

Molekularne aspekty interakcji plemnika z oocytem u ssaków^{*)}

BARTOSZ KEMPISTY, DOROTA BUKOWSKA*, MAGDALENA WOŻNA*,
JACEK SIKORA**, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM,
ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

*Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP,
ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

**Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk o Zdrowiu UM,
ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań

Kempisty B., Bukowska D., Woźna M., Sikora J., Jaśkowski J. M.

Molecular aspects of sperm–egg fusion in mammals

Summary

The process of sperm–egg fusion is one of the most important mechanisms involved in successful fertilization. Studies conducted in an effort to elucidate this process are mainly focused on analyzing the interaction between the membrane proteins of male and female gametes. In the last few years, the genes coding proteins which may play an integral role in the process of sperm–egg binding and fusion have been identified. It has been suggested that sperm ADAMs family proteins are involved in this process. The sperm specific fertilin α , fertilin β and cyritestin are among this protein family. The oocyte's integrins, which are included in egg cell membrane, form receptors specific for those proteins. The other group of proteins, which are connected with sperm–egg fusion, are specific for oocyte CD9 protein and sperm epididymal protein DE.

The aim of this review was to present the characteristics of several proteins involved in the sperm–egg interaction process. The exploration of fertilization mechanisms may become the basic element that will improve assisted reproductive techniques and in vitro fertilization in mammals.

Keywords: fertilization, sperm–oocyte interaction, sperm–zona pellucida interaction

W prawidłowym przebiegu procesu zapłodnienia tylko jeden plemnik uzyskuje zdolność do penetracji i fuzji z błoną komórkową oocyty. Sugeruje się, że etap penetracji jest bardzo istotny nie tylko ze względu na spotkanie plemnika z oolemmą, ale przede wszystkim na uzyskanie zdolności do następującej po tym fuzji gamet. Podczas tego procesu plemniki przechodzą egzocytozę, określaną jako reakcja akrosomowa. Akrosom stanowi duże organellum wywodzące się z aparatu Golgiego i przypominające pod względem struktury lizosomy. Zlokalizowany jest w szczytowej części jądra komórkowego plemnika. Funkcja akrosomu związana jest z sekrecją enzymów, takich jak: proteaza serynowa oraz akrozyna, które ułatwiają plemnikowi penetrację osłonki przejrzystej oocyty (1). Skutkiem reakcji akrosomowej jest również wysunięcie wewnętrznej części błony akrosomu na zewnątrz. Uważa się, że proces ten jest niezbędny do osiągnięcia przez plemnik zdolności do fuzji z błoną cytoplazmatyczną komórki jajowej. Fuzja plemnika z oocytem rozpoczyna się w równikowej części gamety męskiej, zlokalizowanej pomiędzy wewnętrzną błoną akrosomową a błoną cytoplazmatyczną (3).

Oocyt ze względu na swą powierzchnię uważany jest za komórkę o unikatowej strukturze (18). Powierzchnia tej komórki pokryta jest przez liczne mikrokosmki, z wyjątkiem regionu gdzie znajduje się wrzeciono mejoetyczne. Funkcja mikrokosmków polega na otaczaniu główki plemnika, umożliwiając łączenie się gamet. Udowodniono, że proces ten zachodzi niezwykle rzadko w regionie oocyty pozbawionym mikrokosmków.

Struktura i rola specyficznego dla oocyty białka CD9

Białko CD9 należy do grupy tetraspanin, zbudowanych z czterech regionów transbłonowych oraz dwóch pętli zewnątrzkomórkowych (5). Druga pętla jest dużo większa i charakteryzuje się konserwatywną sekwencją aminokwasową (25). Tetraspaniny nie posiadają funkcjonalnych domen wspólnych dla pozostałych grup białek lub też odpowiedzialnych za interakcję z innymi tetraspaninami. Sugeruje się jednak możliwość interakcji pomiędzy tymi białkami a integrzynami, immunoglobulinami, proteoglikanami oraz receptorami czynników wzrostu. Utworzony w ten sposób kompleks białkowy zlokalizowany jest w błonie komórkowej oocyty i uczestniczy w takich procesach, jak: adhezja komórek oraz zdolność do

