



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Biología Celular e Histología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología

**Caracterización molecular y celular de la biosíntesis y
composición de la zona pelúcida de ovocitos de hámster
(*Mesocricetus auratus*). Análisis filogenético de la
glicoproteína ZP4 en la subfamilia Murinae**

Memoria presentada por

M^a José Izquierdo Rico

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Murcia

Murcia, Julio de 2009

ÍNDICE

	PAG
AGRADECIMIENTOS	9
ABREVIATURAS	15
I. RESUMEN	19
II. INTRODUCCIÓN	27
III. OBJETIVOS	33
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	37
1. EL OVARIO. MADURACIÓN FOLICULAR Y OVOCITARIA	39
2. LA ZONA PELÚCIDA	44
2.1. Funciones de la zona pelúcida	45
2.2. Composición y estructura de la zona pelúcida	46
2.2.1. Glicoproteínas de la zona pelúcida en diferentes especies	49
2.2.2. Dominios estructurales de las proteínas de la familia ZP	52
2.3. Origen celular y formación de la zona pelúcida	57
2.3.1. Lugar de síntesis de las glicoproteínas de zona pelúcida en las diferentes especies	58
2.3.2. Síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida en los diferentes estadios de la foliculogénesis	62
2.4. Secreción y procesamiento de las glicoproteínas de la zona pelúcida	65
2.5 Zona pelúcida de hámster	68
2.5.1. Análisis bioquímico de la zona pelúcida de hámster	69
3. EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA	72
3.1. Evolución de las proteínas reproductoras	72
3.2. Evolución molecular de las glicoproteínas de la zona pelúcida	74
V. MATERIAL Y MÉTODOS	81
1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	83
1.1. Ovarios de hámster	83
2. OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO	83
2.1. Obtención de ADN genómico	83
2.2 Obtención de ARN total de ovario de hámster	84
2.3 Síntesis <i>in vitro</i> de ADNc de ovario de hámster	85

3. ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	85
3.1 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADN genómico y ADNc de ZP4	85
3.2 Amplificación mediante la técnica de PCR de un fragmento de ZP1 y ZP4 de hámster	88
3.3 Amplificación por RACE del marco abierto de lectura de ZP1 y ZP4 de hámster	90
4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	92
5. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS O CLONADOS	92
6. CLONACIÓN DE ZP4 DE HÁMSTER	93
6.1. Amplificación mediante RT-PCR de ZP4	93
6.2. Digestión	94
6.3. Ligación	95
6.4. Transformación de células competentes	95
6.5. Selección de recombinantes	96
7. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	96
7.1. Construcción del plásmido de ZP4 marcado con el epítipo FLAG	96
8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ZP4 DE HÁMSTER	99
8.1. Cultivo de células HEK 293T	99
8.2. Transfección transitoria	100
8.3. Obtención de extractos	101
8.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida	102
8.5. Transferencia a membrana o Western-blot	102
9. ANÁLISIS DE LA GLICOSILACIÓN	103
9.1. Tratamiento con N-glicosidasa F	103
9.2. Tratamiento con tunicamicina	104
10. ANÁLISIS INMONOCITOQUÍMICOS	104
10.1. Citometría de flujo (FACS)	104
10.1.1 Análisis de células transfectadas en el citómetro de flujo	105
10.2. Microscopía confocal	105
10.2.1. Tinción inmunocitoquímica	105
10.2.2. Adquisición de Imágenes	106
10.3. Hibridación <i>in situ</i>	107
10.3.1. Construcción de plásmidos que contienen fragmentos de los genes ZP1, ZP2, ZP3, y ZP4 de hámster	107

10.3.2. Linealización de los plásmidos	112
10.3.3. Síntesis de sondas de ARN o Transcripción <i>in vitro</i>	112
10.3.4. Procesamiento de los ovarios de hámster para hibridación <i>in situ</i>	113
10.3.5. Técnica de hibridación <i>in situ</i> sobre cortes de parafina	114
11. PROTEÓMICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER	115
11.1. Aislamiento de la ZP de ovario de hámster	116
11.2. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida	117
11.3. Tinción con plata	117
11.4. Digestión con tripsina y análisis mediante HPLC/MS	118
11.5. Análisis mediante MALDI-TOF MS	120
12. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4	120
13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS	122
VI. RESULTADOS	125
1. CARACTERIZACIÓN DE ZP1 Y ZP4 DE HÁMSTER	127
1.1. Amplificación y análisis de la secuencia codificante de ZP1 de hámster	127
1.2. Amplificación y análisis de la secuencia codificante de ZP4 de hámster	132
2. COMPARACIÓN DE ZP1 Y ZP4 DE HÁMSTER CON OTRAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZP	139
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y VÍA DE SECRECIÓN DE ZP4 DE HÁMSTER EN CÉLULAS HEK 293T	147
3.1. Estudio de la expresión de ZP4 de hámster mediante SDS-PAGE y Western- blot	149
3.2. Estudio de la expresión de ZP4 de hámster mediante citometría de flujo	153
3.3. Estudio de la vía de secreción de ZP4 de hámster mediante microscopía confocal	156
4. LOCALIZACIÓN <i>IN SITU</i> DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE ZP1, ZP2, ZP3 Y ZP4 EN EL OVARIO DE HÁMSTER	163
5. PROTEÓMICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER	175
6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4 EN LA SUBFAMILIA MURINAE	183
6.1. Análisis de las secuencias proteicas de ZP4	185
6.2. Modelo de evolución y características de las secuencias nucleotídicas de ZP4	188
6.3. Análisis filogenético de ZP4	190
VII. DISCUSIÓN	195

1. COMPOSICIÓN DE LA ZP DE HÁMSTER	197
2. EXPRESIÓN DE LA ZP4 DE HÁMSTER EN CÉLULAS HEK 293T	202
3. ORIGEN DE LA EXPRESIÓN DE LA ZP DE HÁMSTER	205
4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA ZP EN LA SUBFAMILIA MURINAE	207
VIII. CONCLUSIONES	215
IX. SUMMARY	219
X. BIBLIOGRAFÍA	237
XI. ANEXO	257

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante el periodo de disfrute de una beca-contrato predoctoral de la Universidad de Murcia y ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto BFU2004-05568/BFI) y por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-11206). Así mismo, se ha desarrollado en el marco del Programa de Ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia de la Fundación Séneca, 04542/GERM/06 y CARM, Plan de Ciencia y Tecnología 2007/10, 464/2008.

Algunos de los resultados obtenidos han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

ARTÍCULOS:

Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Llop E, Pérez-Oliva AB, Ballesta J, Gutiérrez-Gallego R, and Jiménez-Cervantes C and Avilés M. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4. *J. Proteome. Res.* 8 (2): 926-41.

Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C and Avilés M. Localization and synthesis of zona pellucida proteins in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) ovary. En preparación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Ballesta J, Jiménez-Cervantes C, Avilés M. Biochemical and molecular evidences of the presence of ZP4 glycoprotein (ZPB) in the hamster ZP. Poster. Congreso internacional: Spermatology (Madrid, 2006).

Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Ballesta J, Jiménez-Cervantes C, Avilés M. Hamster zona pellucida contains four glycoproteins. Comunicación oral. Congreso internacional: ESHRE (Lyon, 2007).

Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Ballesta J, Jiménez-Cervantes C, Avilés M. Biochemical and molecular evidences for the existence of ZP1 glycoprotein in the hamster ZP. Comunicación oral. Congreso internacional: SEHIT (Córdoba, 2007).

Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Llop E, Ballesta J, Gutiérrez-Gallego R, Jiménez-Cervantes C, Avilés M. Hamster Zona Pellucida is Formed by Four Glycoproteins. A Proteomics Approach. Poster. Congreso internacional: ESDAR (Utrecht, 2008).

Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C and Avilés M. Origin of ZP1 and ZP4 in Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) Ovary. Poster Congreso internacional ESDAR (2009).

Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C and Avilés M. Expression of zona pellucida proteins is exclusively restricted to the oocyte in hamster (*mesocricetus auratus*) ovary. Comunicación oral. SEHIT (2009).

Izquierdo-Rico MJ, Pérez-Oliva AB, Avilés M, and Jiménez-Cervantes C. Expression of recombinant hamster zona pellucida glycoprotein ZP4 in mammalian cells. Enviado. 3APFA (2009).

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar la realización de esta Tesis Doctoral deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

A Manuel Avilés Sánchez por transmitirme su entusiasmo por el mundo científico y por su supervisión en el día a día. Gracias por tu ayuda y por tus ánimos que han permitido que esta tesis sea una realidad.

A Celia Jiménez-Cervantes. Gracias por tu confianza desde el primer momento y por haberme introducido en el fascinante mundo de la biología molecular. Sin tus enseñanzas habría sido imposible la realización de este trabajo. Gracias también a D. José Carlos García Borrón. Del mismo modo quiero agradecer la inestimable ayuda recibida de mis amigos de bioquímica: Ana, Berta, Ceci, Paola, Mari, Conchi, Andrés, Bruno...sin los cuales gran parte de este trabajo no habría sido posible. Gracias por acogerme como una más. Un “gracias” más especial para Ana que me ha ayudado tantísimo y que siempre ha estado a mi lado ante cualquier problema.

A Ricardo Gutiérrez Gallego por su inestimable ayuda y por su aportación a este trabajo.

A Lourdes Gimeno por su importante aportación a este trabajo y por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo momento.

A D. José Ballesta Germán y a D. José Ángel Martínez Menárguez por la ayuda recibida que siempre ha estado cuando la he necesitado.

A Dña. María Teresa Castells Mora y a Fara por su apoyo y ayuda.

A los profesores Dña. Concepción Ferrer Cazorla, Dña. Adelina Zuasti Elizondo, D. Luis Miguel Pastor García, D. Juan Francisco Madrid Cuevas y D. Francisco Hernández Calvo por su ayuda durante todo este tiempo.

A Eva García, María José Gómez y a José Luis Girela de la Universidad de Alicante por la ayuda y enseñanzas recibidas.

A Emma, que has estado conmigo desde el principio hasta el final siendo ante todo una verdadera amiga. Me has apoyado y ayudado siempre que lo he necesitado. Espero seguir compartiendo contigo risas y buenos momentos durante muchos años más.

A Loli, por compartir los últimos días de esta tesis como si fuera propia y por los buenos ratos que hemos pasado juntas. Ya sabes que te dejas una amiga en España para toda la vida.

A mis compañeras de fatiga. A Irene, gracias por ayudarme siempre que te he necesitado. Gracias a Esther por su optimismo y ayuda, a Mónica, Tere... A Maria por su ayuda en el inicio del trabajo. A Julián, David y Vicente. Gracias a M.Carmen y a Luis Miguel.

A todo departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria en especial a Pilar Coy y a Raquel Romar. Un muchísimas gracias a Fran por su amistad y apoyo incondicional. Ya sabes que siempre me tendrás a tu lado como si fueses de mi familia.

A Pascale Chevret del Instituto de Genómica Funcional de Lyon por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas y por su importante aportación a este trabajo. Gracias a Vincent Laudet por acogerme en el grupo y al resto de componentes de su grupo en especial a Anne, y a las dos Marias. Gracias a Allan Lamontara.

A César y M^a José del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia y a Alejandro del Servicio de Proteómica por sus aportaciones a este trabajo.

Gracias a mis amigos, Alejandro, Nati, Cristina, Juanma y Mari por estar siempre ahí y por los buenos momentos.

Por último gracias a mis dos familias: a mis padres Pepe y Charo y a Manolo y Antonia que siempre están ahí cuando los necesito. A mi hermano J.Miguel y a Eva. Gracias por todo vuestro apoyo y por vuestro cariño. Gracias papá por involucrarte en el trabajo y por tu gran ayuda.

A Iván que ha sido mi máximo apoyo. Gracias por tus consejos, gracias por creer en mi, por cuidarme, por escucharme, por quererme y por estar siempre a mi lado.

A Iván,

ABREVIATURAS

A continuación se definen las abreviaturas usadas en esta Tesis Doctoral:

ACN: acetonitrilo

ADNc: ácido desoxirribonucleótido complementario

ARN: ácido ribonucleico

CHCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

DMEM: medio mínimo esencial de Dulbecco.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DTT: ditioneitol

kDa: kilodalton

LH: hormona luteinizante.

β -ME: β -mercaptoetanol.

MS: espectrometría de masas (en inglés mass spectrometry)

Mya: millones de años (million years ago)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (en inglés polyacrilamide gel electrophoresis)

PBS: solución salina tampón fosfato pH 7,4

PMSG: gonadotropina sérica de la yegua gestante.

RACE: amplificación rápida de los extremos del ADNc (del inglés, Rapid Amplification of cDNA Ends).

SA: ácido sináptico.

SBF: suero bovino fetal.

SDS: dodecilsulfato de sodio (en inglés sodium dodecylsulfate)

TCEP: tris (2-carboxietil) fosfina.

TFA: ácido trifluoroacético

UI: unidades internacionales

ZP: zona pelúcida

I. RESUMEN

Los ovocitos de mamíferos están rodeados de una matriz extracelular llamada zona pelúcida (ZP) que está involucrada en diferentes procesos durante la fecundación y desarrollo embrionario temprano. Esta matriz está involucrada en el reconocimiento y unión al espermatozoide, en la reacción acrosómica, bloqueo de la polispermia y en la protección del embrión preimplantado (Yanagimachi, 1994; Epifano *et al.*, 1994; Benoff, 1997; Wassarman, 2008; Denker, 2000; Herrler y Beier, 2000; Sinowatz *et al.*, 2001; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004; Wassarman y Litscher, 2008). A pesar de la importancia del papel jugado por la ZP todavía quedan diferentes aspectos sin aclarar sobre su composición, estructura, origen y filogenia. En la presente Tesis Doctoral se abordan algunos de los aspectos anteriormente mencionados como la composición y origen de la ZP de ovocitos de hámster. Además, se inicia un estudio desde el punto de vista evolutivo de la proteína ZP4 en roedores y concretamente en la subfamilia Murinae.

A continuación se describen brevemente los experimentos realizados y resultados obtenidos:

I. Análisis de la composición de la zona pelúcida de hámster.

La composición de la ZP ha sido descrita en diferentes especies y está constituida por 3 a 6 glicoproteínas dependiendo de la especie analizada (Bleil y Wassarman, 1980a; Hedrick y Wardrip, 1987; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Goudet *et al.*, 2008).

En mamíferos, se ha considerado que la ZP está compuesta por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 tomando como modelo la ZP murina (Bleil y Wassarman, 1980a). Sin embargo, la descripción del genoma completo en algunas especies como el hombre o la rata ha dado lugar a la detección de nuevas proteínas en la ZP. Estudios recientes revelan que algunos mamíferos presentan una ZP formada por cuatro glicoproteínas como el hombre (Lefièvre *et al.*, 2004) o la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005). Estas cuatro glicoproteínas se designan como ZP1, ZP2 (ZPA), ZP3 (ZPC) y ZP4 (ZPB). La presencia de una cuarta glicoproteína en la

composición de la ZP nos hace replantearnos los diversos modelos de composición y estructura de la ZP propuestos hasta la fecha. En el hámster, especie objeto de nuestro estudio, la caracterización de la ZP mediante SDS-PAGE sugería la presencia de tres glicoproteínas diferentes: ZP1, ZP2 y ZP3 (Moller *et al.*, 1990). Sin embargo, solamente ZP2 y ZP3 habían sido clonados (números de acceso en el GenBank: AY876920 (ZP2) y M63629 (ZP3)).

En este estudio, mediante técnicas de biología molecular y proteómica se analiza la composición de la ZP de hámster detectándose la presencia de cuatro glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3, y ZP4. El ARNm de ZP1 y ZP4 es amplificado y secuenciado demostrándose su presencia en el ovario de hámster. Por otro lado, mediante técnicas de espectrometría de masas probamos la traducción del ADNc codificante de ZP1 y ZP4 ya que se detectan diferentes péptidos pertenecientes a estas dos proteínas. Además se detectan péptidos de ZP2 y ZP3, las otras glicoproteínas cuyas secuencias de nucleótidos y aminoácidos se encuentran en la base de datos (GenBank).

Además, realizamos un análisis comparativo de la secuencia del ADNc y proteica de ZP1 y ZP4 con respecto a las glicoproteínas de la ZP de otras especies. Este análisis muestra la existencia de una alta homología de estas glicoproteínas con las glicoproteínas de la ZP de otras especies revelando además la presencia de motivos comunes como el péptido señal, dominio trefoil, dominio ZP, dominio transmembrana y sitio consenso para el corte de furina.

II. Estudio del origen celular de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster

El origen celular de las proteínas de la ZP de las especies mamíferas ha sido motivo de controversia durante largo tiempo. Dependiendo de la especie, las proteínas de la ZP son sintetizadas por: a) el ovocito, b) las células foliculares o c) ambos (ovocito y células foliculares) (Kölle *et al.*, 1996, 1998, 2007; Sinowatz *et al.*, 2001; Bogner *et al.*, 2004). La síntesis de la ZP sólo a nivel del ovocito ha sido

demostrada en ratón y rata (Bleil y Wassarman, 1980b; Skinner y Dunbar, 1992; Epifano *et al.*, 1995; Scobie *et al.*, 1999; Sinowatz *et al.*, 2001; El Mestrah *et al.*, 2002) mientras que en otros mamíferos (hombre, cerdo, conejo, perro y vaca) la expresión de las proteínas de la ZP ha sido detectada también a nivel de las células de la granulosa. En este estudio, mediante técnicas de hibridación *in situ* analizamos el patrón de expresión de las proteínas de la ZP en el ovario de hámster.

Los resultados obtenidos revelan que la síntesis de las cuatro glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) de hámster tiene lugar de forma exclusiva en el ovocito. No hay expresión proteica en las células foliculares. En cuanto a los niveles de expresión de las cuatro glicoproteínas, los ovocitos de los folículos primordiales y los primarios de menor tamaño son los que muestran una mayor expresión disminuyendo conforme el folículo aumenta de tamaño. La expresión fue muy débil o nula en los ovocitos pertenecientes a los folículos preovulatorios o de Graaf.

III. Estudio de la expresión y vía de secreción de ZP4 de hámster en células HEK 293T

Para el estudio de la expresión y vía de secreción de ZP4 de hámster se procedió a la clonación de la misma y transfección posterior en células HEK 293T. Nuestros resultados nos indican que la proteína es expresada en este sistema celular con alta eficacia siendo imposible su detección en el medio de cultivo como proteína secretada. Mediante ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal, ZP4 de hámster se muestra anclada a nivel de la membrana celular de manera que podemos afirmar que el tráfico desde el retículo hasta la superficie celular es adecuado y concuerda con el comportamiento seguido por otras proteínas de la ZP descritas previamente (Litscher *et al.*, 1999; Kiefer y Saling, 2002). No obstante, el hecho por el cual no es secretada permanece sin ser esclarecido pero parece estar en concordancia con algunos resultados obtenidos en estudios previos realizados con proteínas recombinantes de la familia ZPB (ZP1 y ZP4) (Harris *et al.*, 1999; Tsubamoto *et al.*, 1999; Martic *et al.*, 2004; Caballero-Campo *et al.*, 2006)).

El análisis por SDS-PAGE y Western-blot revela un peso molecular de la proteína recombinante obtenida de la lisis celular de aproximadamente 75 kDa. Teniendo en cuenta que el peso esperado de la proteína nativa inmadura es de 56,9 kDa el peso de la proteína recombinante obtenida coincide con el peso esperado que tendría la proteína sin el péptido señal y con el dominio transmembrana más la glicosilación (ZP4 presenta 6 sitios potenciales de N- glicosilación), asumiendo un procesamiento similar al de otras glicoproteínas de la ZP (Litscher *et al.*, 1999; Kiefer y Saling, 2002).

IV. Análisis filogenético de ZP4 en la subfamilia Murinae

En esta Tesis Doctoral mostramos los resultados obtenidos a partir de un análisis filogenético de ZP4 realizado dentro de la subfamilia Murinae. Esta proteína ha sido poco estudiada desde el punto de vista evolutivo siendo interesante resaltar la necesidad de un análisis de la misma debido a su importancia funcional en especies como el bovino, el porcino o el hombre. Además dentro de esta subfamilia encontramos una especie, *Mus musculus* en la que esta proteína no es expresada. El gen ha sufrido a lo largo de la evolución una serie de deleciones e inserciones que impiden la lectura completa del ARNm codificante para dicha proteína (pseudogen). Debido a que ZP4 si se expresa en otro taxón dentro de la subfamilia, en *Rattus norvegicus*, podemos afirmar que ZP4, como proteína funcional, se ha perdido en algún punto del árbol evolutivo desde la divergencia de *Mus* y *Rattus* a partir de un ancestro común.

En nuestro estudio amplificamos y analizamos diferentes regiones de interés dentro de ZP4 tomando como molde el ADN genómico de 25 taxones pertenecientes a la subfamilia Murinae. El análisis reveló que la pseudogenización de ZP4 podría afectar solamente al subgénero *Mus*. Para la confirmación de la existencia de una secuencia codificante completa para ZP4 en determinadas especies se procedió a la amplificación de esta secuencia a partir de ADNc obtenido a partir de ARN de ovario. Hasta la fecha, las secuencias obtenidas no revelan la presencia

de codones de stop de manera que la pseudogenización de ZP4 puede datarse hace unos 4 millones de años.

II. INTRODUCCIÓN

Los ovocitos de los animales vertebrados están rodeados de una matriz extracelular conocida como envoltura vitelina en anfibios, corion en los teleósteos, membrana perivitelina en las aves y zona pelúcida (ZP) en mamíferos (Sasanami *et al.*, 2002, 2003; Barisone *et al.*, 2007; Wassarman y Litscher, 2008). Estas matrices extracelulares llevan a cabo funciones similares en las diferentes especies.

Esta matriz permite la comunicación entre ovocitos y células foliculares durante la ovogénesis, está involucrada en el reconocimiento y unión al espermatozoide, en la reacción acrosómica, bloqueo de la polispermia y en la protección del embrión previo a la implantación (Yanagimachi, 1994; Epifano *et al.*, 1994; Benoff, 1997; Denker, 2000; Herrler y Beier, 2000; Sinowatz *et al.*, 2001; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004; Wassarman y Litscher, 2008).

La composición de la ZP ha sido descrita en diferentes especies y está constituida por 3 a 6 glicoproteínas variando la composición de una especie a otra (Bleil y Wassarman, 1980a; Hedrick y Wardrip, 1987; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Goudet *et al.*, 2008).

Sin embargo, la composición proteica así como la nomenclatura usada para clasificar las diferentes proteínas de la ZP continúan siendo bastante confusas. Un reciente estudio filogenético clarifica dicha nomenclatura relacionándola con la evolución de los genes codificantes para las diferentes proteínas de la ZP. Además, detecta la presencia de pseudogenes en diferentes especies. Así, estos autores proponen clasificar los genes de la ZP dentro de seis subfamilias: *ZPA/ZP2*, *ZPC/ZP3*, *ZPB/ZP4*, *ZP1*, *ZPAX* y *ZPD* (Goudet *et al.*, 2008).

En mamíferos, la ZP se ha considerado compuesta por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 tomando como modelo la ZP murina (Bleil y Wassarman, 1980a). Sin embargo, la descripción del genoma completo en algunas especies como el hombre o la rata ha dado lugar a la detección de nuevas proteínas en la ZP. Estudios recientes revelan que algunos mamíferos presentan una ZP formada por cuatro

glicoproteínas como en el hombre (Lefièvre *et al.*, 2004) o la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005). Estas cuatro glicoproteínas se designan como ZP1, ZP2 (ZPA), ZP3 (ZPC) y ZP4 (ZPB). La presencia de una cuarta glicoproteína en la composición de la ZP nos hace replantearnos los diversos modelos de composición y estructura de la ZP propuestos hasta la fecha.

En la especie humana, *ZP4 (ZPB)* fue primeramente identificado como el gen ortólogo de *ZP1* murina pero estudios posteriores detectaron que el verdadero ortólogo de *ZP1* de ratón era un gen distinto llamado *ZP1* (Hughes y Barrat, 1999). Más tarde, mediante técnicas de biología molecular y proteómica se identificaron los cuatro genes que codificaban las correspondientes proteínas de la ZP humana (Lefièvre *et al.*, 2004). En estos mismos estudios, los análisis por espectrometría de masas fueron incapaces de identificar *ZP4* en el ratón. El ortólogo del gen humano *ZP4* está presente en el genoma del ratón como un pseudogen (Lefièvre *et al.*, 2004).

Así, en los mamíferos, dependiendo de la especie estudiada, la ZP aparece formada por tres o cuatro glicoproteínas. Últimos estudios sobre la evolución de los genes codificantes de las proteínas de la ZP (Goudet *et al.*, 2008) revelan nuevos datos como la existencia de una pérdida de genes en determinadas especies tal y como ocurre con la *ZP4* murina. Así, en especies como el cerdo (Hedrick y Wardrip, 1987), la vaca (Noguchi *et al.*, 1994) o el perro (Goudet *et al.*, 2008) ha sido descrita la presencia de tres glicoproteínas; sin embargo, en estas especies las glicoproteínas son: *ZP2*, *ZP3* y *ZP4*. *ZP1* ha sido identificada como un pseudogen en el genoma de la vaca y el perro (Goudet *et al.*, 2008). En especies no mamíferas, han sido detectados más de cuatro genes, así por ejemplo en el genoma de la gallina están presentes 6 genes (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPAX* y *ZPD*) (Bausek *et al.*, 2000; Goudet *et al.*, 2008) y en el genoma de *Xenopus* encontramos cinco genes codificantes para proteínas de la ZP (*ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPD* y *ZPAX*) (Goudet *et al.*, 2008).

Estas observaciones sugieren que la expresión simultánea de *ZP1* y *ZP4* representa una condición ancestral presente antes de la divergencia de mamíferos y aves en la cadena evolutiva. Así, *ZP1* y *ZP4* que habían sido considerados genes

ortólogos son en realidad genes parálogos. Los dos genes proceden de un ancestro común que sufrió una duplicación (Hughes y Barrat, 1999; Bausek *et al.*, 2000; Sasanami *et al.*, 2003; Goudet *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, podemos afirmar que la composición y estructura de la ZP es más complicada de lo esperado porque:

- 1) Está formada por tres o cuatro glicoproteínas.
- 2) En el modelo de tres glicoproteínas puede estar presente ZP1 o ZP4 dependiendo de la especie.

Además, la proteína responsable de la unión con el espermatozoide difiere según la especie. Así por ejemplo en el ratón, la ZP3 destaca como proteína responsable, mientras que en otras especies como el cerdo este papel lo desempeña ZP4-ZP3.

En cuanto al origen de las proteínas de la ZP de las especies mamíferas ha sido motivo de controversia durante largo tiempo. Dependiendo de la especie las proteínas de la ZP son sintetizadas por: a) el ovocito, b) las células foliculares o c) ambos (ovocito y células foliculares) (Sinowitz *et al.*, 2001).

Así, en la especie murina las glicoproteínas de la ZP son sintetizadas exclusivamente por el ovocito (Haddad y Nagai, 1977; Bleil y Wassarman, 1980b; Fléchon *et al.*, 1984; Kimura *et al.*, 1994; Epifano *et al.*, 1995). Estudios *in vitro* confirman que los ovocitos de ratón son capaces de sintetizar todas y cada una de las proteínas de la ZP (Bleil y Wassarman, 1980b).

Por otro lado, investigaciones en otras especies como en la especie humana (Grootenhuis *et al.*, 1996; Gook *et al.*, 2008), mono (Grootenhuis *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1996), conejo (Dunbar *et al.*, 1994; Grootenhuis *et al.*, 1996), perro (Blackmore *et al.*, 2004), cerdo (Sinowitz *et al.*, 1995; Kölle *et al.*, 1996) y vaca (Kölle *et al.*, 1998) han demostrado que tanto el ovocito como las células foliculares

contribuyen a la síntesis de las glicoproteínas de la ZP. Parece ser que estas especies presentan una ZP muy bien desarrollada y la aportación a la síntesis proteica por parte del ovocito no es lo suficientemente alta como para cubrir la síntesis por sí sólo por lo que las células foliculares han de tomar parte en la misma (Schultz *et al.*, 1979). Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de síntesis que poseen las células de la granulosa.

En el hámster, la caracterización de la ZP mediante SDS-PAGE sugiere la presencia de tres glicoproteínas diferentes: ZP1, ZP2 y ZP3 (Moller *et al.*, 1990). Sin embargo, solamente ZP2 y ZP3 han sido clonados (números de acceso en el GenBank: AY876920 (ZP2), M63629 (ZP3)).

En este estudio, mediante técnicas de biología molecular, hibridación *in situ* y proteómica caracterizamos la biosíntesis y composición de la ZP de hámster. Por otro lado, iniciamos un análisis filogenético de ZP4 dentro de la subfamilia Murinae cuyo objetivo es estudiar la evolución de ZP4. Esta proteína ha sido poco estudiada desde el punto de vista evolutivo siendo interesante resaltar la necesidad de un análisis de la misma debido a su importancia funcional en especies como el bovino, el porcino o el hombre. Además dentro de esta subfamilia encontramos una especie, *Mus musculus* en la que esta proteína no es expresada. El gen ha sufrido a lo largo de la evolución una serie de deleciones e inserciones que impiden la lectura completa del ARNm codificante para dicha proteína. Debido a que ZP4 sí se encuentra presente en otro taxón dentro de la subfamilia, en *Rattus norvegicus*, podemos afirmar que ZP4, como proteína funcional, se ha perdido en algún punto del árbol evolutivo desde la divergencia de *Mus* y *Rattus* a partir de un ancestro común.

III. OBJETIVOS

En función de lo expuesto anteriormente la presente Tesis Doctoral tiene como propósito los siguientes objetivos:

- 1.- Caracterización del ADNc de *ZP1* y *ZP4* de hámster.
- 2.- Clonación y estudio de la expresión y vía de secreción de *ZP4* de hámster.
- 3.- Análisis comparativo de la secuencia del ADNc y proteica de *ZP1* y *ZP4* con respecto a la *ZP* de otras especies.
- 4.- Análisis por espectrometría de masas de la *ZP* obtenida de ovario de hámster.
- 5.- Estudio del patrón de expresión de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* de hámster.
- 6.- Análisis filogenético de *ZP4* en la subfamilia Murinae.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- EL OVARIO. MADURACIÓN FOLICULAR Y OVOCITARIA

Los ovarios de los animales mamíferos son pequeños órganos situados en las cavidades pélvicas laterales, derecha e izquierda. Poseen dos funciones principales:

- Son el origen de los ovocitos, gametos sexuales femeninos.
- Son órganos endocrinos, productores de las hormonas sexuales femeninas.

El ovario puede dividirse en tres componentes: hilio, médula y corteza. El hilio ovárico es la vía a través de la cual los vasos sanguíneos y linfáticos entran y salen del ovario y se continúa con la médula, núcleo central del ovario. La médula ovárica consiste en tejido conectivo fibroelástico irregularmente dispuesto y extensos sistemas vascular y nervioso que llegan al ovario a través del hilio. Vamos a centrar nuestro interés en la corteza ovárica que está constituida por dos componentes:

- Un estroma de sostén
- Estructuras productoras de gametos: los folículos ováricos.

El **folículo ovárico** es una unidad fisiológica cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores extracelulares como las hormonas gonadotropinas, y de un complejo sistema de relaciones intrafoliculares.

Desde el punto de vista histológico, los tres tipos básicos de folículos ováricos pueden identificarse de acuerdo con su estado de desarrollo (Figura 1):

- Folículos primordiales
- Folículos en crecimiento
- Folículos maduros, antrales o de Graaf

Los folículos en crecimiento se subdividen a su vez en folículos primarios y secundarios. Algunos histólogos identifican etapas adicionales en el espectro continuo del desarrollo folicular.

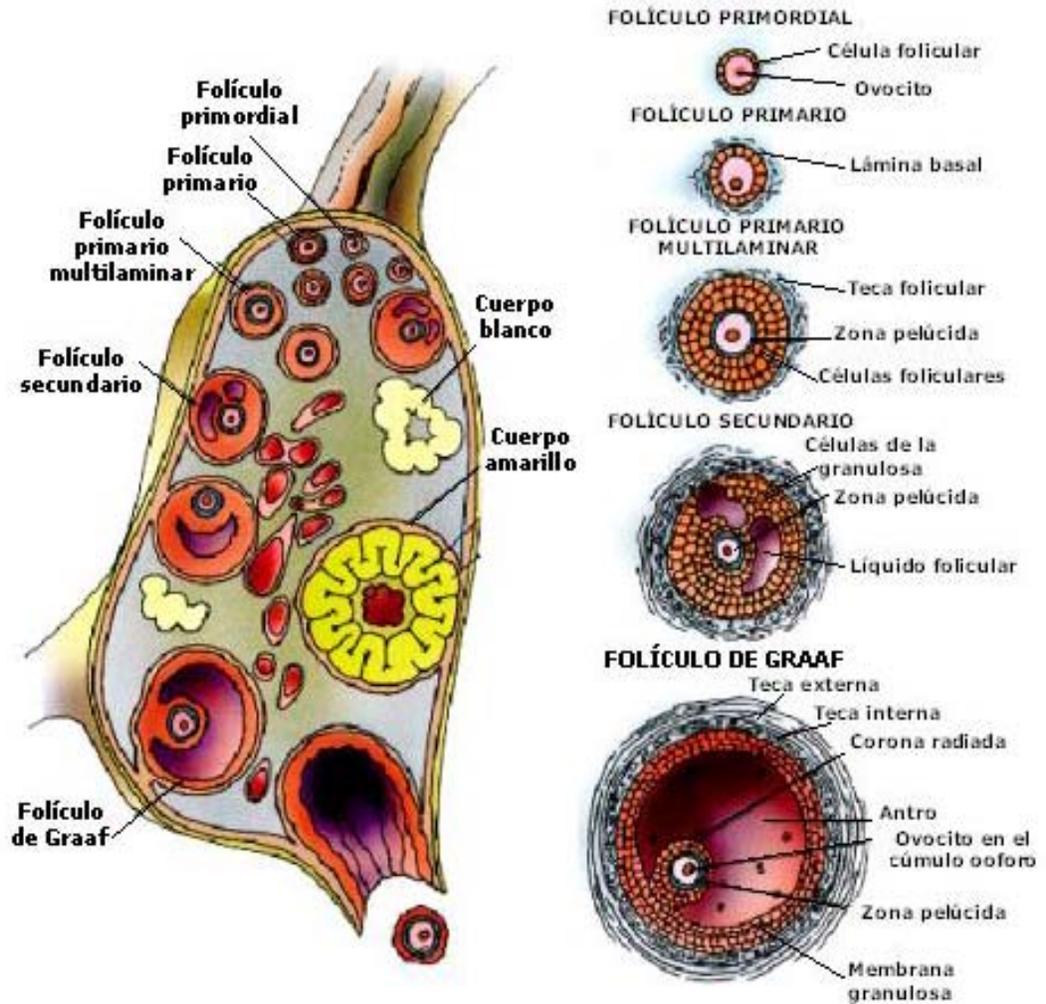


Figura 1. Esquema de la estructura del ovario y del desarrollo del folículo (Tomado de Gartner y Hiatt, texto Atlas de Histología, McGrawHill 2º edición).

En los **folículos primordiales**, el ovocito se encuentra rodeado de una sola capa de células foliculares planas. En esta etapa, el ovocito y las células foliculares circundantes están muy juntos. A medida que el folículo primordial se convierte en folículo en crecimiento ocurren cambios en el ovocito, células foliculares y estroma contiguo. Al principio el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas proliferan y se tornan cúbicas. En esta etapa, es decir cuando las células foliculares adquieren forma cúbica, el folículo recibe el nombre de **folículo primario**. Conforme el folículo va creciendo, una lámina acidófila y refráctil aparece entre éste y las células foliculares contiguas: la **zona pelúcida (ZP)**. En este estadio la capa simple de células foliculares da origen a un epitelio estratificado, la **capa granulosa** (membrana granulosa) que rodea al ovocito. Las células foliculares ahora reciben el nombre de células de la granulosa. La **lámina basal** mantiene su posición entre el estrato más externo de células foliculares y el estroma de tejido conjuntivo.

En este punto además, a medida que las células de la granulosa proliferan, las células estromales perifoliculares forman una vaina de células conjuntivas conocida como **teca folicular** justo por fuera de la lámina basal. La teca folicular se diferencia en dos capas:

- **Teca interna**, que es la capa de células secretoras cúbica muy vascularizada y más profunda. Las células de la teca interna con diferenciación completa poseen las características estructurales típicas de las células productoras de esteroides. Estas células tienen una gran cantidad de receptores de hormona luteinizante (LH). En respuesta a la estimulación por la LH, sintetizan y secretan los andrógenos que son los precursores de los estrógenos. Además de las células secretoras, la teca interna contiene fibroblastos, haces de fibras colágenas y una rica red de vasos pequeños típica de órganos endocrinos.

- **Teca externa**, que es la capa más superficial de células de tejido conjuntivo. Contiene entre las células, fibras musculares lisas y haces de fibras colágenas.

Los límites entre las dos capas tecales y entre la teca externa y el estroma circundante no son nítidos. Sin embargo, la lámina basal que hay entre la capa granulosa y la teca interna establece un límite bien definido entre estas capas. Separa la teca interna, con su lecho capilar extenso, de la capa granulosa, que es avascular durante el periodo de crecimiento folicular.

Cuando la capa granulosa alcanza un espesor de 6 a 12 estratos celulares, entre las células de la granulosa aparecen cavidades con contenido líquido, el llamado **líquido folicular**. A medida que el líquido continúa acumulándose entre las células de la granulosa, las cavidades empiezan a confluir para finalmente constituir una cavidad única llamada **antro**. Este folículo se designa ahora como **folículo secundario o antral**. Cuando el folículo secundario aumenta de tamaño, el antro, que está revestido de varias capas de células de la granulosa, también se hace más grande.

La capa granulosa tiene un espesor que es relativamente uniforme excepto en la región asociada al ovocito. Aquí las células de la granulosa forman un montículo abultado, el **cúmulo ovígeno** (*cumulus oophorus*), que se proyecta dentro del antro. Las células del cúmulo que rodean inmediatamente al ovocito y permanecen con éste en la ovulación forman la denominada **corona radiada**.

Las células del cúmulo ovígeno desarrollan procesos citoplasmáticos atravesando la ZP y formando zonas de contacto con la membrana plasmática del ovocito mediante las uniones de tipo gap también llamadas de nexo, de acoplamiento o de hendidura (Anderson y Albertini, 1976; Eppig, 1977; Sebon, 2003). Estas uniones facilitan el abastecimiento de nutrientes y el aporte de pequeñas moléculas reguladoras procedentes de las células de la granulosa en un proceso de cooperación metabólica (Canipari, 1994). Este paso intercelular se incrementa durante la fase de crecimiento folicular (Lazzari *et al.*, 1994; Picton, 2001).

La mayor parte de los folículos que llegan hasta esta etapa de desarrollo experimentan atresia, persisten unos cuantos que siguen desarrollándose para

convertirse en **folículos maduros o de Graaf** (Figura 2). El folículo maduro también conocido como folículo de Graaf, se caracteriza por su gran tamaño (en la especie humana 18 a 30 mm). Se extiende por todo el espesor de la corteza ovárica y puede observarse como un abombamiento transparente sobre la superficie del ovario y la producción de estos folículos está directamente relacionada con la fertilidad de los mamíferos (Erickson y Shimasaki, 2000).

A medida que el folículo se acerca a su tamaño máximo el antro aumenta de tamaño y la capa granulosa parece tornarse más fina. Sin embargo, las capas teca se tornan más prominentes. En el estadio de folículo de Graaf, los ovocitos han completado su crecimiento y han adquirido una ZP bien desarrollada (McGee y Hsueh, 2000).

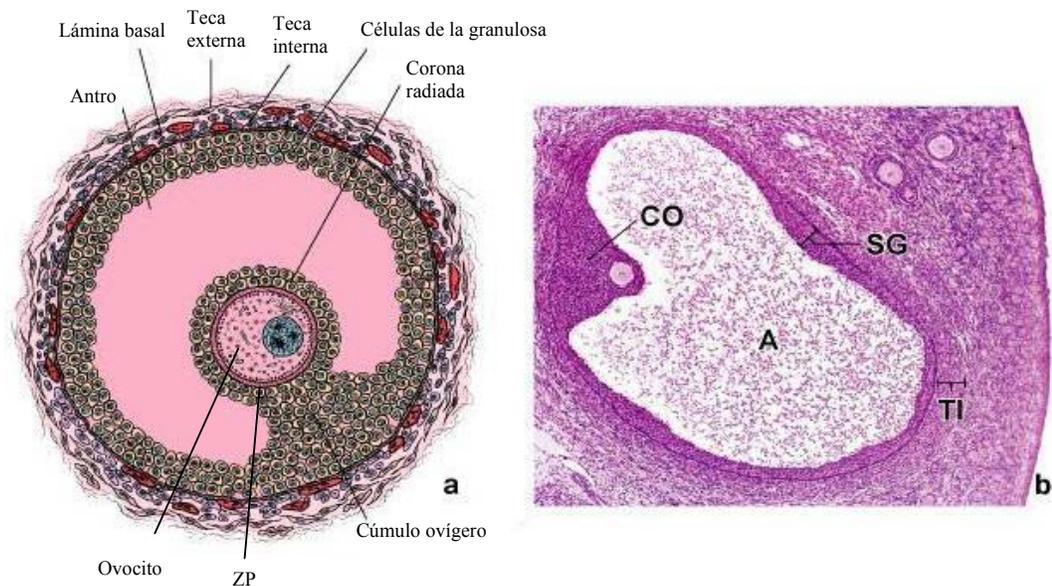


Figura 2. Dibujo esquemático de un folículo maduro (o de Graaf) (a) y fotomicrografía de un folículo de Graaf (b). a: Se puede observar un amplio antro que contiene un ovocito incluido en el "*cumulus oophorus*". Las células del *cúmulus* que rodean inmediatamente al ovocito permanecen con este después de la ovulación y forman la corona radiada. b: Se puede observar el gran antro lleno de líquido folicular (A) y el *cúmulus oophorus* (CO) que contiene el ovocito. El resto de células que rodean la luz antral forman la capa granulosa (SG). También se observan dos folículos primarios (arriba, a la derecha) (Tomado de Ross, Histología, Editorial Médica Panamericana, 4ª edición)

2.- LA ZONA PELÚCIDA

Los ovocitos de los animales vertebrados están rodeados de una matriz extracelular conocida como envoltura vitelina en anfibios, corion en los teleósteos, membrana perivitelina en las aves y zona pelúcida en mamíferos. Estas matrices extracelulares llevan a cabo funciones similares en las diferentes especies. En nuestro estudio nos centraremos en la zona pelúcida de los animales mamíferos.

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que rodea al ovocito y al embrión preimplantado en los mamíferos (euterios y metaterios) (Figura 3). Entre sus funciones destaca su implicación directa en la fecundación, presentando los determinantes moleculares que se unen al espermatozoide en dicho proceso.

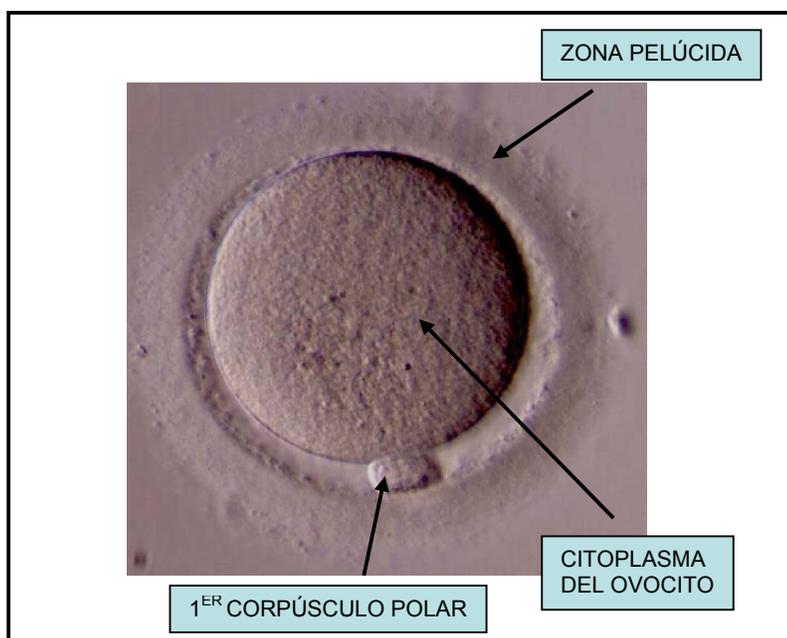


Figura 3. Ovocito humano visto en microscopio óptico en campo claro.

El esclarecimiento de los mecanismos moleculares responsables de la fecundación es de gran trascendencia tanto en su vertiente básica, como clínica. Para

conocer dichos mecanismos es esencial el conocimiento en profundidad de las dos estructuras que interaccionan en la fecundación: membrana espermática y ZP.

A continuación se describe con detalle las funciones, la composición y la estructura de la ZP de los mamíferos.

2.1. Funciones de la zona pelúcida

La ZP está involucrada en diferentes etapas críticas durante el proceso de la fecundación. Así, esta matriz extracelular está implicada en el reconocimiento y unión del espermatozoide capacitado. Además, en la ZP encontramos aquellos componentes responsables de la inducción de la reacción acrosómica del espermatozoide. Tras la penetración del primer espermatozoide se produce un cambio a nivel de la ZP, reacción zonal, siendo responsable del bloqueo de la polispermia. También se ha observado que la ZP tiene un importante papel en la organización y diferenciación de las células de la granulosa y en la foliculogénesis siendo igualmente destacado su papel protector en el desarrollo embrionario temprano (Yanagimachi, 1994; Benoff, 1997; Denker, 2000; Herrler y Beier, 2000; Sinowitz *et al.*, 2001; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004; Wassarman y Litscher, 2008).

Algunas de las funciones descritas anteriormente han podido ser asignadas a alguna de las glicoproteínas que componen la ZP. Así, el receptor primario, la macromolécula presente en la ZP responsable de la unión primaria con la membrana de la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto, ha sido identificado en distintas especies. En el ratón, en el hámster y en la especie humana esta función ha sido asociada a la glicoproteína ZP3. Sin embargo, en otras especies como el cerdo y la vaca, hay una participación conjunta de ZP3 y ZP4 (Wassarman, 1990; Dunbar *et al.*, 1994; Topper *et al.*, 1997; Yurewicz *et al.*, 1998; Amari *et al.*, 2001; Wassarman, 2002, 2005).

En el ratón hay evidencias de que otra glicoproteína, ZP2, actúa como receptor secundario. Es decir, que es responsable de la unión del espermatozoide que

ha sufrido la reacción acrosómica (Bleil *et al.*, 1988; Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1994; Topper, 1997; Sinowatz *et al.*, 2001; Dean, 2004). En cuanto a la glicoproteína ZP1 de ratón parece jugar un papel importante en la organización de la matriz de la ZP (Rankin *et al.*, 1999). Sin embargo, es importante destacar que sin la presencia de la glicoproteína ZP3 no se produce la formación de la ZP durante la foliculogénesis, siendo por lo tanto el papel de la ZP3 clave en la fecundación al actuar como receptor primario, inductor de la reacción acrosómica y también desempeñar un papel estructural (en la especie murina) (Rankin *et al.*, 1998, 1999; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004).

2.2. Composición y estructura de la zona pelúcida

En las dos últimas décadas, la caracterización de la estructura y función de la ZP de varias especies ha sido bien documentada. Tradicionalmente la ZP de mamíferos se ha considerado constituida por tres glicoproteínas, y ha sido recientemente cuando se ha descrito la existencia de cuatro glicoproteínas en especies como la rata y el humano (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) (Hoodbhoy *et al.*, 2005; Lefièvre *et al.*, 2004).

Estas proteínas están altamente glicosiladas y presentan un peso molecular muy similar cuando se estudian mediante electroforesis en SDS-PAGE (Noguchi *et al.*, 1993; Bauskin *et al.*, 1999). Por eso ha sido difícil su correcta identificación mediante técnicas analíticas bioquímicas.

En la especie más estudiada hasta la fecha, el ratón, la ZP estaría formada por un entramado fibrilar. Estas fibras o filamentos estarían constituidos por las distintas glicoproteínas (Wassarman y Mortillo, 1991; Wassarman *et al.*, 1996). Así, la ZP estaría formada por filamentos compuestos de dímeros de las glicoproteínas ZP2:ZP3 y estos filamentos estarían unidos entre sí por dímeros de la glicoproteína ZP1 (Figura 4). Este modelo se apoya en datos experimentales que cuantifican los transcritos de las tres glicoproteínas reflejando una ratio de 1:4:4 (ZP1:ZP2:ZP3) (Epifano *et al.*, 1995). Por lo tanto, la ZP de ratón contendría cantidades

equimoleculares de ZP2 y ZP3, representando ZP1 solamente el 10% de la ZP (Green, 1997).

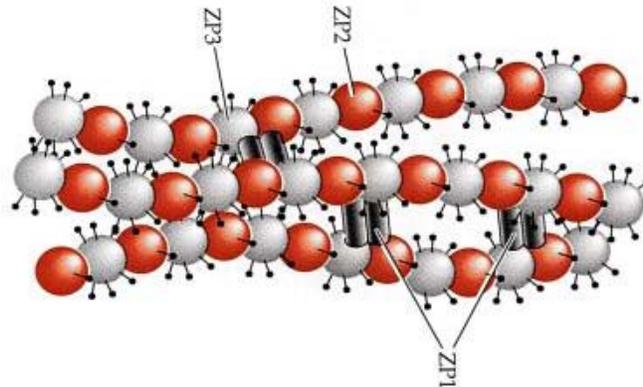


Figura 4. Modelo de la estructura de la ZP de ratón (tomado de Wassarman, 1992).

Sin embargo, estudios recientes realizados por el grupo del Dr. Dean utilizando animales con diferentes modificaciones genéticas en las glicoproteínas de la ZP han aportado nuevas evidencias. Estos estudios han demostrado que los filamentos que constituyen la ZP están formados por dímeros ZP1:ZP3 y ZP2:ZP3. Estos resultados implican que el modelo de estructura de la ZP propuesto para el ratón deba ser reconsiderado (Rankin *et al.*, 1998, 1999, 2001; Dean, 2004) (Figura 5).

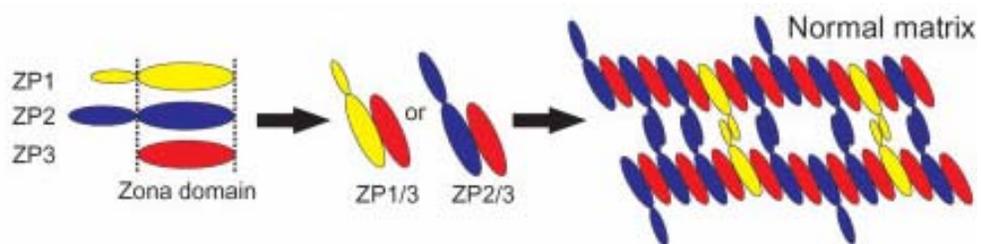


Figura 5. Modelo de la estructura de zona pelúcida de ratón (tomado de Dean, 2004).

Además, el descubrimiento de la existencia de especies con cuatro glicoproteínas en la ZP como la especie humana, la rata o el macaco coronado nos indican que el modelo de estructura de la ZP descrito para el ratón no es extrapolable a estas especies (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008). Además, la ratio molecular de las proteínas de la ZP que ha sido descrito en algunas

especies, no concuerda con las proporciones 1:4:4 determinadas para la especie murina. Así en el cerdo, la relación molar estimada para ZP2/ZP3/ZP4 es de 1:6:6 (Nakano *et al.*, 1996) mientras que en la vaca la estimación para ZP2/ZP3/ZP4 es de 1:2:1 (Yonezawa *et al.*, 2001). En el caso de especies no mamíferas destacamos a *Xenopus laevis* (rana africana de uñas) siendo 1,7:1:16:16 para ZPAX/ZP2/ZP3/ZP4 (Vo y Hedrick, 2000) y a *Bufo arenarum* (sapo) siendo 1:1,3:7,4:4,8 para ZPAX:ZP2:ZP3:ZP4. Todas estas diferencias interespecíficas no hacen sino poner de manifiesto la variabilidad existente no sólo en la composición de la ZP sino en su posible estructura tridimensional.

Para conocer el proceso por el cual se produce el reconocimiento entre gametos en cada una de las especies es importante conocer la precisa composición de la ZP, así como la estructura supramolecular que adoptaría ésta.

En la mayoría de las especies la ZP es secretada morfológicamente en capas y encontramos distinta asimetría entre una capa interna y una capa externa (Phillips y Shalgi, 1980; Ahuja y Bolwell, 1983; Shalgi y Raz, 1997).

Mediante microscopia electrónica de barrido podemos observar como la ZP de mamíferos está compuesta por una red dispersa de numerosos poros (Vanroose *et al.*, 2000) y encontramos diferencias morfológicas entre la superficie externa e interna.

La superficie externa de la ZP presenta una apariencia de “queso suizo” mientras que la superficie interna muestra una apariencia regular y rugosa (Phillips y Shalgi, 1980; Keefe *et al.*, 1997) (Figura 6).

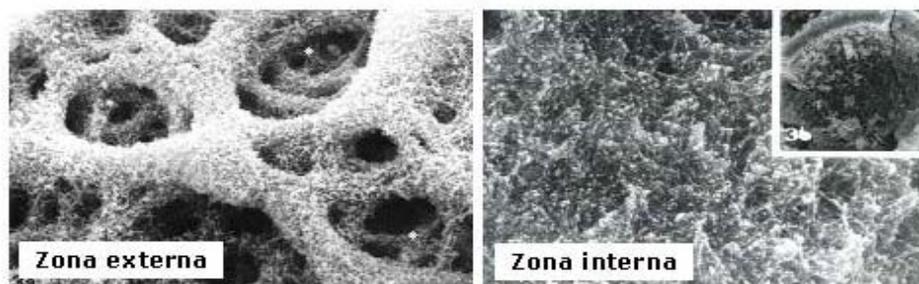


Figura 6. Zona externa y zona interna de la zona pelúcida vista por microscopía de barrido (modificado de Familiari, 1992).

No obstante, no sólo es necesario el estudio del esqueleto proteico de las proteínas de la ZP sino que se ha demostrado en diferentes especies, incluido el hombre, que las cadenas de carbohidratos ancladas a la proteína juegan un papel importante durante la unión primaria entre el espermatozoide y el ovocito (Florman y Wassarman, 1985; Chapman y Barratt, 1996; Ozgur *et al.* 1998; Benoff, 1997; Dell *et al.*, 1999; Amari *et al.*, 2001; Primakoff y Myles, 2002; Talbot *et al.*, 2003, Clark y Dell, 2006; Kanai *et al.*, 2007; Velásquez *et al.*, 2007).

Esta unión está mediada probablemente por proteínas localizadas en la región de la cabeza de espermatozoides capacitados que unen oligosacáridos específicos expresados en la superficie externa de la ZP (Nixon *et al.*, 2001).

2.2.1. Glicoproteínas de la zona pelúcida en diferentes especies

El uso de técnicas de biología molecular ha permitido clarificar en gran parte cuál es la composición de la ZP en diferentes especies. Así, se ha caracterizado el marco abierto de lectura completo de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* en diferentes mamíferos (Harris *et al.*, 1994; Epifano *et al.*, 1995).

Los genes que codifican las proteínas de la ZP en mamíferos son *ZP1*, *ZPA*, *ZPC* y *ZPB* que codificarían las proteínas *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* respectivamente (Harris *et al.*, 1994; Topper *et al.*, 1997; Yonezawa *et al.*, 2001; Sinowatz *et al.*, 2001; Spargo y Hope, 2003).

La terminología usada para denominar cada una de las proteínas de la ZP es confusa y está siendo tema de debate en la actualidad. Las glicoproteínas fueron clasificadas originalmente como *ZP1*, *ZP2* y *ZP3* de acuerdo a su masa molecular estimada por la movilidad tras su separación mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) (Bleil y Wassarman, 1980a). Así, la glicoproteína *ZP1* es la de menor movilidad y la glicoproteína *ZP3* la de mayor movilidad. Recientemente, vista la confusa nomenclatura usada para la ZP, Spargo y Hope (2003) mediante un estudio filogenético proponen unificar el sistema de nomenclatura, en donde las 3 subfamilias *ZPA*, *ZPB*, *ZPC* serían identificadas numéricamente como *ZP2*, *ZP1* y *ZP3*. Desafortunadamente, en este trabajo no consideraron la existencia de especies con más de tres genes codificantes para proteínas de la ZP lo que hace que la terminología usada todavía en nuestros días sea confusa. Aún más recientemente Goudet y col. (2008) clasifican a los genes de la familia ZP en seis subfamilias: *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPD* y *ZPAX* (Goudet *et al.*, 2008) teniendo en cuenta sus relaciones filogenéticas.

