

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ МОЗГА BASP1 И GAP-43 В ООЦИТАХ И ЗИГОТАХ МЫШИ

© 2017 г. Ф. М. Захарова^{a, b, *}, В. В. Захаров^{c, d, e}

^aИнститут экспериментальной медицины
197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д. 12

^bСанкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

^cПетербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ “Курчатовский институт”
188300, Гатчина, Ленинградская обл.

^dСанкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
195251, Санкт-Петербурге, Политехническая ул., д. 29

^eИнститут высокомолекулярных соединений РАН
199004, Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., д. 31

*E-mail: fzakharova@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2016 г.

Сходство кальций-зависимых функциональных систем ооцитов и аксонных окончаний нейронов стало причиной нашего интереса к изучению вопроса о присутствии в ооцитах белков BASP1 и GAP-43, характеризующихся повышенной экспрессией в нейронах мозга позвоночных животных и человека. С помощью иммуноцитохимических методов и конфокальной микроскопии мы впервые показали, что эти белки присутствуют в зрелых ооцитах и зиготах мыши. В ооцитах белок BASP1 локализован в районе плазматической мембраны и актинового кортекса, что также характерно для этого белка в нейронах и других типах клеток. Белок GAP-43, который обычно рассматривается как постмитотический мембранный маркер нервных клеток, в ооцитах связан с микротрубочками мейотического веретена метафазы II (МII). GAP-43 колокализован с γ -тубулином на полюсах веретена (центросомах) и дополнительных центрах организации микротрубочек в цитоплазме. С помощью антител к фосфорилированной по остатку Ser41 форме белка GAP-43 мы показали, что GAP-43 в ооцитах фосфорилируется протеинкиназой С. Присутствие белков BASP1 и GAP-43 в ооците также подтверждено с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга. Микроинъекция BASP1 (но не GAP-43) в цитоплазму МII-ооцитов мыши стимулировала выход ооцитов из фазы мейоза и дальнейшее партеногенетическое развитие эмбрионов, что свидетельствует о возможном участии BASP1 (как регулятора локальной концентрации полифосфоинозитидов в плазматической мембране) в процессе активации ооцитов при оплодотворении. Сходство выявленного нами специфического расположения GAP-43 на веретене и центросомах ооцита с недавно обнаруженной локализацией этого белка на центросомах асимметрично делящихся нейрональных предшественников позволяет высказать предположение об участии GAP-43 в процессах, связанных с ориентацией веретена и поляризацией ооцитов.

Ключевые слова: ооциты мыши, активация ооцитов, мейотическое веретено, центросомы, актиновый кортекс, протеинкиназа С, BASP1, GAP-43

DOI: 10.7868/S0475145017030120

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время появились данные о том, что некоторые сигнальные белковые каскады, считавшиеся исключительно нейрональными, функционируют в клетках других типов. Сходные функциональные и морфологические особенности, основанные на узкоспецифической экспрессии нейрональных белков, были обнаружены, например, у центроцитов лимфоидных фолликулов (Clatworthy et al., 2008) и подоцитов почки (Weide and Huber, 2009). Ооциты и нейроны являются

высокоспециализированными клетками с дивергентными функциями, и морфологическое сходство между ними отсутствует. Однако на молекулярном уровне можно обнаружить сходство присущих этим клеткам систем кальциевой сигнализации и быстрого экзоцитоза. Кальциевые сигналы играют центральную роль в функционировании ооцитов и нейронов. Активация ооцита при оплодотворении у млекопитающих запускается волной кальциевых осцилляций — колебаний внутриклеточной концентрации ионов кальция, распространя-

ющихся от места слияния со сперматозоидом и длящихся в течение нескольких часов (Miyazaki et al., 1993). Возникновение кальциевых осцилляций обусловлено привнесением со сперматозоидом особой формы фосфолипазы C – *PLC ζ* , не требующей высокой концентрации ионов кальция для активации (Fujimoto et al., 2004; Miyazaki and Ito, 2006). *PLC ζ* расщепляет мембранный фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (*PIP $_2$*) с образованием диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата, открывающего кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума. В усилении кальциевых волн участвуют эндогенные формы *PLC* ооцита. Они количественно преобладают над *PLC ζ* и обеспечивают более масштабный гидролиз *PIP $_2$* при условии начального повышения концентрации ионов кальция. Так, например, в случае активации ооцитов мыши была показана важная роль эндогенной *PLC β 1* (Igarashi et al., 2007). Важную роль в поддержании кальциевых осцилляций в ооцитах млекопитающих играют “классические” формы протеинкиназы C (*PKC*), активирующиеся ионами кальция и диацилглицерином. *PKC α* и *PKC γ* в ответ на каждый всплеск внутриклеточной концентрации ионов кальция перемещаются из цитоплазмы ооцита к плазматической мембране, где активируют деполуправляемые кальциевые каналы, восполняющие дефицит ионов кальция во внутриклеточных хранилищах за счет входа кальция из внеклеточной среды (Halet et al., 2004; Madgwick et al., 2005). Кальциевые осцилляции в ооците через посредство кальмодулина активируют Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (*CaMKII*). Это приводит к инактивации фактора созревания *MPF* и снижению активности *MAPK*-протеинкиназ, что влечет за собой выход ооцита из стадии *MII* и завершение мейоза (Backs et al., 2010; Oh et al., 2011). Нейроны способны генерировать более разнообразные кальциевые сигналы, чем ооциты, в том числе кальциевые волны, запускаемые *PLC β* по аналогичному инозитолтрифосфатному механизму (Ross, 2012). Это определяет сходство ферментов и регуляторных белков ооцитов и нейронов, участвующих в преобразовании кальциевого сигнала и передаче его разнообразным эффекторам. Важная роль кальмодулина, *CaMKII* и *PKC* в регуляции нейросекреции и синаптической пластичности хорошо известна (Wang, 2008; Sun and Alkon, 2014).

Повышение концентрации ионов кальция в ооците запускает быстрый экзоцитоз кортикальных гранул, содержащих ферменты, модифицирующие оболочку ооцита (*zona pellucida*) для предотвращения полиспермии. Многие белки, участвующие в транспортировке, докинге и слиянии кортикальных гранул с плазматической мембраной ооцита аналогичны нейрональным белкам. Основную роль в процессах докинга и

слияния пузырьков в клетках обоих типов играют белки комплекса *SNARE*, первоначально изученные в нейронах (Südhof et al., 2014). В ооцитах были обнаружены основные компоненты этого комплекса – синаптобrevин (*VAMP*), синтаксин и *SNAP-25* (Ikebuchi et al., 1998; Iwahashi et al., 2003; Tsai et al., 2011). Также было показано присутствие в ооцитах белков, взаимодействующих с комплексом *SNARE* – комплексина, предотвращающего спонтанное слияние гранул с плазматической мембраной, и синаптотагмина, обеспечивающего кальциевую зависимость докинга и слияния (Leguia et al., 2006; Tsai et al., 2011; Zhu et al., 2012). В то время как большинство *SNARE*-белков и синаптотагмин участвуют в экзоцитозе в различных типах клеток, *SNAP-25* и комплексин присутствуют практически исключительно в нейронах мозга. Также в ооцитах мыши были обнаружены специфические для нейронов малая ГТФаза *Rab3A* и ее эффектор *Rabphilin-3A*, участвующие в транспортировке синаптических пузырьков и кортикальных гранул к плазматической мембране (Masumoto et al., 1998; Wang et al., 2016). Также было продемонстрировано присутствие в актиновом кортексе ооцитов ранее изученного в нейронах белка-субстрата *PKC* – *MARCKS* (Eliyahu et al., 2005). В нейронах и нейроэндокринных клетках было показано, что *MARCKS* обладает способностью поперечно сшивать актиновые филаменты, что обеспечивает создание физического барьера, препятствующего перемещению везикул с нейромедиатором или гормоном к плазматической мембране (Vaughan et al., 1998; Trifaro et al., 2002). Преодоление этого барьера при экзоцитозе обеспечивается активацией *PKC*, фосфорилирующей белок *MARCKS*, который при этом утрачивает способность сшивать F-актин. Аналогичная функция белка *MARCKS* была продемонстрирована при экзоцитозе кортикальных гранул в ооците (Eliyahu et al., 2006; Tsaadon et al., 2008).

