Universidad de la República Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas Área Biología – Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

## Identificación de genes de expresión diferencial durante la profase meiótica masculina de la rata. Caracterización de *CCDC14*: un gen con posible función en la espermatogénesis.

### Lic. Evangelina González López

Orientadora: Dra. Adriana Geisinger

Tribunal de Tesis: Dra. Nibia Berois Dra. Estela Castillo Dra. Rossana Sapiro

2013

#### AGRADECIMIENTOS

No podría empezar esta Tesis de otra manera que no fuera agradeciendo a mis padres, Edel y César, las dos personas que siempre me han alentado e instado a perseverar a lo largo de mi vida y en esta carrera. Su cariño, su apoyo incondicional y las herramientas y valores que me han brindado han sido fundamentales en el camino transitado y en el que aún queda por recorrer.

Agradezco también a toda mi familia, la que está más cerca y la que está más lejos, especialmente a mi hermano Gabriel y a mi primo José que, además de su apoyo, me han brindado su compañía siempre. El agradecimiento a mi familia se extiende de una manera muy especial a mi tía Alondra, mi gran mentora y ejemplo de vida, que si bien hoy no está conmigo aquí, sé que me acompaña y guía desde algún lugar.

Vaya un agradecimiento enorme a todos mis compañeros y amigos del Departamento de Biología Molecular del IIBCE que me acompañaron durante el desarrollo de esta Tesis e hicieron de nuestro laboratorio un lugar de trabajo muy cálido y ameno. Agradezco especialmente a la Lic. Graciela Clivio, el Lic. Andrés Goldman y el Lic. Gabriel Lassabe por su colaboración en parte de este trabajo, y por su compañía. Un agradecimiento más especial aún a mi orientadora, la Dra. Adriana Geisinger, por brindarme todo su conocimiento, apoyo e ideas, y también por los rezongos y su paciencia.

Agradezco también a todos los investigadores de distintos laboratorios del IIBCE que amablemente prestaron equipos y reactivos para el desarrollo de esta Tesis. Quisiera mencionar de manera especial a la Dra. Alejandra Kun por instruirme, brindarme su tiempo y sus conocimientos durante el desarrollo de una pasantía en el Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos del IIBCE.

Gracias al Fondo Clemente Estable y CSIC, por la financiación de proyectos de investigación en el marco de los cuales se realizó esta Tesis.

Agradezco profundamente también, a las integrantes del tribunal, Dras. Nibia Berois, Rossana Sapiro y Estela Castillo, por la dedicada lectura de esta extensa Tesis y por sus críticas y sugerencias sumamente constructivas. Finalmente, agradezco a todos los amigos y compañeros que forman parte de mi vida, los de acá, de más allá y de todos lados, por su apoyo y aliento durante la realización, la redacción y la defensa de la presente Tesis de Maestría.

#### ABREVIATURAS

- A<sub>260</sub> absorbancia a 260 nm
- A280 absorbancia a 280 nm
- aa aminoácidos
- ADNc ADN copia
- ADNg ADN genómico
- amp ampicilina
- ARNm ARN mensajero
- ARNr ARN ribosomal
- b bases
- BrEt bromuro de etidio
- CCDC14 "Coiled coil domain-containing 14"
- CNEA Comisión Nacional de Experimentación Animal
- CS complejo sinaptonémico
- DD "mRNA differential display"
- DO densidad óptica
- DMPC dimetil pirocarbonato
- dpp días posparto
- EST "Expressed sequence tag"

#### GST - glutatión-S-transferasa

- hnRNPs ribonucleopartículas heterogéneas
- hPIP1 "PAK/PLC interacting protein"
- IIBCE Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
- IPMON Institut Pasteur de Montevideo
- min. minutos
- mtch2 "Mitochondrial carrier homolog 2"
- NLS señal de localización nuclear
- o.n. toda la noche
- ORF marco de lectura abierto
- pb pares de bases
- PCR reacción en cadena de la polimerasa
- PEG polietilenglicol
- PFA paraformaldehído
- Pik3r3 "Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3"
- RNP ribonucleoproteína
- rpm revoluciones por minuto
- RRM motivo de reconocimiento de ARN
- RT transcripción reversa o transcriptasa reversa

