

VPLYV MONOKLONOVEJ PROTILÁTKY IVA-50 NA IN VITRO OPLODNEIE U HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Petra Cupperová¹, Jana Antalíková¹, Michal Simon¹

¹ Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko, +4210245943151, petra.cupperova@savba.sk

Abstrakt

CD9 molekula ako člen rodiny tetraspanínov je známa svojou úlohou v procese oplodnenia, hoci jej detailná funkcia nebola objasnená. Viacero publikovaných prác sa zaoberá funkciou CD9 v procese oplodnenia na oocytoch, ale jej funkcia na spermíách ešte nebola študovaná. V tejto práci sme sa zamerali na vplyv monoklonovej protilátky (mAb) IVA-50 (anti-CD9) na samčie a samičie gaméty počas *in vitro* oplodnenia. Zaznamenali sme inhibičný vplyv protilátky na oplodnenie bovinných oocytov v porovnaní s kontrolou po pridaní mAb IVA-50 do oplodňovacej kvapky (P=0,013; **).

Kľúčové slová: CD9; gaméty; oplodnenie;

Úvod

Oplodnenie je zložitý proces, ktorý pozostáva z mnohých komplexných bunkových a biochemických procesov, do ktorých je zapojených množstvo molekúl. Vyvrcholením je fúzia spermie a vajíčka a následne vytvorenie embrya [1]. Interakcia medzi gamétami a splynutie ich plazmatických membrán sú procesy, ktoré zahŕňajú účasť viacerých proteínov nachádzajúcich sa na povrchu vajíčka a spermie [2]. Medzi proteíny podieľajúce sa na procese oplodnenia patria aj niektoré CD molekuly, exprimované na tkanivách a bunkách samčieho a samičieho reprodukčného traktu.

Molekula CD9 je 24-27kDa integrálny membránový glykoproteín a je členom superrodiny tetraspanínov. Bola detegovaná na plazmatickej membráne oocytov u myší [3,4,5] prasiat [6] a hovädzieho dobytká [7], na blastocystách u myší [4,8] a na epiteliálnych bunkách endometria u myší [9], ľudí [10], kráv [11] a prasiat [12]. Na spermíách bola CD9 doposiaľ detegovaná u myší [13] a u ošípaných na spermíách nachádzajúcich sa v reprodukčnom trakte [12].

Molekula CD9 sa zúčastňuje mnohých bunkových procesov. Z doterajších výsledkov vyplýva, že je multifunkčným proteínom, ktorý ovplyvňuje adhéziu buniek, proliferáciu a migráciu v imunitnom systéme [14]. Predošlé štúdie ukázali, že CD9 má úlohu v procese oplodnenia, a to vo fúzii spermie a vajíčka alebo vo väzbe a fúzii spermie a vajíčka [3,4,5]. Výsledky experimentov, v ktorých boli oocyty opracované anti-CD9 protilátkou, ukazujú inhibíciu väzby a fúzie gamét u myší [15, 16, 17, 18]. Inhibícia väzby a fúzie bola dokázaná aj u ošípaných [6] a hovädzieho dobytká [7].

Cieľom tejto práce bolo otestovať vplyv mAb IVA-50 na oba typy gamét počas *in vitro* fertilizácie s pridaním protilátky priamo do oplodňovacej kvapky.

Materiál a metódy

Monoklonová protilátka (mAb) IVA-50 bola pripravená na Ústave biochémie a genetiky živočíchov SAV v Ivanke pri Dunaji štandardnou hybridómovou technikou [19].

