

# El tráfico intranuclear de WAVE1 es esencial para la dinámica del genoma y citoesqueleto durante la fertilización: cambio de localización ciclo celular dependiente entre Fase M e Interfase

WAVE1 intranuclear trafficking is essential for genomic and cytoskeletal dynamics during fertilization: cell-cycle-dependent shuttling between M-phase and interphase nuclei

Vanesa Y. Rawe, Christopher Payne, Christopher Navara, Gerald Schatten

Departments of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, and Cell Biology and Physiology, Magee-Women Research Institute, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, United States.

Artículo publicado en Developmental Biology Dic 15; 276(2):253-67, 2004.

# Introducción

El mantenimiento del arresto meiótico en los oocitos de mamíferos es mediado por el segundo mensajero AMPc y la proteina kinasa AMPc dependiente (PKA). Altos niveles de AMPc dentro del citoplasma oocitario, previenen la activación del factor promotor de la maduración (MPF) y de MAP kinasas inhibiendo la re-asunción de la meiosis. Al tiempo de la fertilización, los niveles de AMPc decrecen y las diferentes iso-enzimas de PKA se localizan en diferentes compartimentos intracelulares en el cigoto.

La PKA consiste en una subunidad regulatoria (R) en forma de dímero y dos subunidades catalíticas (C). La organización intracelular de las PKA es controlada a través de su asociación con proteínas de anclaje de PKA denominadas AKAPs (A kinase-anchoring proteins). Cada miembro de la familia de las AKAPs contiene dos regiones funcionales: una de pegado de PKAs y otra que dirige al complejo PKA-AKAP hacia lugares celulares determinados. Un aspecto importante de las AKAPs es su habilidad de interactuar con múltiples enzimas, integrando diferentes caminos de señalización y regulando la fosforilación de simultáneos sustratos. Los blancos pueden ser intranucleares y citoplásmicos y algunos ejemplos son la actina, microtúbulos y el centrosoma.

Algunas evidencias recientes identificaron a dos AKAPs que se asocian al centrosoma; la AKAP350 y pericentrina. La primera ayuda a integrar distintos mecanismos de señalización que involucran a AMPc, Rho, ácidos grasos y fosfolípidos, mientras que la pericentrina participa en el mantenimiento de la arquitectura del centrosoma y de los microtúbulos durante la mitosis y meiosis. La pericentrina interactúa con  $\gamma$ -tubulina para regular la nucleación de microtúbulos y se asocia con el complejo dineína-dinactina para mediar el transporte de cargas a través de microtúbulos hacia los centrosomas.

El citoesqueleto de actina es regulado por la familia de GTPasas pequeñas Rho, Rac y CdC 42 que controlan la formación de fibras de actina, lamellipodia y filopodia respectivamente. La selectiva interacción de estas GTPasas pequeñas con proteínas de anclaje de PKA (AKAPs) dan como resultado distintos eventos de remodelado de actina (Bishop and Hall, 2000). Ciertos estudios experimentales identificaron a gravin (un antígeno de la enfermedad auto inmune mistenia gravis) y a WAVE1 (un miembro de las proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich) como dos AKAPs que interaccionan con actina. WAVE1 también interacciona con la tirosin kinasa Abl y con PKA y es secuestrada dentro del núcleo en células somáticas. También es el puente molecular que acopla el complejo Arp2/3 con las GTPasas pequeñas para el remodelado de actina (ver esquema).

# **Bionálisis**



Esquema 1. Representación esquemática de las distintas proteínas y estructuras celulares que interaccionan con la AKAP WAVE1 en células somáticas.

Nuestro objetivo fue entender más con profundidad el papel de las AKAPs durante la maduración oocitaria, fertilización y desarrollo embrionario temprano en el modelo animal de bovinos, centrándonos en el estudio de WAVE1 para comprobar que su ubicación intranuclear es requerida durante los eventos mencionados anteriormente.

Para dilucidar su papel, perturbamos el desarrollo normal de embriones de bovinos, exponiendo el citoplasma a anticuerpos anti WAVE1 y a disruptores del citoesqueleto de actina y microtúbulos. Nuestros resultados identificaron que el secuestro intranuclear de WAVE1 es un evento crítico durante la fertilización siendo una de las consecuencias de esta perturbación, la parcial relocalización de WAVE1 en el centrosoma y la inhibición de la unión pronuclear y clivaje embrionario. WAVE1, por lo tanto se localiza en el núcleo para aislarse del centrosoma y evitar su competencia con otras AKAPs, como pericentrina, distorsionar la actividad motora de dineína-dinactina y alterar la función celular.

# Materiales y métodos

# Oocitos de bovinos inmaduros

Los oocitos inmaduros en vesícula germinal (Profase I) fueron obtenidos de BOMED (Madison, WI), recuperados de ovarios luego de la aspiración oocitaria y madurados in vitro en TC199 conteniendo 3 mM de IBMX (inhibidor de fosfodiesterasas). Los oocitos fueron luego fijados y se incubaron con distintos anticuerpos como se describirá luego.



# Maduración in vitro y fertilización de bovinos

La maduración in vitro y fertilización fueron realizadas de acuerdo a protocolos standard (Sirard et al., 1988). Brevemente, los oocitos bovinos inmaduros fueron recuperados de los ovarios por aspiración y madurados in vitro por 24 h. en medio TC199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 5  $\mu$ g/mL de FSH, 1  $\mu$ g/mL de estrógeno y 25  $\mu$ g/mL de gentamicina a 39°C en 5% CO<sub>2</sub> bajo aceite embrio-testado.

Los oocitos maduros arrestados en metafase II, fueron ubicados en gotas de TALP bajo aceite. El semen de toro fue descongelado a temperatura ambiente y centrifugado por 15 minutos a 700 x g en un gradiente de Percoll al 45% y 90%. Los oocitos de bovinos y los espermatozoides fueron incubados a 39°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta diferentes estadios del desarrollo. Para examinar los efectos de la disrupción de los microtúbulos y microfilamentos en la distribución de WAVE1, algunos oocitos y espermatozoides fueron incubados hasta 8 horas post inseminación, momento en el cual los cigotos fueron transferidos a gotas de TALP conteniendo 20  $\mu$ M de Nocodazol, 2  $\mu$ M de Taxol, 10  $\mu$ M de Citocalasina D, y 100 nM de Jasplakinolide (Sigma-Aldrich; Navara et al., 1994; Terada et al., 2000). Los cigotos fueron entonces incubados en presencia de estas drogas hasta 18 horas post-inseminación, momento en el cual fueron fijados para el estudio de la distribución de WAVE1. También las distancias entre los pronúcleos masculino y femenino fueron medidas durante la inhibición de la unión pronuclear. Se consideró que las distancias pronucleares  $\geq$  10  $\mu$ m, eran indicativas de disrupción o inhibición de la migración pronuclear (Payne et al., 2003).