RT-PCR – transcripción reversa seguida de PCR

seg. - segundos

TARDBP - "TAR-binding protein"

TBP – "TATA Binding Protein"

tet - tetraciclina

TRIM27 - "Tripartite motif protein 27"

ufp - unidades formadoras de playas de lisis

UTR – región no traducida

UV - ultravioleta

### ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. MARCO TEÓRICO	3
2.1.1. Reproducción sexual en los organismos pluricelulares	3
2.1.2. La gónada masculina: desarrollo y estructura en los mamíferos.	4
2.1.3. Generalidades de la espermatogénesis en los mamíferos	5
2.1.3.1. Proliferación	7
2.1.3.2. <i>Meiosis</i>	7
2.1.3.3. Espermiogénesis	8
2.1.4. La meiosis en los mamíferos	8
2.1.5. Estudio molecular de la meiosis en los mamíferos	11
2.1.6. Expresión génica durante la meiosis y a lo largo de la	
espermatogénesis en general: características peculiares	14
2.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DE ESTE TRABAJO	18
2.2.1. "mRNA Differential Display"	19
2.2.2. Análisis de bandas diferenciales: identificación y caracterización	
de los genes <i>pecanex-1</i> y <i>Spats1</i>	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVOS GENERALES	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	24
4.1.1. Soluciones	24
4.1.2. Medios de cultivo	25
4.2. ANIMALES	26
4.2.1. Especies y cepas empleadas	26
4.2.2. Disección de tejidos	26
4.2.3. Suspensiones celulares y preparación de lisados proteicos	26
4.2.4. Cortes histológicos	27
4.3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	28
4.3.1. Extracciones de ARN total	28
4.3.2. Minipreparaciones y midipreparaciones de ADN plasmídico	28

4.3.3. Electroforesis en geles comunes de agarosa	
4.3.4. Elución y purificación de bandas de geles de agarosa	
4.3.5. Cuantificación de ácidos nucléicos	
4.3.6. Digestión con enzimas de restricción	
4.3.7. Electroforesis en geles de agarosa conteniendo bisber	nzimida-
PEG	
4.3.8. Secuenciación de ácidos nucleicos	
4.3.9. Análisis bioinformático de secuencias	
4.3.10. RT-PCR	
4.3.10.1. Diseño de iniciadores	
4.3.10.2. Transcripción reversa	
4.3.10.3. Condiciones de amplificación	
4.3.11. Northern blot	
4.3.12. Hibridación in situ con inmunohistoquímica	·····
4.3.13. Rastreo de genoteca de ADNc	
4.3.14. Reacciones de clonado	
4.3.14.1. Preparación de células competentes	······
4.3.14.2. Ligación en vector pGEM-T Easy y transforma células DH10B	ación de
4.3.14.3. Ligación en vector pGEX-5X-3 y transforma	ción de
células BL21 Star	
.4. MANIPULACIONES DE PROTEÍNAS	
4.4.1. Producción de anticuerpos policlonales	
4.4.2. Purificación del suero mediante cromatografía de afinida	ad
4.4.3. Depleción de los anticuerpos anti-GST n	nediante
inmunoprecipitación	······
4.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	······
4.4.5. Western blot	
RESULTADOS	
.1. ANÁLISIS DE BANDAS DIFERENCIALES OBTENIDAS EN EL D	D
5.1.1. Selección y análisis inicial de bandas	
5.1.2. Diferenciación de clones de igual tamaño y distinta se	cuencia:
análisis de patrones de restricción y electroforesis en g	jeles de
agarosa con bisbenzimida-PEG	
5.1.3. Análisis de secuencias, selección de bandas de ir	nterés y
	-

