

## PRESENCE OF PLASMA AND CELLULAR FIBRONECTIN IN UTERINE SECRETIONS OF PIGS DURING EARLY PREGNANCY

## ПРИСЪСТВИЕ НА ПЛАЗМЕН И КЛЕТЪЧЕН ФИБРОНЕКТИН В МАТОЧНИ СЕКРЕТИ НА СВИНЕ ПО ВРЕМЕ НА РАННА БРЕМЕННОСТ

PAVEL RASHEV

Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. K. Bratanov", Department of Immunobiology of Reproduction, Bulgarian Academy of Sciences, 73 Tzarigradsko shosse Blvd, 1113 Sofia, Bulgaria, pavel\_rashev@abv.bg

### ABSTRACT

The fibronectin is an extracellular matrix protein, which play a significant role in cell proliferation, differentiation and migration in several physiological and pathological processes. During pregnancy the fibronectin mediate attachment of embryo to uterine surface epithelium. The aim of the present study is to identify plasma and cellular fibronectin isoforms in uterine secretions of pregnant pigs. The results indicated presence of proteolytic degradation of the plasma and cellular fibronectin molecules during embryo implantation and weak increasing of levels of plasma fibronectin with advancing of pregnancy. On the basis of these results it was suggested that the generated fibronectin fragments may be affect cell differentiation and migration of a trophoblast cells and endometrial surface epithelium.

**Keywords:** fibronectin, ECM, implantation, epitheliochorial placenta, pigs

### РЕЗЮМЕ

Фибронектинът е екстрацелуларен матриксен протеин, който играе съществена роля в процесите на клетъчна пролиферация, диференциация и миграция на различни физиологични и патологични процеси. По време на бременност, фибронектинът медира прикрепването на ембриона към повърхностния маточен епител. Целта на настоящото изследване е да се идентифицира плазмен и клетъчен фибронектин в маточни секрети на бременни свине. Резултатите показаха наличие на протеолитично разграждане на фибронектиновата молекула на плазмения и клетъчния фибронектин по време на имплантацията на ембриона и слабо повишаване нивата на плазмения фибронектин с напредване на бременността. На базата на тези резултати може да се допусне, че генерираните фибронектинови фрагменти могат да повлияят клетъчната пролиферация и миграция на трофобластните клетки и тези на повърхностния маточен епител.

**Ключови думи:** фибронектин, екстрацелуларен матрикс, имплантация, епителиохориална плацента, свине

**РАЗШИРЕНО РЕЗЮМЕ**

Фибронектинът е екстрацелуларен матриксен протеин, който играе съществена роля в процесите на клетъчна пролиферация, диференциация и миграция. В резултат на алтернативния сплайсинг по време на синтеза на фибронектиновите субединици, до момента са известни над 20 изоформи на фибронектиновата молекула, които играят съществена роля в редица физиологични и патологични процеси. По време на бременност, фибронектинът медира прикрепването на ембриона към повърхностния маточен епител. Целта на настоящото изследване е да се идентифицира плазмен и клетъчен фибронектин в маточни секрети на бременни свине. В проучването бяха използвани 9 броя свине от хибрида “Кембъроу” (Голяма Бяла x Ландрас), които бяха изкуствено осеменени на 12 и 18 час след появата на еструса. Маточните рога бяха изолирани на 10-ия, 15-ия и 20-ия ден от бременността и промити с фосфатно-буферен разтвор. Получените маточни секрети бяха центрофугирани и съхранявани при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

За характеризирание на плазмен и клетъчен фибронектин в маточните секрети беше проведен имуноблот при нередуциращи условия. Протеините бяха сепарирани в 10% полиакрил-амиден гел и пренесени върху PVDF мембрана. Мембраните бяха блокирани за 18 часа с 5%-ов буфер на сухо обезмаслено мляко, след което инкубирани последователно за по 1 час с антигела срещу плазмен и клетъчен фибронектин, биотинилирани магарешки анти-заешки (за плазмен фибронектин) или кози анти-миши IgM (за клетъчен фибронектин) и стрептавидин-алкална фосфатаза, като преди всяко следващо инкубиране, мембраните бяха промивани трикратно с трис-буферен разтвор. Реакцията беше визуализирана NBT/BCP буфер. След промиване, мембраните бяха изсушени и сканирани. За определяне на молекулната маса на специфичните ивици беше използван молекулен кит, а като положителна контрола – изолиран от човешка плазма фибронектин. Относителния интензитет на ивиците беше изчислен с UTHSCSA ImageTool софтуер. Сравняването на интензитета беше извършено между проби сепарирани в един и същи гел, а статистическият анализ беше извършен с ANOVA and Tukey's test.