En la tabla I se muestran las proteínas de la ZP descritas en cada una de las especies de los diferentes grupos animales.

Tabla I. Glicoproteínas de la zona pelúcida descritas en las diferentes especies

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	PROTEÍNAS	Nº DE ACCESO (GenBank)
MAMÍFEROS			
<i>Bos taurus</i>	Vaca	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	NM_173973 NM_173974 NM_173975
<i>Callithrix jacchus</i>	Tití común	ZP4/ZPB ZP2/ZPA	Y10822 Y10767
<i>Canis familiaris</i>	Perro	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB(secuencia parcial)	NM_001003304 NM_001003224 AY573930
<i>Felis catus</i>	Gato	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	NM_001009875 NM_001009330 NM_001009260
<i>Homo sapiens</i>	Hombre	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	NM_207341 NM_003460 NM_007155 NM_021186
<i>Macaca fascicularis</i>	Macaco cangrejero	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	AY222645 AY222644 AY222647
<i>Macaca radiata</i>	Macaco coronado	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	EF530200 Y10690 X82639
<i>Macaca mulatta</i>	Macaco rhesus	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	XM_001084628 XM_001093570 XM_001114760 XM_001096846
<i>Mesocricetus auratus</i>	Hámster dorado	ZP2/ZPA ZP3/ZPC	AY876920 M63629
<i>Microtus brandti</i>	Topillo de Brandt	ZP3/ZPC	AF304487
<i>Monodelphis domestica</i>	Colicorto gris o doméstico	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	XM_001379208 XM_001370665 XM_001378889 XM_001375250
<i>Mus musculus</i>	Ratón común, casero, doméstico o de laboratorio	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	NM_009580 NM_011775 NM_011776 XM_001481274 (pseudogen)
<i>Mustela erminea</i>	Armiño	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	AY779765(parcial) AY648050 AY779766
<i>Nottomys alexis</i>	Rata canguro	ZP3/ZPC	AY078054
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	L12167 U05782 (parcial) M58160
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpancé	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	XM_522022 XM_510869 XM_519164 XM_525105
<i>Papio cynocephalus</i>	Papión amarillo	ZP4/ZPB	AY222646
<i>Pseudomys australis</i>	Ratón de los llanos	ZPC/ZP3	AY078055
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata china o noruega	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	XM_001074922 NM_031150 NM_053762 NM_172330

<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	NM_213848 NM_213893 NM_214045
<i>Trichosurus vulpecula</i>	Posum de cola de escoba	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	AF079525 AF079524 AF263013
AVES			
<i>Coturnix japonica</i>	Codorniz	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB ZPD	AB061520 AB295393 AB081506 AB458445 AB301422
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	ZP1 ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB ZPD ZPAX	NM_204683 BN000517 NM-204389 NM_204879 AB114441 AJ698915
PECES			
<i>Carassius auratus</i>	Carpa dorada	ZP2/ZPA ZP3/ZPC	Z72495 AF18045
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	ZP2/ZPA ZP3/ZPC	AF331968 NM_131331
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	ZRP ZPBa ZPBb ZPC	AF407574 AF231706 AF231707 AF271708
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Platija americana	ZPB	U03674
<i>Salmo salar</i>	Salmón común	ZPC Ba Bb ZPB	X93306 AY928800 AY928798 AJ000665
ANFIBIOS			
<i>Xenopus laevis</i>	Rana de uñas africana	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB ZPX1 ZPX2	AF038151 U44952 XLU44950 AF225906 XLU44949
<i>Xenopus tropicalis</i>	Rana africana	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB ZPAX ZPD	NM_203524 NM_203522 NM_203523 NM_203520 NM_203521
<i>Bufo arenarum</i>	Sapo común	ZP2/ZPA ZP3/ZPC ZP4/ZPB	DQ394072 AY185123 DQ403815

2.2.2. Dominios estructurales de las proteínas de la familia ZP

El análisis de secuencias de ADN y de las proteínas de la familia ZP revela varios dominios dentro de las glicoproteínas de la ZP (McLeskey *et al.*, 1998) (Figura 7).

El dominio ZP consiste en una secuencia de 260 aminoácidos y fue identificado por primera vez en las glicoproteínas ZP2 y ZP3 de ratón (Bork y Sander, 1992). Este módulo contiene de 8 (ZP3) a 10 residuos de cisteína (ZP1 y ZP2) y se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Sin embargo, este dominio ZP se encuentra presente en otras muchas proteínas extracelulares como la proteína Tamm-Horsfall, glicoproteína-2, α y β -teictorina, TGF- β , y endoglina, entre otras (Jovine *et al.*, 2005). En diferentes estudios se ha demostrado que el dominio ZP es un módulo conservado que permite la polimerización de proteínas extracelulares (McLeskey *et al.*, 1998; Wassarman *et al.*, 2001; Jovine *et al.*, 2002). Se ha sugerido igualmente que los filamentos de proteínas que presentan dominios ZP deben tener una arquitectura tridimensional semejante (Jovine *et al.*, 2002).

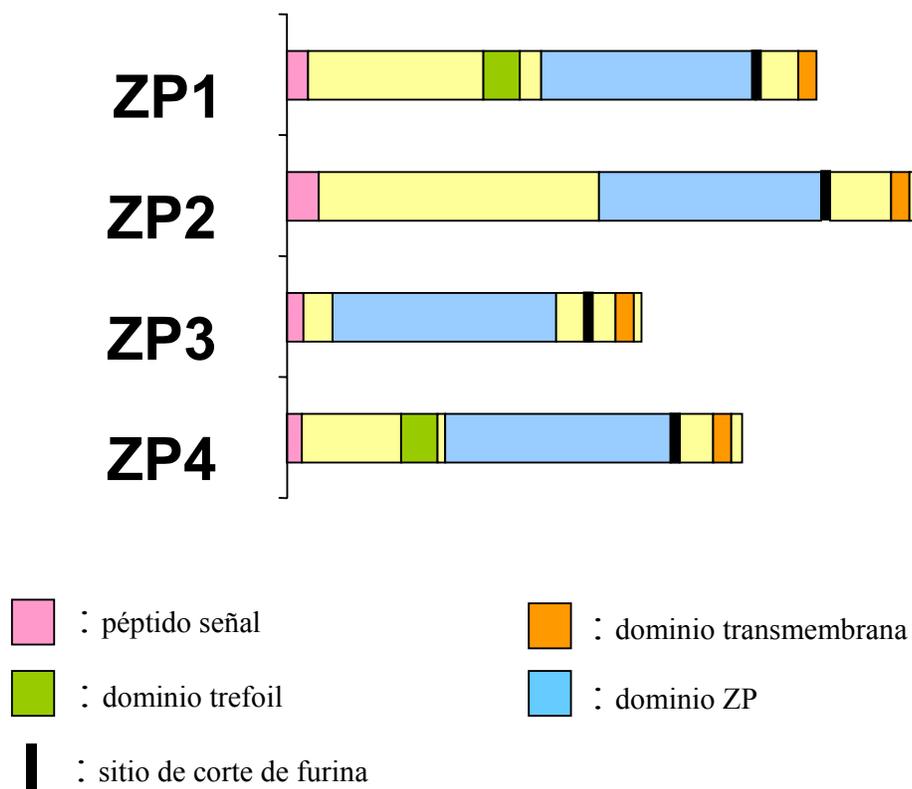


Figura 7. Descripción esquemática de los diferentes dominios presentes en las glicoproteínas de la ZP (modificado de Conner *et al.*, 2005).

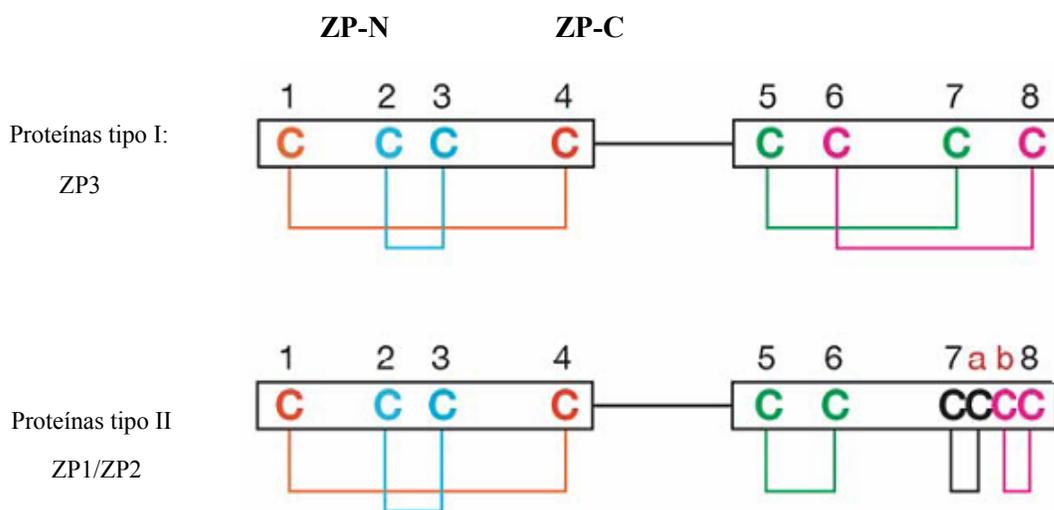


Figura 8. Proteínas tipo I y II. Unión entre cisteínas del dominio ZP (modificado de Jovine *et al.*, 2005)

Estudios recientes sugieren la siguiente hipótesis, el dominio ZP estaría formado por dos subdominios: el subdominio N-terminal (ZP-N) que contiene las cisteínas conservadas 1-4 que se unirían: 1-4, 2-3 y por otro lado el subdominio C-terminal (ZP-C) con las cisteínas 5 a la 8 que pueden adoptar dos tipos de conexiones entre ellas (Jovine *et al.*, 2005). En el tipo I de proteínas con dominio ZP (donde se encontraría la ZP3) la conectividad de las cisteínas dentro del subdominio ZP-C es 5-7, 6-8. En el tipo II, englobaríamos a las proteínas con 10 cisteínas dentro del dominio ZP como ZP1 y ZP2 donde las cisteínas se unirían así: 5-6, 7-a, b-8 (a y b son las dos cisteínas adicionales comparadas con las proteínas tipo I). Otro punto que hay que resaltar es que las proteínas tipo I (como ZP3) parecen polimerizar formando filamentos sólo en presencia de las proteínas del tipo II (como ZP1 y ZP2), mientras que las últimas pueden formar homodímeros (Figura 8).

Sin embargo, estudios posteriores en la ZP de cerdo revelan que mientras que el dominio ZP-N de ZP3 y ZP4 presenta unas uniones entre cisteínas como las hipotetizadas en estudios previos (Figura 8) las uniones entre el resto de cisteínas difieren a lo esperado (Kanai *et al.*, 2008). En la figura 9 mostramos los puentes disulfuro que han sido descritos en la ZP3 y ZP4 de esta especie.

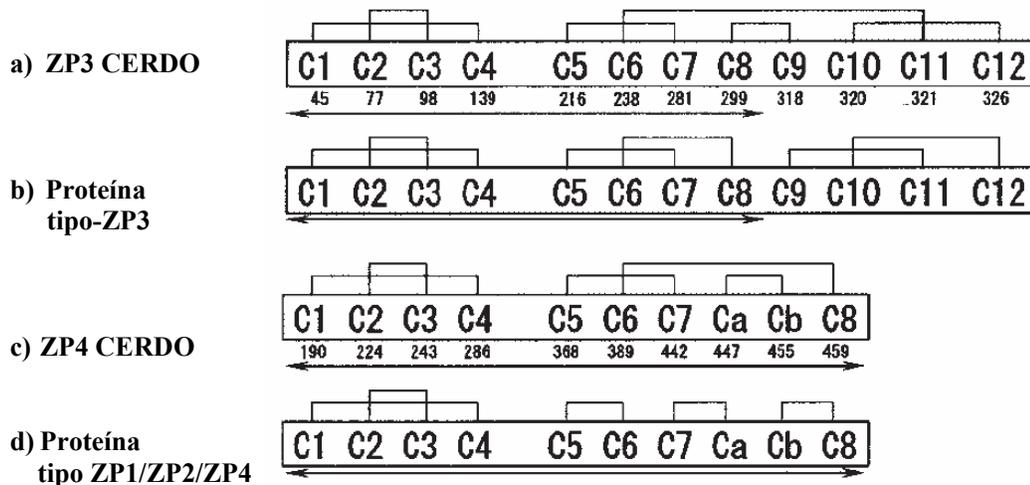


Figura 9. Representación esquemática de los puentes disulfuro formados entre cisteínas en ZP3 y ZP4 de cerdo (tomado de Kanai *et al.*, 2008). Las posiciones de las cisteínas se muestran considerando la metionina inicial como 1. a) uniones en ZP3 de cerdo b) uniones previamente descritas en proteínas tipo ZP3 c) uniones en el dominio ZP de la ZP4 de cerdo d) uniones previamente descritas en el dominio ZP de las proteínas tipo ZP1/ZP2/ZP4. El dominio ZP está indicado con flechas.

Recientemente, se ha descrito la estructura tridimensional del dominio ZP-N de la ZP3 murina mediante técnicas cristalográficas. Monné y col. (2008) determinan que dos tercios de ZP-N están constituidos por ocho β -hélices idénticas (designadas A, B, C, D, E, E', F y G) las cuales están interconectadas por bucles de longitud

variable. Las hélices forman una estructura tipo sándwich con dos hojas similar a la que encontramos en proteínas de la familia de las inmunoglobulinas (Figura 10)

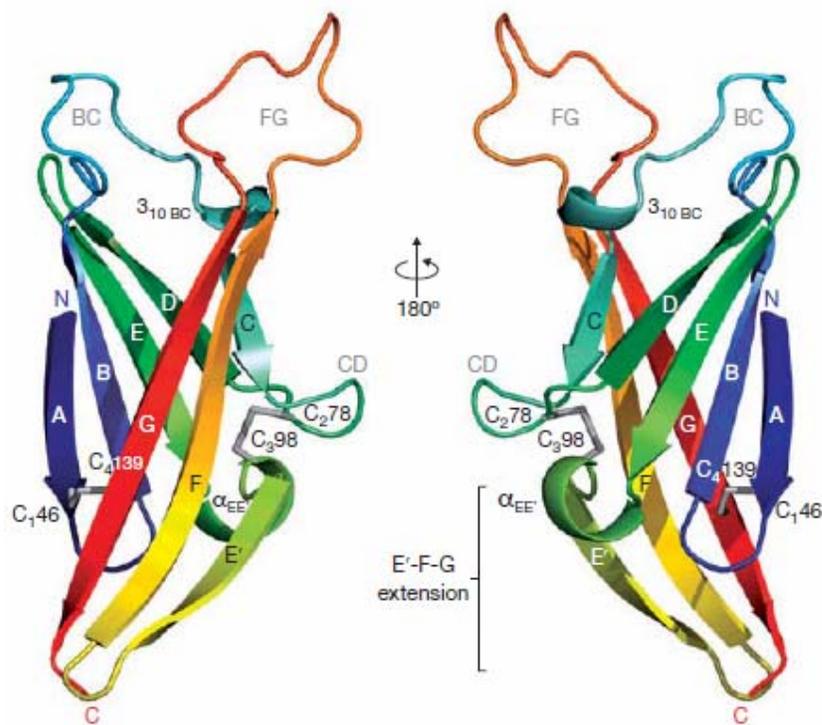


Figura 10. Representación esquemática de la estructura tridimensional del dominio ZP-N de ZP3 de ratón. En diferentes colores podemos ver las ocho hélices (A, B, C, D, E, E', F y G). El extremo N terminal está señalado con una N en azul y el extremo C terminal con una C en rojo. (Tomado de Monné *et al.*, 2008)

Adicionalmente, todas las proteínas de la familia de ZP poseen una secuencia hidrofóbica en posición N-terminal y C-terminal. El dominio hidrofóbico situado en posición C-terminal se corresponde con el dominio transmembrana (Bork y Sander, 1992; McLeskey *et al.*, 1998; Sinowatz *et al.*, 2001). Inmediatamente adyacente al dominio transmembrana encontramos un tallo citoplasmático de naturaleza hidrofílica. El dominio transmembrana de ZP2 y ZP3 es requerido para la

localización de estas glicoproteínas en la membrana del ovocito, donde se procederá al procesamiento del extremo carboxilo terminal y la incorporación de las glicoproteínas a la ZP (Jovine *et al.*, 2002, Hoodbhoy *et al.*, 2006).

El dominio trefoil se encuentra en la ZP4 y ZP1 y se corresponde con una región de 45 aminoácidos que es rica en aminoácidos cisteína. Se cree que este dominio provee de una mayor resistencia a la degradación proteolítica frente al ataque de enzimas acrosómicas o de los gránulos corticales durante la fecundación (McLeskey *et al.*, 1998) ya que las cisteínas suelen formar parte de los puentes disulfuro entre proteínas que contribuyen a mantener la estructura terciaria de las mismas incluso tras la ruptura de enlaces peptídicos.

Por otro lado, en la secuencia clonada de la mayoría de las ZP de mamíferos descritas hasta la fecha aparece conservado un dominio con la secuencia RX(R/K)R situado en posición previa al dominio transmembrana. Esta secuencia es un sitio consenso para un procesamiento proteolítico mediado por una endoproteasa del tipo proproteína convertasa siendo la más conocida la enzima furina. Este procesamiento proteolítico parece ser necesario para la secreción de las glicoproteínas de la ZP aunque diversos estudios indican que se produce justo antes de este dominio para furina (Kiefer y Saling, 2002; Qi *et al.*, 2002; Boja *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2003; Hoodbhoy *et al.*, 2006). Así la ZP3 de cerdo es procesada N-terminal al sitio consenso para corte de furina (Ser332).

Sin embargo, diferentes aspectos de este proceso tales como el tipo de convertasa, su localización celular y la ruta de secreción no han sido clarificadas en su totalidad (Zhao *et al.*, 2003).

2.3. Origen celular y formación de la zona pelúcida

El origen celular de las glicoproteínas de la ZP ha sido motivo de controversia durante largo tiempo. Las proteínas de la ZP de los mamíferos y las proteínas de la envoltura vitelina (VE) de los anfibios son sintetizadas en el ovario. Por otro lado las

proteínas de la VE de aves y peces son producidas en el hígado, en el ovario o en ambas localizaciones según la especie (Litscher y Wassarman, 2007) (Tabla II)

Tabla II: Procedencia celular de las glicoproteínas de la ZP y de la VE en los diferentes taxones

	Ovario	Hígado
Mamíferos (ZP)	+	-
Peces (EV)	+	+
Aves (EV)	+	+
Anfibios (EV)	+	-

2.3.1. Lugar de síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida en las diferentes especies

MAMÍFEROS

Basándonos en resultados obtenidos principalmente en la especie murina, el ovocito ha sido señalado como la célula responsable de la biosíntesis de la ZP. Sin embargo, las únicas especies en la que se ha demostrado síntesis exclusiva de glicoproteínas de la ZP en el ovocito es en el ratón (*Mus musculus*) (Bleil y Wassarman, 1980b; Skinner y Dunbar, 1992; Epifano *et al.*, 1995; Sinowatz *et al.*, 2001; El Mestrah *et al.*, 2002) y en la rata (Scobie *et al.*, 1999). En el resto de especies mamíferas estudiadas aunque el ovocito casi siempre está involucrado, se detecta la expresión de uno o más de estos genes en las células foliculares (Sinowatz *et al.*, 2001) (Tabla III).

Diferentes estudios realizados en diferentes especies animales apoyan la hipótesis de que la expresión de la ZP durante la ovogénesis es especie-específica (Kölle *et al.*, 1996, 1998; Bogner *et al.*, 2004).

Así, Lee y Dunbar (1993) demostraron que en el conejo ZP1 es expresada en ovocito y en células de la granulosa. Un caso similar encontramos con ZP3 en la especie bovina y con ZP4 en la especie porcina (Kölle *et al.*, 1996, 1998).

En el perro (*Canis familiaris*), el ovocito es responsable de la síntesis de ZP2, y las células de la granulosa son las encargadas de la síntesis de ZP3 y ZP4 (Blackmore *et al.*, 2004)

En el tití común (*Callithrix jacchus*) tanto el ovocito como las células foliculares expresan ZP2, ZP3 y ZP4 (Bogner *et al.*, 2004).

En el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) la contribución de las células de la granulosa a la expresión de los genes de la ZP ha sido demostrada por Martínez *et al.* (1996). El ARNm de ZP2 y ZP3 ha sido localizado en células de la granulosa, mientras que el ARNm de ZP4 solamente se ha localizado en el ovocito.

En cuanto a la especie humana, el tipo celular responsable de la síntesis de las glicoproteínas de la ZP está aún siendo objeto de debate. Las proteínas de la ZP pueden ser sintetizadas exclusivamente por el ovocito según algunos autores (Bousquet *et al.*, 1981; Eberspaecher *et al.*, 2001) o pueden ser sintetizadas por ambos, ovocito y células de la granulosa que lo rodean (Hinsch *et al.*, 1994; Lee y Dunbar, 1993).

La especie equina (*Equus caballus*) es otro ejemplo de cooperación en la síntesis de las glicoproteínas de la ZP (ZP4 y ZP3) en la que participan tanto ovocito como células foliculares (Kölle *et al.*, 2007).

Y como excepción dentro de los mamíferos, se encuentra el gato (*Felis catus*) que destaca por la exclusividad de las células de la granulosa en la actividad sintética de las proteínas de la ZP (Jewgenow y Rudolph, 2001).

Tabla III. Origen celular de la ZP en las diferentes especies de mamíferos

Nombre científico	Nombre común	Lugar de síntesis	Referencias
<i>Bos taurus</i>	Vaca	Ovocito y c. granulosa (ZP3)	Kölle <i>et al.</i> , 1996
<i>Callithrix jacchus</i>	Tití común	Ovocito y c. granulosa (ZP2, ZP3, ZP4)	Bogner <i>et al.</i> , 2004
<i>Canis familiaris</i>	Perro	Ovocito (ZP2) C.granulosa (ZP3, ZP4)	Blackmore <i>et al.</i> , 2004
<i>Equus caballus</i>	Caballo	Ovocito y c. granulosa (ZP3, ZP4)	Kölle <i>et al.</i> , 2007
<i>Felis catus</i>	Gato	C. granulosa	Jewgenow y Rudolph, 2001
<i>Homo sapiens</i>	Hombre	Controversia: Ovocito Ovocito y c.granulosa	Bousquet <i>et al.</i> , 1981 Eberspaecher <i>et al.</i> , 2001 Hinsch <i>et al.</i> , 1994 Lee y Dunbar, 1993
<i>Macaca fascicularis</i>	Macaco cangrejero	Ovocito (ZP4) C. granulosa (ZP2,ZP3)	Martínez <i>et al.</i> , 1996
<i>Mus musculus</i>	Ratón	Ovocito	Bleil y Wassarman, 1980b Skinner y Dunbar, 1992 Epifano <i>et al.</i> , 1995 Sinowatz <i>et al.</i> , 2001 El Mestrah <i>et al.</i> , 2002
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	Ovocito	Scobie <i>et al.</i> , 1999
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	Ovocito y c.granulosa (ZP4)	Kölle <i>et al.</i> , 1998

AVES

Por otro lado, en las especies de aves estudiadas (gallina, *Gallus gallus* y codorniz, *Coturnix japonica*) la síntesis de ZP3 es localizada exclusivamente en las células de la granulosa (Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999; Sasanami *et al.*, 2002). Los estudios realizados en la gallina han demostrado que dependiendo de la proteína estudiada la síntesis se localiza bien en las células foliculares (ZP3), o bien en el hígado en el caso de la síntesis de ZP1 (Bausek *et al.*, 2000). En esta

especie no ha podido detectarse actividad sintética de ZP1 ni en el ovocito ni en las células de la granulosa. Algunos transcritos de *ZP1* son también detectables en las glándulas adrenales pero en niveles bajos cuando se compara con el tejido hepático. La síntesis de ZP4 en esta especie aún no se ha resuelto (Tabla IV).

Tabla IV. Origen celular de la ZP en las diferentes especies de aves

Nombre científico	Nombre común	Lugar de síntesis	Referencias
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	C. granulosa (ZP3) Hígado (ZP1)	Waclawek <i>et al.</i> , 1998 Takeuchi <i>et al.</i> , 1999 Bausek <i>et al.</i> , 2000
<i>Coturnix japonica</i>	Codorniz	C. granulosa (ZP3)	Sasanami <i>et al.</i> , 2002

PECES

En el caso de los peces la síntesis de las glicoproteínas de la ZP puede localizarse en el ovario, en el hígado o darse simultáneamente en las dos localizaciones. En la tabla V se muestra el lugar de síntesis de la ZP en diferentes especies de peces.

Por lo tanto, dada la variedad existente en el patrón de expresión de las proteínas de la zona pelúcida según la especie objeto de estudio, resulta de especial interés conocer en cada caso cual o cuales son las células responsables de la síntesis de las glicoproteínas que configuran esta matriz extracelular de fundamental relevancia en el proceso de la fecundación.

Tabla V. Origen de la ZP en las diferentes especies de peces.

Nombre científico	Nombre común	Lugar de síntesis	Referencias
<i>Dicentarchus labrax</i>	Lubina	Hígado	Scapigliati <i>et al.</i> , 1994, 1999 Hyllner <i>et al.</i> , 1995
<i>Gadus morhua</i>	Bacalao común	Hígado	Oppen-Bernsten <i>et al.</i> , 1990, 1992
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán o halibut	Hígado	Hyllner <i>et al.</i> , 1994
<i>Oncorhynchus masou</i>	Salmón	Hígado	Fujita <i>et al.</i> , 2002, 2004, 2008.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	Hígado	Hyllner y Haux, 1992 Hyllner <i>et al.</i> , 2001
<i>Salvelinus alpinus</i>	Trucha alpina	Hígado	Westerlund <i>et al.</i> , 2001 Berg <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Platija americana	Hígado	Lyons <i>et al.</i> , 1993
<i>Carassius auratus</i>	Carpa dorada	Ovario	Chang <i>et al.</i> , 1997
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa	Ovario	Chang <i>et al.</i> , 1997
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Ovario	Bonsignorio <i>et al.</i> , 1996 Wang y Gong, 1999 Del Giacco <i>et al.</i> , 2000
<i>Oryzias latipes</i>	Medaka	Hígado/ovario	Hamazaki <i>et al.</i> , 1989 Kanamori <i>et al.</i> , 2003
<i>Sparus aurata</i>	Dorada	Hígado/ovario	Hyllner <i>et al.</i> , 1995 Del Giacco <i>et al.</i> , 1998 Modig <i>et al.</i> , 2006

2.3.2. Síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida en los diferentes estadios de la foliculogénesis

El conocimiento de las diferencias especie-específicas en la expresión de las proteínas de la ZP durante la oogénesis es no sólo importante para comprender los

eventos celulares y moleculares que regulan el desarrollo ovocitario, sino que tiene implicaciones por ejemplo, en el desarrollo de vacunas anticonceptivas. En este último caso, por ejemplo, en el ovario del títí común se demostró que la glicoproteína ZP2 pero no la ZP3 es detectada en la capa de células foliculares que rodea a los folículos primordiales. Si fabricásemos anticuerpos dirigidos contra antígenos de la ZP2 podríamos inducir una infertilidad irreversible a causa de la destrucción de folículos primordiales, destruyendo así la reserva de ovocitos del que dispone la hembra. Si lo que buscamos es un estado de infertilidad reversible en esta especie el uso de un anticuerpo contra ZP3 podría ser más apropiado como agente contraceptivo.

Las diferencias interespecíficas no sólo se reflejan en el lugar de síntesis de las proteínas de la ZP sino que encontramos diferencias también en la cinética de expresión del proceso de síntesis de estas proteínas según la especie que consideremos. En el ratón, ZP1, ZP2 y ZP3 se expresan coordinadamente durante la fase de crecimiento del ovocito alcanzando el máximo de expresión en ovocitos de 50 μm (Epifano *et al.*, 1995). Los tres genes que codifican para las tres proteínas exhiben un patrón ordenado de expresión durante toda la ovogénesis, con un incremento de expresión durante los primeros estadios de la ovogénesis declinando en los ovocitos maduros (80 μm). Después de la ovulación, los ovocitos tienen menos de un 5% de la expresión si la comparamos con el pico máximo alcanzado durante el desarrollo folicular (Epifano *et al.*, 1995). ZP1 es el menos abundante de los tres transcritos, representando aproximadamente un 11,1 % del total de los ARNm codificantes para las proteínas de la ZP. Los ARNm de ZP2 y ZP3 suponen el 88,8 % del ARN, expresándose de forma equimolar. Epifano y col. (1995) sugieren que los tres genes se encuentran bajo elementos reguladores de la transcripción comunes. Se ha identificado, analizando la región promotora de ZP2 y ZP3 un factor de transcripción llamado ZAP-1 (del inglés Zona Activating Protein) implicado en la regulación de la expresión de los genes de la ZP (Millar *et al.*, 1991, 1993). Otro factor que también está implicado en la expresión coordinada de los genes codificantes para las proteínas de la ZP es el factor FIG α que participa en la

transcripción de los tres genes (*ZP1*, *ZP2* y *ZP3*) en el ratón (Liang, 1997; Soyol *et al.*, 2000; Dean, 2002).

En otras especies, los patrones difieren del encontrado en la especie murina. Así, en el caso del bovino, ARNm de *ZP3* es localizado en el citoplasma del ovocito de folículos primordiales y primarios. Sin embargo, en folículos secundarios tanto el ovocito como las células de la granulosa contienen ARNm de *ZP3*, y en ovocitos terciarios y preovulatorios los transcritos se localizan principalmente en citoplasma del ovocito y células que conforman la corona radiada (Kölle *et al.*, 1998). Después de la fecundación la síntesis de proteínas de la ZP finaliza, hecho que ha sido descrito en varias especies.

En el perro, la proteína *ZP2*, que se expresa exclusivamente en el ovocito, presenta un pico de expresión en folículos primarios y secundarios. Mientras que *ZP3* y *ZP4*, que son sintetizadas por las células de la granulosa, se sintetizan en los folículos en crecimiento exceptuando los folículos primordiales y primarios (Blackmore *et al.*, 2004).

En el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*), *ZP3* es expresada en los estadios tempranos de los folículos, *ZP2* se detecta en los folículos primarios y *ZP1* aparece en los folículos secundarios (Eberspaecher *et al.*, 2001) mientras que en el ovario del macaco “tití” (*Callithrix jacchus*), *ZP2*, pero no *ZP3*, aparece en folículos primordiales (Bogner *et al.*, 2004).

En la especie equina, la expresión de *ZP3* y *ZP4* comienza en el ovocito en folículos primordiales tardíos y primarios. En los folículos secundarios tanto el ovocito como las células de la granulosa contribuyen a la síntesis de estas dos glicoproteínas (Kölle *et al.*, 2007).

En el gato, la síntesis proteica es secuencial, primero comienza la expresión de *ZP4* detectándose en folículos primarios en crecimiento, mientras que el resto de genes (*ZP2* y *ZP3*) se expresan más tardíamente (Jewgenow y Fickel, 1999).

2.4. Secreción y procesamiento de las glicoproteínas de la zona pelúcida.

El proceso por el cual las glicoproteínas de la ZP son sintetizadas, secretadas e incorporadas por el ovocito en la matriz de la ZP está siendo una importante materia de debate.

Poco se conoce acerca del proceso de tráfico intracelular o de los mecanismos por los cuales las proteínas son secretadas para formar la matriz insoluble de la ZP. Lo que sí se conoce es que estos mecanismos están bastante conservados en las diferentes especies, así aunque el anfibio *Xenopus laevis* (rana de uñas africana) y los mamíferos evolutivamente divergieron hace unos 350 millones de años, si microinyectamos ARNm murino que codifica para ZP1, ZP2 y ZP3 estos ARNm son traducidos y las proteínas incorporadas en la membrana vitelina que rodea a los ovocitos de *Xenopus* (Doren *et al.*, 1999).

El tráfico intracelular de la ZP3 ha sido monitorizado mediante la expresión de ZP3 unida a EGFP (proteína fluorescente verde) en ratones transgénicos. La visualización de esta glicoproteína anclada al fluorocromo indica que la ZP3 es conducida por el péptido señal en la ruta de síntesis del ovocito desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi donde es glicosilada (Zhao *et al.*, 2003). En el citoplasma de ovocitos en crecimiento encontramos unas estructuras inusualmente grandes (0,5-3,0 μm) en las que encontramos anclada ZP3-EGFP (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). La localización periférica de ZP3-EGFP en estas estructuras circulares ancladas a lípidos de membrana y la copresencia de synaptobrevina (VAMP), proteína de membrana asociada a vesículas (Lin y Scheller, 2000), sugirieron que estas estructuras surgirían del compartimento post-Golgi como vesículas secretoras (Qi *et al.*, 2002). Sin embargo, estas estructuras circulares surgen en etapas más tempranas en la ruta de síntesis puesto que se observó mediante microscopía electrónica en ovocitos de rata que estas formaciones concéntricas pertenecían a retículo endoplasmático (Kang, 1974) y mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-PDI (proteína disulfuro isomerasa) localizada en membranas de retículo endoplasmático, se pudo determinar que estas

“mega-vesículas” en realidad eran retículo endoplasmático rugoso circular (Hoodbhoy *et al.*, 2006).

La ZP1 murina no se considera esencial para la formación de la ZP ya que los ratones “knock out” para este gen forman una ZP que permite la fecundación y un desarrollo preimplantatorio normal (Rankin *et al.*, 1999) de manera que los estudios se han centrado en la determinación del tráfico intracelular de ZP2 y ZP3. Estudios de coimmunoprecipitación determinan que no hay interacciones físicas entre las dos proteínas durante el tráfico en el interior del ovocito. Las observaciones de que ZP3 es incorporada a una fina ZP en ausencia de ZP2 (Rankin *et al.*, 2003) y que ZP2 está presente en la membrana plasmática en ausencia de ZP3 (Hoodbhoy *et al.*, 2006) están de acuerdo con la afirmación de que ZP2 y ZP3 progresan independientemente en el ovocito antes de ensamblarse para formar la matriz de la ZP (Hoodbhoy *et al.*, 2006).

Durante la síntesis y antes de la incorporación en la ZP extracelular, las proteínas de la ZP sufren importantes modificaciones. El péptido señal que se encuentra formado por aproximadamente los 20 primeros aminoácidos es cortado y resulta un extremo N-terminal de la proteína donde la glutamina es ciclada a piroglutamina (Ringuette *et al.*, 1988; Boja *et al.*, 2003). También son cortados o procesados el dominio transmembrana y el tallo citoplasmático puesto que anticuerpos que reconocen estas secuencias no reaccionan contra la ZP secretada (Boja *et al.*, 2003).

Además, análisis realizados mediante espectrometría de masas de las proteínas de la ZP demuestran el procesamiento de estas proteínas a estos dos niveles. A nivel del extremo carboxi-terminal el sitio de corte se realiza en un dominio bastante conservado RXK/RR reconocido por furina. Así, por ejemplo, en la rata el último aminoácido correspondería His544 en ZP1 Asn351 en ZP3 y Arg473 en ZP4. El corte se sitúa efectivamente dentro del sitio consenso para corte de furina (justo en la mitad), entre los aminoácidos RX y los K/RR (Boja *et al.*, 2005, Hoodbhoy *et al.*, 2005)

Por otro lado, el hecho de que la mutación del motivo RNRR a ANAA o RNGE no impida la secreción o incorporación de la ZP3 en la ZP sugiere que tiene que haber un sitio alternativo de procesamiento (Kiefer y Saling, 2002; Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002). El mecanismo adicional por el cual el ectodominio de las distintas glicoproteínas de la ZP es liberado del dominio transmembrana en la superficie celular no ha sido todavía clarificado.

Recientemente, también se ha observado la presencia de una región hidrofóbica que se encuentra entre el dominio furina y el dominio transmembrana. Esta región se encuentra bien conservada en los mamíferos y su posición es semejante en las tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3). La mutación de esta zona hidrofóbica (VTVGPLIFL) en ZP3 impide la incorporación de la misma en la ZP (Zhao *et al.*, 2003). Sin embargo, el papel de este pequeño dominio debe ser determinado. Se especula que podría servir como sitio de unión de proteínas tipo chaperonas importantes para el tráfico intracelular de las proteínas de la ZP.

Todos estos resultados nos hacen formular dos preguntas; 1) si el sitio de furina no es requerido, como es la ZP3 liberada de la membrana plasmática para la incorporación en la matriz de la ZP y 2) por qué el sitio de corte de furina y su localización por encima del dominio transmembrana está tan bien conservado en las distintas especies. La conservación del sitio de corte de furina en la mayoría de las proteínas de la ZP es bastante inquietante. Incluso cuando está ausente hay residuos dibásicos en la misma región que pueden actuar como sitios potenciales de corte. Aunque siempre tenemos que tener en cuenta que este sitio puede estar presente y no ser utilizado como ocurre en otras proteínas que son secretadas, incluyendo la metaloproteasa meprin A, la proteína gp160 de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humano tipo I, y el receptor de la tirotropina.

En cuanto a los dominios transmembrana de ZP2 y ZP3 hay que destacar que pueden ser requeridos para la colocalización de las proteínas en la membrana plasmática del ovocito donde es procesado el extremo C-terminal para la incorporación de las proteínas a la ZP. Es interesante resaltar que este dominio transmembrana no está presente en las glicoproteínas de la ZP de peces que son

sintetizadas en el hígado y que son transportadas vía sanguínea para su incorporación a la ZP (Darie *et al.*, 2004, 2005; Sugiyama *et al.*, 1999; Hyllner *et al.*, 2001).

2.5. Zona pelúcida de hámster

La ZP de hámster está compuesta de un pequeño número de glicoproteínas. Cada una de estas proteínas presenta una extensa heterogeneidad en SDS-PAGE, coincidiendo con el comportamiento que presentan las glicoproteínas de la ZP de otros mamíferos (Dunbar y Wolgemuth, 1984; Hedrick y Wardrip, 1987; Noguchi *et al.*, 1994; Wassarman, 1988). La ZP de hámster está compuesta por tres glicoproteínas, ZP1, ZP2 y ZP3 y tienen un peso molecular de 103, 208 y 56 kDa respectivamente en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (Oikawa *et al.*, 1988; Moller *et al.*, 1990). No obstante, solamente están descritos los ADNc que codifican para ZP2 y ZP3, con números de acceso en el GenBank: AY876920 y M63629, respectivamente.

Los resultados de ensayos de competición *in vitro* sugieren que la ZP3 de hámster es el receptor primario del espermatozoide (Moller *et al.*, 1990) al igual que la ZP3 de ratón. La ZP3 de hámster se identificó y caracterizó (Moller *et al.*, 1990) demostrando la diferencia en el peso molecular que tiene con la ZP3 de ratón, 56 kDa el hámster, 83 kDa ratón. Esta diferencia se debe a la desigual glicosilación que presentan estas dos glicoproteínas puesto que el tamaño del ARNm es semejante y el peso de los dos péptidos sin glicosilar es de 44 kDa. El polipéptido de la ZP3 de hámster tiene un 81% de identidad con el polipéptido de la ZP3 de ratón y solamente una pequeña región de la ZP3 de hámster (residuos 318-356) es significativamente diferente a la ZP3 de ratón (Kinloch *et al.*, 1990). Además, el espermatozoide de hámster es capaz de unirse al ovocito de ratón y el espermatozoide de ratón es capaz de unirse al ovocito de hámster (Schmell y Gulyas, 1980; Moller *et al.*, 1990). Esto sugiere que los determinantes de las cadenas oligosacáridicas responsables de la interacción entre estos gametos son comunes.

La ZP de ratón solubilizada induce la reacción acrosómica en el espermatozoide de ratón pero no en el espermatozoide de hámster en ensayos *in*

vitro. Sin embargo, la ZP solubilizada de hámster induce la reacción acrosómica en el espermatozoide de ambas especies, ratón y hámster (Moller et al., 1990). De manera que la ZP de hámster retiene los determinantes moleculares para inducir la reacción acrosómica en el espermatozoide de ratón. También es interesante resaltar que el espermatozoide de hámster se une y penetra la ZP humana, mientras que el espermatozoide humano no es capaz de unirse a la ZP de hámster (Yanagimachi, 1994).

La ZP2 de ratón esta sujeta a proteólisis después de la activación del ovocito, pasando de ZP2 a ZP2_f (denominación de ZP2 tras la fecundación) (Moller y Wassarman, 1989). En el hámster, también se ha demostrado que ocurre este procesamiento proteolítico de la ZP2 después de la activación de los ovocitos (Moller *et al.*, 1990). Ovocitos activados de ratón causan la conversión de ZP2 a ZP2_f de hámster, y ovocitos activados de hámster convierten la ZP2 a ZP2_f en ratón, indicando que ambas especies poseen una proteasa para ZP2 con un sustrato específico muy similar y que ZP2 de hámster y de ratón son muy similares (71 % de identidad entre las secuencias proteicas) (Moller *et al.*, 1990).

2.5.1. Análisis bioquímico de la zona pelúcida de hámster

Resultados de un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación acerca de la composición proteica de la ZP del hámster (Jiménez-Movilla *et al.*, 2009) apuntaban la posibilidad de que, contrariamente a lo descrito hasta el momento, existieran cuatro proteínas en la ZP de ovocitos de hámster.

Este estudio se inició con la obtención de ZP de hámster (a partir de ovarios de hámster) mediante la solubilización por calor. La muestra fue separada mediante electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron incubadas con la lectina WGA conjugada con HRP pudiendo observar dos bandas: una banda ancha por encima de 90 kDa e inferior de 200 kDa y otra banda de 56 kDa (Figura 11a). Estas dos bandas habían sido descritas previamente y se corresponden con ZP1 y ZP2, la banda superior y

ZP3 la banda de 56 kDa (Moller *et al.*, 1990). Sin embargo, cuando las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo solamente fue inmunorreactiva la banda inferior de 56 kDa (Figura 11b).

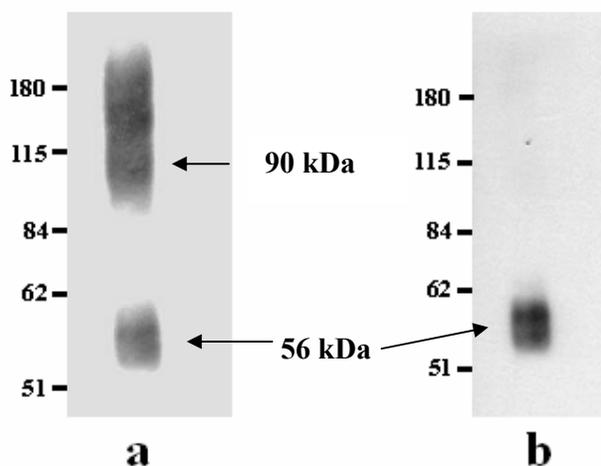


Figura 11. Caracterización mediante electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y Western-blot de las glicoproteínas de la ZP de hámster (a) WGA-HRP. La lectina mostró afinidad por la banda superior a 90 kDa y la banda de 56 kDa. (b) Anti-ZP de cerdo. El anticuerpo reconoce únicamente la banda de 56 kDa.

Por otro lado, como el patrón de las bandas en el Western sugería que se trataba de proteínas altamente glicosiladas y difíciles de resolver con esta técnica analítica, las glicoproteínas de la ZP de hámster fueron tratadas con la enzima N-glicosidasa F para eliminar específicamente las cadenas oligosacarídicas del tipo N-unidas. Una vez digeridas, se analizaron de nuevo mediante electroforesis y Western-blot.

Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo (Figura 12a) y pudimos observar la presencia de cuatro bandas con pesos moleculares de 67 kDa, 60 kDa, 48 kDa y 38 kDa aproximadamente (Figura 12a, calle 2). Sin embargo, en el correspondiente control, que fue incubado sin la enzima,

sólo se detectó la presencia de la banda de 56 kDa (Figura 12a, calle 1). El procedimiento de deglicosilación también fue aplicado a la banda aislada de 56 kDa (Figura 12b). Este tratamiento enzimático demostró la presencia de dos bandas de peso molecular de 48 y 38 kDa respectivamente (Figura 12b, calle 2).

Por lo tanto las figuras 11 y 12 permiten deducir sin ambigüedad que, las bandas de 67 y 60 kDa corresponden a las proteínas deglicosiladas procedentes de la banda ancha de 90-200 kDa. Por otro lado, las bandas de los polipéptidos de 38 y 48 kDa corresponden a las proteínas deglicosiladas procedentes de la banda de 56 kDa.

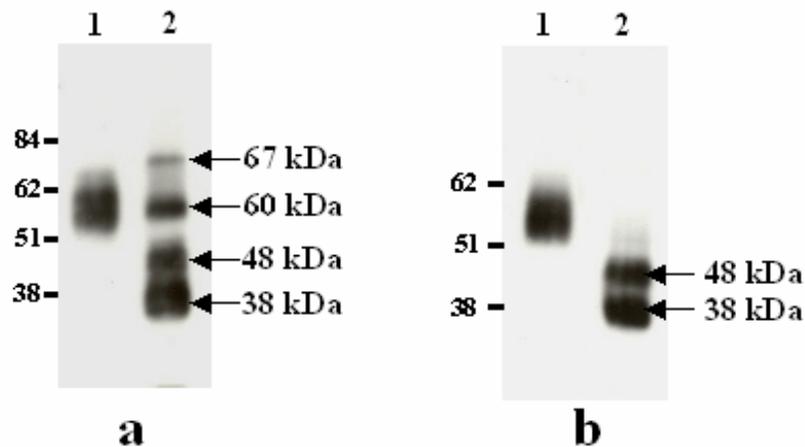


Figura 12. Digestión con la enzima N-glicosidasa F de las glicoproteínas de la ZP de hámster. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo (a) Tratamiento enzimático de la ZP total de hámster. Calle 1: ZP total de hámster incubado sin la presencia de la enzima. Calle 2: ZP total digerida con la enzima. Nótese como cuatro bandas (flechas) en el blot se vuelven reactivas al anticuerpo anti-ZP de cerdo cuando las glicoproteínas son deglicosiladas por la enzima. (b) Tratamiento enzimático de la banda de 56 kDa. Calle 1: Fracción de 56 kDa incubada sin la enzima. Calle 2: Fracción de 56 kDa digerida con la enzima. Se puede observar la presencia de dos bandas (flechas) deglicosiladas.

Así, tras la deglicosilación de la ZP de hámster con la enzima N-glicosidasa F se detecta la presencia de cuatro bandas marcadas específicamente con un anticuerpo contra las glicoproteínas de la ZP. Este hecho nos hace suponer que el hámster al igual que la ZP humana y de rata expresa cuatro glicoproteínas. Estas bandas tienen un peso similar si las comparamos con las glicoproteínas maduras (secretadas por el ovocito) sin el péptido señal, el dominio transmembrana y sin las cadenas glucídicas descritas para el ratón, la rata y la especie humana entre otras.

Es por ello que uno de los objetivos de este estudio fue la amplificación de los genes codificantes para ZP4 y ZP1, que no habían sido caracterizados hasta el momento así como la detección por espectrometría de masas de diferentes péptidos correspondientes a cada una de las cuatro glicoproteínas.

3.- EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA

3.1. Evolución de las proteínas reproductoras

Una evolución rápida de las proteínas involucradas en la reproducción ha sido documentada en una amplia variedad de taxones desde las diatomeas hasta los primates (Singh y Kulathinal, 2000; Swanson y Vacquier 2002). Además, estas proteínas evolucionan más rápidamente que otras proteínas no involucradas en la reproducción. Así, la variación entre proteínas reproductivas en *Drosophila* es dos veces mayor que la variación existente entre proteínas de tejidos no involucrados en el proceso reproductivo (Civetta y Singh, 1995).

La identificación de genes que evolucionan de manera rápida midiendo el porcentaje total de divergencia no nos proporciona información sobre las posibles causas de esta rápida evolución. Por ejemplo, una evolución rápida puede ser debida a una ausencia de selección purificante (por ejemplo, la acumulación rápida de mutaciones en un pseudogen). Por otro lado, una evolución rápida podría ser debida a una evolución adaptativa, que ocurre cuando es la selección natural la que promueve la divergencia en las secuencias aminoacídicas. Una manera de distinguir

entre estas dos alternativas es comparar secuencias de ADN de las regiones codificantes entre especies. Cada cambio nucleotídico es clasificado en un cambio no-sinónimo cuando cambia el aminoácido o sinónimo (silente) cuando no cambia la secuencia de aminoácidos.

El ratio dN/dS (número de sustituciones no sinónimas entre número de sustituciones sinónimas) define el tipo de evolución: si es igual a 1 hablamos de una evolución neutral y si es mayor que uno hablamos de una selección positiva.

La existencia de selección positiva indica que hay una ventaja adaptativa con el cambio de aminoácido y esta señal puede ser utilizada para identificar regiones génicas de importancia sobre todo en procesos de divergencia y adaptación.

Así, y debido a que las proteínas reproductivas regulan procesos esenciales y están directamente relacionadas con la supervivencia de una especie se ha sugerido que estas proteínas podrían evolucionar como resultado de una evolución adaptativa (selección positiva) (Swanson y Vacquier, 2002). Este patrón de evolución como resultado de una adaptación nos sugiere dos cuestiones: primero, ¿cuales son las fuerzas selectivas que lideran la evolución de estas proteínas reproductoras? ¿estas fuerzas selectivas surgen de presiones exógenas (por ejemplo ataques de microorganismos) o de fuerzas endógenas mediadas por los gametos durante la fecundación (conflicto entre el éxito reproductivo de la hembra y del macho)? Estudios recientes sugieren que la coevolución entre pares de proteínas de los dos gametos que interaccionan en la fecundación es la principal fuerza que lidera la evolución adaptativa de las proteínas reproductoras (Swanson y Vacquier, 2002). Uno de los miembros del par espermatozoide-ovocito cambia primero y el otro miembro se adapta a este cambio para maximizar la interacción entre ambos.

Y la segunda pregunta: ¿cuales son las consecuencias funcionales de la diversificación de las proteínas reproductoras? Estudios experimentales muestran que dominios funcionales de proteínas reproductoras que evolucionan bajo una evolución adaptativa son suficientes para producir el aislamiento reproductivo entre especies estrechamente relacionadas (Lyon y Vacquier, 1999)

En diversos organismos y a diferentes niveles del proceso reproductivo se han identificado proteínas que evolucionan de manera rápida.

Así, en *Drosophila* destaca la proteína Acp26Aa relacionada con la inducción de la ovulación (Tsaury Wu, 1997) y la Acp36DE relacionada con el almacenaje del esperma (Begun *et al.*, 2000).

También podemos destacar, en la hembra, algunos ejemplos de proteínas involucradas en la reproducción bajo selección positiva. Una de ellas es la oviductina (en inglés OGP de oviductal glycoprotein). La oviductina se ha relacionado con la regulación de la unión ovocito-espermatozoide contribuyendo al control de la polispermia (Coy *et al.*, 2008) estando, esta proteína, también sometida a una selección positiva (Swanson *et al.*, 2001).

También en la oreja de mar destacamos la proteína sp18. Esta proteína del espermatozoide ha sido relacionada con la fusión de gametos y quizás sea la proteína de metazoos que más rápidamente evoluciona de todas las descritas hasta ahora (Swanson y Vacquier, 1995). Evoluciona 50 veces más rápido que la proteína de más rápida evolución de los mamíferos.

3.2. Evolución molecular de las glicoproteínas de la zona pelúcida

La ZP está directamente implicada en el reconocimiento del espermatozoide en el proceso de fecundación. Este hecho es el que ha guiado a muchos autores a estudiar la evolución de las proteínas constituyentes de esta matriz por sus implicaciones a nivel de la especie-especificidad, implicación de esta evolución en la especiación...etc (Swanson *et al.*, 2001, Turner *et al.*, 2006; Swann *et al.*, 2007). ZP3 y ZP2 son las proteínas constituyentes de la ZP que más han sido estudiadas desde el punto de vista evolutivo siendo consideradas como proteínas de evolución rápida. De hecho, ZP2 y ZP3 están entre el 10% de las proteínas que más difieren cuando comparamos los roedores y los humanos. ZP3 es el receptor primario para el espermatozoide y responsable de la inducción de la reacción acrosómica de manera especie-específica en especies como el ratón o la especie humana. ZP2, por otro lado, actúa como receptor secundario uniendo al espermatozoide reaccionado.

Si nos centramos en ZP3, la zona más estudiada de la proteína es la correspondiente al exón 7 que ha sido relacionada con la unión al espermatozoide. Experimentos de mutagénesis dirigida en la ZP3 de ratón fueron realizados para determinar la función de esta región dentro de la proteína. Han sido las serinas Ser-332 y Ser-334 las más relacionadas con la unión. La mutación de estas dos serinas resulta en la producción de una ZP3 en el ratón inactiva. Es la secuencia aminoacídica de esta región del polipéptido la que manifiesta una importante divergencia durante la evolución. Así por ejemplo, si las secuencias de aminoácidos de la ZP3 murina y la ZP3 humana presentan un 67% de similitud, la región que engloba desde el aminoácido 329 hasta el 342 presenta solamente un 28 % de identidad. Tres de las cinco serinas que tiene esta región en el ratón están conservadas en la ZP3 humana (Ser-331, Ser-332, Ser-334) que presenta un residuo de serina adicional: Ser-342. Comparando estas dos regiones en las dos especies se observa que ha tenido lugar el doble de cambios que en cualquier otra región de la proteína. Además del exón 7, Swanson y col. (2001) señalan al extremo N-terminal como otra región sometida a selección positiva. Estos autores también detectan algunas regiones sometidas a este tipo de selección en ZP2. Tanto la zona N-terminal de ZP3 como las regiones detectadas en ZP2 como sometidas a selección positiva son candidatas para la realización de estudios en los que se esclarezcan la posible implicación de dichas zonas en la especie-especificidad.

Más recientemente se ha seguido estudiando la evolución de ZP3 en particular en la región del exón 7 en roedores del género *Mus* (Jansa *et al.*, 2003); roedores del género *Peromyscus* (Turner y Hoekstra, 2006) y en roedores australianos (Swann *et al.*, 2007). Hay que destacar que los cambios ocurridos en especies que están estrechamente relacionadas pueden ser más relevantes o informativos para la comprensión de como ciertos cambios aminoacídicos afectan a la reproducción y en último lugar al aislamiento reproductivo.

En el trabajo de Jansa y col. del 2003 se estudia la secuencia codificante del exón 6 y 7 de ZP3 de 13 especies de *Mus* y dos especies más distantes. El análisis usa *Rattus norvegicus* como grupo externo. Varios aminoácidos fueron detectados

bajo selección positiva ($\omega=2,4$) de los cuales tres sitios presentan una probabilidad a posteriori mayor de 0,95. Dos de los 3 sitios fueron localizados en la región codificante del exón 7 aunque estos sitios no coinciden con los identificados por Swanson y col. (2001). Jansa y col. especulan que los cambios en residuos cercanos a la zona de unión con el espermatozoide pueden afectar a patrones de glicosilación de residuos de serinas y consecuentemente estos cambios pueden afectar al reconocimiento del espermatozoide.

Ambos trabajos, el de Swanson *et al.* (2001) y el de Jansa *et al.*, (2003) han sido cuestionadas en dos estudios: Berlin y Smith del 2005 y Turner y Hoekstra del 2006. Berlin y Smith reanalizan los datos de Swanson *et al.* (2001) usando el método de máxima verosimilitud (maximum likelihood method) pero con diferentes parámetros. El análisis incluye las mismas ocho secuencias usadas por Swanson *et al.* (2001) más siete secuencias más de especies de mamíferos: vaca, conejo, zorro, hurón, leming, topillo de Brand y hámster. Al contrario que Swanson, Berlin y Smith no encuentran evidencias convincentes de selección positiva. Ellos afirman que el grupo de modelos (M7-M8) usados no son indicadores fiables de selección positiva y pueden generar falsos positivos (Berlin y Smith, 2005). Un hecho que no ha sido observado ni por Swanson y col. ni por Berlin y Smith es que la secuencia de ZP3 humana usada en sus estudios no es correcta. Ésta contiene una inserción de un nucleótido en el exón 8 que resulta en un cambio en el patrón de lectura truncando la proteína de manera prematura (NCBI número de acceso X56777: Van Duin *et al.*, 1992; Kipersztok *et al.*, 1995). Los sitios detectados dentro de la región codificante del exón 8 por Swanson *et al.*, (2001) como sometidos a selección positiva son un error atribuible al uso de esta secuencia (Tesis doctoral de Swann, 2007).