# Inmunocitoquímica y microscopía confocal

Las células del cúmulus y la zona pelúcida fueron removidas luego de cortas incubaciones con 1mg/mL de hialuronidasa y 2mg/mL de pronasa, respectivamente. Los oocitos, cigotos y embriones libres de zona pelúcida fueron ubicados en cubre objetos con poli-L-lisina en medio TALP libre de  $Ca^{2+}$ , fijados por 40 minutos en 2% formaldehído, y permeabilizados en 10 mM de PBS + 0,1% de Tritón X-100 por otros 40 minutos adicionales.

Luego de la fijación y permeabilización, las muestras fueron bloqueadas por 1h en 10 mM PBS + 0,3% BSA + 1 % suero fetal bovino previo a la incubación con anticuerpos primarios y secundarios. Los anticuerpos primarios fueron aplicados por unas 10 horas en cámara húmeda y luego las muestras fueron lavadas 4 veces por 10 minutos cada una, previo al agregado de anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios utilizados (AlexaFluor 488 y 594) fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente y el ADN fue visualizado luego de la incubación con 10 µg/mL TOTO-3 (Molecular Probes).

Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio con medio Vectashield para retardar el fotoenvejecimiento. Los oocitos, cigotos y embriones fueron visualizados con microscopio confocal Leica TCS SP2 con láseres de longitud de onda 488, 568, 594 y 633 nm.

# Anticuerpos utilizados y transfección

Los anticuerpos anti-WAVE1 (policionales hechos en cabra) fueron utilizados para inmunocitoquímica y para transfección a una concentración de 1: 50 (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos anti-PKA fueron hechos en cabra y obtenidos de Upstate Biotechnology. Cuando los anticuerpos anti-WAVE y anti-PKA fueron utilizados simultáneamente, se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-WAVE1 (BD Transduction Labs.). La proteína Abl fue identificada usando un anticuerpo monoclonal 8E9 BD Transduction Labs. Los anticuerpos anti-p21-Arc fueron usados para identificar el complejo proteico Arp 2/3.

Los anticuerpos monoclonales Mab414 fueron utilizados para identificar los complejos de polos nucleares (Covance/Babco). Los anticuerpos anti-tubulina (hechos en oveja) fueron obtenidos en Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO). Los filamentos de actina fueron visualizados utilizando faloidina conjugada con fluorocromo 568 obtenido de Molecular Probes. Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios con AlexaFluor 488 y 594 (1:200, Molecular Probes). El anticuerpo monoclonal anti pericentrina (1:100) fue obtenido de BD Transduction Labs. Los anticuerpos de conejo anti γ-tubulina y anti dinactina p 150 <sup>Glued</sup> fueron obtenidos de Cytoskeleton y



Santa Cruz respectivamente. Los experimentos control fueron realizados utilizando suero preinmune hecho en ratón a una concentración de 1:20. Como controles adicionales se realizaron preincubaciones de los anticuerpos por una hora con sus correspondientes antígenos.

Para los experimentos de transfección los anticuerpos fueron dializados durante toda la noche usando cassettes Slide-A-Lyzer con múltiples cambios en 10 mM PBS para remover la azida sódica del buffer de conservación del anticuerpo. La transfección de los cigotos a las 8 hs post-inseminación fue realizada utilizando el reactivo Chariot® (Active Motif) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Brevemente, para la transfección con WAVE1 y Abl en 20 cigotos, se preparó un volumen de 20  $\mu$ L de reactivo Chariot 1:10 y de anticuerpo anti-WAVE1 1:5 ó 1:2 de suero pre-inmune. El reactivo Chariot solo también fue utilizado como control. Seguido de esa reacción de preincubación Chariot- anticuerpo, ese volumen de 20  $\mu$ L fue agregado a un hoyo de una cápsula de 96 hoyos que contenían 20 cigotos libres de cúmulus y de zona pelúcida en un volumen de 80  $\mu$ L de medio TALP libre de proteína. Las muestras fueron incubadas a 39°C por una hora, momento a partir del cual fueron adicionados 100  $\mu$ l de TALP con proteína en cada hoyo. Luego de ello las muestras fueron cultivadas y fijadas para inmunocitoquímica a las 18 h. ó 36 h. post-inseminación.

### Inmunoprecipitación, SDS-PAGE, y corrida electroforética de proteínas

Las inmunoprecipitaciones (IP) de WAVE1 fueron realizadas usando Protein A Sepharose 4 Fast Flow medium. Los oocitos de bovino maduros fueron lisados inmediatamente o fertilizados in vitro y cultivados 18 horas post-inseminación, tiempo en el cual fueron lisados y preparados para las incubaciones con anticuerpos. El buffer del lisis está constituído por 50 mM de Trietanolamina (TEA), 500 mM de NaCl, 0,5% de Tritón X-100, 1mM DTT, 1 mM PMSF, y una dilución de 1:1000 de inhibidores de proteasas (quimostatina, leupeptina, antipaina, pepstatina A). Los lisados fueron centrifugados a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C, y la concentración proteica fue determinada usando la técnica de Bradford. Iguales cantidades de proteínas fueron cargadas en cada línea del gel.

Los lisados fueron incubados con 3 µg de anti-WAVE1 o suero pre-inmune por una hora a 4°C. El medio Protein A Sepharose 4 Fast Flow fue adicionado a las muestras para una incubación durante toda la noche a 4°C. Luego de una centrifugación, los sobrenadantes fueron separados de los pellets y concentrados para reducir su volumen. Los pellets fueron lavados y resuspendidos en buffer Laemmli y calentados a 100°C por 5 minutos. Los lisados totales de cigotos, oocitos, los sobrenadantes de la inmunoprecipitación y los pellets de la inmunoprecipitación fueron cargados en geles con un gradiente de 4-20% y procesados por SDS-PAGE y Western Blotting en membranas PVDF. Las bandas proteicas fueron visualizadas utilizando el sistema ECL y HyperFilm, haciendo referencia a standards pre-teñidos (Bio-Rad). Los Western blots fueron testados contra PKA R II y luego re-testados contra anti-p21 Arc.

# Microinyección con WGA

Para investigar la disrupción del transporte núcleo-citoplásmico utilizamos la lectina wheat germ agglutinin (WGA), que específicamente reconoce un azúcar en las nucleoporinas. Esta droga fue inyectada en oocitos en metafase II antes de la fertilización. Las inyecciones fueron realizadas a 35°C en gotas de 100 µL de TL-Hepes conteniendo 5,5 µg/mL de Citocalasina D. Luego de la remoción de las células del cúmulus, los oocitos fueron inmovilizados e inyectados para ser luego fertilizados in vitro y procesados para inmunofluorescencia como ha sido descrito anteriormente.

