

BUDOWA I FUNKCJE JAJOWODOWO SPECYFICZNEJ GLIKOPROTEINY 1*

STRUCTURE AND FUNCTION OVIDUCT-SPECIFIC GLYCOPROTEIN 1

Łukasz RAPAŁA¹, Rafał STARZYŃSKI², Piotr TRZECIAK¹, Anna Maria
DUSZEWSKA^{1,3}

¹Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Nauk Morfologicznych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ²Zakład Biologii Molekularnej i ³Zakład
Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Streszczenie: Jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 (OVGP1) zwana również pOSP, MUC-9, sOP92, EAP, EGP i OGP jest białkiem wytwarzanym przez komórki wydzielnicze nabłonka jajowodu u wielu gatunków ssaków. OVGP1 po uwolnieniu do płynu jajowodowego uczestniczy w procesie końcowego dojrzewania oocytów, w dokończeniu kapacytacji plemników, zapłodnieniu oocytów oraz wspomaga wczesny rozwój zarodka. Sekrecja i synteza OVGP1 jest ściśle kontrolowana przez hormony steroidowe wytwarzane przez jajniki i jest zależna od fazy cyklu płciowego. Badania molekularne nad OVGP1 wykazały konserwatyzm tego białka zarówno sekwencji nukleotydowej, jak i aminokwasowej. Główne różnice międzygatunkowe dotyczą regionu C terminalnego, w obrębie którego występują delecje, insercje oraz tandemowe powtórzenia z miejscami N- i O-glikozylacji. Reszty cukrowe przyłączone do OVGP1 chronią białko oraz wpływają na jego specyficzność i aktywność. Również inne modyfikacje potranslacyjne (fosforylacja, przyłączanie siarczanów, kwasu sjałowego) wpływają na różnorodność działania jajowodowo specyficznej glikoproteiny 1.

Słowa kluczowe: OVGP1, OGP, MUC 9, oocyt, plemnik, zarodek.

Summary: Oviduct specific glycoprotein 1 (OVGP1) also known as pOSP, MUC-9, sOP92, EAP, EGP and OGP, is produced by non-ciliated oviductal epithelium in many mammalian species. After its secretion to the oviductal fluid OVGP1 participates in the final gamete maturation, sperm capacitation, fertilization and supports early embryonic development. Secretion and expression of OVGP1 is regulated by steroid hormones and depends on the oestrus cycle. Molecular analysis of OVGP1 indicated that it is highly conserved at both amino acid and nucleotide levels. The main divergence has been observed in the carboxy terminal region containing deletions, insertions and tandem-repeat sequences containing O- and N- glycosylation sites. The carbohydrates protect OVGP1 protein and modulate its specificity and biological activity. Additionally, other post-translational modifications (phosphorylation, sialic acid residues, sulphation) contribute to the diversity of actions of OVGP1 among different species.

Keywords: OVGP1, OGP, MUC 9, oocyte, spermatozoa, embryo.

*Badania finansowane w ramach projektu COST: 453/N-COST/2009/0.

Jajowód ssaków jest wysoce wyspecjalizowaną strukturą, w której zachodzą takie procesy jak: dokończenie dojrzewania gamet, zapłodnienie oraz wczesny rozwój zarodków [22]. Organ ten wyściela nabłonek składający się z komórek urzęsionych i wydzielniczych. Komórki urzęsione są aktywnie zaangażowane w transport oocytów, plemników i zarodka, podczas gdy komórki wydzielnicze zapewniają mikrośrodowisko dla dojrzewania, zapłodnienia oraz rozwoju zygoty (zarodka). Stosunek komórek urzęsionych do wydzielniczych ulega zróżnicowaniu w zależności od gatunku oraz fazy cyklu płciowego. U bydła w fazie ciała żółtego wzrasta liczba komórek urzęsionych zarówno w bańce, jak i w lejku jajowodu, natomiast w okresie rui wzrasta liczba komórek wydzielniczych [36]. Komórki wydzielnicze produkują płyn jajowodowy, w skład którego wchodzi wiele substancji odżywczych (glukoza, mleczan, pirogronian, aminokwasy), ochronnych i regulujących (czynniki wzrostowe, hormony, proteazy, glikozydazy, antyoksydanty, glikozaminoglikany oraz wiele innych). Niektóre z nich biorą udział w ochronie oocytów i plemników przed stresem oksydacyjnym, inne modyfikują osłonkę przejrzystą, a także uczestniczą w zapłodnieniu i rozwoju zarodka [5]. Wiele z tych białek może zmieniać swoją aktywność oraz ilość w zależności od cyklu płciowego. Jednym z nich jest jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 – OVGP1 (ang. *oviduct-specific glycoprotein 1*) – największe i najważniejsze białko sekrecyjne w jajowodzie ssaków [6].

Jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 występuje również pod nazwą pOSP (ang. *oviduct secretory glycoprotein*; [4]), MUC-9 (ang. *mucin 9* [25]), sOP92 (ang. *oviduct glycoprotein* [14]), EAP (ang. *oestrus-associated glycoprotein* [23]), EGP (ang. *oviduct-specific, oestrus-associated glycoprotein* [16]), OGP (ang. *oviduct-specific glycoprotein* [34]). Została ona zidentyfikowana u różnych gatunków: królika [35], świni [10], krowy [39], myszy [40], chomika [42], pawiana [20], rezusa [47] i człowieka [45]. Glikoproteina ta wytwarzana jest przez komórki wydzielnicze nabłonka jajowodu i uwalniana do płynu jajowodowego [28]. Maksymalna synteza i ekspresja OVGP1 zachodzi podczas owulacji, zapłodnienia i we wczesnym okresie rozwoju zarodka [11]. U świń stwierdzono różne stężenia OVGP1 w poszczególnych częściach jajowodu, ze znaczącą aktywnością w lejku i w bańce [28].

Cechą charakterystyczną jajowodowo specyficznej glikoproteiny 1 jest jej konserwatywność, która u ssaków została wykazana zarówno w sekwencji nukleotydowej, jak i aminokwasowej [20, 28, 47]. Jest to białko o dużej masie molekularnej. W formie zredukowanej, zdenaturowanej wynosi ona od 66 do 350 kDa. OVGP1 może występować w postaci wielu izoform zarówno kwasowych, jak i zasadowych, a także w wariantach różniących się masą cząsteczkową. U świń występują 3 różne izoformy i dwa warianty różniące się masą [11], podczas gdy u krowy odkryto siedem takich izoform [48].

STRUKTURA GENU KODUJĄCEGO BIAŁKO OVGP1

Organizacja i struktura genetycznej sekwencji OVGP1 została opisana u wielu gatunków zwierząt. Sekwencja cDNA określona u pawiana, krowy, chomika, człowieka, myszy, świni, rezusa i owcy wykazała bardzo dużą konserwatywność sięgającą 70–78% identyczności i 76–87% podobieństwa [11].

Lokalizacja genu kodującego białko OVGP1 na chromosomie jest różna w zależności od gatunku. U myszy gen *ovgp1* zlokalizowany jest na chromosomie 3 w pozycji F3 [3], u królika na chromosomie 13 [18], u świni na chromosomie 4 [31], natomiast u człowieka na chromosomie 1 w pozycji p13 [19].

U myszy wielkość genu kodującego OVGP1 (*mogp-1*) wynosi 13,4 kpz. Składa się on z 11 egzonów i 10 intronów. W pozycji -29 w regionie promotorowym przy końcu 5' gen *mogp-1* ma sekwencję TATTAA, jednak brak jest klasycznych sekwencji (TATA/GC) charakterystycznych dla tego regionu. W pozycji -36 znajduje się sekwencja CAAC przypominająca CAAT, która u innych gatunków zajmuje najczęściej pozycję -77 (± 10). Jej rola w *mogp-1* nie jest do końca poznana. Analiza sekwencji regionu 5' wykazała istnienie wielu regionów regulatorowych wpływających na ekspresję genu *mogp-1* m.in. niepełną sekwencję wrażliwą na estrogeny ERE (ang. *estrogen-responsive enhancer element*), do której może przyłączać się estradiol [43].