Turner y Hoekstra (2006) investigaron la evolución del exón 6 y 7 de ZP3 en especies del género *Peromyscus* (roedores norteamericanos). Usando los modelos M1a/M2a, M7/M8 y M8/M8a los autores encuentran que hay tres sitios bajo selección positiva ($\omega=2,09$), pero sólo uno de ellos (mZP3-346) tiene una probabilidad *a posteriori* mayor de 0,95. También encuentran diferencias intraespecíficas (polimorfismos) e interespecíficas en el exón 6 y 7. Turner y

Hoekstra también reanalizan los datos de Jansa y col. (2003) para estudiar si hay evidencias de selección positiva cuando el grupo externo *Rattus* es excluido. Cuando el grupo *Rattus* es eliminado no hay pruebas de selección positiva según estos autores concluyendo que al contrario de lo que ocurre en el género *Peromyscus* no hay evidencias de selección positiva en el exón 7 dentro del género *Mus* (Turner y Hoekstra, 2006).

En un trabajo más reciente de Swann y col. (2007) se realiza el estudio sobre el exón 6 y 7 de roedores de Nueva Guinea y Australia. Estos autores encuentran evidencias de selección positiva en el exón 7 pero no en el exón 6. Además esta selección positiva parece estar restringida a unas pocas líneas.

Los aminoácidos sometidos a este tipo de selección (324, 325 y 341) están cerca pero no son los mismos identificados en los estudios realizados en *Mus* (Jansa *et al.*, 2003) y en *Peromyscus* (Turner y Hoekstra, 2006). Dos de esos sitios (324 y 325) están localizados fuera y el tercer sitio (341) dentro del sitio de unión al espermatozoide definido por Wassarman y Litscher (1995).

A la vista de todos estos datos no preguntamos ¿qué papel juega la evolución de ZP3 en el aislamiento reproductivo? Dentro del género *Mus* la divergencia es baja (Jansa *et al.*, 2003) lo mismo ocurre en los roedores australianos (Swann *et al.*, 2007). Por el contrario, hay una gran variación en la secuencia aminoacídica en ZP3 dentro de una misma especie y entre especies diferentes en el género *Peromyscus* (Turner y Hoekstra, 2006). Así, ensayos funcionales son necesarios para testar los efectos de la variación alélica de ZP3 en la unión de esta proteína con el espermatozoide.

Recientemente, se han estudiado la evolución adaptativa de otras glicoproteínas de la ZP (Berlin *et al.*, 2008). En este estudio se compara la evolución de ciertas proteínas reproductivas en aves y en mamíferos. De los genes estudiados (ZP1, ZP2, ZP4, ZPAX, CD9, acrosina) sólo ZP1 y ZP2 parecen haber evolucionado

bajo selección positiva en aves; mientras que en los mamíferos estudiados destaca la presencia de selección positiva en ciertos aminoácidos de CD9, acrosina, ZP2 y ZP4.

También tenemos que destacar el uso de ZP3 para el establecimiento de relaciones filogenéticas en el género *Mus* por Lundrigan *et al.* (2002). A pesar de los trabajos realizados presentar una filogenia del género *Mus* continua siendo problemático. Los resultados de distintos estudios están de acuerdo en el establecimiento de determinadas relaciones filogenéticas pero en desacuerdo con otras. No hay un método objetivo para combinar los diferentes resultados porque los diferentes grupos de datos difieren según el taxón analizado, según la naturaleza de los datos y según los métodos utilizados para la generación de los árboles. Los estudios taxonómicos realizados del género *Mus* (Marshall, 1981) reconocen cuatro subgéneros: *Mus*, *Pyromys*, *Coelomys*, and *Nannomys*. Los cuatro subgéneros se consideran bastante divergentes genéticamente, en algunas ocasiones tan divergentes el uno con el otro como con otro género de la familia Muridae (Bonhomme *et al.*, 1985).

Dentro del contexto explicado anteriormente, nosotros en este estudio utilizamos diferentes especies de la subfamilia Murinae para estudiar la evolución de ZP4. Esta proteína, con importantes implicaciones a nivel de interacción con el espermatozoide en especies como el porcino, bovino o el humano no ha sido estudiada en profundidad desde el punto de vista filogenético.

La existencia además dentro de la subfamilia de especies con cuatro glicoproteínas en la ZP (*Rattus norvegicus*) y especies con tres proteínas (*Mus musculus* no tiene ZP4) nos invita a profundizar en el tipo de evolución que ha sufrido esta proteína. ZP4 ha desaparecido en algún punto desde la divergencia del ratón con la rata a partir de un ancestro común.

El hecho de que un taxón presente tres o cuatro glicoproteínas podría tener importantes implicaciones a nivel de la estructura tridimensional de la ZP y como

consecuencia implicaciones a nivel de funcionalidad, interacción entre gametos, inducción de la reacción acrosómica...etc.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1.1. Ovarios de hámster

Para nuestro estudio hemos utilizado 33 hembras adultas de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) de 11 semanas. Las hembras fueron sometidas (excepto cuando los ovarios fueron destinados a técnicas de hibridación *in situ*) a una inyección intraperitoneal de 25 UI de PMSG para estimular la foliculogénesis y sacrificadas 48 horas más tarde por sobredosis de CO₂.

Los ovarios son congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80 °C hasta su utilización excepto los ovarios utilizados para hibridación *in situ* que fueron fijados en paraformaldehído al 4 % tras su obtención.

2. OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

2.1 Obtención de ADN genómico

Para la realización del estudio filogenético de ZP4 se procedió a la obtención de ADN genómico de diferentes especies de roedores de la subfamilia Murinae.

Las muestras de partida fueron tejidos conservados en etanol al 95% o tejidos congelados y el procedimiento se llevó a cabo mediante el uso del kit QIA amp DNA mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Además del ADN obtenido de los tejidos la Dra. Chevret aportó ADN procedente de determinadas especies de su colección para su inclusión en el estudio. En total se utilizaron secuencias de 25 especies diferentes de roedores pertenecientes a la subfamilia (Tabla VI). *Mesocricetus auratus* (subfamilia Cricetinae) fue utilizado como grupo externo.

Tabla VI. Especies de la subfamilia Murinae utilizadas para el estudio filogenético de ZP4

Subfamilia	Género	Especie	Código de la muestra	Nº acceso del GenBank	
Murinae	Apodemus	agrarius	4314		
		flavicollis	4483		
	Arvicanthis	niloticus	4434		
	Hylomyscus	stella	4590		
	Lemniscomys	striatus	4913		
	Malacomys	longipes	4316		
	Maxomys	whiteheadi	4572		
	Micromys	minutus	5377		
	Millardia	meltada	4803		
	Mus		cypriacus	YCA	
			pahari	PAH	
			caroli	KTK	
			macedonicus	XBS	
			minutoides	US39	
			musculus	-	NC 000079
			musculus	-	DQ279480
			plathytrix	4658	
			spicilegus	ZRU	
			spretus	SFM	
	Niviventer	confucianus	T1646		
	Otomys	angoniensis	4911		
	Praomys	jacksoni	4575		
		tullbergi	4633		
	Rattus		exulans	4397	
			norvegicus	-	NW_047492.2
			norvegicus	-	NM_172330
			rattus	4292	
Cricetinae	Mesocricetus	auratus	-	DQ838550	

2.2 Obtención de ARN total de ovario de hámster

A partir de 10 ovarios de hámster hembra y utilizando las recomendaciones del RNeasy Mini Kit (Quiagen) obtuvimos ARN total de ovario de hámster.

El proceso de manera resumida se describe a continuación. En primer lugar, los tejidos fueron disgregados en una solución de tiocianato de guanidinio; este potente agente caotrópico lisa las células e inactiva las ribonucleasas endógenas. El lisado es después diluido en una solución de etanol y transferido a una columna con una membrana. Las proteínas, ADN y otros contaminantes son eliminados del lisado mediante tres lavados y el ARN unido a la membrana es obtenido en un último paso. Al final del proceso obtuvimos 350 µg de RNA total.

2.3 Síntesis *in vitro* de ADNc de ovario de hámster

La síntesis *in vitro* de ADN complementario (ADNc) se realizó con el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen-Life Technologies, según el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, el procedimiento consistió en la desnaturalización del ARN molde, empleando una cantidad de ARN total de partida de 5 µg, durante 5 min a 65°C y en presencia de oligo (dT)₁₂₋₁₈ y dNTPs (desoxinucleósidos-trifosfato). La muestra se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, tras lo cual se añadió el volumen necesario de tampón, DTT (ditiotreitól), RNaseOUT (inhibidor de las RNasas) y MgCl₂ (a las concentraciones recomendadas por el fabricante) hasta completar 20 µl. Se incubaron las muestras 2 min a 42°C y se añadió 1 µl de enzima retrotranscriptasa (50 unidades). La síntesis de ADNc tuvo lugar a 42°C durante 50 min, y se terminó incubando las muestras a 70°C durante 15 min para desnaturalizar a la enzima. Para hidrolizar el ARN molde se utilizó la enzima RNasa H suministrada por el kit (1 µl a 37°C durante 20 minutos).

3. ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADN genómico y ADNc de ZP4

ZP4 está presente en el genoma del ratón (*Mus musculus*) como un pseudogen. La secuencia codificante posee numerosos codones de stop que impiden

la traducción a proteína funcional (Figura 13). Sin embargo, dentro de la misma subfamilia (subfamilia Murinae) encontramos a la rata (*Rattus norvegicus*) que si expresa una proteína ZP4 funcional. ZP4 se ha perdido en algún punto del árbol evolutivo tras la divergencia de la rata y el ratón. Nuestro objetivo consistió la amplificación de ZP4 en varias especies de la subfamilia para determinar el patrón evolutivo de este gen.

```

1 atggctaagc aggctctaag gactactctg tggcttctgc caagcatctt actgtgtttc
61 ccattctgtc ctcccttgag tggccaggtg tgctccactg tgggttacag agcttccagt
121 ttactgtgaa cctcagcctg gaggcagaga gtcccatgct aacagcttgg gatagccaag
181 ggctgccaca caggcttaag aatgactctg actggtacat ggggtgatgga cagaactgat
241 ggattttttg tattggaagc caccacaat gtcactctgg aaggctccca ttatgtcatg
301 atggtcggcg tgcaagaggt agatgtagct ggaaatatga gagggacaag agagactgct
361 taagtgccct ttggatcttc acagtaagtc ccgaaataca gcaagtgtg aagtgtgcag
421 tcctgtgctc cctcgcccat ctccagagga aactgtgaag aggtggtctg ctgctacagc
481 tctgaagagg aaaaggcagg ttctgtttac tatggaaaca cagtgcctc ccgttgtacc
541 aggaagaggt gcttttccat tgctgtgttc agaatgcaa cctcgccacc cctacgcttg
601 gattccctat ccttggctct caggaacagc agtgggtgtg atcctgtgat gatgacatcc
661 acctttgtcc tgttccaatt tccacttact tcctgtggga ccacacggca gatcactgga
721 gaccagtccg tgtacaaaa tgagctagta gtcattcggg atgtgcaagc ttggggcaga
781 agctctatta cccgatacag caacttcagt ctctgagtca gctgtactta ctctgctctc
841 agcaacacat cccaattaa catgcaagtg ctggtctctc caccaccctt ttctaagacc
901 cagcctgggc cctctctctt ggaacttcag attgccaagg ataaaggcta tggttcttac
961 tatggttctg atgcctacct actggcaaaa ttactocagg atccttttta tgtggagtc
1021 tccatcattc acagaacagg cccctcactg gtttctgctg ctagaacaat gttgggccac
1081 acctggctct aatccttttc atcaaccaca atggccaatc ctgggtgaag ggtaatgcc
1141 atatgccgga gacaactatc agaccgaaag gatccctgtc cagaaagcat caagtccctt
1201 tccgtctcat caccagcact tcagcagagc taccttcagc ttcattgagt ctgtaaggca
1261 gaagcagggt ttaagtggac aggtgtacct gcaactgcag gcatcagtct gccagcctgc
1321 tgggatgcca tcctgtgtga tagtctgccc tgcttccagg agaagaagaa aatttgtgct
1381 tcatttggag accaccacca gcatatctag caaaggctcc atgatcctc tccaagcctc
1441 taaggactct gaagacatgc ttccctagaca ctcgagcacc ctggtggatt ctactgctct
1501 gtgagtaatg gggctttctg caaccgtgat catcattgga gtcttggtag tatcctactt
1561 gccaatcaga aatggagat aa

```

Figura 13. ADNc de ZP4 de *Mus musculus* (XM_001481274). Los codones de stop (12) están señalados en rojo. El atg inicial está señalado en azul y el taa final en verde.

Para ello amplificamos mediante PCR diferentes regiones tomando como molde el ADN genómico de los diferentes roedores de la subfamilia Murinae utilizando cebadores específicos según secuencias conservadas en ZP4 de *Mus musculus* (putativa) y *Rattus norvegicus* (Tabla VII).

Tabla VII. Cebadores utilizados para la amplificación de regiones de interés del ADN genómico de ZP4. En las diferentes columnas podemos ver: nombre del cebador (primera columna), número de pares de bases (pb) y si el cebador es directo (d) o reverso (r) (segunda columna), secuencia en dirección 5' → 3' (tercera columna) y la temperatura de fusión del cebador (última columna).

Nombre	pb (d/r)	SECUENCIA (5'→3')	T _m (°C)
ZP4-1	19(d)	ccaggtgtgctccactgtg	62
ZP4-R1	21(r)	cttgccatagaaggtgctcttg	64
ZP4-F4	21(d)	gggtaagctctgcctacttgc	66
ZP4-R4	19(r)	ccttcagcttcatgagtgc	58
2ZP4-R4	19(r)	gcactcatggctgaagg	58
PZP4-F2	20(d)	ggtctgagaaccctttaatc	58
PZP4-R2	18(r)	ggaacaggacaaaggtgg	56
PZP4-F3	18(d)	gatccacctggctctgtc	58
PZP4-R3	17(r)	ggatctctcgttggctt	52
PZP4-F1	18(d)	ggtacatgggtgatggac	56
PZP4-R1	18(r)	gaaggcatgtgaagagcc	56
2ZP4-2	18(d)	ccacctttgtcctgttcc	56
ZP4-F5	23(d)	gagactgcttaagtgccttgg	58
ZP4-F6	20(d)	tacagatcactggagaccag	60
ZP4-R5	23(r)	gctctattaccgatacagcaac	68

Las condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de ADN genómico fueron: 5 µl del ADN (diluido 1:10), 2,5 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM, MgCl₂ 2 mM, 4 µl de dNTPs (2.5 mM) y 2,5 unidades de polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystem), en un volumen final de 50 µl.

En todos los casos, el programa de amplificación consistió en 30 ciclos y, una vez completados éstos, una extensión final de 10 min a 72°C. Cada ciclo de la PCR constó de tres pasos: 45 segundos a 94°C, 1 min a la T_m (dependiendo del par de cebadores usados) y 1 min a 72°C. Al final de los 30 ciclos se realiza uno a 72 °C durante 10 minutos.

En algunas especies de interés se procedió a la amplificación de ZP4 tomando como molde ADN complementario obtenido a partir de ARN de ovario tal y como se explica en los apartados de “Extracción de ARN total de ovario de hámster” y “síntesis in vitro de ADNc de ovario de hámster” con la diferencia de que el ARN de partida fue mucho menor debido a la dificultad para obtener las muestras. Los cebadores usados en la amplificación que se usaron fueron los diseñados contra secuencias exónicas, algunos de los ya usados para la amplificación de ADN genómico y otros nuevos como: ZP4RNA-F1 (directo): 5'-ttgcccacaaccaagccttc-3', y ZP4RNA-R1 (reverso): 5'-tgcagtcagttttattgagactc-3'.

3.2 Amplificación mediante la técnica de PCR de un fragmento de ZP1 y ZP4 de hámster

En nuestro estudio tras la obtención de ARN total de ovarios de hámster el ADNc obtenido fue usado como molde para una serie de amplificaciones por PCR iniciales en las que se pretendía la amplificación de algún fragmento de los genes de interés (*ZP1* y *ZP4*), ya que al desconocer las secuencias y dado que no existe una homología absoluta entre las secuencias de *ZP1* y *ZP4* conocidas de otras especies no podíamos diseñar cebadores capaces de amplificar todo el marco de lectura de dichos genes. Los cebadores usados en las diferentes amplificaciones por PCR se diseñaron contra motivos conservados de *ZP1* y *ZP4* comunes a la rata y al ratón. Se usaron estas dos especies por su cercanía filogenética con el hámster. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de un fragmento de *ZP1* y de la *ZP4* de hámster

Nombre	Bases (d/r)	SECUENCIA (5'→3')
ZP1F1	20(d)	gaggctggagctgaggattg
ZP1R1	22(r)	gcaggcagaggcactacagaag
ZP4F1	15(d)	acacagtgacctccc
ZP4R1	15(r)	gattggccattgtgg
ZP4F2	15(d)	acacagtgacctccc
ZP4R2	15(r)	caggaagtaagtgga

En el caso de *ZP1* en una primera amplificación se obtuvo un fragmento de tamaño esperado confirmándose por secuenciación su homología con *ZP1* de otras especies (cebadores usados: ZP1F1 Y ZP1R1). En el caso de *ZP4* fue necesaria una amplificación por PCR inicial (ZP4F1 y ZP4R1) a la que le siguió una PCR anidada con un segundo par de cebadores (ZP4F2 y ZP4R2) para amplificar un fragmento de tamaño esperado que efectivamente, correspondió con *ZP4*.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler personal (eppendorf).

Las condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de ADNc fueron las mismas para todos los casos: 2 µl del ADNc, 1µl de cada cebador (0.5 µg/µl), MgCl₂ 2 mM, 1 µl de cada dNTP (10 mM) y 1 unidad de polimerasa, en un volumen final de 50 µl.

En todos los casos, el programa de amplificación consistió en 30 ciclos y, una vez completados éstos, una extensión final de 10 min a 72°C. Cada ciclo de la PCR constó de tres pasos:

- 1) Desnaturalización: se realizó durante 1 minuto a 95°C.
- 2) Hibridación de los cebadores con el molde: 1 min a la T_m . La temperatura de hibridación o temperatura de melting (T_m) se calculó para cada oligonucleótido empleando la fórmula: $T_m (^{\circ}\text{C})=2(\text{A}+\text{T})+ 4(\text{C}+\text{G})$. Se eligió la menor de las dos temperaturas calculadas para cada reacción de amplificación. En la medida de lo posible se buscan cebadores con una T_m similar.
- 3) Extensión de la cadena naciente: 1 min a 72°C.

Los oligonucleótidos necesarios para realizar todas las amplificaciones por PCR de este trabajo, tanto para amplificar secuencias codificantes completas como para secuenciación u otras manipulaciones de ADN, fueron sintetizados por Sigma Aldrich. Los dNTPs procedieron de Ecogen y las ADN polimerasas empleada con fines preparativos fueron las enzimas EcoTaq (Ecogen) y FidelityTaq (usb).

3.3 Amplificación por RACE del marco abierto de lectura de *ZP1* y *ZP4* de hámster

Los fragmentos de *ZP1* y *ZP4* obtenidos en las diferentes reacciones de amplificación descritas anteriormente fueron utilizados como molde para el diseño de cebadores que amplificaran todo el marco abierto de lectura tanto de *ZP1* como de *ZP4* mediante la tecnología RACE. Para ello, utilizamos el kit: BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Este kit permite la rápida amplificación de los extremos 3' y 5' de nuestro ADNc amplificado por PCR obteniendo el ADNc de *ZP1* y de *ZP4* completo. En cada caso, partimos de ARN total (1 μg) y obtuvimos el ADNc 5' y el ADNc 3'.

Tras obtener los ADNc se procede a la realización de amplificaciones por PCR usando cebadores específicos del fragmento que queremos amplificar (zona conocida). En algunos casos es necesario el diseño de cebadores más internos para la

realización de una PCR anidada si con una primera PCR obtenemos demasiado fondo inespecífico o no hay amplificación. Todos los cebadores utilizados en la RACE se muestran en la tabla IX.

En el caso de *ZP1* fue necesario la realización de PCRs anidadas tanto para el caso de la RACE 3' (cebador: 5'-gtggtcctgcttctgctg-3') como para el caso de la RACE 5' (cebador: 5'-cactggtgtagcatcagg-3')

En el caso de *ZP4* para la RACE 3' no fue necesaria ninguna otra amplificación por PCR. Sin embargo para la RACE 5' si se realizó una PCR anidada con el cebador: 5'-gggtgttgccatcacagggtcac-3'

Tabla IX. Cebadores utilizados en la amplificación por RACE del ADNc completo de *ZP1* y *ZP4* de hámster.

Nombre	Bases (d/r)	SECUENCIA (5'→3')
ZP1Fwrace	21(d)	5'-caaatggtggccttggacagg-3'
ZP1Rvrace	22(r)	5'-gtgaagcgcggtagtgagacc-3'
ZP1Fwnested def	18(d)	5'-gtggtcctgcttctgctg-3'
ZP1Rvnested def	18(r)	5'-cactggtgtagcatcagg-3'
ZP4Fwrace	23(d)	5'-ttgctgtgtccaggatgtgacc-3'
ZP4Rvrace	23(r)	5'-tggaaattggaacagggcaaagg-3'
ZP4Rvnested	23(r)	5'-gggtgttgccatcacagggtcac-3'

4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para analizar el tamaño y la abundancia de los amplicones en cada reacción de PCR se tomaron 4 µl de cada reacción, se les añadió tampón de carga de muestras de ADN (Anexo) y la mezcla se aplicó en geles de agarosa (Pronadisa, Hispanlab, Madrid, España) de concentración comprendida entre el 1 y el 2%. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido TAE (Anexo) a 100 V, a temperatura ambiente y en soporte horizontal.

El resultado se visualizó mediante tinción del gel en un baño de bromuro de etidio (2 µg/ml).

El resto del volumen conteniendo el producto de la PCR, que se emplearía con fines preparativos, se purificó de los geles de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Quiagen) según las instrucciones del proveedor.

5. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS O CLONADOS

La identidad de todos los productos amplificados o clonados fue verificada por secuenciación automática completa de ambas cadenas (Laboratorio de Biología Molecular, SACE, Universidad de Murcia). En el caso del estudio filogenético la secuenciación de los amplificados fue realizada por “Genome Express”.

Para la secuenciación de los diferentes amplificados de *ZP1* y *ZP4* fueron necesarios cebadores internos. Los ADNc de este tipo de genes son demasiado largos para ser secuenciados de una vez. Por ello se secuencian primero un fragmento y tras la secuenciación se diseña un nuevo cebador complementario a las últimas bases del fragmento secuenciado. Este cebador nos sirve para secuenciar otro fragmento y así sucesivamente.

Las secuencias obtenidas se analizaron para determinar su homología con otras secuencias conocidas usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool) (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La comparación directa de dos secuencias se hizo usando el programa ALIGN, mientras que los alineamientos múltiples se llevaron a cabo con el programa CLUSTALW (Kyte y Doolittle, 1982) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Las secuencias de aminoácidos fueron deducidas de la secuencias de nucleótidos usando el programa "Translate" disponible en www.expasy.org. El programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) fue usado para predecir el péptido señal. Los programas NetOGlyc (Hansen *et al.*, 1998) y NetNGlyc (Gupta y Brunak, 2002) se utilizaron para la predicción de sitios potenciales de N- y O-glicosilación.

Para el estudio filogenético se verificaron las secuencias mediante el programa SEQUENCHER (version 4.7, Genecode®).

6. CLONACIÓN DE *ZP4* DE HÁMSTER

6.1. Amplificación mediante RT-PCR de *ZP4*

Una vez conocida la secuencia completa del ADNc de *ZP4* nos dispusimos a realizar la clonación molecular. En primer lugar, extrajimos y purificamos ARN procedente de ovarios de hámster. A partir del ARN y mediante transcripción reversa se obtuvo ADNc, que se utilizó como molde para la amplificación por PCR del marco abierto de lectura completo de *ZP4*, mediante los cebadores que se detallan en la Tabla X. Estos cebadores contienen secuencias de restricción para *Hind III* y *Xba I*. Estos sitios de restricción fueron utilizados para el clonaje en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen) (Figura 14 y Anexo).

Tabla X. Cebadores utilizados para la obtención *ZP4* mediante RT-PCR. Se indica el nombre del oligonucleótido, tamaño del cebador (directo o reverso) y su secuencia en sentido 5'→3'. La secuencia de restricción aparece subrayada y especificada entre paréntesis.

Nombre	Bases (d/r)	SECUENCIA (5'→3')
ZP4Fw	30(d)	5'-AGGA <u>AAGCTT</u> ATGGCTAGCCGGACTCTGAGT-3' (<i>Hind III</i>)
ZP4Rv	27(r)	5'-CTGT <u>CTAGAT</u> CATCTTGCTTTTCTGAT-3' (<i>Xba I</i>)

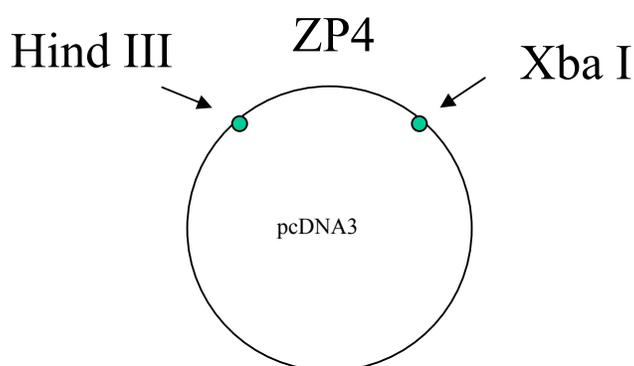


Figura 14. Esquema del vector pcDNA3.1 al que se le ha incorporado la secuencia codificante de *ZP4* de hámster.

6.2. Digestión

Las digestiones preparativas con enzimas de restricción previas a la clonación del producto amplificado se realizaron durante 1h a 37°C empleando el 90% del volumen de la PCR, con el tampón suministrado por el proveedor en cada caso y 1-2 unidades de cada endonucleasa (enzimas de restricción de Fermentas). Para la clonación de *ZP4* utilizamos las enzimas *Hind III* y *Xba I*. Los fragmentos de ADN digeridos se purificaron con el kit DNA Clean and concentrator-5 (Zymo Research) y se cuantificaron tras electroforesis en gel de agarosa, por comparación de la intensidad de la banda, tras tinción con bromuro de etidio, con estándares de cuantificación.

Paralelamente, se preparó vector abierto con las mismas enzimas (*HindIII* y *XbaI*), se purificó y cuantificó de forma idéntica a lo descrito previamente.

6.3. Ligación

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l, con 50 ng de vector y una proporción molar de inserto/vector de 3:1, con 4 μ l del tampón 5x suministrado con la ligasa (T4 DNA ligasa de Invitrogen) y 1 unidad de ésta. Para cada ligación se realizó un control de recircularización del vector de expresión empleado, en las mismas condiciones pero sin añadir inserto. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 4h y los productos de la ligación se clonaron en células competentes de la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α F' (Invitrogen).

6.4. Transformación de células competentes

Para la transformación usamos las células *E. coli* DH5 α F' (Library Efficiency DH5 α de Invitrogen). Para transformar las bacterias, se añadieron 80 μ l de bacterias a tubos de cultivo que contenían 2 μ l (10 ng) de las mezclas de ligación (incluyendo un control de transformación con 1 ng de vector pcDNA3.1 circular). Los tubos se mantuvieron 30 min en hielo y a continuación los tubos se incubaron 45 segundos a 42°C para provocar un choque térmico, y se enfriaron rápidamente en hielo durante 2 min. Para recuperar las bacterias, se les añadió 720 μ l de medio SOC (Invitrogen) y se incubaron 1 h a 37°C con agitación muy suave.

Tras esta incubación, se sembraron distintas diluciones de las bacterias en placas Petri con SOB-agar (Pronadisa) y ampicilina como marcador de selección, y se crecieron toda la noche en un incubador a 37°C. El pcDNA3.1 contiene un gen de resistencia a ampicilina de manera que al crecer las bacterias en un medio con este antibiótico seleccionamos las bacterias que han incorporado el plásmido con el gen de resistencia y el gen de interés (en este caso el gen codificante para ZP4) Tras

seleccionar los recombinantes positivos, las colonias de interés se conservaron en criotubos a -80°C en 20% de glicerol.

6.5. Selección de recombinantes

Tras el experimento de clonación se seleccionaron varias colonias cuyos plásmidos se analizaron por restricción con las endonucleasas apropiadas y en su caso por secuenciación. Las colonias se inocularon en 4 ml de medio SOB con ampicilina y se crecieron los minicultivos a 37°C con agitación vigorosa (250-300 rpm) durante la noche. A continuación, se aislaron los plásmidos mediante el uso del kit "Gen Elute HP Plasmid Miniprep Kit" de Sigma que está basado en el método de lisis alcalina de las bacterias y una posterior purificación y precipitación del plásmido.

El plásmido obtenido ya está en condiciones de ser analizado por restricción para elegir clones positivos.

7. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

7.1. Construcción del plásmido de ZP4 marcado con el epítipo FLAG.

Debido a que no existen referencias fiables sobre la existencia de un anticuerpo específico para ZP4 de hámster que ofrezca buenos resultados, procedimos a la construcción de una proteína de fusión de ZP4 que presentara un epítipo y que nos permitiera reconocerla mediante un anticuerpo comercial bien caracterizado. De esta manera, diseñamos la siguiente construcción: el epítipo FLAG (DYKDDDDKA) se situaría en el extremo C-terminal (ZP4-FLAG) justo antes del sitio putativo de corte de furina (RRRR) (Figuras 15 y 16).

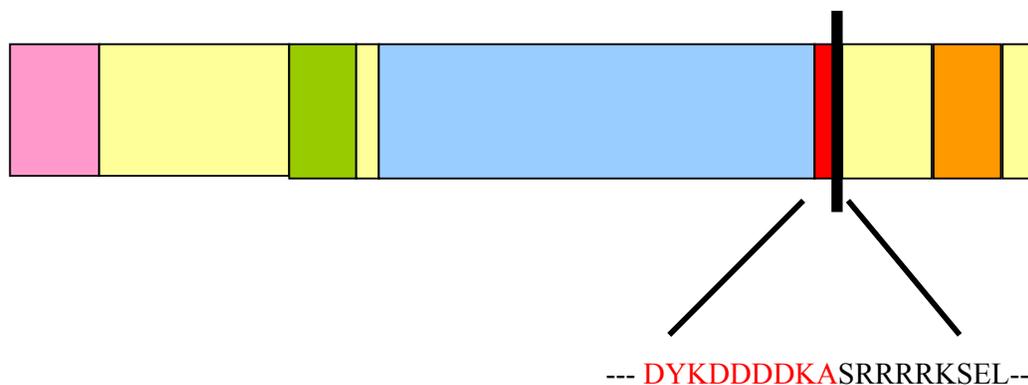


Figura 15. Esquema que ilustra la situación del epítipo FLAG (en rojo) dentro de la secuencia codificante de ZP4 de hámster. En rosa mostramos esquematizado el péptido señal, en verde el dominio trefoil, el azul el dominio ZP y en naranja el dominio transmembrana. El sitio de corte de furina (RRRR) se esquematiza con una barra negra.

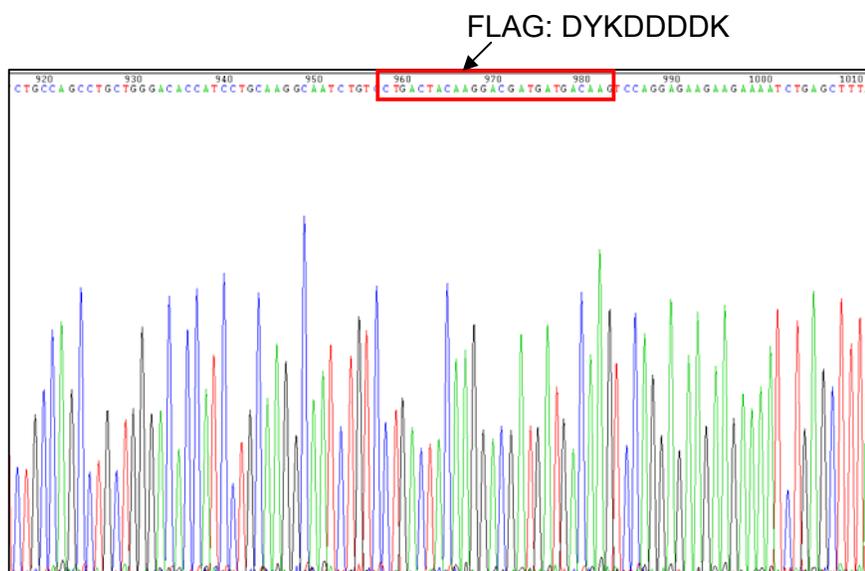


Figura 16. Fragmento del cromatograma obtenido tras la secuenciación de ZP4-FLAG. Con un recuadro rojo se señala el lugar en el que se ha incorporado la secuencia FLAG que corresponde a la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK. La secuencia FLAG es incorporada justo antes del sitio consenso para el corte de furina.

Para la incorporación de la secuencia FLAG en la secuencia de ZP4 se empleó el QuikChange XL Site-Directed Mutagénesis Kit (Stratagen, La Jolla, CA, USA). Este kit usa la Pfu Turbo DNA polimerasa, que puede replicar ambas cadenas del plásmido. Como molde se usa un plásmido con el inserto que se quiere modificar y se diseñan dos oligonucleótidos (uno directo y otro reverso), que contengan la secuencia que se desea insertar. Los oligonucleótidos (cada uno complementario a una de las cadenas del molde), se utilizan como cebadores para la ADN polimerasa durante el proceso de PCR obteniendo el plásmido con el inserto modificado. Posteriormente, para diferenciar el plásmido molde del obtenido por PCR, se realiza una digestión con la endonucleasa DpnI que sólo digiere ADN metilado y hemimetilado. El ADN procedente de la mayoría de cepas de *E.Coli* es Dam metilado y por tanto susceptible de digestión por esta enzima, mientras que el plásmido de nueva síntesis permanece sin metilar, lo que permite su selección. Después se realiza la transformación de células ultracompetentes XL10 Gold, y la selección de recombinantes.

Las PCR y la elección de cebadores (Tabla XI), se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (2.5 U de Pfu Turbo, 10 ng de ADN molde, y 125 ng de cada cebador, para cada reacción). El ADN molde utilizado, fue ZP4 insertado en el vector de expresión pcDNA3.1.

Tabla XI. Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida para incorporación del epítipo FLAG en la secuencia codificante de ZP4. En rojo la secuencia FLAG que se desea incorporar.

Nombre	Bases (d/r)	SECUENCIA (5'→3')
FwZP4 flag R	51(d)	5'-ggcaatctgtcctgactacaaggacgatgatgacaagtcaggagaagaag-3'
Rv ZP4 flag R	51(r)	5'-cttcttctcctggactgtcatcatcgtcctgtagtcaggacagattgcc-3'

El programa de amplificación consistió en 18 ciclos y una vez completados, una extensión de 7 min a 68°C. Los 5 primeros ciclos con una Tm de 42°C y los 13 últimos con una Tm de 60°C.

Tras la digestión del molde mediante la endonucleasa de restricción DpnI y la transformación de las células ultracompetentes se seleccionaron los recombinantes. Para ello, después del experimento de mutagénesis se inocularon varias colonias en 4 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina dejándolas crecer a 37°C en agitación vigorosa durante toda la noche. Al día siguiente, se aislaron los plásmidos utilizando el Plasmid Genelute HP Miniprep kit que acopla el sistema de extracción por lisis alcalina con el uso de columnas de elevada afinidad por el ADN. Se determinó la concentración del ADN extraído mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro GeneQuant y posteriormente se realizaron las digestiones con las endonucleasas apropiadas. Finalmente, se verificó la incorporación del epítipo FLAG mediante secuenciación automática (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia).

Para asegurarnos que la mutagénesis no hubiera insertado mutaciones no deseadas en el vector además del cambio programado, se procedió a la subclonación del inserto ZP4 fusionado con FLAG en un nuevo vector no sometido a ningún ciclo de PCR.

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ZP4

8.1. Cultivos de células HEK 293T

La línea celular empleada en este trabajo, fueron las células embrionarias de riñón humano, HEK 293T proporcionadas por el Servicio de Cultivo de Tejidos (SACE, Universidad de Murcia).

El medio de cultivo celular empleado fue DMEM (Dulbecco's Eagle Medium) enriquecido con un 10% de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomicina (DMEM Completo). Este

medio, el suero bovino fetal (SBF), la glutamina, la tripsina/EDTA y los antibióticos penicilina y estreptomicina fueron suministrados por Gibco BRL-Life Technologies (Gaithersburg, EEUU).

Los cultivos celulares se realizaron en distintos tipos de botellas o placas dependiendo del experimento y el crecimiento de las células tuvo lugar en un incubador ThermoQuest a 37°C, en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂.

8.2. Transfección transitoria

Para los experimentos de transfección transitoria se cultivaron células embrionarias de riñón humano HEK 293T. Dichas células expresan el antígeno grande T del virus SV40, lo que permite que los vectores elegidos para las transfecciones transitorias se repliquen episomalmente.

Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo usando el reactivo Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) a una concentración de 1 mg/ml, que es adecuado para la transfección de ácidos nucleicos en células eucariotas.

Para una placa de 6 pocillos, el procedimiento es el siguiente:

El ADN (0,6 µg/pocillo) y la lipofectamina (3 µl/pocillo) se diluyen por separado en 100 µl de medio D-MEM sin suero durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este período, el ADN diluido se mezcla con la lipofectamina diluida y se incuban durante 20 minutos como máximo, a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos ADN-Lipofectamina 2000.

A continuación, se añaden 100 µl de la mezcla anterior a cada pocillo que contiene 600 µl de medio D-MEM.

No se añaden antibióticos durante la transfección, ya que pueden provocar la muerte de las células. Transcurridas 6 horas, el medio de las células es sustituido por D-MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

El medio secretado por las células y las propias células son recogidas a diferentes tiempos después de la transfección.

Habitualmente, se usaron placas de 6, 12 o 24 pocillos. Cuando las células estaban confluentes a un 80-90% se añadieron 0,6, 0,3 y 0,15 µg de ADN plásmido/pocillo respectivamente y 3, 1 y 1µl de lipofectamina. En todos los casos, tras añadir la mezcla de transfección e incubar durante 6 h, el medio se sustituyó por medio completo, para que las células se recuperaran al menos durante 16 h.

El vector de expresión utilizado fue el pcDNA3.1, que contiene un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico geneticina (G418).

8.3. Obtención de extractos

Para nuestro estudio, se analizaron tanto la proteína secretada como las proteínas procedentes de la lisis celular.

Así, en primer lugar, se obtuvo el medio en el que crecen las células para después obtener las células mediante pipeteo continuo con PBS. Después se centrifugaron a 6000g durante 10 min.

Posteriormente las células lavadas fueron resuspendidas en tampón de solubilización celular, suplementado con iodoacetamida 10 mM. La iodoacetamida, carboximetila los grupos sulfhidrilo de residuos de cisteínas e impide la formación de agregados que puedan dificultar la separación electroforética o complicar la interpretación del patrón electroforético. El volumen utilizado de tampón fue de 100

µl para células recogidas de placas de 24 pocillos. Tras la resuspensión, las muestras se incubaron con agitación vigorosa en oscuridad, a 4°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugaron en una centrífuga tipo Eppendorf, durante 30 min a 16000 g y a 4°C. Se recogieron entonces los sobrenadantes donde se concentran las proteínas de los lisados celulares.

8.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

En primer lugar, las muestras fueron diluidas en tampón de carga que contenía 2% de SDS, 2,5% de mercaptoetanol, 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 y 10% (v/v) de glicerol (Laemmli, 1970); es decir, bajo condiciones reductoras. La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se realizó mediante el sistema discontinuo descrito por Laemmli con algunas modificaciones, con una cubeta Mini Protean 2 o 3 y una fuente de alimentación 3000 Xi, ambos de BioRad. El gel hacinador fue de aproximadamente 1 cm de altura, con una concentración final de acrilamida del 4 %, y el gel separador era de unos 6 cm de altura, con un porcentaje de acrilamida del 10 %. Los geles polimerizan por la acción del TEMED y del persulfato amónico sobre una disolución de acrilamida y bisacrilamida. El tampón de recorrido se describe en el Anexo. La intensidad de corriente aplicada durante la electroforesis fue 15 mA/gel hasta que la muestra entró en el gel separador y posteriormente de 25 mA/gel.

8.5. Transferencia a membrana o Western-blot

La presencia y cantidad de las proteínas en células previamente transfectadas y en el sobrenadante obtenido tras el cultivo, se analizó mediante transferencia Western. Una vez finalizada la electroforesis en condiciones reductoras el gel fue incubado en tampón de transferencia durante 10 min y transferido a una membrana de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore Corporation, Bedford), previamente tratada según las instrucciones de la casa proveedora. Para

ello utilizamos una unidad de transferencia semi-seca de Bio-Rad. La transferencia tuvo lugar durante 1 hora a 22 V.

La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación orbital suave, con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (Anexo). Posteriormente, se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación orbital suave con el anticuerpo primario (anti-FLAG-HRP, Sigma-Aldrich, A8592) a una dilución 1:5000 en el tampón PBS-T.

Finalizada la incubación, la membrana fue lavada tres veces con PBS-T y a continuación las membranas fueron reveladas usando el kit de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham, Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. La emisión se registró en una película de autorradiografía Hyperfilm ECL (Amersham, Biosciences) en una cámara oscura. Para su revelado se emplearon líquidos de revelador y fijador de AGFA.

9. ANÁLISIS DE LA GLICOSILACIÓN

Para analizar el patrón de glicosilación de ZP4 se realizó una deglicosilación enzimática utilizando N-glicosidasa F de la proteína obtenida del lisado celular y una inhibición de la glicosilación a nivel de cultivo celular mediante el uso de tunicamicina.

9.1 Tratamiento con N-glicosidasa F.

Para los estudios de deglicosilación, los extractos obtenidos de células transfectadas con ZP4-FLAG (unos 5-15 µg de proteína total) se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos en tampón de deglicosilación con 15 mU de N-glicosidasa F (Roche, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 15 µl. En estas digestiones, previamente a la incubación a 37°C y adición de la enzima, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min para desnaturalizar la proteína y favorecer su

deglicosilación completa. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añadió a cada tubo 5 μ l de tampón de muestra (4x) con β ME. Las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y la proteína se detectó mediante Western-blot.

9.2. Tratamiento con tunicamicina

La tunicamicina inhibe a la enzima UDP-N-acetilglucosamina transferasa, inhibiendo la incorporación de N-glicanos a la estructura peptídica.

En los ensayos se incubaron las células transfectadas con ZP4-FLAG con una concentración de tunicamicina (Sigma Aldrich) de 5 μ g/ml durante 21 horas tras la cuales se procedió a la recogida de sobrenadantes y contenido celular.

10. ANÁLISIS INMONOCITOQUÍMICOS

10.1. Citometría de flujo (FACS)

El análisis de inmunofluorescencia indirecta de ZP4 marcado con el epítipo FLAG, se realizó mediante citometría de flujo en un sistema FACScan Becton Dickinson 9.

Las células HEK 293T sembradas en placas de 24 pocillos fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de ZP4-FLAG. Tras su lavado con PBS, las células fueron tratadas en la misma placa durante todo el proceso de tinción para evitar la agregación de las células HEK 293T.

Para cada ensayo se usaron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/pocillo, a las que se añadieron 100 μ l de anticuerpo anti-FLAG M2, previamente diluido 1:25 en PBS. Tras una incubación de 30 minutos en hielo (para evitar la internalización del anticuerpo) se realizaron 2 lavados añadiendo al pocillo 100 μ l de tampón de lavado de FACS (2% SBF, 0,01 % NaN_3 en PBS). Posteriormente las células se incubaron 30 min con 100 μ l del anticuerpo secundario (anti IgG de ratón, marcado con ficoeritrina), previamente diluido 1:50 en PBS. Tras la incubación, se realizaron 2 lavados con el tampón de lavado de FACS y un lavado final con PBS 1X. Tras el

último lavado, se procedió a la lectura en el citómetro inmediatamente o bien se resuspendieron en 500µl de paraformaldehído 0,4% en PBS para proceder a su análisis posterior.

10.1.1. Análisis de células transfectadas en el citómetro de flujo

En el momento de analizar las muestras en el citómetro, las células procesadas deben ser resuspendidas y transferidas a un tubo de propileno (Aulabor, España). La adquisición y análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo FACsort (Becto-Dickinson, Montan View; CA, EEUU), equipado con un láser de argón de 488 nm. Como software de adquisición y análisis se empleó el programa CellQuest, con parámetros FCS (tamaño) y en escala lineal, y SSC (granularidad), FL1 (fluorescencia verde) y FL2 (fluorescencia roja) en escala logarítmica. Se han considerado como valores negativos los que se encuentran por debajo de 10^1 tanto en la FL1 como FL2. Para cada muestra se adquirieron un mínimo de 10000 células. Para analizar los resultados, se seleccionó la población principal, desechando las células muertas o agregadas.

10.2. Microscopía confocal

10.2.1. Tinción inmunocitoquímica

En todos los casos se utilizaron células sembradas en monocapa sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos. La tinción se realizó en células HEK 293T transfectadas transitoriamente 24 h postransfección. En el caso de tinciones de membrana, todas las manipulaciones se realizaron a 4°C, mientras que en tinciones intracelulares, todas las etapas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Las células se lavaron con PBS, previamente a su fijación con 200 µl de paraformaldehído al 4% en PBS, durante 10 min. Después se incubaron al menos 20 minutos con glicina 20 mM en PBS para bloquear los grupos amino libres del

paraformaldehído. Para la tinción de proteínas intracelulares, las células se permeabilizaron con Igepal CA630 al 0,5% en PBS, a temperatura ambiente durante 15 min, previamente a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla XII). Tras 30 min de incubación con el anticuerpo, se lavaron las células con PBS-BSA 2%, 2 veces y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla XII), durante otros 30 min. Tras la incubación, las preparaciones se lavaron 2 veces con PBS y tras retirar el exceso de líquido, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos, para ello se usaron 3 μ l de medio de montaje para fluorescencia de Dako (Carpintería, California, EEUU).

Tras el secado del medio sobrante, se sellaron los cubreobjetos con laca de uñas, quedando preparados para su observación. La conservación de las muestras se realizó a 4°C.

En el caso del marcaje del aparato de Golgi se realizó una transfección con un plásmido de expresión de la GTPasa Rab-1 unida a GFP.

10.2.2. Adquisición de Imágenes

Las imágenes fueron captadas mediante un microscopio de fluorescencia confocal True Confocal Scanner TCS-SP2 de Leica AOBS (Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia). Las imágenes representan múltiples series de cortes transversales en el eje Z, adquiridos a intervalos de entre 0,1 y 0,5 μ m, desde el polo superior hasta el inferior de la célula, o bien imágenes de una sola sección en diferentes niveles del eje Z. Las secciones se obtuvieron usando un objetivo de 63X en aceite de inmersión, con una apertura numérica nunca inferior a 0.9 ni superior a 1.2. Otro de los requisitos importantes fue que la intensidad de fluorescencia del fondo fuera mínima y la intensidad de fluorescencia de la muestra no estuviera saturada. Para los estudios de colocalización, la toma de las imágenes de una misma sección marcada con diferentes anticuerpos o marcadores se realizó de manera secuencial para cada fluorocromo y ambas imágenes fueron adquiridas en

condiciones espaciales idénticas para evitar el fenómeno de cruce de señales (crosstalking).

Tabla XII. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia

Anticuerpo Primario	Casa comercial y código	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial y código	Dilución	Tampón de unión
Anti FLAG de ratón	Sigma-Aldrich F3165	1:7000	α -ratón conjugado con Alexa 568	Invitrogen A11019	1:400	PBS
Anti FLAG de conejo	Sigma-Aldrich F7425	1:5000	α -conejo conjugado con Alexa 568	Invitrogen A21069	1:400	PBS
Anti PDI de ratón	Stressgen SPA-891	1:1000	α - ratón conjugado con Alexa 488	Invitrogen A11017	1:400	PBS

10.3. Hibridación *in situ*

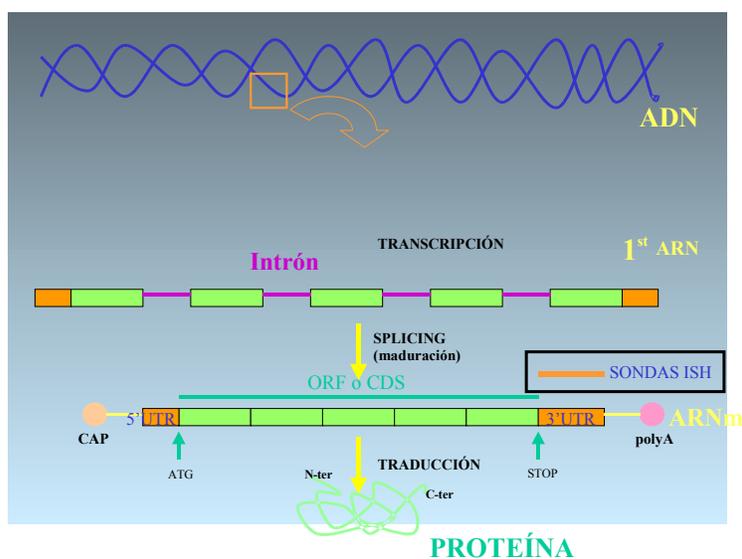
Las técnicas de hibridación *in situ* con sondas de ARN sobre tejido nos permiten el análisis de la regulación espacial y temporal de la expresión de genes a través de la detección de ARN mensajeros (ARNm).

10.3.1. Construcción de plásmidos que contienen fragmentos de los genes *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* de hámster

Para llevar a cabo la determinación del patrón de expresión de los genes de hámster *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* con las técnicas de hibridación *in situ*, construimos

vectores que contenían fragmentos de dichos genes, a partir del cual sintetizaríamos la sonda de ARN.

Se ha descrito que las sondas de ARN que hibridan más específicamente, a utilizar en este tipo de técnicas, corresponden con secuencias del extremo 3' del gen, la denominada región o extremo 3' UTR (untranslate region, región no transcrita), por ser una de las regiones más específicas de un gen.



A partir de la información génica disponible de ZP2 y ZP3 de hámster en las bases de datos genómicas y de la obtenida para ZP1 y ZP4 de hámster durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, diseñamos los cebadores sobre dichas secuencias de ADN copia (ADNc) de los genes ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de hámster, que flanquean 583 pares de bases (pb) para el gen ZP1, 583 pb para ZP2, 574 pb para ZP3 y 636 pb para ZP4. En la tabla XIII se muestran los cebadores usados.

Tabla XIII. Cebadores usados para la amplificación de un fragmento de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 para la construcción de los plásmidos a partir de los cuales se sintetizaron las sondas de ARN.

Nombre	Bases (d/r)	SECUENCIA (5'→3')
ZP1Fw ISH	18(d)	5'- ccgtctctgcagagaac -3'
ZP1Rv ISH	21(r)	5'- ctaacatctggtgccttctc -3'
ZP2Fw ISH	21(d)	5'-gaagtgactgtgtgaacagg-3'
ZP2Rv ISH	20 (d)	5'- gcaagtccaatcaatgatcc- 3'
ZP3Fw ISH	20(d)	5'- gtcattgtggacttccatgg-3'
ZP3Rv ISH	25(r)	5'- gtgaaagggataacaacatgggaagg-3'
ZP4Fw ISH	19(d)	5'-ctccaggatcctatttatg-3'
ZP4Rv ISH	20(r)	5'- ctccatactgggaatgtaag-3'

A partir de un ADNc sintetizado por una reacción de Transcripción Inversa (RT) a partir de ARNm extraído de ovarios de hámster (tal y como se ha explicado anteriormente) se amplificaron los fragmentos mediante una reacción de amplificación por PCR a una Tm apropiada según la pareja de cebadores y 30 ciclos. Los fragmentos amplificados, de los tamaños esperados, se subclonaron en el vector pCR^R2.1-TOPO (Invitrogen) (Anexo, Figuras 17, 18, 19 y 20). A continuación se transformaron bacterias con los vectores y se seleccionaron mediante resistencia a ampicilina aquellos clones con el inserto en la dirección apropiada (5'-3') para la síntesis de las sondas anti-sentido utilizando la RNA polimerasa T7 (cuya secuencia promotor se encuentra aguas abajo al sitio de clonaje en el vector pCR-2.1) mediante una reacción de transcripción *in vitro*. Los clones que habían incorporado el producto de PCR en dirección contraria (3'-5') se utilizaron para la síntesis de sondas sentido, que se utilizaron como controles en la hibridación *in situ*. El análisis de la dirección del inserto en el vector de clonaje se llevó a cabo por restricción.

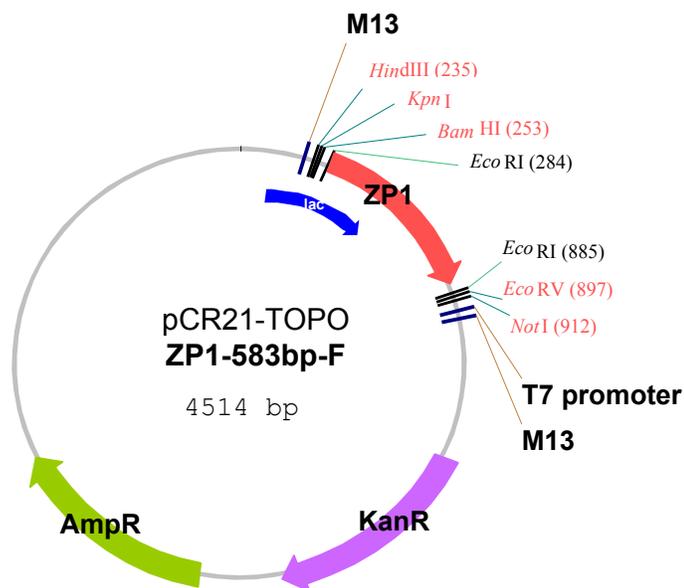


Figura 17. Fragmento amplificado de *ZP1* incorporado en el vector pCR^R2.1-TOPO (Invitrogen).

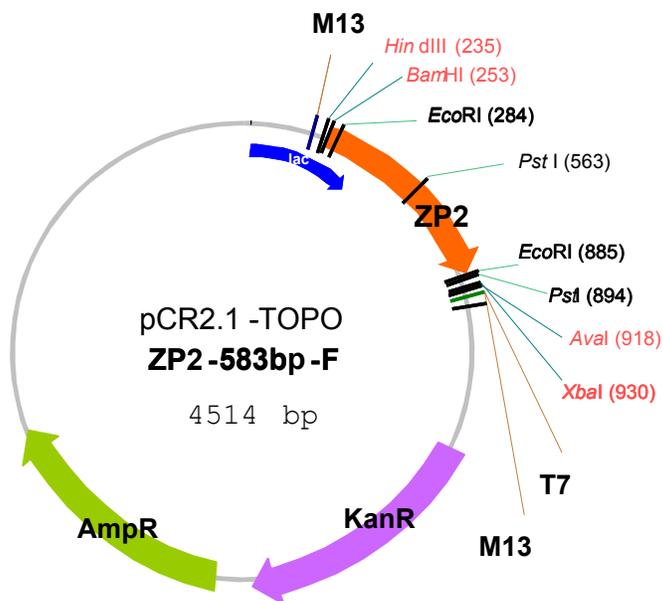


Figura 18. Fragmento amplificado de *ZP2* incorporado en el vector pCR^R2.1-TOPO (Invitrogen).