Сходство кальций-зависимых систем ооцитов и пресинаптических окончаний нейронов стало причиной нашего интереса к изучению вопроса о присутствии в ооцитах связанных с плазматической мембраной белков-субстратов *PKC* – *VASP1* (*Brain Acid-Soluble Protein 1*) и *GAP-43* (*Growth-Associated Protein 43*), участвующих в регуляции специфических процессов в аксонных окончаниях. *VASP1* и *GAP-43* являются кислыми белками с массой 23–25 кДа, первоначально обнаруженными в нейронах мозга позвоночных животных и человека. Роль белков *VASP1* и *GAP-43* в нейронах связывают с участием в навигации конусов роста аксонов и в синаптической пластичности зрелых нейронов (в частности, в контроле нейросекреции) (Mosevitsky et al., 1994; Benowitz and Routtenberg, 1997; Oestreicher et al., 1997; Mosevitsky, 2005). *VASP1* и *GAP-43* локализованы на

внутренней поверхности плазматической мембраны аксонных окончаний. BASP1 модифицирован по N-концу остатком миристиновой кислоты, а остатки Cys3 и Cys4 белка GAP-43 могут связываться с остатками пальмитиновой кислоты, которые участвуют в связывании белков с мембраной. Каждый из белков содержит так называемый “эффекторный домен” – короткий положительно-заряженный участок, способный связывать кальмодулин или кислые фосфолипиды и содержащий остаток серина (Ser5 в BASP1, Ser41 в GAP-43), фосфорилируемый PKC (Wiederkehr et al., 1997; Laux et al., 2000). С помощью эффекторного домена BASP1 и GAP-43 способны кластеризовать молекулы PIP₂ во внутреннем слое плазматической мембраны, причем данная функция находится под контролем PKC и кальмодулина (Laux et al., 2000; Caroni, 2001). Кластеризация PIP₂ обеспечивает регуляцию локальной динамики актинового скелета и докинга синаптических пузырьков при освобождении нейромедиатора (Janmey and Lindberg, 2004; Hammond and Schiavo, 2007; Balla et al., 2012). GAP-43 долгое время считался нейроспецифическим, однако он обнаружен также в глиальных и хромаффинных клетках (Oestreicher et al., 1997). BASP1 распространен в организме гораздо более широко, но его наибольшая экспрессия наблюдается в мозге (Mosevitsky et al., 1997). Внутриклеточные партнеры, с которыми эти белки взаимодействуют в нейронах – PKC, кальмодулин, актин и PIP₂ – также присутствуют в ооците и играют там важную роль. BASP1 и GAP-43 являются полностью неструктурированными (нативно-развернутыми) белками, то есть не имеют определенной третичной структуры (Forsova and Zakharov, 2016). Для таких белков характерны разнообразие молекулярных взаимодействий и полифункциональность, что принято обозначать термином “муллайтинг” (Tompa et al., 2005). К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о том, что белки BASP1 и GAP-43 выполняют важные, и притом не обязательно одинаковые, функции в различных типах клеток. Очень близкий BASP1 и GAP-43 по свойствам неструктурированный белок MARCKS уже упоминался выше как важный участник экзоцитоза в нейронах и ооцитах. Недавно BASP1 и MARCKS были обнаружены в ранних сперматидеях и зрелых сперматозоидах крысы, где они предположительно могут участвовать в Ca²⁺/кальмодулин-зависимых процессах (Mosevitsky et al., 2012). В данной работе было впервые проведено исследование вопроса о присутствии белков BASP1 и GAP-43 в ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Для экспериментов использовали мышей 6–10 недельного возраста (гибриды F1 линий C57BL/СВА). Животных приобретали в питомнике лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область).

Гормональная стимуляция мышей и выделение ооцитов

Мышей стимулировали последовательным интраперитонеальным введением 10 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы и 10 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (“Intervet International B.V.”, Нидерланды) с интервалом 40–46 ч. Для получения зигот самок после введения ХГЧ подсаживали к самцам на ночь. Через 13–16 ч самок подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Комплексы ооцитов (или зигот) с кумулюсными клетками извлекали из яйцевода мыши, после чего кумулюсные клетки удаляли с помощью обработки гиалуронидазой (“Sigma-Aldrich”, США) (300 ед./мл, 1 мин).

Антитела

В работе использовали поликлональные антитела к белку BASP1 ab79349 (“Abcam”, США) и AB9304 (“Millipore”, США), к белку GAP-43 AB5220 (“Millipore”, США), к белку pS41-GAP-43 AB5401 (“Millipore”, США) и sc-17109 (“Santa Cruz Biotechnology”, США), моноклональные антитела к γ -тубулину T6557 (“Sigma-Aldrich”, США).

Иммуноцитохимическое окрашивание

Оболочку *zona pellucida* ооцитов и зигот удаляли с помощью короткой инкубации (2–3 мин) в кислом растворе Тироде (pH 2.5), после чего проводили фиксацию в 4%-ном растворе формальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 60 минут при комнатной температуре. Пермеабиллизацию и блокирование клеток проводили в PBS, содержащем 0.2% Тритона X-100, 0.1% сапонина и 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в течение ночи при 4°C. Иммуноокрашивание проводили в PBS с добавлением 5% BSA. Разведение первичных антител составляло 1 : 200–1 : 400, вторичных антител – 1 : 500. Использовали вторичные антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa-488, и вторичные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с Alexa-568 (“Invitrogen Corporation”, США). Окраску ДНК проводили в растворе DAPI (“Sigma-Aldrich”, США) с концентрацией 1 мкг/мл в PBS в течение 3 минут. Окраску F-актина проводили с использова-

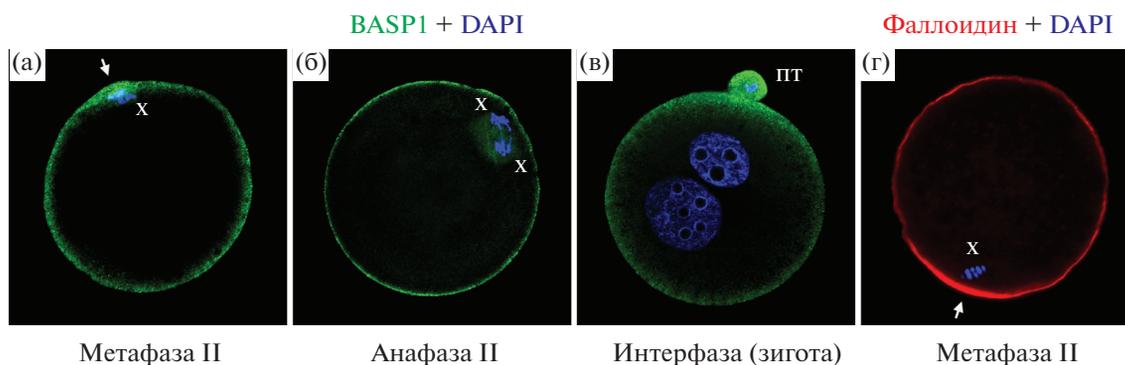


Рис. 1. Локализация белка *VASP1* в ооцитах и зиготах мыши. (а) – МII-ооцит; (б) – ооцит на стадии анафазы II; (в) – зигота на стадии интерфазы. Окраска получена с использованием поликлональных антител к белку *VASP1* (ab79349, зеленый). ДНК окрашена DAPI (синий). (г) – МII-ооцит; F-актин окрашен TRITC-фаллоидином (красный). Стрелкой указан актиновый кэп ооцита; пт – второе полярное тельце; х – хромосомы.