Struktura genu kodującego białko OVGP1 jest zbliżona u wielu gatunków zwierząt, choć występują pewne różnice. U królików egzon 11 jest krótszy i brak w nim tandemowych powtórzeń bogatych w reszty Ser/Thr. Także trzeci intron jest o 84 pz dłuższy niż u innych gatunków. W obrębie regionu promotorowego zlokalizowano niepełną sekwencję wrażliwą na estrogeny ERE oraz przypuszczalną sekwencję TATA zlokalizowaną powyżej miejsca startu transkrypcji. Sekwencja ERE została również wykryta u człowieka, chomika, a kasetę TATA dodatkowo u ludzi. Region promotorowy u człowieka i chomika zawiera mikrosatelitarne powtórzenia (GT)_n pomiędzy sekwencją ERE a kasetą TATA [30]. Dodatkowo sekwencjonowanie tego regionu u różnych linii królików wykazało istnienie regionu INDEL (polimorfizm insercyjno-delecyjny), 8 pojedynczych polimorfizmów nukleotydowych SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) oraz trójallelicznych mikrosatelit (GT)₁₅T(G)₅, (GT)₁₄T(G)₅ i (GT)₁₁T(G)₇. Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, że obecność SNP i mikrosatelit w regionie promotorowym związana jest z regulacją ekspresji genów. Dokładny mechanizm nie jest do końca poznany, jednak sugeruje się, że polimorfizm wpływa na miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, strukturę chromatyny czy konformację DNA [30]. Dalsze badania wykazały, że w egzonie 11 również występuje pojedynczy nukleotydowy polimorfizm 12944C>G. Obecność różnych genotypów może mieć wpływ na przeżycie oraz rozwój zarodków. SNP był wykrywany u królików, które były specjalnie selekcjonowane na podstawie pojemności macicy. Udowodniono, że genotypy GG w SNP egzonu 11 i mikrosatelita (GT)₁₄T(G)₅/(GT)₁₄T(G)₅ w regionie promotorowym są korzystne dla przeżycia wczesnych zarodków opóźniając jednocześnie ich rozwój w początkowym etapie ciąży [15]. Mogą mieć również pozytywny wpływ na rozwój zarodków i ich implantację oraz liczbę urodzeń [29].

Większość różnic międzygatunkowych w sekwencji OVGP1 jest zlokalizowana w egzonie 11 kodującym C-terminalny koniec białka [46]. Dotyczą one długości glikoproteiny (różnica 141-335 aminokwasów [11]), na którą mają wpływ delecje, insercje [38] oraz tandemowe powtórzenia bogate w reszty Ser-Thr [12]. Sekwencja tandemowych powtórzeń nie jest konserwatywna i różni się (także ilością) u

poszczególnych gatunków. W przypadku chomika i człowieka wykryto niezwykle stopień podobieństwa w sekwencji i długości tandemowych powtórzeń zawierających po 15 aminokwasów [25]. U chomika występuje 6 takich powtórzeń, u człowieka, pawiana i rezusa tylko 4, podczas gdy u krowy, owcy i świni sekwencje są niekompletne lub w ogóle nie występują. Myszy mają na C-terminalnym końcu 21 powtarzających się sekwencji (każda po 7 aminokwasów). W obrębie tandemowych powtórzeń, zlokalizowanych w jednym egzonie, znajdują się wszystkie O-glikozylowane reszty cukrowe [11].

REGULACJA EKSPRESJI OVGP1

U wielu gatunków zwierząt synteza OVGP1 jest zależna od cyklu płciowego i ściśle kontrolowana przez hormony steroidowe wytwarzane przez jajniki [2]. Różnice w poziomie transkrypcji mRNA OVGP1 są ściśle skorelowane ze zmieniającym się stężeniem 17β -estradiolu w określonych fazach cyklu płciowego [11]. Badania nad regionem promotorowym u myszy wykazały wpływ 17β -estradiolu jako czynnika regulującego transkrypcję genu *mogp-1*. Możliwe, że bardzo duży wpływ na ekspresję genu ma sekwencja ERE w regionie promotorowym, do której wiąże się ten hormon. Jednak dalsze badania są niezbędne do poznania dokładnych mechanizmów regulacji transkrypcji [43].

U chomików technika *Northern blot* nie wykazała drastycznych różnic w poziomie ekspresji OVGP1 podczas cyklu rujowego, jednak hybrydyzacja *in situ* wyraźnie wykazuje różny poziom ekspresji w poszczególnych dniach cyklu, zwłaszcza w rejonie bańki jajowodu. U tych zwierząt po przeprowadzeniu owariektomii lub po dodaniu analogu gonadoliberyny (GnRH), zmniejsza się poziom 17β -estradiolu i tym samym znacząco obniża się stężenie OVGP1. Po podaniu 17β -estradiolu, w przypadku zwierząt traktowanych GnRH ekspresja OVGP1 zostaje przywrócona, podczas gdy dodanie progesteronu antagonizuje ten proces [24].

Wzrost 17β -estradiolu u kobiet powodował podwyższenie poziomu mRNA OVGP1 w tkance jajowodowej do maksymalnego poziomu [4], taki sam efekt był wywołany u świń w pierwszych dwóch dniach rui. Co więcej, podczas okresu maksymalnej ekspresji mRNA OVGP1 w tkance jajowodowej zaobserwowano wzrost pęcherzyków wydzielniczych zawierających białko OVGP1. Zwiększał się jednocześnie poziom samego białka w płynie jajowodowym. W okresie porujowym u świń, czy w fazie lutealnej u kobiet poziom mRNA i białka OVGP1 jest bardzo niski bądź niewykrywalny [11].