^{*)} Praca finansowana z grantu nr 2923/B/P01/2009/37 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

proliferaacji i różnicowania (6). Wyniki badań wskazują na ważny udział białka CD9 w wielu istotnych procesach, takich jak: infekcje wirusowe, fuzja komórek mięśniowych czy wspomniana już wcześniej zdolność do adhezji (26). Pierwsze obserwacje sugerujące istotną rolę CD9 w zapłodnieniu pochodzą z doświadczeń wykonanych przy wykorzystaniu przeciwciał skierowanych przeciwko temu białku (7). Chen i wsp. (7) wykazali, że użycie przeciwciał anti-CD9 prowadziło do zahamowania wiązania się gamet w warunkach *in vitro*. Następnie udowodniono, że białko CD9 jest rozmieszczone na całej powierzchni oocyty z wyjątkiem regionu obejmującego wrzeciono mejotyczne, a więc w miejscu, w którym bardzo rzadko dochodzi do fuzji komórek (14). Obserwowany wzór rozmieszczenia CD9 pokrywa się z lokalizacją integryny $\alpha 6$. Uważa się, że białka te mogą ulegać wzajemnej interakcji, tworząc specyficzne miejsca wiązania się fertyliny plemnika (20). Kaji i wsp. (14) wykazali, że myszy eksperymentalnie pozbawione białka CD9 (-/-) na powierzchni oocytów były niepłodne. Brak tego białka był przyczyną zaburzenia procesu fuzji plemnika z oocytem (17, 20). Proces wiązania się plemnika z komórką jajową przebiegał prawidłowo, natomiast bardzo rzadko dochodziło do fuzji komórek, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Posługując się techniką docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI – intracytoplasmic sperm injection) wykazano, że rozwój zygot pochodzących z oocytów CD9 (-/-) przebiegał prawidłowo, jednak myszy te rzadko rodziły zdrowe potomstwo (20). Udowodniono również, że dłuższy czas inkubacji oocytów CD9 (-/-) w obecności plemników, w warunkach *in vitro* znacząco zwiększał liczbę fuzji gamet. Obserwacje te, jak również fakt, że tetraspaniny tworzą wielocząsteczkowy błonowy kompleks białkowy sugerują, że CD9 ulega interakcji z innymi białkami odpowiedzialnymi za fuzję plemnika z oocytem. Istnieje hipoteza mówiąca o tym, że CD9 jest białkiem łącznikowym pomiędzy innymi cząsteczkami uczestniczącymi w procesie wiązania się i fuzji gamet. Zablokowanie tego białka przy wykorzystaniu przeciwciał anti-CD9 hamuje proces fuzji plemnika z oocytem (13, 19, 20). Istnieją jednak przypuszczenia, że funkcja tego białka odnosi się głównie do mechanizmu wiązania się gamet. Oocyty pozbawione osłonki przejrzystej i hodowane w obecności przeciwciał anti-CD9 wykazują obniżony poziom wiązania się ligandów plemnika (fertylina α , β i kyrytestina) (28, 31). Funkcjonalna różnica pomiędzy oocytami CD9 (-/-) a traktowanymi przeciwciałami anti-CD9 nie jest wystarczająco wyjaśniona i wymaga dalszych badań. Uważa się jednak, że użycie przeciwciał anti-CD9 może prowadzić do zaburzenia adhezji komórek, poprzez zablokowanie aktywności integryny $\alpha 6$, tworzącej kompleks z białkiem CD9.