Резултатите от проведения имуноблот доказват присъствието на плазмен и клетъчен фибронектин в маточните секрети от 15-ия и 20-ия ден от бременността. Антигелото срещу плазмен фибронектин маркира 5 ивици в областта 220-240 kDa и 165-185 kDa (Фиг.1А). Денситометричният анализ показва слабо повишаване нивата на плазмен

фибронектин с напредване на бременността, с изключение на ивицата с молекулна маса около 165 kDa (Фиг.1В).

При същите условия, антигелото срещу клетъчен фибронектин локализира ивици с молекулни тегла 240 kDa, 145 kDa и 85 kDa (Фиг.2А), като нивата им намаляват с напредване на бременността (Фиг.2В).

На базата на получените резултати можем да предположим, че плазмен и клетъчен фибронектин участват в медиране прикрепването на ембриона и повърхностния маточен епител в периода на адхезия/имплантация и плацентация. Най-вероятно, частичното хидролизиране на фибронектиновата молекула води до индуциране на нови вътреклетъчни сигнали в трофектодерма и ендометриума, повлиявайки тяхната пролиферация, диференциация и миграция.

**INTRODUCTION**

Fibronectin is a large glycoprotein existing in two forms: soluble fibronectin detected in different body fluids and insoluble fibronectin as a component of the ECM. As a result of alternative splicing of the primary RNA, at the present were known more than 20 isoforms, which play a significant role in many physiological processes, such as cell adhesion, migration, differentiation, gene expression, embryogenesis and implantation [3, 4, 9].

In species with epitheliochorial placenta a fibronectin was detected at the maternal-fetal interface and endometrial stroma and it was suggested that fibronectin support adhesion of embryo to surface uterine epithelium [1, 7, 8]. However, there are no data about presence of fibronectin isoforms and its fragments in uterine secretions in pigs during early pregnancy.

The aim of the present study is to investigate the presence of plasma and cellular fibronectin in uterine secretion of pregnant pigs, during periods of maternal recognition of pregnancy and adhesion/implantation.

**MATERIALS AND METHODS****Animals**

Crossbreed gilts (Large White x Landrace) were artificially inseminated 12 and 18 hours after estrus detection (the day of estrus was designed as Day 0) (Camberow Meat Production Farm). Animals were slaughtered (3 per group) on Days 10, 15 and 20 and uterine horns were removed. Each uterine horn was flushed with 20 ml PBS, after that were centrifuged to remove embryonic tissues, after that flushings were concentrated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

SDS-PAGE and Western blot analysis

Uterine samples were mixed 1:1 with sample buffer for SDS-PAGE and separated under non-reducing conditions on 10% SDS gels. Separated proteins were transferred to immunobilon-PVDF membranes (Amersham) by semi-dry blotting. Non-specific binding was blocked by incubation overnight with 5% (w:v) nonfat milk in TBS. Membranes were then probed for 1 h at room temperature with primary antibodies (anti-plasma fibronectin (IgG) and anti-cellular fibronectin (IgM); Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) in dilution 1:2000 in blocking buffer. The membranes were washed with TBS and incubated with biotinylated donkey anti-rabbit IgG (SAPU, Scotland, UK) or goat anti-mouse IgM (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) for 1 h at room temperature. After washing, membranes were incubated with streptavidin-alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) and bands were developed with NBT/BCP buffer. Weight electrophoresis calibration kit (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) and purified plasma fibronectin were run in the same slab gels to determine the relative molecular mass of the proteins and as positive control, respectively. Membranes were dried, scanned and intensity of the immunochemical reactions was calculated.

Statistical analysis

The relative intensity of the bands was calculated by comparison with parallel background readings of equal area using UTHSCSA ImageTool program. Comparisons were made only between samples run on a single gel. Means ( $\pm$  SD) were calculated for each band and were compared using one-way ANOVA and Tukey's test. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

RESULTS

After electrophoresis at nonreducing conditions and following western blot, plasma and cellular fibronectin isoforms were found only on Day 15 and 20 of pregnancy. The antibody against plasma fibronectin binds to five specific bands with approximately molecular weight 220-240 kDa and 165-185 kDa, which correspond to fibronectin subunits (240-220 kDa) and fragments, respectively (Fig. 1A). The relative densitometry analysis of the specific bands for plasma fibronectin demonstrated weak increase in intensity of immunochemical reaction with advancing of pregnancy, with the exception of 165 kDa fibronectin fragment (Fig. 1B).