Poziom białka OVGP1 może być również regulowany przez LH (hormon lutenizujący) i hCG (gonadotropina kosmówkowa). Badania *in vitro* na błonka jajowodu krów wykazały obecność receptora LH/hCG, który po związaniu LH lub hCG wpływa na wzrost poziomu OVGP1. Nie zaobserwowano zwiększonego poziomu mRNA OVGP1, ale wzrosła stabilność transkryptu jajowodowo specyficznej glikoproteiny 1 [41].

MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE OVGP1

Jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 należy do osiemnastej rodziny białek: glikolaz hydrolazowych, których cechą charakterystyczną jest zdolność hydrolizy chityny [5, 21, 28]. Domena odpowiedzialna za hydrolizę chityny występuje w białku OVGP1 i jest wysoce konserwatywna u wszystkich gatunków [25], jednak z powodu braku kluczowych reszt kwasu glutaminowego nie wykazuje aktywności hydrolitycznej [11]. Sama obecność regionu zbliżonego do domeny katalitycznej chitynaz może wpływać na zdolność wiązania się do reszt cukrowych, dzięki czemu OVGP1 może łączyć się z glikoproteinami tworzącymi osłonkę przejrzystą [27].

W obrębie cDNA możemy wyróżnić 21 aminokwasową sekwencję sygnałną, która w białku jest odcinana po przejściu przez retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego [4] pozostawiając dojrzały polipeptyd zawierający w zależności od gatunku 527-721 aminokwasów [11]. W dojrzałym polipeptydzie możemy wyróżnić region N-terminalny charakteryzujący się dużą konserwatywnością oraz region C-terminalny, w obrębie którego wykryto wiele różnic między gatunkami [5, 12, 38]. Identyeczność w regionie N-terminalnym sięga 77–84%, a podobieństwo 86–90%, natomiast w regionie C-terminalnym identyczność występuje w granicach 37–63%, a podobieństwo 50–75%. Bydłęce, owcze i świńskie OVGP1 zbliżone jest do siebie pod względem długości i sekwencji, podobnie jak OVGP1 ludzkie, pawianie i rezusie [11].

Różnice w OVGP1 wynikają głównie ze stopnia glikozylacji tego białka. Reszty cukrowe są jednym z głównych komponentów glikoproteiny. Większość cukrów związana jest wiązaniem O-glikozydowym, jednakże miejsca N-glikozylacji są również obecne [12]. Przypuszczalnie N-glikozylowanych miejsc jest od 1 do 7 natomiast O-glikozylowanych od 10 do 20 (z wyjątkiem myszy, u których wykryto łącznie 67 takich miejsc). Są one bardzo ważne w zachowaniu biologicznej aktywności białka i w utrzymaniu jego zewnątrzkomórkowej rozpuszczalności. Usunięcie kwasu sialowego i N-glikozylowanych reszt cukrowych w bydłowym OVGP1 znacząco redukuje żywotność plemników. Całkowita deglikozylacja powoduje nierozpuszczalność białka. Dodatkowo chronią one białko przed degradacją proteolityczną, utrzymują odpowiednią konformację, a także uczestniczą w interakcjach typu białko-białko. Różnice w ilości tandemowych powtórzeń, obecność i umiejscowienie N- oraz O-glikozylowanych reszt cukrowych, różnorodność tych łańcuchów i różna długość C-terminalnego regionu może nadawać różnorodność międzygatunkową, pośredniczyć w specyficznym rozpoznaniu celu i bezpośrednio regulować biologiczną aktywność OVGP1 [11]. Istnieje hipoteza o udziale reszt cukrowych w ochronie przed infekcją jajowodu. Wiele patogennych mikroorganizmów używa cukrowych struktur jako receptorów do rozpoznania i penetracji specyficznych tkanek i komórek. Obecność powtarzających się wzorów cukrowych w płynie jajowodowym może być odpowiedzialna za wiązanie się patogenów i ich eliminację z jajowodu (patogeny łącząc się z resztami cukrowymi nie infekują komórek i wraz z ruchem płynu jajowodowego eliminowane są z jajowodu). Zastanawiający jest fakt, że OVGP1 u różnych gatunków ssaków ma bardzo rozbieżne tandemowe powtórzenia z

glikozylowanymi miejscami, podczas gdy reszta molekuly jest wysoce konserwatywna. To sugeruje, że region zawierający te powtórzenia ewoluował bardzo szybko, pod bardzo dużą presją ze strony środowiska. Możliwe, że celem było rozpoznanie gatunkowo specyficznych patogenów [25].