### Análisis estadístico

En cada figura se muestran imágenes de fluorescencia representativas para oocitos, cigotos y embriones. Cada experimento ha sido repetido por lo menos dos veces. Los experimentos pilotos diseñados para estandarizar las concentraciones de anticuerpos no fueron incluídos en los



cálculos. La significancia estadística de las diferencias de los tratamientos individuales fue estudiada usando el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

# Resultados

WAVE1 se distribuye desde la corteza al citoplasma en oocitos inmaduros al núcleo de cigotos fertilizados y embriones tempranos

Para determinar la localización de WAVE1 durante la maduración occitaria, fertilización y clivaje embrionario temprano se utilizó inmunocitoquímica. En el estadío de profase I, la mayoría de los oocitos (97%) mostraron una concentración de WAVE1 en la corteza y en estructuras alrededor de la vesícula germinal (Fig. 1A). Durante y después de la primera división meiótica, el 96% de los oocitos mostraron una distribución de WAVE1 puntuada en el citoplasma (Fig. 1B, C). De manera interesante, el 79% de los oocitos mostraron a WAVE1 dentro del cuerpo polar o en la corteza cerca de la placa metafásica donde fue expulsado el cuerpo polar (Fig. 1B detalle, Fig. 1C flecha). Durante la fertilización, la distribución de WAVE1 se visualiza en los pronúcleos masculino y femenino en desarrollo desde las 8 horas post-inseminación (Fig. 1D). WAVE1 se localiza en la vaina mitocondrial de los espermatozoides de toro luego de la fertilización (Fig. 1D flecha). A las 13 horas post-inseminación, la mayoría de WAVE1 se concentra dentro de ambos pronúcleos con una distribución citoplásmica reducida (Fig. 1E). Durante la aposición de los pronúcleos a las 18 horas post-inseminación, WAVE1 permanece localizada dentro de los pronúcleos completamente desarrollados en la mayoría de los cigotos (73%, Fig. 1F). Luego del primer clivaje embrionario, WAVE1 continúa concentrada dentro del núcleo en interfase de cada blastómera en la mayoría de los embriones (67% Fig. 1G). Posterior a la ruptura de la membrana nuclear y condensación cromosómica en un embrión de dos células, WAVE1 se distribuye en el citoplasma (Fig. 1H). En el embrión de 3 células, WAVE1 se concentra dentro del núcleo en interfase en algunas blastómeras mientras que se distribuye en el citoplasma en otras cuando sus cromosomas están condensados (Fig. 1I). En algunas blastómeras WAVE1 también se detecta en el surco de clivaje.

# La localización de WAVE1 en los pronúcleos no depende la funcionalidad de los complejos de poros nucleares

De acuerdo con los datos obtenidos por inmunofluorescencia, WAVE1 interactúa con ambos pronúcleos tan temprano como 8 horas post-inseminación. Para determinar si WAVE1 requiere poros nucleares funcionales para ingresar dentro de los pronúcleos, bloqueamos el ensamblaje de los poros nucleares y su inserción en la membrana nuclear, microinyectando una aglutinina de germen de trigo (WGA) en oocitos en metafase II. Previamente se demostró que WGA inhibe el transporte proteíco a través de la membrana nuclear, interactuando con la nucleoporina p62 (Finlay et al., 1987). Luego de la inyección de WGA y de la fertilización in vitro, la mayoría de los oocitos inyectados contenían WAVE1 dentro de los pronúcleos (65%, Fig. 2A y A'). Este evento no es estadísticamente significativo comparado con el control negativo (sólo inyección, 62%). A pesar de que los oocitos inyectados con WGA mostraron desarrollo pronuclear anormal (Fig. 2A), WAVE1 permanece concentrada dentro de los pronúcleos (Fig. 2A'). Los complejos de poros nucleares se distribuyen en la membrana nuclear de cada pronúcleo y en los citoplasmas de los oocitos inyectados como grupo control (Fig. 2B). La localización de WAVE1 dentro de los pronúcleos, por lo tanto, parece ser un evento temprano durante la fertilización que antecede a la formación de la membrana nuclear y que no requiere del transporte a través del poro nuclear.

# La estabilización de los microtúbulos genera la redistribución de WAVE1 desde el citoplasma al centrosoma.

Luego, examinamos si la localización de WAVE1 era afectada luego de la perturbación de los microtúbulos y microfilamentos durante la fertilización. Para estudiar si la despolimerización o estabilización de los microfilamentos redistribuye a WAVE1 desde el pronúcleo, administramos Citocalasina D y Jasplakinolide a cigotos 8 horas post-inseminación (tiempo en el cual WAVE1 se



localiza dentro de cada pronúcleo). Cuando la actina es despolimerizada con Citocalasina D (Fig. 3A, C), la distribución de WAVE1 no se altera significativamente (60% vs. 74% en controles, tabla 1). De manera similar, cuando la actina es estabilizada con Jasplakinolide la localización de WAVE1 no difiere de los controles (Fig. 3B, C, 66% vs. 74%, tabla1).

Para estudiar si la despolimerización de los microtúbulos afecta la distribución de WAVE1, administramos Nocodazol a los cigotos. Luego de ese tratamiento, la asociación de WAVE1 con el pronúcleo masculino y femenino parece no ser afectada significativamente (62% vs. 70%, Fig. 3D, F, tabla 1). Por el contrario, la estabilización de los microtúbulos luego de la adición de 2  $\mu$ M de taxol causa una significativa redistribución de WAVE1 (Fig. 3E, F, 14% vs. 70%, tabla 1).

De manera interesante, WAVE1 se distribuye en la región del centrosoma en cigotos tratados con taxol (Fig. 3E, cabeza de flecha). Bajo la base de esta observación, investigamos la asociación de WAVE1 con pericentrina, una AKAP que localiza en el centrosoma,  $\gamma$ - tubulina y dinactina (cofactor de la dineína citoplasmática). La figura 3G muestra a WAVE1 dentro de los pronúcleos luego del tratamiento con taxol, y la co–localización con pericentrina en el citoplasma (60%, cabeza de flecha). Cuando estudiamos la asociación de WAVE1 con  $\gamma$ - tubulina (que se asocia con pericentrina) luego del tratamiento con taxol, la mayoría de los cigotos (65%) mostraron interacción entre ellas (Fig. 3H cabeza de flecha). Por el contrario, ninguno de los cigotos mostró WAVE 1 interactuando con dinactina (Fig. 3I). Cuando fueron medidas las distancias inter-pronucleares entre los dos pronúcleos luego la disrupción de los microtúbulos (despolimerización y estabilización), la aposición de los pronúcleos fue inhibida con significancia estadística comparada con controles (tabla 1). Por el contrario, la disrupción de los microfilamentos no inhibe la disrupción de los pronúcleos (tabla 1).