5.2. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE "COILED COIL DOMAIN
CONTAINING 14"
5.2.1. Rastreo de genoteca de espermatocitos paquiténicos y
obtención de la secuencia completa de <i>CCDC14</i>
5.2.2. Reconfirmación del patrón de expresión diferencial y
profundización en la caracterización de la expresión testicular de
CCDC14
5.2.3. Cionado de parte de la secuencia codificante de CCDC14 en un
5 2 3 1 Clonado do la socuencia
5.2.3.1. Cionado de la secuencia
5.2.3.3 Invección de coneios obtención del suero y ensavos de
inmunodetección
6. DISCUSIÓN
6.1. ANÁLISIS DE BANDAS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE
ESPERMATOCITOS PAQUITÉNICOS, OBTENIDAS MEDIANTE DD
6.1.1. Análisis inicial de 123 clones correspondientes a 11 bandas del
DD
6.1.2. Selección de secuencias de interés, y confirmación del patrón
de expresión diferencial de meiosis
6.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CCDC14, UN GEN QUE
CODIFICA PARA UNA PROTEÍNA CON POSIBLE FUNCIÓN EN LA
ESPERMATOGÈNESIS DE LOS MAMÍFEROS
6.2.1. Confirmación del patrón de expresión de <i>CCDC14</i>
6.2.2. Identificación de la secuencia codificante completa del gen
CCDC14 y estudio de la proteina predicha
6.2.3. Obtención de un suero policional anti-CCDC14 y caracterización
de la proteina endogena
7 CONCLUSIONES
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
ANEXO A. SECUENCIAS
A.1. SECUENCIAS DE BANDAS DEL DD
A.2. SECUENCIAS DE CLONES POSITIVOS DEL RASTREO DE GENOTECA
DE ADNC DE ESPERMATOCITOS PAQUITÉNICOS

A.3. SECUENCIAS DE LA REGIÓN CODIFICANTE COMPLETA DE CCDC14.	129

ANEXO B.	FIGURAS SUPLEMENTARIAS	132
----------	------------------------	-----

#### RESUMEN

La espermatogénesis, el complejo proceso de desarrollo y diferenciación de los gametos masculinos, los espermatozoides maduros, es esencial para todos los organismos con reproducción sexuada. Durante la misma se suceden distintos programas de expresión génica, de los cuales nos interesa particularmente la meiosis. La misma consiste en un tipo de división celular especial que ocurre únicamente en las células germinales, durante la cual tienen lugar el apareamiento, recombinación y segregación de los cromosomas homólogos, eventos fundamentales para la conservación del número cromosómico de las especies y la generación de biodiversidad. El transcurso sin alteraciones de la meiosis, es esencial para el progreso de una espermatogénesis normal.

A pesar su importancia, la espermatogénesis en general, y la meiosis en particular, son poco conocidas a nivel molecular, especialmente en los mamíferos debido, en gran parte, a dificultades que presenta su estudio como lo es la heterogeneidad celular del testículo y la ausencia de sistemas de cultivo *in vitro* eficaces.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la meiosis de los mamíferos, en esta tesis caracterizamos de forma preliminar 11 bandas de ADNc que habían sido identificadas en ensayos previos de "mRNA differential display" (DD) como de expresión diferencial de la profase meiótica de la rata, clonadas en el vector pGEM-T, y conservadas en glicerol a -80 °C. Se empleó una combinación de abordajes metodológicos que nos permitió realizar una gran cantidad de trabajo en poco tiempo y a un costo relativamente bajo. Identificamos y confirmamos el patrón de expresión diferencial de meiosis de 7 genes, algunos de ellos nuevos y otros isoformas no descritas de genes conocidos: un nuevo gen miembro de la familia de proteínas de transmembrana "Leucine-rich repeat containing 8 family", el gen correspondiente a la proteína hipotética de rata homóloga de la proteína humana "PAK/PLC interacting protein" (hPIP1), el gen que codifica para la proteína "Mitochondrial carrier homolog 2 (Mtch2)", una nueva isoforma no descrita de la secuencia codificante para la proteína hipotética de rata "Tripartite motif protein 27 (TRIM27/RFP)", el transcripto del gen que codifica para el homólogo de rata de la proteína "Coiled coil domain containing 14" de ratón (CCDC14), una nueva isoforma de la unidad regulatoria de la Pik3 ("Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3, y un posible nuevo gen de la familia de "TAR-binding protein" (TARDBP).

