉email: a.waclawik@pan.olsztyn.pl

The role of PROK1 in female reproductive function has been studied^{19–23}. The expression of *PROK1* mRNA in the human endometrium increases during the peri-implantation period²⁴. Our recent studies indicate that PROK1 and PROKR1 gene and protein expression in the endometrium and *PROK1* gene expression in the trophoblast are upregulated during implantation and early placentation in pigs^{22,25}. PROK1, acting through PROKR1, is an embryonic signal mediator in the endometrium that participates in early pregnancy establishment by promoting angiogenesis, trophoblast cell proliferation, and adhesion and regulating the expression of genes involved in embryo–maternal interactions^{22,25}. Moreover, PROK1 and its receptors (PROKRs) are expressed in ovarian follicles and corpora lutea in humans, cows, and rats^{19,20,26–28}. Although PROK1 expression in the CL during the estrous cycle is dynamic^{19,27,29}, the main role of PROK1 in the CL is still not fully understood. PROK1 effector cells in the corpus luteum are luteal endothelial cells and luteinized cells²⁰. Based on the aforementioned studies, it may be supposed that PROK1 stimulates angiogenesis in the CL. However, the expression of PROK1 is strongest in the bovine and human CL during the late luteal stage or corpus luteum regression when angiogenesis declines^{27,29}. Until now, only the expression profiles of the PROK1 gene, not the protein, have been evaluated in the corpus luteum during the estrous/menstrual cycles in cattle and humans. Moreover, there is a lack of data concerning the expression and role of PROK1 in the CL during early pregnancy in any species. PROK1 expression profiles and function in the porcine CL have not been studied until now.

We hypothesized that PROK1 regulates processes involved in controlling the luteal lifespan in pregnancy and the estrous cycle in pigs. Our objectives for the present study were (1) to evaluate PROK1 and its receptors' (PROKR1 and PROKR2) gene and protein expression profiles in porcine corpora lutea collected during the luteal phase of the estrous cycle and corresponding days of pregnancy; (2) to determine the localization of PROK1 and its receptors' protein expression in the porcine corpus luteum; and (3) to study the effects of PROK1 in the corpus luteum on major functions such as progesterone synthesis, luteal cell apoptosis and viability, and angiogenesis.

Results

The expression of PROK1 in the porcine corpus luteum is upregulated on Day 14 of pregnancy (Experiment 1). The expression profiles of PROK1 and its receptors in porcine corpora lutea were compared during the mid-luteal phase with the highest luteal activity (Days 9 and 12 of the estrous cycle), the beginning of luteolysis on Day 14 of the estrous cycle and the corresponding days of pregnancy (Day 9 and when CL function is rescued from regression on Days 12 and 14 of pregnancy; Fig. 1). We found a significant effect of the estrous cycle/pregnancy day on the expression of the PROK1 gene and protein and on the *PROKR1* and *PROKR2* genes ($p < 0.01$; Fig. 1A–E). A reproductive status effect (cyclic/pregnant) was found on PROK1 protein expression ($p < 0.0001$; Fig. 1B). An interaction between the effect of reproductive status and the effect of the estrous cycle/pregnancy day was detected for the gene expression of *PROKR2* ($p < 0.01$; Fig. 1E).

PROK1 mRNA expression was higher on Day 12 of the estrous cycle and pregnancy than on Days 9 and 14 of the estrous cycle ($p < 0.001$). *PROK1* gene expression was greater on Days 12 and 14 of pregnancy than on Day 9 of pregnancy ($p < 0.0001$ and $p < 0.05$, respectively; Fig. 1A). PROK1 protein expression during pregnancy increased gradually and reached the highest level on Day 14 (vs. Day 9; $p < 0.05$, and vs. Day 14; $p < 0.0001$, Fig. 1B). Furthermore, PROK1 protein expression was significantly higher on Day 14 of pregnancy than on Day 14 of the estrous cycle ($p < 0.05$; Fig. 1B). The expression of the *PROKR1* gene was higher on Days 12 and 14 of pregnancy than on Day 9 of pregnancy ($p < 0.05$; Fig. 1C), whereas *PROKR2* gene expression was upregulated on Day 14 of the estrous cycle compared with Days 9 and 12 of the estrous cycle ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively) and Day 14 of pregnancy ($p < 0.01$; Fig. 1E). No significant differences in PROKR1 and PROKR2 protein expression were found between Days 9 and 14 of the estrous cycle or pregnancy (Fig. 1D and F). The concentration of P4 in plasma from jugular vein blood was elevated on Day 14 of pregnancy compared to Day 14 of the estrous cycle (Supplementary Fig. 1).

The PROK1, PROKR1, and PROKR2 proteins are expressed in steroidogenic cells and blood vessels of the porcine corpus luteum (Experiment 2). The protein expression of PROK1 (Fig. 2A–D), PROKR1 (Fig. 2E–H), and PROKR2 (Fig. 2I–L) in the CL during the estrous cycle and pregnancy (Days 12 and 14) was detected mainly in steroidogenic cells (SC) and luteal blood vessels (bv). No staining or weak staining for PROK1, PROKR1, and PROKR2 was observed in the theca-derived luteal capsule (C) of the porcine CL (Fig. 2). The specificity of the antibodies used in immunohistochemical analyses was confirmed using negative controls (PROK1 and PROKR2—normal rabbit IgG; PROKR1—blocking peptide). Microphotographs of the negative controls are presented in the lower-left parts of Panels A, E, and I in Fig. 2.

PROK1 increases the expression of genes involved in progesterone synthesis and enhances progesterone production by porcine luteal explants in vitro (Experiment 3). The effects of PROK1 on the luteal expression of genes responsible for progesterone synthesis and on the P4 synthesis by CL explants were studied using a precision-cut luteal slice in vitro model. An effect of day of the estrous cycle/pregnancy and an interaction between the effects of treatment and the effect of day of the estrous cycle/pregnancy were detected for the gene expression of *STAR* ($p < 0.05$; Fig. 3A), *HSD3B1* ($p < 0.01$; Fig. 3B), and *CYP11A1* ($p < 0.01$; Fig. 3C) and for secretion of progesterone ($p < 0.05$; Fig. 3D). Moreover, an effect of treatment on progesterone secretion was found ($p < 0.0001$; Fig. 3D).

Prokineticin 1 elevated the expression of the *STAR* and *HSD3B1* genes in luteal explants collected on Day 12 of pregnancy ($p < 0.0001$; Fig. 3A, and B). Interestingly, we found stimulating effects of PROK1 on luteal *CYP11A1* expression in CL explants collected on Day 12 of pregnancy ($p < 0.05$; Fig. 3C) compared to the control, whereas in CL explants collected on Day 12 of the estrous cycle, PROK1 reduced the expression of *CYP11A1* ($p < 0.05$; Fig. 3C). The results of the radioimmunoassay indicated that PROK1 elevated the concentration of progesterone

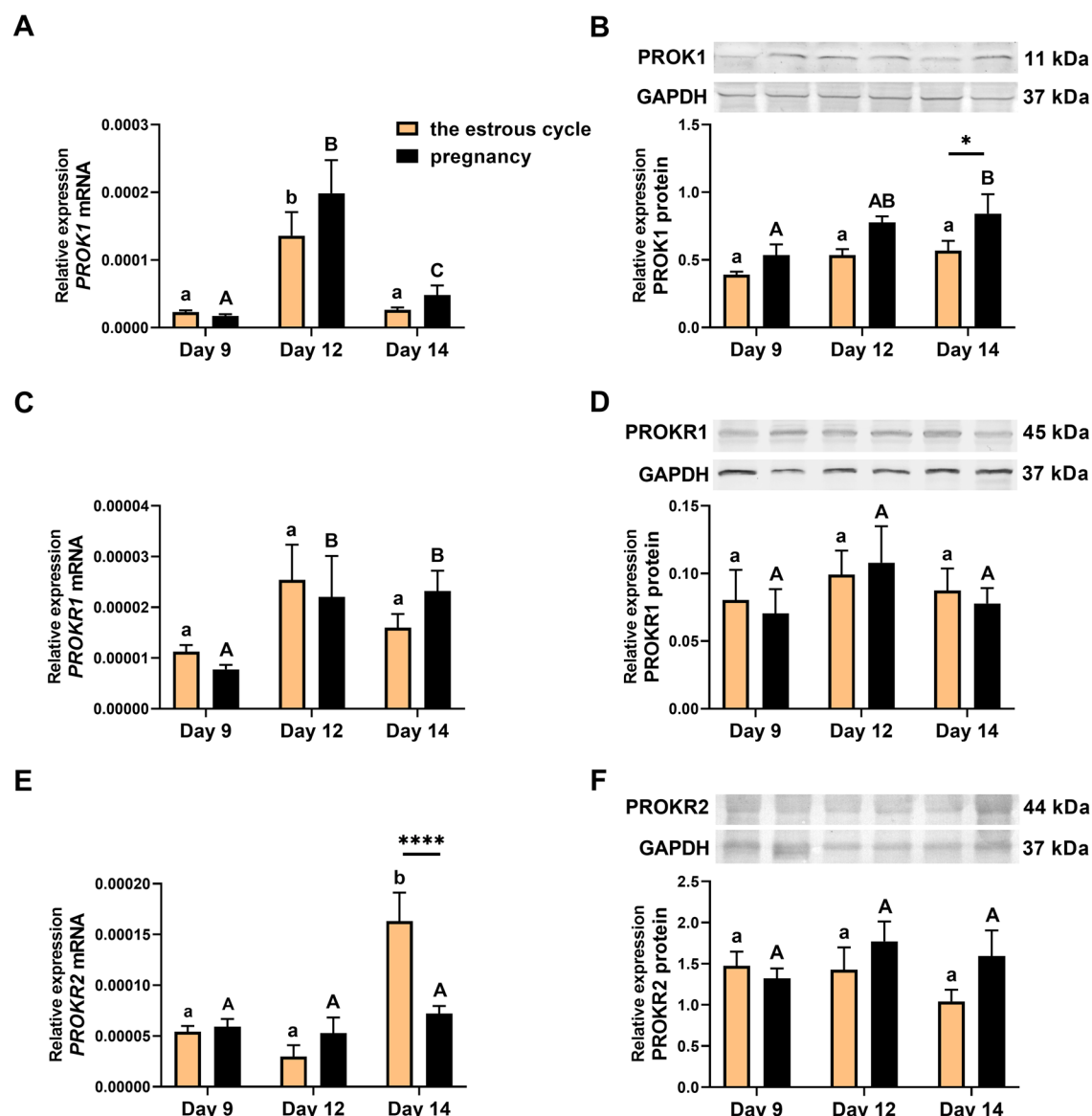


Figure 1. The expression profiles of prokineticin 1 (PROK1; **A** and **B**), prokineticin receptor 1 (PROKR1; **C** and **D**) and 2 (PROKR2; **E** and **F**) mRNA (**A**, **C**, and **E**) and protein (**B**, **D**, and **F**) in the porcine corpora lutea on Days 9, 12, and 14 of pregnancy and the estrous cycle. Representative samples of Western blots are shown in the upper panels (**B**, **D**, **F**). Uncropped images of full length Western blot membranes are shown in Supplementary Fig. 2. Data are presented as means $\pm$ SEM. Bars with different letters differ significantly ($p < 0.05$) within the estrous cycle (lowercase letters) and pregnancy (capital letters). Asterisks indicate statistical differences between reproductive statuses (pregnant vs. cyclic) on corresponding day of the estrous cycle and pregnancy (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

in medium from luteal explants collected on Day 12 of pregnancy ($p < 0.05$), Day 14 of the estrous cycle ($p < 0.05$), and Day 14 of pregnancy ($p < 0.01$; Fig. 3D). The stimulating effects of PROK1 were abolished by a PROKR1 antagonist (PC7). The P4 concentration (mean $\pm$ SEM) in the control medium was 1717 ng/mL $\pm$ 121 on Day 12 of the estrous cycle, 1347 ng/mL $\pm$ 182 on Day 12 of pregnancy, 1314 ng/mL $\pm$ 219 on Day 14 of the estrous cycle, and 1621 ng/mL $\pm$ 213 on Day 14 of pregnancy.

To determine the effects of the incubation time and treatment on the viability of the luteal slices, an Alamar Blue assay was performed. The metabolic activity of CL explants was not significantly different between 0 and 18 h of incubation (100 $\pm$ 7.29% vs. 91.32 $\pm$ 0.87%). In addition, none of the treatments used decreased the tissue explant viability after 18 h of incubation compared to the control (Fig. 4). The antagonist for PROKR1 alone or in combination with PROK1 did not have any effect on tissue explant viability. However, PROK1 slightly increased the viability of CL explants compared to the control ($p < 0.05$; Fig. 4).

PROK1 reduces luteal cell apoptosis and increases the viability of luteal cells (Experiment 4). Isolated primary luteal cells were characterized (Supplementary Fig. 3). We confirmed the presence of the

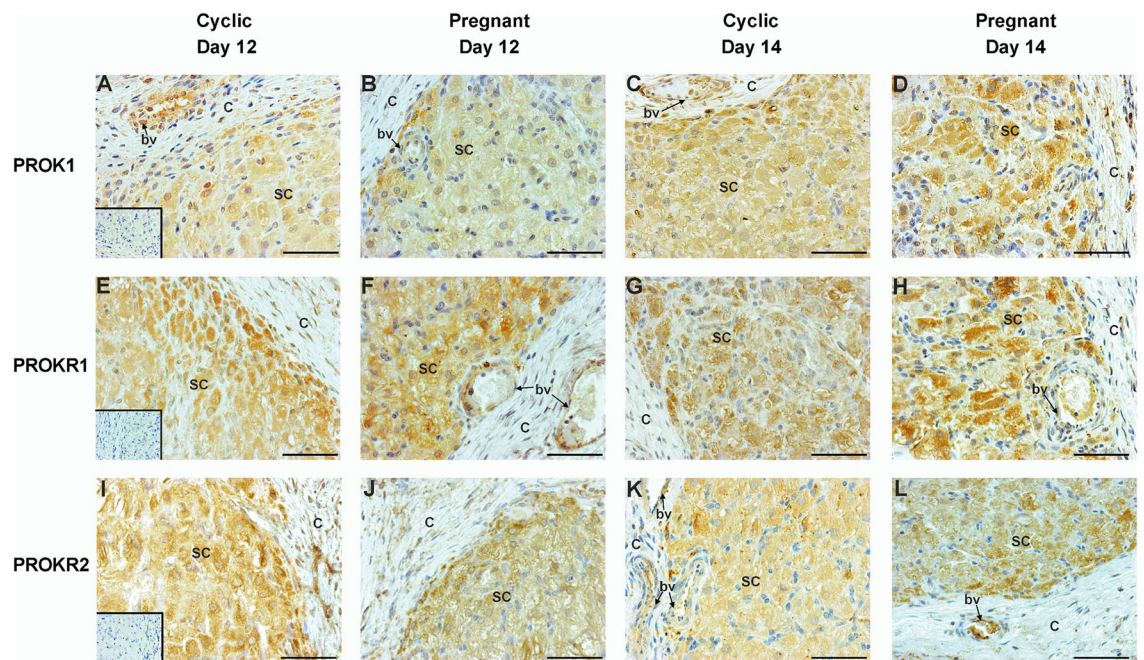


Figure 2. Immunolocalization of prokineticin 1 (PROK1; A–D), prokineticin receptor 1 (PROKR1; E–H), and 2 (PROKR2; I–L) in the porcine corpora lutea on Day 12 (A, B, E, F, I, and J) and 14 (C, D, G, H, K, and L) of the estrous cycle (A, C, E, G, I, and K) and pregnancy (B, D, F, H, J, and L). Positive signals of all studied proteins were detected in luteal steroidogenic cells (SC), and endothelial cells that forms blood vessels (“bv” with arrow). A weak signal or no signal is shown in theca derived luteal capsule (C). All sections were counterstained with hematoxylin. The negative control is presented in the down-left corners of A, I (Normal rabbit IgG), and E panels (antibodies with the blocking peptide). Scale bar represents 50 μ m.

luteal cell marker HSD3B1 (Supplementary Fig. 3A, and C). The specificity of the antibodies used in immunofluorescence analyses was confirmed using the negative control (Supplementary Fig. 3D).

FITC-Annexin V and propidium iodide staining were used to determine the effect of PROK1 on porcine luteal cell apoptosis and viability. PROK1 significantly reduced the percentage of apoptosis compared with the control ($p < 0.05$, Fig. 5B). Moreover, PROK1 significantly increased cell viability compared with the control ($p < 0.05$, Fig. 5C). These stimulating effects of PROK1 on apoptosis and the viability of luteal cells were diminished using a PROKR1 antagonist (PC7). No effect of PROK1 treatment on the number of necrotic cells was detected (Fig. 5A).

PROK1 stimulates angiogenesis in the porcine corpus luteum in vitro (Experiment 5). *PROK1 promotes capillary-like network formation by luteal endothelial cells.* We characterized isolated primary luteal endothelial cells (Supplementary Fig. 4) and confirmed the presence of the endothelial cell marker von Willebrand factor (vWF) in the isolated cells (Supplementary Fig. 4A, D, E, and H). The specificity of the antibodies used in immunofluorescence analyses was confirmed using a negative control—normal rabbit IgG (Supplementary Fig. 4I).

The capillary-like structure formation assay for porcine primary luteal endothelial cells isolated from the corpus luteum collected from gilts on Day 12 of the estrous cycle revealed that PROK1 increased the numbers of nodes, junctions, master junctions, master segments, meshes, pieces, segments, and isolated segments as well as the total master segment length, total mesh area, total length, total branching, segment length, branching interval, mesh index, and mean mesh size ($p < 0.05$; Fig. 6A–F, and Supplementary Fig. 5B–E, G–I, and L–N). The significant effects of PROK1 on the analyzed parameters describing angiogenesis were abolished by a PROKR1 antagonist (PC7).

PROK1 upregulates ANG gene expression and VEGFA secretion in luteal tissue. We used precision-cut luteal slices in the in vitro model to examine whether PROK1 may affect the expression of genes associated with angiogenesis and VEGFA secretion. We found effects of the treatment only on ANG gene expression ($p < 0.05$; Fig. 7A) and VEGFA secretion ($p < 0.0001$; Fig. 7B). PROK1 increased the abundance of ANG mRNA in luteal explants collected on Day 12 of pregnancy ($p < 0.01$; Fig. 7A). These stimulating effects of PROK1 were abolished using PC7. No effects of PROK1 treatment were detected on the gene expression of ANGPT2, FGF2, FLT1 and KDR in luteal explants (Supplementary Fig. 6A–D).

PROK1 elevated the secretion of VEGFA into the culture medium of luteal explants collected on Day 12 of pregnancy ($p < 0.05$) and on Day 14 of the estrous cycle and pregnancy ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively; Fig. 7B). The stimulating effects of PROK1 were inhibited by PC7. The VEGFA concentration (mean $\pm$ SEM)

in the control medium was $9.54 \text{ pg/mL} \pm 2.45$ on Day 12 of the estrous cycle, $9.49 \text{ pg/mL} \pm 3.14$ on Day 12 of pregnancy, $6.31 \text{ pg/mL} \pm 2.13$ on Day 14 of the estrous cycle, and $5.93 \text{ pg/mL} \pm 2$ on Day 14 of pregnancy.

Discussion

Our study is the first report on the role of PROK1 and its receptors in the porcine corpus luteum during the mid-luteal (high luteal activity) and late-luteal (decreased luteal activity) phases of the estrous cycle and the corresponding days of pregnancy, including the period of luteal rescue from regression in response to embryonic estradiol (Days 12 and 14 of pregnancy). We combined our ex vivo approach with an in vitro model of ultrathin luteal tissue explants ($180 \mu\text{m}$), which is more physiological than using one particular population of cells isolated from the CL. We used pigs as models for studying the mechanisms underlying CL physiology because, among others, in the pig as a multiparous species, several CL are usually formed in each ovary, providing an excellent source of material for multiple analyses in tissue studies. Moreover, the cellular mechanisms involved in the regulation of reproductive processes can be common among species with different types of placenta despite of species-specific differences in the establishment of pregnancy^{30–32}. Hence, the presented results may be applicable to the CL of other species.