O ważności C-terminalnej domeny świadczy również doświadczenie przeprowadzone przez Yonga i współpracowników w 2002 roku [49], w którym wykorzystano przeciwciała anty-królicze skierowane przeciwko regionowi C-terminalnemu w króliczej OVGP1. Tak zablokowane białko uniemożliwiało zarodkom myszy przejście przez blok w warunkach hodowli *in vitro* w stadium dwóch blastomerów. Przeciwciała przeciwko N-terminalnemu regionowi nie blokowały tego procesu.

Potranslacyjne modyfikacje nadają biologicznie specyficznych cech i mogą wpływać na interakcje białko-białko, białko-komórka (płemnik, błona komórkowa komórki jajowej, osłonka przejrzysta, błona komórkowa wczesnych zarodków) [11]. Prekursor cukrowy jest identyczny zarówno przy N-, jak i O-glikozylacji. Zawiera kwas sialowy z wiązaniami $\alpha(2,3)$, $\alpha(2,6)$, galaktozę, N-acetylogalaktozaminę, α -fukozę, galaktozyl- $\beta(1,3)$ -N-acetylgalaktozaminę, N-acetyloglukozaminę i mannozę [37]. Dodatkowo u królików, chomików i świń OVGP1 jest modyfikowane przez dodanie nieorganicznych siarczanów. Pomimo że miejsca fosforylacji można przewidzieć, zidentyfikowano je tylko u świń. Różne izoformy w obrębie jednego gatunku mogą być rezultatem różnorodnych reszt kwasu sialowego, różnych cukrów, przyłączania siarczanów i fosforylacji [11].

LOKALIZACJA I FUNKCJE OVGP1

OVGP1 po uwolnieniu do płynu jajowodowego łączy się z oocytami i plemnikami korzystnie wpływając na ich dojrzewanie oraz wczesny rozwój zarodków. Lokalizacja OVGP1 w gametach i zarodkach została szczegółowo opisana i udokumentowana [13, 21, 22, 26, 28, 33, 38]. Liczne badania immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne potwierdzają wiązanie się białka OVGP1 do oocytu i zarodków [26]. Jego obecność stwierdzono w osłonce przejrzystej – ZP (łac. *zona pellucida*), w przestrzeni okołożółtkowej, w błonie komórkowej oocytu oraz zarodków będących na wczesnym etapie rozwoju. To zjawisko jest powszechne u wszystkich gatunków ssaków i odgrywa kluczową rolę w regulowaniu procesu zapłodnienia i rozwoju zarodka [11]. Przy zapłodnieniu bardzo ważną rolę odgrywają reszty cukrowe znajdujące się na główce plemnika i receptorach osłonki przejrzystej. Możliwe, że OVGP1 poprzez asocjację z osłonką przejrzystą odgrywa kluczową rolę w gatunkowo specyficznych interakcjach pomiędzy ZP a plemnikiem [38]. Może mieć ono również wpływ na obniżenie zjawiska polispermii. Istnieje hipoteza, że białko to, akumulowane w przestrzeni okołożółtkowej, może łączyć się z innymi białkami w części korowej oocytu powodując szybkie zmiany w osłonce przejrzystej zapobiegając w ten sposób polispermii [17]. Wiązanie jajowodowo specyficznej glikoproteiny 1 do osłonki przejrzystej jest stabilizowane przez heparynę lub inne białka

zawierające siarczany glikozaminoglikanów (GAG) [12, 13]. Takie połączenia modyfikują rozpuszczalność osłonki przejrzystej, zwiększając jej oporność na penetrację plemników. Plemnik przyłączając się do osłonki przejrzystej zapoczątkowuje reakcję akrosomalną polegającą na jej strawieniu, co w konsekwencji prowadzi do zapłodnienia. OVGP1 po przyłączeniu się do ZP maskuje miejsca przyłączania proteinaz wydłużając tym samym czas trawienia ZP [13]. Dojrzewanie osłonki przejrzystej jest niezbędne do nabycia niewrażliwości na proteiny dając możliwość selektywnego wyboru plemnika zapładniającego oocyt [7]. U bydła OVGP1 po przyłączeniu do osłonki przejrzystej pozostaje z nią związana do stadium blastocysty, natomiast u świń do momentu jej wyklucia [11].