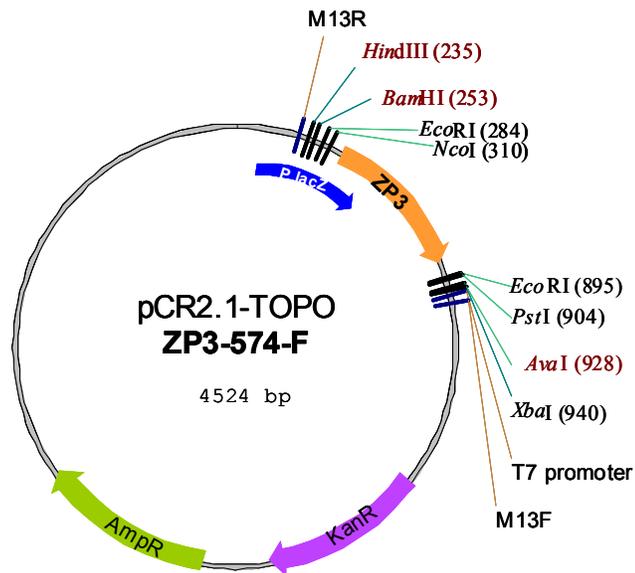


Figura 19. Fragmento amplificado de ZP3 incorporado en el vector pCR^R2.1-TOPO (Invitrogen).

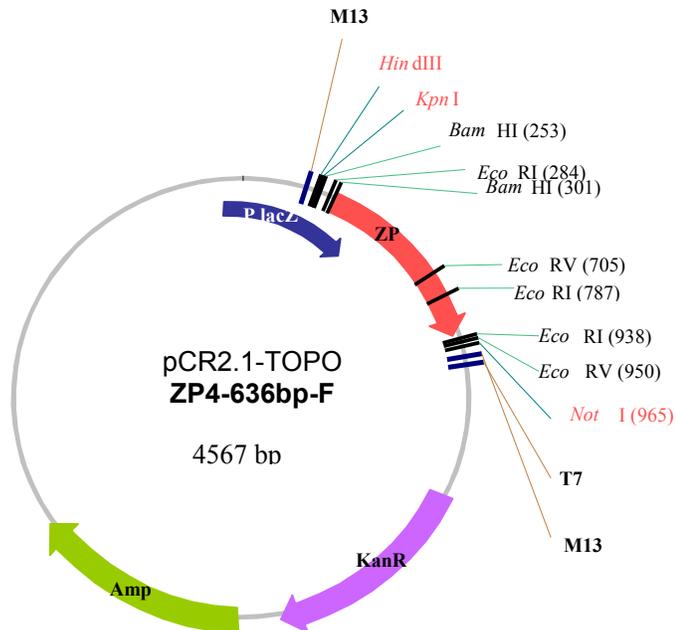


Figura 20. Fragmento amplificado de ZP4 incorporado en el vector pCR^R2.1-TOPO (Invitrogen).

10.3.2. Linealización de los plásmidos

Para la síntesis de la sonda de ARN a partir de la secuencia de ADNc subclonadas en plásmidos (Transcripción), éste debe estar en forma lineal. Para ello se lleva a cabo una reacción de linealización con endonucleasas de restricción. Todos los vectores utilizados para clonaje contienen un sitio denominado sitio multiclonaje, MCS o polylinker, con numerosos sitios o secuencias de reconocimiento para diversas enzimas de restricción. Es en este sitio donde se introduce la secuencia de ADNc a transcribir y, por tanto, a menudo nos encontramos con varias posibles enzimas para linealizar un plásmido. Una vez seleccionado el enzima de restricción, *BamHI* para *ZP1*, *ZP2*, y *ZP3* y *HindIII* para *ZP4*, el protocolo de linealización seguido fue el siguiente:

Mezcla de reacción, Volumen final = 50µl:

ADNp	variable (5µg)
H ₂ O	variable
Tampón del enzima	5µl
Enzima de Restricción	2µl

La reacción de linealización se dejó 2 horas a 37°C y a continuación 10 minutos entre 65-70°C para inactivar los enzimas que lo permiten. La reacción se chequeó en un gel de agarosa al 1% conteniendo 0.5µg/ml de bromuro de etidio.

Tras la linealización, el plásmido lineal (ADNpL) se purificó mediante extracción con Fenol/Cloroformo y posterior precipitación con 1/10 vol de Acetato sódico 5.2M y 1 vol de isopropanol.

10.3.3. Síntesis de sondas de ARN o Transcripción *in vitro*

La reacción de Transcripción tiene lugar a partir de una secuencia de ADN molde, en presencia de desoxinucleótidos (dNTPs) y por una ARN polimerasa. Generalmente los vectores de clonaje contienen sitios de iniciación para más de un

tipo de ARN polimerasa, las más comunes T3, T7 y Sp6. Al igual que el enzima de restricción, hay que seleccionar la ARN polimerasa que hay que utilizar para la síntesis de nuestra ribosonda antisentido, en nuestro caso la T7 polimerasa. Una vez realizada la selección, la reacción tiene lugar según el siguiente protocolo (basado en los protocolos de la casa Roche, Nonradioactive In situ Hybridization Application Manual 2^a ed. 1996):

Mezcla de reacción, volumen final = 20µl:

ADNpL	variable (1 µgr)
H ₂ O (libre de RNasas)	variable
Tampón de Transcripción	2µl (Roche, incluido con las polimerasas)
*Mezcla dNTPs	2µl
Inhibidor de RNasas	2µl
ARN polimerasa (T7)	2µl

* La mezcla de nucleótidos contiene 10mM de ATP, CTP y GTP; 6,5mM de UTP y 3,5mM de Dig-UTP, en 0,1M de Tris-HCl pH 7,5.

La mezcla de reacción se incubó 2 horas a 37°C. A continuación se le añadió a la mezcla de reacción 2 unidades del enzima DNasa I (Roche) y se incubó 15 minutos más a 37°C, para eliminar el ADNpL. Tras comprobar en un gel de agarosa que la síntesis había tenido lugar, se procedió a la purificación de la sonda con el kit de la casa Qiagen RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup y se comprobó de nuevo la sonda en gel de agarosa.

10.3.4. Procesamiento de los ovarios de hámster para hibridación *in situ*

Los ovarios se obtuvieron de hembras adultas de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (n=3). Éstas fueron sacrificadas por sobredosis de CO₂ y los ovarios tras ser limpiados del tejido conectivo y tejido graso circundante fueron fijados durante 12 horas a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4%.

Tras la fijación, los ovarios se deshidrataron, se pasaron por tolueno y se sumergieron en paraplast plus toda la noche todo ello en un procesador automático

tipo Fischer. Se realizaron cortes de 5 μm en un microtomo de parafina de rotación Leitz tipo 1512. Después de su estiramiento en agua caliente, se montaron en portaobjetos Super Frost Plus (Menzel, Braunschweig, Alemania). Los portaobjetos se mantuvieron a 37 °C durante 7 días antes de proceder a la hibridación.

10.3.5. Técnica de hibridación *in situ* sobre cortes de parafina

Las secciones de ovario fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas por paso por una batería de alcoholes decrecientes. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS e incubadas dos veces durante 5 minutos en PBS con 0,1% de Tween 20 (PBT).

Las secciones fueron entonces incubadas 3 minutos con proteinasa K libre de RNasas (Roche) (10 $\mu\text{g/ml}$), lavadas dos veces con PBT durante 10 minutos y postfijadas con 4% de PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados de 5 minutos con PBT, los portaobjetos fueron prehibridados a 65°C durante 1 hora en tampón de hibridación (50% formamida, solución de Denhardt 1X (Sigma Aldrich), SSC 4X (Sigma Aldrich), 10% sulfato de dextrano, 0,1 % de Tween 20 y 1,25 mg de heparina).

Previo a la hibridación, las ribosondas unidas a digoxigenina fueron diluidas en este tampón de hibridación a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ junto con 500 $\mu\text{g/ml}$ de ARNt, desnaturalizadas 5 min a 80 °C y posteriormente enfriadas en hielo.

La incubación de las sondas con las secciones (hibridación) se realizó a 65°C durante toda la noche en cámara húmeda.

Posteriormente los portaobjetos fueron lavados en 50% formamida/4X SSC/0,1% Tween 20 tres veces con una duración de 30 minutos cada lavado a temperatura ambiente.

Después, las secciones fueron incubadas con MAB (Anexo)-0,1% Tween 20 conteniendo 10% de suero fetal bovino para el bloqueo de uniones inespecíficas

durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de las sondas se utilizó un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) que fue incubado con las muestras en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C a una concentración 1:2000. Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados varias veces en TBS-Tween 20 a temperatura ambiente y entonces dos veces en solución de revelado (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂ y 0,1% Tween 20).

Para la detección o revelado de la hibridación se utilizaron los sustratos de la fosfatasa alcalina, 75 mg/ml NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Roche) y 50 mg/ml BCIP (5-Bromo-5-Chloro-3-Indolylphosphate, p-toluidine SALT, Roche) en tampón de revelado y en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción, que daba lugar a un producto coloreado azulado en los lugares de expresión del gen en cuestión, se paró con dos lavados de 5 minutos en PBT. A continuación se procedió a la post-fijación con PFA 4% y al contrastado de las secciones con rojo neutro. El montaje se realizó con el medio de montaje DAKO. Las muestras fueron analizadas mediante un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara digital (Leica DC 500).

11. PROTEÓMICA DE LA ZP DE HÁMSTER

El análisis mediante espectrometría de masas fue realizado por el grupo de Bioanálisis del IMIM-Hospital del Mar (UPF, Barcelona) y en el laboratorio de proteómica de la sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

El análisis por espectrometría de masas nos permite identificar qué proteínas están presentes en una mezcla proteica compleja gracias a la identificación de péptidos obtenida por comparación con bases de datos. Nuestro ensayo tenía como objetivo encontrar péptidos pertenecientes a ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 demostrando así de manera inequívoca que la ZP de hámster estaba constituida por cuatro proteínas.

11.1. Aislamiento de la ZP de ovario de hámster

Para el análisis mediante espectrometría de masas se procedió, en primer lugar, al aislamiento de la ZP de ovario de hámster mediante solubilización por calor (Jiménez-Movilla *et al.*, 2009).

Para ello se procedió, en primer lugar, a la estimulación de la foliculogénesis de las hembras (n=20) con 25 UI de PMSG. Todos los animales fueron sacrificados 48 h después de la inyección de PMSG mediante sobredosis de CO₂. Una vez sacrificados se obtuvieron los ovarios mediante incisión abdominal procediéndose a la extracción de los ovarios y lavado en placa de Petri con PBS. Bajo la lupa se retiró toda la grasa y el tejido conectivo que rodea el ovario.

Los ovarios se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Polytron. La homogeneización se realizó con el material en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra por fricción. Los ovarios fueron diluidos en 2 ml de tampón de homogeneización: tampón TEA (25 mM trietanolamina HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O y 1 mM CaCl₂·2H₂O, pH 8,5) mezclado con 1 pastilla inhibidora de tripsina (Sigma, España), 4 mg de hialuronidasa bovina testicular (Sigma, España), 4 mg de DNasa y 1% del detergente NP40 (Sigma, España) y homogeneizados durante tres periodos de 5 segundos con intervalos de descanso de 1 minuto. Una vez homogeneizado, se añadió 0,4 ml de una solución de ácido deoxicólico (Sigma, España) 0.1 g en 1 ml de TEA y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Esta solución fue de nuevo homogeneizada en un homogeneizador de cristal.

Obtuvimos unos 4 ml de homogeneizado que fueron repartidos en 4 viales y centrifugados a 13.000 rpm en una centrífuga (labofuge 400R, Heraeus) durante 8 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos en tampón TEA (25 mM trietanolamina HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, y 1 mM CaCl₂·2H₂O, pH 8.5) pasando a dos viales. A continuación realizamos tres lavados en tampón fosfato salino 10 mM complementado con 1M de NaCl, pH 7,0. Las muestras fueron

lavadas a continuación en 1 ml de tampón fosfato 10 mM pH=7 y tras este lavado se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato 10 mM y solubilizadas por calor en un baño a 65°C durante 45 minutos en continua agitación. Una vez terminado este proceso, las muestras fueron centrifugadas y recogimos unos 0,8 ml de sobrenadante. El sobrenadante de todas las muestras fue recogido y guardado a -20°C hasta su utilización.

11.2. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras (30 µl) fueron procesadas tal y como se ha descrito en el apartado 8.4 exceptuando el porcentaje de acrilamida del gel separador que fue del 12%. Una vez que el frente salió del gel separador se detuvo la corriente, y se procedió a la detección de las proteínas mediante tinción con plata.

11.3. Tinción de plata

En primer lugar se procedió a la fijación del gel durante 30 minutos en una solución de ácido acético al 5 % y metanol al 50%, a lo que le siguió dos lavados: primero en una solución de metanol al 50 %, y luego en agua ultrafiltrada.

Los siguientes pasos fueron la sensibilización en una solución de tiosulfato sódico al 0,01 %, dos lavados con agua ultrafiltrada y la tinción con nitrato de plata al 0,1 % durante 20 minutos a 4 °C.

Tras la tinción con plata, el gel es lavado dos veces con agua ultrafiltrada y revelado con una solución de carbonato sódico al 2 % en formalina. Cuando las bandas aparecen en el gel fijamos las mismas durante 5 minutos en una solución de ácido acético al 5 %.

11.4. Digestión con tripsina y análisis mediante HPLC/MS.

Las muestras fueron digeridas con el siguiente procedimiento estándar. En primer lugar y tras realizar electroforesis en gel de acrilamida y teñir con una disolución de plata, las bandas de interés fueron recortadas y lavadas dos veces con agua bidestilada MilliQ. A continuación, las bandas se sometieron a destinción con disoluciones incluidas en el kit ProteoSilver Plus® (Sigma-Aldrich). Seguidamente se lavaron dos veces con tampón bicarbonato amónico 25 mM pH 8.5 durante 30 minutos a 37 °C y otras dos veces con tampón bicarbonato amónico 25 mM pH 8.5 en 50 % acetonitrilo. Las bandas se secaron usando un concentrador-evaporador por vacío modelo Eppendorf 5301 durante 15-30 min.

A continuación, las bandas fueron incubadas con 50 µl de tampón bicarbonato amónico 25 mM pH 8.5 con TBP (tributilfosfina, Sigma-Aldrich) 10 mM, durante 15 minutos a 60 °C.

Después de eliminar el sobrenadante, se añadió iodoacetamida a las muestras reducidas utilizando 50 µl de tampón de bicarbonato amónico 25 mM pH 8.5 con IAA (iodoacetamida, Sigma-Aldrich) 100 mM durante 1 hora, a temperatura ambiente en oscuridad.

El sobrenadante fue eliminado y las bandas fueron lavadas dos veces, primero con tampón bicarbonato amónico 25 mM pH 8.5 y a continuación con tampón bicarbonato amónico 25 mM pH 8,5 en 50% de acetonitrilo, durante 15 minutos a 37 °C cada vez.

Después de estos lavados, las bandas fueron secadas usando un concentrador-evaporador por vacío modelo Eppendorf 5301 durante 15-30 min y a continuación incubadas con tampón de bicarbonato amónico 25 mM pH 8.5 conteniendo aproximadamente 0,3 µg de Tripsina Grado de Proteómica (Sigma-Aldrich) durante 45 minutos a 4°C y finalmente sometidas a digestión durante 16-18 horas a 37 °C en agitación continua.

Pasado este tiempo, el sobrenadante fue recogido en un nuevo tubo, y las bandas fueron lavadas una vez con 50 μ l de una solución conteniendo 50% de acetonitrilo y 0,5% de TFA y después otra vez con 50 μ l de acetonitrilo durante 30 minutos a 37 °C cada vez. Estos lavados permiten mejorar la extracción de fragmentos digeridos de las bandas del gel y ambos sobrenadantes después de los lavados fueron recogidos en el mismo tubo y secados usando concentrador-evaporador por vacío.

La separación y análisis de las digestiones tripticas de las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS). Para ello se utilizó un sistema que consiste en un HPLC modelo Serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), termostaticado y equipado con un muestreador automático y una bomba capilar. Este HPLC se conectó a un espectrómetro de masas tipo trampa de iones modelo Agilent XCT Plus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) usando una interfase tipo electrospray (ESI).

Las muestras evaporadas fueron resuspendidas en 10 μ l de tampón A que consistió en una mezcla de agua/acetonitrilo/ácido fórmico (94,9:5:0,1). El tampón B consistió en una mezcla agua/acetonitrilo/ácido fórmico, 10:89,9:0,1.

La muestra fue inyectada en una columna de HPLC tipo Zorbax SB-C₁₈ (5 μ m, 150 \times 0.5 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), la cual se encontraba en un compartimiento termostaticado a 40 °C, utilizando un flujo de 10 μ l/min. Después de la inyección la columna fue lavada con tampón A y los péptidos digeridos se eluyeron usando un gradiente lineal 0-80 % B en 120 minutos.

El espectrómetro de masas se empleó en modo positivo, con un voltaje en el capilar de 3500 V y una velocidad de barrido de 8100 (m/z)/segundo, en el rango de medida desde 300-2200 m/z . La presión del gas de nebulización (Helio) se mantuvo en 15 psi, mientras que el gas secante se mantuvo a un flujo de 5 l/min y a una temperatura de 350 °C. Los datos de MS/MS fueron recogidos de forma

automatizada. Los iones más intensos se fragmentaron secuencialmente mediante una disociación inducida por colisión (CID) usando helio como gas de colisión. Estos iones más intensos se aislaron con una ventana de 2 m/z de anchura y se fragmentaron con una energía relativa de colisión del 35 %. El procesamiento de los datos se llevó a cabo en el programa de análisis LC/MSD Trap Data Analysis Versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y la búsqueda de coincidencias se llevó a cabo con el motor Spectrum Mill (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU).

11.5. Análisis mediante MALDI-TOF MS

Las muestras peptídicas se disolvieron en agua con la correspondiente matriz para llegar a una solución de concentración conocida. Un volumen de entre 300 y 500 nl de esta solución se aplicó al soporte para MALDI y la mezcla se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Para el análisis de proteínas se empleó una solución de ácido sinapínico (10mg/ml) en ACN/agua/TFA ((50:50:0.1 v/v/v) y para péptidos se empleó una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (20 mg/ml) en ACN/agua/TFA (70:30:0.1 v/v/v). Los ensayos fueron llevados a cabo en un Voyager-DE STR Biospectrometry workstation (Applied Biosystems), equipado con un láser N₂ (337 nm). Las muestras fueron medidas en modo reflector para la identificación de fórmulas moleculares a partir de la medición de masas exactas. Las calibraciones de los espectros fueron llevadas a cabo mediante el uso del kit estándar de péptidos Sequazyme Peptide Mass Standards Kit (PerSeptive Biosystems). Los datos fueron procesados con Data Explorer Software (Applied Biosystems).

12. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4

Para estudiar la historia evolutiva del gen ZP4 en el seno de la subfamilia Murinae es necesario construir un árbol filogenético. La construcción del árbol se efectúa en cuatro etapas:

a) Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas. Éste se realizó de manera manual mediante el programa SEAVIEW (Galtier *et al.*, 1996).

b) Elección del modelo de evolución. Con el fin de corregir la diferencia entre el número de sustituciones observadas y el número de sustituciones reales son propuestos diferentes modelos de evolución. Todos los sitios de un alineamiento no evolucionan a la misma velocidad. Esta heterogeneidad en el ritmo o tasa de sustitución puede ser incorporada en el modelo de evolución. Para determinar el modelo de evolución y los parámetros que mejor se adaptan a nuestras secuencias utilizamos el programa MODELTEST. Este programa determina la verosimilitud del árbol según el alineamiento y el modelo de evolución. Un total de 14 modelos de evolución son testados, cada uno de ellos cuatro veces: sólo, con el parámetro I, con el parámetro γ y con los dos parámetros (un total de $14 \times 4 = 56$ posibilidades). El programa calcula según un Criterio de Información de Akaike (AIC) el modelo de evolución más adecuado.

c) Construcción del árbol. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de máxima verosimilitud mediante el programa PHYLM (Guindon *et al.*, 2003). Son necesarias dos etapas para obtener el árbol final utilizando este programa:

1. El programa determina la topología del árbol inicial y la longitud de las ramas utilizando el modelo de “Neighbor Joining” (NJ). PHYML utiliza BioNJ una variante de NJ.

2. Una vez que el árbol está determinado el programa PHYLM optimiza la longitud de las ramas y la topología calculando según el método de máxima verosimilitud para cada sitio del alineamiento la tasa de sustituciones entre los diferentes taxones (en función del modelo elegido). NJPLOT fue utilizado para el visualizado de los árboles.

d) Verificación de la robustez de los árboles obtenidos: utilización del método de “bootstrap”. Con este método estimamos el nivel de confianza (robustez estadística de las hipótesis filogenéticas). Realizamos 1000 replicas con el programa PHYML.

13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Las secuencias de ZP1 y de ZP4 de hámster fueron analizadas para determinar su homología con otras secuencias conocidas usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La comparación directa entre dos secuencias fue hecha con el programa ALIGN y los alineamientos múltiples de las secuencias de ZP1 y ZP4 de hámster con las secuencias de ZP1 y ZP4 de otras especies fueron llevados a cabo usando el Clustal W (Kyte y Doolittle, 1982) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Los alineamientos múltiples entre secuencias de diferentes especies para la posterior construcción de árboles filogenéticos se realizaron mediante el programa SEAVIEW (Galtier *et al.*, 1996). Basándonos en el método de máxima verosimilitud se obtuvieron árboles filogenéticos usando el programa PHYLM (Guindon *et al.*, 2003).

Las secuencias de aminoácidos fueron deducidas por traducción reversa usando programa "Translate" disponible en www.expasy.org. El programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) fue usado para predecir la secuencia de péptido señal. Los programas NetOGlyc (Hansen *et al.*, 1998) y NetNglyc (Gupta y Brunak, 2002) fueron usados para predecir los sitios potenciales de N- y O- glicosilación.

Los números de acceso de los ADNc de las ZP de las diferentes especies con los que hemos trabajado son los siguientes:

Mus musculus ZP1 (NM_009580); *Mus musculus* ZP4 (putativa) (XM_001481273); *Rattus norvegicus* ZP1 (XM_001075428); *Rattus norvegicus* ZP4 (NM_172330); *Mesocricetus auratus* ZP1 (EU003563); *Mesocricetus auratus* ZP4 (DQ838550); *Homo sapiens* ZP1 (NM_207341); *Homo sapiens* ZP4 (NM_021186); *Macaca mulatta* ZP1 (XM_001084628); *Macaca mulatta* ZP4 (XM_001096846); *Macaca*

radiata ZP1 (EF530200); *Macaca fascicularis* ZP4 (AY222647); *Pan troglodytes* ZP1 (XM_522022); *Pan troglodytes* ZP4 (XM_525105); *Equus caballus* ZP1 (XM_001493722); *Equus caballus* ZP4 (XM_001490753); *Monodelphis domestica* ZP1 (XM_001379208); *Trichosurus vulpecula* ZP4 (AF263013); *Papio cynocephalus* ZP4 (AY222646); *Callithrix jacchus* ZP4 (Y10822); *Oryctolagus cuniculus* ZP4 (M58160); *Bos taurus* ZP4 (NM_173975); *Sus scrofa* ZP4 (NM_214045); *Felis catus* ZP4 (NM_001009260); *Canis familiaris* ZP4 CDS parcial (AY573930); *Mustela erminea* ZP4 (AY799766).

VI. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE *ZP1* Y *ZP4* DE HÁMSTER

1.1. Amplificación y análisis de la secuencia codificante de *ZP1* de hámster

Tras la obtención de ARN total de ovarios de hámster, el ADNc obtenido fue usado como molde para una serie de reacciones de PCR iniciales en las que se pretendía la amplificación de algún fragmento de *ZP1* a partir del cual pudiésemos amplificar el ADNc completo mediante tecnología RACE. Para ello diseñamos una pareja de oligonucleótidos teniendo en cuenta regiones conservadas en *ZP1* de rata y ratón. En una primera amplificación por PCR obtuvimos varias bandas, una de ellas de peso esperado (aproximadamente 400 nucleótidos) fue purificada y secuenciada de manera automática (Figura 21). El alineamiento de la secuencia del amplicón en las bases de datos genómicas (blastnt) nos confirmó la identidad del fragmento. Se trataba de un fragmento de *ZP1* de hámster que presentó una homología del 84 % con el ADNc de *ZP1* de rata y ratón.

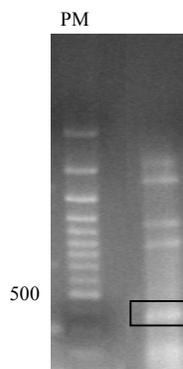


Figura 21. Banda amplificada de aproximadamente 400 pares de bases obtenida por PCR que corresponde con un fragmento de *ZP1* de hámster. En la PCR se utilizaron cebadores específicos diseñados con secuencias comunes a *ZP1* de rata y ratón.

Este fragmento comprendía una región de 391 nucleótidos en el ADNc de ratón y 391 nucleótidos en el ADNc de rata codificando el fragmento comprendido desde el aminoácido Leu395 hasta Cys525 de *ZP1* de rata y el fragmento situado entre Leu397 y la Cys527 en la *ZP1* de ratón (130 aminoácidos). En el hámster, la traducción de la secuencia daba lugar a un fragmento de 130 aminoácidos muy homólogo a la rata y al ratón (Figura 22).

```

RATON      LRLELRIATDKTFSSYYQGS DYPLVRLLEP VYVEVRL LQRTDPSLVLVLHQCWATPTTS 60
RATA       LRLELRIATDKTFSSYYQGS DYPLVRLLEP VYIEVRL LQRTDPGLALMLHQCWATPSAS 60
HAMSTER    LRLELRIAKDKTFSSYYRERDYPLARLLQEPVHV EIRLLQRTDPGMVLMMLHQCWATPTAN 60
          *****.*****:  ****.***:***:.*:*****.:.:*****:;.

RATON      PFEQPQWPILSDGCPFKGDNYRTQVVAADREALPFW SHYQRFTITTFMLLDSSSQNALRG 120
RATA       PFEQPQWPILSDGCPFKGDNYRTQMVAADRATLPFW SHYQRFTIATFTLLDSSSQNALRG 120
HAMSTER    PFQQPQWPILSDGCPFEGDNYRTQMVALDRAELLFWS HYRFTVTFFTLLDSSAGSTLRG 120
          **:*****.*****.*** ** * *****:***:.* *****: .:***

RATON      QVYFFCSASAC 131
RATA       QVYFFCSASAC 131
HAMSTER    LVYFFCSASVC 131
          *****.*
    
```

Figura 22. Alineamiento entre el primer fragmento amplificado de *ZP1* de hámster con el mismo fragmento de *ZP1* de rata y ratón.

Este primer fragmento de *ZP1* de hámster es la primera evidencia, a nuestro entender, de la expresión de la proteína *ZP1* en este animal. Por ello, abordamos a continuación la amplificación del marco abierto de lectura completo del gen de la *ZP1* de hámster usando la información de la secuencia del fragmento de 400 pares de bases y siguiendo las recomendaciones del kit: BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Para ello diseñamos los cebadores necesarios para amplificar por separado el extremo 3' y el extremo 5' del fragmento de 400 pares de bases que comprendiera la unidad de transcripción completa (cebadores descritos en Material y Métodos). Para la obtención de los dos extremos (el 3' y el 5') tuvimos que emplear una segunda reacción de amplificación anidada, ya que el rendimiento y la especificidad de la primera amplificación no fue lo suficientemente alto como para poder localizar los fragmentos tras la separación en gel de agarosa y por lo tanto para poder extraerlos.

A continuación se purificaron y secuenciaron ambos fragmentos (el 5' y el 3') y confirmamos la identidad de cada uno de ellos mediante comparación de las secuencias con las de las bases de datos genómicas de ratón y rata utilizando los programas de homología de secuencias (blastn). El empalme de ambos extremos (5' y 3') nos proporcionó la secuencia del ADNc de ZP1 completa que fue depositada en el GenBank con número de acceso EU003563. El codón de iniciación (ATG) fue predicho con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentra asociado con el entorno Kozak (Kozak, 1991). La secuencia depositada contiene un codón de stop (TGA) en las posiciones 1906-1908 y una señal de poliadenilación en las posiciones 1967-1972 (Figura 23).

```

1   gggggaagttctagcagctgtgggtgtctgtgggtgtactggcaggagcctccgccatg
61  gcctgggggtgctttgtggccgtgcttctgctgggtggcaactcccctgaggttgggtcag
121 catctacactccaagcctggccttgaatacagctatgactgtggggtgcagggtatgcag
181 ctgctgggtgatccccagggtcaaaccagactatccgattcaagggtgctggatgaatttggg
241 aaccggtttgaggatgaataactgctctatctgctaccactgggtcatctctgagccccat
301 gaccctgcagtatctcagctgactacagaggctgccatgtgctgcagaaggatggacgg
361 tccacctgagagtggttcgtgcaagctgtactaccaatggctacgtggatagcagcaca
421 gatgtcactctgatctgtcctaagcagaccacactgtgactccggaccctacctggct
481 ccaccactacacctcaaccttttacacctcatactttgtcccacataccaattctggc
541 cacacgctggctgggtctggccacacgctggctgggtctggccacacgcctcttctcagc
601 acattgtaccagagacagacttcatccattcaactcctgctccaccatccccgggacct
661 ggacctgctgggcccactgtgcctcatccccagtggggaccttggaaaccttggaaattg
721 actaagctggattctgtagggaccatctgacccaggagcagtgctcaggtagcctctggg
781 cacattccctgcatgataaaaagttagttccaaggaagcctgtcagcaggctgggtgctgc
841 tacgacaacaccagagaagtacctgttactatggcaacacagccactctccagtgctcc
901 agaagtggttacttcacctggccatataccaagaaacagccttgacacacagggtcatg
961 ctgaaacaatatccacctggcctatgccccagcagatgccccctaccagaagacaagc
1021 gcttttgggtcttccatgttctcctaaccctctgtggaacgacaatccagggtgggtggg
1081 gagcagctcatctatgagaaccagctgggtgtctaacattgacgtccaaaaggggccaag
1141 ggttccatcactcgggacagtgcttccggcttcatgttcgctgtatcttcaacgctagt
1201 gacttctgctgttcaggcatctatcttctcaccccaaccacctgcccctgtgaccag
1261 tctggaccctcgggctggagctgaggattgccaaggacaagacttctcagctcctactat
1321 cgggagcgtgactatccccttgcgagactgctccaagaaccagtcctatgtggagatccgt
1381 ctctgcagagaaccgaccocggcatggctctgatgctacaccagtgctgggacctccc
1441 acggccaacccttccaacagccccagtgggccattctgtcagatgggtgtcccttcgag
1501 ggtgacaactacagaacacaaaatggggccttgacagggcgagctgctcttctgggtct
1561 cactaccggcgttcaccgtcactaccttactctccttgactccagcgccggaagcacc
1621 cttaggggactgggtctacttcttctgtagtgcctctgtctgctaccctgagggatcagaa
1681 acatgctctactgtatgtgactctgggatggcaaggcaccgacggtccactgggtaccac
1741 aatagcactgtccatgccttggacattgtgagttctccaggagcagtggttcttggat
1801 gctgctaaactcaagccctcaggctccagcaggaactctatctcaagaccctgctctgg
1861 gtgctgctcctcctgctggtcaccacctggctcctgatgtcttcttgtagtctgaattggg
1921 cctgggcccagaaactctgagaaggcaccagatgttaagtgggttcaataaaaccattgtt
1981 tgaaaaccaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 23. Secuencia de nucleótidos de ZPI de hámster. Número de acceso en GenBank: EU003563. El atg inicial y el tga de finalización están destacados en rojo. El sitio potencial de poliadenilación está señalado en color verde.

El ADNc de *ZP1* contiene una secuencia codificante de 1851 pares de bases. Esta secuencia codifica un polipéptido de 616 aminoácidos con un peso molecular teórico de 67,9 kDa. Posee un péptido señal de 20 aminoácidos según el algoritmo de Bendtsen *et al.*, (2004), con corte entre Gly20 y Gln21. Por lo tanto, la proteína secretada madura comenzaría en Gln21 y terminaría en His554 ya que es ahí donde se encuentra el sitio consenso para corte de proteasas tipo furina (Duckert *et al.*, 2004). Estos datos sugieren que el patrón de secreción de ZP1 sería similar al de otras proteínas de la ZP. El peso molecular del péptido procesado (sin el péptido señal y con corte en His554) fue calculado y corresponde a 59,2 kDa (Figura 24).

```

1  MAWGCFFVAVLLLVATPLRLGQHLHSPKPLEYSYDCGVQGMQLLVI PRSNQTI RFKVL
58  DEFGNRFEVNNCSICYHWVISEPHDPAVFSADYRGCHVLQKDRFHLRVFVQAVLPN
115 GYVDTAQDVTLICPKADHTVTPDPYLAPPTTPQPFTPHTFVPHTNSGHTLAGSGHTL
172 AGSGHTPLLSTLYPEHSFIHSTPAPPSPGPGPAGPTVPHQWGTLEPLELTKLDSVG
229 THLTQEQCQVASGHI PCMIKSSSKEACQQAGCCYDNTREVPCYYGNTATLQCSRSY
286 FTLAISQETALTHRVMNNIHLAYAPSRCPPTQKTSFVVFHVPLTLCGTTIQVVGE
343 QLIYENQLVSNIDVQKGPKGSITRDSVFRHLVRCIFNASDFLPVQASIFSPQPPAPV
400 TQSGPLRLELRIAKDKTFSSYYRERDYPLARLLQEPVHVEIRLLQRTDPGMVLMHLQ
457 CWATPTANPFQQPQWPILSDGCPFEGDNYRTQMVALDRAELLFWSHYRRFTVTTFTL
514 LDSSAGSTLRGLVYFFCSASVCYPEGSETCSTVCDSGMARHRRSTGHHNSTVHALDI
571 VSSPGAVGFEDAALKPSGSSRNSISRPLLWVLLLLLVTTLVLMSL

```

Figura 24. Secuencia de aminoácidos de ZP1 de hámster deducida de la secuencia de ADNc y depositada en la base de datos del GenBank con el número de acceso: ABS86997. El péptido señal está en color rojo (corte entre Gly20 y Gln21). El dominio trefoil está señalado en color verde. El dominio ZP está señalado en color azul, el sitio consenso de corte para furina está señalado en naranja (RHRR) y el dominio transmembrana en rosa. La His554 correspondiente al último aminoácido de la proteína madura está subrayada.

Otras características químicas deducibles de la secuencia son que muestra una alta hidrofobicidad en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal. Así mismo también encontramos varios dominios dentro de la estructura proteica: un dominio trefoil (234Glu-Thr278), un dominio ZP (Gln279-Gly550) y un dominio transmembrana (TMD) entre Leu599 y Leu613 que es seguido por un corto tallo citoplasmático (Krogh *et al.*, 2001).

Un total de 102 sitios potenciales de O-glicosilación son predichos en la secuencia proteica de ZP1.

Por otro lado, se detectan tres sitios potenciales de N-glicosilación en la proteína madura (Asn49, Asn68, y Asn379) al presentar la secuencia consenso: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, siendo X cualquier aminoácido distinto de prolina.

1.2. Amplificación y análisis de la secuencia codificante de ZP4 de hámster

Usando la misma metodología empleada para la amplificación de ZP1, tras la obtención de ARN total de ovarios de hámster, el ADNc obtenido fue usado como molde para una serie de reacciones de PCR iniciales en las que se pretendía la amplificación de algún fragmento ZP4 a partir del cual pudiésemos amplificar el ADNc completo mediante tecnología RACE. Para estas amplificaciones se diseñaron cebadores teniendo en cuenta secuencias conservadas en ZP4 de rata y la putativa de ratón. En la figura 25 se muestra la amplificación del primer fragmento de ZP4 de hámster a partir del cual obtendríamos posteriormente la secuencia completa por tecnología RACE.

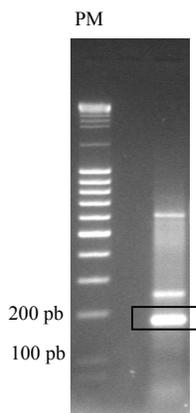


Figura 25. Banda amplificada de 181 pares de bases obtenida por PCR que corresponde con un fragmento de *ZP4* de hámster. En la PCR se utilizaron cebadores específicos diseñados con secuencias comunes a la *ZP4* de rata y ratón.

Este fragmento de 181 pares de bases (Figura 25) se obtuvo tras la realización de dos amplificaciones por PCR (cebadores indicados en Material y Métodos); en la primera no se consiguió un rendimiento bueno de manera que se realizó una PCR anidada con un segundo par de cebadores. En esta segunda PCR se consiguió amplificar el fragmento de tamaño esperado. La secuencia del amplicón y su alineamiento en las bases de datos genómicas (blastnt) nos confirmó la identidad del fragmento. Se trataba del ortólogo de *ZP4* de hámster que presentó una homología del 80% con el ADNc de rata.

Este fragmento comprendía un fragmento de 181 nucleótidos en el ADNc de rata y 178 nucleótidos en el ADNc de ratón codificando el fragmento comprendido desde el aminoácido Asn192 hasta el aminoácido Ser251 de la *ZP4* de rata (Figura 26).

```

RATA          NTVTSHCTKEGHFSIAVSRDVTSPPLRLDSLRLGFRNITGCDPVMKTSTFVLFQFPPLTS 60
HAMSTER      NTVTSQCSREGSFSIAVSRNVTSPPNLDSLHLVVR-SDSGCDPVMATPTFALFQFPPTS 59
*****:*.:** *****:*****.*****.* .* :***** *.**.******:**

```

Figura 26. Alineamiento entre el primer fragmento amplificado de ZP4 de hámster con el mismo fragmento de ZP4 de rata.

Este primer fragmento de *ZP4* de hámster es la primera evidencia de la expresión de la proteína *ZP4* en este animal. Por ello, abordamos a continuación la amplificación del marco abierto de lectura completo del gen de la *ZP4* de hámster usando la información de la secuencia del fragmento de 181 pares de bases y siguiendo las recomendaciones del kit: BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) diseñamos los cebadores necesarios para amplificar por separado el extremo 3' y el extremo 5' del fragmento de 181 pares de bases que comprendiera la unidad de transcripción completa. Para la obtención del extremo 5' tuvimos que emplear una segunda reacción de amplificación anidada ya que el rendimiento y la especificidad de la primera no fue lo suficientemente alto como para poder localizar el fragmento tras la separación en gel de agarosa y por lo tanto para poder extraerlo. La reacción anidada, sin embargo, rindió una banda clara de 700 pares de bases (el tamaño esperado) por lo que procedimos a su aislamiento y purificación. Los mismos procedimientos de purificación se emplearon para la banda de amplificación 3' (1060 pares de bases). A continuación se secuenciaron ambos fragmentos y confirmamos la identidad de cada uno de ellos mediante comparación de las secuencias con las de las bases de datos genómicas de ratón y rata utilizando los programas de homología de secuencias (blastn). El fragmento 5' de *ZP4* de 744 pares de bases comprendía desde la zona 5' no codificante (25 nucleótidos previos al atg inicial) hasta el aminoácido Pro237 y el fragmento 3' de *ZP4* de 1124 pares de bases obtenido contenía la secuencia desde el aminoácido Ala205 hasta el aminoácido Arg543 además del sitio de stop y señal de poliadenilación. Con la finalidad de tener todo el ADNc de *ZP4* en el mismo fragmento clonado, diseñamos una pareja de cebadores que abarcaban todo el marco abierto de lectura (especificados en Material y Métodos) y abordamos la amplificación, clonación en pcDNA3.1 y secuenciación del mismo. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos fue depositada en el GenBank con número de acceso

DQ838550. El codón de iniciación (ATG) fue predicho con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentra asociado con el entorno Kozak (Kozak, 1991). La secuencia depositada contiene un codón de stop (TGA) en posiciones 1663-1665 y una señal de poliadenilación en posiciones 1747-1752 (Figura 27).

```

1  cagagtacgc ggggggggcta gtggaggaga agaatggcta gccggactct gagtagtact
61  ctgtggctcc ttccaggcat cttcctgtgt ttcccattct gtcctccttt gagtgggca
121 catgtgactg agctgccagg tgtgctccac tgtgggctag ggagcttcca gtttactgtg
181 aacctcagcc tggaggcaga gagtccctgtg ttaacagctt gggatagccg agggctgcca
241 cacaggctaa agaatgactc tgactgtggt acgtgggtga tggacagtcc tggtgactct
301 ctggtgttag aagctaccta caatggctgc tatgtcacta tgagcagctc ccaactatgtc
361 atggaagtgt gagtgcaaga cgtgaatgta actgaacata tgccaggggc aaggaagaga
421 ctgcttaaat gccctttgga tcgtcaaggc ccaaactc ttagtactga agtgtgcaat
481 cctgtgccag taaaagaaag gcttctctgt gctcccttgc ccatctctca aggagactgt
541 gacaagtgtg gttgctgcta catcgctgaa gaggaagagg tgggctactg ttactatgga
601 aacacagtga cctcccagtg tagcagagag ggcagcttct ccattgctgt gtccaggaat
661 gtgacctcac cacctctgaa cttggattca ctacacttgg ttgtcaggag tgacagtgga
721 tgtgaccctg tgatggcaac acccaccttt gccctgttcc aatttccatt tacttctctgt
781 gggaccacaa ggcgggtcat tggagaccag gtcgtgtatg aaaatgaact attggccact
841 caggatgtga gaacttgggg caatggctct attacccgag atagcatctt caggctccga
901 gtcagctgca gctactctgt tctcagcaac acatcccaa ttaacatgca agtgctgact
961 ctcccaccac cccttcctaa gaccagcct gggtcctct ctctcagct tcagattgcc
1021 aaggatgaaa cctatggctc ttactatggt gctgaagact acccattggt gaaatttctc
1081 caggatccta tttatgttga ggtctccatc cttcacagaa cagaccctc cttggagtta
1141 ctgctagagc aatgctgggc cacatctggc cctaacctt ttcttcaacc acaatggcca
1201 atcctagtga agggatgcc atatgctgga gacaactatc agaccagaag gatcaatgtc
1261 cagaaagcat caaggccctt tccttctcat caccaacgct tcagcatctc taccttcagc
1321 ttacaaaatg ctatcaggaa ggggcagagt tttgctggac aggtatacct gcaactgcagt
1381 gcattggtct gccagcctgc tgggacacca tcctgcaagg caatctgtcc tgcttcagg
1441 agaagaagaa aatctgagct ttattttaa aacaactc ccaggatatc cagcaagggc
1501 cctgtgatcc tcctgcaagc taccaaggac cctgcagaca tgcttcatag atattcaagc
1561 acccccatga attccctgc tctgtgggtt gtaggacttt cggcaatcac gatcatcatt
1621 tccatcttgt tagtattcta cctggccatc agaaaagcaa gatgaattac ccagactaag
1681 tgtctcaaaa ctgcttacet tcccagtatg gaggggctt gtcatttggga agatcatctg
1741 attctgaata aacacctcta cttatct

```

Figura 27. Secuencia de nucleótidos de ZP4 de hámster. Número de acceso en GenBank: DQ838550. El atg inicial y el tga de finalización están en rojo. El sitio potencial de poliadenilación está señalado en color verde.

El ADNc de *ZP4* contiene una secuencia codificante de 1632 pares de bases. Esta secuencia codifica un polipéptido de 543 aminoácidos con un peso molecular teórico de 59,946 kDa. Posee un péptido señal de 28 aminoácidos según el algoritmo de Bendtsen *et al.*, 2004, con corte entre Gly28 y Gln29. Por lo tanto, la proteína secretada madura comenzaría en Gln29 y terminaría en Arg470 ya que es ahí donde se encuentra el sitio consenso para corte de proteasas tipo furina (Duckert *et al.*, 2004). Este dato refleja que el patrón de secreción de *ZP4* sería similar al de otras proteínas de la ZP. El peso molecular del péptido procesado (sin el péptido señal y con corte en Arg 470) fue calculado y corresponde a 48,767 kDa (Figura 30).

La figura 28 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADNc y depositada en la base de datos GenBank.

```

1  MASRTLSSSTLWLLPGIFLFCFPFCPLSGQHVTELPGVLHCGLGSFQFTVNLSLEAES
58  PVLTAWDSRGLPHRLKNDSDCGTWVMDSPGDSLVEATYNGCYVTMSSSHYVMEVGV
115 QDVNVTEHMPGARKRLLKCPDRQGPNTLSTEVCNPVVKERLLCAPLPISQGDCK
172 LGCCYIAEEEEVGYCYGNTVTSQCSREGSFSIAVSRNVTSPPLNLDLHLVVRSDS
229 GCDPVMATPTFALFQFPFTSCGTTRRVIGDQVVYENELLATQDVRTWGNGSITRDSI
286 FRLRVSCSYSVLSNTSPINMQVLTLPPLPKTQPGSLSELELQIAKDETYGSYYGAED
343 YPLVKFLQDPIYVEVSILHRTDPSLELLLEQCWATSGPNPFLQPQWPILVKGCPYAG
400 DNYQTRRINVQKASRPFPSHHQRFSSITFSFTNAIRKGQSFAGQVYLHCSALVCQPA
457 GTPSCKAICPASRRRRKSELYFKNNTARISSKGPVILLQATKDPADMLHRYSSTPMN
514 SPALWVVVGLSAITIIISILLVFLAIRKAR

```

Figura 28. Secuencia de aminoácidos de *ZP4* de hámster deducida de la secuencia de ADNc y depositada en la base de datos del GenBank con el número de acceso: DQ838550. El péptido señal está en color rojo (corte entre Gly28 y Gln29). El dominio trefoil está señalado en color verde (¹⁴⁶Glu-Ser¹⁹⁴). El dominio ZP está señalado en color azul (¹⁹⁵Gln-Ser⁴⁶⁸) El sitio consenso de corte para furina está señalado en naranja (RRRR) y el dominio transmembrana en rosa (⁵¹⁷Leu-Ile⁵³⁹). La Arg470 correspondiente al último aminoácido de la proteína madura está subrayada.

Otras características químicas deducibles de la secuencia son que muestra, al igual que *ZP1*, una alta hidrofobicidad en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal. Así mismo también encontramos varios dominios dentro de la estructura proteica: un dominio trefoil (¹⁴⁶Glu-Ser¹⁹⁴), un dominio ZP (¹⁹⁵Gln-Ser⁴⁶⁸) y un

dominio transmembrana (TMD) entre Leu517 y Ile539 que es seguido por un corto tallo citoplasmático (Krogh *et al.*, 2001).

2. COMPARACIÓN DE ZP1 Y ZP4 DE HÁMSTER CON OTRAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZP

Las secuencias correspondientes a los ADNc descritos en el apartado anterior de ZP1 y ZP4 de hámster fueron comparadas con ZP1 y ZP4 de diferentes especies de mamíferos.

Los números de acceso de los ADNc utilizados para la comparación fueron:

Mus musculus ZP1 (NM_009580); *Mus musculus* ZP4 (putativa) (XM_001481273)
Rattus norvegicus ZP1 (XM_001075428); *Rattus norvegicus* ZP4 (NM_172330);
Mesocricetus auratus ZP1 (EU003563); *Mesocricetus auratus* ZP4 (DQ838550);
Homo sapiens ZP1 (NM_207341); *Homo sapiens* ZP4 (NM_021186); *Macaca mulatta* ZP1 (XM_001084628); *Macaca mulatta* ZP4 (XM_001096846); *Macaca radiata* ZP1 (EF530200); *Macaca fascicularis* ZP4 (AY222647); *Pan troglodytes* ZP1 (XM_522022); *Pan troglodytes* ZP4 (XM_525105); *Equus caballus* ZP1 (XM_001493722); *Equus caballus* ZP4 (XM_001490753); *Monodelphis domestica* ZP1 (XM_001379208); *Trichosurus vulpecula* ZP4 (AF263013); *Papio cynocephalus* ZP4 (AY222646); *Callithrix jacchus* ZP4 (Y10822); *Oryctolagus cuniculus* ZP4 (M58160); *Bos taurus* ZP4 (NM_173975); *Sus scrofa* ZP4 (NM_214045); *Felis catus* ZP4 (NM_001009260); *Canis familiaris* ZP4 partial CDS (AY573930); *Mustela erminea* ZP4 (AY799766).

El resultado de las comparaciones nos indica que existe una alta similitud de ZP1 de hámster con ZP1 de otros mamíferos como: ZP1 humana (79%), ZP1 de rata (84%), ZP1 de ratón (85%). Así mismo, la de ZP4 muestra también una alta similitud con ZP4 de otros mamíferos como: ZP4 de cerdo (60%), ZP4 humana (78%), ZP4 de rata (82%), ZP4 de ratón (82%) y ZP4 de vaca (61%).

Por otro lado, las relaciones filogenéticas obtenidas indican que ZP1 de hámster está más cercana desde el punto de vista filogenético a ZP1 de rata (*Rattus norvegicus*) y ZP1 de ratón (*Mus musculus*), y ZP4 de hámster se encuentra más cercana a ZP4 de rata y a ZP4 putativa de ratón. En la figura 29 se muestra un árbol

filogenético donde se observan las relaciones existentes entre ZP1 y ZP4 de hámster y ZP1 y ZP4 de otras especies.

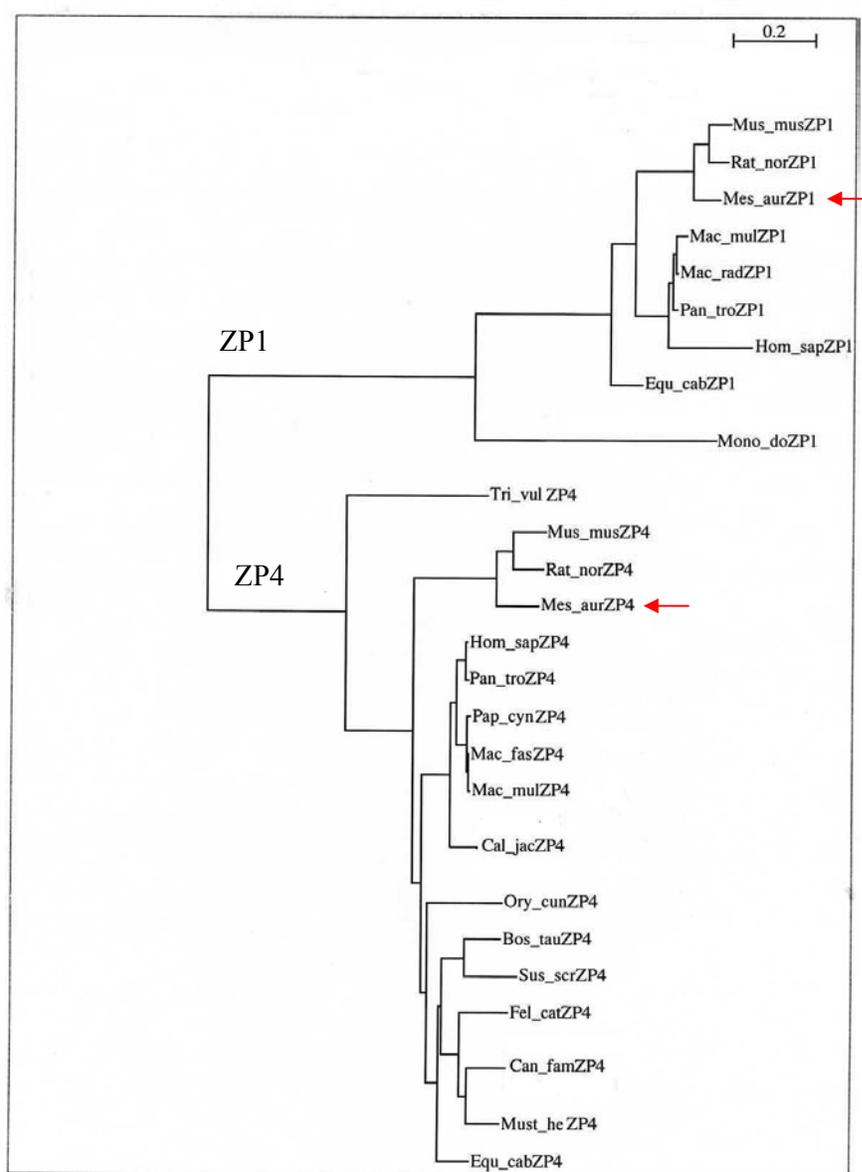


Figura 29. Árbol filogenético donde se observan las relaciones existentes entre ZP1 y ZP4 de diferentes especies. La escala indica el número de sustituciones por sitio. ZP1 y ZP4 de hámster están señaladas con una flecha roja.

Por otro lado, la secuencia de aminoácidos ZP1 tiene una alta similitud con ZP1 de otros mamíferos: ZP1 humana (67%), ZP1 de rata (80%), ZP1 de ratón (80%). ZP4 también presenta similitud con ZP4 de otros mamíferos: ZP4 de cerdo (60%), ZP4 humana (62%), ZP4 de rata (73%) y ZP4 de vaca (61%).

Esta similitud es similar a la existente entre ZP2 y ZP3 de hámster con las secuencias homólogas en las otras especies de mamíferos (Figura 30).

ZP1	Cerdo	Hombre	Rata	Ratón	Vaca
Hámster	-----	67%	80%	80%	-----

ZP2	Cerdo	Hombre	Rata	Ratón	Vaca
Hámster	53%	56%	73%	71%	56%

ZP3	Cerdo	Hombre	Rata	Ratón	Vaca
Hámster	66 %	66%	78%	79%	68%

ZP4	Cerdo	Hombre	Rata	Ratón	Vaca
Hámster	60%	62%	73%	-----	61%

Figura 30. Porcentaje de similitud entre las glicoproteínas de la ZP de hámster y las glicoproteínas ortólogas en otras especies.

Por último, si analizamos los dominios proteicos de las proteínas de ZP1 y ZP4 de hámster con los programas disponibles observamos que el dominio ZP exhibe la más alta identidad entre las diferentes especies. Las cisteínas del dominio ZP están conservadas en hámster, rata, ratón y en humano en la proteína madura, lo que sugiere que la estructura tridimensional existente entre las diferentes ZP de las diferentes especies es similar. (Figura 31 y 32)

El sitio consenso para corte de furina parece estar conservado en las diferentes especies (Figuras 31 y 32).

Los sitios potenciales de N-glicosilación de ZP1 (Asn49, Asn68, Asn379) están conservados en rata, ratón y hámster y se ha visto que se encuentran ocupados, por análisis proteómico, al menos en rata y ratón (Boja *et al.*, 2005). En humano, sólo dos sitios (Asn68 y Asn379) están conservados aunque no hay información sobre si se encuentran o no ocupados. Si analizamos los sitios potenciales de N-glicosilación de ZP4 de hámster observamos que la cadena polipeptídica contiene 7 sitios potenciales de N-glicosilación (N50, N74, N118, N209, N277, N299 y N480). Los sitios potenciales de N-glicosilación N50 y N74 están conservados en ZP4 de rata, y los sitios N74 y N209 están conservados en la ZP4 humana, en ZP4 de vaca, y en ZP4 de cerdo.

Por otro lado, encontramos 102 y 86 sitios potenciales de O-glicosilación (treoninas o serinas) en ZP1 y ZP4 respectivamente. La región O-glicosilada que contiene un O-glicano descrita previamente por MS/MS en ZP4 de rata está conservada en ZP4 del hámster (Ser293, Ser295, Ser298, Ser301 y Thr309). (Figura 31 y 32).


