

SOBREEXPRESSIÓ DEL GENS *HSP90AA1* I *HSPA8* EN CÈL·LULES EPITELIALS DE L'OVIDUCTE (OEC) PRODUÏDA PER ESPERMATOZOIDES EN L'ESPÈCIE PORCINA

Marc Yeste,^{1,2} William V. Holt,² M. Dolors Briz,¹ Sergi Bonet¹ i Rhiannon E. Lloyd²

¹ Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Facultat de Ciències, Universitat de Girona.

Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. marc.yeste@udg.edu.

² Reproductive Biology, Institute of Zoology, Zoological Society of London.

Resum

Les cèl·lules epitelials de l'oviducte (OEC) afecten la viabilitat, la capacitació i la motilitat espermàtiques en porcí i en altres mamífers. S'ha observat que algunes proteïnes oviductals també afecten la funcionalitat espermàtica. L'objectiu d'aquest estudi fou l'anàlisi dels canvis en l'expressió de dos gens que codifiquen dues proteïnes de xoc tèrmic prèviament identificades en un extracte de 70 kDa de proteïnes de les membranes apicals de les OEC (sAPM). Els canvis en l'expressió del gens *heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (HSP90AA1)* i *heat shock cognate protein related 70 kDa (HSPA8)* es van determinar durant un cocultiu *in vitro* de cèl·lules oviductals i espermatozoides durant 24 hores, amb presència o absència d'una membrana semipermeable que impedia el contacte directe entre ambdós tipus cel·lulars. Es va observar que els espermatozoides induïen l'expressió del gens *HSP90AA1* i *HSPA8* a les OEC després de 3 o 6 hores de cocultiu, respectivament, quan hi ha contacte directe entre ambdues cèl·lules. Això suggereix que les proteïnes HSP90AA1 i HSPA8 podrien tenir un paper important en el manteniment de la funcionalitat espermàtica en el reservori seminal.

Paraules clau: espermatozoides, cèl·lules oviductals, HSP90AA1, HSPA8, porcí.

Abstract

Oviductal epithelial cells (OEC) influence viability, capacitation and motility of sperm cells in boar and other mammalian species. Moreover, some oviductal proteins have also been shown to affect the sperm function. The aim of the present study was to analyze the changes in the expression of two relevant genes, all of their corresponding proteins being present in a 70 kDa porcine sAPM (solubilised apical plasma membrane extracts from OEC) protein band. Expression changes of heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*) and heat shock cognate protein related 70 kDa (*HSPA8*) were assessed in *in vitro* co-culture of OEC and Percoll-washed spermatozoa, over a 24 hour period, with or without a diffusible membrane insert to prevent direct contact between OEC and spermatozoa. Spermatozoa induce the upregulation of *HSP90AA1* and *HSPA8* after either 3 hours or 6 hours, respectively, of co-incubation in OEC, when there is direct contact between both types of cells. These results suggest HSP90AA1 and HSPA8 may play an integral role in the maintenance of spermatozoa in the oviductal sperm reservoir.

Key words: spermatozoa, oviductal cells, HSP90AA1, HSPA8, porcine.

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules epitelials de l'oviducte (OEC) afecten la viabilitat i la motilitat espermàtiques com a conseqüència del contacte directe entre ambdós tipus de cèl·lules i de l'activitat secretora d'aquestes cèl·lules somàtiques, tal i com s'ha observat en estudis previs (Yeste *et al.*, 2008a). D'altra banda, en altres estudis duts a terme en cavalls (Ellington *et al.*, 1993) i vaques (Thomas *et al.*, 1995), s'ha observat que quan

els espermatozoides s'uneixen a les OEC alteren quantitativament i qualitativament l'expressió proteica després d'establir un cocultiu homòleg *in vitro*. A més, en porcí s'ha determinat que *in vivo* els espermatozoides també influeixen en l'expressió gènica de les cèl·lules de l'oviducte (Georgiou *et al.*, 2007).