нием TRITC-фаллоидина (“Sigma-Aldrich”, США) (10 мкМ, 20 мин). Полученные препараты анализировали с помощью конфокальных микроскопов Leica TCS SP5 MP (“Leica Microsystems GmbH”, Германия) и Zeiss LSM Meta 510 (“Carl Zeiss AG”, Германия).

Электрофорез и вестерн-блоттинг

МII-ооциты мыши лизировали в буфере, содержащем SDS (2%) и дитиотрейтол (5 мМ), и подвергали электрофорезу в системе Лэммли в 12%-ном геле. На одну дорожку геля использовали 125 ооцитов. Для контроля использовали фракцию синапсом, полученных из мозга мыши как описано ранее (Zakharov and Mosevitsky, 2001). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, блокировали в 5%-ном молоке в PBS и окрашивали с использованием антител к белкам *VASP1* (ab79349) и *GAP-43* (AB5220) при разведении 1 : 1000 и вторичных антител к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (“Jackson ImmunoResearch”, США), при разведении 1 : 10000 при помощи хемилюминесцентной системы детекции CPS-3 (“Sigma-Aldrich”, США).

Выделение и очистка белков *VASP1* и *GAP-43*

Белки *VASP1* и *GAP-43* были выделены из мозга коровы с помощью экстракции хлороформом и 3%-ной хлорной кислотой и очищены с использованием препаративного электрофореза и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии как описано ранее (Zakharov and Mosevitsky, 2007; Zakharov and Mosevitsky, 2010).

Микроинъекция белков в ооциты

Микроинъекцию белков *VASP1* и *GAP-43* коровы в МII-ооциты проводили в среде НТ6 при 16°C на микроманипуляторе “Leitz” (Германия) через 15 ч после введения мышам ХГЧ. Раствор белка (2 мг/мл) в 10 мМ HEPES-NaOH pH 7.2, 0.1 М KCl объемом 2–5 пл инъецировали в цитоплазму ооцита. Инъецированные ооциты помещали на 1 час в среду НТ6 с цитохалазином В (5 мкг/мл) для предотвращения выделения второго полярного тельца и сохранения диплоидного генома ооцитов при партеногенетической активации. Контрольные ооциты выдерживали в аналогичных условиях. После манипуляций ооциты переносили в среду EmbryoAssist (“Origio”, Дания) и инкубировали при температуре 37°C в газовой смеси CO₂/воздух (5 : 95) в течение 5 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью иммуоцитохимического окрашивания с использованием поликлональных антител к белку *VASP1* ab79349 мы показали, что данный белок присутствует в МII-ооцитах и зиготах мыши. При этом *VASP1* локализован вдоль плазматической мембраны и в кортикальной области цитоплазмы (рис. 1а–1в). Для сравнения на рис. 1г показана окраска актинового кортекса МII-ооцита с помощью TRITC-фаллоидина. Кроме этого, в МII-ооците *VASP1* обнаруживается в цитоплазме в области метафазного веретена (рис. 1а), а после оплодотворения ооцита – в области анафазного веретена (рис. 1б). При окрашивании зигот *VASP1* обнаруживается также во втором полярном тельце (рис. 1в). Аналогичные результаты были получены при окрашивании ооцитов и зигот с помощью других поликлональных антител к белку *VASP1* – AB9304 (данные не показаны).

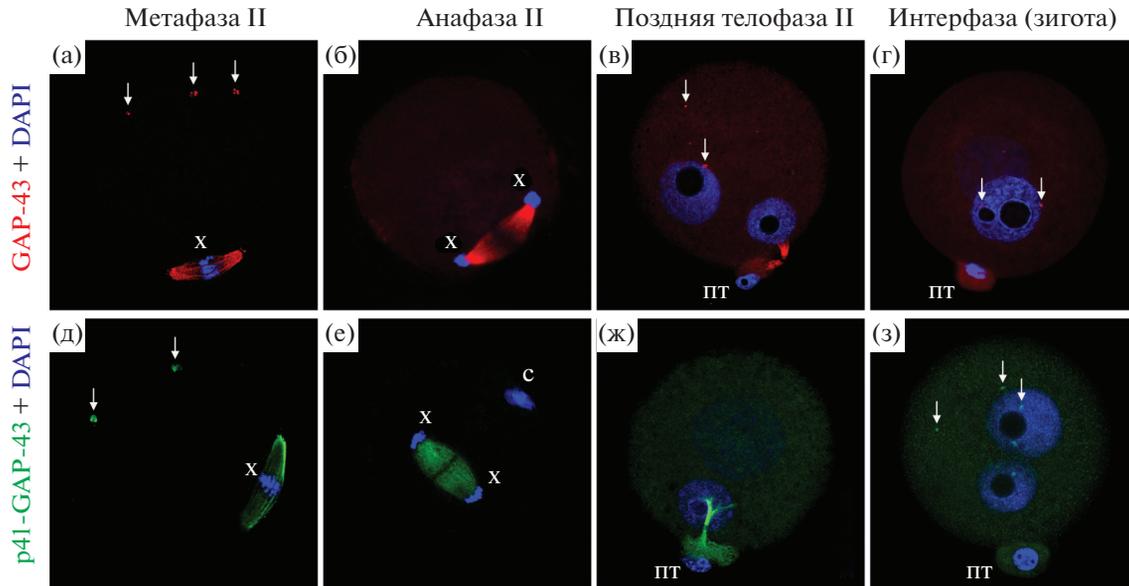


Рис. 2. Локализация белка GAP-43 (а–г) и его фосфорилированной формы pS41-GAP-43 (д–з) в ооцитах и зиготах мыши. (а, д) – МII-ооциты; (б, е) – ооциты на стадии анафазы II; (в, ж) – ооциты на стадии поздней телофазы II; (г, з) – зигота на стадии интерфазы. Окраска получена с использованием поликлональных антител к белкам GAP-43 (AB5220, красный) и pS41-GAP-43 (AB5401, зеленый). ДНК окрашена DAPI (синий). Стрелками указаны ЦОМТ; пт – второе полярное тельце; с – сперматозоид; х – хромосомы.