Our results revealed that luteal expression of *PROK1* mRNA is elevated in the mid-luteal phase of the estrous cycle, which aligns with the findings of previous studies on the bovine and human corpora lutea^{19,27,29}. However, in the late luteal phase, the gene expression of *PROK1* was decreased in the porcine CL, whereas in cattle, it is still elevated²⁷. It has been suggested that the increased expression of the *PROK1* and *PROKR1* genes in the bovine CL at the late luteal phase may be related to the involvement of these genes in recruiting monocytes to the regressing CL²⁷. Therefore, these interspecies discrepancies may be the difference in the stage of regression between these two species. The exact stage of regression is difficult to assess without administration of exogenous prostaglandin F_{2α} and collection of timed luteal samples. However, we did not perform such an analysis because we decided to show the expression of PROK1 and its receptors under physiological conditions (the estrous cycle and early pregnancy). Nonetheless, our results are consistent with those of earlier studies showing that stress conditions such as cell starvation, hypoxia and high levels of tumor necrosis factor, which also occur during luteolysis, result in markedly elevated levels of *PROKR2* mRNA and do not affect the expression of PROK1 in bovine endothelial cells of CL origin²⁶. Interestingly, PROK1 acting through PROKR2 may exert antiapoptotic effects on endothelial cells in the bovine CL²⁶.

Until now, only gene expression for the PROK1–PROKR system has been reported for the CL in other species. In our study we demonstrated the protein expression of PROK1 and its receptors. The profiles of PROK1 mRNA and protein expression were relatively parallel, with somewhat of a shift in protein expression. Both the mRNA and protein levels were, however, greater on Day 14 of pregnancy than on Day 9 of pregnancy. The expression of *PROKR1* and *PROKR2* mRNA was regulated during the estrous cycle and pregnancy, but PROKR1 and PROKR2 protein expression did not change significantly in the studied periods. The discrepancies between the mRNA and protein abundances for PROK1 and its receptors in the porcine CL may have resulted from the fact that transcription and translation do not always have a linear relationship³³. Protein synthesis from a certain copy number of mRNA molecules may be either enhanced or repressed depending on different mechanisms, as described elsewhere³⁴. Moreover, discrepancies between mRNA and protein expression can be caused by the time shift between mRNA and protein synthesis. Most likely, the maximum *PROK1* mRNA expression on Day 12 resulted in a peak PROK1 protein expression slightly later on Day 14 of pregnancy. However, because of the luteolytic events occurring in the porcine CL shortly after Day 12 of the estrous cycle, the increase in *PROK1* mRNA could not be observed on Day 14 of the estrous cycle. Regarding PROKR2, it is also possible that the increase in *PROKR2* mRNA abundance observed on Day 14 of the estrous cycle could have resulted in elevated protein expression later than on Day 14 of the estrous cycle. Another explanation for this discrepancy may be the fact that Western blotting is less accurate than qPCR, and subtle changes may have been hidden.

Although there are numerous reports on PROK1 in the CL in other species, our study is the first concerning PROK1 and its receptor gene and/or protein expression profiles in the CL during early pregnancy in any species. The abundance of the PROK1 transcript and protein was elevated in the luteal tissue during pregnancy at the maternal recognition of pregnancy and implantation period. This finding suggests that the role of PROK1 in the corpus luteum may be especially significant during pregnancy in luteoprotective/antiluteolytic mechanisms, ensuring prolonged CL function. Our results correspond with reports of increased PROK1 expression in the pregnant endometrium at the time of embryo implantation in pigs²² and women^{35,36}.

We demonstrated that PROK1 prevented porcine luteal cells from undergoing apoptosis; therefore, PROK1 supports the function of the corpus luteum during early pregnancy, when elevated levels of PROK1 are observed. Apoptosis, a type of programmed cell death⁷, has been primarily associated with luteal regression³⁷. However, apoptosis is also an important process for developing CL, in which dynamic changes in tissue remodeling occur⁷. Moreover, the significant role of the apoptotic process in controlling the immune response (i.e., the deletion of immune cells recognizing self-antigens and cytotoxic killing) has been described³⁸. Accordingly, the antiapoptotic effect of PROK1 has been demonstrated in different cell types—endothelial cells of CL origin in cattle²⁶.

The expression of PROK1 and its receptors PROKR1 and PROKR2 was localized in porcine steroidogenic cells and blood vessels in the porcine CL during the mid- and late luteal phases and early pregnancy. This finding suggests that PROK1 acts in an autocrine and/or paracrine manner in porcine luteal tissue. Similar results for PROK1 localization have been described for bovine²⁷ and human corpora lutea^{19,29}. Colocalization of PROK1 and PROKR in blood vessels and steroidogenic cells implies the significant effect of PROK1 on crucial processes related to corpus luteum function: steroidogenesis and angiogenesis.

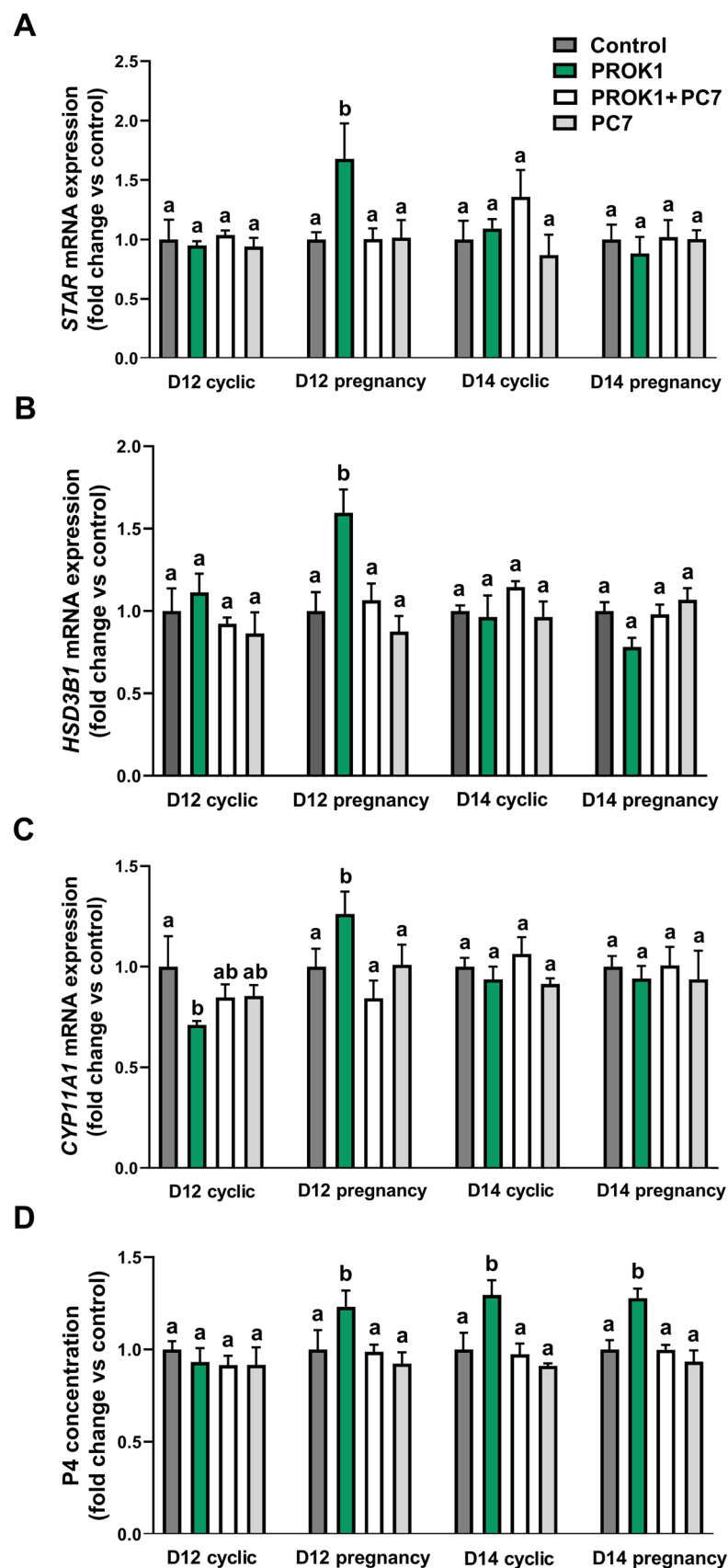
We found that prokineticin 1 stimulated the secretion of P4 by CL explants collected on Day 12 of pregnancy and on Day 14 of pregnancy and the estrous cycle. On the other hand, the expression of genes involved

Figure 3. The effect of prokineticin 1 (PROK1) on expression of genes involved in progesterone (P4) synthesis and on P4 production by the porcine luteal explants in vitro on Day 12 and 14 of estrous cycle or pregnancy: (A) steroidogenic acute regulatory protein (*STAR*), (B) hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (*HSD3B1*), (C) cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 (*CYP11A1*) genes and (D) P4 secretion. Precision-cut luteal slices were incubated with the control (vehicle) or PROK1 (40 nM) for 18 h in the presence/absence of prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7; 10 μ M). Data are presented as means $\pm$ SEM. Different lowercase letters (a, b) indicate statistical significant differences between treatments within groups on Days 12 (D12) and 14 (D14) of the estrous cycle or pregnancy ($p < 0.05$).

in steroidogenesis (*HSD3B1*, *STAR*, and *CYP11A1*) was found to be upregulated by PROK1 only on Day 12 of pregnancy. This could have been caused by measurement of the gene expression and P4 secretion at the same time-point. The increase in P4 might have occurred later in the tissue collected on these specific days. Another explanation is that PROK1 regulates the synthesis of P4 in the CL on Day 14 of pregnancy/or the estrous cycle via mechanisms other than direct regulation, such as cholesterol or LDL uptake or storage, progesterone metabolism or action of PROK1-induced VEGFA. Another possible explanation for the increased P4 secretion by the luteal tissue collected from the regressing CL on Day 14 of the estrous cycle is that the potential effect of PROK1 was maintained when the tissue was separated from the luteolytic signals present in vivo. The lack of suppression of P4 secretion by luteal tissue collected on Day 14 of the estrous cycle may indicate a limitation of this in vitro model; hence, our conclusions on the role PROK1 in porcine CL during luteolysis should be interpreted with caution. However, the results on gene expression and P4 secretion were consistent for luteal tissue collected on Day 12 of pregnancy. Our results show the effects of PROK1 on the expression of genes involved in P4 synthesis and on P4 production by luteal tissue, which thus far have not been studied in any species. A previous study using the luteinized human granulosa cell line SVOG implied that steroidogenesis and the increased transcript abundance of the PROK1 gene could be positively correlated; however, no direct experiments have been performed to demonstrate this relationship²⁰. Our findings are consistent with the increased abundances of *STAR* and *HSD3B1* mRNA in the porcine CL on Day 14 of pregnancy³⁹.

The present results indicated that PROK1 increased capillary-like structure formation by luteal endothelial cells, which stimulated angiogenesis in the porcine CL. Interestingly, angiogenesis in the CL is more intensive than in any other organ and similar to that in a rapidly growing tumor¹. Newly formed blood vessels are adjacent to the membranes of luteal cells (60%) or close to the interstitial space (29%) because luteal cells consume two to six times more oxygen per unit weight than the liver, the kidneys, or even the heart¹. During the mid-luteal phase and early pregnancy, when PROK1 expression in the porcine CL is high, angiogenesis is an intensive process that ensures luteal tissue with nutrients and substrates for P4 synthesis. Our findings agree with previous reports indicating PROK1 as a mitogen for endothelial cells^{18,22,23,40,41}. In endocrine glands, it has been shown that PROK1 regulates microvessel formation by supporting endothelial cell survival, migration, and fenestration¹⁸. Moreover, an in vivo study confirmed the angiogenic role of PROK1 because administering PROK1 into rat ovaries intensified angiogenesis⁹. Our findings also suggest that PROK1 regulates angiogenesis indirectly by increasing the luteal gene expression of the angiogenic factor ANG and the secretion of VEGFA by porcine luteal tissue. In the porcine CL, the abundance of VEGFA mRNA and protein is elevated during the mid-luteal phase of the estrous cycle and drops at the onset of luteolysis⁸. Similarly, in bovine CL, the levels of VEGFA mRNA tend to decrease during the late luteal phase and in the regressing CL²⁷. However, the results of the present study showed that the protein abundance of PROK1 in the porcine CL was not changed in the analyzed days of the estrous cycle, whereas in the bovine CL, the mRNA levels of *PROK1* increase at the onset of luteolysis²⁷. Intriguingly, our results showed that in cyclic pigs, PROK1 increased VEGFA secretion by porcine luteal tissue at the onset of luteolysis, but in pregnant pigs, PROK1 stimulated VEGFA secretion by luteal tissue at both the time corresponding to the luteal phase (Day 12) and the time corresponding to the onset of luteolysis (Day 14). This, in turn, may suggest different roles for PROK1 depending on the physiological state. PROK1 may contribute to processes controlling luteolytic events in the regressing CL, whereas during pregnancy, PROK1 may support mechanisms regulating angiogenic processes in the functioning CL. Moreover, our results are consistent with previous reports indicating that PROK1 increases VEGFA mRNA expression in bovine luteal steroidogenic cells²⁶. In addition, a similar relationship between PROK1 and VEGFA secretion has been reported for endometrial explants in pigs²².

In conclusion, our study thoroughly elucidates the role of PROK1 in the porcine corpus luteum during the mid- and late luteal phase of the estrous cycle and early pregnancy. Our results indicate that PROK1, which is abundantly expressed in the porcine corpus luteum at the mid-luteal phase of the estrous cycle and early pregnancy, participates in processes related to CL function, such as progesterone synthesis, luteal cell apoptosis and viability, and angiogenesis (Fig. 8). Our results suggest that during the rescue of the corpus luteum from luteolysis on Days 12–14 of pregnancy, an increase in the abundance of the PROK1 protein, acting via PROKR1, increases the viability of luteal cells, reduces luteal cell apoptosis, promotes steroidogenesis by increasing the expression of genes involved in P4 synthesis (*STAR*, *HSD3B1*, and *CYP11A1*), and elevates P4 synthesis by luteal tissue. PROK1–PROKR1 signaling also stimulates capillary-like structure formation by luteal endothelial cells and promotes angiogenesis by increasing VEGFA secretion and angiogenin mRNA expression in luteal tissue. Therefore, we concluded that PROK1 is an important regulator of porcine CL function during the mid-luteal phase of the estrous cycle and early pregnancy.



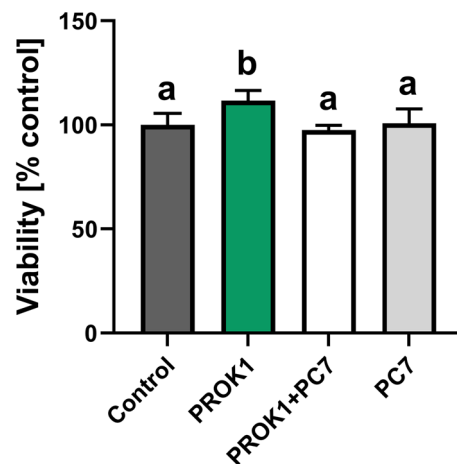


Figure 4. The viability of luteal explants after in vitro treatment analyzed by Alamar Blue assay. Precision-cut luteal slices were incubated with control (vehicle) or PROK1 (40 nM) for 18 h in the presence/absence of prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7; 10 μ M). Data are presented as means of the fold change versus control (100%) $\pm$ SEM. Different lowercase letters (a, b) indicate statistical significant differences between treatments.

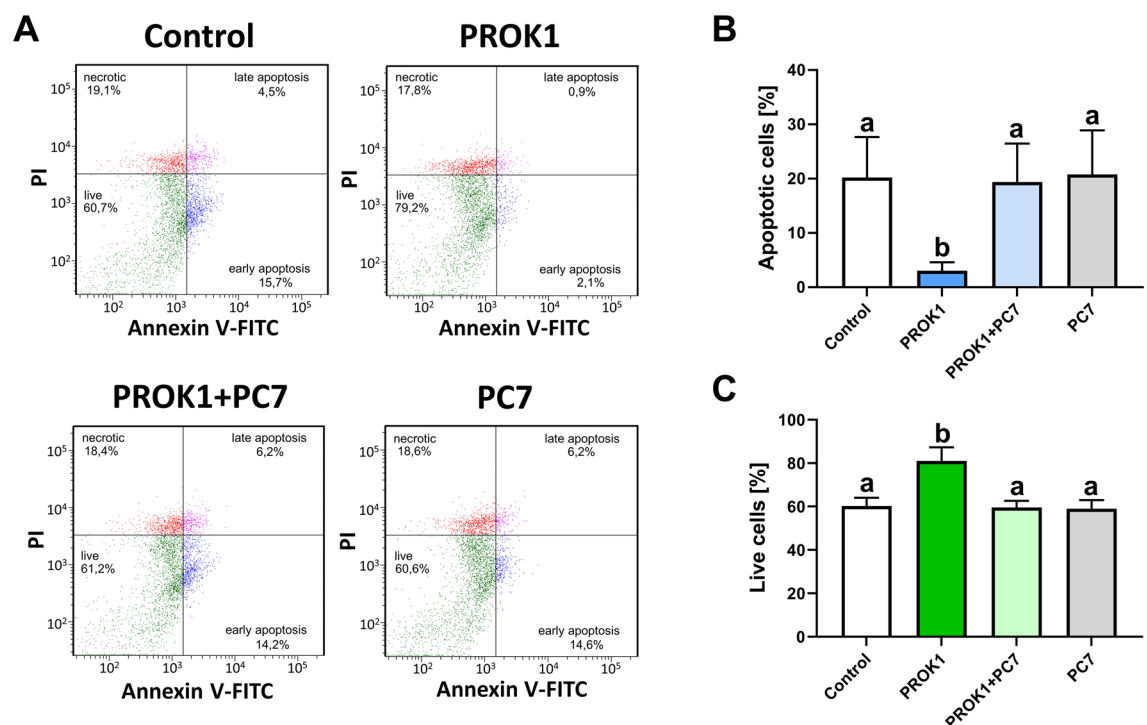


Figure 5. The effect of prokineticin 1 (PROK1) on apoptosis and viability of the porcine luteal cells collected on Day 12 of the estrous cycle. Three cell phenotypes were distinguished: live (annexin V-negative/PI-negative), apoptotic (sum of early apoptotic—annexin V-positive/PI-negative and late apoptotic—annexin V-positive/PI-positive), and necrotic cells (annexin V-negative/PI-positive). (A) Representative scatter plots of PI (y-axis) vs. annexin V (x-axis) with percentages of individual cell phenotypes are shown in panels on the right of the graphs; (B) apoptotic cells, and (C) live cells. Isolated cells were treated with the control (vehicle) or PROK1 (40 nM) in the presence or absence of prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7; 1 μ M). The assay was performed by using fluorescence-activated single-cell sorting based on phenotypes detected by flow cytometry. Data are presented as means $\pm$ SEM. Different lowercase letters (a, b) indicate statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

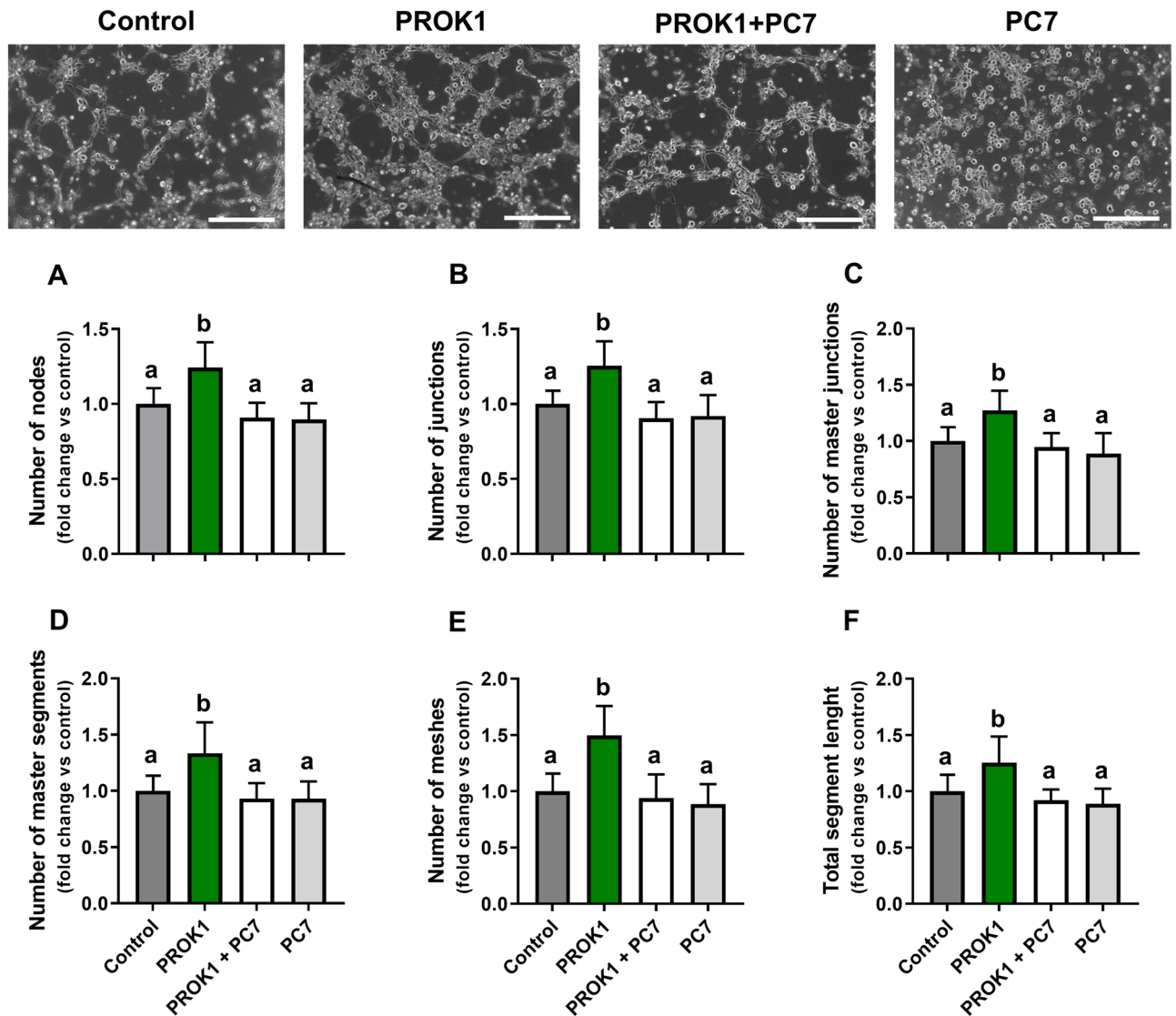


Figure 6. The prokineticin 1 (PROK1) induces capillary-like structure formation by porcine primary luteal endothelial cells isolated on Day 12 of the estrous cycle. The effects of PROK1 (40 nM) on selected parameters describing angiogenesis, such as: (A) the number of nodes, (B) number of junctions, (C) number of master junctions, (D) number of master segments, (E) number of meshes, and (F) total segment length were evaluated in the presence or absence of the prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7, 1 μ M). Representative photographs of the capillary-like structure formation assay for porcine primary luteal endothelial cells are shown in panels above graphs. Data are presented as means $\pm$ SEM of the fold change versus control, different lowercase letters (a, b) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). The scale bar at the lower-right part of all photographs represents 25 μ m.