In same conditions, antibody to cellular fibronectin localized single bands of fibronectin subunits 240 kDa

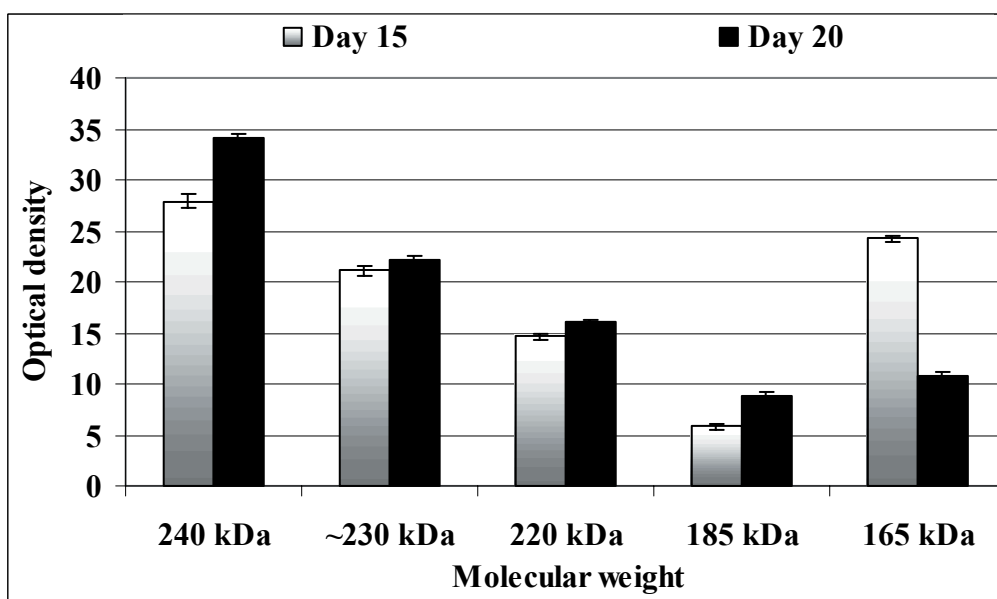


Fig. 1. Western Blot for detection of plasma fibronectin in native uterine secretions from Days 10, 15 and 20 of pregnancy (A) and densitometry analysis of the specific bands (B).

FN-isolated from human plasma fibronectin; M-molecular weight marker.

Фиг. 1. Имуноблот за доказване на плазмен фибронектин в нативни маточни секрети от 10-ти, 15-ти и 20-ти ден от бременността (A) и денситометричен анализ на специфичните ивици (B).

FN-изолиран от човешка плазма фибронектин. M-молекулен маркер.

and fibronectin fragments - 145 and 85 kDa (Fig.2A). In contrast to levels of plasma fibronectin, a sharply decrease of 240 kDa fibronectin subunits of cellular fibronectin between Days 15 and 20 was found (Fig.2B).

**DISCUSSION**

The results indicated that fibronectin absent from uterine secretions on Day 10 of pregnancy, which corresponding with period of maternal recognition of pregnancy. In preliminary our study fibronectin was found on trophoctoderm and endometrial surface epithelium, but not in uterine glands, during periods of adhesion/implantation and placentation, with increasing immunohistochemical reaction for fibronectin on uterine surface epithelium on Day 10, compared with these on Day 15 and 20 [7]. This suggests either lower proteolytic activity in uterine secretions or increased fibronectin polymerization on uterine surface epithelium during peri-implantation period.

The appearance of multiple fibronectin subunits, with near molecular weights, probably is as a result of different degree of glycosilation of the fibronectin molecule. There are data that FN at the maternal-fetal interface is in higher degree glycosilated and demonstrate decreased ability for connection to other matrix proteins and restricted

susceptibility to proteolysis [5, 10]. It was found that a fibronectin fragment with molecular weight 160 kDa, isolated from oncofetal FN, possess anti-inflammatory property [2, 6]. Most probably, the 165 kDa fibronectin fragment in uterine secretions from pregnant pigs, and its increased level during period of maternal recognition of pregnancy (Day 15) was associated with the protection of embryo from maternal immune cells.

It is not investigated how different fibronectin isoforms and fragments affect differentiation, proliferation and migration of cells of the maternal-fetal interface. It was suggested that alternative splicing of fibronectin molecule be able to alter its association with other matrix proteins or cellular receptors. On the other hand, the native fibronectin molecule is not able to induce secretion of proteolytic enzymes, and to affect cell migration. On the basis of these results it was suggested, that fibronectin fragments lead to induction of new intracellular signals in trophoctoderm and endometrium, altering their proliferation, differentiation and migration.