С использованием поликлональных антител к белку GAP-43 (AB5220) мы показали, что в зрелых МII-ооцитах GAP-43 связан с микротрубочками мейотического веретена, причем более яркая окраска наблюдается на полюсах веретена (рис. 2а). Взаимодействие GAP-43 с веретеном сохраняется в оплодотворенных ооцитах после расхождения сестринских хромосом на стадии анафазы II (рис. 2б). В ходе цитокинеза, приводящего к образованию второго полярного тельца (стадия телофазы II), GAP-43 остается связанным с микротрубочками веретена, которые формируют остаточное тельце (тельце Флемминга) (рис. 2в). Аналогичные результаты были получены при использовании антител к фосфорилированной по остатку Ser41 форме белка GAP-43 (pS41-GAP-43) AB5401, что доказывает, что связанный с веретеном белок GAP-43 фосфорилирован РКС по данному остатку (рис. 2д–2ж). Помимо веретена, антитела к GAP-43 и pS41-GAP-43 окрашивают несколько ярких точечных структур, расположенных в цитоплазме ооцита (показаны стрелками на рис. 2а, 2д). В зиготах к началу интерфазы (к моменту образования двух пронуклеусов) антитела к GAP-43 дают слабое диффузное окрашивание всего объема цитоплазмы и несколько ярких точечных структур, часто ассоциированных с пронуклеусами (показаны стрелками на рис. 2г, 2з). Одинаковая картина окрашивания, получаемая при использовании двух указанных выше антител, а также еще одних антител к pS41-GAP-43 sc-17109

(данные не показаны), свидетельствует о достоверности полученных результатов.

С целью идентификации точечных структур в цитоплазме ооцитов и зигот, окрашиваемых антителами к GAP-43, мы использовали моноклональные антитела к γ -тубулину, являющемуся маркером центров организации микротрубочек (ЦОМТ). Двойное окрашивание с помощью антител к γ -тубулину и pS41-GAP-43 показывает колокализацию этих двух белков на центросомах (на полюсах веретена) и расположенных в цитоплазме точечных структурах (фокусах), являющихся дополнительными ЦОМТ (рис. 3). Наличие цитоплазматических ЦОМТ и центросом на полюсах веретена (образованных несколькими ассоциированными ЦОМТ) является характерной особенностью МII-ооцитов мыши (Schatten and Schatten, 1987; Manandhar et al., 2005). После оплодотворения, во время первой интерфазы цитоплазматические ЦОМТ, содержащие γ -тубулин и GAP-43, связываются с поверхностью пронуклеусов зиготы (рис. 3м). Таким образом, наши данные показывают взаимодействие GAP-43 со структурами, обеспечивающими нуклеацию микротрубочек – содержащих γ -тубулин ЦОМТ, а также с микротрубочками веретена.

Для подтверждения присутствия белков BASP1 и GAP-43 в ооцитах с помощью независимого подхода был использован вестерн-блоттинг. Белки МII-ооцитов мыши и используемой в качестве контроля фракции синапсом (изолированных аксонных окончаний) мозга мыши разде-

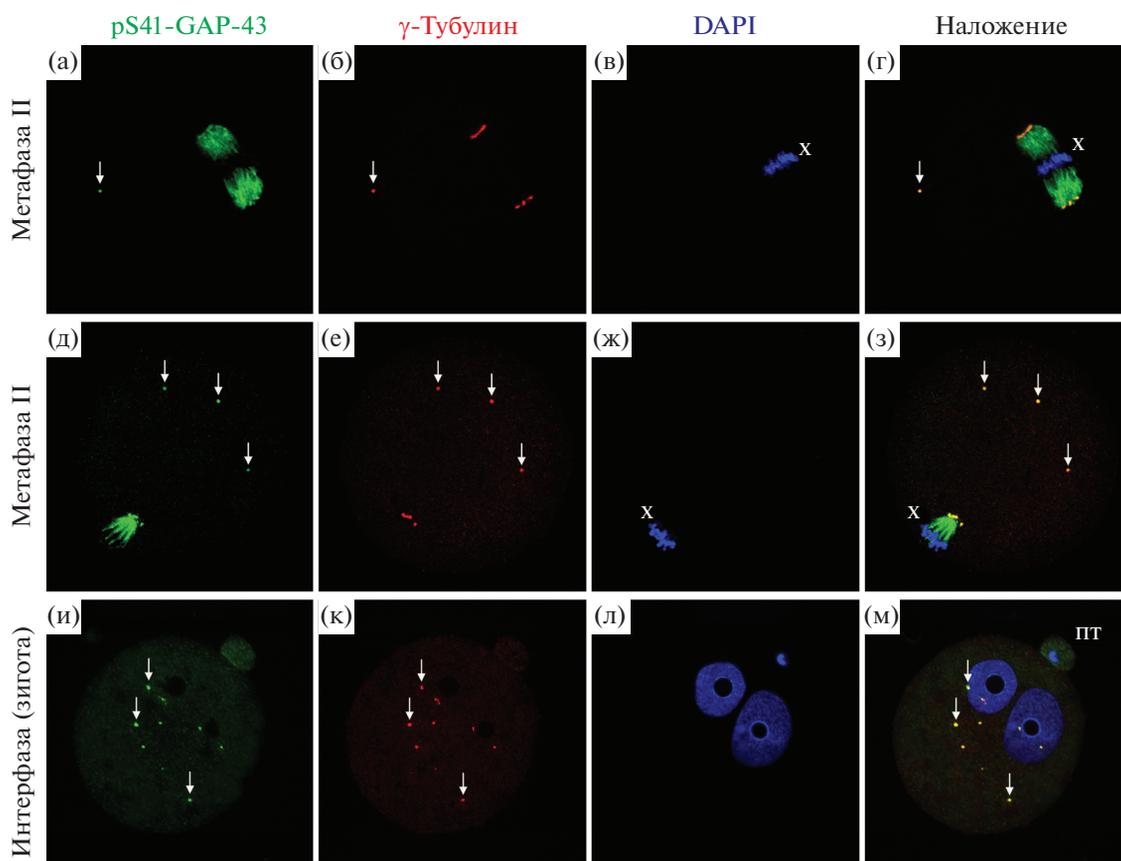


Рис. 3. Колокализация фосфорилированной формы белка GAP-43 (pS41-GAP-43) и γ -тубулина в МII-ооцитах (а–з) и зиготах мыши (и–м). Окраска получена с использованием поликлональных антител к белку pS41-GAP-43 (AB5401, зеленый) и моноклональных антител к γ -тубулину (Т6557, красный). Места совпадения окраски на pS41-GAP-43 и γ -тубулин окрашены в желтый цвет (г, з, м). ДНК окрашена DAPI (синий). Стрелками указаны ЦОМТ; пт – второе полярное тельце; х – хромосомы.

ляли с помощью SDS-электрофореза. На вестерн-блотах были выявлены белки ооцитов, реагирующие с антителами к BASP1 и GAP-43, с массой в районе 50–55 кДа, что соответствует кажущейся массе этих белков при электрофорезе в присутствии SDS. Подвижность этих белков совпала с подвижностью BASP1 и GAP-43, выделенных из мозга. Укороченная форма белка GAP-43 (GAP-43-3), являющаяся продуктом расщепления белка m-кальпаином в районе остатка Ser41 и присутствующая в нейронах (показана стрелкой на рис. 46) (Zakharov and Mosevitsky, 2007), в ооцитах выявлена не была. Полученные данные свидетельствуют о том, что белки BASP1 и GAP-43 достоверно присутствуют в ооците, и подтверждают специфичность использованных антител.