#### Table 1

Cytoskeleton disruption and WAVE1 distribution

	Microfilaments disruption			Microtubules disruption		
	Contro1	+Cytochalasin D	+Jasplakinolide	Control	+Nocodazole	+Tax ol
WAVE1 staining pattern in	side the pronuclei					
Both male and females	74% (37/50)	60% (30/50)	66% (33/50)	70% (35/50)	62% (31/50)	14% (7/50)
None of them	24% (12/50)	32% (16/50)	30% (15/50)	24% (12/50)	26% (13/50)	70% (35/50)
One of them	2% (1/50)	8% (4/50)	4% (2/50)	6% (3/50)	12% (6/50)	16% (8/50)
Distance between pronucle	i					
≥10 μm	4% (2/50)	8% (4/50)	10% (5/50)	0% (0/50)	96% (48/50)	92% (46/50)
≤10 μm	96% (48/50)	92% (46/50)	90% (45/50)	100% (50/50)	4% (2/50)	8% (4/50)

Para demostrar que la re-localización de WAVE1 es específica y no un artefacto luego del tratamiento con  $2\mu$ M de taxol, hemos realizado una curva dosis-respuesta usando diferentes concentraciones de taxol (Fig. 4). Los cigotos tratados con diferentes concentraciones fueron fijados y procesados por inmunocitoquímica usando anticuerpos anti-tubulina y anti-WAVE1. Nuestros resultados muestran una normal distribución de WAVE1 en los pronúcleos masculino y femenino luego del tratamiento con 0,1  $\mu$ M de taxol sugiriendo que la localización de la proteína no es alterada con esa baja concentración (Fig. 4A). Luego del tratamiento con 5  $\mu$ M de taxol (Fig. 4B), WAVE1 se asocia con el áster espermático y no se visualiza dentro de los pronúcleos. Nuestros datos muestran masiva polimerización de tubulina luego del tratamiento con 10 y 20  $\mu$ M de taxol (Fig. 4C, D). En esos casos se observan localizaciones de WAVE1 anormales en el citoplasma. Por lo tanto, sólo después de concentraciones mayores a 5  $\mu$ M de taxol, WAVE1 muestra una asociación no específica con la tubulina polimerizada.

## WAVE1 interacciona con PKA R II en oocitos en metafase II y cigotos fertilizados

Basados en previos resultados que demuestran una interacción entre WAVE1 y proteínas relacionadas con actina en células 3T3 y HEK 293 (Westphal et al., 2000), examinamos la distribución de PKA R II, Abl, y p21 Arc (un componente del complejo Arp2/3) en oocitos en metafase II y cigotos pronucleados. La mayoría de los oocitos en metafase II (89%) mostraron una

# **Signálisis**

co-localización de WAVE1 y PKA R II dispersadas en el citoplasma de manera puntuada (Fig. 5A). Mientras que WAVE1 se distribuye en la corteza, PKA R II no se visualiza en esa ubicación. A las 18 horas post-inseminación, la mayoría de los cigotos (69%) muestran una co-distribución de WAVE1 con PKA R II dentro de los pronúcleos, en áreas cercanas a la envoltura nuclear (Fig. 5B). Una menor y débil tinción también son detectadas en el citoplasma.

Para explorar la posible asociación de WAVE1 con Arp 2/3, usamos un anticuerpo que identifica uno de sus componentes (p21 Arc, Volkmann et al., 2001). La mayoría de los oocitos en metafase II (72%) muestran una co-localización de WAVE1 con p21 Arc en el citoplasma, excepto en un área cercana a la placa metafásica (Fig. 5C cabeza de flecha). Cuando estudiamos los cigotos pronucleados, WAVE1 y p21 Arc distribuyen de manera independiente en la mayoría de ellos (88%, Fig. 5D). Mientras que WAVE1 es vista dentro de los pronúcleos, p21 Arc se visualiza en el citoplasma rodeando a los pronúcleos.

En células somáticas, otra proteína que se asocia con WAVE1 es Abl. En nuestro trabajo la mayoría de los oocitos en metafase II no muestran co-localización entre WAVE1 y Abl (63%, Fig. 5E). Curiosamente, luego de la inseminación y formación de pronúcleos, Abl se redistribuye en áreas dentro de ambos pronúcleos donde la cromatina está ligeramente condensada (75%) y co-localiza con WAVE1 en regiones especificas (Fig. 5F, cabeza de flecha).

Basados en previas observaciones que mostraron que el tratamiento con taxol afecta la distribución de WAVE1, examinamos la localización de dinactina en oocitos en metafase II y en cigotos pronucleados (Fig. 5G, H). La mayoría de los oocitos en metafase II (71%) mostraron colocalización de WAVE1 con dinactina en el citoplasma (Fig. 5G). Cuando los cigotos pronucleados fueron estudiados (Fig. 5H), la mayoría de ellos (66%) mostraron a WAVE1 y dinactina dentro de los pronúcleos y rodeándolos en el citoplasma respectivamente.

Luego exploramos la interacción física entre WAVE1 y PKA R II y entre WAVE1 y p21 Arc a través de estudios de inmunoprecipitación. En oocitos en metafase II y en cigotos pronucleados, WAVE1 fue inmunoprecipitada y se utilizaron anticuerpos contra PKA R II y p21 Arc en los inmunoprecipitados. En los pellets y sobrenadantes de las inmunoprecipitaciones de oocitos y cigotos se detectó una fuerte banda correspondiente a PKA R II con una masa molecular de aproximadamente 51 kDa (Fig. 6A). El hecho de PKA R II es detectada en los sobrenadantes de las inmunoprecipitaciones sugiere que no toda la proteína está asociada con WAVE1 durante el arresto en metafase II y la aposición de los pronúcleos (hecho que concuerda con los datos por inmunofluorescencia).

Cuando fueron utilizados anticuerpos anti p21 Arc, se pudo detectar una banda con una masa molecular de aproximadamente 21 kDa en los pellets y en los sobrenadantes de los oocitos inmunoprecipitados (Fig. 6B). Esta banda también es observada en los sobrenadantes de las inmunoprecipitaciones de los cigotos pero no en los pellets. La presencia de una banda en los sobrenadantes de las inmunoprecipitaciones de los cigotos, sugiere que existe un pool de p21 Arc en el cigoto que no interacciona con WAVE1. Estos datos confirman los resultados obtenidos en la Fig. 5.