W przypadku oocytów myszy charakteryzujących się brakiem białka CD9, zdolność do interakcji z plemnikiem może być przywrócona poprzez wstrzyknięcie do oocytów mRNA (messenger ribonucleic acid, informacyjny kwas rybonukleinowy) tego białka (13, 30, 31). Wykorzystując tę metodę, Zhu i wsp. (30) zidentyfikowali funkcjonalną domenę białka CD9 odpowiedzialną za ten proces. Ponadto, badania te wykazały, że zamiana pojedynczego nukleotydu w pozycji 174 łańcucha aminokwasowego oraz trzech zasad w pozycji 173-175 w oocytach

proceedzi do syntezy białka o obniżonej aktywności i ograniczenia zdolności do fuzji.

Specyficzne dla plemników białko DE

Białko najądrza (DE), określane również jako bogate w cysteinę białko wydzielnicze (CRISP1 – cysteine-rich secretory protein) należy do cząsteczek występujących w błonie komórkowej plemników. Uważa się, że białko to odgrywa istotną rolę w procesie fuzji gamet.

DE jest białkiem syntetyzowanym w przedniej części najądrza (15). Sugeruje się, że sekrecja tego białka jest regulowana odpowiednim stężeniem androgenów. Podczas przechodzenia plemników przez najądrze DE jest zlokalizowane na ich powierzchni (16). Podczas etapu poprzedzającego reakcję akrosomową DE jest położone na grzbietowej części akrosomu, a następnie przemieszcza się do części równikowej, która jest miejscem fuzji z oocytem (24). Zastosowanie poliklonalnych przeciwciał anti-DE znacząco obniża zdolność plemników do fuzji z pozbawionymi osłonki przejrzystej oocytami. Natomiast ruchliwość plemników, jak i zdolność do wiązania się z gametą żeńską były prawidłowe (9). Oczyszczone białko DE może wiązać się w każdym miejscu powierzchni oocyty, z wyjątkiem miejsca, gdzie formuje się wrzeciono mejotyczne. Rochwerger i wsp. (23) wykazali, że na powierzchni oocyty znajdują się receptory specyficzne dla plemnikowego białka DE. Użycie przeciwciał anti-CRISP1 (Cysteine-Rich Secretory Protein 1) w znaczący sposób obniża zdolność plemników do penetracji oocyty. Natomiast ich ruchliwość i zdolność do wiązania się z gametą żeńską nie uległy zmianie (29).

Integryny oraz białka ADAM

Fertylina α , β oraz kyrytestina należą do rodziny białek ADAM, określanych, odpowiednio, jako ADAM1, ADAM2 i ADAM3. Wszystkie te białka charakteryzują się występowaniem dużej metaloproteazowej domeny. Początkowo fertylina β była zidentyfikowana przy wykorzystaniu błonowego przeciwciała PH-30. Białko to tworzy strukturę heterodimeru z fertyliną α (4). Natomiast kyrytestina funkcjonuje jako pojedynczy polipeptyd (21). Fertylina α posiada charakterystyczną sekwencję aminokwasową, określaną jako białko fuzyjne, które tworzy domenę odpowiedzialną za wiązanie się z integrynami na powierzchni oocyty. Białko to charakteryzuje się następującymi cechami: (a) jest związane z błoną komórkową, (b) wykazuje charakter silnie hydrofobowy oraz (c) posiada zdolność do zmiany struktury α -helisy.

Wszystkie wymienione wyżej cechy charakteryzują białka fuzyjne specyficzne dla wirusów ulegających fuzji z błoną komórki gospodarza (22). Funkcja tych białek została określona na drodze doświadczeń zapłodnienia *in vitro*, stosując przeciwciała anti-ADAM oraz poprzez izolowanie i oczyszczanie tych białek. Evans i wsp. (11) wykazali, że użycie plemników ze zrekombinowanymi formami fertyliny α , β oraz kyrytestiny skutkowało znacznym obniżeniem współczynnika zapłodnień. Udowodniono, że plemniki z wyłączonym genem fertyliny β (-/-) wykazywały o 80% obniżoną zdolność do wiązania się z oolemmą komórki jajowej (8). Natomiast plemniki z wyłączonym genem kodującym kyrytestinę (-/-) wykazywały znacznie obniżoną zdolność do wiązania się

z oocytem, mimo że proces fuzji gamet przebiegał prawidłowo (21). Plemniki charakteryzujące się niedoborem fertyliny β oraz całkowitym brakiem fertyliny α wykazują znacznie obniżoną ilość kurytestyny. Natomiast plemniki z niedoborem kurytestyny wykazują całkowity brak fertyliny α oraz obniżoną o 50% w odniesieniu do typu dzikiego ekspresję fertyliny β (21).