Для исследования возможной роли BASP1 и GAP-43 в активации ооцитов была проведена внутриклеточная инъекция экзогенных белков BASP1 и GAP-43, выделенных из мозга коровы, в цитоплазму МII-ооцитов мыши. Через 6–7 ч после инъекции определяли долю активировавшихся (вышедших из стадии МII) ооцитов с пронукле-

усами. Для определения потенциала полученных эмбрионов к дальнейшему развитию за ними наблюдали в течение нескольких дней и определяли количество эмбрионов, дошедших в срок до следующих стадий: двухклеточной (через сутки), четырехклеточной (через 2 сут) и бластоцисты (через 4 сут). Было показано, что уровень партеногенетической активации ооцитов после инъекции BASP1 (но не GAP-43) значительно (примерно в 2.5 раза) превышал уровень спонтанной активации ооцитов в контрольной группе (рис. 5). При этом около 6% ооцитов после инъекции BASP1 успешно развились до стадии бластоцисты к 5 дню, в то время как в контроле бластоцисты отсутствовали. Полученные данные свидетельствуют о возможной роли белка BASP1 в активации ооцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе было впервые показано присутствие белков BASP1 и GAP-43 в ооцитах и ранних эмбрионах млекопитающих. Наши результаты подтверждаются данными базы NumER (создан-

ной на основе высокопродуктивного скрининга), свидетельствующими об экспрессии генов *BASP1* и *GAP-43* (на уровне транскрипции) в ооцитах и ранних эмбрионах человека в ходе всего их преимплантационного развития (Vassena et al., 2011). Наши предварительные данные подтверждают присутствие белков *BASP1* и *GAP-43* в ранних эмбрионах мыши вплоть до стадии бластоцисты (данные не показаны).

Белок *BASP1* локализован в ооцитах преимущественно в районе плазматической мембраны и актинового кортекса. Такая локализация характерна для *BASP1* в нейронах и других типах клеток (Wiederkehr et al., 1997; Laux et al., 2000), а одним из альтернативных названий этого белка является “CAP-23” (Cortical cytoskeleton-Associated Protein 23) – “белок, связанный с кортикальным цитоскелетом” (Widmer and Caroni, 1990). Известная роль белка *BASP1* в связывании PIP_2 в плазматической мембране представляет особый интерес, поскольку гидролиз данного фосфолипида напрямую связан с генерацией кальциевых осцилляций и активацией ооцита. Кластеры PIP_2 могут также играть важную роль в регуляции динамики актинового скелета при экзоцитозе кортикальных гранул и взаимодействии мейотического веретена с актиновым кортексом, поэтому эти процессы также могут иметь отношение к функциям *BASP1* в ооците.

GAP-43 обычно рассматривается как постмитотический нейроспецифический маркер, концентрирующийся в нейритах, конусах роста и синаптических окончаниях аксонов, где он ассоциирован с плазматической мембраной (Biffo et al., 1990; Goslin et al., 1990; Dani et al., 1991). Однако существуют данные, хотя и немногочисленные, об обнаружении *GAP-43* в плюрипотентных и мультипотентных пролиферирующих клетках. *GAP-43* был выявлен в клетках эмбриональной карциномы мыши и в нейрональных предшественниках (прогениторных клетках) мыши, крысы и человека, где этот белок проявляет специфическое для нейронов взаимодействие с РКС и кальмодулином (Kanazir et al., 1996; Esdar et al., 1999; Mani et al., 2001; Shen et al., 2004; Stricker et al., 2006). В ходе митоза в клетках-предшественниках гранулярных нейронов коры мозжечка мыши pS41-*GAP-43* был обнаружен на центросомах и вокруг хроматина, где он был колокализован с F-актином и β -тубулином (Mishra et al., 2008). При отсутствии *GAP-43* (в случае мышей с нокаутом гена *GAP-43*) наблюдались нарушения хода митоза, появление множественных ЦОМТ и ошибки сегрегации хромосом. Также происходило нарушение ориентации митотического веретена, изменение плоскости деления прогениторных клеток и, как следствие, нарушение клеточной дифференцировки (Mishra et al., 2008). Было показано, что

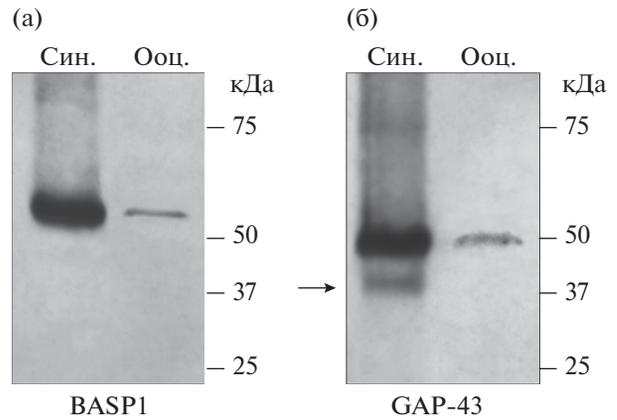


Рис. 4. Электрофорез и вестерн-блоттинг белков синнапсомы и МП-ооцитов мыши. Блоты проявлены с использованием антител к *BASP1* ab79349 (а) и *GAP-43* AB5220 (б). Син. – синнапсомы мозга мыши; Ооц. – МП-ооциты мыши. Стрелкой указан белок *GAP-43*-3. Справа указано положение маркеров молекулярной массы.

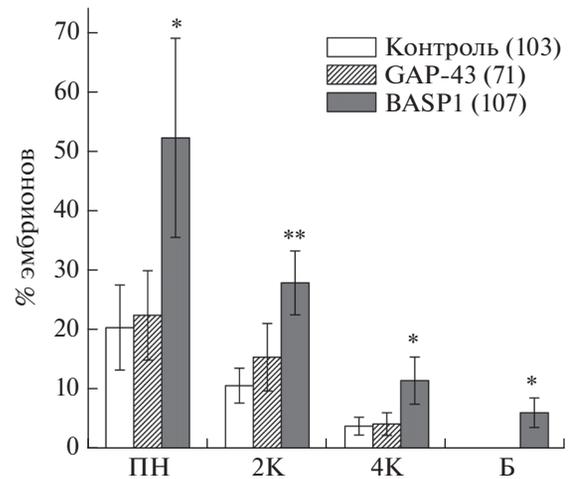


Рис. 5. Партеногенетическая активация ооцитов и развитие ранних эмбрионов мыши после инъекции белков *BASP1* и *GAP-43* в цитоплазму МП-ооцита. Стадии развития: ПН – зигота с двумя пронуклеусами; 2К – двухклеточный эмбрион; 4К – четырехклеточный эмбрион; Б – бластоциста. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение для трех независимых экспериментов. В скобках указано общее количество проанализированных ооцитов в контрольной группе и после инъекции белков *BASP1* и *GAP-43*. Отмечены статистически значимые различия относительно контроля при уровне достоверности $p < 0.05$ (*) и $p < 0.01$ (**). Достоверность различий проверяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

фосфорилирование *GAP-43* на центросоме необходимо для привлечения белков *Par6*, *Cdc42* и *IQGAP1*, стабилизирующих полимеризацию актина и микротрубочек, и обеспечивает рост нейрита (будущего аксона образовавшегося нейрона) в сопряжении с положением центросомы (как центра нуклеации микротрубочек) (Gupta et al., 2010).

Полученные нами данные показывают, что субклеточная локализация белка *GAP-43* в ооцитах существенно отличается от его локализации в дифференцированных нейронах. Однако расположение *GAP-43* на тубулин-содержащих структурах в ооците схоже с его расположением на центросоме в пролиферирующих нейрональных предшественниках. Существуют также биохимические данные, свидетельствующие о том, что *GAP-43* принципиально может связываться с микротрубочками. Осаждение рафтов антителами к *GAP-43* приводит к коседиментации β -тубулина (Nguyen et al., 2009). Также *GAP-43* способен взаимодействовать с ассоциированным с микротрубочками белком *MAP-2* (Chakravarthy et al., 2008).