# WAVE1 pero no Abl es requerida para la aposición de los pronúcleos y la primera división mitótica

Para determinar si la localización nuclear de WAVE1 es necesaria durante la fertilización y desarrollo embrionario temprano, transfectamos oocitos fertilizados con anticuerpos anti WAVE1 usando el sistema Chariot® (Morris et al., 2001; Payne et al., 2003) (Fig. 7A). La introducción de anticuerpos dentro de los cigotos ocurrió tan pronto como WAVE1 comenzó a interactuar con los pronúcleos en formación (8 horas post inseminación). Los cigotos fueron luego incubados hasta el momento de la aposición de los pronúcleos (18 horas post inseminación) o hasta el estadío de dos células (36 horas post inseminación). Sólo el 11% de los cigotos transfectados con el anti WAVE1 mostraron la proteína dentro de los pronúcleos (tabla 2). Este evento se compara con el 75% y el 73% de los cigotos transfectados con suero preinmune o Chariot solo respectivamente (tabla 2). La figura 7A muestra una localización difusa de WAVE1 dentro de cada pronúcleo, mientras que Abl se observa en la mayoría de los cigotos dentro de cada pronúcleo, evento que no es diferente significativamente de los controles (tabla 2).

Transfección de cigotos 8HPI	Fijación de cigotos 18HPI		Fijación de embriones 18HPI	
	WAVE1	Abl	WAVE1	Abl
Chariot + WAVF1	11% (4/36)	78% (7/9)	0% (0/14)	78% (7/9)
Chariot + suero preinmune de ratón (IgG)	75% (21/28)	83% (10/12)	69% (9/13)	71% (5/7)
Chariot + solo	73% (11/15)	100% (11/11)	77% (7/9)	83% (5/6)
Chariot +Abl	87% (35/40)	12% (5/40)	75% (12/16)	13% (2/15)
Chariot + suero preinmune de ratón (IgG)	84% (32/38)	89% (34/38)	85% (11/13)	83% (10/12)
Chariot + solo	86% (30/35)	88% (31/35)	70% (7/10)	100% (9/9)

A las 36 horas post inseminación, los cigotos transfectados con anti-WAVE1 fueron fijados y analizados (Fig. 7B). Luego de la transfección no se pudieron identificar embriones clivados y todos los cigotos transfectados estaban arrestados en el estadio de pronúcleos (Fig. 7B, tabla 2). A las 36 horas post inseminación, Abl se localiza dentro de los pronúcleos en la mayoría de los casos. Con el fin de evaluar el bloqueo de Abl durante el desarrollo embrionario, usamos Chariot de la manera anteriormente descrita para WAVE1. A las 18 horas post inseminación, la mayoría de los cigotos transfectados con Abl mostraron WAVE1 pero no Abl dentro de los pronúcleos (Fig. 7C, tabla 2). Este resultado coincide con el efecto de la distribución de Abl luego del bloqueo con WAV E1, sugiriendo que ambas proteínas migran hacia los pronúcleos de manera independiente. A las 36 horas post inseminación ocurrió clivaje embrionario en la mayoría de los embriones, con WAVE1 pero no Abl vista dentro de los núcleos de cada blastómera (Fig. 7D, tabla 2). En todos los casos los controles mostraron clivaje normal y distribución de WAVE1 y Abl dentro de los núcleos de cada blastómera.

# Discusión

Resultados previos han identificado la asociación de las AKAPs con una variedad de compartimentos celulares que incluyen el retículo endoplásmico, membrana nuclear, membrana plasmática, centrosomas, mitocondrias y vesículas (ver revisión por Colledge and Scott, 1999).

Las AKAPs han sido bien caracterizadas en células somáticas durante interfase y mitosis, pero el papel de ellas y su asociación con PKA durante la meiosis y la fertilización es pobremente comprendido. El arresto meiótico en oocitos de mamíferos depende de eventos de fosforilación catalizados por PKA (Bornslaeger et al., 1988), y la modulación de las concentraciones intracelulares de AMPc es uno de los mecanismos más importantes que regulan la acción de PKA dentro de los oocitos (Dekel, 1988).

Debido a que WAVE1 se asocia con diferentes proteínas relacionadas con la actina (Arps) para mediar la regulación de actina en células somáticas (Westphal et al., 2000), examinamos la distribución de WAVE1 en oocitos de mamíferos comprobando la hipótesis de que su función es requerida durante la fertilización y desarrollo embrionario. Nuestros resultados sugieren que mientras que la asociación de WAVE1 con Arps y con microfilamentos en el citoplasma puede ser un importante regulador de la maduración meiótica, su localización nuclear durante la fertilización es independiente de actina y depende de la dinámica de los microtúbulos para su apropiada distribución y subsecuente función.

# WAVE1 exhibe diferentes distribuciones espaciales y temporales durante la maduración oocitaria y fertilización.



Durante la maduración oocitaria, WAVE1 se localiza alrededor de la vesícula germinal. El mismo patrón ha sido observado para PKA RII (datos no mostrados). Luego de la reasunción de la meiosis, los oocitos en metafase II muestran WAVE1 y PKA codistribuídas en todo el citoplasma. Estos resultados confirman y extienden previos hallazgos de Kovo et al., 2002, que demostró la presencia de la subunidad RII en oocitos de rata y los cambios en la fosforilación durante la progresión meiótica. El ensamblaje de WAVE1 en células somáticas depende del estímulo extracelular (Westphal et al., 2000).

La activación de Rac por factores del crecimiento resulta en una rápida redistribución de WAVE1, PKA y Abl hacia la periferia de la célula. En nuestros estudios, la fertilización y subsecuente activación oocitaria induce también la relocalización de WAVE1.

En oocitos en metafase II, WAVE1 se distribuye a través de todo el ooplasma y se asocia con PKA R II y el complejo Arp 2/3. Luego de 8 horas de ocurrida la inseminación, la AKAP se asocia con los pronúcleos en desarrollo; se concentra dentro de ellos y en ese momento se reorganizan PKA R II y Abl de manera intrapronuclear al mismo tiempo que el complejo Arp 2/3 lo hace en el citoplasma. Recientemente, se ha reportado otra AKAP asociada con los pronúcleos durante la fertilización en ratón (Bomar et al., 2002). El ARNm materno se traduce y genera la formación de la proteína AKAP95 luego de la activación oocitaria, se ensambla dentro del pronúcleo femenino y se asocia con la cromatina materna en mitosis. Los autores sugieren que la AKAP95 interactúa con una proteína de matriz nuclear llamada NuMA que podría constituir su posible sustrato en el pronúcleo femenino.