Materials and methods

The ovaries used in our research were collected from animals bound for commercial slaughter and meat production. The use of animals was in accordance with the Act of 15 January 2015 for the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and conducted in accordance with the national guidelines for agricultural animal care, and the ARRIVE guidelines. Experiments were not carried out on human tissue or cells samples.

Experiment 1. The expression profiles of PROK1 and its receptors (PROKR1 and PROKR2) in the porcine corpus luteum during early pregnancy and the estrous cycle. Gilts of similar age and genetic background from one commercial herd were observed for the onset of estrus. After two natural estruses, the animals were randomly divided into two groups: pregnant and cyclic. Gilts assigned to the pregnant group were artificially inseminated at 12 and 24 h after the onset of estrus (Day 0). Animals were slaughtered in a local slaughterhouse on Day 9, 12, or 14 of pregnancy or the estrous cycle ($n = 4$ –12 per group; no animals were pooled

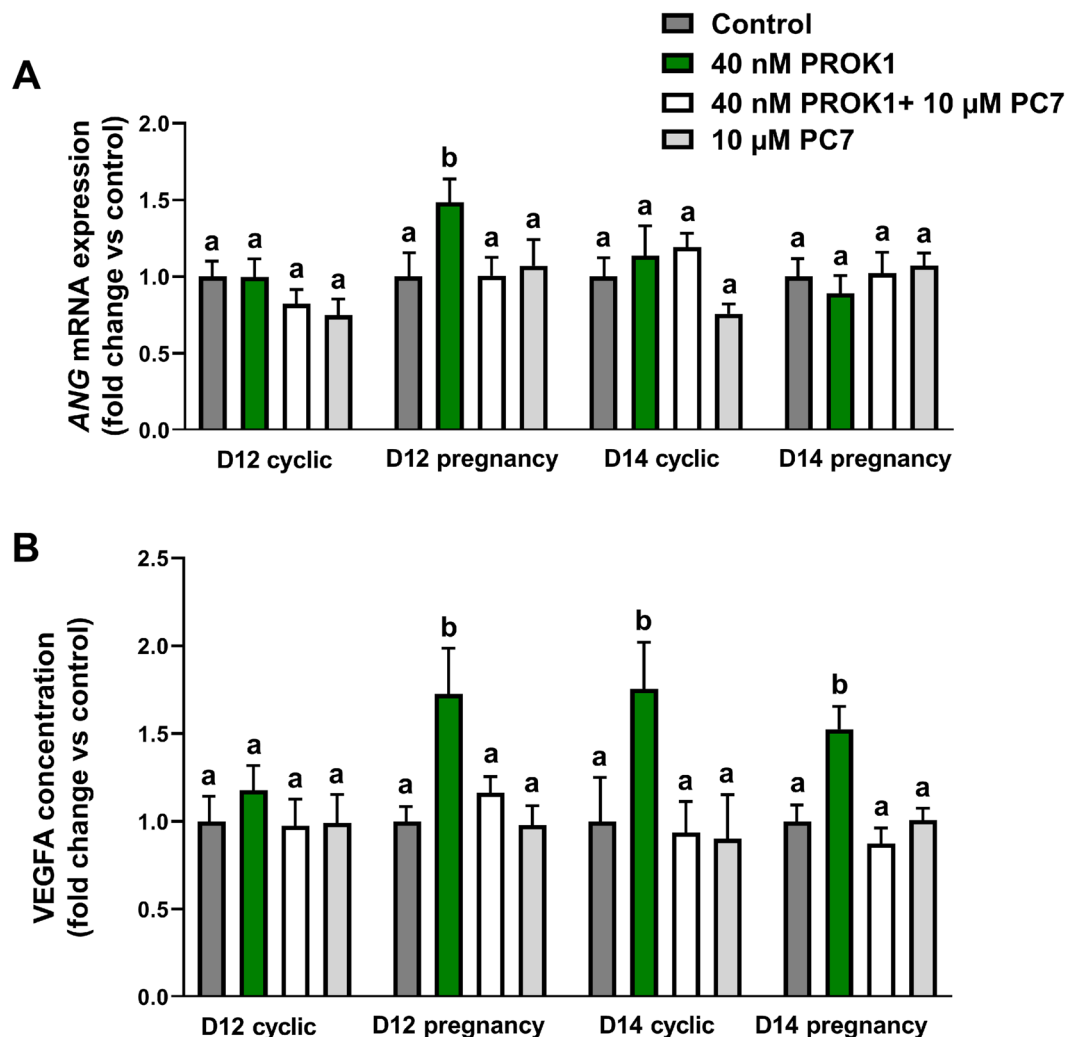


Figure 7. The effect of prokineticin 1 (PROK1) on (A) mRNA expression of angiogenin (ANG) and (B) on vascular endothelial growth factor A (VEGFA) secretion. Precision-cut luteal slices were incubated with control (vehicle) or PROK1 (40 mM) for 18 h in the presence/absence of prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7; 10 μM). Data are presented as means ± SEM. Different lowercase letters (a, b) indicate statistical significant differences between treatments within groups on Days 12 (D12) and 14 (D14) of the estrous cycle or pregnancy.

for replicates; each biological replicate represents a different animal). Reproductive status (cyclic/pregnant) was assessed based on the presence and morphology of conceptuses and the concentration of progesterone in plasma from jugular vein blood (Supplementary Fig. 1). The estrous cycle stage was confirmed by estrus observation and assessment of the ovarian morphology. Gilts that were fertilized but nonpregnant were excluded from the experiments. Luteal tissue samples were collected from CL separated from ovaries and snap-frozen in liquid nitrogen. The luteal expression of PROK1, PROKR1, and PROKR2 genes and proteins was determined by using Western blotting and quantitative PCR (qPCR; real-time RT-PCR), as described in the “Gene expression analyses” and “Protein expression analyses” sections in the Supplementary Information.

Experiment 2. Immunolocalization of PROK1, PROKR1, and PROKR2 proteins in the porcine corpus luteum. Prokineticin 1 and its receptors (PROKR1 and PROKR2) were immunolocalized in the porcine corpora lutea on Days 12 and 14 of the estrous cycle and pregnancy (n = 3 per group; each biological replicate represents a different animal) as described previously²² with some modifications. A full description of the procedure is provided in the Supplementary Information.

Experiment 3. The effects of PROK1 on the synthesis of progesterone by porcine luteal explants in vitro. The effects of PROK1 on the expression of genes involved in steroidogenesis as well as on progesterone synthesis by luteal tissue explants were studied using an in vitro model of precision-cut luteal slices as described previously⁴², with some modifications. Briefly, the ovaries were collected from gilts on Days 12 and 14 of the estrous cycle or pregnancy (n = 4–7 per group; no animals were pooled for replicates; each biological replicate represents a different animal), placed in medium M199 (cat. no. 2525; Merck, Darmstadt, Germany)

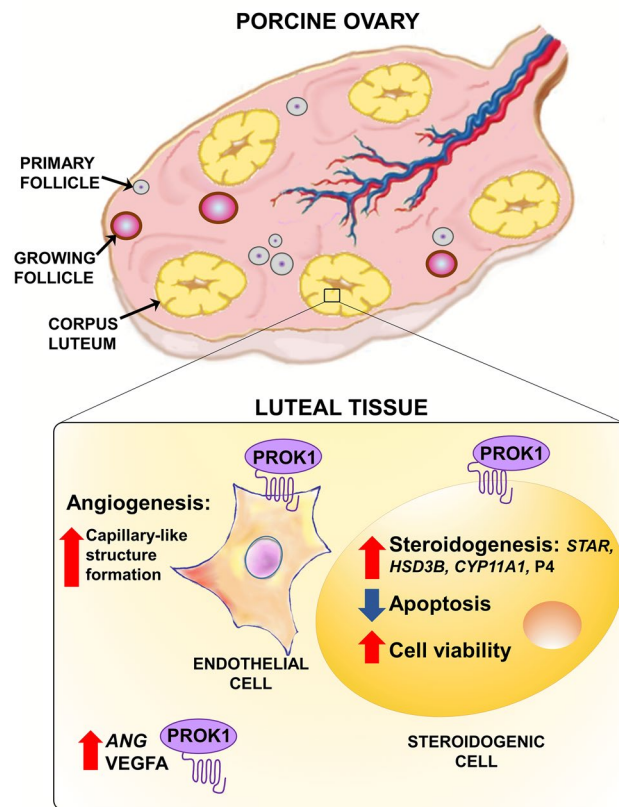


Figure 8. Proposed mechanism of prokineticin 1 (PROK1) for regulating the porcine corpus luteum function during the mid-luteal phase of the estrous cycle (Day 12 of the estrous cycle) and early pregnancy (the maternal recognition of pregnancy and the rescue of CL from regression, Days 12 and 14 of pregnancy). A greater abundance of PROK1, acting through the related receptor (PROKR1), increases the viability of luteal cells and reduces luteal cell apoptosis, as well as promotes steroidogenesis by increasing the expression of genes involved in progesterone (P4) synthesis: steroidogenic acute regulatory protein (STAR), hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (*HSD3B1*), and cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 (*CYP11A1*), and elevating P4 secretion. PROK1–PROKR1 signaling also promotes angiogenesis by stimulating the capillary-like structure formation by luteal endothelial cells and increasing vascular endothelial growth factor A (VEGFA) secretion and angiogenin (ANG) mRNA expression in luteal tissue. PROKR2 mRNA and protein are expressed in the porcine CL and also may have a putative role in effects of PROK1 on CL. A scheme of ovary was prepared based on a cartoon adapted and modified from⁴⁸.

supplemented with antibiotics (penicillin, streptomycin; P0781, Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) and 0.1% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA; ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) and transported to the laboratory on ice. Then, a corpus luteum was separated from the rest of the ovary and cut out using a tissue coring tool. Luteal tissue was transferred onto a Krumdick Tissue Slicer (K&F Research, Birmingham, AL, USA). Tissue explants of similar dimensions and weight (~180 µm thick, 8 mm diameter, 4–5 mg wet weight) were cut and collected in a Petri dish filled with medium M199. The luteal explants were then transferred to 6-well plates (one luteal slice and 4 mL of medium per well). For one hour, the explants were preincubated in medium with or without a PROKR1 antagonist (2-(5-(4-fluorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino)-ethyl)-guanidine; PC7, 10 µM). Then, the medium was changed, and the explants were incubated for 18 h in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂ at 37 °C with gentle shaking with either vehicle (control, 0.01% ethanol) or PROK1 (40 nM; cat. no. 100–44, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) in the presence or absence of a PROKR1 antagonist (PC7, 10 µM). The IC₅₀ for PROKR1 is 36 nM, whereas that for PROKR2 is 4400 nM⁴³. The amino acid sequence similarity of PROKR1 between pigs and mice (the species for which the antagonist was tested for the first time) was 83.46%. The antagonist was kindly donated by Dr. Gianfranco Balboni from the University of Cagliari in Cagliari, Italy. The doses of PROK1 and PC7 were chosen based on previous studies^{22,23,44}. Following incubation, the luteal explants and culture media were snap-frozen in liquid nitrogen and transferred to -80 °C for future analyses. The expression of genes involved in P4 synthesis (*CYP11A1*, *HSD3B1*, and *STAR*) in the luteal explants was investigated by qPCR, as described in the section “Gene expression analyses” provided in the Supplementary Information. The concentration of P4 secreted by precision-cut luteal slices was determined in collected culture medium by radioimmunoassay (RIA) as described in the Supplementary Information. The viability of luteal explants before and after incubation and in response to the different treatments was analyzed by Alamar Blue assay as described in the Supplementary Information.

Experiment 4. The effect of PROK1 on the apoptosis and viability of luteal cells. *Isolation and culture of porcine luteal cells.* To investigate the effects of PROK1 on the apoptosis/viability of luteal cells, we isolated steroidogenic cells from porcine CL. Ovaries were collected from gilts on Day 12 of the estrous cycle ($n=11$; no animals were pooled for replicates; each biological replicate represented a different animal). Luteal tissue was dissected from the surrounding ovarian tissue and mechanically fragmented using a scalpel. Subsequently, the tissue was enzymatically digested in 0.07% (w/v) collagenase (cat. no. C0130; Sigma–Aldrich) solution in M199 medium supplemented with 1% BSA for 70 min at 37 °C. The total cell suspension contained luteal and endothelial cells. The post-digested cell suspension was then filtered through gauze. Luteal cells were separated from the obtained supernatant through a series of centrifugations ($45\times g$, $29\times g$, and $16\times g$ each for 10 min). The homogeneity of the isolated cells was confirmed by immunodetection of the luteal cell marker HSD3B1. Detailed information on luteal cell characteristics is provided in the Supplementary Information.

Apoptosis assay—Fluorescence-activated single cell sorting (FACS) against propidium iodide and FITC-annexin V by flow cytometry. Luteal cells were seeded into 6-well plates at a concentration of 4×10^5 in M199 medium with 10% newborn calf serum (NCS; Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA). After 24 h, the cells were treated with vehicle or 40 nM PROK1 in the presence or absence of 1 μ M PC7 for 20 h. After incubation, the cells were detached enzymatically using Accutase solution (cat. no. A6964, Merck), and apoptosis was assessed using the flow cytometer FACS Aria II (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) and a FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (cat. no. V13242, Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturers' instructions. The cell populations were classified into three groups: live cells, apoptotic cells, and dead cells. The experiment was repeated 11 times (number of animals = 11).

Experiment 5. The effect of PROK1 on luteal angiogenesis in vitro. To determine whether PROK1 participates in angiogenesis in the porcine corpus luteum, an in vitro model of a capillary-like structure formation assay and a model of precision-cut luteal slices were used.

Isolation and culture of porcine endothelial cells from the corpora lutea. Endothelial cells were isolated during the luteal cell isolation procedure (described in Experiment 4). For isolation of endothelial cells, the supernatant obtained during the first three centrifugations was collected and kept on ice. The collected supernatant was filtered (filter with a pore diameter of 15 μ m) and centrifuged at $300\times g$ for 10 min. Subsequently, the cell precipitate was suspended in culture medium MCDB 131 (cat. no. M8537, Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA), including 10% NCS and 50 μ g/mL endothelial cell growth supplement (cat. no. E2759, Merck, Darmstadt, Germany), and cells were seeded onto a sterile plate. The cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. The homogeneity of the isolated cells was confirmed by examining the cell cultures for the presence of the endothelial cell marker vWF. Detailed information on the endothelial cell characteristics is provided in the Supplementary Information.

Capillary-like structure formation assay. A capillary-like structure formation assay was performed as described previously^{22,45}. Briefly, isolated endothelial cells from the corpora lutea (3×10^5 cells/mL) were suspended in MCDB-131 medium with or without PC7 (1 μ M) and preincubated for 20 min in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. Subsequently, the cells were treated with PROK1 (40 nM) or vehicle (the control). The cells were then plated onto μ -Slide angiogenesis plates (cat. no. 81506; Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) covered with growth factor-reduced Matrigel (cat. no. 354230; Corning, NY, USA) and incubated for 5 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂ in a Zeiss Axio Observer System (Carl Zeiss Microscopy). Single wells were photographed at 30-min intervals. The photographs were analyzed using ImageJ software with an angiogenesis plug-in⁴⁶. This software is able to measure and quantify morphological structures formed by endothelial cells. The parameters describing the formation of the capillary-like networks were defined as described earlier⁴⁷. Pixels with at least three neighbors were defined as nodes. Junctions were referred to as nodes or fused nodes. Elements limited by two junctions/nodes were defined as the segments. The branches consisted of elements delimited by a junction and one extremity, whereas the pieces of three, limited by two junctions (but not exclusively associated with one branch), were considered master segments. At least three linked master segments were defined as master junctions. Areas limited by the segments or master segments were considered meshes. The experiment was repeated 10 times (number of animals = 10) in duplicate (each treatment was duplicated).

The effect of PROK1 on the expression of genes associated with angiogenesis and VEGFA secretion in porcine luteal explants in vitro. We used precision-cut luteal slices described in Experiment 3 to evaluate whether PROK1 may be involved in angiogenic changes in the porcine CL ($n=4-7$ per group; no animals were pooled for replicates; each biological replicate represented a different animal). The expression of genes associated with angiogenesis, including angiogenin (ANG), angiopoietin 2 (ANGPT2), fibroblast growth factor 2 (FGF2), fms-related receptor tyrosine kinase 1 (FLT1), and kinase insert domain receptor (KDR), and the secretion of VEGFA in response to PROK1 treatment were evaluated. The level of VEGFA in the culture medium was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Supplementary Information), whereas the gene expression was determined by qPCR, as described in the section “Gene expression analyses” provided in Supplementary Information.