Przedstawione wyniki wskazują, że białka ADAM odgrywają istotną rolę w mechanizmie wiązania się plemnika z oocytem, natomiast nie mają wpływu na fuzję gamet.

Powierzchnia oocytów pokryta jest białkami określanymi jako integryny.

Sugeruje się, iż tworzą one receptory specyficzne dla ligandów występujących w błonie komórkowej plemników. Pierwszym białkiem należącym do tej rodziny, zidentyfikowanym na powierzchni oocytu, była integryna $\alpha 6 \beta 1$. Wykorzystanie błonowego przeciwciała anti- $\alpha 6$ (GoH3) powodowało zahamowanie zarówno procesu wiązania się, jak i fuzji plemnika z oocytem (2, 7, 27). Integryny ulegające ekspresji na powierzchni oocytów dzieli się na dwie grupy: integryny $\beta 1$, w których skład wchodzi $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 9 \beta 1$ oraz integryny $\alpha \nu$: $\alpha \nu \beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$ (10, 12, 19). Podobnie jak w przypadku integryn $\alpha 6$, oocyty z wyłączonymi genami kodującymi białka $\alpha 3$, $\beta 3$ i $\beta 5$ charakteryzowały się prawidłową płodnością (12). Badania He i wsp. (12) wykazały, że myszy z wyłączonym genem kodującym integrynę $\beta 1$ charakteryzowały się prawidłowym współczynnikiem ciąży oraz nie wykazywały nieprawidłowości w procesie wiązania się czy fuzji gamet. Podobnie, wykorzystanie przeciwciał anti- $\beta 3$ lub anti- $\alpha \nu$ nie prowadziło do zaburzeń procesów wiązania się i fuzji plemnika z oocytem. Sugeruje się więc, że występujące na powierzchni oocytów białka integrynowe stanowią jedynie jeden z elementów pośredniczących w procesie zapłodnienia.

Wnioski i perspektywy

Dokładna charakterystyka interakcji pomiędzy białkami specyficznymi dla gamety męskiej i żeńskiej wymaga skupienia się na określeniu roli, jaką w tych procesach odgrywają takie cząsteczki, jak białko CD9 w oocytach oraz występujące w błonie komórkowej plemnika białko DE. Badania z wykorzystaniem zwierząt z wyłączonym genem DE przybliżyły znacznie poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za skuteczne zapłodnienie. Zgromadzona wiedza na temat wiązania się i fuzji gamet może pozwolić w przyszłości na zwiększenie wydajności zapłodnienia pozaustrojowego.