```

Hamster      MASRTLSSTLWLLPGIFLCFFPCPLPSGQHVTELPG---VLHCGLGSFQFTINLSEAES 57
Rata        MARQALRSTLWLLPSILLCFPFCLPLSGQHVTELPG---VLHCGLQSFQFAVNLISLEAES 57
Hombre      -----MWLLRCVLLCVSLSLAVSGQHKEAPDYSSVLHCGPWSFQFAVNLNQEATS 51
           :***  :*:..:  :**** * *  ***** ***:***  ** *

Hamster      P-VLTAWDSRGLPHRLINDSDCGTWVMDSPGDSLVLEATYNGCYVTMSSSHYVMEVGVQD 116
Rata        P-VLTTWDSQGLPHRLKNDSDCGTWVMDSPDGFLVLEASYSGCYVTLEGSHYIMTVGVQE 116
Hombre      PPVLIANDNQGLLHELQNDSDCGTWIRKGGSSVVLEATYSSCYVTEWDSHYIMPVGVG 111
           * * * :*:*** * *:*****: ..*.. :****:*..*****  .***:* ***:

Hamster      NVWEHMPGARKRLKCPIDRQG--PNTLSTEVCNFPVVKERLLCAPLPISQGDCKLGC 174
Rata        ADVAGHVAGTRQRLITCPLALQGKAPDTPNAKVCSPVPVKERLPCASSTISRGDCEELGC 176
Hombre      AGAAEHKVVTERKLLCPMDLLAR--DAPDTDWCDIPARDRLPCAPSPISRGDCEGLGC 169
           ...: *  :*:***:  .  :  :  : * :*:***:*** **  .***:***: ***

Hamster      CYIAEEEEVGYCYGNTVTSQCSREGSFSIAVSNVWSPPLNLDLHLVVR-SDSGCDPV 233
Rata        CYSSEEEGADSCYGNVTVTSHTKEGHFSIAVSRDVTSPPLRLDLSRLGFRNITTCDDPV 236
Hombre      CYSSEE--VNSCYGNTVTLHCTREGHFSIAVSRNVTSPPLLLDSVRLALR-NDSACNPV 226
           ** :* *  .  ***** :*:** *****:***** ***: *  . :*:**

Hamster      MATPTFALFQFPFPTSCGTRRVIGDQVYENELLATQDVRTWNGSITRDSIFRLRVSCS 293
Rata        MKTSTFVLFQFPLTSCGTTQRITGDQAMYENELVAIRDVQAWGRSSITRDSNFRLRVSC 296
Hombre      MATQAFVLFQFPFPTSCGTRQITGDRAVYENELVATRDVKNGSRGVSITRDSIFRLRVSC 286
           * * :* :*****:*****:  :  :  : *****: * :*:  . . . :* ** * ** :* ** :

Hamster      YSVLNTSFINMQVLTLPPLPKTQPGSLSELEQIAKDETYGSYYGAEDYPLVKFLQDPI 353
Rata        YSIH SIMSPVNMQVWTLPPPLPKTQPGPLSLELQIAQDKNYSYYGTDAYPLVKFLQDPI 356
Hombre      YSVSSNSLPINVQVFTLPPFPETQPGPLTLELQIAKDKNYSYYGVGDYPVVKLLRDPI 346
           **: *  * :*:** *****:*****:*****: * :* ** *  .  ** :* ** :* **

Hamster      YVEVSIHRTDPSLELLELLEQCWATSGPNPFLQPQPWILVKGCOPYAGDNYQTRRINVQKAS 413
Rata        YVEVSIHRTDPSLSLLELLEQCWATPGSNPFHQQPWILVKGCOPYAGDNYQTRIPVQKAS 416
Hombre      YVEVSIHRTDPYLGLLLELLEQCWATPSTDPSPQPWILVKGCOPYIGDNYQTLIPVQKAL 406
           ***** * * * :* ** * . . . :* : ***** ***** ***** : * * **

Hamster      R-PFPSSHQRFSISFTSFTNAIRKGGQSFAGQVYLHCASALVCQAPAGTPSCKAICPARRRR 472
Rata        D-VFPSSHQRFSISFTSFMASAGREKQVGGQVYLHCASAVCQAPAGMPSCVICPASRRRR 475
Hombre      DLPFSSHQRFSIFTSFVNPTVEKQALRGPVHLHCASVVCQPAETPSCVVTCPDLSRRR 466
           ***** ***** ..  : * : * :*****  ***** * *  .  **  ***

Hamster      KSELYFINNTARISSKGPVILLQATKDPADMLHRYSSSTPMNSPALWVVGLSAITIISIL 532
Rata        KSELYFDNSTS-ISSKGPVILLQATKDPVMLHKSHTHADSPTLWVMGLSASMTITGVL 534
Hombre      NFDNSQNTTASVSSKGPVILLQATKDPPEKLR---VPVDSKVLWVAGLSG-TLILGAL 521
           :  :  . :* : :*****:*****. * :  .  : * .*** ** * . : * . *

Hamster      LVFYLAIRKAR----- 543
Rata        VVSYLATRKQR----- 545
Hombre      LVSYLAVKKQKCPDQMCQ 540
           : * * * : * :

```

Figura 32. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP4 de hámster, rata y humano. Los aminoácidos conservados en las tres especies están identificados con un asterisco. El dominio ZP está en color rojo. El dominio trefoil está en azul. En naranja está señalado el dominio transmembrana. El sitio consenso de corte de furina está señalado con un recuadro rojo. Las cisteínas están marcadas en color verde. Los potenciales sitios de N-glicosilación están señalados con un recuadro negro.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y VÍA DE SECRECIÓN DE ZP4 DE HÁMSTER EN CÉLULAS HEK 293T.

El objetivo de este estudio fue, por un lado, determinar si la secuencia amplificada correspondiente a *ZP4* de hámster codificaba una proteína expresable por la célula y, por otro lado, analizar la vía de secreción de ésta.

En primer lugar, procedimos a la amplificación de la secuencia codificante de *ZP4* por PCR con la finalidad de clonarla en el vector de expresión pcDNA3.1 y posteriormente le incorporamos el epítipo FLAG (mediante mutagénesis dirigida) para su detección mediante el uso del anticuerpo comercial anti-FLAG. El sistema de expresión utilizado fueron las células HEK 293T. Estas células son transfectadas transitoriamente con el vector de expresión construido tal y como se describe en la sección “Material y Métodos” recuperando después tanto los lisados celulares como los sobrenadantes para el estudio de la expresión de la proteína.

La expresión de *ZP4*-FLAG se analizó mediante tres técnicas: electroforesis y Western-blot, citometría de flujo y microscopía confocal. En todas ellas aprovechamos la presencia en fase del epítipo FLAG, muy inmunogénico, para el reconocimiento de la proteína por el anticuerpo anti-FLAG.

Antes de la transfección de las células con *ZP4*-FLAG, para determinar la pertinencia del uso de esta línea celular en la expresión de este tipo de proteínas, se realizó un control positivo mediante la transfección de dichas células con un vector de expresión que contenía *ZP3* humana (recZP3h). Se realizó una electroforesis y Western-blot utilizando como anticuerpo primario un anti-ZP de cerdo de probada eficacia en la detección de las glicoproteínas de la ZP.

Efectivamente la proteína recZP3h se expresaba en esta línea celular, siendo detectada tanto en el medio de cultivo como en el lisado celular (Figura 33). En la imagen del Western-blot realizado tras la expresión podemos observar como la proteína pasa del lisado celular al medio de cultivo, ya que se detecta una banda muy

mayoritaria en el peso molecular correspondiente al polipéptido glicosilado (entre 48-70 kDa) que va desapareciendo con el tiempo de transfección de los lisados celulares. Esta señal va aumentando con el tiempo de expresión en el medio de cultivo hasta alcanzar el máximo a las 40 horas. Es de destacar que el patrón de la banda mayoritaria corresponde con el de una proteína altamente glicosilada. Además pueden observarse bandas de alto peso molecular que previsiblemente podrían corresponder a dímeros y oligómeros de la proteína formados en el medio celular.

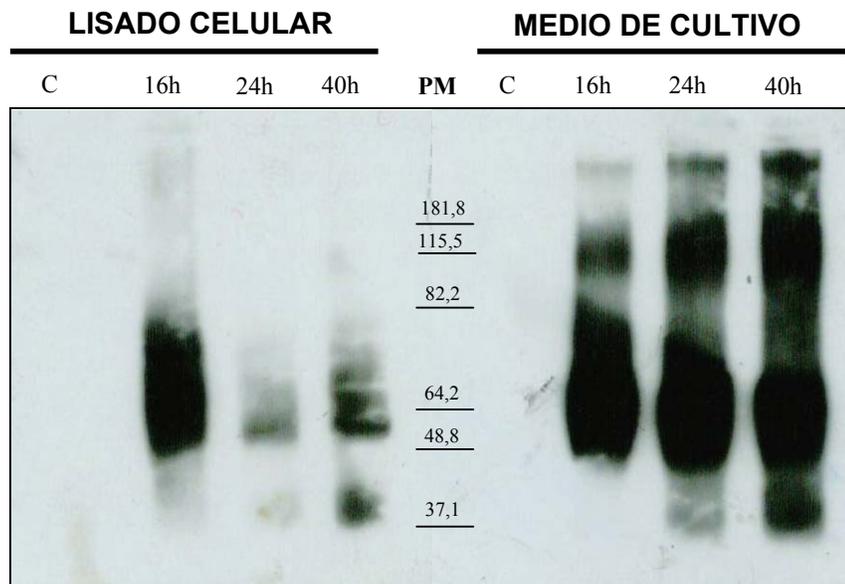


Figura 33. Caracterización mediante electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y Western-blot de ZP3 humana expresada en células HEK 293T: lisados celulares (a la izquierda del marcador) y medios de cultivo (a la derecha del marcador). Cada calle fue cargada con 10 µl de muestra. Calle 1: lisado celular de células transfectadas con pcDNA3 vacío. Calle 2, 3, y 4: lisado celular de células transfectadas con recZP3h recogido a las 16 h, 24 h, 40 h postransfección respectivamente. Calle 5: marcador de peso molecular. Calle 6: medio de cultivo de células transfectadas con pcDNA3 vacío. Calles 7, 8 y 9: medio de cultivo de células transfectadas transitoriamente con recZP3h a las 16h, 24 h y 40 h postransfección respectivamente.

3.1. Estudio de la expresión de ZP4 de hámster mediante SDS-PAGE y Western-blot

Tras la comprobación de que, efectivamente la línea celular HEK 293T podía ser utilizada para el estudio de la expresión transitoria de proteínas de la familia ZP, se analizaron mediante electroforesis en condiciones reductoras y posterior Western-blot tanto los lisados celulares como los sobrenadantes obtenidos del cultivo celular de las células HEK 293T transfectadas transitoriamente con el vector *ZP4-FLAG*. Para ello, tanto los lisados como los sobrenadantes se recogieron para su análisis tras la transfección.

Este estudio nos permitió valorar si efectivamente la secuencia descrita como codificante para ZP4 de hámster permitía la traducción a una proteína con características y secreción similar a la glicoproteína ZP4 descrita en otras especies.

Tras la recogida de las muestras 16 h postransfección y tratamiento de las mismas (tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos) éstas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a membrana. La presencia de una banda específica se detectó únicamente en el lisado celular, tras revelar con el anticuerpo desarrollado contra el epítipo FLAG presente en la construcción anteriormente descrita.

Como se ve en la figura 34, en los lisados celulares se observa una banda ancha de aproximadamente 75 kDa. En cuanto a los sobrenadantes, la presencia de una banda ancha tanto en la calle del control negativo como en la calle correspondiente al sobrenadante obtenido de células transfectadas con *ZP4-FLAG* no nos permite afirmar que la secreción de la proteína al medio esté teniendo lugar. Esta banda ancha puede atribuirse a la albúmina por su peso molecular aproximado de 60 kDa (Figura 34).

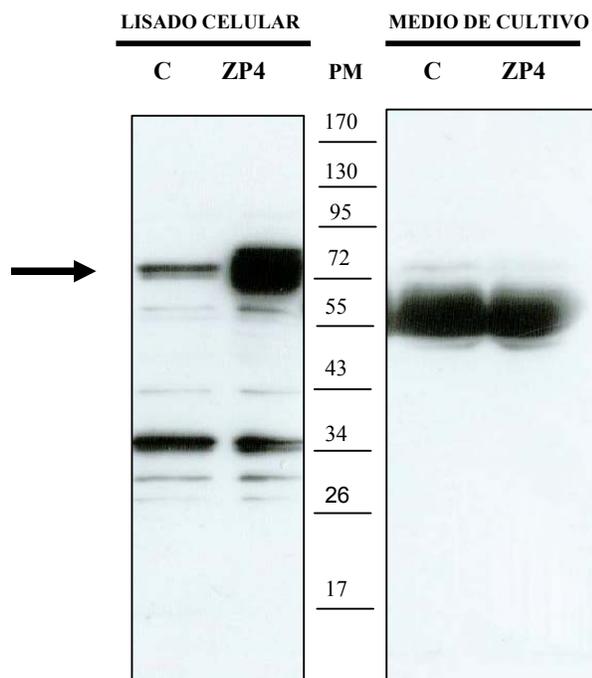


Figura 34. Caracterización mediante electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y Western-blot de ZP4 de hámster expresada en células HEK 293T: lisados celulares (a la izquierda del marcador) y medios de cultivo (a la derecha del marcador) obtenidos 16 h postransfección. Los pesos moleculares están indicados en kDa. Las calles fueron cargadas con 12 μ l de muestra. Calle 1: control negativo de células transfectadas con pcDNA3 vacío, lisado celular. Calle 2: lisado obtenido de células transfectadas con ZP4-FLAG. Calle 3: medio de cultivo obtenido de células transfectadas con pcDNA3 vacío. Calle 4: medio de cultivo obtenido de células transfectadas con ZP4-FLAG. Con la flecha indicamos el peso molecular aproximado de ZP4-FLAG (calle 2).

A continuación, realizamos otro ensayo para determinar si la ausencia de secreción de ZP4 al medio de cultivo era un problema cinético por falta de tiempo. Para ello, tras la transfección de células HEK 293T con ZP4-FLAG recogimos el sobrenadante a las 16 h, 24 h, 40 h y 48 h postransfección y realizamos el Western-blot con el mismo anticuerpo. El resultado obtenido fue el mismo para los diferentes tiempos de recogida. El patrón de la banda se asemeja mucho al que suele obtenerse cuando se detecta albúmina de suero. De esta manera, podemos afirmar que en estas

condiciones experimentales la proteína no se secreta en este sistema celular. (Figura 35).

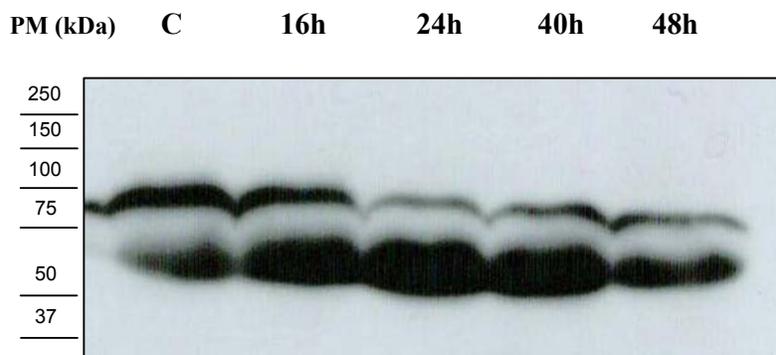


Figura 35. Expresión de ZP4-FLAG en HEK 293T. Medios de cultivo recogidos a diferentes tiempos. Cada calle fue cargada con 12 μ l de muestra. Calle 1: control negativo, medio de cultivo recogido de células transfectadas con pcDNA3 vacío. Calle 2, 3, 4, y 5: medio de cultivo de células transfectadas transitoriamente con ZP4-FLAG recogido a las 16, 24, 40 y 48 h posttransfección respectivamente. Las bandas observadas corresponderían a la albúmina.

Este resultado está en consonancia con otros publicados previamente, realizados en el mismo sistema heterólogo, que estudian la expresión de ZP4 de otras especies (Harris *et al.*, 1999; Tsubamoto *et al.*, 1999; Martic *et al.*, 2004; Caballero-Campo *et al.*, 2006).

Sin embargo, la presencia de ZP4-FLAG en los lisados celulares si aumenta conforme aumenta el tiempo de cultivo celular tras la transfección (Figura 36, calles 3, 4, 5 y 6) al cargar las calles con la misma cantidad de lisado celular. El máximo nivel de expresión se observa a las 48 h de transfección.

Teniendo en cuenta que el peso esperado de la proteína nativa inmadura es de 56,9 kDa (sin péptido señal pero con el dominio transmembrana), el peso aproximado de 75 kDa de la proteína recombinante obtenida coincide con el peso esperado que tendría la proteína tras su glicosilación (ZP4 tiene 6 sitios potenciales de N- glicosilación). Si asumimos que cada uno de ellos pueda tener una cadena de

oligosacáridos de unos 3 kDa el peso esperable de la proteína glicosilada se correspondería con el observado experimentalmente.

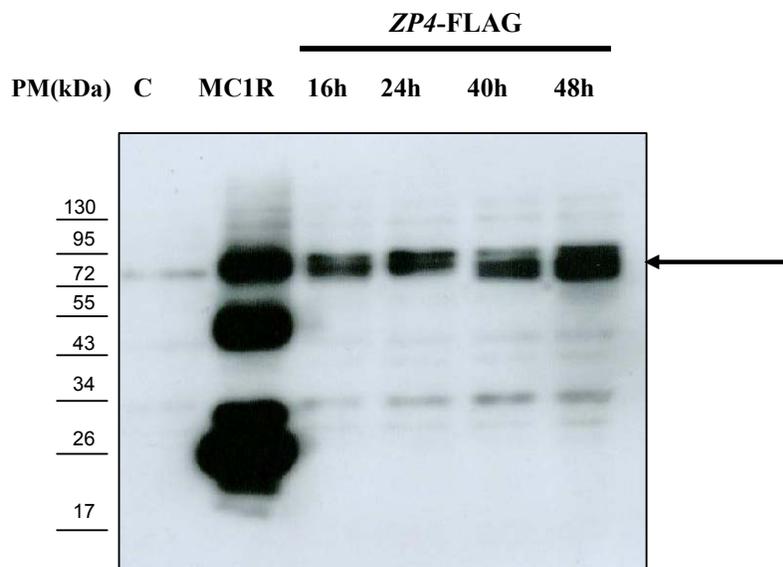


Figura 36. Caracterización mediante electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y Western-blot de ZP4 de hámster expresada en células HEK 293T. Lisados celulares. Las calles fueron cargadas con 12 μ l de muestra. Calle 1: control negativo de células transfectadas con pcDNA3 vacío. Calle 2: control positivo: MC1R marcado con FLAG. Calle 3, 4, 5 y 6: células transfectadas con ZP4-FLAG a tiempo 16, 24, 40 y 48 horas tras la transfección respectivamente. La flecha indica la posición de la proteína ZP4 (peso molecular aproximado de 75 kDa)

Para confirmar la glicosilación de ZP4 se realizaron ensayos de deglicosilación con N-glicosidasa F y de inhibición de la N-glicosilación mediante la incubación de las células transfectadas con la droga tunicamicina. La N-glicosidasa F es una enzima que actúa eliminando las cadenas de oligosacáridos N-unidas de la proteína mientras que la tunicamicina inhibe a la enzima UDP-N-acetilglucosamina transferasa, inhibiendo la incorporación de N-glicanos a la estructura peptídica.

La deglicosilación lograda en diferentes tiempos de incubación con la enzima N-glicosidasa F revela la presencia de al menos tres glicofomas en la proteína (Figura 37, calle 2). Tras una hora de incubación con la enzima la migración de la

proteína se sitúa en un peso molecular superior (aproximadamente 63 kDa) al que obtenemos cuando la proteína es sintetizada por células incubadas con tunicamicina, (58 kDa). Este hecho puede ser explicado a una eliminación parcial de las cadenas N-unidas cuando tratamos con la N-glicosidasa F tal y cómo se ha descrito para las proteínas de la ZP de otras especies, como la ZP porcina. Con incubaciones con N-glicosidasa F superiores a una hora (hasta 24 horas) obtenemos el mismo grado de deglicosilación que con una hora.

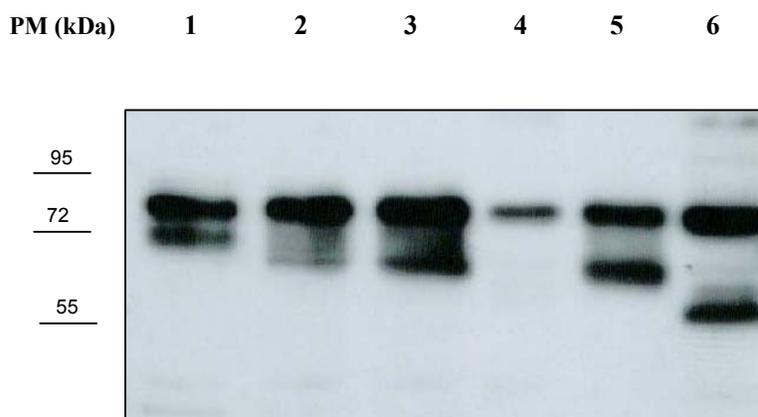


Figura 37. Ensayos de deglicosilación de ZP4 de hámster expresada en células HEK 293T. Lisados celulares. Calle 1: incubación con la enzima N-glicosidasa F a tiempo 0. Calle 2: incubación con la enzima N-glicosidasa 15 min. Calle 3: incubación con la enzima N-glicosidasa 30 min. Calle 4: control de lisado de células transfectadas con pcDNA3. Calle 5: incubación con la enzima N-glicosidasa F durante 1 hora. Calle 6: ZP4 obtenida tras la incubación de las células durante 16h con tunicamicina

3.2. Estudio de la expresión de ZP4 de hámster mediante citometría de flujo

Los resultados obtenidos por Western-blot indican que, en nuestro sistema de expresión, ZP4 se expresa con alta eficacia. El máximo de expresión ocurre a las 48 horas tras la transfección y la célula no llega a secretar la proteína al medio de cultivo. Este hecho, aunque concuerda con los resultados previos de otras ZP4

(Tsubamoto et al., 1999; Martic et al., 2004; Caballero-Campo *et al.*, 2006) podía resultar sorprendente ya que al poseer intacta la secuencia de reconocimiento de la peptidasa señal y la de la proteasa furina, cabría esperar una eficiente secreción al medio de cultivo. Por ello quisimos cerciorarnos de que la vía biosintética-secretora que debía seguir ZP4 de hámster era la esperable llegando a la membrana celular. Por todo ello recurrimos a la citometría de flujo por ser una técnica eficaz y rápida para detectar la proteína a nivel de la membrana celular.

Las células HEK 293T, confluentes en un 70%, sembradas en placas de 24 pocillos fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de ZP4 marcado con FLAG o el plásmido control pcDNA3.1 (vector vacío). Tras 24 horas de la transfección las células se recogieron y se marcaron con el anticuerpo anti FLAG M2 como anticuerpo primario, y el anticuerpo anti IgG de ratón, marcado con ficoeritrina.

El análisis de inmunofluorescencia indirecta de ZP4 marcado con el epítipo FLAG, se realizó mediante citometría de flujo en un sistema FACScan Becton Dickinson 9. El histograma que mostramos en la figura 38 representa en color violeta la intensidad de fluorescencia obtenida sin anticuerpo (control negativo) y en color verde el marcaje obtenido con el anticuerpo anti-FLAG. Los resultados indican un marcaje evidente a nivel de membrana en un alto porcentaje de células (un 22 % que coincide con el porcentaje usual de células que se transfectan con la técnica utilizada). Por lo tanto, la técnica confirma que la expresión de ZP4-FLAG en el sistema celular heterólogo empleado (células HEK 293T) comprobada mediante Western-blot se localiza, al menos en parte, en la membrana plasmática.

En la figura 39 se muestran los diagramas de puntos obtenidos con esta técnica. En el cuadrante superior izquierdo se sitúa la población de células positivas detectada solamente en el caso de células que habían sido transfectadas con ZP4-FLAG y no en el control negativo (células transfectadas con pcDNA3.1 vacío).

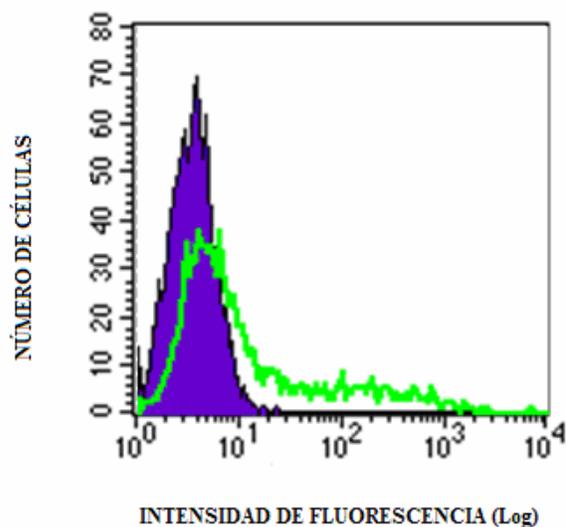


Figura 38. Marcaje de células 293T transfectadas con el plásmido ZP4-FLAG. El histograma representa en color violeta la intensidad de fluorescencia obtenida sin anticuerpo (control negativo) y en color verde el marcaje obtenido con el anticuerpo anti-FLAG.

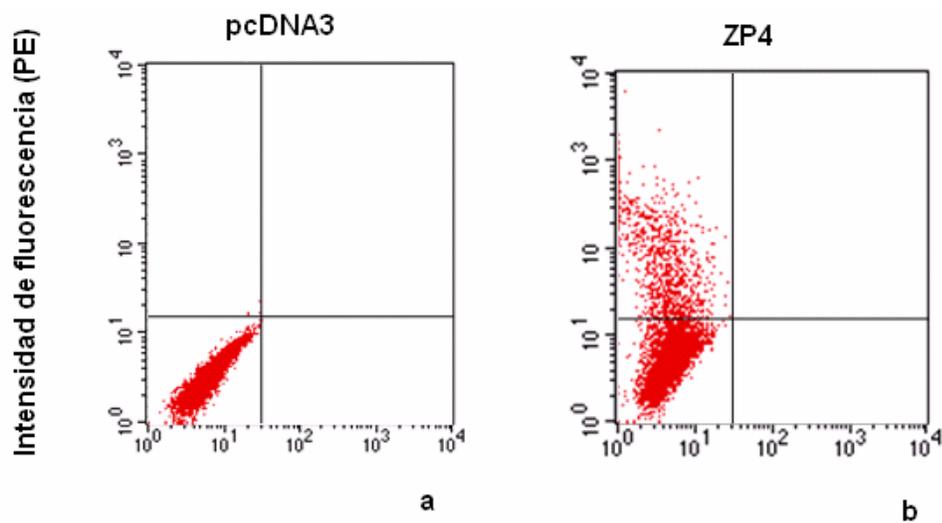


Figura 39. Marcaje de células 293T transfectadas con el plásmido pcDNA3 vacío (a) y transfectadas con el plásmido ZP4-FLAG (b). En el cuadrante superior izquierdo se muestra la población de células marcadas.

3.3. Estudio de la vía de secreción de ZP4 de hámster mediante microscopía confocal

Una vez demostrado que la proteína ZP4 alcanzaba la membrana plasmática quisimos asegurarnos de que ZP4 no presentaba retención en ningún estadio temprano de la misma como consecuencia de alguna mutación no deseada; por ello, se realizaron estudios mediante microscopía confocal. En todos los casos se utilizaron células sembradas en monocapa sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos. La tinción se realizó en células HEK 293T transfectadas transitoriamente 24 h postransfección. Las células se procesaron tal y como describimos en Material y Métodos. Destacamos que en el caso de marcaje de proteínas de membrana todas las manipulaciones se realizaron a 4°C, mientras que en las detecciones de proteínas intracelulares, todas las etapas se llevaron a cabo a temperatura ambiente empleando como agente permeabilizante Igepal. Dado que el epítipo FLAG se sitúa aguas arriba del sitio de corte de furina, debíamos obtener señal de la proteína en los dos casos, tanto sin permeabilizar como permeabilizando de la membrana plasmática.

De hecho, *ZP4-FLAG* de hámster transfectada de manera transitoria en células HEK 293T se localizó principalmente a nivel de la membrana celular (Figura 40).

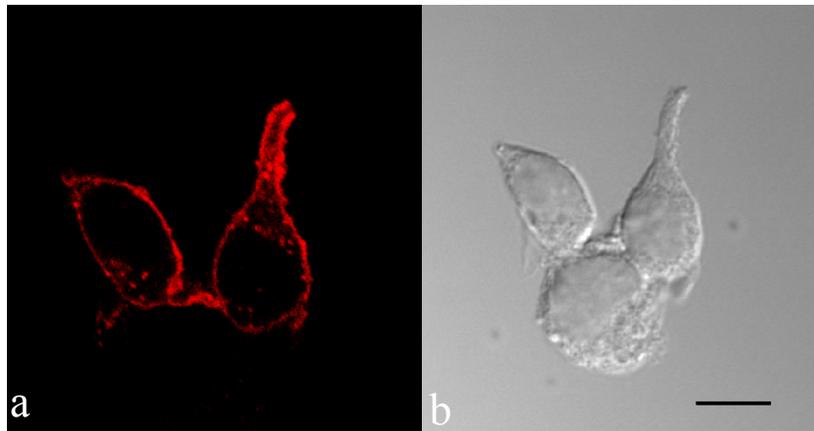


Figura 40. Estudio de la localización de ZP4 de hámster expresada en células HEK 293T mediante microscopía confocal. Las células se marcaron en rojo por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario anti-FLAG y un anticuerpo secundario anti-ratón-Alexa Fluor 568. La figura muestra la imagen en rojo (a) y la de campo claro (b). Se observa una fuerte inmunotinción a nivel de la membrana plasmática; sin embargo, la unión del anticuerpo fue débil a nivel citoplasmático. Barra: 8 μm

Ensayos realizados sin la permeabilización de la membrana celular (Figura 41 a, b y c) y mediante la permeabilización de la membrana celular previa a la inmunofluorescencia (Figura 41 d, e y f) nos muestran una localización idéntica de la proteína. ZP4 se muestra como una proteína anclada a membrana. Sin embargo, podemos apreciar en las imágenes que el marcaje es más intenso en las células que han sido permeabilizadas probablemente debido a que estamos detectando tanto la proteína que ha alcanzado su destino definitivo, la membrana plasmática, como la que está siendo transportada hacia la misma en vesículas de secreción.

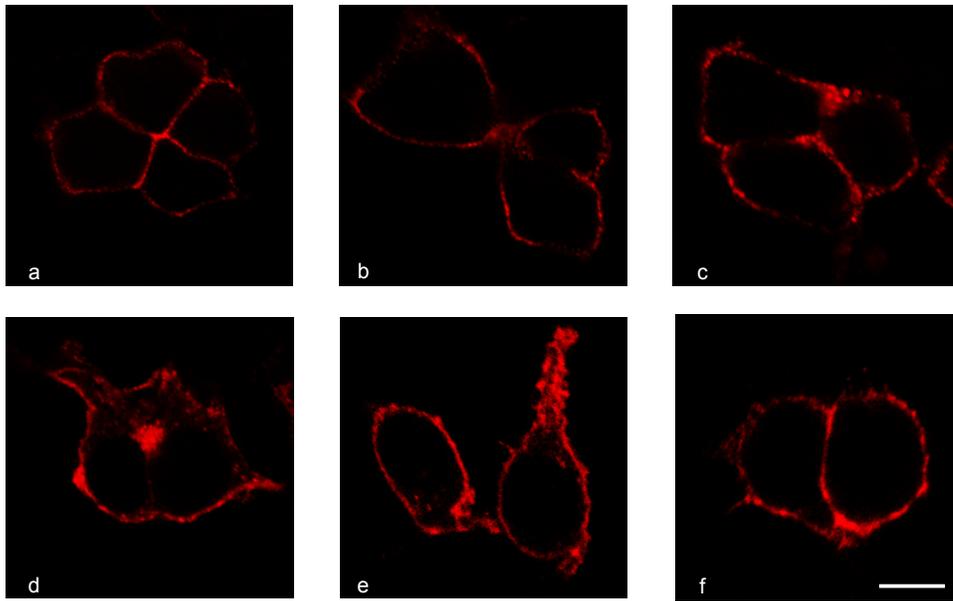


Figura 41. Expresión de ZP4-FLAG en células HEK 293T. Análisis mediante microscopía confocal a,b,c: sin permeabilización de la membrana celular. d,e,f: permeabilizando la membrana celular. Barra: 8 μm

Realizamos algunos marcajes dobles con proteínas residentes en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático para confirmar el tráfico intracelular y la localización a nivel de membrana de ZP4.

Para la localización del retículo endoplasmático se utilizó el anticuerpo anti-PDI de ratón como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488 dando un marcaje verde por inmunofluorescencia indirecta. PDI es una enzima (proteína disulfuro isomerasa) que cataliza la formación de puentes disulfuro en las proteínas que transitan por el lumen del retículo endoplasmático. Por este motivo, se utiliza normalmente como marcador de este orgánulo. El marcaje del retículo aparece en el citoplasma celular respetando el núcleo. Para la localización de ZP4 se utilizó el anticuerpo anti-FLAG de conejo al que se le une el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 568 dando una fluorescencia en rojo a nivel de membrana. La colocalización vendría dada por

una fluorescencia en amarillo. Los resultados muestran que no hay colocalización entre ZP4 y retículo endoplasmático (Figura 42).

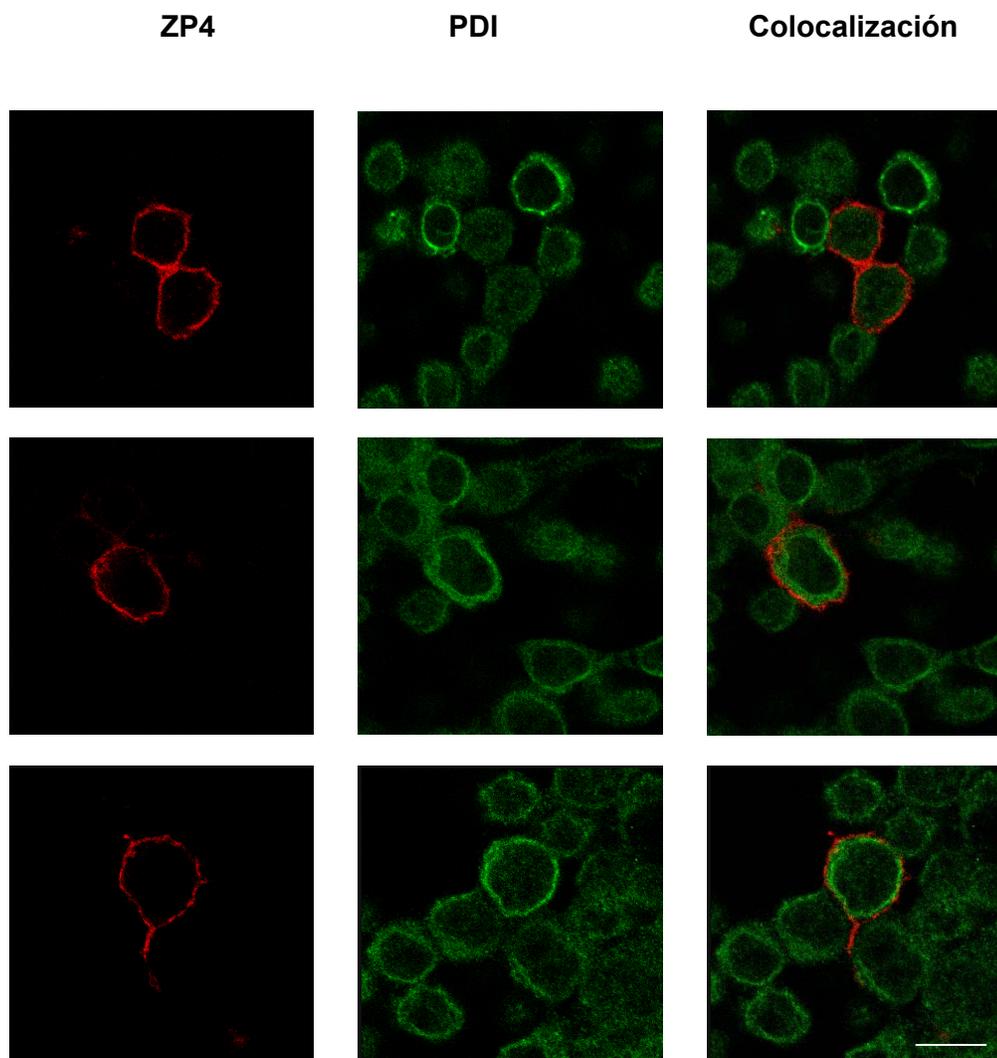


Figura 42. Estudio de la colocalización entre ZP4 y retículo endoplasmático. Las células HEK 293T se marcaron en rojo por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario anti-FLAG y un secundario anti-conejo-Alexa Fluor 568. Para la detección del retículo endoplasmático se marcaron en verde por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario anti-PDI y un secundario anti-ratón-Alexa-488. En la imagen correspondiente a la superposición de las imágenes en rojo y en verde podemos observar la ausencia de color amarillo lo cual es indicativo de falta de colocalización de los dos marcadores. Barra: 16 μ m

En el caso del marcaje del aparato de Golgi se procedió a la transfección de las células con un plásmido de expresión de la GTPasa Rab-1 unida a GFP que nos marcaría con una fluorescencia verde directa la localización del orgánulo. Rab-1 es una GTPasa pequeña que interviene en la fusión de vesículas que participan en el transporte retrógrado ente las cisternas del cis-Golgi y el retículo endoplasmático. Por ello, se puede considerar como marcador de la cara cis del aparato de Golgi. ZP4 se marcó con un anticuerpo primario de ratón anti-FLAG y con un secundario anti-ratón-Alexa 568 que daría una fluorescencia roja. Los resultados se muestran en la figura 43. En algunos casos se observa colocalización entre ZP4 y aparato de Golgi, indicativo del tránsito de la proteína por esta organela.

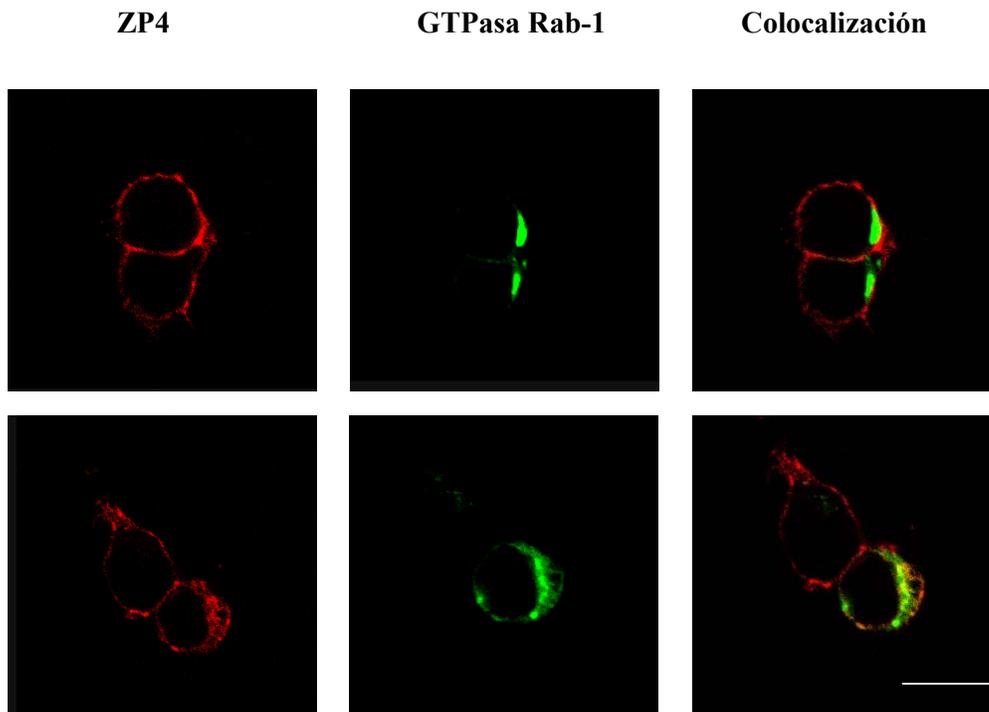


Figura 43. Estudio de la colocalización entre ZP4 y aparato de Golgi. Las células HEK 293T se marcaron en rojo por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario de ratón anti-FLAG y un secundario anti-ratón-Alexa Fluor 568. Para la detección del aparato de Golgi se marcaron en verde por fluorescencia directa de GFP (las células se transfectan con un plásmido de expresión de la GTPasa Rab-1 unida a GFP). En la imagen correspondiente a la superposición de las imágenes en rojo y en verde podemos observar la presencia de color amarillo cuando hay colocalización de los dos marcadores. Barra: 16 μ m

Por lo tanto, en cuanto a la expresión y localización de la proteína ZP4 de hámster se observó una alta expresión a nivel de membrana celular. A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de colocalización celular, podemos afirmar que ZP4 de hámster es una proteína, que en el sistema de expresión utilizado, las células HEK 293T, es guiada de manera normal desde su lugar de síntesis hasta la membrana plasmática de manera que no hay retención de la misma a ningún nivel (aparato de Golgi y retículo endoplasmático). La pequeña colocalización con el marcador de Golgi es la propia de una proteína en tránsito por esta vía y en ningún caso justifica la falta de secreción en el medio observada por Western-blot.

4. LOCALIZACIÓN *IN SITU* DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* Y *ZP4* EN EL OVARIO DE HÁMSTER

Para llevar a cabo la determinación del patrón de expresión de los genes de hámster *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* con las técnicas de hibridación *in situ*, construimos vectores que contenían fragmentos de dichos genes, a partir de los cuales sintetizaríamos las sondas de ARN.

En primer lugar se extrajo ARN a partir de ovarios de hámster a partir del cual se realizó la síntesis *in vitro* de ADNc por una reacción de Transcripción Inversa. Este ADNc fue usado como molde para la amplificación de los fragmentos correspondientes a cada uno de los genes mediante PCR. En las figuras 44, 45, 46 y 47 se muestran los cebadores usados en cada caso con el fragmento que se amplificó.

Resultados

```

1      GGGGGAAGTT CTAGCAGCTG TGGGTGTCTG TGGTGTGTAC TGGCAGGAGC
51     CTCCGCCATG GCCTGGGGTT GCTTTGTGGC CGTGTCTCTG CTGGTGCAA
101    CTCCCTGAG  GTTGGGTCAG CATCTACACT CCAAGCCTGG CCTTGAATAC
151    AGCTATGACT GTGGGGTGCA GGGTATGCAG CTGTGGTGA  TCCCCAGGTC
201    AAACCAGACT ATCCGATCA  AGTGCTGGA  TGAATTTGGG AACCGGTTTG
251    AGGTGAATAA CTGCTCTATC TGCTACCACT GGGTCATCTC TGAGCCCCAT
      PstI
      ~~~~~~
301    GACCCTGCAG TATTCTCAGC TGACTACAGA GGCTGCCATG TGCTGCAGAA
351    GGATGGACGG TTCCACCTGA GAGTGTTCTG GCAAGCTGTA CTACCCAATG
401    GCTACGTGGA TACAGCACAA GATGTCACCTC TGATCTGTCC TAAAGCAGAC
451    CACACTGTGA CTCCGGACCC CTACCTGGCT  CCACCACTA  CACCTCAACC
501    TTTTACACCT CATACTTTTG TCCCACATAC CAATTCTGGC CACACGCTGG
551    CTGGGTCTGG CCACACGCTG GCTGGGTCTG GCCACACGCC TCTTCTCAGC
601    ACATGTGACC CAGAGCACAG CTTCATCCAT TCAACTCCTG CTCCACCATC
      SmaI
      ~~~~~~
      XmaI
      ~~~~~~
      AvaI
      ~~~~~~
651    CCCGGGACCT GGACCTGCTG GGCCACTGT  GCCTCATCCC CAGTGGGGCA
701    CTTTGAACC  ATTGGAATTG ACTAAGCTGG ATTCTGTAGG GACCCATCTG
751    ACCCAGGAGC AGTGTCAAGT AGCCTCTGGG CACATTCCTT GCATGATAAA
801    AAGTAGTTCC AAGGAAGCCT GTCAGCAGGC TGGTGCTGCT TACGACAACA
851    CCAGAGAAGT ACCCTGTTAC TATGGCAACA CAGCCACTCT CCAGTGTTC
901    AGAAGTGGTT ACTTCACCCT GGCCATATCC CAAGAAACAG CCTTGACACA
951    CAGGGTCATG CTGAACAATA TCCACCTGGC CTATGCCCCC AGCAGATGCC
1001   CCCCTACCCA GAAGACAAGC GCTTTTGTGG TCTTCCATGT TCCTCTAACC
      BstXI
      ~~~~~~
1051   CTCTGTGGAA CGACAATCCA GGTGGTTGGT GAGCAGCTCA TCTATGAGAA
1101   CCAGCTGGTG TCTAACATG  ACGTCCAAAA GGGGCCAAAG GGTTCATCA
      AvaI
      ~~~~~~
1151   CTCGGGACAG TGTCTTCCGG CTTTATGTTT GCTGTATCTT CAACGCTAGT
1201   GACTTCCTGC CTGTTACAGC ATCTATCTTC TCACCCAAC  CACCTGCCCC
1251   TGTGACCCAG TCTGGACCCC TCGGCTGGA  GCTGAGGATT GCCAAGGACA
1301   AGACTTTCAG CTCCTACTAT CGGGAGCGTG ACTATCCCCT TCGGAGACTG
      PstI
      ~~~~~~
1351   CTCCAAGAAC CAGTCCATGT GGAGATCCGT CTCCTGCAGA GAACCGACCC
1401   CGGCATGGTC CTGATGCTAC ACCAGTGCTG GGCCACTCCC ACGGCCAACC
1451   CCTTCCAACA GCCCCAGTGG CCCATTCTGT CAGATGGGTG TCCCTTCGAG
1501   GGTGACAAC ACAGAACACA AATGGTGGCC TTGGACAGGG CGGAGCTGCT
1551   CTTCTGGTCT CACTACCGGC GCTTCACCGT CACTACCTTC ACTCTCCTTG
1601   ACTCCAGCGC CGGAAGCACC CTTAGGGGAC TGGTCTACTT CTTCTGTAGT
1651   GCCTCTGTCT GCTACCCCTGA GGGATCAGAA ACATGCTCTA CTGTATGTGA
1701   CTCTGGGATG GCAAGGCACC GACGGTCCAC TGGTCACCAC AATAGCACTG
1751   TCCATGCCTT GGACATTGTG AGTTCTCCAG GAGCAGTGGG CTTTGAGGAT
1801   GCTGCTAAAC TCAAGCCCTC AGGCTCCAGC AGGAACTCTA TTTCAAGACC
1851   CCTGCTCTGG GTGCTGCTCC TCCTGCTGGT CACCACCCTG GTCCTGATGT
1901   CTTTGTGAGT CTGAATTGGG CCTGGGCCCA GAAACTCTGA GAAGGCACCA
1951   GATGTTAAGT GGGTTCAATA AACCATTGTT TGAAAACCAA TGAAAAAAA
2001   AAAAAAAAAA AAA

```

Figura 44. Secuencia nucleotídica de *ZPI* de hámster en la que se señalan en color rojo los cebadores usados para la amplificación del extremo 3' de la secuencia codificante y parte de la UTR. En verde se señalan el atg inicial y el tga final.

```

                                                    PstI
                                                    ~~~~~
1      ATGTTTGGG GGCAGAGGAG AGAGTCTGTA AGCCCTCCAT GCTGCAGGAG
51     CACCTACAGG TCGATTTCTC TCTTATTGTC CCTTCTGACT TCAGTAAACT
101    CATTAAGTCT TCCTCAGTTG AAGCACCCCT CCTTCCCAGT CACTGTCTCT
151    TGTGATGAAA ATGAAGTGAG AGTTGCATTT CCAAGCAGTT TTGACATGGA
201    AAAATGGCAA CCTTCTGTGG TGGATACCTC TGGTGTGAA ATTTTGAAC
251    GCACTTATAC TCTGGACTCA GAAAAGCTCC TCATGAAATT TCCTTATGAA
301    AACTGTACTA CAAGAACATT TGGTGGGTAC CAGGTGACCA TCAGGGTCCA
351    GGACAATAGT ACTGAAGAGG ACGTGCATCA TTTCTCCTGT CCACTTAAGA
401    AAATGGAGAT CCACGAGCGT TCAGAAGTCA TAGTCTGCAT GGAGGATTTT
451    GTATCTTTTT CCTTCCCCTA CGTTTTCTCT AAGTTGGCTG ATGATGATCA
501    GAAAAATGCT TCTGAGACGG GATGGATTGT TAATCTTGGC AATGGTACAA
551    GAGTCCACAG ACTGCCCTG AAGGATGCCT TAAGACAAGG ATTTAATTTT
601    CTGATTGACA CCCGAAAAAT AACCCTCGAA GTCCCATCA ATGCTACTGG
651    AGTCGGTAC TATGTGCAAG GGAGAAGTCA TCTCTATACT GTGCAACTGA
701    AGCTCTTGT CTCAATTCC TACGACACGG TCACCTTAC CTCACAAGCT
751    GTCTGTGCAT CAGATCTTTC TGTGGCTTGC AATGCTACAC ACATGACTCT
801    CACCATACCA GAATTTCCCT GGAAGCTAAC GTCTGTGGAC TTTGGAAAAA

AvaI
~~~~~
851    GCAGCATCCC CGAGATGCAA TGGCATGCCA ATGGGATCGA CAAAGAAGCA
901    ACAAAATGGCT TGAGACTGCA TTTCAGAAAA ACTCTCCTGA AAACAAAACC
951    CTCTGAAAAA TGCCACCCT ATCAGTTCTA CTTCTCCTCA CTCAGCTGA
1001   ACTTTAGCCT TCAGCCACAC CTGGTGCCT TGGTGATGTA TCCTGAGTGC
1051   CATTGTGAGT CACCAGTCTC TATAGTTGCA GATAAACTGT GTACACAGGA
1101   TGGCTTTATG GACTTTGAGG TCTACAGCCA CCAAACAAA CCTGCTCTGA
1151   ACCTGGAGAC CCTGTGCTG GAAACTCTT CCTGTCATCC TATCCCCAAG
1201   TCTCAGTAC AGGGCCTTCT ACGGTTCAT ATACCTCTGA ATGGATGTGG
1251   AACAGGACAG AAATTTGAAG GTGATAAAGT CATCTACGAG AATGAAATAC

EcoRI
~~~
1301   ATGCTCTCTG GAAAAATCTA CCACCAAGCA TCATATTTAG GGATAGTGAA
EcoRI
~~~
1351   TTCAGAATGA CAGTGAGGTG TTATTACACC AGAGACAGTG TGCCACTAAA
1401   TGCCGATATC AAAAGCCTTC TTTCTCCAGT GGCCTCTGTG AAGCCAGGTC
1451   CACTGATGTT GTCCTGCAA ATCTACCCAG ACAAAATCCTA CCAGCAACCT
1501   TATAGGAAGG ATGAGTACCC TCTAGTGAGA TACCTCCGCC AGCCAATCTA
1551   CATG GAAGTG ACTGTGTTGA ACAGGAATGA CCCCAGTATC AAGCTGGTCT
1601   TAGATGACTG CTGGGCAACA TCTTCTAGCG ACCCAGCCTC TGTCCACAGT
1651   GGCACATTGT CGTGGATGGC TGTGAATATG AACTGGACAA GCTACCCGAC
1701   TACCTTCCAT CCAGCTGGCT CCTCTGTGGT CCATCTGCT CACTACCAGA
1751   GGTTTGATGT GAAGACCTT GCCTTTGTGT CAGAGGCACA GGGGCTCTCT

PstI
~~~~~
1801   AGCTGATCT ACTTCCACTG CAGTGCCTTA ATCTGCAACC CAGAGTCCCT
1851   TGACTCCCT CTGTGCTCTG TGACTTGCC TGCACCATTG AGGAGCAAAC
1901   GAGAGCCAT CCAAGAAGAT ACAATGACAG TTAGCCTCCC AGGACCCATT
1951   CTTTGCTGT CAGACGACTC TTCACTTAA GATACTATGG TCCCAACAG

NcoI
~~~~~
2001   GCATGAGATT GCCAAGGATA CTGCTTCTAA AACAGTAGCT GCCATGGCTG
2051   CATTAGTGGG TTCAGTGGT ATTGTTGGCT TCATCTGTTA CTGCATAAG
2101   GAAAGAACTA TGAGGTTGGA TCATGATTG GACTTGCAAA TAAAGAGGCT
2151   GTGGTAG

```

Figura 45. Secuencia nucleotídica de *ZP2* de hámster en la que se señalan en color rojo los cebadores usados para la amplificación del extremo 3' de la secuencia codificante y parte de la UTR. En verde se señalan el atg inicial y el tga final.

```

                                NcoI
                                ~~~~~~
1      ATGCAGCGGG CTTATTCAG GCAGTACCAT GGGGCTGAGC TACCAGCTCC
51     TCCTGTGTCT  CCTGTGTGT  GGAGGCGCCA AGCAGTGCTG TTCCCAGCCT
101    CTGTGGCTCT  TGCCAGGCGG AACTCCGACC CCAGGAAAGC TCACGTATC
151    CGTGGAGGTG  GAGTGTCTGG AAGCTGAGCT CGTGGTACT  GTCAGTAGAG

                                AvaI
                                ~~~~~~
201    ACCTTTTTGG  CACCGGGAAG CTCATACAGC CCGAGGACCT CACCCTTGGC
251    TCAGAAAAC  GTCGGCCCTT GGTTCCGTG  GCTACGGATG TGGTCAGGTT
301    CAAGGCCAG  TTGCATGAAT GCAGCAACAG GGTGCAGGTG ACGGAAGATG
351    CCCTGGTGTA  CAGCACCGTG CTGCTGCACC AACCCGCCC  TGTGCCGGC
401    CTGTCCATCC  TGAGGACTAA CCGTGCAGG  GTGCCTATTG AGTGCCGCTA
451    CCCCAGGCAG  GGCAATGTGA GCAGCCACGC TATCCGGCCC ACCTGGGTTG
501    CCTTCAGCAC  CACTGTGTCC TCAGAGGAGA AGCTGGTTTT CTCTCTCCGC
551    CTGATGGAGG  AGAACTGGAA CACTGAGAAA TTGTCACCCA CCTCCCACCT
601    GGGAGAGGTA  GCCTACCTCC AGGAGAGGT  CCAGACTGGA AGCCATCTGC
651    CACTGCTGCT  GTTTGTGGAC CGCTGTGTGC CCACACCTTC GCCGGACCAG

                                NcoI
                                ~~~~~~
701    ACCGCCTCTC  CCTATCATGT CATTGTGGAC TTCCATGGTT GCCTTGTGGA
751    TGGTCTATCT  GAGAGCTTTT CTGCATTTC  AGTGCCTAGA CCCC GGCCGG
801    AGACTCTTCA  GTTACAGGTG GATGTATTCC ATTTTGCCAA TAGCTCCAGA
851    AATACGATCT  ATATCACCTG TCATCTCAA  GTCACCCAG  CCAACCAGAC
901    CCCAGATGAG  CTCAACAAAG CCTGCTCCTT CAACAGGTCT TCCAAGAGTT

                                PstI
                                ~~~~~~
951    GGTGCCAGT  AGAGGGCGAT GCTGAGGTCT GCGGCTGCTG CAGCAGTGGC

                                NcoI
                                ~~~~~~
1001   GACTGTGGTA  GCTCAAGCCG TTCACGGTAC CAGGCCATG  GAGTGAGCCA
1051   GTGGCCCAAG  TCGGCATCTA GACGCCGAG  GCACGTGAGA GACGAAGCTG
1101   ATGTCACGGT  AGGACCCTG  ATCTTCCTGG GAAAGGCAAG CGACCAGGCT
1151   GTGGAGGGCT  GGGCCTCTT  TGCTCAAACC TCTTTGGCTC TTGGTTTAGG
1201   CCTAGCCGCA  GTGGCATTC  TGACCCTGGC TGCTATTGTC CTCGGTGTCA
1251   CCAGGAGTTG  TCACACCCT  TCCCATGTTG TATCCCTTTC ACAATAAAAA
1301   GTCCAGTTCT  G

```

Figura 46. Secuencia nucleotídica de ZP3 de hámster en la que se señalan en color rojo los cebadores usados para la amplificación del extremo 3' de la secuencia codificante. En verde se señalan el atg inicial y el tga final.

```

1   CAGAGTACGC GGGGGGGCTA GTGGAGGAGA AGAATGGGCTA GCCGGACTCT
51  GAGTAGTACT CTGTGGCTCC TTCCAGGCAT CTTCTGTGT TTCCATTCT
101 GTCCTCCTTT GAGTGGGCAG CATGTGACTG AGCTGCCAGG TGTGCTCCAC
151 TGTGGGCTAG GGAGCTTCCA GTTTACTGTG AACCTCAGCC TGGAGGCAGA
201 GAGTCCTGTG TTAACAGCTT GGGATAGCCG AGGGCTGCCA CACAGGCTAA
251 AGAATGACTC TGACTGTGGT ACGTGGGTGA TGGACAGTCC TGGTGACTION
301 CTGGTGTAG AAGCTACCTA CAATGGCTGC TATGTCACTA TGAGCAGCTC
351 CCACTATGTC ATGGAAGTTG GAGTGCAAGA CGTGAATGTA ACTGAACATA
401 TGCCAGGGGC AAGGAAGAGA CTGCTTAAAT GCCCTTTGGA TCGTCAAGGC
451 CCAAACACTC TGAGTACTGA AGTGTGCAAT CCTGTGCCAG TAAAAGAAAG
501 GCTTCTCTGT GCTCCCTTGC CCATCTCTCA AGGAGACTGT GACAAGCTGG
551 GTTGCTGCTA CATCGCTGAA GAGGAAGAGG TGGGCTACTG TTACTATGGA
601 AACACAGTGA CCTCCCAGTG TAGCAGAGAG GGCAGCTTCT CCATTGCTGT
651 GTCCAGGAAT GTGACCTCAC CACCTCTGAA CTTGGATFCA CTACACTTGG
701 TTGTGAGGAG TGACAGTGGG TGTGACCCTG TGATGGCAAC ACCCACCTTT
751 GCCCTGTTC AATTTCCATT TACTTCTGTG GGGACCACAA GGGGGTCTAT
801 TGGAGACCAG GTCGTGTATG AAAATGAACT ATTGGCCACT CAGGATGTGA
      AvaI
      ~~~~~~
851 GAACTTGGGG CAATGGCTCT ATTACCCGAG ATAGCATCTT CAGGCTCCGA
      PstI
      ~~~~~~
901 GTCAGCTGCA GCTACTCTGT TCTCAGCAAC ACATCCCCAA TTAACATGCA
951 AGTGTGACT CTCCCACCAC CCCTTCTTAA GACCCAGCCT GGGTCCCTCT
      XhoI
      ~~~~~~
      AvaI
      ~~~~~~
1001 CTCTCGAGCT TCAGATTGCC AAGGATGAAA CCTATGGCTC TTACTATGGT
      BamHI
      ~~~~~~
1051 GCTGAAGACT ACCCATTGGT GAAATTTCTC CAGGATCCTA TTTATGTTGA
1101 GGTCTCCATC CTTACAGAA CAGACCCCTC CTTGGAGTTA CTGCTAGAGC
1151 AATGCTGGGC CACATCTGGC CCTAACCCCTT TTCTTCAACC ACAATGGCCA
1201 ATCCTAGTGA AGGGATGCC ATATGCTGGA GACAACATC AGACCAGAAG
1251 GATCAATGTC CAGAAAGCAT CAAGGCCCTT TCCTTCTCAT CACCAACGCT
1301 TCAGCATCTC TACCTTCAGC TTCACAAATG CTATCAGGAA GGGCAGAGT
      PstI                               BstXI
      ~~~~~~                               ~~~~~~
1351 TTTGCTGGAC AGGTATACCT GCACTGCAGT GCATTGGTCT GCCAGCCTGC
      BstXI
      ~~~~
1401 TGGGACACCA TCCTGCAAGG CAATCTGTCC TGCTTCCAGG AGAAGAAGAA
      EcoRV
      ~~~~~~
1451 AATCTGAGCT TTATTTTAAA AACAACTG CAGGATATC CAGCAAGGC
      PstI
      ~~~~~~
1501 CCTGTGATCC TCCTGCAAGC TACCAAGGAC CCTGCAGACA TGCTTCATAG
      EcoRI
      ~~~~~~
1551 ATATTCAAGC ACCCCATGA ATTCCCTGC TCTGTGGGT GTAGGACTTT
1601 CGGCAATCAC GATCATCATT TCCATCTGT TAGTATCTA CCTGGCCATC
1651 AGAAAAGCAA GATGAATTAC CCAGACTAAG TGTCTCAAAA CTGCTTACAT
1701 TCCAGTATG GATTGGGCTT GTCATTGGA AGATCATCTG ATTCTGAATA
1751 AACACCTCTA CTTATCT

```

Figura 47. Secuencia nucleotídica de *ZP4* de hámster en la que se señalan en color rojo los cebadores usados para la amplificación del extremo 3' de la secuencia codificante y parte de la UTR. En verde se señala el atg inicial y el tga final.