Testy immunohistochemiczne wykazały wiązanie się OVGP1 z plemnikami [33]. W przypadku bydła miejscem wiązania jest główka i witka plemnika [23]. U chomików OVGP1 wiąże się do regionu akrosomowego, zarówno przed, jak i po kapacytacji. Ma ono również dodatni wpływ na ruchliwość i żywotność plemników u bydła. Podobne rezultaty uzyskano u świń po inkubacji plemników z OVGP1. Istnieje hipoteza, że jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 przyspiesza reakcję akrosomową i przyłączanie plemnika do osłonki przejrzystej [8, 11].

Jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 pełni również funkcję embriotroficzną [1, 21, 28]. Inkubacja owczych oocytów i plemników z OVGP1 podczas zapłodnienia *in vitro* – IVF (ang. *in vitro fertilization*) wykazała znaczący wzrost częstości podziałów i liczby blastocyst. Jednak dodanie tego białka do trwającej już hodowli zarodków nie wpływa na tempo ich podziałów. U świń dodanie OVGP1 podczas zapłodnienia nie wpłynęło na tempo podziału zarodka, ale zaobserwowano wzrost ich liczby. Potwierdzają to inne badania, w których wykazano, że hodowla zarodków w obecności OVGP1 wpływa na zwiększenie liczby blastocyst [1, 11].

Badania przeprowadzone na myszach z nokautem genu *ovgp1* (*ovgp1*^{-/-}) wykazały brak znaczących różnic w częstości zapłodnienia oocytów w porównaniu z myszami kontrolnymi (*ovgp1*^{+/+}). Oznacza to, że OVGP1 nie jest kluczowe w procesie zapłodnienia, przynajmniej w przypadku myszy [3]. Ponadto, badania przeprowadzone na koniach wykazały brak białka OVGP1 w jajowodzie. Istnieje również hipoteza sugerująca, że występuje ono w postaci pseudogenu – genu z nagromadzonymi mutacjami, w wyniku których utracił swoją aktywność [32]. Podobna sytuacja jest u szczurów [44].

Lokalizacja OVGP1 w gametach i zarodkach została szczegółowo opisana i udokumentowana [13, 21, 26, 28, 33, 38,]. Oprócz wymienionych powyżej miejsc białko to zostało wykryte również w filamentach osłonki przejrzystej, w endosomach, w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych i lizosomach (prawdopodobnie przeznaczone do degradacji). Badania wykazały istnienie dwóch form białka OVGP1 biorących udział w tworzeniu połączeń międzykomórkowych – formy zewnątrzkomórkowej oraz wewnątrzkomórkowej. Forma zewnątrzkomórkowa, wydzielana do płynu jajowodowego, została zlokalizowana w strukturach połączeń barierowych – TJs (ang. *tight junction*) w dzielących się zarodkach. W oocytach OVGP1 jest połączona z niemięśniową miozyną IIA odpowiedzialną za utrzymanie kształtu komórki,

biegunowość oraz proces morfogenezy. Analiza białka OVGP1 ujawniła obecność domeny PDZ, która pełni bardzo ważną rolę w tworzeniu wielobiałkowych kompleksów np. połączeń zamykających. Ekspresja OVGP1 jest skoordynowana z białkiem ZO-1 tworzącym rusztowanie dla innych białek w połączeniach międzykomórkowych, również zawierającym domenę PDZ. Obecność tych motywów w białku OVGP1, razem z potranslacyjnymi modyfikacjami, sugeruje ich rolę w komunikacji komórkowej, morfogenezie i rozwoju komórkowym. Forma wewnątrzkomórkowa, zlokalizowana w nabłonku jajowodu, współtworzy filamenty keratynowe związane z desmosomami [21].

PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę występowanie różnych izoform, a także możliwości modyfikacji potranslacyjnych u poszczególnych gatunków wydaje się, że niezbędne są dalsze badania nad OVGP1. Pozwolą one stwierdzić, czy jajowodowo specyficzna glikoproteina 1 występująca w osłonce przejrzystej, w przestrzeni okołozółtkowej, w błonie komórkowej oocyty, czy zarodka istnieje w odmiennych formach mających różną aktywność i miejsca specyficznego wiązania. Występowanie izoform z różniącymi się resztami cukrowymi i liczbą łańcuchów cukrowych, z różnym powinowactwem do receptorów błonowych osłonki przejrzystej i błony komórkowej może w przyszłości dać wiele możliwości w regulowaniu biologicznych procesów związanych z zapłodnieniem czy rozwojem zarodka [11]. Ważne jest również zbadanie mechanizmów molekularnych indukujących powstanie różnych izoform OVGP1 oraz dokładne poznanie regulacji ekspresji jajowodowo specyficznej glikoproteiny 1 [28].