D'altra banda, és ben conegut que la coïncubació d'espermatozoides amb extractes de proteïnes de les membranes apicals (APM) de les cèl·lules oviductals

Taula 1. *Primers utilitzats*

Gen	Seqüències dels primers	Mida de l'amplicó	Temperatura de fusió (°C)	Nombre de cicles	EMBL (accession number)
ACTB	5' -GCCATGTACGTGGCCATCCAGGC-3' 5' -CTTAGCGGTCCCCGTGCAA-3'	455	63	30	NM_001009784 AJ312183 M10277
HSPA8	5' -GGACCTGCAGTTGGCATTGATCT-3' 5' -TAGCCTGACGCTGAGAGTCGTTA-3'	362	60	35	NM_174345 CX062900 CX061052
HSP90AA1	5' -TTCAGCCTAGATGCCCGAGGAAA-3' 5' -ATGTGCAGCTCTTCCCGGAGTC-3'	219	61	35	NM_213973 U94395 X15183

manté la viabilitat espermàtica en diferents espècies de mamífers (Smith i Nothnick, 1997; Fazeli *et al.*, 2003). Atès que en porcí s'han identificat, entre d'altres, dues proteïnes de xoc tèrmic, la *heat shock cognate protein 70 kDa* (HSPA8) i la *heat shock protein 90 kDa alpha A.1* (HSP90AA1), com a constituents de l'APM (Elliot *et al.*, 2009), l'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar els canvis en l'expressió dels gens que codifiquen aquestes dues proteïnes en les cèl·lules oviductals durant 24 hores de cocultiu. Per això, s'han dut a terme dos experiments de cocultiu diferents, amb contacte directe OEC-espermatozoide (sense *insert*) i sense contacte directe OEC-espermatozoide (amb *insert*).

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció i cultiu de cèl·lules oviductals (OEC)

El cultiu primari de cèl·lules oviductals es va obtenir d'acord amb el protocol descrit per Yeste i col·laboradors (2008a). Els oviductes amb els ovaris es van recollir de femelles entre 10 i 16 mesos d'edat i es van distingir les fases fol·licular i luteínica atenent a l'aparença dels ovaris. Posteriorment les cèl·lules es van sembrar utilitzant medi de cultiu 199 suplementat amb sèrum fetal (10 %), penicil·lina/estreptomicina (1 %) i fungicida (0,5 %) a una concentració de 10⁶ cèl·lules per ml i es van cultivar a 37,5 °C i atmosfera al 5 % de CO₂ fins que es va assolir la confluència (6-7 dies). El medi de cultiu es va canviar cada 48 hores i la naturalesa epitelial de les cèl·lules oviductals es va comprovar mitjançant immunofluorescència anticitoqueratines.

Obtenció d'espermatozoides i cocultiu amb OEC

Es van utilitzar 11 mostres seminals que es van ren-

tar amb gradient de Percoll (35-70 %). Posteriorment, els espermatozoides es van resuspendre en medi Tyrode's modificat (Yeste *et al.*, 2008a) a una concentració de 1,87 × 10⁶ espermatozoides/ml. Els cocultius es van incubar a 37,5 °C, 100 % humitat i 5 % CO₂ i l'expressió gènica de les cèl·lules oviductals es va determinar després de 0, 3, 6, 12 i 24 hores. En els cocultius en els quals es volia impedir el contacte directe cèl·lula oviductal-espermatozoide, es va dipositar prèviament una membrana semipermeable (o *insert*) amb un diàmetre de porus de 4 µm (Millipore Corp.).

L'experiment es va repetir 11 vegades utilitzant esperma i cultius cel·lulars procedents d'animals diferents.

Extracció de RNA i RT-PCR semiquantitativa

L'mRNA es va extreure mitjançant un *kit* comercial i la seva puresa es va determinar mitjançant espectroscòpia (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀). La transcripció inversa es va dur a terme utilitzant el *kit* Reverse Transcription System durant dues hores a 42 °C.

La PCR es va realitzar emprant *primers* (vegeu la taula 1) que es van dissenyar específicament en cada cas. Els productes de la RT-PCR es van separar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 2 % i a 100 V. Els gels es van visualitzar posteriorment amb un transil·luminador i les imatges obtingudes es van analitzar mitjançant el programari SynGene Genetools, el qual permet estimar la quantitat de cDNA mitjançant densitometria. Totes les mostres es van normalitzar utilitzant el gen de la β-actina (*ACTB*) com a estàndard intern.