Statistical analyses. The results obtained in Experiment 1 were assessed using two-way ANOVA, followed by Bonferroni multiple comparison post-test. The results from Experiment 3, studying the effect of PROK1 on

the expression of angiogenic genes and VEGFA secretion (Experiment 5) and assessment of P4 concentration in jugular vein blood plasma collected from cyclic and pregnant gilts were evaluated by two-way ANOVA, followed by Tukey's post-test. The results obtained from the apoptosis assay (Experiment 4), capillary-like structure formation assay (Experiment 5) and luteal explants viability after treatment were assessed using one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons post-test. The results from luteal explants viability before and after incubation were analyzed using T-tests. Differences were considered statistically significant at a 95% confidence level ($p < 0.05$). All statistical analyses were conducted using GraphPad PRISM v. 9.0.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Ethics approval. Ovaries used in our research were collected from animals bound for commercial slaughter and meat production. The use of animals was in accordance with the Act of 15th of January 2015 on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22nd of September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and conducted in accordance with the national guidelines for agricultural animal care, and the ARRIVE guidelines. Experiments were not carried out on human tissue/cells samples.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 4 July 2022; Accepted: 22 March 2023

Published online: 29 March 2023

References

- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K. & McIntush, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* **80**, 1–29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1> (2000).
- Ziecik, A. J., Przygodzka, E., Jalali, B. M. & Kaczmarek, M. M. Regulation of the porcine corpus luteum during pregnancy. *Reproduction* **156**, R57–R67. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0662> (2018).
- Kaczynski, P., Goryszewska-Szczurek, E., Baryla, M. & Wacławik, A. Novel insights into conceptus-maternal signaling during pregnancy establishment in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.23567> (2022).
- Wacławik, A., Kaczmarek, M. M., Blitek, A., Kaczynski, P. & Ziecik, A. J. Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig. *Mol. Reprod. Dev.* **84**, 842–855. <https://doi.org/10.1002/mrd.22835> (2017).
- Pope, W. F. & First, N. L. Factors affecting the survival of Pig embryos. *Theriogenology* **23**, 91–105. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(85\)90075-5](https://doi.org/10.1016/0093-691x(85)90075-5) (1985).
- Reynolds, L. P. & Redmer, D. A. Growth and development of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **54**, 181–191 (1999).
- Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337> (2007).
- Kaczmarek, M. M., Kowalczyk, A. E., Wacławik, A., Schams, D. & Ziecik, A. J. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 730–739. <https://doi.org/10.1002/mrd.20638> (2007).
- LeCouter, J. *et al.* Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**, 877–884. <https://doi.org/10.1038/35091000> (2001).
- Traboulsi, W. *et al.* Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **24**, 73–81. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0040> (2015).
- Alfaidy, N. *et al.* The multiple roles of EG-VEGF/PROK1 in normal and pathological placental angiogenesis. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 451906. <https://doi.org/10.1155/2014/451906> (2014).
- Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G. & Kreil, G. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep.* **4**, 469–473. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor830> (2003).
- Lecouter, J., Lin, R. U. I. & Ferrara, N. EG-VEGF: A novel mediator of endocrine-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 50–57. <https://doi.org/10.1196/annals.1294.005> (2004).
- Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehler, F. J. & Zhou, Q. Y. Identification of two prokineticin cDNAs: Recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* **59**, 692–698. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.692> (2001).
- Lin, D. C. *et al.* Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **277**, 19276–19280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202139200> (2002).
- Chen, J. *et al.* Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol. Pharmacol.* **67**, 2070–2076. <https://doi.org/10.1124/mol.105.011619> (2005).
- Alfaidy, N. Prokineticin1 and pregnancy. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **77**, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.014> (2016).
- Brouillet, S. *et al.* Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2832–2843. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0059> (2010).
- Ferrara, N. *et al.* Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am. J. Pathol.* **162**, 1881–1893. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64322-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64322-2) (2003).
- Kisliouk, T., Levy, N., Hurwitz, A. & Meidan, R. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3700–3707. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030492> (2003).
- Alfaidy, N. *et al.* PROK1 level in the follicular microenvironment: A new noninvasive predictive biomarker of embryo implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 435–444. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1988> (2016).
- Goryszewska, E., Kaczynski, P., Balboni, G. & Wacławik, A. Prokineticin 1-prokineticin receptor 1 signaling promotes angiogenesis in the porcine endometrium during pregnancy. *Biol. Reprod.* **103**, 654–668. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa066> (2020).
- Goryszewska, E., Kaczynski, P., Baryla, M. & Wacławik, A. Pleiotropic role of prokineticin 1 in the porcine endometrium during pregnancy establishment and embryo implantation. *Biol. Reprod.* **104**, 181–196. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa181> (2021).
- Ngan, E. S. *et al.* Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* **147**, 88–95. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0543> (2006).
- Goryszewska-Szczurek, E., Baryla, M., Kaczynski, P. & Wacławik, A. Prokineticin 1-prokineticin receptor 1 signaling in trophoblast promotes embryo implantation and placenta development. *Sci. Rep.* **11**, 13715. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93102-1> (2021).

26. Kisliouk, T. *et al.* Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: Expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* **146**, 3950–3958. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0297> (2005).
27. Kisliouk, T. *et al.* Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: Involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol. Reprod.* **76**, 749–758. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054734> (2007).
28. Masuda, Y. *et al.* Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 396–402. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00239-5) (2002).
29. Fraser, H. M. *et al.* Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 427–434. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0843> (2005).
30. Waclawik, A. Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: Regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig. *Reproduction* **142**, 389–399. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0033> (2011).
31. Waclawik, A., Kaczynski, P. & Jabbour, H. N. Autocrine and paracrine mechanisms of prostaglandin E(2) action on trophoblast/conceptus cells through the prostaglandin E(2) receptor (PTGER2) during implantation. *Endocrinology* **154**, 3864–3876. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2271> (2013).
32. Baryla, M., Kaczynski, P., Goryszewska, E., Riley, S. C. & Waclawik, A. Prostaglandin F2alpha stimulates adhesion, migration, invasion and proliferation of the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Placenta* **77**, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.01.020> (2019).
33. Gry, M. *et al.* Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-365> (2009).
34. Maier, T., Guell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* **583**, 3966–3973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036> (2009).
35. Evans, J. *et al.* Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* **149**, 2877–2887. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1633> (2008).
36. Hoffmann, P. *et al.* Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J. Cell Mol. Med.* **13**, 2224–2235. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x> (2009).
37. Sugino, N. & Okuda, K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *J. Reprod. Dev.* **53**, 977–986. <https://doi.org/10.1262/jrd.19047> (2007).
38. Ekert, P. G. & Vaux, D. L. Apoptosis and the immune system. *Br. Med. Bull.* **53**, 591–603. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011632> (1997).
39. Przygodzka, E., Kaczmarek, M. M., Kaczynski, P. & Ziecik, A. J. Steroid hormones, prostanoids, and angiogenic systems during rescue of the corpus luteum in pigs. *Reproduction* **151**, 135–147. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0332> (2016).
40. LeCouter, J. & Ferrara, N. EG-VEGF and Bv8A novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 276–282. [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(03\)00110-5](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(03)00110-5) (2003).
41. Podlovni, H. *et al.* Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: A physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol. Biochem.* **18**, 315–326. <https://doi.org/10.1159/000097609> (2006).
42. Przygodzka, E., Lopinska, M. & Ziecik, A. J. Precision-cut luteal slices: A promising approach for studying luteal function in pigs. *Reprod. Biol.* **14**, 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.04.001> (2014).
43. Lattanzi, R. *et al.* Halogenated triazinediones behave as antagonists of PKR1: In vitro and in vivo pharmacological characterization. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **5**, 5066–5074 (2014).
44. Landucci, E. *et al.* Prokineticins are neuroprotective in models of cerebral ischemia and ischemic tolerance in vitro. *Neuropharmacology* **108**, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.043> (2016).
45. Kaczynski, P., Goryszewska, E., Baryla, M. & Waclawik, A. Prostaglandin F2alpha stimulates angiogenesis at the embryo-maternal interface during early pregnancy in the pig. *Theriogenology* **142**, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.046> (2020).
46. Carpentier, G. Contribution: Angiogenesis analyzer. *ImageJ News* **5** (2012).
47. Oliveira, S. M. *et al.* Platelet lysate-based pro-angiogenic nanocoatings. *Acta Biomater.* **32**, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.028> (2016).
48. Marieb, E. N. & Hoehn, K. N. *Human Anatomy & Physiology 7TH EDITION*. (Benjamin Cummings Pearson Education, Incorporated, 2006).

Acknowledgements

This research was supported by the National Science Centre (Poland), grant no. 2019/35/N/NZ9/03986; only the study on the capillary-like structure formation in response to PROK1 was supported by internal funds of the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences (no. 18/FBW/2021). We are grateful for Katarzyna Gromadzka-Hliwa, Jan Kłos, Michał Blitek (Institute of Animal Reproduction and Food Research of PAS, Olsztyn, Poland) for technical assistance and/or sample collection. Joanna Wiśniewska (Laboratory Cell and Tissue Analysis and Imaging, Institute of Animal Reproduction and Food Research of PAS, Olsztyn, Poland) for her excellent technical assistances with flow cytometry.

Author contributions

M.B. performed most of the experiments, contributed to the conception and design of the study, administration the grant project, participated in the data analysis and interpretation, wrote the draft of the manuscript, revised the manuscript. E.G-Sz.: contributed to performing experiments and writing the draft and revision of the manuscript, participated in data analysis of capillary-like formation assay. P.K. participated in data analysis, writing the draft and the revision of the manuscript. G.B.: contributed to expertise in prokineticin 1 receptor antagonist. A.W. conceptualized the study design and coordinated the study, analyzed and interpreted the data, contributed to optimization of the experiments, writing the draft and revision of the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32132-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.W.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Supplementary Dataset

Prokineticin 1 is a novel factor regulating the porcine corpus luteum function

Monika Baryla¹, Ewelina Goryszewska-Szczurek¹, Piotr Kaczynski¹, Gianfranco Balboni²,
Agnieszka Waclawik^{1*}

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima
10, 10-748 Olsztyn, Poland.

²Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Cittadella
Universitaria, 09042 Monserrato (CA), Italy.

*Corresponding author:

Agnieszka Waclawik

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima
10, 10-748 Olsztyn, a.waclawik@pan.olsztyn.pl

Major Category: Biological Sciences

Minor Category: Reproductive Biology

Supplementary Methods:

Immunohistochemistry procedure

Prokineticin 1 and its receptors (PROKR1 and PROKR2) were immunolocalized in the porcine corpora lutea on Days 12 and 14 of the estrous cycle and pregnancy as described previously¹ with some modifications. Briefly, corpora lutea dissected from the ovaries were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin. Paraffin-embedded tissue was cut into 5 µm sections on a microtome. Tissue sections were placed onto glass slides and dewaxed with Neo Clear® xylene substitute (cat. no. 109843; Merck, Darmstadt, Germany) and rehydrated in decreasing ethanol gradient (100, 70, and 50%). Tissue antigens were retrieved by heating sections in 10 nM solution of citrate buffer (pH=6) for 15 minutes. Then, tissue sections were incubated in 3% hydrogen peroxidase in methanol for 30 minutes. Afterwards, sections were treated with SEA BLOCK Blocking Buffer (cat. no. 37527; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to block unspecific reactions with antibodies. Sections were incubated overnight at 4° C with primary anti-PROK1, anti-PROKR1 and anti PROKR2 antibodies (Supplementary Table 1). Afterwards, secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies (1:200; Supplementary Table 1) were applied to the sections for 45 minutes at room temperature. Sections were then incubated for 30 minutes with a mixture of reagents A and B (cat. no. PK-6102; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) in TRIS-buffered saline to activate conjugated peroxidase. Immune complexes were visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride hydrate (cat. no. D5637, Sigma–Aldrich, Saint Luis, USA). Subsequently, sections were slightly counterstained with hematoxylin and dehydrated with a rising gradient of alcohols (70, 96, and 100%). Sections were incubated with xylene substrate (twice for 10 and 15 minutes) and mounted using DPX (cat. no. 44581, Fluka, Buchs, Switzerland). Negative controls were performed with normal rabbit IgG (I-1000-5; Vector Laboratories) diluted at the same protein concentration as the primary antibodies, omitting the primary antibodies (PROK1 and PROKR2), and by using blocking peptide (PROKR1, cat. no. LS-E29168, LSBio, Seattle, WA, USA). Tissue sections were observed under a light microscope (Olympus Provis AX70, Tokyo, Japan) and photographed.

Characteristics of luteal cells

Luteal cells homogeneity was confirmed by immunodetection of HSD3B1 in the isolated cells. The cells were seeded on Cell Imaging Coverglasses (cat. no. 003074206; Eppendorf, Hamburg, Germany) at a density of 5×10^4 . The attached cells were washed with PBS before fixing in 2% PFA for 15 min. The cells were then washed with PBS and blocked with newborn donkey serum (cat. no. 017-000-121, Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK) for 1 hour at room temperature. Subsequently, the buffer was removed, and cells were incubated overnight with primary anti-HSD3B1 antibodies at 4°C (Supplementary Table 1). Afterwards, the cells were washed with PBS and incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature (Supplementary Table 1). Negative controls were performed by omitting the primary antibodies. Cell nuclei were counterstained with DAPI (cat. no. ab104135; Abcam, Cambridge, UK). Slides were mounted with anti-fade fluorescence mounting medium (cat. no. ab104135, Abcam, Cambridge, UK). Fluorescent images of stained cells were captured using an Olympus microscope (Olympus BX-40) equipped with filters set for CY3.

Characteristics of endothelial cells

The homogeneity of isolated cells was confirmed by examining cell culture for the presence of the endothelial cell marker, von Willebrand factor (vWF). Isolated cells after the first passage were cultured for 3 days on Cell Imaging Coverglasses at a seeding density of 1.5×10^5 cells/mL. The culture medium was removed, and cells were washed with PBS. Then, cells were fixed in 2% PFA for 15 minutes at room temperature. Subsequently, cells were washed and blocked with SEA BLOCK Blocking Buffer for 1 hour at room temperature. The cells were washed and then incubated overnight with primary anti-vWF antibodies at 4°C (Supplementary Table 1). The next day, cells were incubated with secondary anti-rabbit antibodies (Supplementary Table 1) for 1 hour at room temperature. Negative controls were performed by replacing the primary antibodies with normal rabbit IgG diluted to the antibody concentrations (Supplementary Table 1). Actin filaments were stained with CytoPainter Phalloidin-iFluor 488 Reagent (cat. no. ab176753, Abcam, Cambridge, UK). Additionally, to visualize cell nuclei, counterstaining with DAPI was performed. Slides were mounted with anti-fade fluorescence mounting medium. Fluorescent images of stained cells were captured using an Olympus microscope (Olympus BX-40) equipped with filters set for CY3 and iFluor488.

Gene expression analyses

The expression of *PROK1*, *PROKR1*, and *PROKR2* genes in porcine CL on Days 9, 12, and 14 of pregnancy and the estrous cycle, as well as the expression of *CYP11A1*, *HSD3B1*, *STAR*, *ANG*, *ANGPT2*, *FLT1*, and *KDR* genes in porcine luteal explants in response to *PROK1* treatment, was determined by qPCR, as described previously¹. Briefly, total RNA was isolated from collected samples using commercially available kits (ex vivo samples—A&A Biotechnology, Gdansk, Poland; in vitro samples—Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocols. The quality and quantity of isolated RNA were assessed using Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Total RNA was then reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, USA). Synthesized cDNA was used as a template in real-time PCR. The expression of the studied genes was analyzed using TaqMan Master Mix with TaqMan probes (Life Technologies, Supplementary Table 2) according to the manufacturer's protocol. The PCR programs for all genes were as follows: initial denaturation (95°C, 10 min) followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 15 sec), annealing, and elongation (60°C, 1 min). All real-time PCR reactions were performed with Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR system (Life Technologies). Gene expression was estimated using real-time PCR Miner software². The following formula was used to calculate gene expression from values generated by PCR Miner software: $1/(1+\text{Average Efficiency})^{\text{CT}}$. The stability of reference genes actin beta (*ACTB*), cyclophilin A (*PPIA*), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was assessed separately by NormFinder³ for ex vivo and in vitro experiments. The results of gene expression in luteal tissue from Days 9, 12, and 14 of pregnancy and the estrous cycle were normalized against the geometric mean of *ACTB* and *PPIA*, whereas the gene expression in luteal explants collected after in vitro experiments was normalized against the geometric mean of *GAPDH* and *PPIA*. The geometric mean was calculated for each sample separately using the expression values of selected reference genes.

Protein expression analyses

Protein expression of PROK1, PROKR1, and PROKR2 in porcine corpora lutea on Days 9, 12, and 14 of pregnancy and the estrous cycle was evaluated by Western blotting analyses, as described previously¹ with some modifications. The luteal tissue samples were homogenized in a homogenization buffer (50 mM/L TRIS-HCl, pH 8.0; 150 mM/L NaCl; 1 mM/L EDTA) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich). Total protein extracts (70 µg for PROK1; 50 µg for PROKR1 and PROKR2) were dissolved in SDS-gel loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, and 2% β-mercaptoethanol), heated at 95°C for 4 min. Protein samples were separated on Tris-Tricine SDS-PAGE (PROK1)¹ or 10% Tris-Glycine SDS-PAGE gels (PROKR1 and PROKR2). Separated proteins were electroblotted onto a 0.2 µm (PROK1) or 0.4 µm (PROKR1, PROKR2) polyvinylidene difluoride membrane (PVDF). Then, the membranes were blocked in 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (TBS-T). Subsequently, the PVDF containing samples to determine the expression of PROK1 were divided into two parts (the upper part was subjected to detection of GAPDH expression, while the lower part was subjected to detection of PROK1 expression). Afterwards, the membranes were incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies (Supplementary Table 1). Next, the incubated membranes were washed three times with fresh TBS-T and incubated with secondary anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated antibodies (Supplementary Table 1) for 90 min at room temperature. To determine GAPDH expression (PROKR1 and PROKR2), membranes were washed three times with fresh TBS-T, re-blocked in 5% nonfat dry milk in TBS-T, and then incubated again with primary antibodies (the blots were not stripped). Negative controls were obtained by replacing the primary antibodies with normal rabbit IgG (IgG; sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) used at the same concentration as the primary antibodies. For PROKR1 additional negative control was performed with the primary antibody pre-absorbed with a blocking peptide (LS-E29168, LS Bio). Immune complexes were visualized using a standard alkaline phosphatase visualization procedure and documented in ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Normalization of the results was performed by dividing the expression of the tested protein by the expression of GAPDH (for each sample separately).

Alamar Blue Viability assay

The effect of the time of incubation and treatment with PROK1 (40 nM), PC7 (10 µM) and PROK1+PC7 on the viability of the luteal explants was assessed by the Alamar Blue assay (cat. no. DAL 1025, Invitrogen, Waltham, MA, USA). Metabolically active living cells change the color of Alamar Blue from blue to pink, while dead or inactive cells do not change the original blue color. The measurement was performed according to the manufacturer's protocol. The ovaries were collected from gilts on Day 12 of the estrous cycle (n = 4). The luteal explants were prepared as described in the Experiment 3. To determine the initial viability (control T0), CL slice were pre-incubated for 1 h, then the medium was changed and incubated for 4 h with Alamar Blue. Whereas, to determine the viability after treatment, the CL explants were incubated with control (vehicle, control T18) or PROK1 (40 nM) for 14 h in the presence/absence of prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7; 10 µM). After 14 h, Alamar Blue was added to the culture medium and incubated for a further 4 h (total incubation time was 18 h). After 4 h incubation with Alamar Blue, 300 µL of reaction mixtures were transferred to 96-well plates (100 µL per well). Absorbance measurement was performed using Epoch Microplate Spectrophotometer (Agilent BioTek, Santa Clara, CA, USA) at 570 and 600 nm. Medium (M199) with 10% Alamar Blue, without any CL explant, was used as blank for the absorbance measurements. The percentage of viability was calculated using the free software `alamarBlue Colorimetric Calculator` (<https://www.bio-rad-antibodies.com/colorimetric-calculator-fluorometric-alamarblue.html>).

Radioimmunoassay (RIA) for P4

The concentration of P4 secreted by precision-cut luteal slices to culture media and P4 concentration in plasma from blood collected post-mortem from the jugular vein were assessed using a commercially available RIA kit (cat. no. KIP1458, DIAsource Immuno Assays SA, Louvain-la-Neuve, Belgium) according to the manufacturer's protocol. The assay sensitivity was 0.19 pg/mL, and the intra-assay coefficient of variation (CV%) was 4.6% for calculations of P4 concentration in culture media and 4.03% for calculations in blood plasma.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) of VEGFA

The level of VEGFA secreted to culture media by precision-cut luteal slices was determined by a commercially available ELISA assay (cat. no. ES25RB; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The measurement was performed according to the manufacturer's protocol with some modifications. The standard curve was extended by adding standards 10 and 5 pg/mL, and the calculated sensitivity was 5 pg/mL.

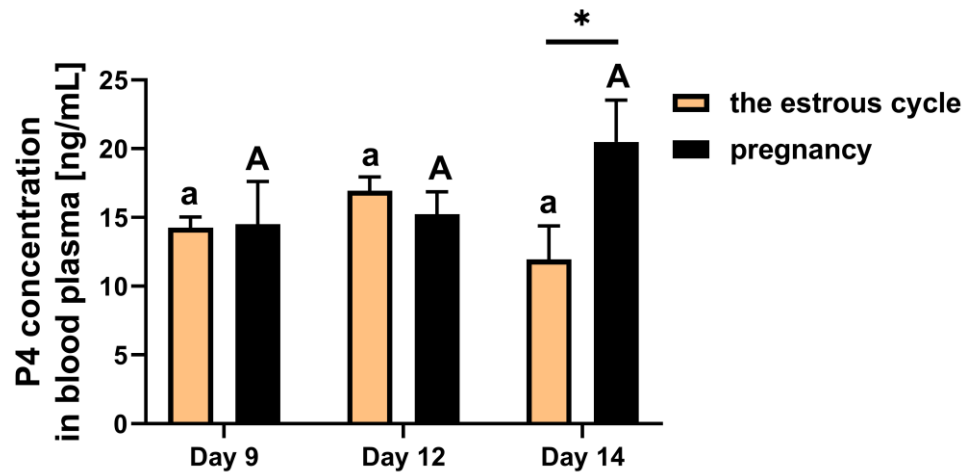
Supplementary Tables:**Supplementary Table 1.** List of antibodies used in Western blot (WB), immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence experiments.

