



Mecanismo de fusión de membranas durante la exocitosis de gránulos corticales en ovocito de ratón.

Molecular mechanism of membrane fusion during cortical granule exocytosis in mouse egg.

Director: MICHAUT, Marcela Alejandra

Correo Electrónico: mmichaut@fcm.uncu.edu.ar

Co-Director: -

Integrantes: CAPPÀ, Andrea Isabel; BELLO, Oscar Daniel; RODRIGUEZ PEÑA, Marcelo Javier; GALLO, Giovanna Lucrecia; DE PAOLA, María Matilde; ZANETTI, María Natalia.

Palabras Clave: gránulos corticales, exocitosis, ovocitos, fusión de membranas, reacción cortical, fecundación

Resumen Técnico: Tanto el ovocito como el espermatozoide sufren exocitosis reguladas a distintos tiempos durante su encuentro. El espermatozoide libera su contenido acrosomal durante la reacción acrosomal para fecundar el ovocito, y el ovocito libera el contenido de los gránulos corticales durante la reacción cortical para bloquear la poliespermia. Teniendo en cuenta que la fusión de gránulos corticales (GC) constituye el bloqueo primario a la penetración poliespérmica, este proyecto propone identificar y estudiar las proteínas involucradas en exocitosis en otros tipos celulares – tales como SNAREs, rabs, NSF, alpha-SNAP, sinaptotagminas, etc.- en la fusión de los GC con la membrana plasmática que tiene lugar durante la reacción cortical. Nuestra hipótesis es que el mecanismo molecular de la fusión de membranas durante la exocitosis es un mecanismo universal que comparte la maquinaria proteica básica con otras exocitosis conocidas tales como la exocitosis neuronal y acrosomal. Este proyecto propone identificar proteínas aún no identificadas por western blot y estudiar la localización de las mismas por microscopía de fluorescencia confocal utilizando anticuerpos específicos. Asimismo, propone estudiar la expresión de las proteínas identificadas durante los distintos estadios de maduración del ovocito de ratón. Para estudiar la función de las proteínas identificadas se microinyectarán ovocitos de ratón con RNAm o proteínas recombinantes salvajes y mutadas. Se microinyectarán también anticuerpos inactivantes y toxinas como las botulínicas y tetánicas que cortan diversos SNAREs. Luego de activar partenogenéticamente los ovocitos, se analizará el efecto de los diferentes tratamientos en la exocitosis de los GC por microscopía confocal de fluorescencia utilizando la lectina lens culinaris que se une específicamente al contenido de los GC. Los GC serán cuantificados utilizando el programa Image J. La microinyección de ovocitos inmaduros y maduros de ratón es un sistema muy versátil que permitirá ensayar en forma aguda todo tipo de compuestos impermeables a membranas en una célula única y viva. Si bien se sabe que la fusión de los GC con la membrana plasmática es inducida por el aumento del calcio intracelular, la importancia de este proyecto radica en que permitirá caracterizar el mecanismo que regula esta fusión de membranas y proveerá nueva información científica básica

potencialmente importante en el área de la clínica reproductiva humana y animal.

Keywords: *cortical granules, exocytosis, oocyte, membrane fusion, cortical reaction, fertilization*

Summary: *Both the oocyte and the sperm suffer regulated exocytosis at different times during their encounter. The sperm releases its acrosomal content during the acrosome reaction to fertilize the oocyte and the oocyte releases the contents of cortical granules during the cortical reaction to block polyspermy. Considering that the fusion of cortical granules (CG) is the primary block to polyspermic penetration, this project aims to identify and study the proteins involved in exocytosis in other cell types - such as SNARE, rabs, NSF, alpha-SNAP, sinaptotagminas, etc.- in the fusion of CG with the plasma membrane that occurs during cortical reaction. Our hypothesis is that the molecular mechanism of membrane fusion during exocytosis is a universal mechanism that shares the basic protein machinery with other known exocytosis such as neuronal and acrosomal exocytosis. This project aims to identify proteins not yet identified by western blot and to analyze their localization by confocal fluorescence microscopy using specific antibodies. It also proposes to study the expression of the identified proteins during mouse oocyte maturation. To analyze the function of the identified proteins, mouse metaphase II eggs will be microinjected with RNAm, wild type and mutated recombinant proteins, chimeras between proteins and protein domains. They will also be microinjected with inactivating antibodies and toxins such as botulinum and tetanus that cut various SNAREs. After parthenogenetic activation, CG exocytosis will be analyzed by confocal fluorescence microscopy using lens culinaris lectin that binds specifically to the content of the CG. CG will be quantified using the program Image J. Microinjection of mature and immature mouse oocytes is a versatile system that will allow testing impermeable compound in a unique and alive cell. Although it is known that CG fusion with the plasma membrane is induced by increasing intracellular calcium, the importance of this project is that it will characterize the mechanism that regulates this membrane fusion and provide new basic scientific information in the area of human and animal reproduction.*