**REFERENCES**

[1] Bowen JA, Burghardt RC., Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals, *Semin. Cell. Develop. Biol.* (2000) 11: 93-104.

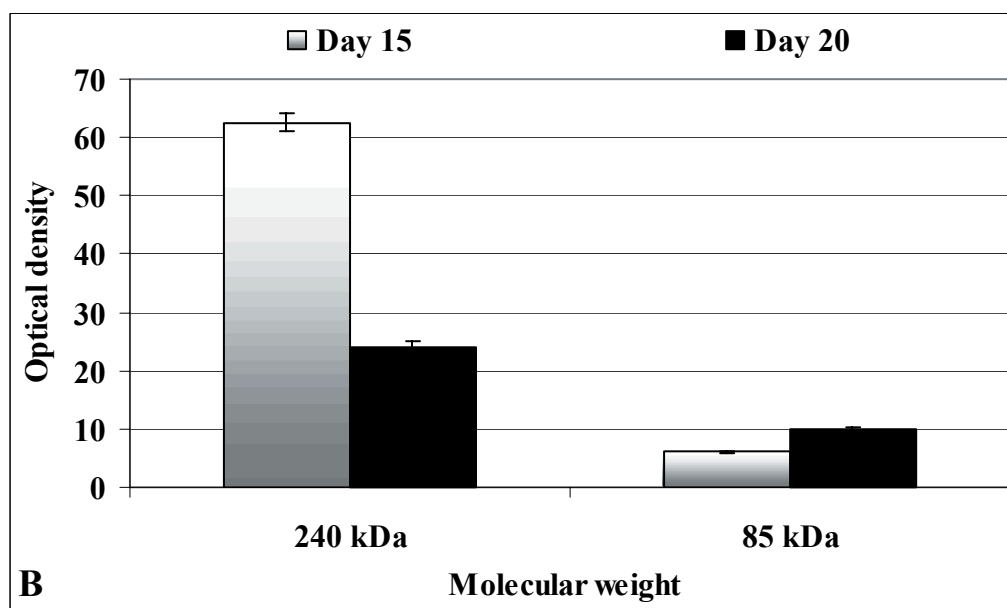


Fig.2. Western Blot for detection of cellular fibronectin in native uterine secretions from Days 10, 15 and 20 of pregnancy (A) and densitometry analysis of the specific bands (B). M-molecular weight marker.

Фиг.2. Имуноблот за доказване на клетъчен фибронектин в нативни маточни секрети от 10-ти, 15-ти и 20-ти ден от бременността (A) и денситометричен анализ на специфичните ивици (B). М-молекулен маркер.

- [2] Guller S., Ma Y., Raju U., Kadner S., Thung SF., Colasacco L., Malek A., Schneider H., Release of Oncofetal Fibronectin from Human Placenta, *Placenta* (2003) 24(8-9): 843 – 850.
- [3] Hynes RO., YAMADA KM., Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins, *J. Cell Biol.* (1982) 95: 369-377.
- [4] Kornblihtt AR., Pesce CG., Alonso CR., Cramer P., Srebrow A., Werbajh S., Muro AF., The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies, *FASEB J.* (1996) 10: 248-257.
- [5] Köttgen E., Hell B., Müller C., Kainer .F, Tauber R., Developmental changes in the glycosylation and binding properties of human fibronectins, *Biol.Chem. Hoppe-Seyler* (1989) 370: 1285-1294.
- [6] Okamura Y., Watari M., Jerud ES., Young DW., Ishizaka ST., Rose J., Chow JC., Strauss JF III., The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4, *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 10229–10233.
- [7] Rashev P., Georgieva R., Rees D., Expression of  $\alpha 5\beta 1$  Integrin and Fibronectin during Early Pregnancy in Pigs, *Folia Biologica* (2005) 51(5): 121-125.
- [8] Tuo WB., Bazer FW., Expression of onco-fetal fibronectin in porcine conceptuses and uterus throughout gestation. *Reprod. Fertil. Dev.* (1996) 8: 1996, 1207–1213.
- [9] Zetter BR, Brightman SE, Cell motility and the extracellular matrix, *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1990) 2:850-856.
- [10] Zhu BC., Fisher SF., Pande H., Calaycay J., Shively JE., Laine RA., Human placental (fetal) fibronectin: increased glycosylation and higher protease resistance than plasma fibronectin. Presence of polylysosamine glycopeptides and properties of a 44-kilodalton chymotryptic collagen-binding domain: difference from human plasma fibronectin, *J. Biol. Chem.* (1984) 259(6): 3962–3970.