Protein target	Name of antibody	Manufacturer, catalog no., or name of source	Species raised in monoclonal or polyclonal	Dilution Used
PROK1	Anti-PROK1 antibody	Phoenix Pharmaceuticals, G-023-59 (Western blot)/ H-023-59 (Immunohistochemistry)	Rabbit, polyclonal	1:100 (WB)/ 1:150 (IHC)
PROKR1	Anti-PROKR-1 antibodies	LSBio LifeSpan Bioscience, LS-A6684	Rabbit, polyclonal	1:200 (WB)/ 1:150 (IHC)
PROKR2	Prokineticin receptor 2 (extracellular) antibody	Invitrogen, PA5-77688	Rabbit, polyclonal	1:200 (WB)/ 1:50 (IHC)
GAPDH	Anti-GAPDH antibody	Abcam, ab9485	Rabbit, polyclonal	1:2000
anti-rabbit AP	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody	Sigma-Aldrich, A3687	Goat, polyclonal	1:20000
Anti-rabbit Biotinylated	Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated	Vector Laboratories Inc, AB-1000	Goat, polyclonal	1:200
VWF	anti- von Willebrand factor	Dako, A-0082	Rabbit, polyclonal	1:100
HSD3B1	Anti-HSD3B1	Abcam, ab55268	Mouse, monoclonal	1:100
Anti-mouse CY3	CY TM 3 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 715-165-150	Donkey, polyclonal	1:2000
Anti-rabbit CY3	CY3-conjugated donkey anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, 711165152	Donkey, polyclonal	1:2000

Supplementary Table 2. Assays used in real-time RT-PCR analyses.

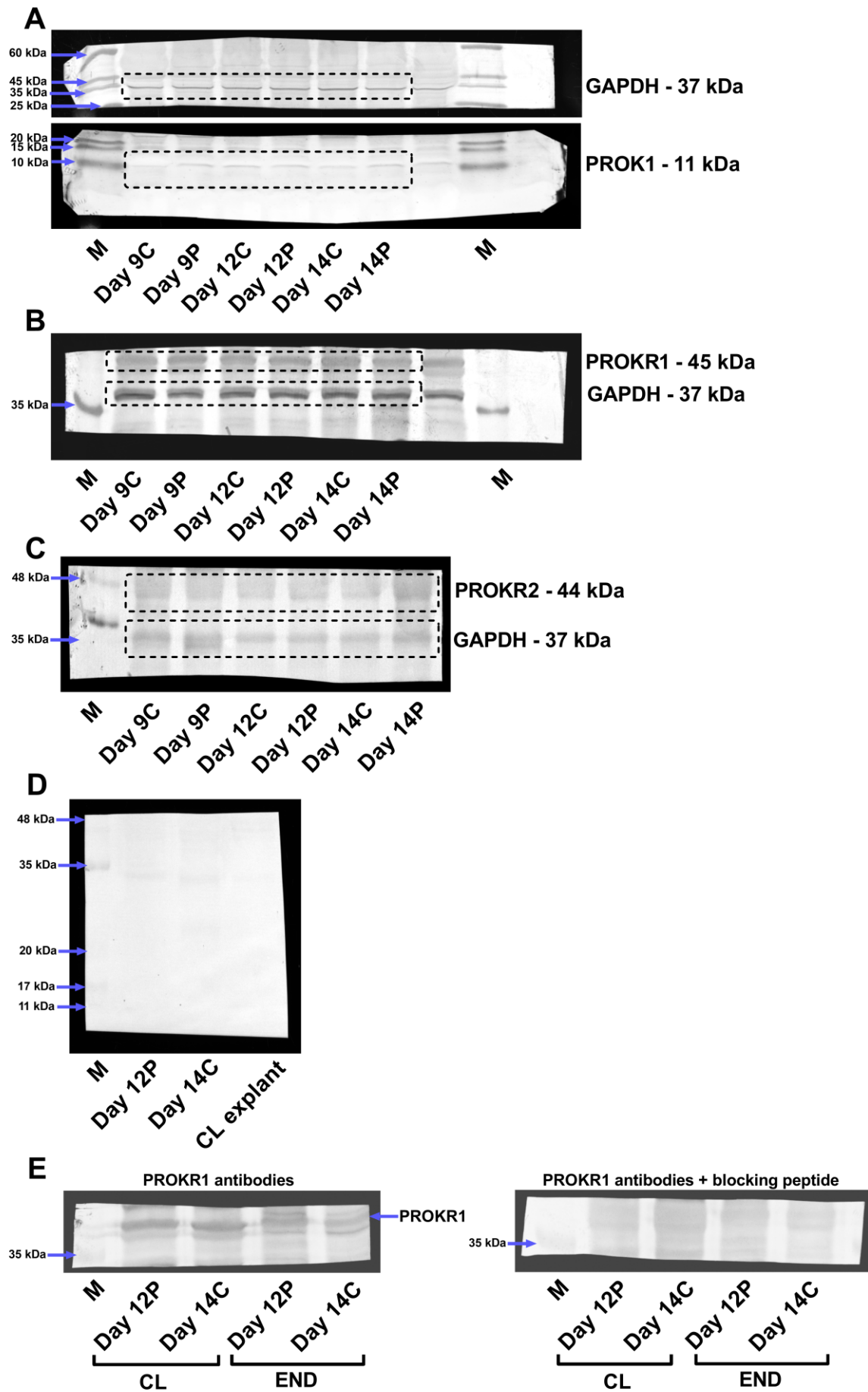
Gene	Primer sequence/TaqMan Assay ID	GenBank accession no.
<i>ACTB</i>	Ss03376081_u1	AK237086.1
<i>GAPDH</i>	Ss03373286_u1	NM_001206359.1
<i>PPIA</i>	Ss03394782_g1	NM_214353.1
<i>PROK1</i>	Ss04246562_m1	NM_001172586.1
<i>PROKR1</i>	ARGZGD3	NC_010445.4
<i>PROKR2</i>	ARWCXJZ	NC_010459.5
<i>HSD3B1</i>	Ss03391752_m1	NM_001004049.2
<i>CYP11A1</i>	Ss03384849_u1	NM_214427.1
<i>STAR</i>	Ss03381250_u1	NM_213755.2
<i>FGF2</i>	Ss03375809_u1	AJ577089.1
<i>FLT1</i>	Ss03375679_u1	AJ245445.1
<i>KDR</i>	Ss03376639_u1	XM_013997943.2
<i>ANG</i>	Ss03380513_u1	NM_001044573.2
<i>ANGPT2</i>	Ss03392365_m1	NM_213808.1

Supplementary Figure 1



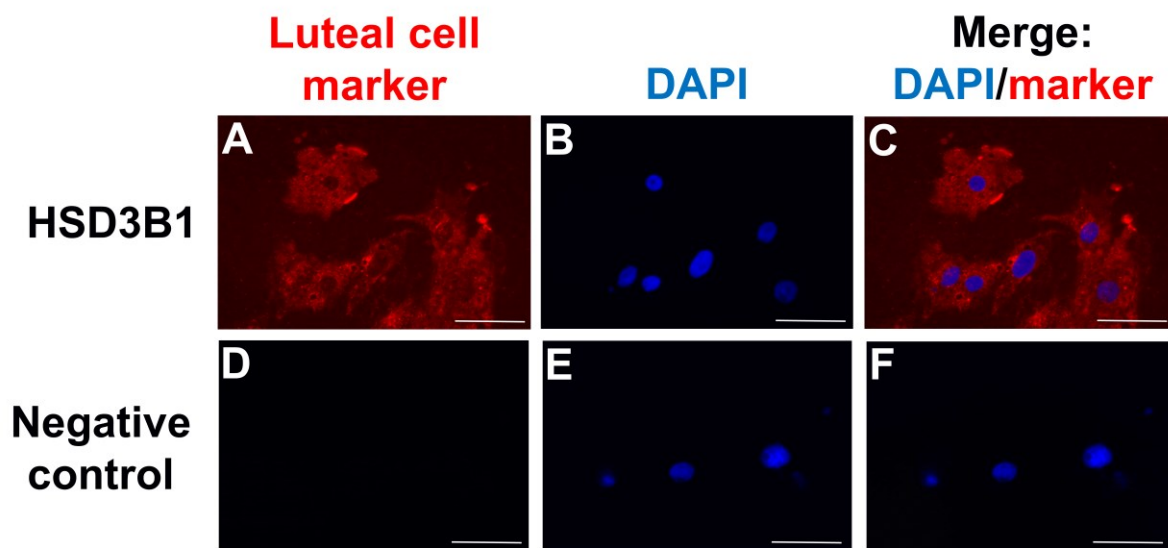
Supplementary Figure 1. Progesterone (P4) concentration in plasma from jugular vein blood collected post mortem from gilts on either Day 9, 12 or 14 of the estrous cycle or pregnancy. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Lowercase letters (a) indicate no statistical significant differences between days of the estrous cycle, and capital letters (A) indicate no statistical significant differences between days of pregnancy. Statistical significance ($p < 0.05$) of reproductive status has been marked with an asterisk (*).

Supplementary Figure 2



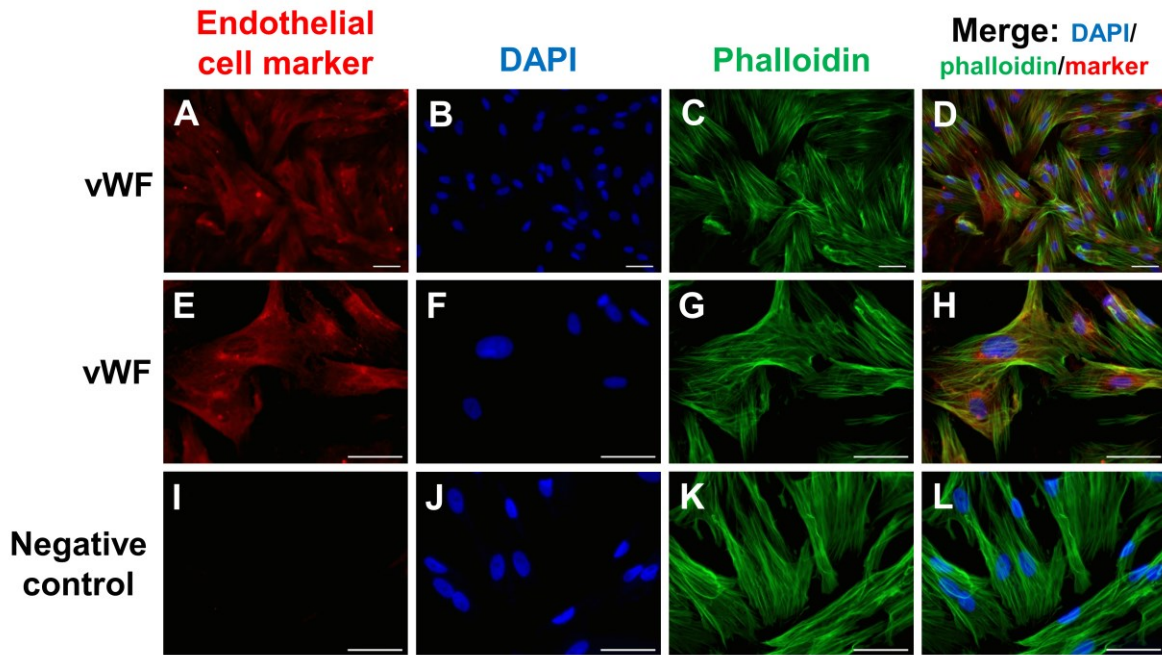
Supplementary Figure 2. Uncropped images of full length Western blot membranes presented in the Figure 1 for expression of prokineticin 1 (PROK1) (A); prokineticin receptor 1 (PROKR1) (B) and prokineticin receptor 2 (PROKR2) (C). Negative controls were obtained by: a replacement of the primary antibodies with normal rabbit immunoglobulin G used at the concentration corresponding to the protein concentrations of antibodies (D) and using the primary antibody for PROKR1 pre-absorbed with a blocking peptide (E). The membranes were cut prior to hybridization with the antibodies to reduce the consumption of the antibodies. Colorimetric method of Western blot detection in which membranes are photographed on the black background was used. M - Protein Molecular Weight Marker; CL – corpus luteum tissue; END – endometrium tissue.

Supplementary Figure 3



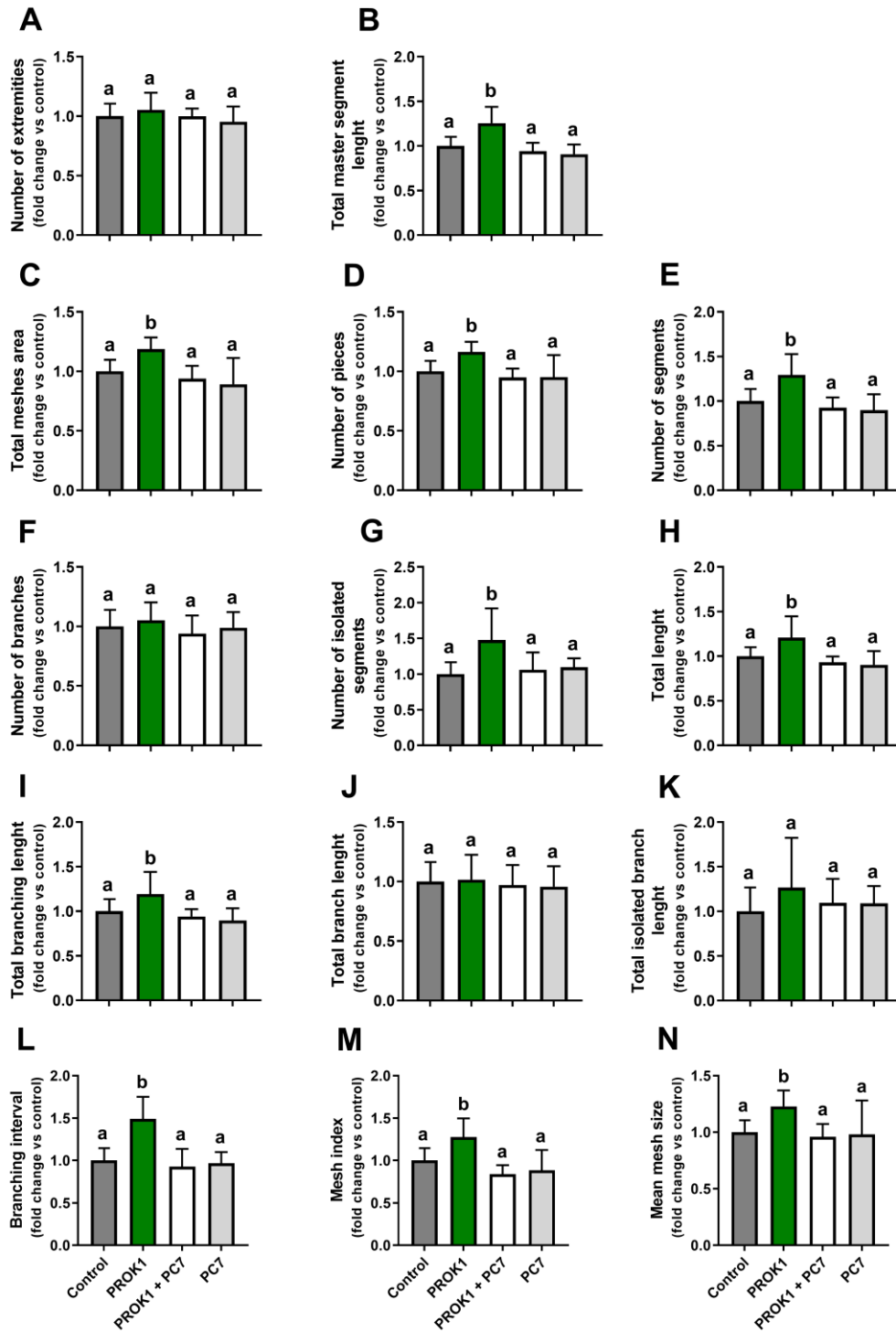
Supplementary Figure 3. Immunolocalization of (A) hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (HSD3B1) factor in the porcine luteal cells. Cell nuclei were stained with (B and E; blue) DAPI dye. Specificity of immunoreaction was determined by using (D) negative control – omitting the primary antibody. Photos merge (DAPI/marker) are shown in the last column (C, and F). Scale bars: 50 μ m.

Supplementary Figure 4



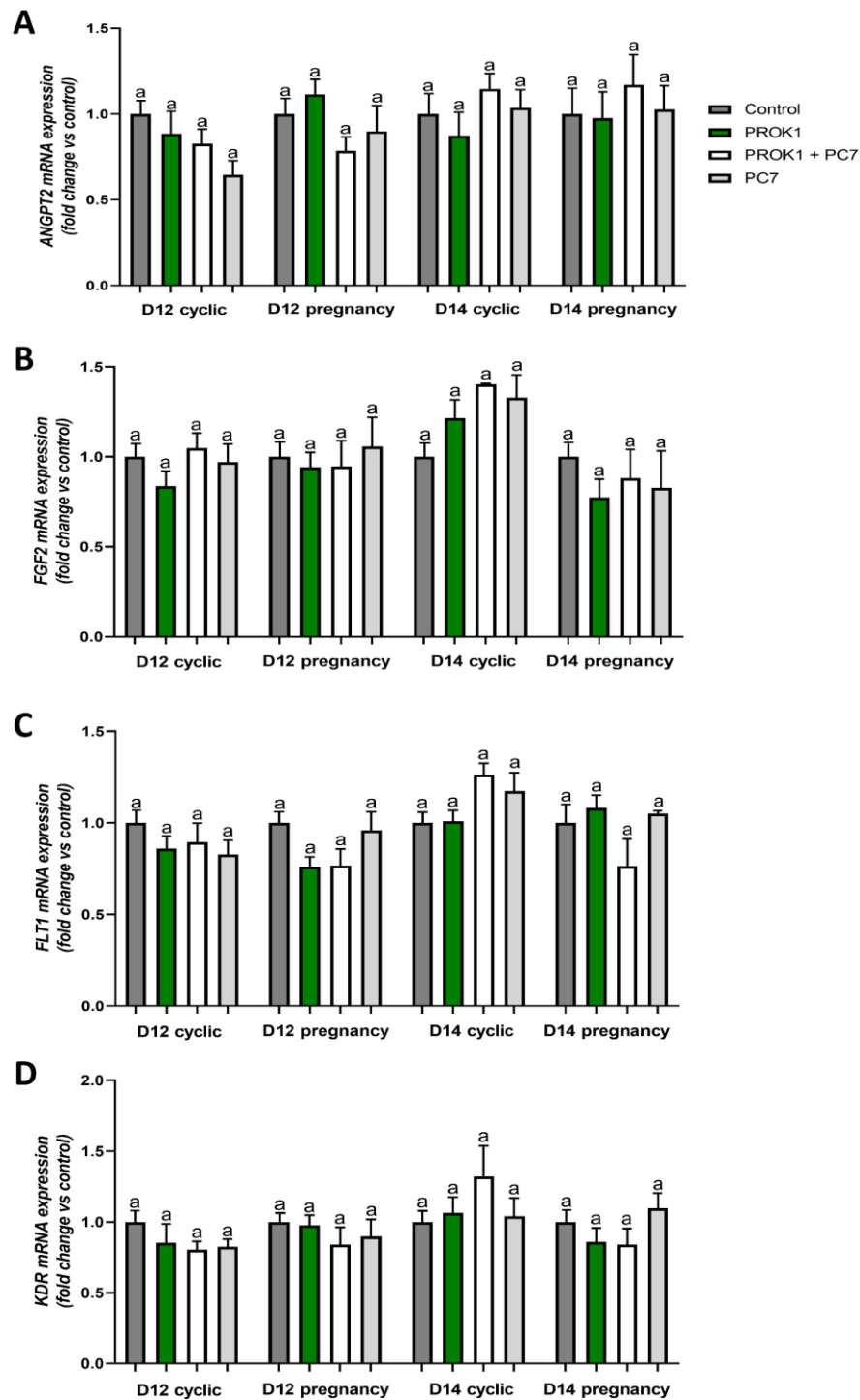
Supplementary Figure 4. Immunolocalization of von Willebrand (vWF) factor (A and E) in the porcine luteal endothelial cells. Cell nuclei were stained with DAPI dye (blue; B, F, and J) while the cytoplasm were stained with phalloidin (green; C, G, and K). Specificity of immunoreaction was determined by using (I) negative controls – normal rabbit IgG. Photos merge (DAPI/phalloidin/marker) are shown in the last column (D, H, and L). Scale bars: 50 μ m.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. Prokineticin 1 effect on capillary-like structure formation by the porcine primary luteal endothelial cells isolated on Days 12 of the estrous cycle. The effects of PROK1 on the parameters describing angiogenesis (excluding the results presented in Fig. 6), such as (A) the number of extremities, (B) total master segment length, (C) total meshes area, (D) number of pieces, (E) number of segments, (F) number of branches, (G) number of isolated segments, (H) total length, (I) total branching length, (J) total branch length, (K) total isolated branch length, (L) branching interval; (M) mesh index, and (N) mean mesh size were evaluated in the presence or absence of a PROK receptor 1 antagonist (PC7). Data are presented as the mean $\pm$ SEM of the fold change versus control. Different letters (a - b) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. The effect of prokineticin 1 (PROK1) on expression of genes associated with angiogenesis in the porcine luteal explants in vitro on Day 12 and 14 of estrous cycle or pregnancy: (A) angiopoietin 2 (*ANGPT2*), (B) fibroblast growth factor 2 (*FGF2*), (C) fms related receptor tyrosine kinase 1 (*FLT1*), and (D) kinase insert domain receptor (*KDR*). Precision-cut luteal slices were incubated with control (vehicle) or PROK1 (40 nM) for 18 h in the presence/absence of prokineticin receptor 1 (PROKR1) antagonist (PC7; 10 μ M). Data are presented as means $\pm$ SEM. The same lowercase letters (a) indicate no statistically significant differences between treatments within groups on Days 12 (D12) and 14 (D14) of the estrous cycle or pregnancy.