Anàlisi estadística

Les abundàncies relatives de cDNA per a cada gen (*x*) (11 rèpliques) es van transformar mitjançant el

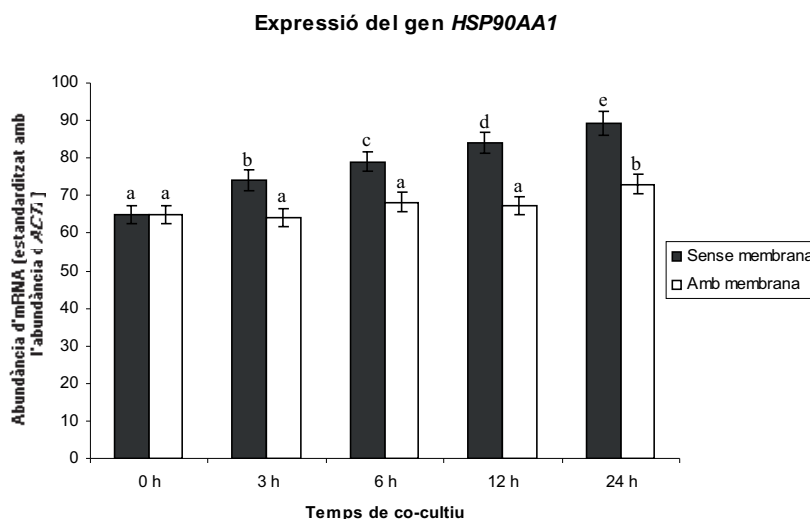


Figura 1. Expressió del gen *HSP90AA1* durant el cocultiu amb i sense membrana semipermeable. Els superíndexs (*a, b, c, d* i *e*) indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre les abundàncies relatives.

càlcul de l'arcsin \sqrt{x} , per ser analitzades després amb mètodes paramètrics (ANOVA de mesures repetides, test post-hoc de Tukey i test *t* amb correcció de Bonferroni) i no paramètrics (tests de Friedman i Wilcoxon). El nivell de significació es va fixar per a $P < 0,05$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana.

RESULTATS

La figura 1 mostra l'expressió relativa del gen *HSP90AA1* a les OEC durant el temps de cocultiu. S'observa que els espermatozoides sobreregulen l'expressió d'aquest gen després de 3 hores de cocultiu i de manera creixent respecte al temps de cocultiu només quan estan en contacte directe amb les cèl·lules oviductals (sense membrana semipermeable), excepte després de 24 hores de coincubació, quan s'observa una sobreregulació marginal en el tractament amb membrana semipermeable.

Pel que fa a l'expressió del gen *HSPA8* a les OEC (vegeu la figura 2), només s'observen diferències significatives quan els espermatozoides estan en contacte directe amb aquestes cèl·lules oviductals (tractament sense membrana) després de 6 hores de cocultiu.

DISCUSSIÓ

La incubació dels espermatozoides amb l'APM (APM) de l'oviducte manté la seva viabilitat en conills (Smith i Nothnick, 1997), porcs (Fazeli *et al.*, 2003) i vaques (Boilard *et al.*, 2004). En porcí, aquests extractes han estat parcialment caracteritzats (Elliot *et al.*, 2009) i s'hi han identificat, entre d'altres, les proteïnes HSP90AA1 i HSPA8. En aquest estudi es demostra com l'expressió d'aquests dos gens en les cèl·lules oviductals es mostra sobreregulada quan els espermatozoides es poden unir de manera directa a aquestes cèl·lules. Recentment, s'ha observat que la incubació d'espermatozoides tant d'espècie porcina (Elliot *et al.*, 2009) com ovina (Lloyd *et al.*, 2009) amb la proteïna HSPA8 recombinant augmenta la viabilitat espermàtica. D'altra banda, s'ha determinat que la HSP90AA1 dels espermatozoides està implicada en la seva capacitació (Ecroyd *et al.*, 2003). Així doncs, a partir dels estudis previs, dels resultats d'aquest estudi i de les dades obtingudes a partir del cocultiu d'espermatozoides amb cèl·lules epitelials no reproductores (LLC-PK1) (Yeste *et al.*, 2008b), se suggereix que aquestes dues proteïnes són dos components de l'APM implicats en la modulació de la funcionalitat espermàtica en el reservori seminal i en el manteniment dels oòcits fecundats en les etapes primerenques del desenvolupament preimplantacional.