Como segunda parte del trabajo, se seleccionó la secuencia correspondiente al gen CCDC14 para profundizar en su caracterización. Mediante la aplicación de diversas metodologías se amplió el estudio del patrón de expresión de este gen en el testículo de la rata, confirmando su expresión diferencial en dicho tejido en comparación con otros, y dentro del mismo, el patrón de expresión diferencial en células meióticas respecto a células posmeióticas. Los datos obtenidos sugieren que también se expresaría a ciertos niveles en células somáticas testiculares, como las células de Sertoli. Se determinó la secuencia codificante completa de este gen, que posee 13 exones y da lugar a la síntesis de un ARNm de 4945 bases. Se clonó y expresó parte de la secuencia codificante como proteína de fusión con GST, y se produjo un suero policional contra la proteína predicha CCDC14. Dicho suero nos ha permitido confirmar la existencia de una proteína de 103 kDa para el gen CCDC14. La proteína identificada no presenta, dentro de los 929 aminoácidos que la componen, una señal de localización nuclear (NLS) evidente, y de acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados, poseería una región capaz de adoptar estructura de coiled coil. Este tipo de motivo particular se encuentra presente en muchas de las proteínas que conforman el andamiaje de las células meióticas, lo cual sugiere que podría desempeñar una función estructural.

#### 2. INTRODUCCIÓN

#### 2.1. MARCO TEÓRICO

#### 2.1.1. Reproducción sexual en los organismos pluricelulares

La reproducción sexuada es el proceso presente, a lo largo de la evolución, en la mayoría de los organismos eucariotas pluricelulares en la etapa de dejar descendencia y perpetuar así la especie. Se sabe también que muchos organismos procariotas y eucariotas unicelulares han desarrollado la capacidad de reproducirse sexualmente. A diferencia de la reproducción asexuada, que da lugar a descendencia genéticamente idéntica al organismo progenitor, la reproducción sexuada implica la combinación de los genomas de dos individuos distintos de la misma especie, produciendo descendientes que son genéticamente diferentes entre sí y de sus progenitores (Solomon *et al.*, 1996).

El ciclo de reproducción sexual implica una alternancia entre generaciones de células haploides y diploides. En los metazoarios, las células haploides especializadas para este proceso son los gametos: el ovocito, gameto femenino, generalmente grande e inmóvil, y el *espermatozoide*, gameto masculino, pequeño y móvil. Durante la fecundación, un gameto masculino y uno femenino, ambos haploides, se fusionan y se produce una célula diploide, denominada cigoto, cuya información genética proviene de ambos progenitores. El cigoto inicia desarrollo y prolifera mediante mitosis, dando lugar a una gran población de células diploides que se diferencian y forman un organismo pluricelular complejo. Cuando dicho organismo alcanza la madurez sexual, en los órganos sexuales las células diploides de la línea germinal se dividen por medio del proceso de *meiosis* (ver adelante) y se generan nuevas células haploides (Gilbert, 2005). En las primeras etapas de la meiosis, ocurren los importantes procesos de apareamiento entre cromosomas homólogos y recombinación génica; mediante esta última, dichos cromosomas intercambian fragmentos de ADN, haciendo que la dotación genética que recibe cada gameto haploide sea diferente. Así, la redistribución de genes a través de la reproducción sexual da lugar a diversidad genética. Se asume que aquellas combinaciones de alelos que provean ventajas y permitan a los organismos adaptarse y sobrevivir en ambientes cambiantes se perpetuarán entre la población, mientras que las que no sean beneficiosas tenderán a perderse. Esto explicaría por qué la selección natural ha favorecido la reproducción sexual (Alberts et al., 2002).