References

- 1 Goryszewska, E., Kaczynski, P., Balboni, G. & Wacławik, A. Prokineticin 1-prokineticin receptor 1 signaling promotes angiogenesis in the porcine endometrium during pregnancy. *Biol Reprod* **103**, 654-668, doi:10.1093/biolre/ioaa066 (2020).
- 2 Zhao, S. & Fernald, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* **12**, 1047-1064, doi:10.1089/cmb.2005.12.1047 (2005).
- 3 Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Orntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**, 5245-5250, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496 (2004).



Original Research Article

The regulation of the expression of prokineticin 1 and its receptors and its mechanism of action in the porcine corpus luteum

Monika Baryla, Piotr Kaczynski, Ewelina Goryszewska-Szczurek, Agnieszka Waclawik*

Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748, Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Prokineticin 1
Estradiol
Prostaglandins
Angiogenesis
Corpus luteum
Pregnancy

ABSTRACT

Prokineticin 1 (PROK1) is an important factor in pregnancy establishment in pigs, acting at the embryo–maternal interface and the corpus luteum (CL). Estradiol-17 β (E2) is the primary pregnancy recognition signal in pigs, and its effects are augmented by luteotropic prostaglandin E2 (PGE2). On the contrary, prostaglandin F2 α (PGF2 α) exerts mainly a luteolytic effect. The present study aimed to elucidate whether E2, PGE2, and PGF2 α regulate the expression of PROK1 and its receptors in the porcine CL and to determine the PROK1 effect on luteal endothelial cells and pathways that may be involved in this regulation. The effects of E2, PGE2, and PGF2 α on the expressions of PROK1 and its receptors in the CL were studied using an *in vitro* model of ultrathin luteal tissue explants model. Additionally, the effects of E2 and PGE2 on the PROK1 system were determined using an *in vivo* approach, in which the hormones were administered into the uterine lumen to imitate their secretion by embryos. Endothelial cell proliferation was measured using the colorimetric method. E2 acting via estrogen receptors simulated the mRNA and protein expressions of PROK1 and PROKR1 in CL explants *in vitro* ($p < 0.05$). The simultaneous action of E2 with PGE2 enhanced the expression of luteal *PROK1* mRNA *in vitro* ($p < 0.05$). Estradiol-17 β acting alone significantly increased *PROK1* mRNA levels *in vivo*, whereas E2 simultaneously administered with PGE2 significantly elevated the *PROK1* mRNA expression and PROKR1 mRNA and protein contents in CLs adjacent to uterine horns receiving hormonal infusion compared with CLs adjacent to placebo-treated uterine horns ($p < 0.01$). The PROK1 protein expression was significantly higher in the CLs of pigs treated with E2, PGE2, and E2 together with PGE2 than in the control group. PGF2 α increased the *PROK1* mRNA content in CLs on days 12 and 14 of the estrous cycle ($p < 0.05$). The expression of PROKR2 at the mRNA and protein levels remained unchanged in response to *in vitro* and *in vivo* treatments. PROK1 stimulated the proliferation of luteal endothelial cells by activating the MAPK, AKT, and mTOR pathways ($p < 0.05$). In summary, the luteal expressions of PROK1 and PROKR1 in early pregnancy are regulated by E2 and PGE2. PROK1 stimulates luteal angiogenesis by activating the MAPK, AKT, and mTOR pathways. The regulation of luteal *PROK1* expression by PGF2 α indicates PROK1's putative role during luteolysis. We conclude that PROK1-PROKR1 signaling supports luteal function during CL rescue in pregnancy in pigs.

1. Introduction

The corpus luteum (CL) is critical in gestation maintenance in pregnant mammals. In pigs, the CL is the major progesterone source throughout pregnancy [1]. The lifespan of the CL is determined by the presence of conceptuses that release specific signals triggering a physiological response in the maternal organism, resulting in the CL's prolonged function. Estradiol-17 β (E2) is the primary embryonic signal in pigs secreted by conceptuses on days 11–13 post-coitum and, later, on days 15–25 [2,3]. Prostaglandin E2 (PGE2) is another factor that

supports CL function in pigs and is abundantly secreted by the endometrium and conceptuses during pregnancy establishment [4–10]. In addition, our results revealed that the secretion profile of embryonic and endometrial PGE2 is similar to that of E2 of conceptus origin [5]. A lack of embryos initiates processes leading to the regression of the CL. Pulsatile endometrial secretion of prostaglandin F2 α (PGF2 α) in pigs induces functional luteolysis after day 12 of the estrous cycle, when the CL becomes sensitive to its action [1,11–13]. The main effect of PGF2 α on CLs is decreasing progesterone synthesis by the luteal tissue [14,15].

Prokineticin 1 (PROK1) was demonstrated to be important for

* Corresponding author.

E-mail address: a.waclawik@pan.olsztyn.pl (A. Waclawik).

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.05.044>

Received 2 April 2024; Received in revised form 28 May 2024; Accepted 30 May 2024

Available online 31 May 2024

0093-691X/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ovarian function and gaining successful oocyte competence [16,17], and its expression was shown in CLs [18,19]. Recently, PROK1 was indicated as a pivotal factor in luteal function during early pregnancy in pigs [20]. We demonstrated that the expression of prokineticin 1 and its receptors (PROKR1 and PROKR2) undergoes dynamic changes during the estrous cycle and early pregnancy in the porcine CL [20]. However, the regulatory mechanisms controlling the luteal expression of PROK1 and its receptors in pigs remain unknown. We hypothesized that luteoprotective factors secreted by embryos and luteolytic factors regulate the expression of the PROK1-PROKR system in the CL in the estrous cycle and early pregnancy. In this study, we aimed to elucidate the effects of luteotropic (E2 and PGE2) and luteolytic (PGF2 α) factors on the mRNA and protein abundance of PROK1 and its receptors in the porcine CL using two experimental models: luteal tissue cultures *in vitro*, and an *in vivo* model in which E2 was administered alone or in combination with PGE2 directly into the uterine lumen to imitate the secretion of these hormones by conceptuses. In our recent study, we demonstrated that PROK1, acting through PROKR1, contributed to luteal angiogenesis by stimulating luteal endothelial cells to form capillary-like structures *in vitro* and by increasing the expression of the angiogenin mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGFA) secretion by the CL tissue [20]. Additionally, this study aimed to elucidate the effect of PROK1 on luteal endothelial cells and determine the signaling pathways involved in angiogenesis in the porcine CL.

2. Methods

Procedures involving the use of animals and collecting ovary samples were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, the ARRIVE guidelines and the national guidelines for animal care, and were approved by the Animal Ethics Committee of University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland, permission No. 17/2008.

Gilts of a similar age (approximately 6–6.5 months), weight (100–115 kg), and genetic background originating from the same commercial herd were included in this study. The signs of estrus were checked for every animal. After one natural estrous cycle, the gilts were randomly selected into two groups: pregnant and cyclic. Animals assigned to the pregnant group, underwent insemination at 12 and 24 h after the estrus (day 0). Gilts were slaughtered in a local abattoir on day 12 and 14 of the estrous cycle and on day 14 of pregnancy (n = 6–11 per group). The day of pregnancy was validated based on the presence and morphology of embryos. The day of the estrous cycle/pregnancy was confirmed by the estrus observation and the evaluation of the ovary morphology, as well as progesterone concentration in plasma of jugular vein blood as described in our previous study [20]. Inseminated gilts that were not pregnant were excluded from the experiments.

2.1. Experiment 1: the effects of E2, PGE2, and PGF2 α on mRNA and protein expressions of prokineticin 1, PROKR1, and PROKR2 in the CL *in vitro*

In this experiment, we examined the effects of luteotropic (E2 and PGE2) and luteolytic (PGF2 α) hormones on the luteal expressions of PROK1 and its receptors (PROKR1 and PROKR2). The effects of E2 and PGE2 were studied *in vitro* using luteal tissue explants collected from gilts on day 12 of the estrous cycle. The effects of PGF2 α and its stable analog (fluprostenol; FLP) were evaluated *in vitro* using luteal tissue explants collected on days 12 and 14 of the estrous cycle and day 14 of pregnancy. Corpora lutea were dissected from the ovaries with a tissue-coring tool and transferred onto a Krumdick Tissue Slicer (K&F Research, Birmingham, AL, USA). Luteal explants of a similar size (~180 μ m thick; 8 mm diameter) and weight (4–5 mg wet weight) were minced and placed in a Petri dish containing M199 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The explants were cultured in 6-well plates (a luteal tissue slice per well in 4 mL of the medium) and underwent

preincubation for 1 h in the M199 medium without phenol red and with or without an estrogen receptor antagonist (ICI 182780; Sigma-Aldrich). After preincubation, the explants were incubated under gentle shaking with the treatments for 18 h in a humidified atmosphere with 95 % air and 5 % CO₂ at 37 °C. The following treatments were applied: the control (vehicle: 0.01 % ethanol); E2 (100 nM) with or without ICI 182780 (1 μ M), PGE2 (100 nM), E2 (100 nM) + PGE2 (100 nM), PGF2 α (100 nM and 1 μ M; Sigma-Aldrich), and FLP (1 μ M; Sigma-Aldrich). The hormone doses were selected based on physiological levels in Refs. [11, 21] and their ability to induce a physiological response *in vitro* [22]. After incubation, the luteal explant samples and media were frozen using liquid nitrogen and stored at –80 °C for future experiments. The expression levels of *PROK1*, *PROKR1*, and *PROKR2* mRNA in the luteal explants were assessed using qPCR, as described in the “Gene expression analyses” section. The PROK1 protein level was determined using ELISA, and protein expressions of the receptors were studied using Western blot, as described in the “Protein expression analyses” section.

2.2. Experiment 2: the effect of E2 and PGE2 on mRNA and protein expression of prokineticin 1, PROKR1, and PROKR2 in the CL *in vivo*

To study the effect of E2 and PGE2 separately or simultaneously administered on the levels of PROK1, PROKR1, and PROKR2 gene and protein expressions in the porcine CL, we used an *in vivo* model described previously [23,24]. Briefly, peri-pubertal Pietrain $\times$ Duroc crossbred gilts, of similar genetic background, age (approx. 6.5 months), and weight (approx. 110 kg), after two natural estrous cycles, were subjected to estrus synchronization according to previously established procedure [8]. On days 8 of the third estrous cycle, gilts underwent surgical procedures, during which cannulas were introduced into both uterine horns. Cannulas inserted into uterine lumen were perforated along their length, in order to imitate hormone secretion by embryos. The cannulas were inserted into the uterine lumen at a middle part of uterine horn and were exteriorized through a flank incision on the back of animal. Mixing between the uterine horns was prevented because of anatomical positioning, the catheter length, and the volume of hormonal infusions. Gilts assigned to the control group (n = 6), received infusions of placebo (5 mL of 1 % v/v ethanol saline) into uterine lumen of both horns. In the experimental groups (n = 6 per each group), every animal was treated with hormonal infusions of E2 (833 ng or 33.3 μ g per infusion; Sigma-Aldrich), PGE2 (200 μ g per infusion; Sigma-Aldrich), or E2 together with PGE2 into a randomly chosen horn (the hormone doses were determined based on previous reports [8,23,25]). Into the contralateral horn, the gilts received placebo infusions. Treatments were infused every 4 h for a 24 h, beginning on day 11 after the estrus. On day 12 after onset of the estrus, the gilts were slaughtered at a local slaughterhouse, and tissue samples were collected. Luteal tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Abundance of *PROK1*, *PROKR1* and *PROKR2* mRNA in the collected CL tissue samples was examined using qPCR (subchapter – “Gene expression analyses”). PROK1 protein expression was measured by ELISA assay, while the expression of PROKR1 and PROKR2 proteins were evaluated by Western blot analyses, as detailed in the subchapter “Protein expression analyses”.

2.3. Experiment 3: the effect of PROK1 on luteal endothelial cell proliferation

2.3.1. Isolation and *in vitro* culture of porcine endothelial cells from the CL

Isolation and culture of porcine endothelial cells of luteal origin were performed as described earlier [20]. The protocol allowed to obtain separated populations of steroidogenic and endothelial cells from the CL in pigs. Briefly, ovaries were gathered from gilts (n = 11) on day 12 of the estrous cycle. All corpora lutea were collected and pooled from each gilt to obtain endothelial cells. N refers to the gilt not the single CL. Each biological replicate represented an individual gilt. The CL tissue was

Table 1
Assays used in real-time RT-PCR.

Gene	GenBank accession no.	TaqMan Assay ID
<i>PROK1</i>	NM_001172586.1	Ss04246562_m1
<i>PROKR1</i>	NC_010445.4	ARGZGD3
<i>PROKR2</i>	NC_010459.5	ARWCXJZ
<i>ACTB</i>	AK237086.1	Ss03376081_u1
<i>GAPDH</i>	NM_001206359.1	Ss03373286_u1
<i>PPIA</i>	NM_214353.1	Ss03394782_g1

carefully separated from the surrounding ovary tissue and minced with a lancet. Afterwards, the tissue underwent enzymatic digestion in a solution of 0.07 % (w/v) collagenase (Sigma–Aldrich) in M199 medium with 1 % BSA for 70 min at 37 °C. Cell suspension obtained after tissue digestion consisted both endothelial and luteal cells. This post-digestion cell suspension was passed through a gauze, and the cells were separated by a series of centrifugations. The supernatant collected after the initial three centrifugations was stored on ice. Collected supernatant fractions containing endothelial cells were separated using a 15 µm-diameter pore filter and centrifuged at 300×g for 10 min. Afterwards, the pellet was resuspended in MCDB 131 medium (Sigma–Aldrich), supplemented with 10 % Newborn Calf Serum (Sigma–Aldrich) and 50 µg/mL of endothelial cell growth supplement (Merck, Darmstadt, Germany). The cells were then plated and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Procedure’s effectiveness was validated by assessing the presence of von Willebrand Factor (the endothelial cell marker) in the cultured cells. The characteristics of the isolated endothelial cells was performed as presented previously [20].

2.3.2. Endothelial cell proliferation assay

Proliferation assay experiments were performed as described recently [26,27]. Briefly, PLE (primary luteal endothelial) cells were isolated from CLs of gilts (n = 11) on day 12 of the estrous cycle. Then, PLE cells were seeded (2.5 × 10⁵ cells/mL in 96-well). After attachment, at 50–60 % confluency, the cells were treated for 24 h with the control (a vehicle, 0.01 % ethanol) or 40 nM PROK1 in the presence/absence of a PROKR1 antagonist (1 µM; PC7 [28]), MAPK inhibitor (25 µM; PD 098059; Sigma Aldrich), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor (25 µM; LY 294002; Sigma Aldrich), AKT1/2 kinase inhibitor (2.5 µM; Sigma Aldrich), mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase inhibitor (50 nM; rapamycin; Sigma Aldrich). The dose of PC7 was selected based on previous results [20]. The antagonist was kindly provided by Prof. Gianfranco Balboni (the University of Cagliari, Italy). After 24 h-incubation, proliferation was measured using the CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay (Promega, Madison, WI) according to the producer instructions. Experiments were performed eleven times in triplicate. The fold difference was calculated by dividing the absorbance obtained by PROK1-treated cells by the absorbance obtained by the control-treated cells.

2.4. Gene expression analyses

2.4.1. Real-time RT-PCR

The expressions of *PROK1*, *PROKR1*, and *PROKR2* mRNA in the porcine luteal tissue, from *in vivo* and *in vitro* experiments was evaluated using quantitative PCR (real-time RT-PCR; qPCR), accordingly to previously established methods [20]. Briefly, total RNA was isolated from collected samples using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the producer instructions. The RNA quality and quantity were analyzed using Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). cDNA was generated from RNA by reverse transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) and used as a template for qPCR. The expressions of target genes were determined using TaqMan Master Mix with TaqMan probes (Life Technologies, Table 1), following the

Table 2
List of antibodies used in Western blot analyses.

Protein	Antibody name	Manufacturer, catalog no.	Monoclonal or polyclonal, species raised in	Dilution
PROKR1	Anti-PROKR-1 antibody	LSBio LifeSpan Bioscience, LS-A6684	Polyclonal, rabbit,	1:200
PROKR2	Prokineticin receptor 2 (extracellular) antibody	Invitrogen, PA5-77688	Polyclonal, rabbit,	1:200
GAPDH	Anti-GAPDH antibody	Abcam, ab9485	Polyclonal, rabbit,	1:2000
anti-rabbit AP	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody	Sigma-Aldrich, A3687	Polyclonal, goat	1:20 000

manufacturer’s protocol. The qPCR programs for all the target genes were set as following: denaturation (95 °C, 10 min) followed by 40 cycles of denaturation (95 °C, 15 s), annealing, and elongation (60 °C, 1 min). The reactions were performed using the Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR system (Life Technologies). Expression levels of mRNA were assessed using Miner software2 [29]. The following formula was used to calculate mRNA expression from values generated by PCR Miner software: 1/(1 + Average Efficiency)^{CT}. Stability of house-keeping genes (*ACTB*, *PPIA*, *GAPDH*, *HPRT1*, and *RPL13A*) was separately determined using NormFinder3 [30] for both *in vivo* and *in vitro* experiments. mRNA expression results were normalized against the geometric mean of *ACTB* and *PPIA* (*in vivo* experiments), and against the geometric mean of *ACTB* and *GAPDH* (*in vitro* experiments). The geometric mean was calculated for each sample individually using the expression values of the selected reference genes.