Durante la fertilización en mamíferos, el ensamblaje de las envolturas nucleares ocurre alrededor de dos entidades distintas: los cromosomas paternos y maternos. Diferentes vesículas con membrana rodean a la cromatina desnuda y se fusionan para formar una membrana nuclear continua, evento que se acompaña del ensamblaje, y la inserción del complejo de poros nucleares, así como también de la organización de la lámina nuclear (Sutovsky et al., 1998). La inserción de los complejos de poros nucleares dentro de la envoltura nuclear ocurre temprano en el desarrollo y es un evento esencial para una fertilización exitosa en mamíferos incluyendo al humano (Sutovsky et al., 1998; Rawe et al., 2003). Curiosamente, la microinyección de WGA dentro de los oocitos no inhibe la redistribución de WAVE1 dentro de los pronúcleos en formación. En nuestro estudio, la concentración de WGA inyectada fue de aproximadamente 0,3 mg/mL lo cual es suficiente para inhibir el transporte hacia el núcleo a través de los poros nucleares. Podemos concluir que la formación de la envoltura nuclear ocurre poco después o simultáneamente con la incorporación de WAVE1 dentro de los pronúcleos. Por lo tanto, un tráfico convencional núcleo-citoplásmico no parece ser un requerimiento para una correcta localización de WAVE1 durante la fertilización.

El hecho de que WAVE1 sea secuestrada dentro de los pronúcleos muy tempranamente durante la fertilización tiene consecuencias interesantes. Originariamente, las proteínas relacionadas con la actina fueron descritas con una ubicación citoplásmica regulando la nucleación de filamentos de actina (Pollard et al., 2000). Cierta evidencia sugiere, sin embargo, que pueden ser componentes de complejos nucleares (ver revisión por Shumaker et al., 2003). Una de ellas es Profilin, una proteína asociada a actina globular (G). Profilin interactúa con la porción central de WAVE1 (Miki et al., 1998; Mullins, 2000). Algunos de nuestros resulados no publicados y otros (Skare et al., 2003), sugieren que luego de inmunocitoquímica contra Profilin 1 se visualiza un patrón dentro de los pronúcleos. Los autores demostraron que Profilin podría tener un papel en el procesamiento de ARNm. Este posible diálogo molecular entre Profilin y WAVE1 podría proveer un marco dinámico estructural para una normal función nuclear de replicación del ADN y transcripción.

# La reorganización de WAVE1 durante la fertilización se acompaña de una reorganización en la distribución de PKA RII y Abl

En células somáticas en interfase, la subunidad regulatoria II (RII) de la PKA, se asocia al centrosoma a través de la interacción con la AKAP450, pero luego se disocia y se redistribuye con la AKAP95 durante la mitosis (Eide et al., 2002). La fosforilación de RII durante la mitosis, reduce su afinidad por la AKAP450 y la incrementa por la AKAP95, explicando la dinámica en la organización de RII durante el ciclo celular (Keryer et al., 1998; Landsverk et al., 2001). Recientemente, se reportó el papel esencial de kinasas que fosforilan en tirosinas a componentes



del ciclo celular y a factores de la maquinaria transcripcional. Varias de esas tirosinas se localizan en compartimentos nucleares y citoplásmicos de la célula y coordinan eventos de transducción de señales en el citoplasma con específicos cambios en el núcleo (ver revisión por Van Etten, 1999). Dentro de esas proteínas se encuentra Abl. Nuestros hallazgos indican que WAVE1 interactúa con PKA y Abl durante la formación de pronúcleos, y sugieren un posible mecanismo para explicar la fosforilación de diferentes epitopes. Tal vez WAVE1 actúa como una AKAP para los complejos responsables de la remodelación de la cromatina o los reguladores de la transcripción.

Recientemente, Miki y Takenawa (2003) mostraron defectos en el desarrollo de moscas de la fruta que tenían el gen de *WAVE/Scar* mutado. Las anomalías son causadas por defectos generales en la organización del citoesqueleto de actina durante el desarrollo embrionario temprano. Este fenotipo fue similar a mutantes para genes que codifican para subunidades del complejo Arp2/3 complex (Hudson and Cooley, 2002), sugiriendo que WAVE/Scar juega un papel importante en la activación del complejo Arp 2/3 durante el desarrollo embrionario. Recientemente, se reportó la generación de knockouts para el gen que codifica para WAVE1 (WAVE1 - -) en ratones (Soderling et al., 2003). A pesar de que no se reportaron defectos en el desarrollo embrionario, los autores no fueron capaces de estudiar su fertilidad ya que los mismos morían al mes de haber nacido.

La inhibición de la migración de los pronúcleos y división celular luego de la introducción de anticuerpos bloqueadores anti-WAVE1, podría ser explicada a través de su asociación con la porción C terminal de WAVE1 (WCA, WASP homology, cofilin-binding, acidic domain) que media la interacción con el complejo Arp 2/3. De esta manera, el complejo no interactúa con WAVE1 comprometiendo su capacidad para organizar los filamentos de actina (Marchand et al., 2001). La distorción de esa interacción podría, como consecuencia, dar lugar a una completa alteración del citoesqueleto de actina.

Cuando los cigotos de bovinos son tratados con disruptores de los microfilamentos, no se afecta la localización de WAVE1 ni la aposición de los pronúcleos. Por el contrario, la estabilización de los microtúbulos interfiere de manera significativa en el tráfico de WAVE1 durante la fertilización. Como era de esperar, en presencia de nocodazol o taxol no ocurre migración de pronúcleos. Este evento concuerda con previos resultados (no mostrados) que muestran una co-localización de WAVE1 con dinactina en oocitos en metafase II, sugiriendo que WAVE1 podría ser transportada hacia los pronúcleos en decondensación vía dineína citoplásmica por los microtúbulos.

Recientemente, se mostró que más de una AKAP puede localizarse en la misma estructura celular. Un ejemplo es pericentrina y AKAP350, las dos ubicadas en el centrosoma para interaccionar con PKA (Colledge and Scott, 1999; Edwards and Scott, 2000). Esta aparente redundancia en el anclaje de PKA sugiere la existencia de la complejidad en la distribución intracelular de las AKAP. La errónea localización de WAVE1 en el centrosoma en cigotos tratados con taxol tiene consecuencias negativas y sugiere su posible competencia con pericentrina en el pegado de PKA. Este evento podría explicar la alteración en la formación (centrosoma dependiente) del áster espermático y la consecuente inhibición en la movilidad intracelular de los pronúcleos.

# Conclusión

La localización nuclear de WAVE1 durante la fertilización es un evento esencial para una normal aposición de los pronúcleos, y su inhibición resulta en su redistribución en el centrosoma colocalizando con pericentrina y  $\gamma$ -tubulina. Dicha redistribución, podría alterar la función normal del centrosoma y generar defectos en los microtúbulos que generarían inhibición en la migración de los pronúcleos. Una apropiada compartimentalización de las AKAPs parece ser un factor de fundamental importancia para una exitosa fertilización y clivaje embrionario en mamíferos.



Figura 1. Distribución de WAVE1 durante la maduración meiótica, fertilización y clivaje embrionario temprano.