Los fragmentos amplificados, de los tamaños esperados (583 pb para ZP1 y para ZP2, 574 pb para ZP3 y 636 pb para ZP4), se subclonaron en el vector pCR^R2.1-TOPO (Invitrogen) (Anexo, Figuras 48 y 49).

En segundo lugar, se procedió a la linealización de los plásmidos ya que para la síntesis de la sonda de ARN a partir de las secuencia de ADNc subclonadas en plásmidos (Transcripción), éste debe estar en forma lineal. Para ello se llevó a cabo una reacción de linealización con endonucleasas de restricción (Figuras 48 y 49)

Una vez linealizado el plásmido, la reacción de transcripción tiene lugar a partir de la secuencia de ADN molde, en presencia de desoxinucleótidos (dNTPs, uno de ellos marcado con digoxigenina) y por una ARN polimerasa obteniéndose las sondas que utilizamos para la hibridación *in situ* sobre cortes de ovario hechos en bloques de parafina (Figuras 48 y 49).

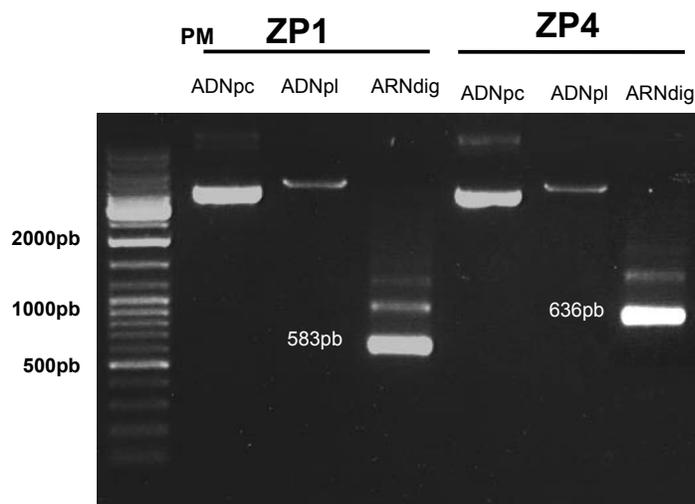


Figura 48. Obtención de las sondas de ARN de ZP1 y ZP4 para la realización de la hibridación *in situ*. Sobre cada calle se indica el producto obtenido: ADNpc: ADN plasmídico circular, ADNpl: ADN plasmídico lineal, ARNdig: sonda de ARN marcada con digoxigenina. En la calle 3 se observa la banda de 583 pb correspondiente a la sonda de ZP1 y en la última calle la banda correspondiente a 636 pb correspondiente a la sonda de ZP4.

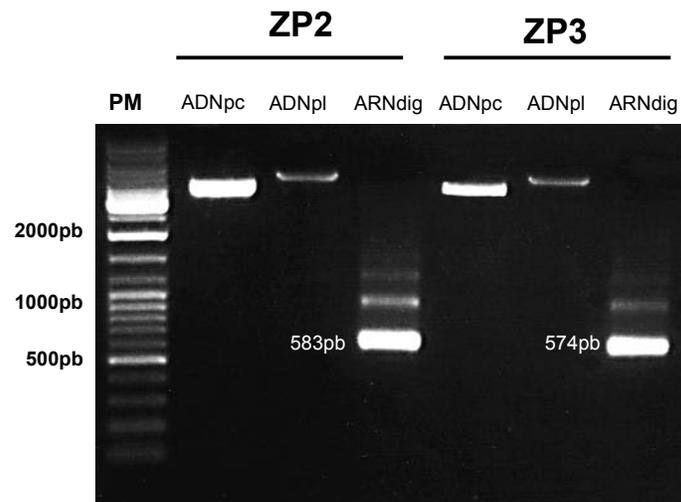


Figura 49. Obtención de las sondas de ARN de ZP2 y ZP3 para la realización de la hibridación *in situ*. Sobre cada calle se indica el producto obtenido: ADNpc: ADN plasmídico circular, ADNpl: ADN plasmídico lineal, ARNdig: sonda de ARN marcada con digoxigenina. En la calle 3 se observa la banda de 583 pb correspondiente a la sonda de ZP2 y en la última calle la banda correspondiente a 574 pb correspondiente a la sonda de ZP3.

Tras la obtención de las sondas se procedió a la realización de la hibridación *in situ* sobre cortes de parafina de ovario de 5 μm . En los cuatro genes ZP1 (Figura 50), ZP2 (Figura 51), ZP3 (Figura 52) y ZP4 (Figura 53) detectamos un patrón de expresión similar. La expresión se detecta únicamente en el ovocito. La población de células foliculares no presenta señal de expresión.

Dependiendo del tipo de folículo observamos una señal más o menos intensa de expresión. Así, son los ovocitos pertenecientes a los folículos de menor tamaño los que presentan una señal más intensa disminuyendo ésta a medida que el folículo crece siendo casi inapreciable en los folículos preovulatorios o de Graaf.

De esta manera, podemos observar en las figuras 50 y 51 (correspondientes a la hibridación con sondas para *ZP1* y *ZP2*) como en los folículos preovulatorios aparecen ovocitos sin señal de expresión.

Por el contrario, en la figura 50 (b) y en la figura 52 (a y b) podemos observar una señal muy intensa correspondiente a la máxima expresión en folículos primordiales y primarios.

La expresión específica del ARNm de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* en el citoplasma ovocitario se confirmó mediante la realización de tres controles en cada uno de los casos. En primer lugar, se realizó la incubación con la sonda anti-sentido. En segundo lugar se llevó a cabo todo el procedimiento pero sin incubación con sonda. Y por último se realizó la hibridación *in situ* sobre trompa uterina. En ninguno de los tres casos se detectó señal de expresión (Figura 53).

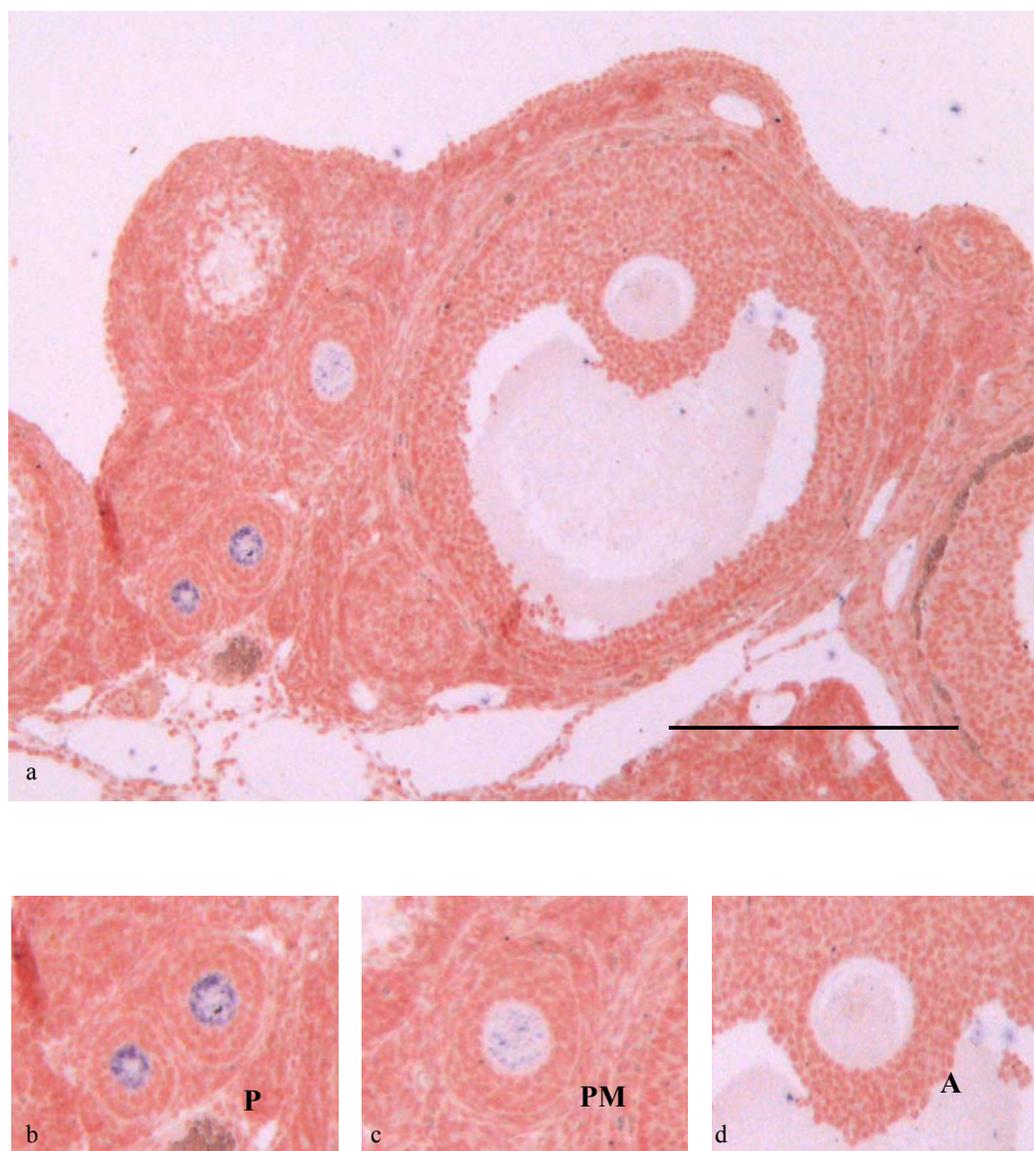


Figura 50. Análisis de la expresión de ZP1 en cortes de ovario. Podemos observar la diferente intensidad de la señal dependiendo del tipo de estadio folicular. a: La señal es más intensa en folículos primarios pequeños (señalados con P), disminuyendo en los primarios multilaminares (PM) hasta hacerse muy débil en los folículos antrales o de Graaf (A). Barra figura a: 300 μ m. b,c,d: aumento de la imagen “a” donde se observa la diferente intensidad de señal de los ovocitos de los diferentes folículos.

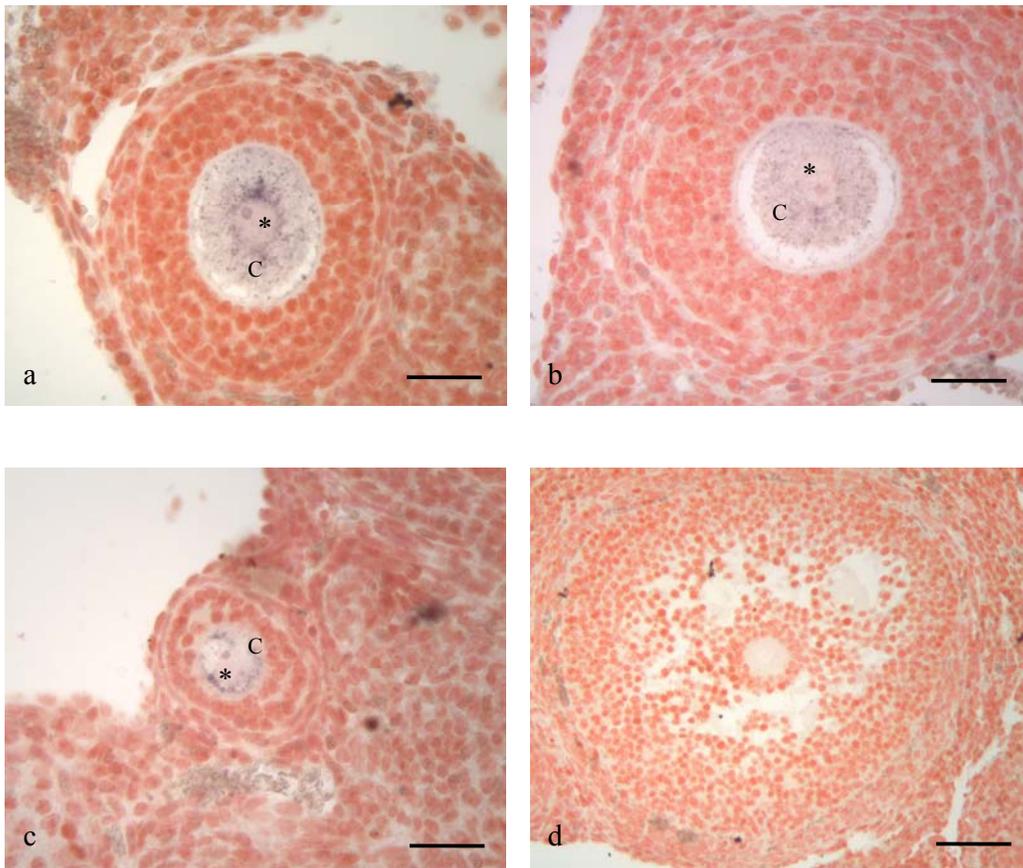


Figura 51. Análisis de la expresión de ZP2 en cortes de ovario. En la figura se muestran distintos tipos de folículos. Se observa señal de expresión en el citoplasma ovocitario (C) respetando la vesícula germinal (*) en todos los ovocitos de los diferentes tipos de folículos exceptuando el folículo de Graaf. a,b: Folículos primarios multilaminares. c: Folículo primario bilaminar. d: Folículo antral o de Graaf. Barra: 40 μ m

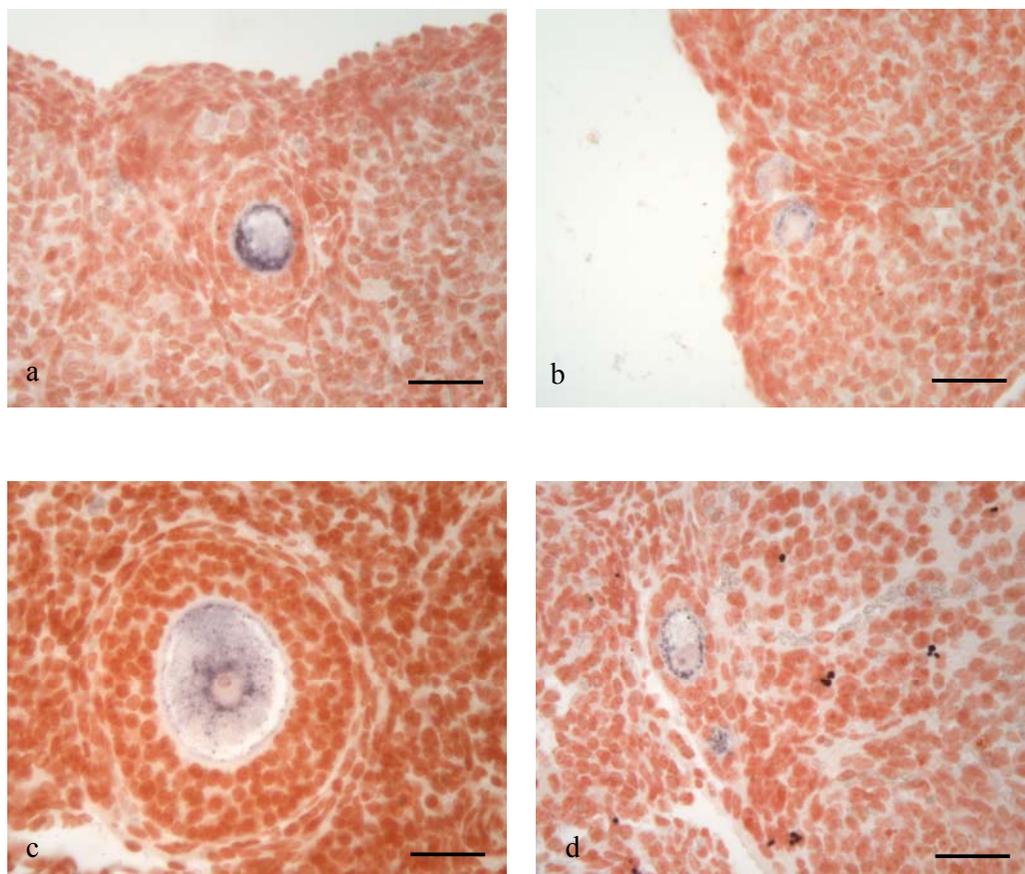


Figura 52. Análisis de la expresión de ZP3 en cortes de ovario. a) folículo primario bilaminar b) folículos primordiales c) folículo primario multilaminar d) folículo primario unilaminar (arriba) y folículo primordial (abajo). Barra: 40 μm .

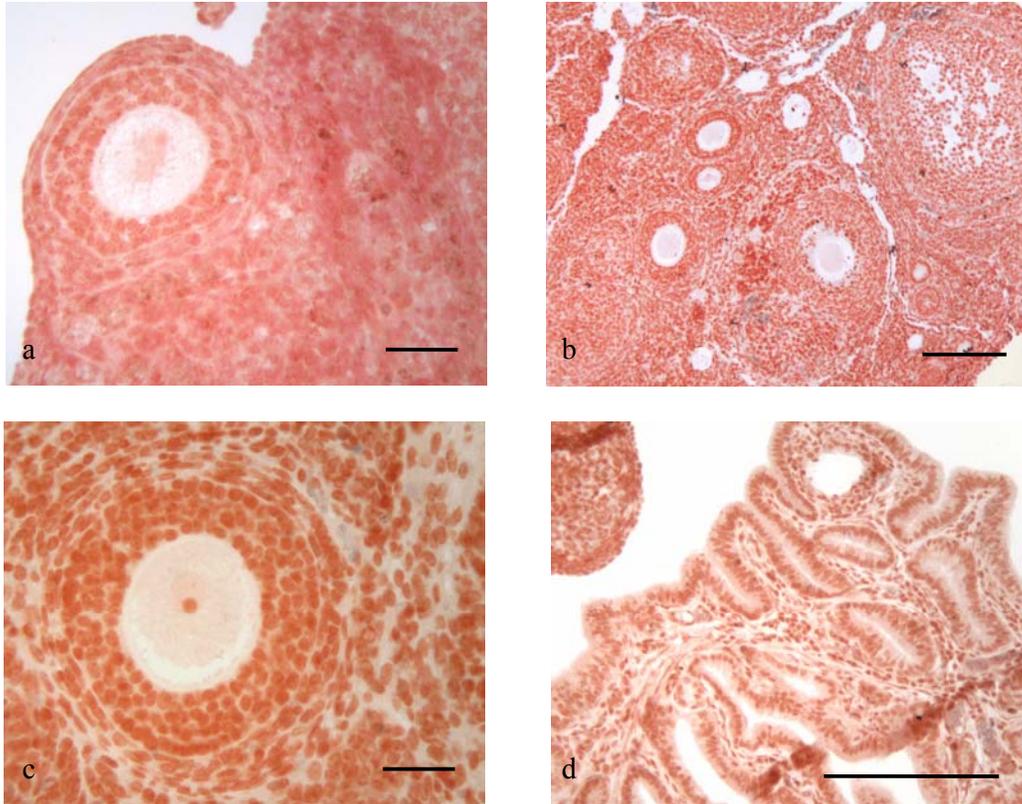


Figura 53. Controles realizados en la hibridación *in situ*. a) folículo primario multilaminar de corte de ovario incubado con sonda sentido de *ZP3*. b) ovario incubado con sonda sentido de *ZP2*. Se observan folículos de diferente tamaño. c) folículo primario multilaminar de corte de ovario incubado con sonda sentido de *ZP1*. d) trompa uterina incubada con sonda anti-sentido de *ZP4*. En ninguno de los controles encontramos señal. Barra a y c: 40 μm . Barra b y d: 200 μm .

5. PROTEÓMICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER.

Tras la identificación y caracterización del ADNc de *ZP1* y *ZP4* nos propusimos estudiar la expresión de las cuatro proteínas de la ZP de hámster (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4*). Para ello se obtuvieron ovarios de hámster hembra a partir de los cuales se obtuvo ZP solubilizada por calor. Esta fracción de ZP solubilizada se sometió a electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y posteriormente a una tinción de plata que nos permitió observar las diferentes bandas en las que se separó la muestra (todo ello tal y como se describe en Material y Métodos).

Cada una de las bandas fue recortada del gel, tripsinizada y analizada mediante huella peptídica-MALDI-TOF y por LC-ESI-MS-MS.

En la figura 54 se muestra un ejemplo de las diferentes bandas detectadas por tinción de plata y un resumen de los péptidos que han sido identificados por espectrometría se incluyen en la tabla XIV.

El espectro de masas de algunos péptidos correspondientes a *ZP1* y *ZP4* de hámster se muestra en la figura 55.

Péptidos correspondientes a *ZP1* de hámster se detectaron en las bandas 4 (aproximadamente 90 kDa) y 7 (aproximadamente 65 kDa). Un total de 7 péptidos diferentes fueron identificados en varios ensayos obteniéndose un 12.6 % de cobertura de la proteína respecto a la secuencia aminoacídica derivada del gen (ABS86997). Ninguno de los péptidos identificados contiene sitios potenciales de N-glicosilación sugiriendo que los tres sitios potenciales descritos pueden estar ocupados en la proteína madura. Por otro lado, 13 de los 102 sitios potenciales de O-glicosilación se encuentran en los péptidos detectados lo que sugiere que estos sitios no estarían ocupados en la proteína.

En cuanto a ZP2 se detectaron tres péptidos en las bandas 1 y 2 (peso molecular 182-115 kDa, Figura 54). El hecho de que solamente el 5,1% de la secuencia pueda ser identificada puede ser atribuida al hecho de que ZP2 contiene 10 sitios potenciales de N-glicosilación y 120 sitios de O-glicosilación (6 de los cuales están al menos, parcialmente ocupados). Este hecho afecta a la efectividad de la digestión proteolítica y altera los resultados obtenidos por espectrometría.

Un total de 8 péptidos fueron obtenidos pertenecientes a ZP3 a partir de las bandas 7, 8 y 9 (peso molecular entre 64,2-48 kDa, Figura 54), correspondiente al 19,2 % de la secuencia. Uno de los péptidos identificados contiene un sitio de N-glicosilación, indicación de que este sitio debe encontrarse libre o parcialmente ocupado en la proteína nativa. Además podemos encontrar 15 de los 77 sitios potenciales de O-glicosilación.

Por último, péptidos correspondientes a ZP4 de hámster, fueron detectados en la banda 3 (182-115 kDa) y en la banda 9 (64,2-48 kDa) (Figura 54). El hecho de que ZP4 comigre con ZP2 y ZP3 ha dificultado su descubrimiento con anterioridad. Hemos detectado un total de 5 péptidos correspondiente al 11,2 % de la secuencia. Al igual que para ZP1 ninguno de los péptidos identificados contiene un sitio de N-glicosilación por lo que los siete sitios potenciales de N-glicosilación podrían estar glicosilados. 9 de los 86 (de un total de 92) sitios potenciales de O-glicosilación están presentes en los péptidos secuenciados indicando la ausencia de glicosilación en estos residuos de serina o treonina o incompleta glicosilación. La aparición de ZP1 y ZP4 en la fracción molecular alta podría corresponder a estructuras dimericas u oligoméricas. En el caso de ZP1, el peso molecular de la proteína madura (sin el péptido señal ni el dominio transmembrana) es de 59,2 kDa. Si los tres sitios potenciales de N-glicosilación se encontraran ocupados el peso molecular de la proteína podría llegar a alcanzar como máximo 68,2 kDa (si tenemos en cuenta un peso molecular de 3 kDa para cada cadena N-unida) de manera que la glicosilación no podría explicar la aparición de ZP1 en las bandas superiores (banda 4 de aproximadamente 90 kDa). Estamos ante el mismo caso con ZP4. El peso molecular de la proteína madura se sitúa en 48,7 kDa. Si los 6 sitios potenciales de glicosilación

estuviesen ocupados el peso molecular podría alcanzar unos 66,7 kDa. La detección de péptidos correspondientes a ZP4 en la banda 3 (182-115 kDa) sólo puede ser explicada por la formación de agregaciones intermoleculares entre proteínas. Ahora bien, estas agregaciones no tienen porqué estar presentes en la ZP nativa sino que pueden ser fruto de interacciones surgidas tras la solubilización de la ZP. Estas proteínas presentan numerosas cisteínas que podrían facilitar este tipo de agregaciones. De hecho, son sólo ZP1 y ZP4 las proteínas que encontramos tanto en bandas inferiores como en bandas superiores. Estas proteínas son las únicas de la familia que presentan el dominio trefoil, región caracterizada por ser muy rica en el aminoácido cisteína.

Por último, tenemos que comentar que de todas las bandas analizadas, en las bandas 5, 6, 10 y 11 no fue detectado ningún péptido correspondiente a ninguna de las proteínas de la ZP de hámster.

En las figuras 56, 57, 58 y 59 se localizan los péptidos detectados en la secuencia de aminoácidos de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 respectivamente.

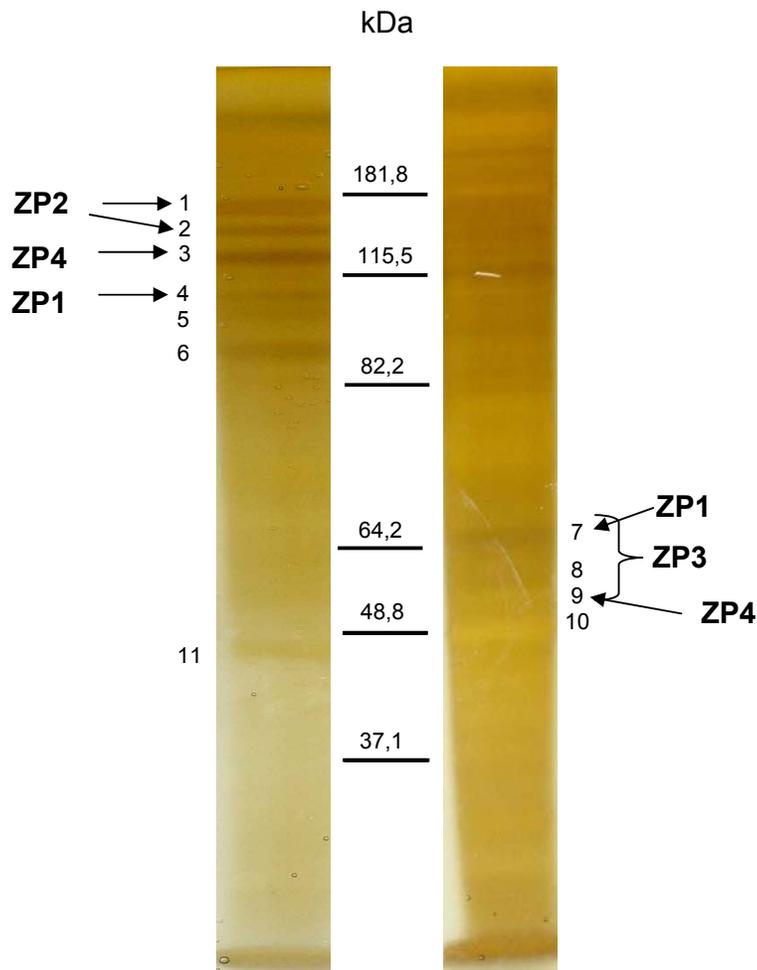
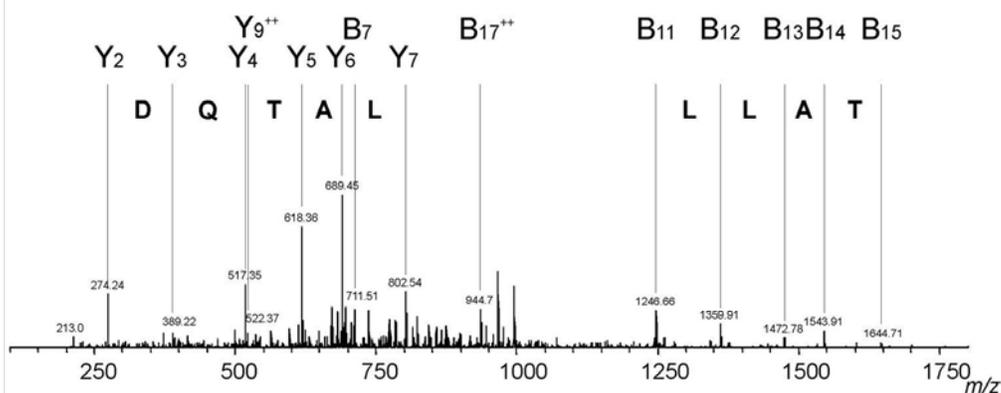


Figura 54. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la zona pelúcida solubilizada de hámster. Las bandas detectadas con la tinción de plata fueron numeradas, recortadas y enviadas para la realización de análisis por espectrometría de masas tal y como se describe en Material y Métodos. La calle número 1 corresponde a 40 μl de una muestra de ZP solubilizada a una concentración de 1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la calle número 2 a 40 μl de una muestra de ZP solubilizada a una concentración de 1,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se indica la proteína cuyos péptidos se han encontrado al analizar cada banda

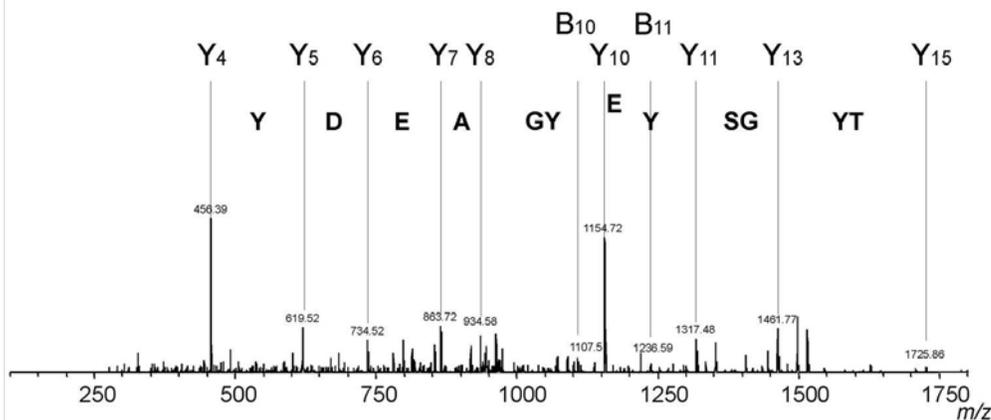
Tabla XIV. Péptidos correspondientes a las glicoproteínas de la ZP de hámster detectados por espectrometría de masas. En azul se señalan los sitios potenciales de O-glicosilación y en rojo los sitios potenciales de N-glicosilación.

Glicoproteína	Péptidos	Secuencia	Masa [M+] ⁺
ZP1	EVPCYYGNTATLQCSR	267-282	1641.7359
	SGYFTLAISQETALTHR	283-299	1894.9657
	VMLNNIHLAYAPSR	300-313	1598.8471
	DKTFSSYYR	414-422	1166.5476
	LLQEPVHVEIR	431-441	1332.7634
	AELLFWSHYRR	495-505	1477.7699
	AELLFWSHYR	495-504	1321.6687
ZP2	HPSFPVTVSCDENEVR	42-57	1815.8330
	TFGGYQVTIR	106-115	1141.6000
	QGFNFLIDTR	196-205	1210.6215
ZP3	LTSSVEVECLEAELVTVSR	38-57	2173.1200
	DLFGTGK	58-64	737.3828
	LVFSLRLMEENWNTEK	169-184	2009.0160
	LMEENWNTEK	175-184	1293.5780
	NTIYITCHLK	275-284	1205.6347
	VTPANQTPDELNK	285-298	1426.7172
	YQAHGVSQWPKSASR	334-348	1701.8455
	YQAHGVSQWPK	334-344	1300.6433
ZP4	EGSFSIAVSR	199-208	1052.5371
	DETYGSYYGAEDYPLVK	331-347	1969.8701
	RVIGDQVVYENELLATQDVR	254-273	2317.2146
	VIGDQVVYENELLATQDVR	255-273	2161.1135
	TQPGSLSLELQIAK	317-330	1484.8318

ZP4 : VIGDQVVYENELLATQDVR



ZP4: DETYGSYYGAEDYPLVK



ZP1: VMLNNIHLAYAPSR

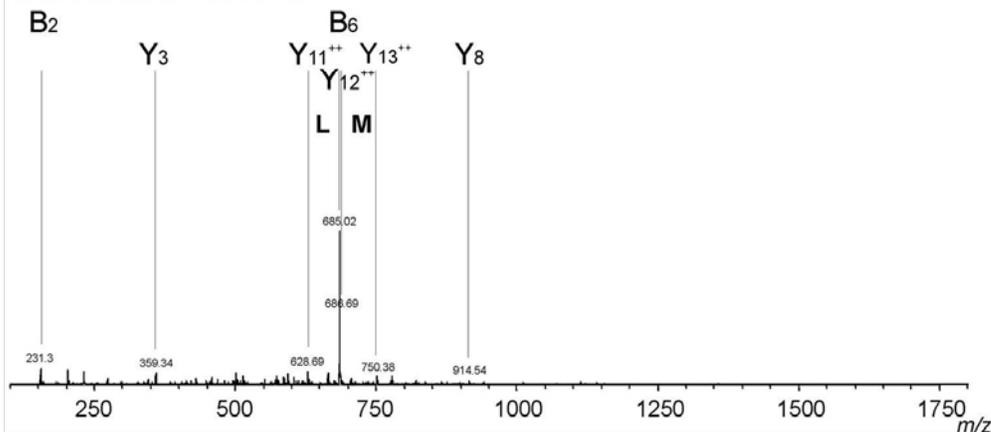


Figura 55. Espectro de masas de varios péptidos de ZP1 y ZP4 de hámster. Espectro de masas del péptido de ZP4 255 VIGDQVVYENELLATQDVR 273 (panel superior), espectro de masas del péptido de ZP4 331 DETYGSYYGAEDYPLVK 347 (centro) y espectro de masas del péptido de ZP1 300 VMLNNIHLAYAPSR 313 (panel inferior).

Hámster ZP1

```

1 MAWGCFVAVL LLVATPLRLG QHLHSPGLE YSYDCGVQGM QLLVIPRSNQ TIRFKVLDEF
61 GNRFEVNNCS ICYHWVISEP HDPVAFSADY RGCHVLQKDG RFHLRVFVQA VLPNGYVDTA
121 QDVTLICPKA DHTVTPDPYL APPTTPQFFT PHTFVPHNS GHTLAGSGHT LAGSGHTPLL
181 STLYPEHSFI HSTPAPPSPG PGPAGPTVPH PQWGTLEPLE LTKLDSVGTH LTQEQCQVAS
241 GHIPCMIKSS SKEACQQAGC CYDNTREVPC YYGNTATLQC SRSGYFTLAI SQETALTRV
301 MLNNIHLAYA PSRCPPTQKT SAFVVHVPL TLCGTTIQVV GEQLIYENQL VSNIDVQKGP
361 KGSITRDSVF RLHVRCIFNA SDFLPVQASI FSPQPPAPVT QSGPLRLELR IAKDKTFSSY
421 YRERDYPLAR LLOEPVHVEI RLLQRTDPGM VLMLHQWAT PTANPFQQPQ WPILSDGCPF
481 EGDNYRTQMV ALDRAELLFW SHYRRFTVTT FTLLDSSAGS TLRGLVYFFC SASVCYPEGs
541 ETCSTVCDsG MARHRRSTGH HNSTVHALDI VSSPGAVGFE DAAKLKPSGS SRNSISRPLL
601 WVLLLLLVTT LVLMSL

```

Figura 56. Secuencia de aminoácidos de ZP1 (ABS86997) de hámster. Las secuencias en negrita y subrayadas representan los péptidos obtenidos por MS/MS. En rojo se resaltan los sitios potenciales de N-glicosilación.

Hámster ZP2

```

1 MVWRQRRESV SPPCCRSTYR SISLLFALLT SVNSLSLPQL KHPSFPVTVS CDENEVRVAF
61 PSSFMEKWQ PSVVDTSQVE ILNCTYTLDS EKLLMKFPYE NCTTRTFGGY QVTIRVQDNS
121 TEEDVHHFSC PLKKMEIHER SEVIVCMEDF VSFSFPYVFS KLADDDQKNA SETGWIVNLG
181 NGTRVHRLPL KDALRQGFNF LIDTRKITLE VPFNATGVGH YVQGRSHLYT VQLKLLFSIP
241 EQVTFTSQA VCASDLSVAC NATHMTLTIP EFPGLTSVD FGKSSIPEMQ WHANGIDKEA
301 TNGRLRHFRK TLLKTKPSEK CPPYQFYFSS LKLNFSLQPH LVSLVIDPEC HCESPVSIVA
361 DKLCTQDGFM DFEVYSHQTK PALNLETLVV GNSSCHPIPK SQQGLLRFH IPLNGCGTGQ
421 KFEGDKVIYE NEIHALWKNL PPSIIFRDSE FRMTVRCYYT RDSVPLNADI KLLSPVASV
481 KPGPLMLVLQ IYPDKSYQP YRKDEYPLVR YLRQPIYMEV TVLNRNDPSI KLVLDCCWAT
541 SSSDPASVHS GTLSWMAVNM NWTSYRTTFH PAGSSVHHPA HYQRFVKTf AFVSEAQGLS
601 SLIYFHCSAL ICNPESLDSP LCSVTCAPL RSKREAIQED TMTVSLPGPI LLLSDDSSLK
661 DTMVPNRHEI AKDTASKTVA AMAALVGSVV IVGFICYLHK ERTMRLDH

```

Figura 57. Secuencia de aminoácidos de ZP2 (AAW66610) de hámster. Las secuencias en negrita y subrayadas representan los péptidos obtenidos por MS/MS. En rojo se señalan los sitios potenciales de N-glicosilación.

Hámster ZP3

```

1  MGLSYQLLLC LLLCGGAKQC CSQPLWLLPG GTPTPGKLTS SVEVECLEAE LVVTVSRDLF
61  GTGKLIQPED LTLGSENCRP LVSVATDVVR FKAQLHECSN RVQVTEDALV YSTVLLHQPR
121 PVPGLSILRT NRADVPIECR YPRQGNVSSH AIRPTWVPFS TTVSSEEKLV FSLRLMEENW
181 NTEKLSPTSH LGEVAYLQAE VQTGSHLPLL LFDVRCVPTP SPDQTASPYH VIVDFHGCLV
241 DGLSESFSAF QVPRRPETL QFTVDVFHFA NSSRNTIYIT CHLKVTPANQ TPDELNKACS
301 FNRSSKSWSP VEGDAEVCGC CSSGDCGSSS RSRYOAHGVS OWPKSASRRR RHRVDEADVT
361 VGPLIFLGA SDQAVEGWAS SAQTSALGL GLAAVAFLLT AAIVLGVTRS CHTPSHVVSL
421 SQ

```

Figura 58. Secuencia de aminoácidos de ZP3 (P23491) de hámster. Las secuencias en negrita y subrayadas representan los péptidos obtenidos por MS/MS. En rojo se señalan los sitios potenciales de N-glicosilación. Uno de ellos es detectado por lo que debe estar libre o parcialmente ocupado en la proteína nativa.

Hámster ZP4

```

1  MASRTLSSSTL WLLPGIFLCF PFCPPLSGQH VTELPGLVHC GLGSFQFTVN LSLEAESVVL
61  TAWDSRGLPH RLKNSDCGT WVMDSPGDSL VLEATYNGCY VTMSSSHYVM EVGVQDVNVT
121 EHMPGARKRL LKCPDRQGP NTLSTEVCPN VPVKERLLCA PLPISQGDGD KLGCCYIAEE
181 EEVGYCYGN TVTSQCSREG SFSIAVSRNV TSPPLNLDL HLVVRSDSGC DPVMATPTFA
241 LFQFPFTSCG TTRRVIGDQV VYENELLATQ DVRTWNGSI TRDSIFRLRV SCSYSVLSNT
301 SPINMQVLTLP PPLPKTQPG SLSLELQIAK DETYGSYYGA EDYPLVKFLQ DPIYVEVSIL
361 HRTDPSLELL LEQCWATSGP NPFLQPQWPI LVKGCYPYAGD NYQTRRINVQ KASRPFPSHH
421 QRFSISTFSF TNAIRKGQSF AGQVYLHCSA LVCQPAGTPS CKAICPASRR RRKSELYFKN
481 NTARISSKGP VILLQATKDP ADMLHRYSS PMNSPALWV GLSAITIIIS ILLVFYLAIK
541 KAR

```

Figura 59. Secuencia de aminoácidos de ZP4 (ABH06548) de hámster. Las secuencias en negrita y subrayadas representan los péptidos obtenidos por MS/MS. En rojo se señalan los sitios potenciales de N-glicosilación.

6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4 EN LA SUBFAMILIA MURINAE

El objetivo de este estudio fue doble. En primer lugar, analizar el ADN genómico de diferentes especies de la subfamilia Murinae con la finalidad de

determinar el patrón evolutivo de ZP4. Y en segundo lugar, analizar las secuencias proteicas de ZP4 con el objetivo de localizar el punto en el que tuvo lugar la pseudogenización de ZP4 a lo largo de la evolución de la subfamilia.

ZP4 está presente en el ADN genómico de *Mus musculus* (ratón domestico o ratón de laboratorio) como un pseudogen (Lefièvre *et al.*, 2004, Evsikov *et al.*, 2008, Goudet *et al.*, 2008). El ARNm o transcrito primario presenta en su secuencia numerosos codones de stop que impiden la traducción a proteína a nivel ribosomal. Sin embargo, en la misma familia encontramos a la rata noruega o rata china (*Rattus norvegicus*) que si posee una ZP4 funcional (Hoodbhoy *et al.*, 2006). Con estos datos, la pseudogenización debe haber ocurrido en algún punto de la cadena evolutiva tras la separación de la rata y el ratón a partir de un ancestro común (esta separación está datada aproximadamente entre 10 y 14 millones de años).

Para estos dos objetivos estudiamos especies clave intentando abarcar diferentes ramas del árbol de manera que pudiésemos tener un abanico variado de todos los taxones de la subfamilia (Figura 60). A partir del ADN genómico de las diferentes especies amplificamos varias regiones de este gen mediante PCR utilizando cebadores específicos diseñados según secuencias conservadas en dos especies pertenecientes a la subfamilia: el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) y la rata noruega o rata china (*Rattus norvegicus*).

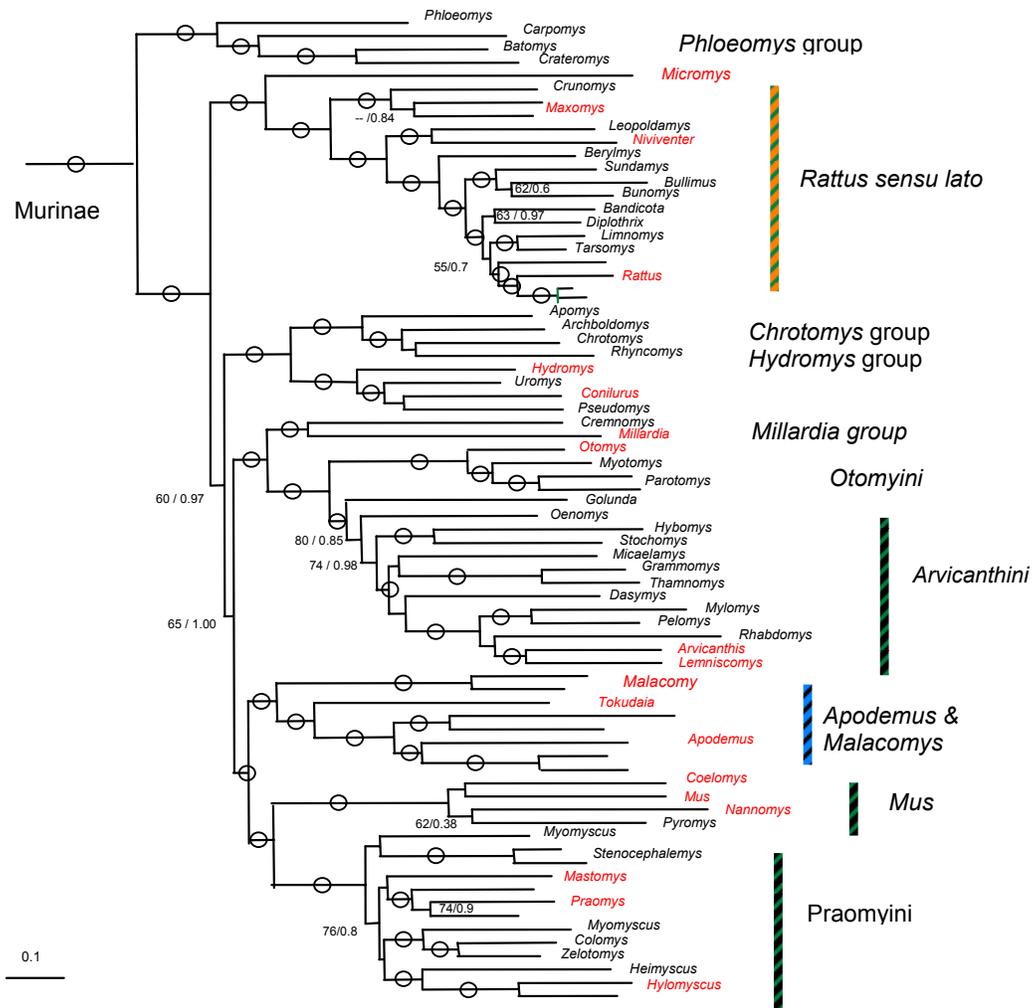


Figura 60. Árbol filogenético de la subfamilia Murinae. En rojo marcamos los taxones utilizados en el estudio. A la derecha se enmarcan las diferentes tribus en las que se agrupan las especies. Tomado de Lecompte *et al.*, 2008. En determinados nodos se indica el valor de bootstrap separándolo con una barra del número de sustituciones por sitio.

De todas las secuencias de ADN genómico amplificadas y secuenciadas de ZP4 de las diferentes especies (Tabla V de Material y Métodos) obtuvimos la secuencia completa para 4 especies: *Mus spretus*, *Mus minutoides*, *Mus pahari* y *Rattus rattus*. Respecto al resto de especies analizadas pudimos amplificar y secuenciar de entre un 80 a un 90% de la secuencia perteneciente a ZP4 exceptuando a 4 taxones: *Apodemus agrarius* (13%), *Hylomyscus stella* (44%), y las dos especies pertenecientes al género *Praomys* (55%). Así, para estos 4 taxones la existencia de problemas en la amplificación o en la secuenciación nos impidió la obtención de una buena secuencia. La hipótesis más probable es la falta de especificidad de los cebadores usados en estas amplificaciones. Recordemos que los cebadores están diseñados según secuencias conservadas en rata y ratón de manera que si estas especies presentan secuencias muy divergentes tendremos como resultado una mala o nula amplificación.

6.1. Análisis de las secuencias proteicas de ZP4

Nuestro objetivo principal era determinar si alguno de los roedores estudiados presentaba indicios a nivel de ADN genómico de presentar una proteína ZP4 funcional (sin codones de stop en la secuencia codificante). Para poder analizar las secuencias proteicas alineamos las secuencias obtenidas de ADN genómico con secuencias pertenecientes a ARNm de especies como *Mus musculus* (XM_001481274) o *Rattus norvegicus* (NM_172330) de manera que nos permitieran determinar la posición de los exones e intrones en las secuencias de ADN genómico de los taxones objeto de estudio. De los 25 taxones estudiados observamos la presencia de codones de stop en sólo 6 de ellos, todos pertenecientes al género *Mus*, subgénero *Mus*: *Mus musculus*, *Mus spretus*, *Mus caroli*, *Mus spicilegus*, *Mus macedonicus* y *Mus cypriacus* (Figuras 61 y 62).

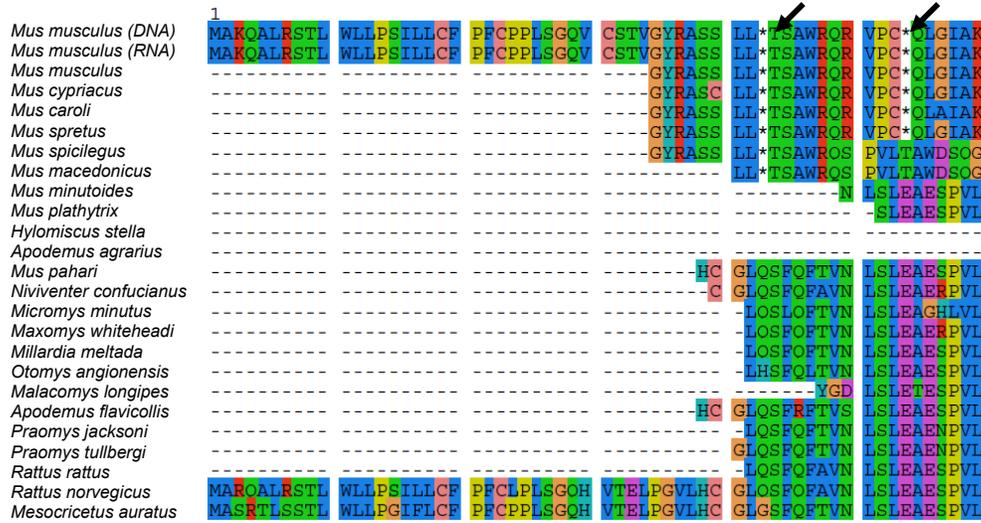


Figura 61. Alineamiento proteico de ZP4 de las diferentes especies estudiadas realizado manualmente mediante el programa SEAVIEW. La metionina inicial se marca con un 1. Los codones de stop está indicado por el símbolo “ * ” y las flechas. Cada letra corresponde a un aminoácido. La presencia del símbolo “-” indica ausencia de secuencia por una falta de secuenciación o una deleción real.

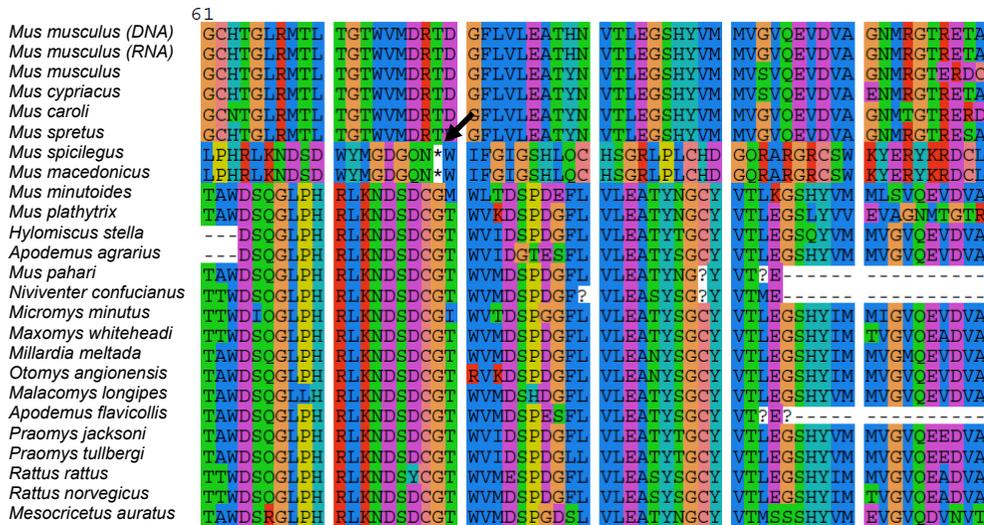


Figura 62. Alineamiento proteico de ZP4 de las diferentes especies estudiadas realizado manualmente mediante el programa SEAVIEW (continuación de la secuencia anterior). La interrogación indica presencia de ambigüedad. Los codones de stop están indicados por el símbolo “ * ” y señalados con una flecha. Cada letra corresponde a un

aminoácido. Destacamos la presencia de un codón de stop en *Mus spicilegus* y *Mus macedonicus* y el corrimiento del marco de lectura de ZP4 en estas dos especies.

En la tabla XV mostramos la posición de los codones de stop en las diferentes especies. El primer codón de stop se localiza en la posición 49. Este codón está presente en las 6 especies. El segundo codón de stop se sitúa en la posición 54 después de la secuencia QRVPC exceptuando a las especies *Mus macedonicus* y *Mus spicilegus* en las cuales no existe este codón de stop apareciendo en su lugar en posición 79. Esto es debido a que estas especies presentan una deleción de dos pares de bases que solamente aparece en estos dos taxones. Este fenómeno así como la diferente posición del resto de codones detectados según analicemos una especie u otra nos resalta las diferencias evolutivas de la ZP4 dentro de un mismo género, el género *Mus*.

Tabla XV: Posición de los codones de stop en el ADN genómico de las diferentes especies.

Género	Especie	Posición de los codones de stop
<i>Mus</i>	<i>caroli</i>	49,54
<i>Mus</i>	<i>cypriacus</i>	49, 54, 121, 129
<i>Mus</i>	<i>macedonicus</i>	49, 79
<i>Mus</i>	<i>musculus</i>	49, 54, 121, 129, 137, 272, 364
<i>Mus</i>	<i>spicilegus</i>	49, 79
<i>Mus</i>	<i>spretus</i>	49, 54, 121, 126, 129, 137, 247, 286

Así, todos estos datos parecen indicar que la pseudogenización de ZP4 sólo afecta al subgénero *Mus* dentro del género *Mus*. El género *Mus* está constituido por cuatro subgéneros: *Mus*, *Coelomys*, *Nannomys* y *Pyromys*. Para delimitar el fenómeno de pseudogenización a este único subgénero (*Mus*) teníamos que determinar si los otros subgéneros efectivamente presentaban ARNm sin codones de stop. Así, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el ARNm de ZP4 de especies pertenecientes a los otros subgéneros del género *Mus*.