2.5. Protein expression analyses

2.5.1. Western blot

The protein expressions of PROKR1 and PROKR2 in the porcine CLs were evaluated by Western blot analyses, as described previously [20]. The luteal tissue and explant samples were homogenized in a buffer (50 mM/L TRIS-HCl, pH 8.0; 1 mM/L EDTA; 150 mM/L NaCl), including protease inhibitor mixture (Sigma–Aldrich). SDS-gel loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, and 2 % β-mercaptoethanol), was used to dissolve protein extracts (50 µg). Protein samples were denatured by heating at 95 °C for 4 min and separated on 10 % Tris-Glycine SDS-PAGE gels. The proteins were then transferred onto 0.4 µm polyvinylidene difluoride membrane. The membranes with transferred proteins were blocked in 5 % nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1 % Tween 20 (TBS-T), followed by overnight incubation with the primary antibodies (Table 2) at 4 °C. Antibodies were used and validated in our previous papers [20,24,27]. Following incubation, blots were washed with TBS-T, and incubated with secondary anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated antibodies (Table 2) for 90 min at room temperature. To assess GAPDH expression, membranes were washed again in TBT-T, re-blocked, and incubated with primary antibodies against GAPDH (Table 2). Normal rabbit IgG (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) at concentrations equivalent to the antibody protein content was used as negative controls for primary antibodies [20]. An additional negative control for PROKR1 was performed with the antibody pre-absorbed with a blocking peptide (LS Bio, Seattle, WA, USA) [20]. Visualization of immune complexes was performed by using standard alkaline phosphatase method and documented in ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The results were normalized by dividing the expression of the

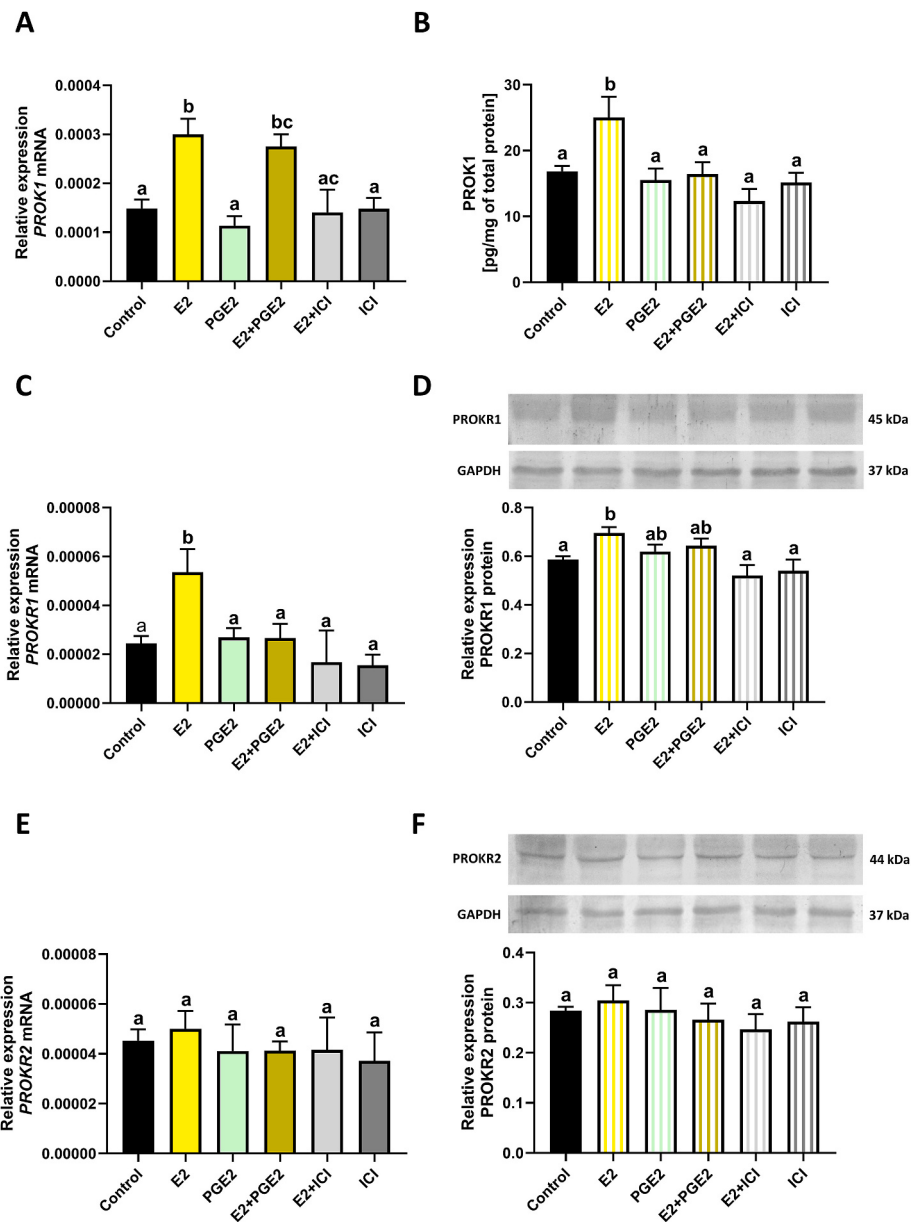


Fig. 1. The effects of estradiol-17 β (E2) and prostaglandin E2 (PGE2) on the expressions of prokineticin 1 (PROK1; A and B), and its receptors (PROKR1 - C, D and PROKR2 - E, F) mRNA and proteins in the porcine corpus luteum *in vitro*. Ultrathin luteal slices of corpus luteum were incubated with the vehicle (control, 0.01 % ethanol) or E2 (100 nM) in presence or absence of estrogen receptor antagonist – ICI 182780 (ICI) or PGE2 (100 nM) for 18 h. PROK1 protein concentration in luteal slice homogenates was determined by ELISA (B). Representative samples of Western blots for PROKR1 and PROKR2 are shown in the upper panels (D and F). Data are presented as means $\pm$ SEM, $n = 6$ –11 per group. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test. Different lowercase letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

target proteins by GAPDH expression (individually for each sample).

2.5.2. ELISA for PROK1

Luteal tissue slices (from the experiment 1) and luteal tissues (from the experiment 2) were homogenized using a homogenizer (Polytron® Generator PT-DA 03/2 EC-050) in phosphate buffered saline (PBS; 240 μ L) supplemented with protein inhibitor cocktail. Samples were homogenized twice (in 2 min intervals). Subsequently, the homogenates were centrifuged for 10 min at 800 $\times$ g. Supernatant was gathered. Protein concentration in lysates was examined using Bradford method. The samples were kept at -80°C until further analysis.

A commercially available ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was applied to assess concentration of PROK1 protein in lysates from CL slices and tissues. The analysis was performed accordingly to

the producer's protocols. In brief, the plates were coated with capture antibodies at a concentration of 2 μ g/mL by introducing 100 μ L of the suspension into the well. On the next day, after washing the adjacent wells, non-specific binding sites were blocked by using Reagent Diluent (containing 0.1 % bovine serum albumin). Samples and standards were applied to the wells prepared according to the manufacturer's instructions and incubated at room temperature for 2 h. The plate was then washed and Detection Antibodies (200 ng/mL; 100 μ L/well) were added and the plate was incubated for 2 h at room temperature. After rinsing the plate, streptavidin-HRP was introduced into the wells and incubated on the plate for 20 min at room temperature. Following incubation, the plate was rinsed again and substrate solution was added in a volume of 100 μ L/well and incubated for 20 min. After stopping the reaction, measurements were made with a spectrophotometer at

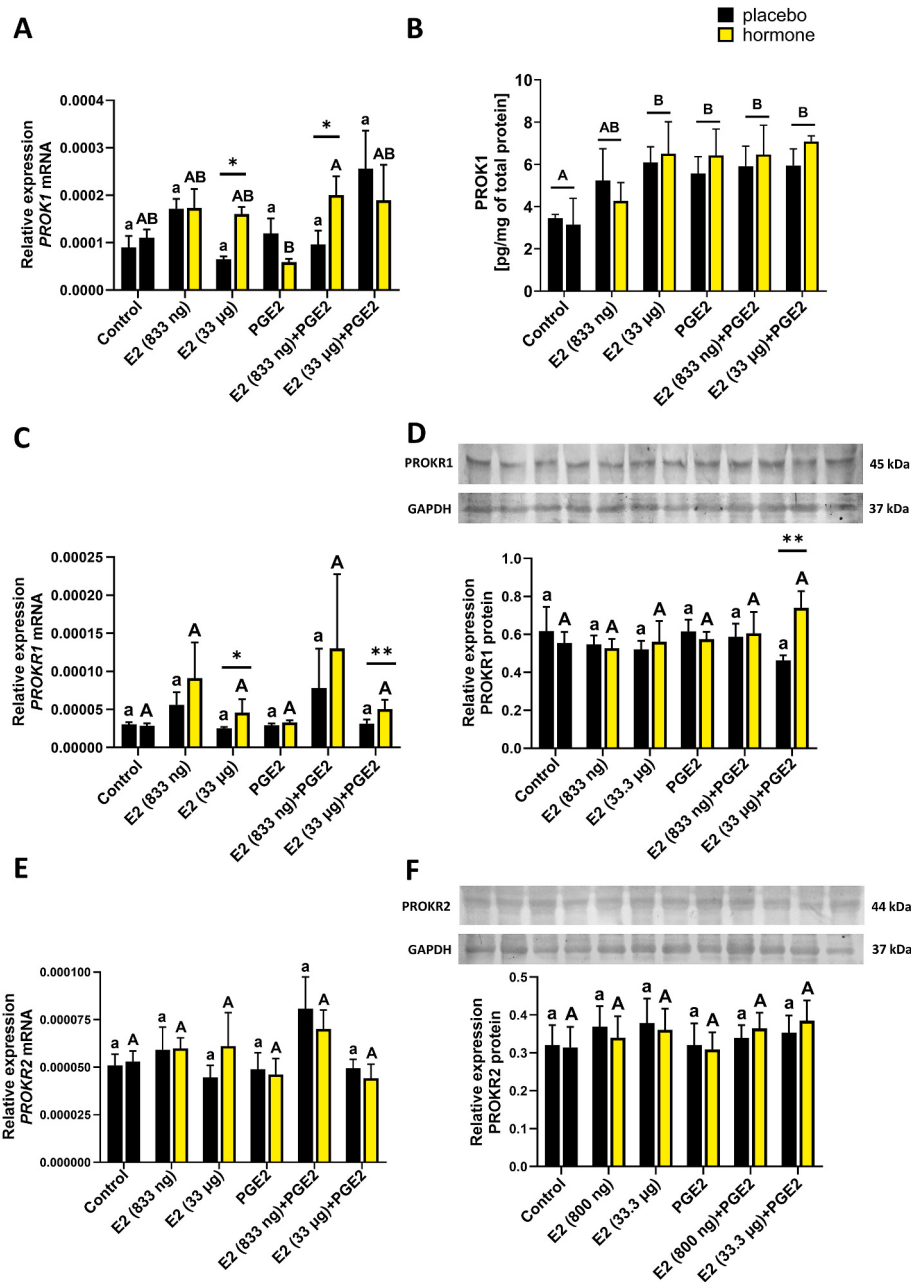


Fig. 2. Effects of estradiol-17 β (E2; 833 ng or 33.3 μ g per infusion), prostaglandin E2 (PGE2; 200 μ g per infusion), and E2, together with PGE2, administered *in vivo* on the luteal expressions of prokineticin 1 (PROK1) and its receptors PROKR1 and PROKR2 mRNA (A, C and E, respectively) and proteins (B, D and F, respectively). Hormones were infused by cannulas into the uterine horns every 4 h from day 11 until 12 after the onset of estrus. PROK1 protein concentration in luteal tissue homogenates was determined by ELISA (B). Representative photographs of Western blots for PROKR1 and PROKR2 are shown in the upper panels (D and F, respectively). Data are represented as means $\pm$ SEM, $n = 6$ per group. Data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's post-test. Asterisks represent significant differences in the expression between the corpora lutea on ovary adjacent to placebo-treated uterine horn and corpora lutea on ovary adjacent to the hormone-treated uterine horn in the same gilt (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Lack of different lowercase letters (a) indicate no statistically significant differences for the expression in corpora lutea on ovaries adjacent to the uterine horns receiving the vehicle-only infusions between the control and the hormone-treated gilts ($p > 0.05$). Different capital letters (A, B) indicate statistically significant differences between the control and the hormone-treated gilts ($p < 0.05$) for the expression in corpora lutea on ovaries adjacent to the horns receiving hormonal infusions, or in case of PROK1 protein expression, in corpora lutea from both sides of uterus belonging to the control or experimental animal group).

wavelength of 450 nm and 570 nm. The calculated sensitivity of the method reached 7.8 pg/mL. For *in vitro* experiment with PGF2 α intra-series variability was 3.4 %. For *in vitro* experiment with E2 and PGE2, and for *in vivo* experiment intra-series variabilities were 2.6 % and 2.96 %, respectively.

2.6. Statistical analyses

The results of the experiment 1 (the effect of E2 and PGE2 on prokineticin 1 system *in vitro*) and 3 were determined using one-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparisons post-test. The results of the experiment 2, and the results obtained from the experiment 1 with luteal slices treated with PGF2 α /FLP were assessed by two-way ANOVA, followed by Tukey's post-test. Differences were considered

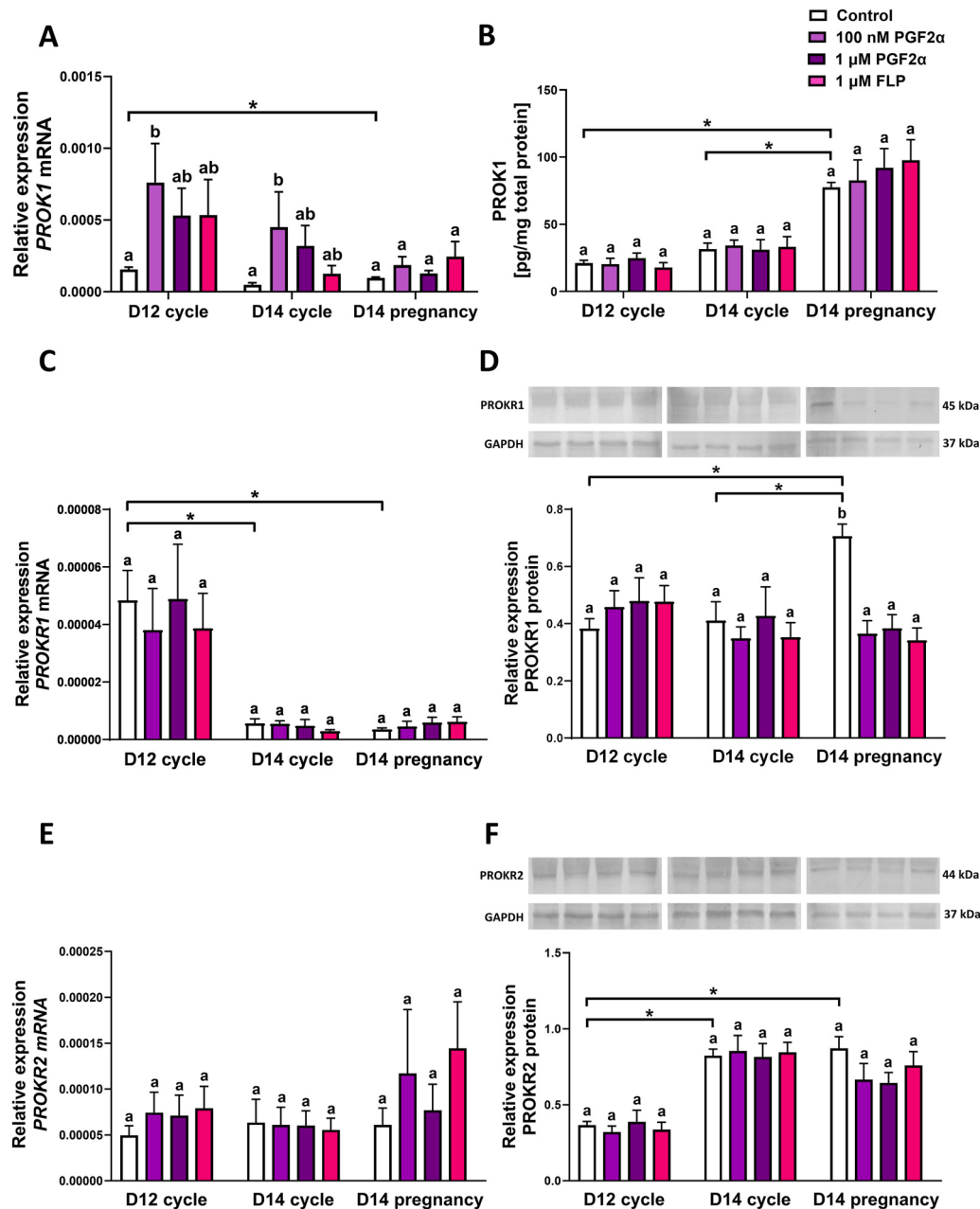


Fig. 3. The effects of prostaglandin F₂α (100 nM and 1 μM PGF₂α) and fluprostenol (FLP) (1 μM) on mRNA and protein expressions of prokineticin 1 (PROK1; A, B) and its receptors (PROKR1 - C, D and PROKR2 - E, F) in the porcine luteal explants *in vitro* on day 12 and 14 of the estrous cycle or pregnancy. Precision-cut luteal slices were incubated with the control (vehicle) or PGF₂α/FLP for 18 h. Data are presented as means ± SEM, n = 6–8 per group. Data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's post-test. Different lowercase letters (a, b) indicate statistical significant differences between treatments within groups on days 12 (D12) and 14 (D14) of the estrous cycle or pregnancy (p < 0.05). Asterisks represent significant differences between the control groups (vehicle-treated explants) collected from gilts on different days of the estrous cycle or pregnancy (p < 0.05).

statistically significant at a 95 % confidence level (p < 0.05). All statistical analyses were performed using GraphPad PRISM v. 10.2.2 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Estradiol-17β upregulates the expressions of prokineticin 1 and PROKR1 in CL tissue slices *in vitro* (experiment 1)

Effects of the treatments on the expressions of the PROK1 mRNA (p < 0.0001) and protein (p = 0.0029) and on the expression of the PROKR1 mRNA (p = 0.0016) and protein (p < 0.0009) were detected.

Estradiol-17β acting alone or simultaneously with PGE₂ significantly increased the abundance of PROK1 mRNA in luteal tissue slices *in vitro* (p < 0.001 and p < 0.05, respectively; Fig. 1A). Stimulating effect of E₂ was abolished by using an estrogen receptor antagonist (ICI 18278). The PROK1 protein expression in luteal tissue slices was elevated by E₂ (p < 0.05). This effect was reduced by using ICI 18278 (Fig. 1B). Estradiol-17β acting alone via its receptor significantly upregulated the expression of the PROKR1 mRNA and protein in luteal tissue *in vitro* (p < 0.01, and p < 0.05, respectively; Fig. 1C and D). E₂ and PGE₂ acting alone or simultaneously did not affect the luteal expression of the PROKR2 mRNA and protein *in vitro* (p > 0.05; Fig. 1E and F).

3.2. Embryonic signal (estradiol-17 β) and PGE2 regulate the expressions of prokineticin 1 and PROKR1 in the CL *in vivo* (experiment 2)

In this study, we aimed to investigate whether intrauterine infusions of E2 and PGE2 transported to the ovaries via the local circulation [8] affect the expressions of PROK1 and its receptors PROKR1 and PROKR2 in the CL. Therefore, the mRNA and protein abundance of PROK1, PROKR1, and PROKR2 were examined in the CLs collected from ovaries adjacent to the hormone-treated and placebo-treated uterine horns from the experimental groups and in the luteal tissues of CLs collected from ovaries in the control group (with placebo infusions into both uterine horns). We studied the effects of the treatments (the control group vs. hormone-treated groups) and the site of hormone administration (CLs in ovaries adjacent to hormone-treated uterine horns vs. CLs in ovaries adjacent to placebo-treated uterine horns) on the PROK1, PROKR1, and PROKR2 mRNA and protein expressions in porcine CLs *in vivo*.

We detected an interaction between the effect of the treatments and the effect of the site of hormonal infusions on the PROK1 mRNA levels ($p = 0.017$) and PROKR1 protein content ($p = 0.0433$) in CLs collected from gilts after the *in vivo* experiment. The main effect of the treatments ($p = 0.005$) on the PROK1 protein abundance in CLs and the main effect of the site of hormone administration ($p = 0.025$) were found for the PROKR1 mRNA content in CLs.

Estradiol-17 β acting alone (33.3 μ g/infusion) or simultaneously with PGE2 (833 ng/infusion of E2 with PGE2) significantly increased the content of the PROK1 transcript in CLs adjacent to the uterine horns receiving hormonal infusion compared with CLs adjacent to the placebo-treated uterine horns ($p < 0.05$; Fig. 2A). The PROK1 protein expression was significantly higher in the CLs collected from pigs treated with E2 (33.3 μ g/infusion), PGE2 alone, E2 (833 ng/infusion) with PGE2, and E2 (33.3 μ g/infusion) with PGE2 than in the control group, which received placebo infusions into both uterine horns (Fig. 2B). The expression of PROKR1 mRNA was increased in CLs adjacent to uterine horns receiving infusions of E2 (33.3 μ g/infusion) compared with CLs adjacent to uterine horns receiving placebo infusions ($p < 0.05$; Fig. 2C). Moreover, E2 (33 μ g/infusion) in combination with PGE2 stimulated PROKR1 mRNA and protein abundance in CLs collected from ovaries adjacent to the hormone-treated horns compared with CLs adjacent to the placebo-treated horns (Fig. 2C and D). There were no significant main effects of the treatments or the site of hormone administration for both PROKR2 mRNA and protein expressions ($p > 0.05$; Fig. 2E and F).

3.3. The effect of PGF2 α on luteal expressions of PROK1, PROKR1, and PROKR2 *in vitro* (experiment 1)

The effects of PGF2 α and its analog (fluprostenol) on the luteal expressions of PROK1, PROKR1, and PROKR2 were studied *in vitro* in luteal slices on days 12 and 14 of the estrous cycle and day 14 of pregnancy. Effects of the day of the estrous cycle/pregnancy ($p < 0.05$) and the treatments ($p < 0.01$) on the mRNA expression of PROK1 were detected (Fig. 3A). The day of the estrous cycle/pregnancy affected the PROK1 protein expression ($p < 0.0001$; Fig. 3B); PROKR1 mRNA expression ($p < 0.001$; Fig. 3C); and PROKR2 protein expression ($p < 0.0001$; Fig. 3F). Moreover, an interaction was observed between the effect of the treatments and the effect of the day of the estrous cycle/pregnancy ($p < 0.05$) on the PROKR1 protein expression (Fig. 3D).

