

RESUMEN

Los ovocitos ováricos totalmente crecidos de anfibios están fisiológicamente arrestados en la profase de la primera división meiótica. La progesterona, a través de un proceso denominado maduración, induce el desarresto ovocitario que se traduce en la ruptura de la vesícula germinal (GVBD).

Se acepta generalmente que la hormona desencadena la maduración por un mecanismo no genómico que involucra la inhibición de la adenilil ciclasa y la disminución del AMPc intracelular a través de la unión a un receptor ligado a la membrana plasmática. Como respuesta al estímulo hormonal se sintetiza la oncoproteína c-Mos cuya actividad biológica está mediada por la cascada de las proteínas activadas por mitógenos (MAPK). En conjunto con la activación de reguladores del ciclo celular estos caminos convergen en la activación del factor promotor de la maduración (MPF).

Los rafts de membrana, en particular la estructura invaginada de las *caveolae*, podrían proporcionar un ambiente óptimo para la interacción entre la progesterona y el ovocito en la maduración meiótica. Sin embargo, las bases moleculares y los mecanismos de la posible participación de los microdominios caveolares en la transducción de señales de la maduración aún no han sido completamente dilucidados.

En este trabajo de tesis se analizó el efecto de la maduración inducida por la progesterona sobre el contenido y la composición de los lípidos neutros y polares de

las plaquetas vitelinas, organelas del ovocito de *Bufo arenarum* que cumplen un rol importante durante la embriogénesis. Se realizó un análisis cuantitativo de los lípidos y de las proteínas de las membranas de baja densidad aisladas de ovocitos ováricos y la identificación bioquímica y el estudio biofísico de los microdominios tipo-caveolares, como un requisito para comprender mejor sus funciones regulatorias. La metil- β -ciclodextrina (M β CD) se usó como herramienta para modular el colesterol celular con el fin de evaluar la participación de los rafts de membrana en la maduración inducida por progesterona y en la inducida por ceramida, disparador de la reiniciación de la meiosis en otras especies de anfibios. En particular, se indagó la vía de las MAPK en la señalización de la maduración meiótica.

Se demostró que los lípidos de las plaquetas vitelinas están involucrados activamente en la reiniciación del ciclo meiótico lo que apoya la hipótesis de un rol dinámico de estas organelas. La maduración produjo una disminución en el contenido total de fosfolípidos fundamentalmente por la caída de fosfatidilcolina, un fosfolípido considerado esencial para que se complete la meiosis. Los principales cambios en el perfil de ácidos grasos se observaron en esfingomielina, en ácido fosfatídico y en los diacilgliceroles, lípidos bioactivos implicados en caminos de señalización celular. El tratamiento hormonal disminuyó el nivel de la esfingomielina plaquetaria lo que podría vincularse con su rol como precursor de ceramidas.

Se pusieron a punto distintos métodos de aislamiento de microdominios de membrana y se logró obtener una fracción de *membranas livianas* en ausencia de

detergentes. Se determinó que dicha fracción deriva de la membrana plasmática, está enriquecida en colesterol y en el gangliósido GM1 y presenta un nivel importante de esfingomielina. Las *membranas livianas* muestran un enriquecimiento en una caveolina de 21 kDa indicando la existencia de estructuras tipo-caveolares en el ovocito de *Bufo arenarum*. Además, están asociadas significativamente con las moléculas señales, c-Src y H-Ras. En estas membranas se encontró una banda proteica que, por espectrometría de masa, se identificó como la cadena pesada de la miosina no muscular planteando la posibilidad de una relación con el citoesqueleto.

La depleción de colesterol, mediada por M β CD, afectó principalmente el nivel de colesterol de las *membranas livianas* alterando el orden lipídico y la localización de los marcadores moleculares de rafts, caveolina, c-Src y GM1, e inhibiendo la maduración de manera dosis-dependiente lo que sugiere que estos microdominios de membrana están involucrados en la inducción hormonal. La repleción de colesterol indicó una recuperación de la habilidad para madurar de los ovocitos tratados especialmente en la concentración de M β CD 25 mM en la cual la reversibilidad fue cercana al valor control.

Se demostró que la ceramida es un inductor efectivo de la maduración que afecta la distribución de los marcadores moleculares de rafts en las fracciones de membrana. Por el contrario, la progesterona no parece afectar la integridad de los microdominios de membrana.