#### 2.1.2. La gónada masculina: desarrollo y estructura en los mamíferos

Durante el proceso de desarrollo embrionario de cada nuevo individuo, se produce la diferenciación de distintos tipos celulares que conformarán órganos y tejidos que cumplirán funciones específicas. Uno de esos órganos es la gónada, en la cual se producirán los gametos, y cuyo tipo en los mamíferos dependerá de los cromosomas sexuales que integren el cariotipo del individuo. Si el cariotipo contiene dos cromosomas sexuales homólogos X se desarrollará una gónada femenina, *ovario;* en cambio si uno de dichos cromosomas es X y el otro Y se desarrollará una gónada masculina, *testículo*.

El desarrollo de una gónada masculina en los individuos que poseen un cromosoma Y, responde a la presencia y expresión del gen *Sry*. La proteína SRY, producto de dicho gen, es un factor de transcripción que participa en la regulación de genes que determinan el desarrollo gonadal; activa la expresión de genes involucrados en la formación y el desarrollo de los testículos, e inhibe otros que participan en la formación de hormonas como la hormona anti-mulleriana (AMH), testosterona, di-hidro testosterona (DHT), y hormona folículo estimulante (FSH), entre otras, que darán lugar a la diferenciación de células somáticas específicas de testículo como las de Sertoli y Leydig, y a la diferenciación de las células germinales que originarán los gametos, mediante el proceso de *espermatogénesis* (Walker & Cheng, 2005; Gilbert, 2005; Barrionuevo & Scherer, 2010; Sekido, 2010).

El testículo maduro está compuesto por una vasta red de túbulos seminíferos, contenidos dentro de una capa conectiva resistente llamada túnica albugínea. Fuera de los túbulos se encuentran las células de Leydig, las células mioides peritubulares, algunos fibroblastos y vasos sanguíneos [Figura 2.1.A]. Dentro de los túbulos reside una población celular muy heterogénea, compuesta por células germinales en distintas etapas de la espermatogénesis y células de Sertoli. Las células germinales se disponen de forma ordenada, pudiéndose en cortes transversales observar células en etapas cada vez más avanzadas de la espermatogénesis desde la membrana basal hacia la luz del túbulo. Las células de Sertoli, consideradas las nodrizas de las células germinales masculinas, cumplen funciones de mantenimiento, protección y nutrición de las mismas, y se ubican dentro del túbulo protruyendo entre ellas [Figura 2.1.B] (Berne & Matthew, 1998; Gilbert, 2005).



**Figura 2.1. Esquema de corte transversal de testículo adulto de mamífero. A.** En el espacio intertubular se observan células de Leydig, fibroblastos y vasos sanguíneos. **B**. Dentro del túbulo se pueden observar células germinales en distintas etapas de la espermatogénesis dispuestas desde la membrana basal hacia la luz, y células de Sertoli. Rodeando al túbulo seminífero se observan las células mioides (Tomado de Guyton & Hall, 2001).

#### 2.1.3. Generalidades de la espermatogénesis en los mamíferos

La *espermatogénesis* es el proceso de producción de los gametos masculinos, los espermatozoides maduros. Es esencial para todas las especies con reproducción sexuada, y puede describirse como la ejecución coordinada de tres programas sucesivos de expresión génica, que se encuentran superpuestos temporalmente en el testículo adulto. El primer programa corresponde a la proliferación mitótica de las espermatogonias, células troncales somáticas precursoras de las células de la línea germinal. El segundo programa, la meiosis, provee al espermatocito primario del aparato molecular para el apareamiento, recombinación y segregación de los cromosomas homólogos, y da como resultado espermátidas haploides. El tercero, la espermiogénesis, es responsable de los dramáticos cambios estructurales y bioquímicos que sufren las espermátidas, hasta completar su diferenciación como espermatozoides maduros (Erickson, 1990; Hess, 1999) [Figura 2.2].