(A) En el estadio de profase I, WAVE1 (verde) se concentra en la corteza y se distribuye en el citoplasma como fragmentos rodeando el núcleo. (B) Durante anaphase I de la meiosis I, WAVE1 aparece distribuída con un patrón punteado en el citoplasma. En este estadío, los oocitos muestran una reducida distribución de WAVE1 en la corteza. En detalle se muestra la concentración de WAVE1 en el cuerpo polar. (C) En oocitos arrestados en Metafase II, WAVE1 se localiza en una región en la corteza cercana a la placa metafásica (cabeza de flecha), y está significantemente reducida en el resto de la superficie oocitaria. (D) A las 8 h post inseminación (8 HPI), WAVE1 se distribuye con el pronúcleo femenino y masculino en formación. Las cabezas de flecha muestran a WAVE1 en la vaina mitocondrial del espermatozoide de toro. (E) A las 13 HPI, WAVE1 re-localiza dentro de los pronúcleos masculino y femenino. (F) A las 18 HPI, WAVE1 se concentra dentro de los pronúcleos en aposición. (G) En el estadío de 2 células, WAVE1 se localiza dentro de cada núcleo de las blastómeras en interfase. (H) Luego de la ruptura de la envoltura nuclear (NEBD), WAVE1 re-localiza en el citoplasma de cada blastómera, con los cromosomas condensados mostrados en el detalle. (I) En embriones de 3 células, WAVE1 se distribuye dentro de los núcleos en interfase de algunas blastómeras, pero está dispersa en el citoplasma cuando alguna de ellas sufre ruptura de la membrana nuclear. Notar la concentración de WAVE1 en el surco de clivaje. El ADN se muestra en los detalles de D-I. Las barras de A-F se muestran en F (10 µm) y para G-I en I (10 μm).

# Figura 2. Inyección de WGA no afecta la localización de WAVE1 durante la fertilización.



(A) Luego de la microinyección de WGA en oocitos en Metafase II y luego de FIV, la mayoría de los cigotos muestran una anormal formación de los pronúcleos a las 18 h post-inseminación. La aglutinina asociada a los complejos de poros nucleares se visualiza en el citoplasma y rodeando ambos pronúcleos. (A') En oocitos inyectados con FITC-WGA, WAVE1 se concentra dentro de los pronúcleos. (B) En oocitos inyectados controles, el complejo de poros nucleares (NPC) se distribuye alrededor de la envoltura nuclear de cada pronúcleo a través del citoplasma en forma punteada. (B') WAVE1 se concentra dentro de los pronúcleos en oocitos inyectados controles que



fueron sometidos a FIV. En A y B, el ADN está mostrado en los detalles. NS: no significativo. La barra representa 10  $\mu$ m.

Figura 3. La estabilización de los microtúbulos durante la fertilización afecta la distribución de WAVE1.



(A) La despolimerización de actina por citocalasina D no perturba la concentración de WAVE1 (verde) alrededor de los pronúcleos. El segundo cuerpo polar (PB) está enriquecido con WAVE1, pero no es expulsado. La actina cortical se visualiza en rojo. (B) La estabilización de actina por Jasplakinolide no altera ni la distribución de WAVE1, ni las distancias entre los pronúcleos comparando con los controles (ver Tabla 1). Los filamentos de actina (rojo) se distribuyen en todo el citoplasma y WAVE1 (verde) se concentra dentro de ambos pronúcleos. (C) Los cigotos controles muestran una distribución normal de actina (rojo) en el citoplasma y WAVE1 (verde) dentro de los pronúcleos. (D) La despolimerización de microtúbulos por nocodazol no altera la concentración de WAVE1 dentro de los pronúcleos, aunque las distancias pronucleares son ≥10 µm en la mayoría de las cigotos (ver Tabla 1). (E) La estabilización de los microtúbulos por taxol redistribuye a WAVE1 (verde) en el citoplasma, sin detectarse una localización nuclear. Se encontraron distancias inter-pronucleares de  $\geq 10 \ \mu m$  en la mayoría de los cigotos (ver Tabla 1), y se detectó una clara señal de WAVE1 en la zona del centrosoma (cabeza de flecha). (F) Los cigotos control muestran una distribución normal de microtúbulos (rojo) en el citoplasma y se visualiza WAVE1 (verde) dentro de los pronúcleos. (G) Luego del tratamiento con taxol, WAVE1 se asocia con la AKAP pericentrina (rojo) en la zona del centrosoma (cabeza de flecha). (H) Colocalización de WAVE1 (verde) y la proteína centrosómica  $\gamma$ -tubulina (rojo; cabeza de flecha). (I) No se detecta una co-distribución entre WAVE1 (verde) y dinactina en el centrosoma (cabeza de flecha). El ADN está representado en los detalles en los paneles A-F. Las barras representan 10 μm.

# Figura 4. Diferentes concentraciones de taxol alteran la distribución de WAVE1.



(A) Luego del tratamiento con 0,1μM de Taxol, WAVE1 se distribuye dentro de los pronúcleos masculino y femenino. (B) Luego de la incubación con 5μM de taxol, se visualiza WAVE1 cerca del áster espermático y no es más vista dentro de los pronúcleos. Notar que con esta concentración de taxol, los pronúcleos no sufren aposición. (C y D) Masiva polimerización de tubulina luego del



tratamiento con 10µM y 20µM de Taxol. En esos casos, se observan localizaciones de WAVE1 completamente anormales co-localizando con tubulina en el citoplasma.

Figura 5. WAVE1 co-localiza con PKA RII, p21 Arc y la subunidad p 150<sup>Glued</sup> de dinactina en diferentes estadíos durante el desarrollo.



(A) En oocitos en metafase II, se visualiza WAVE1 (verde) co-distribuyendo con PKA RII (rojo). (B) A las 18 h post-inseminación, los cigotos en dos pronúcleos muestran a WAVE1 (verde) concentrada dentro de los pronúcleos y PKA RII (rojo) enriquecida alrededor de la superficie de los pronúcleos y distribuída en todo el citoplasma. La co-localización entre WAVE1 y PKA RII se detecta en amarillo. (C) En oocitos en metafase II, WAVE1 co-distribuye con el complejo proteico Arp 2/3 (p21 Arc, rojo) en todo el citoplasma, y se concentra sola en una porción de la corteza cerca de la placa metafásica (cabeza de flecha). (D) En los cigotos luego de 18HPI, WAVE1 (verde) se localiza dentro de ambos pronúcleos, mientras que p21 Arc (rojo) los rodea del lado citoplásmico. (E) En oocitos arrestados en metafase II, no se observan co-localizaciones entre WAVE1 (verde) y Abl (rojo). (F) Sorprendentemente, en los cigotos con 2 pronúcleos existe una redistribución de Abl dentro de ellos en áreas donde la cromatina no está firmemente condensada. Se observa alguna co-localización de WAVE1 con Abl limitada a zonas específicas (cabeza de flecha). (G) En oocitos en metafase II se observa una co-distribución entre WAVE1 (verde) y dinactina (rojo). (H) En cigotos con dos pronúcleos, WAVE1 (verde) se concentra dentro de los pronúcleos, mientras que dinactina (roio) los rodea del lado del citoplasma. El ADN se muestra en los detalles de todos los paneles. En los oocitos en MII, las barras A, C, E y G se representan en G  $(10 \ \mu m) \ y \ para \ los \ cigotos \ (B, D, F \ y \ H) \ en \ H \ (10 \ \mu m).$ 



Figura 6. WAVE1 co-immunoprecipita con PKA RII y p21 Arc.