En concordancia con la inhibición de la GVBD, el tratamiento con M β CD retardó la fosforilación en tirosinas y la activación de la p42 MAPK en la maduración

inducida por progesterona. La presencia de los marcadores de rafts, caveolina, GM1, c-Src y H-Ras, y el hallazgo de moléculas señales de la cascada de las MAPK funcionalmente asociadas a las *membranas livianas*, sugieren que esta fracción enriquecida en microdominios tipo-caveolares puede, en parte, recrear eficazmente la señalización de la maduración.

ABSTRACT

Amphibian full-grown ovarian oocytes are physiologically arrested at the first meiotic prophase. Progesterone, through a mechanism called maturation, induces meiotic resumption represented by germinal vesicle breakdown (GVBD).

It is generally accepted that progesterone hormone triggers maturation through a nongenomic mechanism that involves the inhibition of adenylyl cyclase and the reduction of intracellular cAMP by association with a plasma membrane receptor. As a response to the hormonal stimuli oncoprotein c-Mos is synthesized and its biological activity is mediated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade. Together with the activation of cell cycle regulators, both pathways converge in the activation of the M-phase promoting factor (MPF).

Membrane rafts, particularly the invaginated structure of *caveolae*, seems to provide an optimal environment for hormone binding leading to meiotic maturation. However, the molecular bases and the mechanisms of the possible caveolar microdomain involvement in maturation signal transduction pathways have not been fully elucidated to date.

In the present thesis, the effect of progesterone-induced maturation on the quantity and composition of neutral and polar lipids of yolk platelets, organelles from *Bufo arenarum* oocyte that play an important role during embryogenesis, were analyzed. A quantitative analysis of lipids and proteins of low-density membranes isolated from ovarian oocytes and the biochemical identification and a biophysical

study of *caveolae*-like microdomains were performed as a requisite to further understand how these domains carry out their regulatory functions. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) was thus used for cellular cholesterol modulation in order to assess the membrane raft involvement in maturation induced by progesterone and by ceramide, the latter being trigger of meiosis reinitiation in other amphibian species.

We demonstrated that lipids from yolk platelets are actively involved in the resumption of the meiotic cell cycle supporting the hypothesis of a dynamic role for these organelles. Phospholipid content decreased mainly as a result of a fall at the level of phosphatidylcholine, a phospholipid considered crucial for the completion of meiosis. Fatty acid composition registered significant changes in sphingomyelin, phosphatidic acid and diacylglycerols, bioactive lipids involved in cellular signaling pathways. Hormonal treatment induced a decrease at sphingomyelin level that could be related to its role as ceramide precursor.

Different isolation methods were assayed to obtain membrane microdomains and a light membrane fraction was obtained in the absence of detergents. *Light membranes* derive from the plasma membrane, show an enrichment in cholesterol and GM1 ganglioside, and evidence an important level of sphingomyelin. The finding of a 21 kDa caveolin enriched in *light membranes* indicates the presence of *caveolae*-like structures in *Bufo arenarum* oocytes. In support of this finding, signaling molecules as c-Src and H-Ras are significantly associated to this fraction. A protein band was

found in these membranes and it was identified as a non-muscle myosin heavy chain by mass spectrometry suggesting possible membrane-cytoskeleton interactions.

Cholesterol depletion mediated by M β CD affected mainly *light membranes* cholesterol level disturbing lipid order and localization of rafts markers, caveolin, c-Src, and GM1 and inhibiting maturation in a dose-dependent manner, thus suggesting that these membrane microdomains are involved in hormonal induction. Cholesterol repletion showed a recovery of the ability of M β CD-treated oocytes to mature, particularly at the 25 mM concentration at which reversibility was close to control level.

We also demonstrated that ceramide is an effective inducer of maturation that affects the distribution of raft markers among membrane fractions. On the contrary, progesterone seems not to affect membrane microdomain integrity.

In agreement with GVBD inhibition, M β CD treatment delayed tyrosine phosphorylation and p42 MAPK activation in progesterone-induced maturation. The presence of the rafts markers, caveolin, GM1, c-Src, and H-Ras, and the finding of signaling molecules from the MAPK cascade functionally associated to *light membranes* suggest that this fraction enriched in *caveolae*-like microdomains could efficiently recreate, at least in part, maturation signaling.