Izolácia, selekcia a dozrievanie bovinných oocytov in vitro

Vaječníky odobraté od kráv porazených na bitútku sme pred spracovaním premyli 1-krát v 70% etanole (Slavus, SR) a 2-krát v teplom fyziologickom roztoku (0,9% NaCl (Sigma, SR)). Následne sme aspiráciou pomocou ihly (18G) a striekačky získavali oocyty s kumulárnymi bunkami z folikulov v priemere 2-8mm, preniesli do Petriho misiek a vhodné

oocyty sme vyhľadávali pod svetelným mikroskopom Olympus SD30 (Olympus, Nemecko). Oocyty sme pomocou mikrokapiláry preniesli do maturačného média (médiu TCM 199 + Earle's + GlutaMAXTM (Life Technologies, SR) s prídavkami 10% FCS, 0,05mg/ml gentamycínu (Biotech, SR), 25mmol.l⁻¹ pyruvátu sodného (Sigma, SR), 5UI/ml HCG a 5UI/ml PMSG (Pluset (MiniTübe, Nemecko)), ekvilibrovaného 2hod pred použitím pri 39°C a vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂ (CO₂ Inkubátor Binder 150, Nemecko). *In vitro* dozrievanie (do metafázy II) prebiehalo v 500µl kvapkách maturačného média v päť-jamkových doštičkách (24hod, 39°C, 5% CO₂) (max. 50 oocytov na kvapku). Kumulárne bunky sme z oocytov odstránili vortexovaním 5min v médiu HEPES-TALP (113,8mmol.l⁻¹ NaCl + 3,2mmol.l⁻¹ KCl + 2,0mmol.l⁻¹ NaHCO₃ + 2,7mmol.l⁻¹ NaH₂PO₄ + 0,02mmol.l⁻¹ Na laktát (60% sirup) + 0,01mol.l⁻¹ HEPES + 2,3mmol.l⁻¹ CaCl₂.2H₂O + 0,05mmol.l⁻¹ MgCl₂.6H₂O, s prídavkami 3mg.ml⁻¹ BSA, 8µl.ml⁻¹ 25mM pyruvátu sodného (Sigma, SR), 0,05mg/ml gentamycínu). Očistené oocyty sme ďalej spracovávali.

***In vitro* oplodnenie**

Býčie spermie uchovávané pri veľmi nízkej teplote (-186°C) sme po rozmrazení 2-krát premyli v SP-TL médiu (MiniTübe, Nemecko), predtým temperovanom 2hod pri 37°C, odstredení pri 245xg 6min pri laboratórnej teplote. Sediment spermií sme resuspendovali v SP-TL médiu, odstredili pri 245xg 5min pri laboratórnej teplote. Získaný sediment sme rozsuspendovali v príslušnom množstve IVF-TL média (MiniTübe, Nemecko) tak, aby bola výsledná koncentrácia spermií 0,5.10⁶ na jednu oplodňovaciu kvapku (na 25 oocytov). K oocytom do oplodňovacej kvapky sme pridávali 50µl spermií.

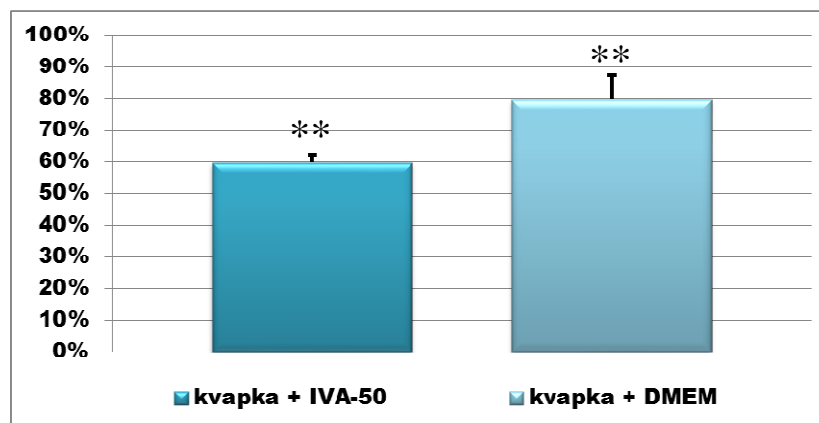
Maturované očistené oocyty sme rozdelili na skupiny, preniesli do kvapiek IVF-TL média, následne preniesli do oplodňovacích kvapiek s PHE (D-penicilamín, hypotaurín a epinefrín (Sigma, SR)), pridali príslušné množstvo spermií a do jednej skupiny sme pridali monoklonovú protilátku IVA-50 (10µl protilátky/100µl média) a do druhej ako kontrolu DMEM (10µl DMEM/100µl média), gaméty sme inkubovali (24hod, 39°C, 5% CO₂).