(A) En los pellets y sobrenadantes, luego de la inmunoprecipitación con WAVE1, se puede detectar una fuerte banda de aproximadamente 51 kDa, correspondiente a PKA RII. Esta banda también se detecta en los lisados totales pero no en la línea de sólo 'beads'. (B) En los pellets y sobrenadantes y en los lisados totales de los oocitos en metafase II, se puede detectar una banda de aproximadamente 21 kDa, correspondiente a p21 Arc. En contraste, se detecta p21 Arc en el sobrenadante de las IP pero no en los sobrenadantes aislados de los cigotos. Como controles de células somáticas se utilizaron lisados completos de células bovinas aórticas endoteliales (BAE).

# Figura 7. Se requiere WAVE1 pero no Abl durante la aposición de los pronúcleos y desarrollo embrionario.



(A) Los cigotos transfectados con anticuerpos anti-WAVE1 muestran una redistribución de la proteína (verde) en el citoplasma, (ausente del interior de los pronúcleos). Las distancias interpronucleares son  $\ge 10 \ \mu$ m en la mayoría de los cigotos. (B) A las 36 h post-inseminación, los cigotos transfectados con anticuerpos anti-WAVE1 no mostraron clivaje, con la mayoría de ellos mostrando una separación entre los pronúcleos de  $\ge 10 \ \mu$ m. (C) Los cigotos transfectados con anticuerpos anti-Abl muestran a WAVE1 (verde) dentro de los pronúcleos y una re-distribución de Abl (rojo) citoplásmica. (D) A las 36 h post-inseminación, la mayoría de los cigotos transfectados con anticuerpos anti-Abl, clivaron en blastómeras hermanas, mostrando a WAVE1, pero no Abl, dentro de cada núcleo. El ADN se muestra en los detalles (A-D). La barra representa 10  $\mu$ m.



# Referencias

- Bishop, A.L., and Hall, A., 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, 241-255.
- Bomar, J., Moreira, P., Balise, J.J. and Collas, P., 2002. Differential regulation of maternal and paternal chromosome condensation in mitotic zygotes. *J.Cell Sci*.115, 2931-2940.
- Bornslaeger, E.A., Mattei, P.M., Schultz, R.M., 1988. Protein phosphorylation in meiotically competent and incompetent mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev* 1, 19-25.
- Colledge, M., and Scott, J.D., 1999. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 9, 216-221.
- Dekel, N., 1988. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. Ann. NY Acad. Sci. 541, 211-216.
- Edwards, A. S. and Scott, J. D., 2000. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 217-221.
- Eide, T., Carlson, C., Tasken, K.A., Hirano, T., Tasken, K., Collas, P., 2002. Distinct but overlapping domains of AKAP95 are implicated in chromosome condensation and condensin targeting. *EMBO* 3, 426-32.
- Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M. and Forbes, D. J., 1987. Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell Biol.* 104, 189-200.
- Hudson, A.M. and Cooley, L., 2002. A subset of dynamic actin rearrangements in Drosophila requires the Arp2/3 complex. *J.Cell Biol.* 156, 677–687.
- Keryer, G., Yassenko, M., Labbe, J.C., Castro, A., Lohmann, S.M., Evain-Brion, D., Tasken, K., 1998. Mitosis-specific phosphorylation and subcellular redistribution of the RII alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 34594-34602.
- Kovo, M., Schillace, R.V., Galiani, D., Josefsberg, L.B., Carr, D.W. and Dekel, N., 2002. Expression and modification of PKA and AKAPs during meiosis in rat oocytes. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 192, 105-113.
- Landsverk, H.B., Carlson, C.R., Steen, R.L., Vossebein, L., Herberg, F.W., Taskén, K. and Collas, P., 2001. Regulation of anchoring of the RIIα regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIIα: implications for chromosome dynamics at mitosis. *J. Cell Sci.* 114, 3255-3264.
- Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D., Higgs, H.N., 2001. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol* 3, 76–82.
- Miki, H. and Takenawa, T., 2003. Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem.* 134, 309–313.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T., 1998. WAVE, a novel WASP family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 17, 6932-6941.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G., 2001. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotech.* 19, 1173-1176.



- Mullins, R. D., 2000. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 91-96.
- Navara, C.S., First, N.L. and Schatten, G., 1994. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev. Biol.* 162, 29-40.
- Payne, C., Rawe, V.Y., Ramalho-Santos, J., Simerly, C. Schatten, G., 2003. Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *J.Cell Sci.* 116, 4727-4738.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., Mullins, R.D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29,545-576.
- Rawe, V.Y., Brugo Olmedo, S., Nodar, F.N., Ponzio, R., Sutovsky, P., 2003. Abnormal assembly of annulate lamellae: a possible explanation of fertilization arrest at two pronuclei stage. *Hum. Reprod.* 3, 576-582.
- Shumaker, D.K., Kuczmarski, E.R. and Goldman, R.D., 2003. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions *Curr.Opin.Cell Biol.* 15, 358–366.
- Sirard, M.A., Parrish, J.J., Ware, C.B., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L., 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39, 546-552.
- Skare P., Kreivi J-P., Bergstrom A., Karlsson R., 2003. Profilin I colocalizes with Speckles and Cajal bodies: A possible role in pre-mRNA splicing. *Exp. Cell Res.* 286, 12-21.
- Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J. and Scott, J.D., 2003. Loss of WAVE- causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 1723–1728.
- Sutovsky, P., Simerly, C., Hewitson, L. and Schatten, G., 1998. Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes. *J. Cell Sci.* 111, 2841-2854.
- Terada, Y., Simerly, C. and Schatten, G., 2000. Microfilaments stabilization by Jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, buy not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol. Reprod. and Dev.* 56, 89-98.
- Van Etten, R.A., 1999. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends in Cell Biology* 9, 179-186.
- Volkmann, N., Amann, K.J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D.C., Hazelwood, L., Heuser, J.E., Li, R., Pollard, T.D., Hanein, D., 2001. Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 293, 2456–2459.
- Westphal, R.S., Soderling, S.H., Alto, N.M., Langeberg, L.K., and Scott, J.D., 2000. Scar/WAVE-1, a Wiskott-Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. *EMBO J.* 19, 4589-4600.