LITERATURA

- [1] ABE H, HOSHI H. Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* 1997; **23**(1–3): 171–183.
- [2] ABE H, SATOH T, HOSHI H. Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. *J Reprod Fertil* 1998; **112**(1): 157–163.
- [3] ARAKI Y, NOHARA M, YOSHIDA-KOMIYA H, KURAMOUCHI T, ITO M, HOSHI H, SHINKAI Y, SENDAI Y. Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochem J* 2003; **374**: 551–557.
- [4] ARIAS EB, VERHAGE HG, JAFFE RC. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* 1994; **51**: 685–694.
- [5] AVILÉS M, GUTIÉRREZ-ADÁNA, COY P. Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 2010; **16**(12): 896–906.
- [6] BAUERSACHS S, REHFELD S, ULBRICH SE, MALLOK S, PRELLE K, WENIGERKIND H, EINSPIANIER R, BLUM H, WOLF E. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 2004; **32**: 449–466.
- [7] BEDFORD JM. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004; **79**(2): 429–460.
- [8] BOATMAN DE, MAGNONI GE. Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biol Reprod* 1995; **52**(1): 199–207.
- [9] BUHI WC, ALVAREZ IM, CHOI I, CLEAVER BD, SIMMEN FA. Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1305–1314.

- [10] BUHI WC, ALVAREZ IM, SUDHIPONG V, DONES-SMITH MM. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory protein. *Biol Reprod* 1990; **43**: 929–938.
- [11] BUHI WC. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 2002; **123**(3): 355–362.
- [12] COY P, AVILÉS M. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc* 2010; **85**: 593–605.
- [13] COY P, CÁNOVAS S, MONDÉJAR I, SAAVEDRAMD, 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 USA* 2008; **105**(41): 15809–15814.
- [14] GANDOLFI F, MODINA S, BREVINI TAL, GALLI C, MOOR RM, LAURIA A. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem* 1991; **35**: 383–392.
- [15] GARCÍA ML, PEIRÓ R, ARGENTE MJ, MERCHÁN M, FOLCH JM, BLASCO A, SANTACREU MA. Investigation of the oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) gene associated with embryo survival and development in the rabbit. *J Anim Sci* 2010; **88**(5): 1597–1602.
- [16] HILL JL, WALKER SK, BROWN GH, NANCARROW CD. The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. *Theriogenology* 1996; **46**: 1367–1377.
- [17] HILL, J.L.; WALKER, S.K.; BROWN, G.H.; NANCARROW, C.D. The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the *in vitro* fertilization and development of ovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1996; **46**(8): 1379–1388.
- [18] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100008811>
- [19] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5016>
- [20] JAFFE RC, ARIAS EB, O'DAY-BOWMAN MB, DONNELLY KM, MAVROGIANIS PA, VERHAGE HG. Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 1996; **55**: 421–426.
- [21] KADAM KM, D'SOUZA SJ, NATRAJ U. Identification of cellular isoform of oviduct-specific glycoprotein: role in oviduct tissue remodeling? *Cell Tissue Res* 2007; **330**: 545–556.
- [22] KILLIAN GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2004; **82–83**: 141–153.
- [23] KING RS, KILLIAN GJ. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod* 1994; **51**: 34–42.
- [24] KOMIYA H, ONUMAT, HIROI M, ARAKI Y. *In situ* localization of messenger ribonucleic acid for an oviduct-specific glycoprotein during various hormonal conditions in the golden hamster. *Biol Reprod* 1996; **55**(5): 1107–1118.
- [25] LAPENSÉE L, PAQUETTE Y, BLEAU G. Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril* 1997; **68**(4): 702–708.
- [26] LLOYD RE, ROMAR R, MATÁS C, GUTIÉRREZ-ADÁN A, HOLT WV, COY P. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced *in vitro*. *Reproduction* 2009; **137**(4): 679–687.
- [27] MALETTE B, PAQUETTE Y, MERLEN Y, BLEAU G. Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 1995; **41**(3): 384–397.
- [28] MCCAULEY TC, BUHI WC, WU GM, MAO J, CAAMANO JN, DIDION BA, DAY BN. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 2003; **69**: 828–834.
- [29] MERCHÁN M, PEIRÓ R, ARGENTE MJ, SANTACREU MA, GARCÍA ML, BLASCO A, FOLCH JM. Analysis of the oviductal glycoprotein 1 polymorphisms and their effects on components of litter size in rabbits. *Anim Genet* 2009; **40**(5): 756–758.
- [30] MERCHÁN M, PEIRÓ R, SANTACREU MA, FRANCINO O, FOLCH JM. Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: genomic organization polymorphism analysis and mRNA expression. *Mol Reprod Dev* 2007; **74**(6): 687–693.
- [31] MERCHÁN M, RENDÓN M, FOLCH JM. Assignment of the oviductal glycoprotein 1 gene (OVGP1) to porcine chromosome 4q22q23 by radiation hybrid panel mapping. *Cytogenet Genome Res* 2006; **114**: 93.
- [32] MUGNIER S, KERVELLAM, DOUET C, CANEPA S, PASCAL G, DELEUZE S, DUCHAMP G, MONGET P, GOUDET G. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine *in vitro* fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod Biol Endocrinol* 2009; **19**: 7: 129.