Na odstránenie spermií sme embryá vortexovali 1min v 0,5ml HEPES-TALP, očistené embryá preniesli do ISM1 média (EAST PORT, Praha), následne do 40µl kvapky ISM1 média prekrytej 0,8ml minerálneho oleja ultrapure (USB, Cleveland) a inkubovali (24hod, 39°C, 5% CO₂). Embryá sme fixovali v 3,8% paraformaldehyde 7-15min, premyli, preniesli na podložné sklíčko, zakvapli prípravkom Vectashield-DAPI (Vector laboratories, Veľká Británia) na DNA farbenie a prikryli krycím sklíčkom. Stav oplodnenia oocytov sme vyhodnocovali pod epifluorescenčným mikroskopom LeicaDM5500 B s digitálnou kamerou Leica DFC340 FX pri 400 násobnom zväčšení s využitím Leica Advanced Fluorescence software (Leica Mikros, SR).

Experimentálne údaje sme vyhodnotili Mann-Whitney Rank Sum Testom s využitím programu Sigma Plot 10.0.

Výsledky a diskusia

Protilátku IVA-50 sme pridávali priamo do oplodňovacej kvapky, lebo sme predpokladali vplyv na obe gaméty. Pri samotnom procese oplodnenia (n = 180 oocytov, 90 na skupinu, 30 na pokus) sme zistili signifikantný pokles (P=0,013; **) v počte oplodnených boviných oocytov v kvapkách s mAb IVA-50 (59,82 ± 2,33%) v porovnaní s kontrolou (79,82 ± 7,59%) (Graf 1. a Tabuľka 1.). Za oplodnené sme pokladali oocyty, ktoré boli minimálne v štádiu prvojadra (viditeľné DNA štruktúry dvoch pólových teliesok a jedna prvojadrová štruktúra). Nedozreté (v štádiu zárodočného vaku a metafázy I) a rozpadnuté oocyty (nemali žiadnu jadrovú štruktúru, alebo deštruované) boli pri konečnom hodnotení vyradené.



Graf 1. Priemerný počet oplodnených oocytov po pridaní mAb do oplodňovacej kvapky
 1. Oplodňovacia kvapka s mAb IVA-50
 2. Kontrola - Oplodňovacia kvapka s DMEM

Tabuľka 1. Priemerný počet oplodnených oocytov po pridaní mAb do oplodňovacej kvapky

skupina	1.pokus	2.pokus	3.pokus	priemerný počet oplodnených oocytov	smerodajná odchýlka
Oplodňovacia kvapka s mAb IVA-50	62,50%	58,33%	58,62%	59,82%	2,33%
Oplodňovacia kvapka s DMEM	81,82%	71,43%	86,21%	79,82%	7,59%

Výsledky našich experimentov ukázali inhibíciu väzby spermií už na úrovni ZP po ovplyvnení intaktných oocytov alebo spermií mAb IVA-50 u hovädzieho dobytku. V doteraz publikovaných prácach nebol testovaný vplyv na proces oplodnenia pridaním protilátky do oplodňovacej kvapky, čím sa priamo ovplyvňujú obe gaméty počas celého procesu oplodnenia.

Záver

Prezentované experimenty ukázali inhibičný vplyv protilátky IVA-50 na oplodnenie po jej pridaní do oplodňovacej kvapky.

Pod'akovanie

Realizácia projektu bola finančne podporená grantmi VEGA 2/0006/12 a APVV-0137-10. Za technickú spoluprácu ďakujeme Zuzane Nádaždyovej.