Piśmiennictwo

1. Abou-Haila A., Tulsiani D. R.: Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. Arch. Biochem. Biophys. 2000, 379, 173-182.
2. Almeida E. A., Huovila A. P., Sutherland A. E., Stephens L. E., Calarco P. G., Shaw L. M., Mercurio A. M., Sonnenberg A., Primakoff P., Myles D. G., White J. M.: Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. Cell 1995, 81, 1095-1104.
3. Bedford J. M., Moore H. D., Franklin L. E.: Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. Exp. Cell Res. 1979, 119, 119-126.
4. Blobel C. P., Wolfsberg T. G., Turck C. W., Myles D. G., Primakoff P., White J. M.: A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature 1992, 356, 248-252.
5. Boucheix C., Benoit P., Frachet P., Billard M., Worthington R. E., Gagnon J., Uzan G.: Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. J. Biol. Chem. 1991, 266, 117-122.
6. Boucheix C., Rubinstein E.: Tetraspanins. Cell. Mol. Life Sci. 2001, 58, 1189-1205.
7. Chen H., Sampson N. S.: Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilin beta. Chem. Biol. 1999, 6, 1-10.
8. Cho C., Bunch D. O., Faure J. E., Goulding E. H., Eddy E. M., Primakoff P., Myles D. G.: Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. Science 1998, 281, 1857-1859.
9. Cuasnicu P. S., Gonzalez Echeverria F. M., Piazza A. D., Cameo M. S., Blaquier J. A.: Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. J. Reprod. Fert. 1984, 72, 467-471.
10. Evans J. P., Kopf G. S., Schultz R. M.: Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. Dev. Biol. 1997, 187, 79-93.
11. Evans J. P., Schultz R. M., Kopf G. S.: Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin alpha subunit to mouse eggs: evidence for function as a cell adhesion molecule in sperm-egg binding. Dev. Biol. 1997, 187, 94-106.
12. He Z. Y., Brakebusch C., Fassler R., Kreidberg J. A., Primakoff P., Myles D. G.: None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. Dev. Biol. 2003, 254, 226-237.
13. Kaji K., Oda S., Miyazaki S., Kudo A.: Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. Dev. Biol. 2002, 247, 327-334.
14. Kaji K., Oda S., Shikano T., Ohnuki T., Uematsu Y., Sakagami J., Tada N., Miyazaki S., Kudo A.: The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. Nat. Genet. 2000, 24, 279-282.
15. Kohane A. C., Cameo M. S., Pineiro L., Garberi J. C., Blaquier J. A. et al.: Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biol. Reprod. 1980, 23, 181-187.
16. Kohane A. C., Gonzalez Echeverria F. M., Pineiro L., Blaquier J. A.: Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. Biol. Reprod. 1980, 23, 737-742.
17. Le Naour F., Rubinstein E., Jasnin C., Prenant M., Boucheix C.: Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. Science 2000, 287, 319-321.
18. Longo F. J., Chen D. Y.: Development of surface polarity in mouse eggs. Scan. Electron. Microsc. 1984, 2, 703-716.
19. Miller B. J., Georges-Labouesse E., Primakoff P., Myles D. G.: Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. J. Cell. Biol. 2000, 149, 1289-1296.
20. Miyado K., Yamada G., Yamada S., Hasuwa H., Nakamura Y., Ryu F., Suzuki K., Kosai K., Inoue K., Ogura A., Okabe M., Mekada E.: Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science 2000, 287, 321-324.
21. Nishimura H., Cho C., Branciforte D. R., Myles D. G., Primakoff P.: Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. Dev. Biol. 2001, 233, 204-213.
22. Parseval A. de, Lerner D. L., Borrow P., Willett B. J., Elder J. H.: Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. J. Virol. 1997, 71, 5742-5749.
23. Rochwerger L., Cohen D. J., Cuasnicu P. S.: Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. Dev. Biol. 1992, 153, 83-90.
24. Rochwerger L., Cuasnicu P. S.: Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. Mol. Reprod. Dev. 1992, 31, 34-41.
25. Seigneuret M., Delaguillaumie A., Lagaudriere-Gesbert C., Conjeaud H.: Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. J. Biol. Chem. 2001, 276, 40055-40064.
26. Tachibana I., Hemler M. E.: Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. J. Cell Biol. 1999, 146, 893-904.
27. Takahashi Y., Yamakawa N., Matsumoto K., Toyoda Y., Furukawa K., Sato E.: Analysis of the role of egg integrins in sperm-egg binding and fusion. Mol. Reprod. Dev. 2000, 56, 412-423.
28. Wong G. E., Zhu X., Prater C. E., Oh E., Evans J. P.: 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, 24937-24945.
29. Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers B. J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 1976, 15, 471-476.
30. Zhu G. Z., Miller B. J., Boucheix C., Rubinstein E., Liu C. C., Hynes R. O., Myles D. G., Primakoff P.: Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. Development 2002, 129, 1995-2002.
31. 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, 1193-1202.

Adres autora: mgr Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań;
e-mail: etok@op.pl