

STRESZCZENIE

W jajniku ssaków oocyt jest otoczony osłonką przejrzystą (ZP), składającą się z czterech glikoprotein u ludzi (ZP1-ZP4) i trzech u myszy (ZP1-ZP3). Główne funkcje osłonki przejrzystej to udział w procesie zapłodnienia i zapobieganie polispermii, a także udział w rozwoju zarodka. Osłonka przejrzysta była z powodzeniem stosowana jako docelowy antygen w metodzie antykoncepcyjnej do czynnej immunizacji populacji niektórych dzikich zwierząt, ponieważ przeciwciała specyficzne dla ZP3 inicjują utratę funkcji jajników z powodu autoimmunologicznego zapalenia jajników, w którym pośredniczą komórki T. Konwencjonalnie ZP3 ulega ekspresji wyłącznie w jajniku, ale została odkryta również w kilku tkankach nowotworowych (rak jajnika, prostaty, jelita grubego i płuc). To odkrycie rozszerzyło możliwości wykorzystania ZP3 w czynnej lub biernej immunizacji raka. Niespodziewanie, niedawno wykazano ekspresję ZP3 w mysich i ludzkich jądrach.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie ekspresji ZP3 w zdrowych ludzkich i mysich tkankach, ze szczególnym uwzględnieniem jądra, oraz analiza jej funkcjonalnych implikacji w procesie ontogenezy jąder i spermatogenezy u myszy.

W badaniu wykorzystano tkanki mysie (n=6) i ludzkie (n=14) utrwalone w RNAlater i/lub 4% paraformaldehydzie (PFA) oraz komercyjna linia komórkowa spermatocytów mysich GC-2spd(ts). Do badania ontogenezy wybrano jądra myszy z 7 grup: 18. dzień płodowy (ED), 1. dzień po urodzeniu (PND), 7 PND, 15 PND, 21 PND, 35 PND, 2-miesięczne (n=6/każda grupa). Ekspresję ZP3 zbadano stosując analizę RT-PCR. Wykorzystując hybrydyzację RNAscope in situ i metody immunohistochemiczne, sprawdzono odpowiednio transkrypty mRNA i lokalizację białka ZP3. Przeprowadzono barwienie immunologiczne całych kanalików nasiennych w celu oceny ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych i progenitorowych (SSPC) i zwizualizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Ekspresję ZP3 na poziomie białka analizowano w jądrach u myszy ze znokautowanym receptorem (R) hormonu luteinizującego (LH) (LuRKO), które są całkowicie pozbawione spermatogenezy. Aby przeanalizować czynniki, które mogą regulować działanie ZP3, mysie spermatocyty GC-2spd(ts) poddano działaniu hormonów: estradiolu, testosteronu, progesteronu, FSH, LH i hCG. Ekspresję ZP3 zbadano na poziomie mRNA i lokalizację białka za pomocą testu immunofluorescencyjnego.

Analiza immunohistochemiczna wykazała lokalizację białka ZP3, a RNAscope transkryptów mRNA ZP3 w ludzkich i mysich jądrach, a mianowicie w komórkach rozrodczych: spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach, a także w komórkach spermatocytów mysich GC-2spd(ts). ZP3 był nieobecny w zdrowych ludzkich i mysich (n=14/gatunek) komórkach somatycznych Leydiga i Sertolego, SSPC oraz progenitorowych i macierzystych. Podczas ontogenezy jąder myszy ekspresja ZP3 pojawiła się w PND21 (w okresie dojrzewania). Młodsze myszy PND1, PND7, PND15 i płodowe myszy ED18 nie wykazywały ekspresji ZP3 w jądrach. U myszy LuRKO również nie wykryto ZP3. Stymulacja estradiolem, testosteronem, progesteronem, FSH, LH lub hCG nie miała wpływu na poziom ekspresji ZP3 w komórkach GC-2spd(ts).

Podsumowując, przedstawione dane wykazały ekspresję ZP3 w jądrach ludzkich i mysich na poziomie molekularnym, ZP3 prawdopodobnie można wykorzystać jako docelowy antygen w odwracalnej męskiej antykoncepcji. Wyniki badań ontogenezy i brak ekspresji ZP3 u myszy LuRKO, podkreśla funkcjonalne znaczenie ZP3 w jądrach podczas spermatogenezy. Brak ekspresji ZP3 w innych zdrowych tkankach (poza jajnikiem i jądrem), sugeruje, że potencjalne efekty uboczne off-target w immunoterapii nowotworowej z udziałem ZP3 będą nieznaczne.