BASP1 и *GAP-43* известны как одни из основных нейрональных белков-субстратов РКС. В ооцитах млекопитающих РКС выполняет модулирующую роль во многих процессах – не только в поддержании кальциевых осцилляций и экзоцитозе кортикальных гранул (как было упомянуто во *Введении*), но и в формировании мейотического веретена, образовании полярного тельца и пронуклеусов, реорганизации актинового скелета и других процессах (Kalive et al., 2010). Обнаруженное нами фосфорилирование белка *GAP-43*, связанного с микротрубочками веретена, можно объяснить тем, что ряд изоформ РКС – α , γ , δ и ζ – также связаны с веретеном МII-ооцита (Baluch et al., 2004). При этом известно, что РКС α , γ и δ (но не РКС ζ) фосфорилируют *GAP-43 in vitro* (Sheu et al., 1995; Oehrlein et al., 1996). Интересно, что активированная форма РКС δ в МII-ооцитах, как и *GAP-43*, специфически связана с полюсами веретена и цитоплазматическими ЦОМТ, а в телофазе – с микротрубочками остаточного тельца (Ma et al., 2008).

Что может обуславливать исключительную локализацию мембранного белка *GAP-43* на мейотическом веретене? *GAP-43* синтезируется на свободных рибосомах как цитозольный белок, после чего подвергается пальмитоилированию по остаткам *Cys3* и *Cys4*, что направляет его к аппарату Гольджи, откуда он транспортируется к плазматической мембране, а в поляризованных нейронах – в аксон (Skene and Virag, 1989). Мутации остатков *Cys3* и *Cys4* приводят к нарушению мембранной локализации *GAP-43*, который оказывается задержанным в цитоплазме клетки (Liu et al., 1994; Aarts et al., 1995). Транспорт *GAP-43* к тубулин-содержащим структурам ооцита, таким образом, может происходить только при отсутствии пальмитоилирования белка. Укороченная форма белка *GAP-43*, лишённая четырех N-концевых остатков (включая *Cys3* и *Cys4*), была ранее обнаружена в мозге как минорная цитоплазматическая форма белка и была названа разными авторами как *F1*, *IB-50*, *BASP2-2* и *GAP-43-2*

(Rosenthal et al., 1987; McMaster et al., 1988; Mosevitsky et al., 1994; Zakharov and Mosevitsky, 2001). Образование этой укороченной формы белка, не имеющей домена транспортировки к плазматической мембране, может быть объяснена специфическая локализация белка *GAP-43* в пролиферирующих клетках и ооцитах. К сожалению, мы не смогли непосредственно проверить данную гипотезу с помощью вестерн-блоттинга, поскольку *GAP-43* и *GAP-43-2* имеют одинаковую подвижность при SDS-электрофорезе (Mosevitsky et al., 1994). В качестве предполагаемых механизмов образования формы *GAP-43-2* рассматриваются протеолиз и альтернативная инициация трансляции мРНК *GAP-43* с кодона, соответствующего остатку Met5 (Zakharov and Mosevitsky, 2001).

Обнаруженная нами специфическая локализация белка *GAP-43* на мейотическом веретене позволяет сделать некоторые предположения о его возможной роли в ооцитах. Мы полагаем, что функция *GAP-43* в данном случае связана с регуляцией положения центросом и пространственной ориентации мейотического веретена, как это было продемонстрировано на нейрональных предшественниках. Вследствие асимметричности мейотических делений (выделение полярных тельца происходит с минимальным объемом цитоплазмы) ооциты обладают поляризацией, связанной с асимметричным положением веретена, связанного с актиновым кэпом. В поляризации ооцита участвуют малые ГТФазы семейства Rho (*Cdc42*, *Rac1*), их эффекторный белок *IQGAP1* и белки семейства *Par6* (Kloc et al., 2012). Можно предположить, что *GAP-43* участвует в асимметричной локализации данных белков поляризации, обеспечивающих взаимодействие веретена с актиновыми филаментами кортекса, как это было показано при митозе нейрональных предшественников (Gupta et al., 2010). Актиновый кэп и мейотическое веретено определяют анимальный полюс ооцита, положение которого в значительной степени определяет не только плоскость первого деления зиготы, но и оси симметрии бластоцисты и дальнейшую поляризацию эмбриона. Маркерами анимального полюса после завершения мейоза являются второе полярное тельце и остаточное тельце, содержащие белок *Par6* (Zernicka-Goetz, 2004). Локализация *GAP-43* в этих структурах может означать его участие в дальнейшей поляризации эмбриона на одно- и двухклеточной стадиях.

Таким образом, нами впервые показано присутствие “нейрональных” белков *BASP1* и *GAP-43* в ооцитах и ранних эмбрионах мыши. Повышение вероятности выхода ооцитов из стадии МII при внутриклеточной инъекции *BASP1* свидетельствует о возможной роли этого белка в активации ооцитов как регулятора локальной концентрации *PIP₂*. Выявленная нами специфиче-

ская внутриклеточная локализация GAP-43 в ооците позволяет предположить его участие в процессах, связанных с поляризацией ооцитов, а также наличие особенностей в транскрипции и трансляции гена и мРНК GAP-43 в ооцитах.