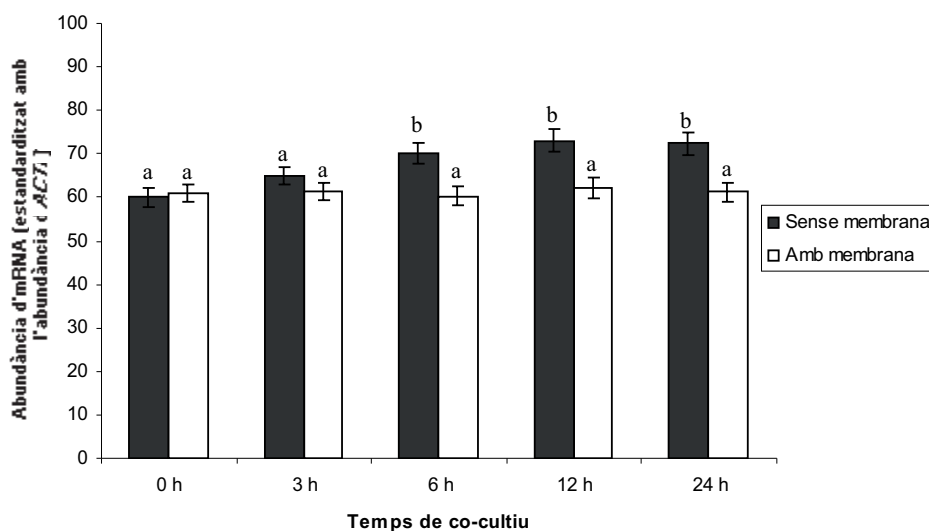
Expressió del gen *HSPA8*

Figura 2. Expressió del gen *HSPA8* durant el cocultiu amb i sense membrana semipermeable. Els superíndexs *a* i *b* indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre les abundàncies relatives.

BIBLIOGRAFIA

- BOILARD, M.; REYES MORENO, C.; LACHANCE, C.; MASSICOTTE, L.; BAILEY, J. L.; SIRARD, M. A.; LECCLERC, P. (2004). «Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa». *Biology of Reproduction*, 71: 1879-1889.
- ECROYD, H.; JONES, R. C.; AITKEN, R. J. (2003). «Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation». *Biology of Reproduction*, 69: 1801-1807.
- ELLINGTON, J. E.; IGNOTZ, G. G.; BALL, B. A.; MEYERS-WALLEN, V. N.; CURRIE, W. B. (1993). «De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa». *Biology of Reproduction*, 48: 851-856.
- ELLIOTT, R. M.; LLOYD, R. E.; FAZELI, A.; SOSTARIC, E.; GEORGIU, A. S.; SATAKE, N.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2009). «Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa». *Reproduction*, 137: 191-203.
- FAZELI, A.; ELLIOTT, R. M.; DUNCAN, A. E.; MOORE, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2003). «In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal plasma membrane preparations». *Reproduction*, 125: 509-517.
- GEORGIU, A. S.; SNIJDERS, A. P.; SOSTARIC, E.; AFLATOONIAN, R.; VÁZQUEZ, J. L.; VÁZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A.; WRIGHT, P. C.; FAZELI, A. (2007). «Modulation of the oviductal environment by gametes». *Journal of Proteome Research*, 6: 4656-4666.
- LLOYD, R. E.; ELLIOTT, R. M.; FAZELI, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2009). «Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro». *Reproduction, Fertility and Development*, 21: 408-418.
- SMITH, T. T.; NOTHNICK, W. B. (1997). «Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability». *Biology of Reproduction*, 56: 83-89.
- THOMAS, P. G.; IGNOTZ, G. G.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. P.; CURIE, W. B. (1995). «Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells». *American Journal of Veterinary Research*, 56: 1657-1662.
- YESTE, M.; LLOYD, R. E.; BADIA, E.; BRIZ, M.; BONET, S.; HOLT, W. V. (2008a). «Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro». *Animal Reproduction Science*, DOI:10.1016/j.anireprosci.2008.08.018.
- YESTE, M.; LLOYD, R. E.; BRIZ, M.; BONET, S.; HOLT, W. V. (2008b). «The changes in the expression of three Heat Shock Proteins during in vitro homologous oviductal epithelial cell co-culture». 1st International Meeting of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) and the British Andrology Society (BAS). Gijón, Spain. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(supl. 4): 53.