Prostaglandin F2 α (100 nM) increased the content of PROK1 transcripts in luteal tissue slices isolated from gilts on days 12 and 14 of the estrous cycle compared with the control ($p < 0.05$; Fig. 3A). Moreover, PGF2 α (100 nM and 1 μ M) and fluprostenol (1 μ M) significantly reduced the expression of the PROKR1 protein in luteal slices collected on day 14 of pregnancy ($p < 0.05$; Fig. 3D).

The expression of PROK1 mRNA in CL tissue explants was significantly elevated in the control group collected on day 12 of the estrus cycle compared with the control group on day 14 of the estrous cycle and day 14 of pregnancy ($p < 0.05$; Fig. 3A). Furthermore, the PROKR1

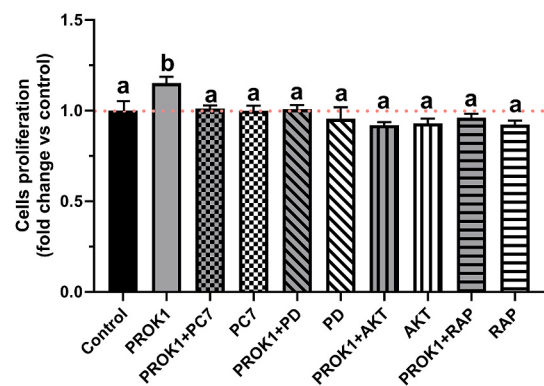


Fig. 4. The effects of PROK1 on proliferation of luteal endothelial cells isolated on days 12 of the estrous cycle. Endothelial cells were incubated for 24 h with the control (vehicle; 0.01 % ethanol) or prokineticin 1 (PROK1; 40 nM) in the presence/absence of a PROKR1 antagonist (PC7; 1 μ M) and inhibitors of MAPK (PD 098059; 25 μ M), protein kinase B (AKT; 2.5 μ M) and mTOR (rapamycin, RAP; 50 nM). Data are presented as the mean $\pm$ SEM of the fold change versus control, $n = 11$. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test. Different letters (a–c) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

mRNA content in the control group on day 12 of the estrous cycle was higher than in the control group on day 14 of the estrous cycle and day 14 of pregnancy ($p < 0.001$; Fig. 3C). The expressions of PROK1 and the PROKR1 protein in the control group on day 14 of pregnancy were increased compared with days 12 and 14 of the estrous cycle in the control group ($p < 0.0001$; Fig. 3B and D). Moreover, the PROKR2 protein content was higher on day 14 of the estrous cycle and day 14 of pregnancy with day 12 of the estrous cycle in the control group ($p < 0.0001$; Fig. 3F). There were no significant main effects of the treatments or the day of the estrous cycle/pregnancy for the PROKR2 mRNA abundance ($p > 0.05$; Fig. 3E).

3.4. PROK1 promotes luteal endothelial cell proliferation (experiment 3)

One-way ANOVA analysis revealed an effect of the treatment on endothelial cell proliferation ($p < 0.0001$). PROK1 significantly stimulated proliferation compared with the control ($p < 0.05$). Stimulating effect of PROK1 was reduced by using a PROKR1 antagonist (PC7; $p < 0.05$) compared with the PROK1-treated cells. Similarly, using inhibitors of MAPK kinases (PD 89059; $p < 0.05$), an AKT 1/2 kinase inhibitor ($p < 0.01$), and an mTOR pathway inhibitor (rapamycin; $p < 0.01$) abolished stimulating effect of PROK1 on luteal endothelial cell proliferation (Fig. 4).

4. Discussion

This study demonstrated the mechanism regulating the expressions of PROK1 and its receptors in the porcine CL. Furthermore, we identified the signaling pathways activated by PROK1 during angiogenic processes in the porcine CL.

Signals secreted by developing embryos are essential for triggering the physiological response in maternal organisms, creating an appropriate environment for pregnancy establishment and development. E2 is regarded as the major embryonic signal [2] preventing CL from luteolysis in pigs [31,32]. Prostaglandin E2, released by conceptuses and the endometrium, reaches the ovaries and prevents the regression of the CL [21,33]. Our recent findings revealed that PGE2 augments the embryonic effect of E2 acting in the porcine endometrium in early pregnancy [7]. We previously established the expression profiles of PROK1 and its receptors in the porcine CL during the estrous cycle and early pregnancy [20]. We found a significant increase in PROK1, PROKR1 mRNA expressions, and PROK1 protein expression in the CLs during the time

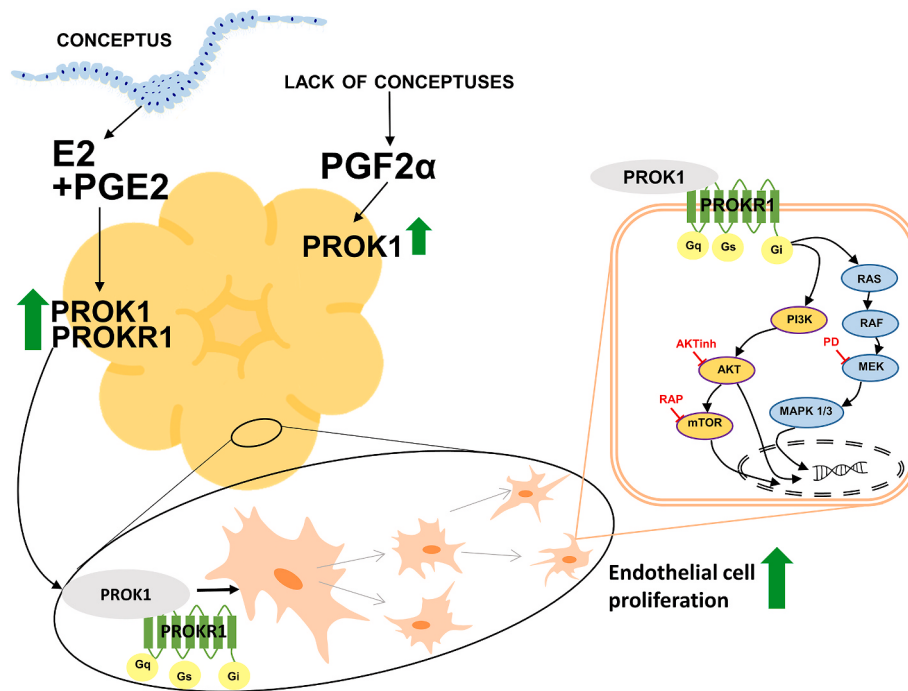


Fig. 5. Proposed mechanism of regulation of expression of prokineticin 1 (PROK1) and its receptors (PROKR1 and PROKR2) and their actions in the porcine corpus luteum (CL). Estradiol-17 β (E2), acting alone or with prostaglandin E2 (PGE2), increases PROK1 and PROKR1 expressions in the porcine CL during pregnancy establishment. The luteolytic factor PGF2 α upregulates *PROK1* mRNA expression, indicating that PROK1 could also have a putative role during luteolysis. PROK1 may stimulate angiogenesis in the CL by activating MAPK, AKT, and mTOR intracellular pathways.

corresponding to increased secretion of embryonic E2 (the onset of maternal recognition of pregnancy) [20]. Based on these results, we hypothesized that E2 and PGE2 regulate the expressions of PROK1 and PROKR1 in the porcine CL. Our results from the *in vivo* model, in which we mimicked the secretion of embryonic signals (E2 and PGE2), revealed that they increase the mRNA and protein expressions of PROK1 and PROKR1 in porcine CLs. These findings correspond with our recent study indicating that *PROK1* and *PROKR1* mRNA expressions are stimulated by E2 in the porcine endometrium *in vivo* [24]. In addition, using the *in vitro* model of luteal tissue cultures, our present results show that E2 regulates the expression of PROK1 via estrogen receptors. Previous studies have shown that similar regulation of PROK1 by embryonic signals occurs in different tissues. The stimulating effects of E2 on PROK1 expression in the porcine endometrium *in vitro* have been reported by our group [27]. The human embryonic signal hCG was also demonstrated to stimulate the expressions of PROK1 and its receptors in the human placenta [34]. The upregulation of PROK1 and PROKR1 expressions in the CL by embryonic signals is in agreement with the significant role of PROK1 in luteoprotective/antiluteolytic mechanisms in porcine CL rescue comprising the stimulation of angiogenesis, steroidogenesis, luteal cell viability, and an antiapoptotic effect on luteal and endothelial cells [18,20].

Our results reveal that PROKR2 mRNA and protein expression are not regulated in the porcine CL by E2 and PGE2 *in vitro* and *in vivo*. In our previous study, no changes in PROKR2 expression during early pregnancy in the porcine CL were reported; therefore, we assume this receptor does not have a major role in the CL during early pregnancy [20]. It would be interesting to study whether in response to the E2 and PGE2 treatment, the localization of protein expressions of PROK1 receptors, especially PROKR2 is changed in the luteal tissue. However, based on our recent immunohistochemistry results indicating no difference in PROK1, PROKR1 and PROKR2 localization between the pregnant and cyclic CL [20], we assumed that it is questionable that E2 and PGE2 treatments could substantially change these protein localization in the porcine CL. Nevertheless, we could not confirm this assumption due to

lack of enough luteal tissue explants after *in vitro* experiments to perform additional analyses. Meanwhile, we detected a significant increase in luteal *PROKR2* mRNA levels during the initial stages of luteolysis [20], suggesting the involvement of luteolytic factors in this regulation. Prostaglandin F2 α is a factor that initiates luteolysis in the mammalian reproductive tract. In pigs, after binding to the luteal PTGFR receptor, PGF2 α triggers functional luteolysis after day 12 of the estrous cycle [11–13,15]. We demonstrated stimulating effect of PGF2 α on the *PROK1* gene expression in the slices isolated from the CLs of gilts collected on days 12 and 14 of the estrous cycle using the *in vitro* model of ultrathin slices of CL tissue incubated with PGF2 α or its stable analog (fluprostenol). This result corresponds with previous findings in bovines demonstrating an increased expression of the luteal *PROK1* gene in response to PGF2 α treatment *in vivo* [35], suggesting PROK1 may play a role in luteolysis by the increasing migration of leukocytes into regressing CLs [35]. Unlike in bovines, in this study, PGF2 α did not affect the expressions of the PROKR1 mRNA and protein *in vitro* in the CL during the luteal phase. We also found that PGF2 α did not affect the luteal expression of PROKR2 *in vitro*. A previous report similarly revealed that PGF2 α was ineffective in regulating *PROKR2* mRNA expression in the bovine CL *in vivo* [35]. We observed significantly higher levels of the PROK1 protein in luteal tissue explants collected from gilts on day 14 of pregnancy compared with day 14 of the estrous cycle in the control group. This result corresponds with our previous finding indicating an elevated expression of the PROK1 protein in the porcine CLs collected on day 14 of pregnancy compared with day 14 of the estrous cycle [20].

Prokineticin 1 is widely known as a factor promoting angiogenic events in various tissues [20,24,27,36–39]. In this study, we demonstrated that PROK1, acting via its receptor (PROKR1), stimulates the proliferation of endothelial cells isolated from CLs from gilts on day 12 of the estrous cycle. Our findings are consistent with previous reports evidencing the involvement of PROK1 in angiogenic processes [20,27,36] and the ovaries as a major producer of this peptide [20,36]. Our present findings also agree with our previous results indicating that

PROK1, acting via the PROKR1, promotes the formation of capillary-like structures via endothelial cells isolated from porcine CLs *in vitro* and stimulates the synthesis of VEGFA and the mRNA expression of angiogenin (another angiogenic factor) in the CL [20]. In addition, our results correspond with the PROK1-induced proliferation of a myometrial uterine microvascular cell line (UtMVEC-Myo) [40]. Using specific inhibitors, we established that PROK1–PROKR1 signaling enhances luteal endothelial cell proliferation by activating the MAPK, AKT kinases, and mTOR pathways. These results are consistent with our recent report revealing that PROK1 induces the proliferation of endothelial cells in the porcine endometrium by phosphorylating MAPK, PI3K, and AKT kinases and influencing the mTOR pathway [27].

5. Conclusions

Our study identified E2 (the major embryonic signal in pigs), acting alone or with PGE2, as a potent regulator of PROK1 and PROKR1 expression in the porcine CL during pregnancy establishment. The luteolytic factor PGF2 α regulates *PROK1* mRNA expression, which indicates that PROK1 could also have a potential role during luteolysis. Additionally, we determined that PROK1 may stimulate angiogenesis in the CL by activating MAPK, AKT, and mTOR pathways. Therefore, we conclude that PROK1–PROKR1 signaling in the porcine CL supports luteal function during CL rescue in early pregnancy in pigs (Fig. 5).

Funding

This research was funded by the National Science Centre, Poland, grant no. 2019/35/N/NZ9/03986. A. Waclawik was supported by the SRF Academic Scholarship Award 2022 from the Society for Reproduction and Fertility.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

CRediT authorship contribution statement

Monika Baryla: Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization. **Piotr Kaczynski:** Writing – review & editing, Validation, Methodology, Formal analysis. **Ewelina Goryszewska-Szczurek:** Writing – review & editing, Validation, Methodology, Formal analysis. **Agnieszka Waclawik:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Acknowledgments

We are grateful for Katarzyna Gromadzka-Hliwa, Michał Blitek and Jan Kłos, (Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland) for technical help in the laboratory and sample collection. We thank Prof. Gianfranco Balboni from the University of Cagliari in Italy for gift of a PROKR1 antagonist (PC7).

References

- Ziecik AJ, Przygodzka E, Jalali BM, Kaczmarek MM. Regulation of the porcine corpus luteum during pregnancy. *Reproduction* 2018;156:R57–67.
- Perry JS, Heap RB, Amoroso EC. Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature* 1973;245:45–7.
- Geisert RD, Zavy MT, Moffatt RJ, Blair RM, Yellin T. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1990;40:293–305.
- Akinlosotu BA, Diehl JR, Gimenez T. Sparing effects of intrauterine treatment with prostaglandin E2 on luteal function in cycling gilts. *Prostaglandins* 1986;32:291–9.
- Waclawik A, Ziecik AJ. Differential expression of prostaglandin (PG) synthesis enzymes in conceptus during peri-implantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/PG 9-ketoreductase in the pig. *J Endocrinol* 2007;194:499–510.
- Waclawik A, Jabbour HN, Blitek A, Ziecik AJ. Estradiol-17 β , prostaglandin E2 (PGE2), and the PGE2 receptor are involved in PGE2 positive feedback loop in the porcine endometrium. *Endocrinology* 2009;150:3823–32.
- Kaczynski P, Bauersachs S, Goryszewska E, Baryla M, Waclawik A. Synergistic action of estradiol and PGE2 on endometrial transcriptome *in vivo* resembles pregnancy effects better than estradiol alone. *Biol Reprod* 2021;104:818–34.
- Kaczynski P, Baryla M, Goryszewska E, Waclawik A. Estradiol-17 β regulates expression of luteal DNA methyltransferases and genes involved in the porcine corpus luteum function *in vivo*. *Int J Mol Sci* 2021;22.
- Kaczynski P, Goryszewska-Szczurek E, Baryla M, Waclawik A. Novel insights into conceptus-maternal signaling during pregnancy establishment in pigs. *Mol Reprod Dev* 2023;90:658–72.
- Waclawik A. Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig. *Reproduction* 2011;142:389–99.
- Moeliono MP, Thatcher WW, Bazer FW, Frank M, Owens LJ, Wilcox CJ. A study of prostaglandin F2 α as the luteolysin in swine: II Characterization and comparison of prostaglandin F, estrogens and prostetin concentrations in utero-ovarian vein plasma of nonpregnant and pregnant gilts. *Prostaglandins* 1977;14:543–55.
- Diaz FJ, Wiltbank MC. Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2 α of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:172–89.
- Chang J, Frandsen S, D'Annibale-Tolhurst M, Palumbo N, Gadsby J. Prostaglandin (PTG) E and F receptors in the porcine corpus luteum; effect of tumor necrosis factor- α . *Anim Reprod Sci* 2018;195:139–48.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000;80:1–29.
- De Rensis F, Saleri R, Tummaruk P, Techakumphu M, Kirkwood RN. Prostaglandin F2 α and control of reproduction in female swine: a review. *Theriogenology* 2012;77:1–11.
- Alfaidy N, Hoffmann P, Gillois P, Gueniffey A, Lebayle C, Garcin H, et al. PROK1 level in the follicular microenvironment: a new noninvasive predictive biomarker of embryo implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:435–44.
- Alfaidy N, Baron C, Antoine Y, Reynaud D, Traboulsi W, Gueniffey A, et al. Prokineticin 1 is a new biomarker of human oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis. *Biol Reprod* 2019;101:832–41.
- Kisliouk T, Podlovní H, Spanel-Borowski K, Ovadia O, Zhou QY, Meidan R. Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* 2005;146:3950–8.
- Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 2003;162:1881–93.
- Baryla M, Goryszewska-Szczurek E, Kaczynski P, Balboni G, Waclawik A. Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. *Sci Rep-Uk* 2023;13.
- Christenson LK, Farley DB, Anderson LH, Ford SP. Luteal maintenance during early pregnancy in the pig: role for prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1994;47:61–75.
- Gregoraszczuk EL, Michas N. Progesterone and estradiol secretion by porcine luteal cells is influenced by individual and combined treatment with prostaglandins E2 and F2 α throughout the estrus cycle. *Prostag Other Lipid Mediat* 1999;57:231–41.
- Kaczynski P, Kowalewski MP, Waclawik A. Prostaglandin F2 α promotes angiogenesis and embryo-maternal interactions during implantation. *Reproduction* 2016;151:539–52.
- Goryszewska E, Kaczynski P, Baryla M, Waclawik A. Pleiotropic role of prokineticin 1 in the porcine endometrium during pregnancy establishment and embryo implantation. *Biol Reprod* 2021;104:181–96.
- Pusateri AE, Smith JM, Smith 2nd JW, Thomford PJ, Diekmann MA. Maternal recognition of pregnancy in swine. I. Minimal requirement for exogenous estradiol-17 β to induce either short or long pseudopregnancy in cycling gilts. *Biol Reprod* 1996;55:582–9.
- Baryla M, Kaczynski P, Goryszewska E, Riley SC, Waclawik A. Prostaglandin F2 α stimulates adhesion, migration, invasion and proliferation of the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Placenta* 2019;77:19–29.
- Goryszewska E, Kaczynski P, Balboni G, Waclawik A. Prokineticin 1-prokineticin receptor 1 signaling promotes angiogenesis in the porcine endometrium during pregnancy. *Biol Reprod* 2020;103:654–68.
- Congiu C, Onnis V, Deplano A, Salvadori S, Marconi V, Maffei D, et al. A new convenient synthetic method and preliminary pharmacological characterization of triazinediones as prokineticin receptor antagonists. *Eur J Med Chem* 2014;81:334–40.
- Zhao S, Fernald RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* 2005;12:1047–64.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245–50.

- [31] Conley AJ, Ford SP. Direct luteotrophic effect of oestradiol-17 beta on pig corpora lutea. *J Reprod Fertil* 1989;87:125–31.
- [32] Wacławik A, Kaczmarek MM, Blitek A, Kaczynski P, Ziecik AJ. Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig. *Mol Reprod Dev* 2017;84:842–55.
- [33] Wacławik A, Kaczmarek MM, Kowalczyk AE, Bogacki M, Ziecik AJ. Expression of prostaglandin synthesis pathway enzymes in the porcine corpus luteum during the oestrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* 2008;70:145–52.
- [34] Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, Salomon A, Chamboredon S, Sergent F, et al. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:1537–50.
- [35] Kisliouk T, Friedman A, Klipper E, Zhou QY, Schams D, Alfaidy N, et al. Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol Reprod* 2007;76:749–58.
- [36] LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001;412:877–84.
- [37] LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8A novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:276–82.
- [38] Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, et al. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2010;21:2832–43.
- [39] Podlovni H, Ovadia O, Kisliouk T, Klipper E, Zhou QY, Friedman A, et al. Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem* 2006;18:315–26.
- [40] Lee YL, Chan YL, Chow WN, Ng EH, Lee KF, Yeung WS, et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulates proliferation and tube formation in human uterine microvascular endothelial cell through the mitogen-activated protein kinase but not through the Akt pathway. *Fertil Steril* 2009;91:2163–71.