Работа выполнялась частично с использованием базы ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Санкт-Петербургского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aarts L.H., van der Linden J.A., Hage W.J., van Rozen A.J., Oestreicher A.B., Gispens W.H., Schotman P.* N-terminal cysteines essential for Golgi sorting of B-50 (GAP-43) in PC12 cells // *Neuroreport*. 1995. V. 6. P. 969–972.
- Backs J., Stein P., Backs T., Duncan F.E., Grueter C.E., McAnally J., Qi X., Schultz R.M., Olson E.N.* The gamma isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulating cell cycle resumption // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 81–86.
- Balla T., Wymann M., York J.D.* (Eds.) Phosphoinositides II: The Diverse Biological Functions. Subcellular Biochemistry. Volume 59. Springer, 2012. 460 p.
- Baluch D.P., Koeneman B.A., Hatch K.R., McGaughey R.W., Capco D.G.* PKC isotypes in post-activated and fertilized mouse eggs: association with the meiotic spindle // *Dev. Biol*. 2004. V. 274. P. 45–55.
- Benowitz L.I., Routtenberg A.* GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity // *Trends Neurosci*. 1997. V. 20. P. 84–91.
- Biffo S., Verhaagen J., Schrama L.H., Schotman P., Danho W., Margolis F.L.* B-50/GAP43 expression correlates with process outgrowth in the embryonic mouse nervous system // *Eur. J. Neurosci*. 1990. V. 2. P. 487–499.
- Caroni P.* New EMBO members’ review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts // *EMBO J*. 2001. V. 20. P. 4332–4336.
- Chakravarthy B., Rashid A., Brown L., Tessier L., Kelly J., Menard M.* Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2008. V. 371. P. 679–683.
- Clatworthy M.R., Lyons P.A., Smith K.G.* The nervous spleen: The nervous spleen // *Immunol. Cell Biol*. 2008. V. 86. P. 1–2.
- Dani J.W., Armstrong D.M., Benowitz L.I.* Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry // *Neuroscience*. 1991. V. 40. P. 277–287.
- Eliyahu E., Shtraizent N., Tsaadon A., Shalgi R.* Association between myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) translocation and cortical granule exocytosis in rat eggs // *Reproduction*. 2006. V. 131. P. 221–231.
- Eliyahu E., Tsaadon A., Shtraizent N., Shalgi R.* The involvement of protein kinase C and actin filaments in cortical granule exocytosis in the rat // *Reproduction*. 2005. V. 129. P. 161–170.
- Esdar C., Oehrlein S.A., Reinhardt S., Maelicke A., Herget T.* The protein kinase C (PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKC ζ and binds calmodulin // *Eur. J. Neurosci*. 1999. V. 11. P. 503–516.
- Forsova O.S., Zakharov V.V.* High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder // *FEBS J*. 2016. V. 283. P. 1550–1569.
- Fujimoto S., Yoshida N., Fukui T., Amanai M., Isobe T., Itagaki C., Izumi T., Perry A.C.* Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix // *Dev. Biol*. 2004. V. 274. P. 370–383.
- Goslin K., Schreyer D.J., Skene J.H., Banker G.* Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity // *J. Neurosci*. 1990. V. 10. P. 588–602.
- Gupta S.K., Meiri K.F., Mahfooz K., Bharti U., Mani S.* Coordination between extrinsic extracellular matrix cues and intrinsic responses to orient the centrosome in polarizing cerebellar granule neurons // *J. Neurosci*. 2010. V. 30. P. 2755–2766.
- Halet G., Tunwell R., Parkinson S.J., Carroll J.* Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca $^{2+}$ oscillations at fertilization in mouse eggs // *J. Cell Biol*. 2004. V. 164. P. 1033–1044.
- Hammond G.R., Schiavo G.* Polyphosphoinositol lipids: under-PPIning synaptic function in health and disease // *Dev. Neurobiol*. 2007. V. 67. P. 1232–1247.
- Igarashi H., Knott J.G., Schultz R.M., Williams C.J.* Alterations of PLC β 1 in mouse eggs change calcium oscillatory behavior following fertilization // *Dev. Biol*. 2007. V. 312. P. 321–330.
- Ikebuchi Y., Masumoto N., Matsuoka T., Yokoi T., Tahara M., Tasaka K., Miyake A., Murata Y.* SNAP-25 is essential for cortical granule exocytosis in mouse eggs // *Am. J. Physiol*. 1998. V. 274. P. 1496–1500.
- Iwahashi K., Kuji N., Fujiwara T., Tanaka H., Takahashi J., Inagaki N., Komatsu S., Yamamoto A., Yoshimura Y., Akagawa K.* Expression of the exocytotic protein syntaxin in mouse oocytes // *Reproduction*. 2003. V. 126. P. 73–81.
- Janmey P.A., Lindberg U.* Cytoskeletal regulation: rich in lipids // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2004. V. 5. P. 658–666.
- Kaliva M., Faust J.J., Koeneman B.A., Capco D.G.* Involvement of the PKC family in regulation of early development // *Mol. Reprod. Dev*. 2010. V. 77. P. 95–104.
- Kanazir S., Ruzdijic S., Vukosavic S., Ivkovic S., Milosevic A., Zecevic N., Rakic L.* GAP-43 mRNA expression in early development of human nervous system // *Brain Res. Mol. Brain Res*. 1996. V. 38. P. 145–155.
- Kloc M., Ghobrial R.M., Borsuk E., Kubiak J.Z.* Polarity and asymmetry during mouse oogenesis and oocyte maturation // *Results Probl. Cell Differ*. 2012. V. 55. P. 23–44.
- Laux T., Fukami K., Thelen M., Golub T., Frey D., Caroni P.* GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism // *J. Cell Biol*. 2000. V. 149. P. 1455–1472.
- Leguia M., Conner S., Berg L., Wessel G.M.* Synaptotagmin I is involved in the regulation of cortical granule exocytosis in the sea urchin // *Mol. Reprod. Dev*. 2006. V. 73. P. 895–905.
- Liu Y., Fisher D.A., Storm D.R.* Intracellular sorting of neuro-modulin (GAP-43) mutants modified in the membrane targeting domain // *J. Neurosci*. 1994. V. 14. P. 5807–5817.

- Ma W., Koch J.A., Viveiros M.M. Protein kinase C delta (PKCdelta) interacts with microtubule organizing center (MTOC)-associated proteins and participates in meiotic spindle organization // *Dev. Biol.* 2008. V. 320. P. 414–425.
- Madgwick S., Lévassieur M., Jones K.T. Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. P. 3849–3859.
- Manandhar G., Schatten H., Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance // *Biol. Reprod.* 2005. V. 72. P. 2–13.
- Mani S., Shen Y., Schaefer J., Meiri K.F. Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons // *Mol. Cell. Neurosci.* 2001. V. 17. P. 54–66.
- Masumoto N., Ikebuchi Y., Tahara M., Yokoi T., Tasaka K., Miyake A., Murata Y. Expression of Rab3A in the cortical region in mouse metaphase II eggs // *J. Exp. Zool.* 1998. V. 280. P. 91–96.
- McMaster D., Zwiers H., Lederis K. The growth-associated neuronal phosphoprotein B-50: improved purification, partial primary structure, and characterization and localization of proteolysis products // *Brain Res. Bull.* 1988. V. 21. P. 265–276.
- Mishra R., Gupta S.K., Meiri K.F., Fong M., Thostrup P., Juncker D., Mani S. GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. P. 348–357.
- Miyazaki S., Shirakawa H., Nakada K., Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs // *Dev. Biol.* 1993. V. 158. P. 62–78.
- Miyazaki S., Ito M. Calcium signals for egg activation in mammals // *J. Pharmacol. Sci.* 2006. V. 100. P. 545–552.
- Mosevitsky M.I., Novitskaya V.A., Plekhanov A., Skladchikova G. Neuronal protein GAP-43 is a member of novel group of brain acid-soluble proteins (BASPs) // *Neurosci. Res.* 1994. V. 19. P. 223–228.
- Mosevitsky M.I., Capony J.P., Skladchikova G.Yu., Novitskaya V.A., Plekhanov A.Yu., Zakharov V.V. The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties // *Biochimie.* 1997. V. 79. P. 373–384.
- Mosevitsky M.I. Nerve ending “signal” proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1 // *Int. Rev. Cytol.* 2005. V. 245. P. 245–325.
- Mosevitsky M.I., Snigirevskaya E.S., Komissarchik Y.Y. Immunoelectron microscopic study of BASP1 and MARCKS location in the early and late rat spermatids // *Acta Histochem.* 2012. V. 114. P. 237–243.
- Nguyen L., He Q., Meiri K.F. Regulation of GAP-43 at serine 41 acts as a switch to modulate both intrinsic and extrinsic behaviors of growing neurons, via altered membrane distribution // *Mol. Cell. Neurosci.* 2009. V. 41. P. 62–73.
- Oehrlein S.A., Parker P.J., Herget T. Phosphorylation of GAP-43 (growth-associated protein of 43 kDa) by conventional, novel and atypical isoforms of the protein kinase C gene family: differences between oligopeptide and polypeptide phosphorylation // *Biochem. J.* 1996. V. 317(Pt 1). P. 219–224.
- Oestreicher A.B., De Graan P.N., Gispén W.H., Verhaagen J., Schrama L.H. B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system // *Prog. Neurobiol.* 1997. V. 53. P. 627–686.
- Oh J.S., Susor A., Conti M. Protein tyrosine kinase Wee1B is essential for metaphase II exit in mouse oocytes // *Science.* 2011. V. 332. P. 462–465.
- Rosenthal A., Chan S.Y., Henzel W., Haskell C., Kuang W.J., Chen E., Wilcox J.N., Ullrich A., Goeddel D.V., Routtenberg A. Primary structure and mRNA localization of protein F1, a growth-related protein kinase C substrate associated with synaptic plasticity // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3641–3646.
- Ross W.N. Understanding calcium waves and sparks in central neurons // *Nat. Rev. Neurosci.* 2012. V. 13. P. 157–168.
- Schatten G., Schatten H. Cytoskeletal alterations and nuclear architectural changes during mammalian fertilization // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1987. V. 23. P. 23–54.
- Shen Y., Mani S., Meiri K.F. Failure to express GAP-43 leads to disruption of a multipotent precursor and inhibits astrocyte differentiation // *Mol. Cell. Neurosci.* 2004. V. 26. P. 390–405.
- Sheu F.S., Huang F.L., Huang K.P. Differential responses of protein kinase C substrates (MARCKS, neuromodulin, and neurogranin) phosphorylation to calmodulin and S100 // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 316. P. 335–342.
- Skene J.H., Virag I. Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43 // *J. Cell Biol.* 1989. V. 108. P. 613–624.
- Stricker S.H., Meiri K., Gotz M. P-GAP-43 is enriched in horizontal cell divisions throughout rat cortical development // *Cereb. Cortex.* 2006. V. 16. Suppl. 1. P. i121–131.
- Südhof T.C. The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture) // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. P. 12696–12717.
- Sun M.K., Alkon D.L. The “memory kinases”: roles of PKC isoforms in signal processing and memory formation // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014. V. 122. P. 31–59.
- Tompa P., Szász C., Buday L. Structural disorder throws new light on moonlighting // *Trends Biochem. Sci.* 2005. V. 30. P. 484–489.
- Trifaro J.M., Lejen T., Rose S.D., Pene T.D., Barkar N.D., Seward E.P. Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion // *Neurochem. Res.* 2002. V. 27. P. 1371–1385.
- Tsaadon L., Kaplan-Kraicer R., Shalgi R. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate, but not Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, is the mediator in cortical granules exocytosis // *Reproduction.* 2008. V. 135. P. 613–624.
- Tsai P.S., van Haefen T., Gadella B.M. Preparation of the cortical reaction: maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to the porcine oocyte’s surface blocks membrane traffic until fertilization // *Biol. Reprod.* 2011. V. 84. P. 327–335.
- Vassena R., Boue S., Gonzalez-Roca E., Aran B., Auer H., Veiga A., Izpisua Belmonte J.C. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation

- during human preimplantation development // *Development*. 2011. V. 138. P. 3699–3709.
- Vaughan P.F., Walker J.H., Peers C. The regulation of neurotransmitter secretion by protein kinase C // *Mol. Neurobiol.* 1998. V. 18. P. 125–155.
- Wang H.H., Cui Q., Zhang T., Wang Z.B., Ouyang Y.C., Shen W., Ma J.Y., Schatten H., Sun Q.Y. Rab3A, Rab27A, and Rab35 regulate different events during mouse oocyte meiotic maturation and activation // *Histochem. Cell Biol.* 2016. V. 145. P. 647–657.
- Wang Z.W. Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels // *Mol. Neurobiol.* 2008. V. 38. P. 153–166.
- Weide T., Huber T.B. Signaling at the slit: podocytes chat by synaptic transmission // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. V. 20. P. 1862–1864.
- Widmer F., Caroni P. Identification, localization, and primary structure of CAP-23, a particle-bound cytosolic protein of early development // *J. Cell Biol.* 1990. V. 111. P. 3035–3047.
- Wiederkehr A., Staple J., Caroni P. The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties // *Exp. Cell Res.* 1997. V. 236. P. 103–116.
- Zakharov V.V., Mosevitsky M.I. Site-specific calcium-dependent proteolysis of neuronal protein GAP-43 // *Neurosci. Res.* 2001. V. 39. P. 447–453.
- Zakharov V.V., Mosevitsky M.I. M-calpain-mediated cleavage of GAP-43 near Ser41 is negatively regulated by protein kinase C, calmodulin and calpain-inhibiting fragment GAP-43-3 // *J. Neurochem.* 2007. V. 101. P. 1539–1551.
- Zakharov V.V., Mosevitsky M.I. Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1 // *J. Struct. Biol.* 2010. V. 170. P. 470–483.
- Zernicka-Goetz M. First cell fate decisions and spatial patterning in the early mouse embryo // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 15. P. 563–572.
- Zhu X.L., Qi S.T., Liu J., Chen L., Zhang C., Yang S.W., Ouyang Y.C., Hou Y., Schatten H., Song Y.L., Xing F.Q., Sun Q.Y. Synaptotagmin I is required for spindle stability and metaphase-to-anaphase transition in mouse oocytes // *Cell Cycle*. 2012. V. 11. P. 818–826.

Identification of Brain Proteins BASP1 and GAP-43 in Mouse Oocytes and Zygotes

F. M. Zakharova^{a, b, *} and V. V. Zakharov^{c, d, e}

^a*Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint-Petersburg, 197376 Russia*

^b*Saint-Petersburg State University, 7-9 Universitetskaya Emb., Saint-Petersburg, 199034 Russia*

^c*Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, NRC “Kurchatov Institute,” Gatchina, Leningrad District, 188300 Russia*

^d*Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 29 Polytechnicheskaya St., 195251 Russia*

^e*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, 31 Bolshoy prospect, Saint-Petersburg, 199004 Russia*

*e-mail: fzakharova@mail.ru

Received October 1, 2016

Similarity of calcium-activated signaling systems of oocytes and neuronal axon terminals prompted us to investigate the possible presence in oocytes of BASP1 and GAP-43 proteins, which are highly expressed in brain neurons. Using immunocytochemical techniques combined with confocal microscopy, we have revealed that both BASP1 and GAP-43 are indeed present in mouse metaphase II (MII) oocytes and zygotes. BASP1 was found to be localized at the plasma membrane and actin cortex of the MII-oocytes, which is similar to BASP1 distribution in neurons and other cell types. GAP-43 is generally considered as a postmitotic membrane marker of nerve cells. However, in the MII-oocytes, GAP-43 is associated with microtubules of the meiotic spindle. GAP-43 was also found to be co-localized with γ -tubulin at the spindle poles (centrosomes) and at the discrete microtubule-organizing centers in the cytoplasm. As shown with phospho-specific antibodies to Ser41-phosphorylated form of GAP-43, GAP-43 is subject to phosphorylation by oocyte protein kinase C. The expression of BASP1 and GAP-43 in oocytes at the protein level was confirmed by electrophoresis and western blotting. Microinjection of BASP1 (but not GAP-43) in the cytoplasm of the MII-oocytes induced their exit from metaphase II arrest followed by parthenogenetic embryo development. This suggests participation of BASP1 in fertilization-induced oocyte activation, probably through regulation of local concentration of polyphosphoinositides in the plasma membrane. Recently it was found that GAP-43 is associated with centrosomes in asymmetrically dividing neuronal progenitors, which is similar to the localization of GAP-43 at the meiotic spindle and centrosomes in oocytes. Therefore we suggest that GAP-43 may be involved in regulation of spindle orientation and oocyte polarity.

Keywords: mouse oocytes, oocyte activation, meiotic spindle, centrosomes, actin cortex, protein kinase C, BASP1, GAP-43