La dificultad para obtener ovarios de estas especies nos permitió estudiar sólo dos taxones pertenecientes a dos subgéneros: *Mus pahari* del subgénero *Coelomys* y *Mus minutoides* del subgénero *Nannomys*. A partir de los ovarios de estas especies se obtuvo ARN total y a partir del mismo se sintetizó el ADNc tal y como se describe en Material y Métodos. El ADNc sirvió como molde para la amplificación de diferentes regiones usando varios cebadores contra secuencias exónicas con el objetivo de secuenciar el marco de lectura completo de ZP4. Hasta la fecha, las secuencias obtenidas son limpias y libres de codones de finalización tanto para *Coelomys* como para *Nannomys*.

6.2. Modelo de evolución y características de las secuencias nucleotídicas de ZP4

Para el análisis filogenético sólo se usaron las partes del alineamiento en las que al menos un tercio de los taxones habían sido secuenciados. Así, si el alineamiento de partida contenía 5235 sitios, sólo se tuvieron en consideración 4300 para incluirlos en los análisis. 1323 sitios corresponden a la parte exónica de ZP4 y 2977 a la parte intrónica.

El modelo de evolución utilizado fue el modelo GTR (General time reversible, modelo general tiempo reversible). Este modelo considera que cada una de las sustituciones son posibles (sustitución de una A por una C, G o T (seis tasas)

Las características de la secuencia de ZP4 de las especies estudiadas están presentes en la Tabla XVI. Así, la parte exónica presenta homogeneidad en cuanto a la frecuencia de aparición de las distintas bases. En la parte intrónica, sin embargo, encontramos un ligero sesgo positivo en la favor de la timina. Este sesgo repercute en la secuencia completa pero en menor medida.

Tabla XVI. Características generales de las secuencias nucleotídicas de ZP4.

	EXONES	INTRONES	SECUENCIA COMPLETA
Número de sitios	1323	2977	4300
Modelo de evolución	GTR + Γ	GTR + Γ	GTR + Γ
Frecuencia de A	0,258	0,256	0,257
Frecuencia de C	0,257	0,232	0,239
Frecuencia de G	0,239	0,21	0,217
Frecuencia de T	0,245	0,301	0,286
Tasa A-C	1,084	0,989	1,024
Tasa A-G	5,396	3,799	4,164
Tasa A-T	0,781	0,704	0,746
Tasa C-G	0,892	1,028	0,988
Tasa C-T	3,974	3,115	3,356
Tasa G-T	1	1	1

Para poder calcular la tasa de sustitución relativa el programa utilizado fija la tasa G-T en 1. Las tasas relativas de sustitución de A-G y de C-T son, independientemente de la zona considerada, mucho más elevadas que las otras posibilidades de sustitución. Así, en las zonas exónicas el cambio de A por G tiene una probabilidad de ocurrir 5 veces más elevada que el cambio de G por T. Esto significa que las transiciones son mucho más probables que las transversiones.

Siendo:

- **Transiciones:** cambio de una purina (Pu) por otra purina, o bien cambio de una pirimidina (Pi) por otra pirimidina.
- **Transversiones:** cambio de una purina (Pu) por una pirimidina (Pi) o cambio de una pirimidina (Pi) por una purina (Pu).

6.3. Análisis filogenético de ZP4

El árbol obtenido después de analizar nuestros alineamientos está representado en la figura 63. La longitud de cada rama corresponde al número de sustituciones por sitio que acumula la secuencia. *Mesocricetus auratus* es usada como grupo externo de manera que estamos ante un árbol enraizado (en un árbol enraizado se especifica dónde se sitúa un grupo externo con respecto a los otros taxones).

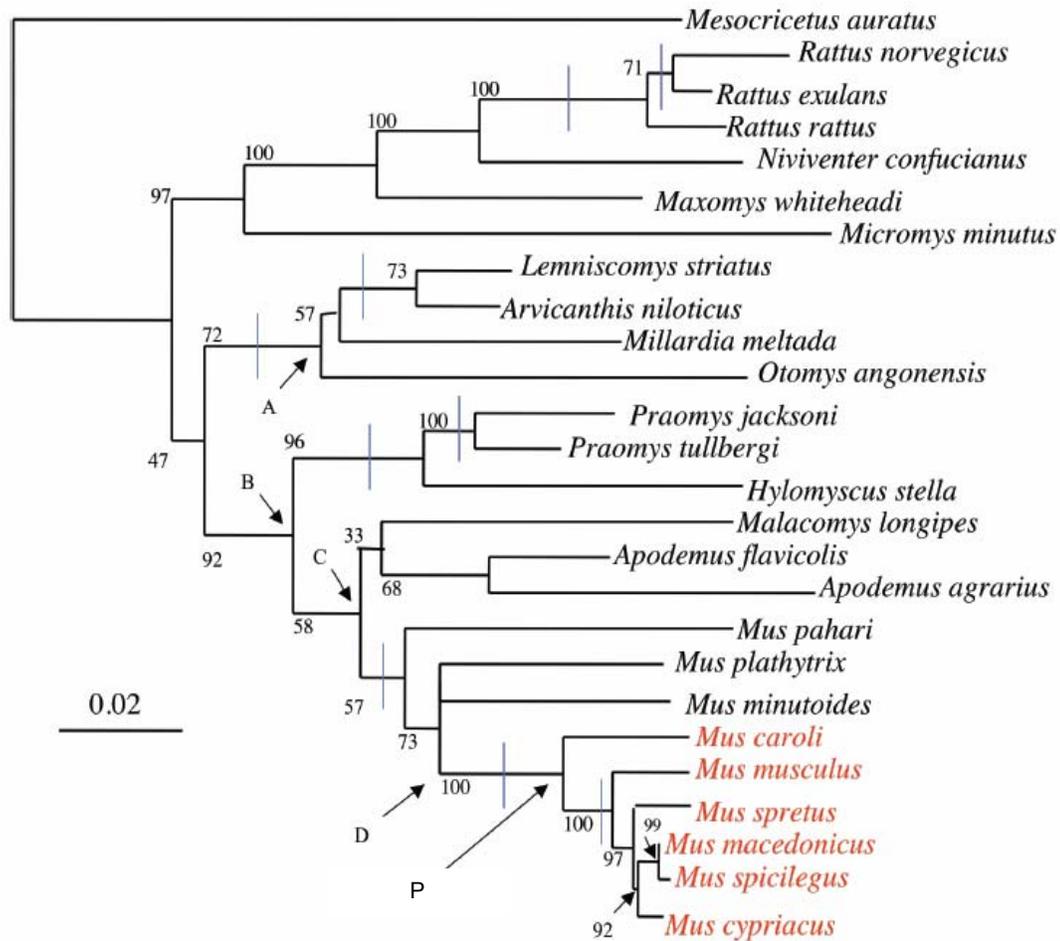


Figura 63. Filogenia molecular del gen ZP4 en la subfamilia Murinae obtenida por el método de máxima verosimilitud. La escala indica el número de sustituciones por sitio. A nivel de cada rama se indica el valor de bootstrap (bp: porcentaje de bootstrap) del nodo al que se dirige la rama. Las especies en las cuales hemos observado un fenómeno de pseudogenización se encuentran coloreadas en rojo (todas ellas correspondientes al subgénero *Mus*, dentro del género *Mus*). Las barras verticales azules representan la presencia de indels (inserciones/deleciones) en los taxones situados a la derecha de cada barra. Estos indels son sinapomorfias, caracteres presentes en dos o más taxones derivados de un ancestro común.

En el árbol de la figura se señala el punto dónde, según nuestros resultados, ha tenido lugar la pseudogenización. El grupo de especies que se ven afectadas por este fenómeno de pseudogenización corresponde al subgénero *Mus* y puede considerarse monofilético (todas las especies afectadas proceden de una ancestro común) presentando una alta robustez (valor de bootstrap de 100).

La ramas que se dirigen a las especies con *ZP4* pseudogenizada son bastante cortas. Esto nos permite afirmar que tras el fenómeno que dió lugar a la pseudogenización, el pseudogen *ZP4* desde entonces no ha acumulado muchas mutaciones.

Según Chevret y col, la separación entre los 6 taxones dónde encontramos indicios de pseudogenización y las tres especies: *Mus minutoides*, *Mus plathytrix* y *Mus pahari* (nodo D, figura 63) data de hace 7 millones de años. Ahora bien, la aparición de los codones de stop a nivel de la secuencia de *ZP4* se sitúa a nivel del nodo que da lugar a *Mus caroli* y los otros 5 taxones del género *Mus* subgénero *Mus* (nodo P, Figura 63) tuvo lugar hace 4 millones de años.

La topología del árbol obtenido es congruente con las filogenias establecidas por otros autores (Figura 64) para la subfamilia Murinae. Sin embargo, podemos destacar algunas diferencias si comparamos el árbol obtenido por nosotros para *ZP4* y el obtenido por Rowe y colaboradores (2008).

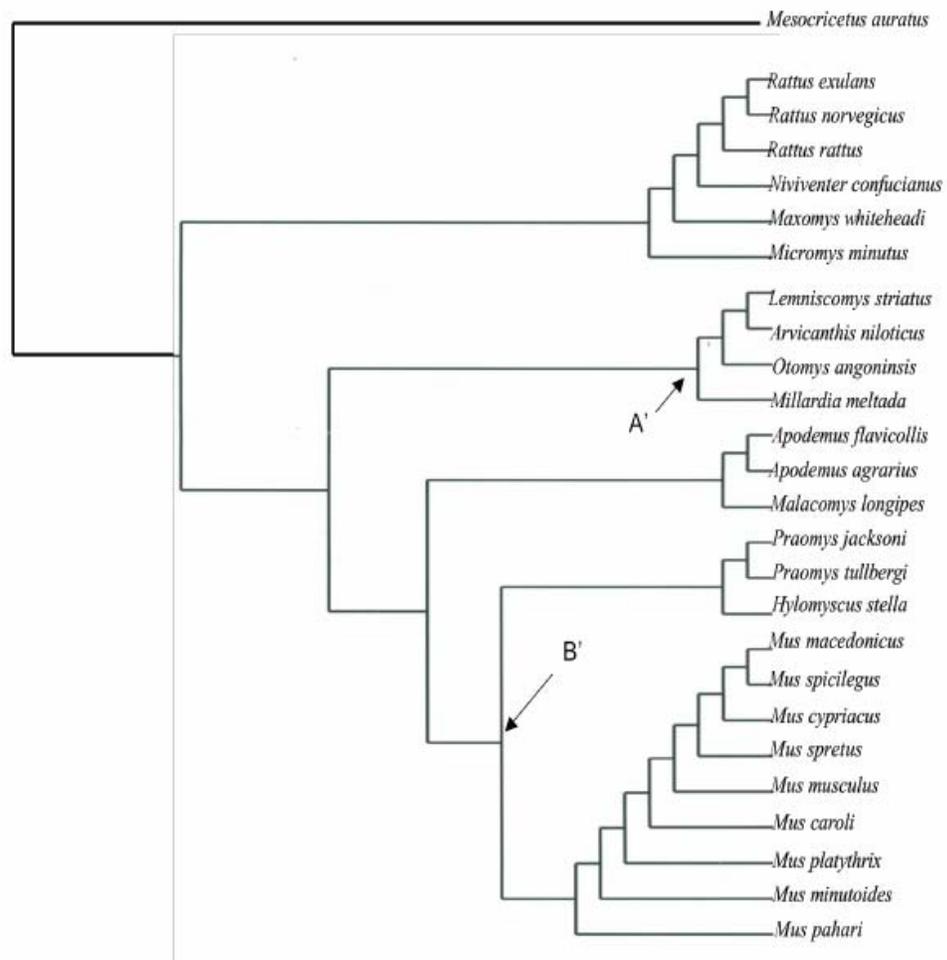


Figura 64. Filogenia de la subfamilia Murinae obtenida por Rowe y col. (2008).

Nuestro árbol coloca al taxón *Otomys angoniensis* en la base del grupo constituido por *Millardia meltada*, *Arvicanthis niloticus*, y *Lemniscomys striatus* (nodo A, figura 56). En el caso del segundo árbol el taxón *Millardia meltada* es el que se sitúa en la base del grupo (nodo A', figura 63). La otra diferencia que encontramos es una inversión entre el grupo compuesto por los taxones del género *Praomys* e *Hylomyscus stella* con el grupo compuesto por *Malacomys longipes* y los

dos taxones del género *Apodemus* (nodo B y C respectivamente, figura 63). En efecto, de acuerdo con la figura 64 el grupo formado por el género *Praomys* y el taxón *Hylomyscus stella* (nodo B') se sitúa en la base del grupo del género *Mus*. En nuestro árbol en la base del grupo del género *Mus* encontramos al grupo formado por *Malacomys longipes* y los dos taxones del género *Apodemus* (nodo C, figura 63). Esta inversión de los grupos podría ser explicada por una falta de secuencias especialmente para el género *Apodemus* lo que conlleva un valor de bootstrap débil (58 para el nodo C que sitúa al grupo de *Apodemus* y *Malacomys* en la base del género *Mus*).

VII. DISCUSIÓN

1. COMPOSICIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER

La fecundación en los mamíferos es un proceso complejo en el cual, a nivel molecular, participan varios receptores y ligandos en el ovocito y varios receptores en el espermatozoide. En el ovocito, el sitio de unión del espermatozoide se localiza en la zona pelúcida (ZP) (Yanagimachi, 1994; Wassarman, 2005; Lyng y Shur, 2007; Wassarman y Litscher, 2008).

El estudio de la composición, estructura y función precisa de la ZP y de cada una de sus glicoproteínas constituyentes es de gran interés para el entendimiento de los procesos que tienen lugar durante la fecundación. El modelo murino ha sido el más extensamente utilizado para este tipo de estudios (Bleil y Wassarman, 1980a; Greve y Wassarman, 1985; Rankin *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2004). La ZP de ratón (*Mus musculus*) está constituida por tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) que constituyen una matriz tridimensional compleja. Sin embargo, si estudiamos el ADN genómico del ratón podemos observar que esta especie tiene cuatro genes distintos que codifican para las glicoproteínas de la ZP (Lefièvre *et al.*, 2004). No obstante, un análisis de la secuencia codificante de ZP4 revela que ZP4 de ratón ha adquirido un número de mutaciones tal que el ARNm nunca podrá traducirse a una proteína funcional debido a la presencia de múltiples codones de stop. Esto se ve corroborado por la espectrometría de masas que es incapaz de identificar la proteína ZP4 en esta especie (Lefièvre *et al.*, 2004).

Estudios recientes describen la presencia de cuatro glicoproteínas en la ZP de especies como el humano, la rata, o el macaco coronado (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Boja *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008). La presencia de una cuarta glicoproteína en la composición de la ZP nos hace replantearnos el modelo murino y cuestionarnos si es un modelo aceptable para el estudio de la fecundación humana y otras especies con una ZP constituida por cuatro proteínas.

La descripción de una cuarta proteína en estas especies sugiere además, la necesidad de una reinterpretación de numerosos estudios electroforéticos de la ZP en

las diferentes especies.

Así, en mamíferos, dependiendo de la especie analizada, la ZP está formada por tres o cuatro glicoproteínas. Como hemos comentado, la ZP de ratón está formada únicamente por tres glicoproteínas (ZP1, ZP2, y ZP3). En otras especies, como el cerdo (Hedrick y Wardrip, 1987), la vaca (Noguchi *et al.*, 1994) y el perro (Goudet *et al.*, 2008) la ZP está formada también por tres glicoproteínas pero en estas especies las proteínas son ZP2, ZP3 y ZP4. ZP1 ha sido identificada como un pseudogen en el genoma bovino y canino. Por otro lado, en especies no mamíferas se detectan más de cuatro genes codificantes para las proteínas de la ZP. Por ejemplo, en el genoma de la gallina (Bausek *et al.*, 2000; Goudet *et al.*, 2008) se detectan seis genes (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPAX, ZPD) y en el genoma de *Xenopus* hay cinco genes codificantes para las glicoproteínas de la ZP (ZP2, ZP3, ZP4, ZPD, ZPAX). (Goudet *et al.*, 2008).

La presencia de ZP1 y ZP4 tanto en especies de mamíferos como en especies de aves sugiere que la expresión de estos dos genes (ZP1 y ZP4) representa una condición ancestral presente antes de la divergencia de los linajes de aves y mamíferos. ZP1 y ZP4 que fueron considerados previamente como genes ortólogos son en realidad parálogos. Estos dos genes provienen de un ancestro común por duplicación (Hughes y Barrat, 1999; Bausek *et al.*, 2000; Sasanami *et al.*, 2003; Goudet *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta todos estos datos, podemos decir que la composición y por lo tanto la estructura de la ZP de los mamíferos es más complicada de lo esperado porque, dependiendo de la especie:

1) está formada por tres o cuatro glicoproteínas, 2) en el modelo de tres glicoproteínas puede estar presente ZP1 o ZP4 y 3) la proteína responsable de la unión con el espermatozoide varía en las diferentes especies (así es la ZP3 en el ratón y ZP4-ZP3 en el cerdo).

Muchos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de determinar la composición bioquímica de la ZP de ovocitos de mamíferos (Moller *et al.*, 1990;

Ikeda *et al.*, 2002). En estos estudios la ZP ha sido descrita como una envoltura altamente porosa constituida por unidades glicoproteicas. Sus propiedades histoquímicas (Kang, 1974), capacidad para unir lectinas (Nicolson *et al.*, 1975; Avilés *et al.*, 2000) y para incorporar azúcares marcados radiactivamente (Oakberg y Tyrrell, 1975), sugieren que la ZP es un típico glucocálix compuesto por proteínas y polisacáridos. Estas cadenas de azúcares están directamente ligadas a la interacción con el espermatozoide en la fecundación (Benoff, 1997; Tulsiani *et al.*, 1997). La dificultad de la identificación de las diferentes proteínas que constituyen la ZP de los mamíferos es debida a la presencia de estas cadenas de carbohidratos. La presencia de diferentes glicofomas en cada glicoproteína de la ZP es la responsable de la migración como una banda ancha de estas proteínas cuando son separadas por SDS-PAGE. Así, la ZP1 y ZP3 humanas se muestran superpuestas en geles de electroforesis (Gupta *et al.*, 1998; Bauskin *et al.*, 1999). Un resultado similar se observa en la ZP de rata (Araki *et al.*, 1992). Las diferentes glicoproteínas de la ZP de bovino migran en una banda ancha y solamente pueden ser aisladas mediante el tratamiento con la enzima endo- β -galactosidasa (Noguchi *et al.*, 1994). De la misma manera, la identificación de las diferentes glicoproteínas de la ZP de porcino sólo ha podido ser llevada a cabo cuando la ZP fue deglicosilada (Yonezawa y Nakano, 2003).

En el hámster, la caracterización de la ZP mediante SDS-PAGE sugiere la presencia de tres proteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) (Ahuja y Bolwell, 1983; Oikawa *et al.*, 1988; Moller *et al.*, 1990). Moller y colaboradores (1990) caracterizaron el ARNm que codifica para la glicoproteína ZP3 y además, mediante resultados de ensayos de competición *in vitro*, sugirieron que ZP3 es el receptor en la ZP de hámster para el espermatozoide, proteína que se muestra análoga a la ZP3 de ratón. Sin embargo, la secuencia del ADNc codificante para ZP2 y ZP3 no fue conocida hasta una década más tarde (Koyama *et al.*, 2005, Kinloch *et al.*, 2002).

En nuestro estudio analizamos la ZP de hámster mediante técnicas de biología molecular y espectrometría de masas para la determinación precisa de la composición de esta matriz extracelular presentando la primera evidencia de la

existencia de cuatro glicoproteínas en la ZP de esta especie. Obtuvimos el marco abierto de lectura completo de *ZP1* y *ZP4* de hámster. El análisis de las secuencias obtenidas de *ZP1* y *ZP4* indica la existencia de secuencias codificantes; presentan un marco abierto de lectura con un codón de iniciación de la traducción (atg) y un codón de stop. Las regiones 3' no codificantes incluyen además una señal de poliadenilación.

La comparación de las secuencias de *ZP1* y *ZP4* de hámster, deducidas de sus secuencias de ADNc correspondientes, con las secuencias presentes en la base de datos del GenBank revela una alta similitud con las ZPs de otras especies, incluida la humana; siendo la estructura básica de las nuevas proteínas similar a la de otras glicoproteínas de la ZP previamente descritas. Así, comparten con dichas proteínas, el dominio ZP (Bork y Sander, 1992), dominio trefoil y dominio transmembrana. La presencia de un péptido señal, y un sitio consenso para corte de furina es también común en las distintas glicoproteínas. La conservación del sitio consenso para corte de furina y dominio transmembrana puede reflejar una vía secretora común en la biosíntesis de las proteínas de la ZP de las diferentes especies (Sasanami *et al.*, 2002). Así, asumiendo un procesamiento similar al descrito en las glicoproteínas de otras especies la proteína madura *ZP1* y *ZP4* deberían corresponder a 21Gln-Arg554 y 29Gln-Arg470 respectivamente como resultado de la eliminación del péptido señal y dominio transmembrana con un peso molecular del polipéptido de 59,2 kDa y de 48,7 kDa respectivamente.

El dominio ZP es el que tiene la más alta identidad entre las diferentes especies. Las cisteínas del dominio ZP, tanto de *ZP1* como de *ZP4* de hámster, están conservadas cuando las comparamos con las presentes en estas proteínas en otras especies. Esta conservación supone una evidencia de la existencia de una estructura tridimensional similar existente entre las proteínas de la ZP en las diferentes especies.

Los 3 sitios potenciales de N-glicosilación presentes en la proteína *ZP1* de hámster (Asn49, Asn68, Asn379) están conservados en rata y ratón y ha sido

demostrado, en estas dos especies, mediante espectrometría de masas que están ocupados por cadenas de oligosacáridos complejos. En el hombre solamente dos sitios (Asn68 y Asn379) están conservados no existiendo información en esta especie sobre si están ocupados o no.

Por otro lado, la cadena polipeptídica madura de ZP4 de hámster contiene 6 sitios potenciales de N-glicosilación (N50, N74, N118, N209, N277, N299). Los sitios potenciales de N-glicosilación N50 y N74 están conservados en ZP4 de rata, y los sitios N74 y N209 están conservados en ZP4 humana, en ZP4 de vaca, y en ZP4 de cerdo. Además, encontramos 86 sitios potenciales de O-glicosilación (treoninas o serinas). La región O-glicosilada que contiene un O-glicano descrita previamente por MS/MS en ZP4 de rata está conservada en ZP4 del hámster (Ser293, Ser295, Ser298, Ser301, Thr309).

Además, mediante técnicas de espectrometría de masas probamos que las secuencias de ZP1 y ZP4 de hámster caracterizadas por primera vez en esta Tesis Doctoral codifican las proteínas correspondientes ya que mediante esta técnica conseguimos detectar específicamente diferentes péptidos pertenecientes a estas dos proteínas (detección de un 12,6 % de la secuencia de ZP1 y un 11,2 % en el caso de ZP4). Además se detectan péptidos de ZP2 y ZP3, las otras glicoproteínas cuyas secuencias de nucleótidos y aminoácidos se encontraban en la bases de datos (GenBank), lo que permite validar el método utilizado (5,1 % de cobertura para ZP2 y 19,2 % de cobertura para ZP3).

En cuanto a la glicosilación de las proteínas de la ZP de hámster, sólo detectamos un sitio potencial de N-glicosilación dentro de un péptido perteneciente a ZP3. Esto es indicativo de que el sitio podría estar libre o parcialmente ocupado en la proteína nativa.

El resto de sitios descritos como potencialmente N- glicosilables podrían estar ocupados por cadenas N-unidas en las proteínas nativas correspondientes.

Por el contrario, dentro de algunos péptidos si se detectan sitios potenciales de O-glicosilación (13 en ZP1, 6 en ZP2, 15 en ZP3 y 9 en ZP4) de manera que podemos afirmar que se encontrarían libres o parcialmente ocupados en estas proteínas.

En este estudio mostramos la evidencia de la presencia de cuatro glicoproteínas en la ZP de hámster (*Mesocricetus auratus*). Esto sugiere que la estructura y probablemente la fisiología de la ZP de hámster es muy similar a la ZP humana. Estos resultados hacen del hámster un modelo animal más apropiado para investigar la interacción entre gametos y relacionarlo con la especie humana que el modelo de ratón (*Mus musculus*) que está formado por tres glicoproteínas. La rata, con cuatro glicoproteínas en la ZP, podría servir también como modelo; sin embargo, existen grandes problemas en esta especie animal para la realización de la fecundación *in vitro*, problemas que no encontramos en el hámster por lo que la consideramos una especie de elección para el estudio de la fecundación en la especie humana y otras especies con una ZP constituida por cuatro glicoproteínas.

2. EXPRESIÓN DE ZP4 DE HÁMSTER EN CÉLULAS HEK 293T

En nuestro estudio, la línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293T) ha sido empleada como sistema celular heterólogo para expresar ZP4 de hámster. Esta línea celular se escogió porque existen precedentes en la bibliografía de que es un sistema idóneo para el estudio de la expresión de proteínas de otras especies.

Nuestros resultados nos indican que la proteína es expresada en este sistema celular pero no fue posible su detección en el medio extracelular como proteína secretada. Mediante ensayos de citometría y microscopía confocal ZP4 de hámster se sitúa a nivel de la membrana celular de manera que podemos afirmar que el tráfico desde el retículo hasta la superficie celular es adecuado y concuerda con el comportamiento de otras proteínas de la ZP descritas. No obstante el hecho por el cual no es secretada permanece sin ser esclarecido, pero parece estar en concordancia con resultados obtenidos en estudios previos realizados con proteínas recombinantes

de la familia ZPB (ZP1 y ZP4) (Harris *et al.*, 1999; Tsubamoto *et al.*, 1999; Martic *et al.*, 2004; Caballero-Campo *et al.*, 2006)

Así, en un estudio previo, la línea celular de riñón embrionario humano 293T fue empleada para producir ZP1, ZP2 y ZP3 humanas (Martic *et al.*, 2004). Los autores realizan ensayos de expresión y coexpresión por transfección simultánea de los plásmidos. La presencia de estas proteínas en el medio de cultivo y en el lisado celular fue testada mediante electroforesis y análisis por Western-blot. ZP2 y ZP3 son secretadas al medio mientras que ZP1 solamente la encontraron en el lisado celular. Curiosamente, cuando las tres proteínas son expresadas al mismo tiempo, en ensayos de cotransfección, ZP1 si es secretada al medio. En este mismo trabajo, el análisis por Western-blot del lisado celular reveló, tras la incubación con un suero anti-ZP1 una banda de 70 kDa. Esta banda podría corresponder a una forma inmadura de la ZP1 en la cual el extremo C-terminal no ha sido eliminado. La furina, enzima posiblemente responsable de este corte, prefiere el sitio R-X-K/R-R. Estas secuencias están presentes en ZP2 y ZP3 humanas. Sin embargo, ZP1 humana contiene un sitio de corte alterado S-R-R-R que podría ser también reconocido por algunas enzimas tipo furina. Existe la posibilidad de que la furina en las células HEK 293T no reconozca esta secuencia alternativa presente en ZP1 haciéndose esta proteína resistente al corte e impidiéndose así liberación de la membrana. Otra opción podría ser que los sitios o el sitio activo de corte de la enzima pueda estar oculto por la limitada flexibilidad de la proteína y por lo tanto inaccesible al corte. Todas las proteínas de la familia ZPB, incluyendo ZP1 humana, contienen una región rica en cisteínas llamada dominio trefoil. Ha sido demostrado que muchas proteínas que contienen este dominio presentan una alta resistencia a la degradación enzimática relacionada con un intenso entrecruzamiento (formación de puentes disulfuro).

Es de interés resaltar que la coexpresión de las tres glicoproteínas si resulta en una secreción de ZP1 fuera de la célula. El tamaño molecular de ZP1 detectada entonces en el medio (55kDa) es más cercano al tamaño esperado (aproximadamente

60 kDa) de la proteína madura (sin péptido señal y cortada a nivel del sitio potencial de corte de furina).

Estudios de coexpresión de las diferentes proteínas de la ZP de hámster podrían ser de utilidad para comprobar si el comportamiento de la ZP4 podría ser similar.

En el estudio anterior, Martic y col. (2004), empleando ensayos de inmunofluorescencia de las células transfectadas muestran una tinción típica a nivel de membrana y ocasionalmente unas estructuras largas a modo de hilos o cuerdas que se extienden a partir de la membrana. Estas estructuras podrían corresponder a alguna clase de polímero formado tras la expresión de estas glicoproteínas que no se libera al medio extracelular sino que permanece enlazado de algún modo a la membrana plasmática por la cara extracelular. En nuestro caso, aunque no visualizamos este tipo de estructuras, sí podemos afirmar que la proteína llega a la membrana celular y no descartamos la posibilidad de la formación de algún tipo de estructura pericelular que impida la secreción de la proteína.

Otro estudio nos muestra unos resultados similares: Tsubamoto y col. (1999) utilizan la proteína ZP4 porcina (en el artículo la nombran como ZP1) para estudios de expresión. Ésta no es secretada al medio a partir de células transfectadas de tres líneas celulares diferentes incluyendo una línea celular porcina. Incluso cuando el dominio transmembrana es eliminado se observa muy poca secreción. Sólo cuando se construye y transfecta una proteína de fusión de ZP4 (198 residuos) con la cadena pesada de la inmunoglobulina IgG1 se observa algo de secreción.

Tanto ZP4 de cerdo como ZP4 de hámster tienen un sitio de corte de furina típico de manera que cobra fuerza la presencia del dominio trefoil como causa principal que impida la secreción de estas proteínas por la formación de algún tipo de estructura que interfiera con la solubilización de la mismas.

Sin embargo, ZP4 de cerdo si es expresada como una proteína secretada al sobrenadante en otro trabajo utilizando una línea celular de insecto Sf9 (Yonezawa *et*

al., 2005). Esta misma línea es utilizada por los mismos autores para la producción de ZP4 bovina, la cual también es obtenida del sobrenadante celular (Kanai *et al.*, 2007). Diferentes resultados obtienen Caballero-Campo y col. al expresar ZP2, ZP3 y ZP4 humanas en este tipo de células Sf9. Las proteínas son utilizadas para ensayos funcionales tras su purificación a partir de lisados celulares pues no se secretan al medio de cultivo.

En cuanto a la ZP4 humana, es expresada y secretada al sobrenadante en células CHO en otro estudio (Harris *et al.*, 1999) pero no en el resto de líneas celulares que usan en el mismo.

Así, el hecho por el cual las proteínas son o no secretadas podría depender no sólo de la naturaleza de la proteína que estamos estudiando sino de características propias de cada línea celular.

Estudios posteriores de coexpresión de las 4 glicoproteínas de la ZP de hámster así como la utilización de nuevas líneas celulares nos podrían aportar nuevos datos sobre las vías de secreción de estas proteínas. La obtención de ZP4 recombinante serviría de herramienta útil para el desarrollo de estudios de funcionalidad de la proteína: efecto sobre la inducción de la reacción acrosómica, unión al espermatozoide...etc.

3. ORIGEN DE LA EXPRESIÓN DE LA ZP DE HÁMSTER

Estudios realizados en diferentes especies animales apoyan la hipótesis de que la expresión de la ZP durante la ovogénesis es especie-específica (Kölle *et al.*, 1996, 1998; Bogner *et al.*, 2004). En nuestro estudio nos propusimos determinar el origen de la síntesis de las proteínas de la ZP en la especie objeto de estudio, el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

El número de especies donde la expresión de los genes de la ZP tienen lugar en las células foliculares supera a las especies en las que la expresión se localiza exclusivamente en el citoplasma ovocitario. Las únicas especies en las que se ha demostrado expresión de ARNm de estas glicoproteínas solamente en el ovocito son el ratón (Epifano *et al.*, 1995; El Mestrah *et al.*, 2002) y la rata (Scobie *et al.*, 1999). En la mayoría de las especies estudiadas, aunque el ovocito está siempre involucrado, una expresión adicional de uno o más genes de la ZP se detecta en células somáticas foliculares (Sinowatz *et al.*, 2001). Así por ejemplo, Lee y Dunbar (1993) demostraron que en el conejo ZP1 es expresada en ovocito y en células de la granulosa. Un caso similar encontramos en ZP3 bovina y en ZP4 porcina (Kölle *et al.*, 1996, 1998).

Las dos localizaciones (ovocito y células de la granulosa) pueden mostrarse como sitios específicos de síntesis de determinadas proteínas de la ZP. Es decir, unas proteínas se sintetizan en ovocito y otras en células de la granulosa como ocurre por ejemplo en el perro (*Canis familiaris*) (Blackmore *et al.*, 2004) en el cual el ovocito es responsable de la síntesis de ZP2, y las células de la granulosa son las encargadas de la síntesis de ZP4 y ZP3. Lo mismo ocurre en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) en el que el ARNm de ZP2 y ZP3 ha sido localizado en células de la granulosa, mientras que el ARNm de ZP4 solamente se ha localizado en el ovocito.

En otras especies todas las glicoproteínas se sintetizan en ambas localizaciones celulares. Así por ejemplo, en el tití común (*Callithrix jacchus*) tanto el ovocito como las células foliculares expresan ZP2, ZP3 y ZP4 (Bogner *et al.*, 2004). La especie equina (*Equus caballus*) es otro ejemplo de cooperación en la síntesis de las glicoproteínas de la ZP (ZP4 y ZP3) en la que participan tanto ovocito como células foliculares (Kölle *et al.*, 2007).

Nuestros resultados nos indican que la expresión de las proteínas de la ZP en el hámster es equivalente a lo que ocurre en las especies filogenéticamente emparentadas (rata y ratón). Sólo es posible detectar expresión en el citoplasma ovocitario. Las células foliculares no muestran señal de expresión.

En este estudio, demostramos que en el hámster las proteínas de la ZP se expresan en todos los estadios de la foliculogénesis. Aunque no estamos usando un método cuantitativo, podemos afirmar que el nivel de expresión de las cuatro proteínas es similar si comparamos ovocitos pertenecientes a folículos de un mismo tamaño. Los folículos primordiales y los primarios de menor tamaño son los que muestran una señal más intensa de expresión disminuyendo conforme el folículo aumenta de tamaño. La señal es muy débil o nula en los ovocitos de los folículos preovulatorios o de Graaf.

Estudios posteriores son necesarios para determinar el nivel exacto de expresión de cada uno de los genes en cada estadio folicular.

4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4 EN LA SUBFAMILIA MURINAE

Como hemos comentado en apartados anteriores, la ZP de los vertebrados dependiendo de la especie puede estar formada por de 3 a 6 glicoproteínas (Bleil y Wassarman, 1980a; Hedrick y Wardrip, 1987; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Goudet *et al.*, 2008). Los genes de la ZP pueden ser clasificados dentro de 6 subfamilias: *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPD* y *ZPAX*.

Si centramos nuestro estudio en los mamíferos dependiendo de la especie podemos encontrar uno de estos dos modelos de ZP: (1) puede estar constituida por cuatro glicoproteínas: *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* (por ejemplo: humano, rata) (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005); (2) puede estar constituida por tres glicoproteínas. En este último modelo existen dos posibilidades: puede estar formada por *ZP1*, *ZP2* y *ZP3* como es el caso del ratón (Bleil y Wassarman, 1980a) o puede estar formada por *ZP2*, *ZP3*, y *ZP4* como ocurre en especies como la vaca, el perro, o el cerdo (Hedrick y Wardrip, 1987, Blackmore *et al.*, 2004; Goudet *et al.*, 2008).

La presencia de diferentes modelos de ZP puede ser explicada mediante análisis filogenéticos. Así, en la familia de la ZP, a lo largo de la evolución, han tenido lugar sucesivos eventos de duplicación y muerte génica. Prueba de ello son los

indicios que encontramos en varias especies de mamíferos de la pérdida de ZP1, ZP4, ZPD y/o ZPAX. Así, ZP1 ha sido identificado como un pseudogen en el perro y en la vaca (Goudet *et al.*, 2008). En el caso del cerdo, el genoma aún no ha sido totalmente secuenciado de manera que, por su cercanía filogenético con la vaca, es posible que ZP1 también se haya visto afectada por el mismo proceso de pseudogenización. La falta de una completa secuenciación del genoma sería la causa por la cual no se ha identificado este pseudogen. Así, nuevos genes o pseudogenes pertenecientes a la familia de la ZP van surgiendo conforme se completa el genoma de diferentes especies.

El objeto de nuestro estudio fue el análisis de la evolución molecular del gen ZP4 en varias especies en el seno de la subfamilia Murinae. Dentro de esta subfamilia encontramos a *Mus musculus*, el ratón doméstico o ratón de laboratorio. Esta especie presenta una ZP constituida por tres glicoproteínas. ZP4 está presente en el genoma de esta especie como un pseudogen no existiendo una proteína funcional (Lefièvre *et al.*, 2004; Goudet *et al.*, 2008). En la misma subfamilia encontramos a la rata de alcantarilla, rata noruega o rata china (*Rattus norvegicus*) en la cual ZP4 si se expresa como una proteína funcional estando entonces la ZP de esta especie constituida por cuatro glicoproteínas. ZP4 se muestra entonces como una proteína cuya expresión se ha perdido en algún punto de la evolución tras la divergencia del ratón y la rata a partir de un ancestro común (la divergencia de esta dos especies se data aproximadamente hace 10-14 millones de años). El estudio filogenético de este gen dentro de la subfamilia Murinae arrojaría datos muy interesantes sobre la evolución de este gen. Además, el estudio de especies muy cercanas desde el punto de vista evolutivo puede arrojar datos relevantes sobre la aparición de incipientes barreras reproductivas y sobre cuales son las presiones selectivas que promueven dichos cambios.

La subfamilia Murinae queda englobada junto con otras dos subfamilias (Deomyinae, Gerbillinae) dentro de la familia Muridae. La subfamilia Murinae tiene una distribución natural que incluye el Viejo Mundo, incluyendo África y Eurasia, Australia, Nueva Guinea y muchas islas del oeste del Pacífico (sin considerar la distribución mediada por el hombre de algunas especies de roedores del género *Mus*

y *Rattus* en América y otras islas oceánicas). Esta subfamilia incluye más de 500 especies incluidas en 126 géneros.

El género *Mus*, incluido dentro de esta subfamilia, está constituido al menos por 38 especies divididas en cuatro subgéneros: *Mus*, *Pyromys*, *Nannomys* y *Coelomys* (Musser y Carleton, 2005). El subgénero *Mus* ha sido el más estudiado e incluye al ratón común o ratón de laboratorio *Mus musculus*. Este subgénero comprende 11 especies. Los otros subgéneros son el subgénero *Nannomys* (19 especies reconocidas), y los dos subgéneros del sudeste asiático *Coelomys*, con cuatro especies y *Pyromys* con cinco especies (Musser y Carleton, 2005).

Nuestros resultados apuntan a que la pseudogenización afecta únicamente al subgénero *Mus* dentro del género *Mus*, demostrando que la composición de tres glicoproteínas de la ZP es una excepción dentro de la subfamilia Murinae.

Las secuencias obtenidas de ZP4 a partir de ADN genómico muestran la presencia de codones de stop única y exclusivamente en especies incluidas dentro del subgénero *Mus*. El estudio de las secuencias de ADNc obtenido a partir del ARNm de otros subgéneros pertenecientes al género *Mus* demuestran que *Coelomys* y *Nannomys* no poseen codones de stop en la secuencia codificante de ZP4 indicando que esta proteína podría estar presente en estos subgéneros como una proteína funcional. La pseudogenización de ZP4 podría ser entonces datada hace aproximadamente unos 4 millones de años afectando únicamente a los taxones pertenecientes a la rama del subgénero *Mus*.

La pseudogenización de ZP4 en estas especies de roedores puede ser entendida si nos remontamos al origen del gen. Así, ZP1 y ZP4 surgen a partir de un ancestro común por duplicación, fenómeno común dentro de la familia ZP. Esta duplicación puede ser datada después de la divergencia de anfibios y mamíferos (360 Mya) pero anterior a la divergencia entre aves y mamíferos (300 Mya) (Smith *et al.*, 2005). La duplicación génica es un proceso esencial que da origen a nuevos genes

con nuevas o modificadas funciones. Este fenómeno representa una de los principales motores que impulsan la evolución génica.

La primera prueba de que la duplicación génica ha jugado un papel vital en la evolución de los genes de la ZP es la existencia de un importante número de genes parálogos en la familia ZP.

Tras una duplicación de un gen, de manera general, podemos afirmar que son posibles dos situaciones. En ocasiones, el par de genes formado a partir de una duplicación tiene un periodo de vida corto hasta que una de las copias desaparece dejando a la otra que sobreviva. Otras veces, cuando los genes surgidos por duplicación son fijados en el genoma por selección natural, los nuevos genes pueden cambiar bajo dos escenarios posibles. El primer escenario se denomina neofuncionalización (Ohno, 1970) en el cual el duplicado evoluciona hacia una nueva función diferente de la del gen ancestral. Una condición indispensable para que este escenario pueda desarrollarse es que la otra copia continúe supliendo la función original del gen de partida. Y la otra posibilidad tras la duplicación es lo que se denomina subfuncionalización (Force *et al.*, 1999), en la cual las funciones desarrolladas por el gen ancestral se dividen entre los duplicados apareciendo diferentes patrones temporales o espaciales de expresión génica (Hurles *et al.*, 2004). Así, si aplicamos estos conceptos a los fenómenos ocurridos a lo largo de la evolución de la familia ZP podemos hipotetizar, que en el caso de las especies con tres glicoproteínas una de las copias (ZP1 o ZP4) se ha perdido porque no ha evolucionado hacia nuevas funciones y la otra copia ha mantenido las funciones del gen ancestral.

Por otro lado, en las especies con cuatro glicoproteínas en la ZP las dos copias han evolucionado bajo procesos de neofuncionalización o subfuncionalización. Futuras investigaciones deberían ir enfocadas a la realización de análisis funcionales para determinar en estas especies cual es el efecto o efectos de la duplicación y cuales son las causas del mantenimiento de las dos copias (ZP1 y ZP4). Poco se conoce acerca de la función de cada una de estas glicoproteínas en

especies cuya estructura está conformada con cuatro glicoproteínas. Así, en la especie humana ZP4 ha sido relacionada con la unión al espermatozoide e inducción de la reacción acrosómica (Chiu *et al.*, 2008a; Chiu *et al.*, 2008b) pero no existen datos acerca de la función que pudiese mantener ZP1. En otras especies con cuatro glicoproteínas como la rata o el hámster la función de estos genes parálogos es desconocida. Si hay información más completa sobre ZP4 en especies con tres glicoproteínas, como la vaca o el cerdo. En estas especies ha sido relacionada con la unión al espermatozoide (Yurewicz *et al.*, 1998). Y en cuanto a la función de ZP1 nuestra única referencia es en *Mus musculus* presentando en esta especie un papel estrictamente estructural (Rankin *et al.*, 1999).

En el marco del género *Mus* disponemos de grandes posibilidades para estudiar el comportamiento de la ZP en especies cercanas pero a la vez distintas en la composición de dicha matriz. Por un lado, tenemos el subgénero *Mus*, con tres glicoproteínas en la ZP y por otro lado las especies de los otros tres subgéneros (*Nannomys*, *Coelomys* y *Pyromys*) con cuatro glicoproteínas en su constitución. La estructura de la ZP de estos roedores con cuatro glicoproteínas diferirá a la estructura que pueda presentar *Mus musculus*. Esta diferencia estructural podría estar implicada en la especie-especificidad de la fecundación y en última instancia en el aislamiento reproductivo. De este modo, ensayos tanto *in vivo* como de fecundación cruzada *in vitro* entre las dos clases de murinos (3 proteínas *versus* 4 proteínas) podrían ser de utilidad para la obtención de información acerca de las implicaciones estructurales que podría tener la presencia de una cuarta proteína en la ZP del ratón. Estas diferencias estructurales podrían estar implicadas en cambios a nivel de unión al espermatozoide, inducción de reacción acrosómica y bloqueo de la polispermia.

Se ha comprobado que las proteínas relacionadas con los procesos reproductivos son las que más rápidamente evolucionan. Esta evolución no es homogénea en toda la proteína. Si comparamos la homología de diferentes ZPs vemos que presentan zonas altamente conservadas (dominio ZP) y otras zonas que son las que más divergen. La evolución de la especie-especificidad se ha relacionado con la divergencia de estas zonas. Sólo existe un estudio filogenético en el que se

incluye ZP4 (Berlin *et al.*, 2008) señalándose en el mismo algunos aminoácidos como sometidos a selección positiva. Análisis posteriores de nuestros datos serían muy interesantes para la detección de este tipo de selección positiva en ZP4 en el seno de la subfamilia Murinae.

Por otro lado, hay estudios que demuestran una coevolución entre el gameto femenino y el masculino. En estos trabajos (Swanson y Vacquier, 1998; Galindo *et al.*, 2003), realizados en la oreja de mar, se demuestra la existencia de una coevolución entre un receptor espermático, la lisina y su receptor en el gameto femenino. En este caso, el gameto femenino cambia o se modifica primero y el gameto masculino es seleccionado por su capacidad de unión al gameto femenino. No se ha demostrado la coevolución a nivel molecular en gametos de ninguna otra especie. No obstante, existen indicios de que esta coevolución es una realidad también a niveles superiores. Así, el éxito reproductivo en la fecundación entre miembros de una especie frente a la disminución de la tasa de fecundación cuando ésta tiene lugar entre individuos de diferentes especies es reflejo de una coevolución subyacente.

Dos son las fuerzas que lideran la evolución de las proteínas que participan en la fecundación a nivel postcopulatorio (Birkhead *et al.*, 2002). La competencia espermática, a nivel de gameto masculino y la elección críptica femenina a nivel del ovocito. La competencia espermática tiene lugar cuando hay inseminación heteroespérmica, es decir, cuando múltiples apareamientos permiten la presencia simultánea de espermatozoides vivos de dos o más machos dentro de los conductos genitales femeninos (para aquellas especies de fertilización interna). Los espermatozoides de distintos machos compiten por lograr fecundar a los óvulos de una misma hembra. La competencia espermática favorece un incremento en el número de espermatozoides, un incremento en la proporción de espermatozoides viables, así como cambios morfológicos que favorecen una mayor velocidad de desplazamiento (Gomendio *et al.*, 2007; Gomendio y Roldan, 2008). La elección críptica femenina es la habilidad de las hembras en sesgar el éxito de fertilización de los diferentes machos con que copuló.

El hecho de que existan estas dos fuerzas opuestas liderando la evolución de las proteínas reproductoras en el macho por un lado y en la hembra por otro, también son un indicativo de que si el gameto masculino evoluciona para obtener un mayor potencial fecundante la hembra deberá evolucionar en el sentido contrario para evitar la polispermia. Así, existe un estudio en el que se relaciona altos niveles de competición espermática con altos niveles de “defensa ovocitaria” de manera que se puede intuir una cooperación o una guía común en la evolución entre los gametos de una misma especie. (Martín-Coello *et al.*, 2009).

Con este marco de trabajo, la evolución de las glicoproteínas de la ZP podría encontrarse íntimamente relacionada con la evolución de las proteínas espermáticas implicadas en la unión a la ZP. ¿Podría ser el caso de la evolución de la ZP un caso de elección críptica femenina? Futuras investigaciones de fecundación entre especies de roedores con 4 ZPs y especies con 3 ZPs podrían ir dirigidos no sólo a esclarecer la implicación de la ZP en los mecanismos de especie-especificidad sino al estudio de la coevolución entre los dos gametos, femenino y masculino.

VIII. CONCLUSIONES

1. El ARNm de *ZP1* y *ZP4*, al igual que el de *ZP2* y *ZP3*, se encuentra presente en el ovario de hámster. El ADNc correspondiente a *ZP1* y *ZP4* ha sido amplificado, secuenciado y caracterizado.
2. La clonación del marco abierto de lectura completo de *ZP4* en un vector de expresión permitió el estudio de la expresión de este gen en un sistema heterólogo.
3. La proteína expresada se detecta en los lisados celulares y tiene un peso molecular de unos 75 kDa que se corresponde con el esperable del polipéptido inmaduro con los oligosacáridos del tipo N-unidos.
4. El análisis de la expresión mediante citometría de flujo y microscopía confocal indica que la proteína *ZP4* se localiza en la membrana plasmática con el extremo amino terminal hacia el espacio extracelular. Estos resultados apuntan a que el tráfico de la proteína a lo largo de la vía biosintética-secretora es el esperable para proteínas pertenecientes a esta familia.
5. Los análisis de comparación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *ZP1* y *ZP4* con sus ortólogos respectivos revelan una alta homología entre los dominios propios de las glicoproteínas de esta familia.
6. El ARNm de *ZP1* y *ZP4*, al igual que el de *ZP2* y *ZP3*, se expresa dando lugar a una proteína, resultado apoyado por la detección de distintos péptidos pertenecientes a las cuatro glicoproteínas (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4*) mediante espectrometría de masas.
7. La expresión de las cuatro glicoproteínas está restringida a los ovocitos. Los folículos primordiales y los primarios de menor tamaño son los que muestran una mayor expresión disminuyendo durante la maduración folicular. La expresión es muy débil o nula en los ovocitos de los folículos preovulatorios o de Graaf.
8. Análisis filogenéticos de *ZP4* en la subfamilia *Murinae* revelan que la pseudogenización de *ZP4* de ratón tuvo lugar hace 4 millones de años aproximadamente. Este fenómeno afecta solamente al subgénero *Mus*.

9. El proceso de pseudogenización ocurrido en el subgénero *Mus* es distinto en los distintos taxones estudiados.

IX. SUMMARY

INTRODUCTION

Mammalian oocytes are surrounded by an extracellular coat called the zona pellucida (ZP) which is involved in different processes during fertilization and early embryo development. This matrix is responsible for species-specific recognition between gametes, inducing the acrosome reaction, preventing polyspermy and protecting the preimplantation embryo (Yanagimachi, 1994; Epifano *et al.*, 1994; Benoff, 1997; Wassarman, 1998; Denker, 2000; Herrler and Beier, 2000; Sinowatz *et al.*, 2001; Dean, 2004; Hoodbhoy and Dean, 2004; Wassarman and Litscher, 2008). The composition of the ZP matrix has been elucidated for various species and shown to be composed of 3-6 or more glycoproteins depending on the species (Bleil and Wassarman, 1980; Hedrick and Wardrip, 1987; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Goudet *et al.*, 2008). However, the protein composition of the ZP and the nomenclature used to classify the different ZP proteins are quite confusing. A recent phylogenetic study clarified the nomenclature and the evolution of the ZP gene, especially since the presence of pseudogenes in different species had been confirmed (Goudet *et al.*, 2008). Thus, these authors proposed a classification for the ZP genes comprising six subfamilies: *ZPA/ZP2*, *ZPB/ZP4*, *ZPC/ZP3*, *ZP1*, *ZPAX*, and *ZPD*. Until very recently, mammalian ZP was believed to be composed of only three glycoproteins of the ZP family, *ZP1*, *ZP2* and *ZP3*, as first described in the mouse species (Bleil and Wassarman, 1980). However, the description of the complete genome in some species, like human and rat, has resulted in the detection of new proteins in the ZP. Recent studies have revealed that some mammals present a ZP formed by four glycoproteins, e.g., human (Lefièvre *et al.*, 2004), rat (Hoodbhoy *et al.*, 2005) and bonnet monkey (Ganguly *et al.*, 2008). These four glycoproteins have been designated *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, and *ZP4*. In human, *ZP4* was first identified as an orthologue of mouse *ZP1*, but later studies detected that the true orthologue of mouse *ZP1* was a different gene called *ZP1* (Hughes and Barrat, 1999). Further molecular and proteomic approaches identified the four genes and the corresponding proteins, respectively (Lefièvre *et al.*, 2004).

The above studies contrast with other studies using a mouse model in which mass spectrometric analysis failed to identify ZP4. The ortholog of the human *ZP4* gene is present in the mouse genome as a pseudogene (Lefièvre *et al.*, 2004) but a functional protein is not expressed. Thus, depending on the mammalian species analyzed, ZP is formed by three or four glycoproteins. In species like pig (Hedrick and Wardrip, 1987), cow (Noguchi *et al.*, 1994) and dog (Goudet *et al.*, 2008) the presence of three glycoproteins has also been described, but in these species the proteins are ZP2, ZP3 and ZP4. *ZP1* has been identified as a pseudogene in the dog and bovine genome (Goudet *et al.*, 2008). In non-mammalian species, more than four genes have been detected, for example, in chicken genome (Goudet *et al.*, 2008; Bausek *et al.*, 2000) six genes are present (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPAX*, *ZPD*) and in *Xenopus* genome there are five genes encoding ZP proteins (*ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPD*, *ZPAX*) (Goudet *et al.*, 2008) These observations suggest that the expression of both *ZP1* and *ZP4* genes represents an ancestral condition present before the mammalian and avian lineages diverged. Thus, *ZP1* and *ZP4*, previously considered orthologs, are in fact paralogs. These two genes come from an ancestral gene through duplication (Goudet *et al.*, 2008; Hughes and Barrat, 1999; Bausek *et al.*, 2000). Taking all these data together, it seems that the composition and, consequently, the structure of the mammalian ZP is more complicated than expected because, depending on the species: (1) it is formed by three or four glycoproteins; (2) in the three glycoprotein model it may be formed by *ZP1*, *ZP2*, and *ZP3* or *ZP2*, *ZP3*, and *ZP4*; (3) the protein responsible for the sperm binding is different, for example, *ZP3* in mouse and *ZP4*-*ZP3* in pig. It is therefore important to know the precise composition of the ZP in all species.

On the other hand, the origin of mammalian ZP glycoproteins has long been controversial. Recent evidence suggested that glycoproteins are synthesized by: a) the oocyte alone; or b) the follicle cells; or c) both the oocyte and the follicle cells (reviewed by Sinowatz *et al.*, 2001). However, the synthesis of ZP by the oocyte alone has only been demonstrated in mouse (Bleil and Wassarman, 1980b; Skinner and Dunbar, 1992; Epifano *et al.*, 1995; Sinowatz *et al.*, 2001; El Mestrah *et al.*, 2002) and rat (Scobie *et al.*, 1999), while in other mammals (rabbit, dog, pig and

cow) ZP protein expression has also been reported in follicle cells (Sinowatz *et al.*, 2001). In the case of hamster, the origin of the ZP proteins remains to be elucidated.

In hamster, the characterization of the ZP by SDS-PAGE suggested the presence of just three different glycoproteins called ZP1, ZP2, and ZP3 (Moller *et al.*, 1990). However, only ZP2 and ZP3 have been cloned (GenBank accession numbers: AY876920 (ZP2), M63629 (ZP3)). In this study, we analyze the hamster ZP composition by means of molecular and proteomic analysis. The expression pattern of these ZP genes was also studied by *in situ* hybridization analysis.

Finally, ZP4 is analyzed by means of a phylogenetic approach in the subfamily Murinae. This protein has not been studied in depth and its analysis might be very interesting due to its functional importance in species like cow, pig and human (Yurewicz *et al.*, 1998, Amari *et al.*, 2000; Chiu *et al.*, 2008a; Chiu *et al.*, 2008b). In this subfamily, a functional copy of ZP4 is present in *Rattus*. However, ZP4 is present as a pseudogene in *Mus*. We hypothesized that the pseudogenisation event took place during the evolution of the Murinae after the separation of *Mus* and *Rattus*. The aim of this study was determine when this event took place during the history of the murine rodents.

AIMS

Within the framework explained in the introduction, the aims of this work involved:

1. Characterization of the open reading frame of hamster ZP1 and ZP4.
2. Analysis of the expression and the secretory pathway of hamster ZP4.
3. Comparative analysis of nucleotide and protein sequences of hamster ZP1 and ZP4 in relation with the ZP of other species.
4. Mass spectrometry analysis of hamster ovarian ZP.

5. Study of ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 expression pattern in hamster ovary.
6. Phylogenetic analysis of ZP4 in the Murinae subfamily.

MATERIALS AND METHODS

1. Purification of Hamster Ovarian RNA

Thirty, 11 week-old female hamsters (*Mesocricetus auratus*) were injected with 25 IU of pregnant mare serum gonadotropin to stimulate folliculogenesis. The animals were sacrificed 48 h later by overdose of CO₂ and the ovaries were obtained and frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until use. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Quiagen) according to the manufacturer's instructions.

