

STRESZCZENIE

Mgr Paweł Likszo

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olszynie

Ciałko żółte (CL), przejściowy gruczoł dokrewny, powstaje z pękniętego pęcherzyka przedowulacyjnego (POF) w następstwie wyrzutu hormonu luteinizującego (LH) i jest głównym źródłem progesteronu (P4), hormonu specyficznego dla ciąży. Hormon luteinizujący wywołuje rozległe molekularne i strukturalne zmiany w POF prowadzące do formowania CL. W fazie środkowo-lutealnej, przy braku sygnałów zarodkowych, wzrasta wydzielanie prostaglandyny F2 α (PGF2 α) przez macicę, która rozpoczyna funkcjonalną oraz strukturalną luteolizę skutkującą obniżeniem syntezy P4. Jednakże estradiol (E2), sygnał macicznego rozpoznania ciąży u świń, przywraca funkcję lutealną i podtrzymuje aktywność CL w trakcie 114-dniowej ciąży. Dogłębny wgląd w molekularną kontrolę trwania cyklu CL u świni: formowanie, rozwój, dojrzałość czynnościowa, luteoliza lub utrzymanie funkcji lutealnej we wczesnej ciąży ma kluczowe znaczenie dla poprawy wydajności rozrodu. Prezentowana praca dotyczy wykorzystania metod proteomiki do zrozumienia molekularnej regulacji funkcji CL u świni oraz dostarcza nowych informacji na temat procesów biologicznych i fizjologicznych związanych z funkcjonowaniem i regresją CL.

Celem niniejszej pracy było określenie molekularnych zmian zachodzących w CL u świni domowej w kluczowych etapach trwania cyklu CL. Szczegółowe zadania badawcze dotyczyły: **a)** porównania proteomu POF i proteomu wczesnego CL; **b)** analizy proteomu CL w różnych etapach cyklu rujowego: rozwoju od fazy wczesno-lutealnej do fazy wczesno-środkowo-lutealnej (dzień 3 vs. dzień 9), dojrzałości czynnościowej podczas fazy środkowo-lutealnej (dzień 9 vs. dzień 12), regresji (dzień 12 vs. dzień 15); **c)** analizy zmian odpowiedzialnych za utrzymanie funkcji lutealnej (dzień 15 cyklu vs. dzień 15 ciąży); **d)** możliwego mechanizmu luteolizy indukowanej przez endogenną PGF2 α .

W niniejszej pracy doktorskiej materiał do badań stanowiły POF oraz CL pozyskane od cyklicznych lub ciężarnych loszek (n=4). Do analizy proteomu wykorzystano dwukierunkową elektroforezę żelową (2-DE) i tandemową spektrometrię mas (MALDI TOF-TOF MS/MS). Analizę funkcjonalną *in silico* z użyciem Ingenuity Pathway Analysis (IPA) wykorzystano do identyfikacji funkcji molekularnych i procesów biologicznych związanych z białkami o zróżnicowanej ekspresji w wykonanych porównaniach.

W pierwszej części prezentowanej pracy doktorskiej zidentyfikowano 422 białka lub ich proteoformy w POF i wczesnym CL, w tym 15 i 48 białek charakterystycznych wykryto odpowiednio w POF i wczesnym CL. Analiza funkcjonalna proteomu POF wykazała, że liczne białka pęcherzykowe zaangażowane były w przebudowę cytoszkieletu (MAPRE1, ACTG1, TUBB, VIM), odpowiedź na stres endoplazmatyczny (GRP78, HSP70) oraz odpowiedź na niesfaldowane białka (CALR, PDIA6). Natomiast wczesne białka lutealne głównie były związane z metabolizmem steroidów (HMGCS1, APOE), śmiercią i przeżywalnością komórek (SELENBP1, PDCD6), „zmiataniem” wolnych rodników (GLO1, HP) i szlakiem ubikwitynacji białek (PSMA6, TRAP1). Porównanie proteomu POF z proteomem wczesnego CL wykazało, że białka, które uległy istotnym zmianom w rozwijającym się CL związane były z biosyntezą cholesterolu (FDPS, GGPS1), śmiercią i przeżywalnością komórek (SERPIN, DIABLO) oraz odpowiedzią ostrej fazy (HPX, RBP4). Dowiedziono, że w POF białka cytoszkieletu (VIM, MAPRE1) nie uczestniczą tylko w zmianie kształtu komórek pęcherzykowych, ale również są zaangażowane w procesy steroidogenezy. Ponadto, jest to pierwsze doniesienie naukowe, w którym wykazano, że w nowo utworzonym CL niektóre z białek regulowanych przez LH były powiązane z procesami steroidogenezy (IDI1, FDPS, HMGCS1), przeżywalnością komórek (EIF, PDCD6, DIABLO) oraz układem ubikwityny proteasomu (PSMD13, UCHL1). Wyniki te dostarczają nowych informacji na temat przedowulacyjnej regulacji białek, które mogą odgrywać rolę w procesach luteinizacji i utrzymania funkcji lutealnej.