La espermatogénesis es un proceso continuo que comienza en los días posteriores al nacimiento del individuo, se completa cuando se alcanza la edad adulta, y se continúa produciendo a lo largo de toda la vida del individuo. En la rata, tomada como ejemplo de modelo experimental, los túbulos seminíferos de un individuo pre-púber de hasta 12 días posparto (dpp) poseen sólo células de Sertoli y espermatogonias. A partir de ese momento comienza la proliferación y diferenciación de células germinales, pudiéndose observar a los 17-18 días la presencia de espermatocitos primarios en el túbulo seminífero. A los 21 días algunos de esos espermatocitos alcanzan la profase media de la primera división meiótica (paquiteno, ver más adelante), y a los 27 días ya se ha producido la primera meiosis completa, por lo que se observan además espermátidas redondas. Alrededor de los 40 días, cuando el individuo alcanza la edad adulta, ha finalizado la primera onda espermatogénica, y se pueden observar los primeros espermatozoides (Siu & Cheng, 2004).



2.2 Esquematización de Figura las de diferentes etapas la espermatogénesis de la rata. La fase de proliferación (Prol.) incluye las divisiones espermatogónicas desde espermatogonia tipo A (A1 - A4) hasta las células intermedias (I) y de tipo B (B). La fase de meiosis comienza luego que las espermatogonias de tipo B se diferencian en espermatocitos preleptoténicos (PI). profase meiótica La comienza con pequeños espermatocitos leptoténicos (L) y continúa a través de los espermatocitos zigoténicos (Z), paquiténicos tempranos (eP), medios (mP) y tardíos (LP). Una vez en el diploteno (DI), las células se someten a la primera división meiótica (M-1) produciendo los espermatocitos secundarios (ss). Luego de la segunda división (M-2), las espermátidas, haploides, comienzan la fase de espermiogénesis con la formación de las espermátidas redondas (1-7), continúan con una transformación hacia células elongadas (8-19) y finalizan con la formación del espermatozoide (Figura modificada de Hess, 1999).

Todas las células resultantes de las divisiones de una original se comportan de la misma manera y maduran sincrónicamente, debido a que durante las sucesivas divisiones celulares se produce una separación incompleta de los citoplasmas. En consecuencia, forman un sincitio conectado por puentes intercelulares que permitirán el pasaje de la totalidad de los componentes citoplasmáticos tales como los ARNs y proteínas (Braun *et al.*, 1989). A continuación describiremos en mayor detalle cada una de las etapas de la espermatogénesis.

#### 2.1.3.1. Proliferación

Al momento del nacimiento los testículos de los individuos poseen, dentro de las células geminales, gonocitos que en los primeros días serán sustituidos por espermatogonias de tipo A (células madre de espermatogonias, o espermatogonias A<sub>s</sub>; Culty, 2009). Durante la etapa pre-púber estas células proliferan mediante una serie de divisiones mitóticas rápidas y continuas, con el fin de aumentar la población celular. A partir de la pubertad las células de Sertoli secretan niveles más altos del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF), y algunas de las espermatogonias A inician el proceso de espermatogénesis, diferenciándose sucesivamente en espermatogonias A1, A2, A3, A4, AI y B, de tamaño progresivamente menor y cada vez mayor nivel de compactación de la cromatina, para dar lugar finalmente a espermatocitos primarios (Bellvé *et al.*, 1977; Meng *et al.*, 2000; De Rooij, 2001) [Ver figura 2.2].

#### 2.1.3.2. Meiosis

La meiosis es un tipo de división celular especial, que en los organismos con reproducción sexuada ocurre en las células de la línea germinal. La misma consta de dos divisiones celulares consecutivas, precedidas de una única instancia de duplicación del material genético. Cada espermatocito primario que inicia este proceso de división celular reductiva experimenta una primera división meiótica que produce dos espermatocitos secundarios, aún diploides. En la segunda división meiótica, que transcurre sin previa replicación del material genético, cada espermatocito secundario da origen a dos espermátidas redondas. Como resultado final, de cada espermatocito primario diploide se obtienen cuatro espermátidas redondas haploides (Bellvé *et al.*, 1977) [Ver figura 2.2].