2. Obtaining cDNA and amplification of the complete open reading frame of hamster *ZP1* and *ZP4* genes.

The first-strand cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript First-Strand Synthesis System kit for RT-PCR (Invitrogen-Life *Technologies*), according to the manufacturer's instructions. Hamster *ZP1* and *ZP4* were partially amplified using the polymerase chain reaction (PCR) by means of specific primers. Two pairs of oligonucleotides were designed based on conserved sequences in mouse and rat ZP for the specific detection of hamster *ZP1* and *ZP4*. In the case of mouse *ZP4*, we used a putative sequence deduced from the mouse pseudogene *ZP4* (XM_001481274). After amplifications, four microliters of the PCR reaction mixture were mixed with loading buffer and separated for 90 min at 100 V, before being visualized under UV light using ethidium bromide. Amplicons were carefully excised from the agarose gels and purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), following the manufacturer's protocol. After that, the amplicons were automatically sequenced. To obtain the full-length hamster *ZP1* and *ZP4* cDNAs, 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) was performed with the BD

SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), according to the manufacturer's instructions. The sequences were analyzed to determine the homology with other known sequences using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool). Direct comparison between two sequences was made with the program ALIGN and the multiple alignment of the ZP1 and ZP4 sequences of different species with hamster sequences was carried out using Clustal W. The amino acid sequences were analyzed with the following software packages: "SignalP" to predict the putative signal sequence and cleavage sites, and "NetOGlyc"^{17,18} and "Net-Nglyc"¹⁹ to predict potential N-linked and O-linked glycosylation sites.

3. ZP4 expression construct

Total hamster ovarian RNA was isolated from ovaries and cDNA was synthesized with oligo-dT as primer with the same kits described in previous paragraphs. Hamster *ZP4* was amplified using polymerase chain reaction (PCR) by means of specific primers and cloned into the pcDNA3 vector. The FLAG epitope was incorporated by directed mutagenesis using the QuickChange kit (Stratagene, La Jolla, CA).

4. Cell lines and transfection

HEK 293T cells were grown in 12-well dishes using D-MEM medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin sulphate. Cells grown to 75% confluence were routinely transfected using 1 mg/ml lipofectamine. Culture medium and cell lysate were tested for the presence of ZP4 by western-blot analysis. Transfected cells were analyzed by confocal microscopy and flow cytometry analysis.

5. Analysis of glycosylation

For deglycosylation studies, the extracts were incubated at 37°C for different times in the presence of 15 mU of N-glycosidase F (Roche, Mannheim, Germany) in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 mM EDTA and 0.1% SDS. Samples

were heated at 95°C, 5 min prior to incubation at 37°C and followed by western-blotting analysis. In glycosylation inhibition assays the cells were incubated with 5 µg/ml tunicamycin (Sigma-Aldrich, Spain) for 21 h prior analysis by western blot of cell lysates.

6. SDS-PAGE and Western-blot

Electrophoresis and Western blotting were performed in 10% acrylamide gels, under reducing conditions. Direct Western blot was performed with supernatants and extracts of cells expressing ZP4-FLAG. Blots were probed with anti-FLAG M2 monoclonal antibody peroxidase conjugated (Sigma) at a final dilution of 1:5000 overnight in PBS-T and stained with a chemiluminescent substrate (Amersham).

7. Flow cytometry analysis

Approximately 0.5×10^6 HEK 293T cells/well transiently expressing the FLAG epitope-labeled ZP4 construct were incubated in a final volume of 100 µl with the anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) at 1:25 dilution, for 30 min on ice. Cells were washed twice (2% fetal calf serum, 0.01% NaN₃ in PBS), and further incubated with a phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, at a final dilution of 1:50, for 30 min at 4°C. Cells were washed three times, resuspended in 500 µl 0.4% paraformaldehyde in PBS and analyzed in a Becton Dickinson FACScan system.

8. Confocal microscopy

Cells grown on coverslips were transfected with the ZP4-FLAG construct. In some experiments, cells were co-transfected with ZP4-FLAG and EGFP-Rab1. In permeabilized assays the procedures were performed at room temperature and in non-permeabilized assays the procedures were performed at 4 °C. 24 h after transfection cells were washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS

for 10 min. After that, cells were incubated 20 min in 20mM glycine in PBS. Cells were permeabilized with 0.5% Igepal for intracellular localization of the protein. Cells were then labelled with a primary antibody (30 min incubation), washed with PBS-BSA 2% and followed by a secondary antibody (30 min). After washing, samples were mounted by standard procedures using a mounting medium from DakoCytomation (Carpinteria, USA) and examined with a Leica laser scanning confocal microscope.

9. Proteomic analysis

Hamster ZP was partially isolated from ovarian homogenate as previously reported (Jiménez-Movilla *et al.*, 2009). The ovaries were homogenized and centrifuged. The pellet was washed and heat solubilized at 65°C for 45 min. The supernatant containing the ZP glycoproteins was recovered.

The samples were separated by SDS/PAGE under reducing conditions and the gel was silver stained. Gel segments were reduced, alkylated and trypsinized.

The separation and analysis of the tryptic digestions of the samples were performed by MALDI-TOF peptide mass finger printing and LC-ESI-MS-MS.

9.1 HPLC-MS analysis

The analysis was carried out on a HPLC-MS system consisting of an Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a μ -wellplate autosampler and a capillary pump, and connected to an Agilent Ion-Trap XCT Plus mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an electrospray (ESI) interface.

9.2 MALDI-TOF MS analysis

Experiments were carried out on a Voyager-DE STR Biospectrometry workstation (Applied Biosystems), equipped with a N₂ laser (337 nm). Samples were measured in reflectron mode to identify molecular formulas based on precise mass measurements. External calibrations of the spectrometer were performed with standard peptides from the Sequazyme Peptide Mass Standards Kit (PerSeptive Biosystems). Recorded data were processed with Data Explorer Software (Applied Biosystems).

10. *In Situ* Hybridization

10.1 Processing of ovaries for histological studies

Fresh ovaries were obtained and fixed at 4°C in 4% paraformaldehyde overnight, dehydrated, and embedded in paraplast wax. Tissue sections (5 µm) were placed on Superfrost Plus microscope slides (Menzel, Braunschweig, Germany), dried at 37°C for 7 days.

10.2 RNA probes and labelling

Total RNA from hamster ovaries was isolated and cDNA was synthesized as described previously (sections 1 and 2). Antisense and sense *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* DNA were amplified from total hamster ovary cDNA by PCR. The amplified products (approximately 500 pb) were subcloned into pCR[®]2.1-TOPO vector (Invitrogen). The digoxigenin (DIG)-UTP labelling probes were generated from *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* linearized plasmids according to the manufacturer's instructions (Boehringer, Mannheim, Germany), using T7 promoter (located at downstream site of the pCR-2.1 multiple cloning site) in the presence of labelled NTPs.

10.3 *In situ* hybridization (ISH) procedure

Tissue sections were deparaffined in xylene, rehydrated through a descending ethanol series, washed in PBS and incubated twice in PBS containing 0.1% of Tween 20 (PBT) for a further 10 min at room temperature. Sections were treated with RNase-free proteinase K (10 µg/ml) for 3 min, washed twice with PBT for 5 min each and postfixed with 4% PFA in PBS for 20 min at room temperature. After several washes with PBT, slides were prehybridized for 1 h at 65°C in a hybridization buffer containing 50% formamide, 1X Denhardt's solution, 4X SSC, 10% dextran sulphate and 500 µg/ml yeast tRNA. The DIG labelled riboprobes were diluted with this buffer to a concentration of 2µg /ml, denaturalized 5 min at 80°C, placed on ice and incubated with the sections overnight at 65°C in a humidified chamber. The slides were washed in 50% formamide/4x SSC twice for 30 min at 65°C and once more at room temperature. Sections were blocked in MABT containing 10% goat serum for 1 h at room temperature and incubated with anti-DIG alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody (Roche) (1:1000) in blocking solution overnight at 4°C. The slides were washed several times in TBS-Tween 20 at room temperature and then in detection buffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂ and 0.1% Tween 20). For staining, NBT/BCIP were used as chromogenic alkaline phosphatase substrates. The incubation of slides with the colour reagent was carried out until sufficient colour develops. The colour reaction was stopped by rinsing the slides two times in PBS-T. After a postfixation with 4% PFA, the sections were stained with neutral red and mounted with DAKO mounting medium (DAKO Cytomation). Images were obtained with a Zeiss Axiophot microscope with a digital camera (Leica DC 500).

11. Phylogenetic analysis of hamster ZP4

11.1 Genomic DNA extraction and sequencing

A total of 25 species of subfamily Murinae were included in this study. *Mesocricetus auratus* was used as an outgroup (subfamily Cricetinae). Total genomic DNA was extracted from tissues preserved in ethanol using a QiaAmp extraction kit (Qiagen) following manufacturer's recommendations. Primers were designed using

conserved regions of *ZP4* in *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. PCR amplifications were carried out on a T3 Thermocycler (Biometra). When necessary, the amplicons were excised from the agarose gels and then purified with an Amicon Ultrafree-DNA column (Millipore) according to the manufacturer's protocol. The PCR products were then sent to "Genome Express" to be sequenced and the electropherograms were analyzed with Sequencher. The sequences were manually aligned with Seaview (Galtier *et al.*, 1996). The intronic portion of the genomic sequences was removed before the translation of the nucleotides in amino acids in order to check for the presence of stop codons in the sequences.

11.2 RNA extraction and sequencing

Total RNA was extracted from the ovaries of *Nannomys* and *Coelomys* preserved in RNAlater (Ambion) and the cDNA was obtained as described above. PCR were then performed with specific primers and the PCR products were purified and sequenced.

RESULTS AND DISCUSSION

1. COMPOSITION OF HAMSTER ZONA PELLUCIDA

The zona pellucida (ZP) is an extracellular glycoprotein matrix that surrounds all mammalian oocytes. Recent data have shown the presence of four glycoproteins (ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4) in the human and rat ZP rather than the three glycoproteins proposed in the mouse model. In the hamster (*Mesocricetus auratus*), it was previously described that ZP was composed by three different glycoproteins, called ZP1, ZP2, and ZP3, although only ZP2 and ZP3 have been cloned thus far (Koyama *et al.*, 2005, Kinloch *et al.*, 2002).

In our study we present the first evidence for the existence of four glycoproteins in hamster ZP: ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4. We obtained a full-length cDNA for hamster *ZP1* and *ZP4*. The analysis of the sequences indicated that these

are complete coding regions: they have an ORF, an initiation codon and a stop codon. The 3'-UTR regions include a polyadenylation signal. A computer homology search with the GenBank database revealed significant homology of the ZP1 and ZP4 sequences with the ZP glycoproteins reported in other mammalian species, including human. The basic structure of the new proteins is similar to the other ZP glycoproteins previously described, with the highest degree of homology in the so-called ZP domains. ZP proteins from different species share these conserved motifs and domains, showing a similar predicted folding with a central ZP domain. The presence of a signal peptide, trefoil domain and transmembrane domain is also ubiquitous. The conservation of a C-terminal consensus furin cleavage site and the transmembrane domain in different mammalian ZP proteins may reflect the constitutive secretory pathway involved in their biosynthesis.

Peptides of the four hamster mature proteins (ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4) were detected by means of peptide mass finger printing and MS-MS analyses, confirming for the first time that the four distinct genes are effectively expressed, as already seen in human and rat ZP also using proteomics approaches. The similar composition (four proteins) of hamster and human ZP make the hamster a good model for analyzing the structure and function of human ZP.

2. EXPRESSION PATTERN OF ZP1, ZP2, ZP3 AND ZP4 IN HAMSTER OVARY

Controversy exists about the cellular type responsible for the synthesis of the ZP and several models have been proposed. Depending on the species, ZP proteins are expressed in the oocyte, in follicular cells or in both. Thus, in the mouse and rat follicle, ZP synthesis is confined solely to the oocyte (Epifano *et al.*, 1995; Sinowatz *et al.*, 2001; El Mestrah *et al.*, 2002; Scobie *et al.*, 1999), while in other mammals studied ZP protein expression has also been reported to occur in follicle cells (Sinowatz *et al.*, 2001). In the canine ovary, the oocyte is responsible for the synthesis of ZP2 protein and the granulosa cells are responsible for the synthesis of ZP4 and ZP3 proteins (Blackmore *et al.*, 2004). In the marmoset monkey (*Callithrix*

jacchus) ovary ZP2, ZP3 and ZP4 proteins are biosynthesised both in the oocytes and in the follicle cells of different follicle stages (Bogner *et al.*, 2004). In cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), the contribution of granulosa cells to the expression of ZP genes has been demonstrated by Martinez *et al.*, (1996). ZP2 and ZP3 mRNA was localized in granulosa cells, whereas ZP4 has been localized only in the oocyte. The horse is another example of cooperation between oocyte and follicular cells. ZP4 and ZP3 expression starts in the oocyte of the late primordial and primary follicle. In the secondary follicle, both the oocyte and the cumulus cells contribute to ZP4 and ZP3 synthesis. In the tertiary follicle the oocyte prevents ZP4 and ZP3 production while the cumulus cells continue their synthesis (Kölle *et al.*, 2007).

In human, the precise site of ZP protein synthesis remains controversial. Some authors report that the cell type responsible is exclusively the oocyte (Bousquet *et al.*, 1981; Eberspaecher *et al.*, 2001) and other studies suggest a participation of both oocyte and granulosa cells (Hinsch *et al.*, 1994; Lee and Dunbar, 1993).

In contrast, studies in the domestic cat suggest that the ZP is produced exclusively by granulosa cells, not by oocytes, and that the synthesis of ZP takes place at every stage during follicular development (Jewgenow and Fickel, 1999).

In the present study, the expression of ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 was analyzed by *in situ* hybridization (ISH) in hamster ovaries. The results of our ISH study suggest that the expression of ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 is exclusively restricted to the oocyte. More particularly, primordial and small primary follicles revealed strong labelling. In addition, the ZP signal decreases as the ovarian follicle matures. Accordingly, the signal was very weak or absent in the later developmental stage of ovarian follicles (Graafian follicle). On the other hand, ZP gene expression was absent in the granulosa cell population. These results agree with the expression pattern observed in phylogenetically related species (mouse and rat).

3. EXPRESSION OF HAMSTER ZP4 IN HEK 293T CELLS

In our study the HEK 293T cell line was used as heterologous cells to study the expression and the secretory pathway followed by hamster ZP4. The flow-cytometric analysis showed that the protein is present at plasma membrane level. Analysis by confocal microscopy detected the recombinant ZP4 in the plasma membrane and demonstrated that ZP4 is trafficked from the endoplasmic reticulum to the cell surface in the same way as other ZP proteins (Litscher *et al.*, 1999; Kiefer and Saling, 2002). No protein was detected in the supernatant. The reason for this remains unclear but it agrees with the results obtained by other authors in previous works with recombinant proteins of the ZPB family (ZP1 and ZP4) (Harris *et al.*, 1999;; Tsubamoto *et al.*, 1999; Martic *et al.*, 2004; Caballero-Campo *et al.*, 2006). For example, HEK 293T cells were used to produce human ZP1, ZP2 and ZP3 (Martic *et al.*, 2004). The proteins were detected by SDS-PAGE and Western-blot in the cell lysate and supernatant. ZP2 and ZP3 were secreted to the supernatant although ZP1 was only detected in the cell lysate. Curiously, when the three proteins were coexpressed, ZP1 was secreted to the supernatant very likely due to a potential protein-protein interaction from early stages of the secretory pathway followed by these proteins in their way to the plasma membrane.

In addition, the putative furin proteolytic processing signal is altered in human ZP1. Furin, the enzyme responsible for this cleavage, prefers the consensus site R-X-K/R-R. These sequences are present in human ZP2 and ZP3. However ZP1 has S-R-R-R. It is possible that the furin does not recognize this sequence and that the protein remain anchored to the membrane.

Also, all the proteins belonging to the ZPB family have a cysteine rich region called the trefoil domain. It has been demonstrated that several proteins with this domain are highly resistant to enzymatic degradation (McLeskey *et al.*, 1998).

Similar results were also observed in porcine model (Tsubamoto *et al.*, 1999). In this study, porcine ZP4 protein is expressed in several cell lines. This protein was

not secreted even when the transmembrane domain was removed. Since porcine and hamster ZP4 has a typically putative furin cleavage site, the principal cause that prevents the secretion of these proteins could be the presence of a trefoil domain.

Future studies of coexpression of the four proteins of hamster ZP are necessary to obtain new data about the secretory pathway of the proteins. In addition, the production of a recombinant ZP4 could be a useful tool for functionality studies including the induction of acrosome reaction, sperm binding, etc.

4. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ZP4 INSIDE THE MURINAE SUBFAMILY.

The ZP coat has been described for various species and has been shown to be composed of 3-6 or more glycoproteins depending on the species (Bleil and Wassarman, 1980; Hedrick and Wardrip, 1987; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Goudet *et al.*, 2008). The ZP genes can be classified into six subfamilies: *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPD* and *ZPAX*. Mammals show two models of ZP composition: (1) formed by four glycoproteins: *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* (human, rat) (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005) or (2) formed by three glycoproteins. In the second model there are two possibilities: it may be formed by *ZP1*, *ZP2* and *ZP3* (mouse) (Bleil and Wassarman, 1980) or *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* (cow, cat, dog, and pig); (Hedrick and Wardrip, 1987, Goudet *et al.*, 2008,). In non-mammalian species, more than four genes have been detected; for example, in chicken genome (Monget *et al.*, 2008; Bausek *et al.*, 2000) six genes are present (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPAX*, *ZPD*) and in *Xenopus* genome there are five genes coding for ZP proteins (*ZP2*, *ZP3*, *ZP4*, *ZPD*, *ZPAX*) (Goudet *et al.*, 2008). The presence of the different models in ZP depending on the species can be explained by means of phylogenetic analysis, which points to duplication and gene death events. In several mammal species the presence of *ZP1*, *ZP4*, *ZPD* and/or *ZPAX* is lacking (Lefièvre *et al.*, 2004; Goudet *et al.*, 2008).

Our study focused on ZP4 evolution in several species of the subfamily Murinae and demonstrated that the composition of four ZP glycoproteins is more common than previously thought. Within this subfamily, the ZP4 gene has been found to be expressed in the oocytes of the laboratory rat (*Rattus norvegicus*, ‘the rat’), but there is no evidence that a functional ZP4 gene exists in mouse (Lefièvre *et al.*, 2004; Conner *et al.* 2005). Although ZP4 is transcribed in *Mus musculus* oocytes, it lacks a protein product due the presence of several stop codons in its ORF (Evsikov *et al.*, 2008; Lefièvre *et al.*, 2004). Therefore, the *Mus musculus* ZP is only formed by three glycoproteins (ZP1, ZP2 and ZP3) and ZP4 has been identified as a pseudogene in the *Mus musculus* genome. The active form of ZP4 was probably lost after *Mus* diverged from its common ancestor with *Rattus*. The results of this study show that the pseudogenization of ZP4 in mice happened around 4 million years ago, affecting only the subgenus *Mus*. This study opens the door for future research into the effects of ZP4 on the structure and function of murine ZP and its possible implication in the reproductive isolation of divergent species.

CONCLUSIONS

1. cDNAs encoding ZP1 and ZP4 have been obtained in hamster (*Mesocricetus auratus*) ovaries.

2. cDNA encoding ZP4 has been cloned into a expression vector to study its expression in a heterologous system. The ZP4 protein was detected in cell lysate and it has been characterized by means of SDS-PAGE and Western-blot. This protein has a molecular weight of 75 kDa which agrees with the theoretical weight of the protein and the sugar chains acquired after post-translational modifications in the immature protein.

Flow cytometry and confocal microscopy analysis detected the recombinant ZP4 at plasma membrane level, showing that ZP4 trafficking from the endoplasmic reticulum to the cell surface occurred in a similar way as other ZP proteins previously described.

3. The comparative analysis of the nucleotide and amino acid sequences of ZP1 and ZP4 reveal a high degree of similarity with ZP glycoproteins of other mammals. This analysis reveals the presence of common protein domains such as: signal peptide, trefoil domain, ZP domain, transmembrane domain, and consensus furin cleavage site.

4. The mRNA of *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* encodes for proteins as confirmed by the detection of several peptides belonging to the four proteins (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4*) using mass spectrometry.

5. The expression of *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* is exclusively restricted to the oocyte. *ZP* gene expression was absent in the granulosa cell population. Primordial and small primary follicles revealed strong labelling. *ZP* signal decreased as the ovarian follicle matures. Accordingly, the signal was very weak or absent in the later developmental stage of ovarian follicles (Graafian follicle).

6. The phylogenetic analysis of *ZP4* in subfamily Murinae revealed that the pseudogenization of *ZP4* in mice happened around 4 million years ago, affecting only the subgenus *Mus*.

X. BIBLIOGRAFÍA

Ahuja KK, Bolwell GP. Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona. *J Reprod Fertil* 1983; 69:49-55.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EV, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410.

Amari S, Yonezawa N, Mitsui S, Katsumata T, Hamano S, Kuwayama M, Hashimoto Y, Suzuki A, Takeda Y, Nakano M. Essential Role of the nonreducing terminal α -mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 221-226.

Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol.* 1976; 71: 680-686.

Araki Y, Orgebin-Crist MC, Tulsiani DR. Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates. *Biol Reprod.* 1992; 46: 912-919.

Avilés M, Okinaga T, Shur BD, Ballesta J. Diferential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 296-308.

Barisone GA, Krapf D, Correa-Fiz F, Arranz SE, Cabada MO. Glycoproteins of the vitelline envelope of Amphibian oocyte: biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum*. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 629-640.

Bausek N, Waclawek M, Wolfgang JS, Wohlrab F. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2000; 275: 28866-28872.

Bauskin AR, Franken DR, Eberspaecher U, Donner P. Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:534-540.

Begun DJ, Whitley P, Todd BL, Waldrip-Dail HM, Clark AG. Molecular population genetics of male accessory gland proteins in *Drosophila*. *Genetics.* 2000; 156:1879-1888.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; 16; 340:783-795.

Benoff S. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 599-637.

Berg AH, Westerlund L, Olson PE. Regulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) egg shell proteins and vitellogenin during reproduction and in response to 17 β -estradiol and cortisol. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135:276-285.

Berlin S, Smith NG. Testing for adaptative evolution of the female reproductive protein ZPC in mammals, birds and fishes reveals problems with the M7-M8 likelihood ratio test. *BMC Evol Biol* 2005; 5:226-233

Berlin S, Qu L, Ellegren H. Adaptive evolution of gamete-recognition proteins in birds. *J Mol Evol.* 2008; 67(5):488-496.

Birkhead TR, Pizzari T. Postcopulatory sexual selection. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(4):262-73

Blackmore DG, Baillie LR, Holt JE, Dierkx L, Aitken RJ, McLaughlin EA. Biosynthesis of the Canine Zona Pellucida Requires the Integrated Participation of Both Oocytes and Granulosa Cells. *Biol Reprod* 2004; 71:661-668.

Bleil JD, Wassarman PM (a). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 1980; 76:185-202.

Bleil JD, Wassarman PM (b). Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:1029-1033.

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* 1988; 128:376-385.

Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E. Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 481-488.

Boja ES, Hoodbhoy T, Fales HM, Dean J. Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *J Biol Chem* 2003; 278: 34189-34202.

Boja ES, Hoodbhoy T, Garfield M, Fales HM. Structural conservation of mouse and rat zona pellucida glycoproteins. Probing the native rat zona pellucida proteome by mass spectrometry. *Biochemistry.* 2005; 44:16445-16460.

Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J, Chapman VM, Moriwaki K, Nevo E, Thaler L. Biochemical diversity and evolution in the genus *Mus*. *Biochem Genet.* 1984 Apr;22(3-4): 275-303. Review

Bonsignorio D, Perego L, Del Giacco L, Cotelli F. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote.* 1996; 4:101-108.

Bork PC, Sander. A large domain common to sperm receptors (ZP2 and ZP3) and TGF- β type III receptor. *Fed Eur Biochem Soc* 1992; 300:237-240.

Bousquet D, Leveille MC, Roberts KD, Chapdelaine A, Bleau G. The cellular origin of the zona pellucida antigen in the human and hamster. *J Exp Zool* 1981; 215: 215-218.

Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, González-González ME, Galicia-Chavarría M, Larrea F, Gerton GL. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod* 2006; 74:760-768.

Canipari R. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 1994; 2:343-345.

Chang YS, Hsu CC, Wang SC, Tsao CC, Huang FL. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP2 gene. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:258-267.

Chapman NR, Barratt CLR. The role of carbohydrates in spermatozoa–zona pellucida adhesion. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:767–774.

Chevret P, Jenkins P, Catzefflis F. Evolutionary systematics of the Indian mouse *Mus famulus* Bonhote 1898: molecular (DNA/DNA hybridization and 12S rRNA sequences) and morphological evidences. *Zool J Linn Soc* 2003; 137:385-401.

Chiu PC, Wong BS, Chung MK, Lam KK, Pang RT, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WS. Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2008a; 79:869-877.

Chiu PC, Wong BS, Lee CL, Pang RT, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WS. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Hum Reprod.* 2008b; 23:1385-1393.

Civetta A, Singh RS. High divergence of reproductive tract proteins and their association with postzygotic reproductive isolation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* group species. *J Mol Evol.* 1995; 41:1085-1095.

Clark GF, Dell A. Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem.* 2006;281:13853-13856

Conner SJ, Lefièvre L, Hughes DC, Barratt CL. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod.* 2005; 20(5):1148-52

Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, Romar R, Grullón L, Matás C, Avilés M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:15809-15814.

Darie C.C., Binossek M.L., Jovine L., Litscher E.S. and Wassarman P.M. Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry. *Biochemistry* 2004; 43,7459-7478.

Darie C.C., Binossek M.L., Gawinowicz M.A., Milgrom Y., Thumfart J.O., Jovine L., Litscher E.S. and Wassarman P.M. Mass spectrophotometric evidence that proteolytic processing of rainbow trout vitelline envelope proteins takes place on the egg. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 37585-37598.

Dean J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J Reprod Immunol* 2002; 53(1-2):171-180.

Dean J. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* 2004; 26:29-38.

Del Giacco L, Vanoni C, Bonsignorio D, Duga S, Mosconi G, Santucci A, Cotelli F. Identification and spatial distribution of the mRNA encoding the gp49 component of the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, egg envelope. *Mol Reprod Dev* 1998;49(1): 58-69.

Del Giacco L, Diani S, Cotelli F. Identification and spatial distribution of the mRNA encoding an egg envelope component of the Cyprinid zebrafish, *Danio rerio*, homologous to the mammalian ZP3 (ZPC). *Dev Genes Evol* 2000; 210:41-46.

Dell A, Morris HR, Easton RL, Patankar M, Clark GF. The glycobiochemistry of gametes and fertilization. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1473:196-205.

Denker HW. Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells Tissues Organs.* 2000; 166:180-207.

Doren S, Landsberger N, Dwyer N, Gold L, Blanchette-Mackie J, Dean J. Incorporation of mouse zona pellucida proteins into envelope of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Genes* 1999; 209:33-339.

Ducker P, Brunak S, Blom N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17:107-112.

Dunbar BS, Wolgemuth DJ. Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. In *Modern Cell Biology* 1984; Volumen 3. B.H. Satir (ed.) New York: Alan R. Liss, Inc. 77-111.

Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod Fert Dev* 1994; 6:331-347.

Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P. Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res* 2001; 303:277-287.

El Mestrah M, Castle PE, Borossa G, Kan FW. Subcellular distribution of ZP1, ZP2, and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. *Biol Reprod* 2002; 66:866-876.

Epifano O, Dean J. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6:319-330.

Epifano O, Liang LF, Familiari M, Moos MC Jr, Dean J. Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* 1995; 121:1947-1956.

Eppig JJ. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev Biol* 1977;15;60:371-388.

Erickson GF, Shimasaki S. The role of oocyte in folliculogenesis. *Endocrinol* 2000; 11: 193-198.

Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, Hampl A, Holbrook AE, Singh P, Eppig JJ, Solter D, Knowles BB. Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes dev* 2006; 1;20 (19): 2713-27

Familiari, G., S.A. Nottola, G. Macchiarelli, G. Micara, C. Aragona, P.M. Motta (1992). Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 51-61.

Fléchon JE, Pavlok A, Kopecný V. Dynamics of zona pellucida formation by the mouse oocyte. An autoradiographic study. *Biol Cell.* 1984;51:403-406.

Florman HM, Wassarman PM. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell.* 1985 May;41:313-324.

Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 1999; 151: 1531-1545.

Fujita T, Shimizu M, Hiramatsu N, Fukada H, Hara A. Purification of serum precursor proteins to vitelline envelope (choriogenins) in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002;132:599.

Fujita T, Fukada H, Shimizu M, Hiramatsu N, Hara A. Quantification of serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) and vitellogenin in

estrogen treated masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 136:49-57.

Fujita T, Fukada H, Shimizu M, Hiramatsu N, Hara A. Molecular cloning and characterization of three distinct choriogenins in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Mol Reprod Dev* 2008; 22.

Galindo BE, Vacquier VD, Swanson WJ. Positive selection in the egg receptor for abalone sperm lysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 15;100(8):4639-4643

Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci.* 1996; 12:543-548.

Ganguly A, Sharma RK, Gupta SK. Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 2008.75(1):156-166

Gomendio M, Malo AF, Garde J, Roldan ER. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction.* 2007; 134(1):19-29. Review.

Gomendio M, Roldan ER. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int J Dev Biol.* 2008; 52(5-6):439-47. Review.

Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum Reprod.* 2008 Feb;23:394-402.

Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod.* 2008 May;78:796-806.

Green DP. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod.* 1997;2:147-156.

Greve JM, Wassarman PM. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* 1985; 181,253±264.

Grootenhuis AJ, Philipson HL, de Breet-Grijsbach JT, van Duin M. Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J Reprod Fertil Suppl.* 1996; 50:43-54.

Guindon S, Gascuel O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 2003 52:696–704.

Gupta SK, Yurewicz EC, Sacco AG, Kaul R, Jethanandani P, Govind CK. Human zona pellucida glycoproteins: characterization using antibodies against

recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3. *Mol Hum Reprod.* 1998;4:1058-1064.

Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosilation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput* 2002; 310-322.

Haddad A, Nagai ME. Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. *Cell Tissue Res.* 1977 15; 177: 347-369

Hamazaki TS, Nagahama Y, Iuchi I, Yamagami K. A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*. *Dev Biol* 1989; 133:101-110.

Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S. NetOglyc: Prediction of mucin type O-glycosilation sites based on sequence context and surface accesibility. *Glycoconj J* 1998; 15: 115-130.

Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA. Seq* 1994; 4: 361-393.

Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, Liu HF. Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr Purif.* 1999;16:298-307.

Hedrick JL, Wardrip NJ. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev Biol* 1987; 121:478-488.

Herrler A, Beier HM. Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs.* 2000;166:233-246.

Higgins DG, Sharp PM. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 1988 15;73:237-244.

Hinsch KD, Hinsch E, Meinecke B, Topfer-Petersen E, Pfisterer S, Schill WB. Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. *Biol Reprod* 1994; 51: 193-204.

Hyllner SJ, Haux C. Immunochemical detection of the major vitelline envelope proteins in the plasma and oocytes of the maturing female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Endocrinol.* 1992; 135:303-309.

Hyllner SJ, Norberg B, Haux C. Isolation, Partial Characterization, Induction, and the Occurrence in Plasma of the Major Vitelline Envelope Proteins in the Atlantic Halibut (*Hippoglossus-Hippoglossus*) During Sexual-Maturation *Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences.* 1994; 51: 1700-1707.

Hyllner SJ, Fernández-Palacios Barber H, Larsson DG, Haux C. Amino acid composition and endocrine control of vitelline envelope proteins in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 339-347.

Hyllner SJ, Westerlund L, Olsson PE, Schopen A. Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. *Biol Reprod.* 2001 Mar;64:805-811.

Hoodbhoy T, Dean J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reprod Fert* 2004; 127: 417-422.

Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem* 2005; 280: 12721-12731.

Hoodbhoy T, Avilés M, Baibakov B, Epifano O, Jiménez- Movilla M, Gauthier L, Dean J. ZP2 and ZP3 traffic independently within oocytes prior to assembly into the extracellular zona pellucida. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 7991-7998.

Hughes, DC, Barratt CL. Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim Biophys Acta* 1999; 1447: 303-306.

Hurles M. Gene duplication: the genomic trade in spare parts. *PLoS Biol* 2004; 2: E206.

Ikeda K, Yonezawa N, Naoi K, Katsumata T, Hamano S, Nakano M. Localization of N-linked carbohydrate chains in glycoprotein ZPA of the bovine egg zona pellucida. *Eur J Biochem* 2002; 269, 4257-4266.

Izquierdo-Rico MJ, Jimenez-Movilla M, Llop E, Perez-Oliva AB, Ballesta J, Gutierrez-Gallego R, Jimenez-Cervantes C, Aviles M. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *J Proteome Res.* 2009 Feb; 8:926-41.

Jansa SA, Lundrigan BL, Tucker PK. Test for positive selection on immune and reproductive genes in closely related species of the murine genus *mus*. *J Mol Evol* 2003; 56(3): 294-307

Jewgenow K and Fickel J. Sequential Expression of Zona Pellucida Protein Genes during the Oogenesis of Domestic Cats *Biol Reprod* 1999; 60, 522-526.

Jewgenow K, Rudolph M. Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats: an ultrastructural immunohistological investigation. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001; 57:23-29

Jiménez-Movilla M, Martínez-Alonso E, Castells MT, Izquierdo-Rico MJ, Saavedra MD, Gutiérrez-Gallego R, Fayrer-Hosken R, Ballesta J and Avilés M

Cytochemical and biochemical evidences for a complex tridimensional structure of the hamster zona pellucida. *Histol Histopathol.* 2009

Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol* 2002 4: 457-461.

Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM. Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74:83-114.

Kanai S, Yonezawa N, Ishii Y, Tanakura M, Nakano M. Recombinant bovine zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4 coexpressed in Sf9 cells form a sperm-binding active hetero-complex. *FEBS Journal* 2007; 274, 5390-5405.

Kanai S, Kitayama T, Yonezawa N, Sawano Y, Tanokura M, Nakano M. Disulfide linkage patterns of pig zona pellucida glycoproteins ZP3 y ZP4. *Mol Reprod dev* 2008; 75 (5): 847-56

Kanamori A, Naruse K, Mitani H, Shima A, Hori H. Genomic organization of ZP domain containing egg envelope genes in medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 2003; 13;305:35-45.

Kang YH. Development of the zona pellucida in the rat oocyte. *Am J Anat* 1974; 139:535-565.

Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod.* 1997;12:1250-1252.

Kiefer SM, Saling P. Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol Reprod* 2002; 66: 407-14.

Kimura J, Sato K, Okano M, Tsukise A. Localization of ZP3 mRNA in mouse ovary by non-radioactive in situ hybridization with digoxigenin-labelled cDNA. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1994 Dec;40:1097-1101.

Kinloch RA, Ruiz-Seiler B, Wassarman PM. Genomic organization and polypeptide primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor. *Dev Biol* 1990; 142:414-421.

Kipersztok S, Osawa GA, Liang LF, Modi WS, Dean J. POM-ZP3, a bipartite transcript derived from human ZP3 and a POM121 homologue. *Genomics* 1995;25 354-359.

Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Totzauer I, Amselgruber W, Plendl J. Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem J* 1996; 28: 441-447.

Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G. Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 435-443.

Kölle S, Dubois CS, Caillaud M, Lahuec C, Sinowatz F, Goudet G. Equine zona protein synthesis and zp structure during folliculogenesis oocyte maturation, and embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:851-859

Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol.* 1991; 115:887-903.

Krogh A, Larsson B, von HG, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001; 305:567-580

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157(1):105-132

Lazzari G, Galli C, Moor RM. Functional-changes in the somatic and germinal compartments during follicle growth in pigs. *Anim Reprod Sci* 1994; 35: 119-130.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Lecompte E, Aplin K, Denys C, Catzeffis F, Chades M, Chevret P. Phylogeny and biogeography of African Murinae based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with a new tribal classification of the subfamily BMC *Evol Biol.* 2008; 10;8:199.

Lee VH, Dunbar BS. Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; 155: 371-382.

Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CLR. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 1580-1586.

Liang L, Soyal SM, Dean J. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 1997; 124, 4939-4947.

Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000; 16: 19-49.

- Litscher ES, Qi H, Wassarman PM.** Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry* 1999; 38:12280–12287.
- Litscher ES, Wassarman PM.** Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol.* 2007;22:337-347
- Lundrigan BL, Jansa SA, Tucker PK.** Phylogenetic relationships in the genus, based on paternally, maternally and biparentally inherited characters. *Syst Biol* 2002; 51(3):410-31.
- Lyng R, Shur BD.** Sperm-egg binding requires a multiplicity of receptor-ligand interactions: new insights into the nature of gamete receptors derived from reproductive tract secretions. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:335-351.
- Lyon JD, Vacquier VD.** Interspecies chimeric sperm lysins identify regions mediating species-specific recognition of the abalone egg vitelline envelope. *Dev Biol.* 1999; 1;214(1):151-159
- Lyons CE, Payette KL, Price JL, Huang RC.** Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene. *J Biol Chem* 1993; 5;268(28):21351-21358.
- Martic M, Moses EK, Adams TE, Liu DY, Gook DA, Garrett C, Dunlop ME, Baker GH.** Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J Androl.* 2004; 6(1):3-13.
- Martín-Coello J, Benavent-Corai J, Roldan ER, Gomendio M.** Sperm competition promotes asymmetries in reproductive barriers between closely related species. *Evolution.* 2009 63(3):613-23.
- Martinez ML, Fontenot GK, Harris JD.** The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 1996; 50:35-41.
- Marshall, J.T.** Taxonomy. In: Foster, H.L., Small, J.D., Fox, J.G. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research*, 1. Academic Press, New York, 1981 pp. 17–26.
- McGee EA, Hsueh AJ.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-214.
- McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White R, Saling PM.** Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int Rev Cytol* 1998; 177:57-113.
- Millar SE, Lader E, Liang LF, Dean J.** Oocyte-specific factors bind a conserved upstream sequence required for mouse zona pellucida promoter activity. *Mol Cell Biol* 1991; 11(12):6197-6204.

Millar SE, Lader ES, Dean J. ZAP-1 DNA binding activity is first detected at the onset of zona pellucida gene expression in embryonic mouse oocytes. *Dev Biol* 1993; 158 (2):410-413.

Modig C, Modesto T, Canario A, Cerdà J, von Hofsten J, Olsson PE. Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod* 2006; 75(5):717-725.

Moller CC, Wassarman PM. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 1989; 132:103-112.

Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 1990; 137(2):276-286.

Monné M, Han L, Schwend T, Burendahl S, Jovine L. Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats. *Nature*.2008;456(7222):653-657.

Musser GG, Carleton MD. Superfamily Muroidea. In *Mammal species of the world A taxonomic and geographic reference. Volume 2. 3rd edition.* Edited by Wilson DE, Reeder DM. Baltimore: Johns Hopkins University; 2005: 894-1531.

Nakano M, Yonezawa N, Hatanaka Y, Noguchi S. Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl.* 1996;50:25-34.

Nicolson GL, Yanagimachi R, Yanagimachi H. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. *J Cell Biol.* 1975; 66(2):263-274.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 1997; 10:1-6.

Nixon B, Lu Q, Wassler MJ, Foote CI, Ensslin MA, Shur BD. Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cell Tissues Org* 2001; 168: 46-57.

Noguchi S, Nakano M. Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1158: 217-226.

Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M. Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1201(1). 7-14.

Oakberg EF, Tyrrell PD. Labeling the zona pellucida of the mouse oocyte. *Biol Reprod* 1975; 12(4):477-482.

Ohno S. *Evolution by Gene Duplication.* Berlin: Springer Verlag; 1970.

Oikawa T, Sendai Y, Kurata S and Yanahimachi R. A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res* 1988; 19, 113-122.

Oppen-Berntsen DO, Helvik JV, Walther BT. The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening. *Dev Biol.* 1990 Feb;137(2):258-65.

Oppen-Berntsen DO, Hyllner SJ, Haux C, Helvik JV, Walther BT. Eggshell zona radiata-proteins from cod (*Gadus morhua*): extra-ovarian origin and induction by estradiol-17 beta. *Int J Dev Biol.* 1992 ;36(2):247-54.

Ozgun K, Patankar MS, Oehninger S, Clark GF. Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 318-324.

Pedersen AG, Nielsen H. Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 1997;5:226-33.

Phillips DM, Shalgi RM. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J Ultrastruct* 1980. Res 72: 1-12

Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 56: 1193-1210.

Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 2002; 296: 2183-2185.

Qi H, Williams Z, Wassarman PM. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell* 2002; 13:530-541.

Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 1998, 125:2415-2424.

Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Develop* 1999 126: 3847-3855.

Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and

development. *Development* 2001 128: 1119-1126.

Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 2003; 5:33-43.

Ringuette, M.J., M.E. Chamberlin, A.W. Baur, D.A. Sobieski, J. Dean. Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida. *Dev Biol* 1988 127: 287-295.

Rowe KC, Reno ML, Richmond DM, Adkins RM, Steppan SJ. Pliocene colonization and adaptive radiations in Australia and New Guinea (Sahul): Multilocus systematics of the old endemic rodents (Muroidea: Murinae). 2008. *Mol Phylogenet Evol* 47:84-101.

Sasanami T, Pan J, Doi Y, Hisada M, Koshaka T, Toriyama M. Secretion of egg envelope protein ZPc after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells. *Eur J Biochem.* 2002;269(8):2223-2231.

Sasanami T, Pan J, Mori M. Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in vivo treatment with diethylstilbestrol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84:109-116.

Scobie GA, Kerr LE, MacDuff P, Aitken RJ. Cloning, sequencing and site of origin of the rat sperm receptor. *Zygote* 1999; 7:27-35.

Sebon, S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and somatic cells in follicular development: Lesson from In Vitro Culture. *J Reprod Dev* 2003; 49: 259-269.

Scapigliati G, Carcupino M, Taddei AR, Mazzini M. Characterization of the main egg envelope proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostea, Serranidae). *Mol Reprod Dev* 1994; 38 (1):48-53.

Scapigliati G, Meloni S, Mazzini M. A monoclonal antibody against chorion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): studies of chorion precursors and applicability in immunoassays. *Biol Reprod* 1999 ;60(4):783-789.

Schmell ED, Gulyas BJ. Mammalian sperm-egg recognition and binding in vitro. I. Specificity of sperm interactions with live and fixed eggs in homologous and heterologous inseminations of hamster, mouse, and guinea pig oocytes. *Biol Reprod* 1980; 23:1075-1085.

Shalgi R, Raz T. The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histo Histochem J* 1997;29:813-822.

- Singh RS, Kulathinal RJ.** Sex gene pool evolution and speciation: a new paradigm. *Genes Genet Syst.* 2000; 75(3):119-30
- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Totzauer I, Calvete J, Plendl J.** Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat Embryol (Berl).* 1995 Jan;191(1):41-46.
- Sinowatz F, Kolle S and Topfer-Petersen E.** Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 2001; 168, 24–35.
- Skinner SM, Dunbar BS.** Localization of a carbohydrate antigen associated with growing oocytes and ovarian surface epithelium. *J Histochem Cytochem* 1992 40: 1031-1036.
- Smith J, Paton IR, Hughes DC, Burt DW.** Isolation and mapping the chicken zona pellucida genes: an insight into the evolution of orthologous genes in different species. *Mol Reprod Dev* 2005; 70 (2) 133-145.
- Soyal SM, Amleh A, Dean J.** FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000;127(21):4645-4654.
- Spargo SC, Hope RM.** Evolution and nomenclature of zona pellucida gene family. *Biol Reprod* 2003; 68: 358-362.
- Sugiyama H, Murata K, Iuchi I, Nomura K, Yamagami K.** Formation of mature egg envelope subunit proteins from their precursors (choriogenins) in the fish, *Oryzias latipes*: loss of partial C-terminal sequences of the choriogenins. *J Biochem* 1999; 125: 469-475.
- Swann CA, Cooper SJ, Breed WG.** Molecular evolution of the carboxy terminal region of the zona pellucida 3 glycoprotein in murine rodents. *Reproduction.* 2007 Apr;133:697-708.
- Swanson WJ, Vacquier VD.** Extraordinary divergence and positive Darwinian selection in a fusagenic protein coating the acrosomal process of abalone spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:4957-4961.
- Swanson WJ, Vacquier VD.** Concerted evolution in an egg receptor for a rapidly evolving abalone sperm protein. *Science.* 1998; 281:710-712.
- Swanson WJ, Yang Z, Wolfner MF, Aquadro CF.** Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:2509-2514.
- Swanson WJ, Vacquier VD.** The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet.* 2002;3:137-44.

Takeuchi Y, Nishimura K, Aoki N, Adachi T, Sato C, Kitajima K, Matsuda T . A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian Zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. *Eur J Biochem* 1999; 260: 736-742.

Talbot P, Shur BD, Myles GD. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2003 68: 1-9.

Topper EK, Kruijt L, Calvete J, Mann K, Topfer-Petersen E, Woelders H. Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 344-350.

Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediate event. *Biol Reprod* 1997; 57: 487-494.

Turner LM, Hoekstra HE. Adaptive evolution of fertilization proteins within a genus: variation in ZP2 and ZP3 in deer mice (*Peromyscus*). *Mol Biol Evol* 2006; 23 (9): 1656-69.

Tsaur SC, Wu CI. Positive selection and the molecular evolution of a gene of male reproduction, *Acp26Aa* of *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 1997;14(5):544-549

Tsubamoto H, Yamasaki N, Hasegawa A, Koyama K. Expression of a recombinant porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 1999; 17: 8-15

Van Duin M, Polman JEM, Verkoelen CCEH, Bunschoten H, Meyerink JH, Olijve W, Aitken RJ. Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different frequency in the Caucasian and Japanese populations. *Genomics*, 1992; 14 1064-1070

Vanroose G, Nauwynck H, Soom AV, Ysebaert MT, Charlier G, Oostveldt PV, de Kruif A. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol Reprod.* 2000 Feb;62(2):463-469.

Velásquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jiménez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Avilés M, Coy P. Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev.* 2007 May;74(5):617-628.

Vo LH, Hedrick JL. Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod.* 2000;62(3):766-774.

Waclawek M, Foisner R, Nimpf J, Schneider WJ. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biol Reprod* 1998; 59: 1230-1239.

- Wang H, Gong Z.** Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 7;1446(1-2):156-160.
- Wassarman PM.** Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 1988 57: 415-442.
- Wassarman PM.** Profile of a mammalian sperm receptor. *Develop* 1990 108: 1-17.
- Wassarman PM, Mortillo S.** Structure of the mouse extracellular coat, the zona pellucida. *Int Rev Cytol* 1991 130: 85-110.
- Wassarman PM, Litscher ES.** Sperm--egg recognition mechanisms in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 1995;30:1-19.
- Wassarman PM, Liu C, Litscher ES.** Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J Cell Sci* 1996 109: 2001-2004.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES.** A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 2001; 3:E59-E64.
- Wassarman PM.** Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med* 2002; 69:148-155.
- Wassarman PM.** Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* 2005; 204(2):388-391.
- Wassarman PM, Litscher ES.** Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol.* 2008;52(5-6):665-676.
- Wassarman PM.** Zona pellucida glycoproteins. *J Biol Chem.* 2008 5;283(36):24285-24289.
- Westerlund L, Hyllner SJ, Schopen A, Olsson PE.** Expression of three vitelline envelope protein genes in arctic char. *Gen Comp Endocrinol* 2001. 122(1):78-87.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. *En physiology of reproduction* 1994, Knobil y Neil J (eds.). 189-317.
- Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M.** Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem* 2001; 268: 3587-3594.
- Yonezawa N, Nakano M.** Identification of the carboxyl termini of porcine zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 877-882.

Yonezawa N, Kudo K, Terauchi H, Kanai S, Yoda N, Tanokura M, Ito K, Miura K, Katsumata T, Nakano M. Recombinant porcine zona pellucida glycoproteins expressed in Sf9 cells bind to bovine sperm but not to porcine sperm. *J Biol Chem.* 2005 27; 280(21):20189-20196.

Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 1998 273: 7488-7494.

Zhao M, Gold L, Ginsberg AM, Liang LF, Dean J. Conserved furin cleavage site not essential for secretion and integration of ZP3 into the extracellular egg coat of transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(9):3111-3120

Zhao M, Gold L, Dorward H, Liang LF, Hoodbhoy T, Boja E, Fales HM, Dean J. Mutation of a conserved hydrophobic patch prevents incorporation of ZP3 into the zona pellucida surrounding mouse eggs. *Mol Cell Biol* 2003 23: 8982-8991.

XI. ANEXO

ADN

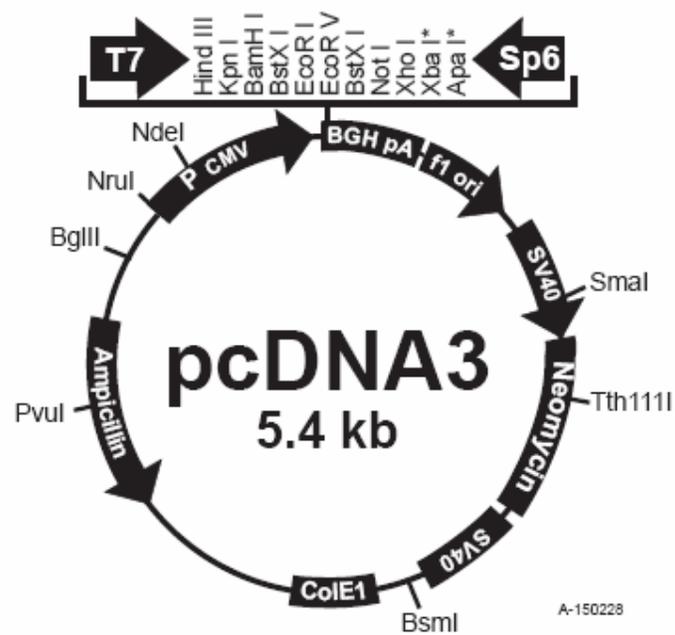
Tampón de carga de muestras (5x)

Ficoll 400	20 %
Azul de bromofenol	0,05 %
Azul xileno	0,05%
EDTA	50mM

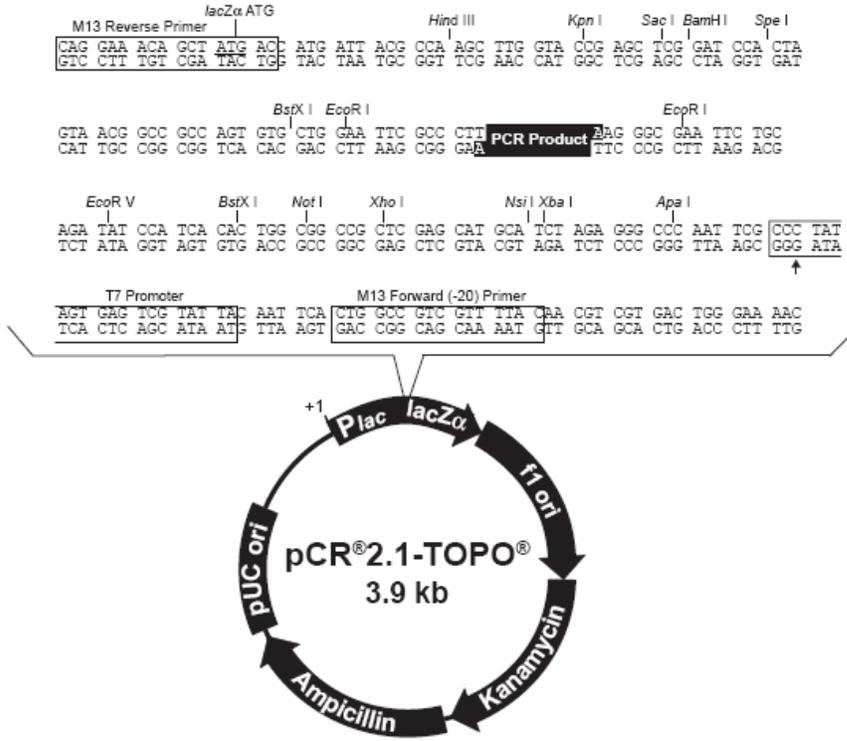
Tampón de recorrido de electroforesis (TAE)

Tris	40 mM
EDTA	1mM
Ácido acético	30 mM (0,175% v/v)

pcDNA 3.1



pCR[®]2.1-TOPO vector (Invitrogen)



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

SDS-PAGE

Preparación de geles para electroforesis.

Gel separador	Gel al 10% para 10ml	Gel a 12% para 10ml
Agua destilada	4 ml	3,34 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl	100 µl
Acrilamida-bis-acrilamida 30%	3,3 ml	3,96 ml
Persulfato amónico 10%	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Gel concentrador	Gel al 4% para 5ml
Agua destilada	3,05 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 10% (p/v)	50 µl
Acrilamida-bis-acrilamida 30%	0,65 ml
Persulfato amónico 10%	25 µl
TEMED	5 µl

Tampón de muestra (3x):

Tris HCl 0.18 M pH 6.8
 Glicerol 15%
 SDS 9%
 Azul de bromofenol 0.075%
 β-mercaptoetanol 7.5% (sólo para condiciones reductoras)

Tampón de recorrido:

Tris (base) 25 mM
 Glicina 190 mM
 SDS 0.1%
 (pH aproximado 8.3)

Transferencia Western.

Tampón de transferencia:

Tris (base) 48 mM pH 9.2
 Glicina 39 mM
 SDS 0.04%
 Metanol 20%

TBS 10x: Tris 250 mM, Glicina 1.9 M SDS 1%

TTBS: TBS 1X, Tween 20 0.05 %

Medios de cultivo de células

Abajo se especifica la composición del medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Eagle Medium) empleado en mg/l, de GIBCO (Invitrogen). Salvo cuando se indique lo contrario, el medio se suplementó con un 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

Componentes	DMEM	Componentes	DMEM
Sales inorgánicas		L-Met	30.0
CaCl ₂ 2H ₂ O	264.0	L-Phe	66.0
FeNO ₃ 9H ₂ O	0.1	L-Pro	46.0
KCl	400.0	L-Ser	42.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	200.0	L-Thr	95.0
NaCl	6400.0	L-Trp	16.0
NaHCO ₃	3700.0	L-Tyr	72.0
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	140.0	L-Val	94.0
Aminoácidos		Vitaminas	
L-Ala	35.6	Ác. pantoténico	4.0
L-Arg	84.0	Cloruro de colina	4.0
L-Asn	60.0	Ác. Fólico	4.0
L-Asp	53.0	i-Inositol	7.2
L-cistina	48.0	Nicotinamida	4.0
L-Glu	59.0	Piridoxina	4.0
Gly	30.0	Riboflavina	0.4
L-His	42.0	Tiamina	4.0
L-Ile	105.0	Otros componentes	
L-Leu	105.0	D-glucosa	4500.0
L-Lys	146.0	Rojo fenol	17.0

REACTIVOS HIBRIDACIÓN *IN SITU*

RIPA:

2.5 ml SDS (10%)
15 ml NaCl (5M)
5 ml NP40
25 ml Deoxycholate (10%) (Sigma D 6750)
1 ml EDTA (0.5M)
25 ml Tris (1M; pH 8)
completar hasta 500 ml con H₂O-DEPC

pre-HB:

25 ml Formamida Desionizada (FA, Ambion AM9342)
12.5 ml SSC 20X
25 µl Heparina (stock 50 mg/ml, Sigma H-3393)
10% dextran sulfato
1x Denhardt's solution (Sigma D-2532)
Tween 20
Completar con H₂O-DEPC hasta 50 ml

HB o/n:

Añadir al HB 100µg/µl de tRNA (Sigma R-5636) y 1/100 de la sonda

WASH:

5 ml SSC 20X
25 ml FA
Tween 20 50 µl
Completar con H₂O hasta 50 ml

TBS 10X

8 gr NaCl
0,2 gr KCl
25 ml Tris 1M pH 7.5
Completar con H₂O hasta 100 ml

TBST: TBS + 0.1% Tw-20

MAB

11.6 gr ac. Málico (M-0375)
8.8 gr NaCl
Completar hasta 800 ml con H₂O

Ajustar con NaOH-pellets hasta pH 7.5
Completar con H₂O hasta 1L

MABT: MAB + 0.1% Tw-20

AP buffer:

1 ml NaCl (5M)
2,5ml MgCl₂ (1M)
50 µl Tw-20
5ml Tris (1M pH 9.5)
completar con H₂O hasta 50ml

PBT: PBS + 0.1%Tween 20 (Sigma P-1379)