W drugiej części niniejszej pracy doktorskiej zidentyfikowano 273 białka lub ich proteoformy o zróżnicowanej ekspresji na różnych etapach rozwoju, regresji lub utrzymania funkcji lutealnej CL. Analiza funkcjonalna białek o zróżnicowanej ekspresji między 3 a 9 dniem cyklu rujowego wykazała, że procesy wspierające wzrost lutealny i steroidogenezę były bardziej wzmożone w fazie środkowo-lutealnej cyklu rujowego. Białka o zróżnicowanej ekspresji były głównie zaangażowane w procesy, takie jak wzrost komórkowy (EZR, FKBP5), endocytoza (CLTA, CAPG), angiogeneza (ANXA2, CLIC4), hamowanie apoptozy (ENO1, SRI), biogeneza mitochondriów (STOML2, HMGB1) oraz reakcja na stres oksydacyjny (PRDX6, HSP60). Utrzymanie funkcji CL, między 9 i 12 dniem, było związane z dalszym zwiększeniem ekspresji enzymów szlaku biosyntezy steroidów (HMGCS1, APOA1), przeżywalnością komórek (EIF2, HSP60) i białek związanych z migracją komórek (VIM, MAPRE1). Niektóre białka wykazały obniżenie ekspresji w 12 dniu cyklu rujowego, najważniejsze z nich były związane z homeostazą energetyczną (CKB), stresem oksydacyjnym (GSS) oraz białkami transportowymi (GC).

W trakcie regresji CL funkcjonalna adnotacja białek o zróżnicowanej ekspresji (dzień 15 vs. dzień 12 cyklu rujowego) wykazała, że odpowiedź na niesfałdowane białka (HSP90B1, PDIA6), szlaki odpowiedzi na stres oksydacyjny (GPRX, GSTA1), białka związane z transportem cholesterolu (APOA1, HMGCS1) i jego syntezą *de novo* zostały zahamowane w 15 dniu cyklu. Ponadto, odnotowano zwiększenie ekspresji białek związanych z apoptozą (DPP3, HMGB1), odpowiedzią ostrej fazy (FGB, C4A), przebudową cytoszkieletu (DPYSL2, PDX) i metabolizmem estrogenów (SLUT1A1, COMT). Następnie zbadano udział metabolizmu estrogenów w luteolizie indukowanej przez PGF2 α . Przeprowadzone doświadczenie *in vitro* wskazują na możliwą rolę metabolitów estrogenów w funkcji lutealnej i regresji.

Następnie porównano 15 dzień cyklu rujowego z 15 dniem ciąży. Zmiany zachodzące w okresie ciąży zabezpieczają CL przed regresją poprzez utrzymanie ekspresji białek wspierających steroidogenezę (HSD3B1, G6PD, STNM1), w tym endocytozę, syntezę lipidów, metabolizm kwasów tłuszczowych, transport steroli oraz hamowanie białek związanych z sygnalizacją apoptotyczną (RGN, STMN1), sygnalizacją śmierci komórki (CCT5, ENO1) i tworzeniem reaktywnych form tlenu (GSTA1, CP).

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej łącznie 440 białek lub ich proteoform wykazało znaczące zmiany w ekspresji na różnych etapach trwania cyklu CL. Uzyskane wyniki rzuciły nowe światło na funkcjonalne znaczenie białek o zróżnicowanej ekspresji, związanych z utrzymaniem funkcji lutealnej. Poszerzono również dotychczasową wiedzę o kilka ważnych szlaków związanych z przeżywalnością komórek, endocytozą, odpowiedzią na stres oksydacyjny, metabolizmem estradiolu oraz angiogenezą w funkcjonalnym CL. Wskazano, że biogeneza i funkcja mitochondriów może być ważnym regulatorem steroidogenezy w funkcjonalnym CL podczas fazy środkowej cyklu rujowego. Cięża podtrzymuje ekspresję białek, która w innym wypadku uległaby zmniejszeniu w fazie późno-lutealnej. W trakcie luteolizy CL białka o zróżnicowanej ekspresji: **a)** zaburzają prawidłową syntezę i metabolizm steroidów, **b)** zwiększają apoptozę, martwicę i infiltrację komórek odpornościowych. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, w niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano obecność białek, wcześniej niezidentyfikowanych w CL u świni, związanych z przeżywalnością komórek (DPP3, HMGB1, STOML2), metabolizmem estradiolu (SULT, COMT), endocytozą (CLTA, EZR, SNX6) i angiogenezą (RNH1, CLIC4).