- [33] NATRAJ U, BHATT P, VANAGE G, MOODBIDRI SB. Overexpression of monkey oviductal protein: purification and characterization of recombinant protein and its antibodies. *Biol Reprod* 2002; **67**(6): 1897–1906.
- [34] O'DAY-BOWMAN MB, MAVROGIANIS PA, REUTER LM, JOHNSON DE, FAZLEABAS AT, VERHAGE HG. Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following *in vitro* incubation. *Biol Reprod* 1996; **54**: 60–69.
- [35] OLIPHANT G, REYNOLDS AB, SMITH PF, ROSS PR, MARTA JS. Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biol Reprod* 1984; **31**: 165–174.
- [36] ROTTMAYER R, ULBRICH SE, KÖLLE S, PRELLE K, NEUMUELLER C, SINOWATZ F, MEYER HH, WOLF E, HIENDLEDER S. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction* 2006; **132**: 637–648.
- [37] SATOH T, ABE H, SENDAI Y, IWATA H AND HOSHI H. Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1266**: 117–123.
- [38] SCHMIDT A, MAVROGIANIS PA, O'DAY-BOWMAN MB, VERHAGE HG. Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997; **46**(2): 201–207.
- [39] SENDAI Y, ABE H, KIKUCHI M, SATOH T, HOSHI H. Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1994; **50**: 927–934.
- [40] SENDAI Y, KOMIYA H, SUZUKI K, ONUMA T, KIKUCHI M, HOSHI H, ARAKI Y. Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1995; **53**: 285–294.
- [41] SUN T., Z.M LEI AND CH.V RAO. A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **131**(1): 97–108.
- [42] SUZUKI K, SENDAI Y, ONUMA T, HOSHI H, HIROI M, ARAKI Y. Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1995; **53**: 345–354.
- [43] TAKAHASHI K, SENDAI Y, MATSUDA Y, HOSHI H, HIROI M, ARAKI Y. Mouse oviduct-specific glycoprotein gene: genomic organization and structure of the 5'-flanking regulatory region. *Biol Reprod* 2000; **62**(2): 217–226.
- [44] TIAN X, PASCAL G, FOUCHÉCOURT S, PONTAROTTI P, MONGET P. Gene birth, death, and divergence: the different scenarios of reproduction-related gene evolution. *Biol Reprod* 2009; **80**(4): 616–621.
- [45] VERHAGE HG, FAZLEABAS AT, DONNELLY K. The *in vitro* synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* 1988; **122**: 1639–1645.
- [46] VERHAGE HG, FAZLEABAS AT, MAVROGIANIS PA, O'DAY-BOWMAN MB, DONNELLY KM, ARIAS EB, JAFFE RC. The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Hum Reprod Update* 1997; **3**(6): 541–552.
- [47] VERHAGE HG, MAVROGIANIS PA, BOOMSMARA, SCHMIDT A, BRENNER RM, SLAYDEN OV, JAFFE RC. Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biol Reprod* 1997; **57**: 525–531.
- [48] VIEIRA EG, CHAPMAN DA AND KILLIAN GJ. Evidence for multiple forms of estrus-associated protein in bovine oviductal fluid associated with oviduct region and stage of the estrous cycle. *Biol Reprod* 1999; **60** (Supplement 1): 202.
- [49] YONG P, GU Z, LUO JP, WANG JR, TSO JK. Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell Res* 2002; **12**(1): 69–78.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 12.05. 2011 r.

Przyjęto: 04.07. 2011 r.

Łukasz Rapała

Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Nauk Morfologicznych, SGGW

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

E-mail: lukas6885@gmail.com