Literatura

- [1.] ELLERMAN D.A., HA C., PRIMAKOFF P. et al. *Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion.* Mol. Biol. Cell, 2003, 14, pp. 5098-5103.
- [2.] RUBINSTEIN E., ZIYYAT A., WOLF J. P. et al. *The molecular players of sperm-egg fusion in mammals.* Semin. Cell Dev. Biol. 2006, 17, pp. 254-263.
- [3.] KAJI K., ODA S., SHIKANO T. et al. *The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice.* Nat. Genet. 2000, 24, pp. 279-282.
- [4.] LE NAOUR F., RUBINSTEIN E., JASMIN C. et al. *Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice.* Science. 2000, 287, pp. 319-321.
- [5.] MIYADO K., YAMADA G., YAMADA S. et al. *Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization.* Science. 2000, 287, pp. 321-324.
- [6.] LI Y.H., HOU Y., MA W. et al. *Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on*

- sperm-egg interaction*. *Reproduction*. 2004, 127, pp. 151-157.
- [7.] ZHOU G.B., LIU G.S., MENG Q.G. et al. *Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization*. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55(3), pp. 305-308.
- [8.] LIU W.M., CAO Y.J., YANG Y.J. et al. *Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation*. *J. Mol. Endocrinol.* 2006, 36, pp. 121-130.
- [9.] WEIMIN L., YUJING C., JING L. et al. *The expression of CD9 in the peri-implantation mouse uterus is upregulated in an ovarian steroid hormone-dependent manner*. *Fertil. Steril.* 2007, 87, pp. 664-670.
- [10.] PARK K.R., INOUE T., UEDA M. et al. *CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins alpha (6), alpha (3) and beta (1)*. *Mol. Hum. Reprod.* 2000, 6, pp. 252-257.
- [11.] XAING W., MACLAREN L.A. *Expression of fertilin and CD9 in bovine trophoblast and endometrium during implantation*. *Biol. Reprod.* 2002, 66, pp. 1790-1796.
- [12.] KAEWMALA K., UDDIN M. J., CINAR M. U. et al. *Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits*. *Animal Reprod. Sci.* 2011, 125, pp. 170-179.
- [13.] ITO C., YAMATOYA K., YOSHIDA K. et al. *Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization*. *Cell. Tissue. Res.* 2010, 340, pp.583-594.
- [14.] BOUCHEIX C., BENOIT P., FRACHET P. et al. *Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins*. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, pp. 117-122.
- [15.] CHEN M.S., TUNG K.S.K., COONROD S.A. et al. *Role of integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization*. *PNAS.* 1999, 96, pp. 11830-11835.
- [16.] TAKAHASHI Y., BIGLER D., ITO Y., WHITE J.M. *Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98*. *Molecular Biology of Cell*, 2001, 12, pp. 809-820.
- [17.] WONG G.E., ZHU X., PRATER C.E. et al. *Analysis of fertilin alpha (ADAM1)-mediated sperm-egg cell adhesion during fertilization and identification of an adhesion-mediating sequence in the disintegrin-like domain*. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (27), pp. 24937-24945.
- [18.] ZHU X., EVANS J.P. *Analysis of the roles of RGD-binding integrins, alpha(4)/alpha(9) integrins, alpha(6) integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane*. *Biol. Reprod.* 2002, 66(4), pp. 1193-1202.
- [19.] KOVÁČIKOVÁ P., SIMON M., DUŠINSKÝ R. et al. *The new monoclonal antibodies against bovine sperm*. *Czech. J. Anim. Sci.* 2001, 46, pp. 333-338.

Abstract

CD9 molecule is a member of tetraspanin family. Its role in fertilization process was shown, although detailed function of CD9 molecule in this process is not fully understood. There is a number of papers concerning CD9 function in the process of fertilization on oocytes, but function of sperm has not yet been studied. In our research we focused on the influence of monoclonal antibody IVA-50 (anti-CD9) on male and female gametes during in vitro fertilization. Inhibitory effect of the antibody on fertilization of bovine oocytes was detected in comparison with control group after the addition of mAb IVA-50 into the fertilization droplet (P=0,013, **).