Dado que nuestro interés se centra en el estudio de la primera división meiótica, esta etapa se desarrollará con mayor profundidad en el capítulo siguiente.

#### 2.1.3.3. Espermiogénesis

A lo largo de la espermiogénesis, las espermátidas atraviesan una serie de cambios morfológicos, diferenciándose consecutivamente en espermátidas elongadas, espermátidas tardías y finalmente espermatozoides. Estos son liberados hacia el lumen del túbulo seminífero y migran hacia el epidídimo, donde completan su maduración y se almacenan (Guyton & Hall, 2001).

Los cambios que ocurren en esta etapa consisten en un gran aumento en la condensación de la cromatina, el estrechamiento del núcleo, la notoria disminución del tamaño del citoplasma, la formación del flagelo y la reorganización de las mitocondrias formando un anillo alrededor de la base del mismo. De entre estos cambios destacamos la marcada condensación que sufre la cromatina, la cual puede ser atribuida inicialmente a modificaciones postraduccionales que sufren las histonas, aumentando su capacidad de unirse al ADN, y posteriormente a la sustitución de las mismas primero por proteínas de transición, específicas de testículo, y posteriormente por protaminas. Estas últimas son proteínas básicas muy ricas en arginina con gran capacidad de unirse al ADN. El aumento en la condensación de la cromatina conlleva una notoria disminución en la actividad transcripcional (Peschon *et al.*, 1987; Hecht, 1998; Govin *et al.*, 2004).

#### 2.1.4. La meiosis

Como se mencionara anteriormente, la meiosis es un tipo especial de división celular presente en las células de la línea germinal. Se trata de dos divisiones celulares sucesivas con una única duplicación del material genético precedente. De este modo, un espermatocito primario, diploide (2N), que posee duplicada su cantidad de ADN de 2C a 4C, da lugar a 4 espermátidas redondas con un número haploide de cromosomas (N) y una cantidad C de ADN. Esto permite que al final del proceso de espermatogénesis, cada gameto producido contenga la mitad del número de cromosomas original de la especie y posea un solo miembro de cada uno de los pares de cromosomas homólogos. De esta manera, cuando los gametos se unan durante la fecundación y se forme el cigoto, se restablecerá el número cromosómico 2N de la especie.

La meiosis puede ser separada en dos divisiones celulares, meiosis I y meiosis II, y cada una de ellas se subdivide, al igual que la mitosis, en 5 etapas continuas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. La etapa más larga y compleja de la primera división meiótica es la profase I, la cual ha sido a su vez subdividida en cinco estadíos: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis.

Al comenzar la meiosis I, en el estadío leptoteno, tiene lugar la duplicación y migración de los centríolos hacia los polos de la célula. Los cromosomas se encuentran descondensados y comienza la formación de ejes proteicos simples a lo largo de los brazos de los mismos. Durante este estadío también se puede observar que los extremos de los cromosomas, los telómeros, se insertan en la membrana nuclear interna y comienzan a migrar hasta agruparse en una región del núcleo, formando una estructura denominada *bouquet* (Moses, 1968), que queda constituída entre el leptoteno y el cigoteno.

En el estadío cigoteno, los cromosomas homólogos se aparean a lo largo de su longitud en un proceso mediado por los complejos proteicos simples. Estos complejos proteicos que se ensamblan sobre los brazos de los cromosomas homólogos, pasarán a constituir los elementos laterales de una estructura más compleja denominada *complejo sinaptonémico* (CS) (Wettstein & Sotelo, 1971). Además de los elementos laterales, los CS están integrados por un elemento central, con distinto nivel de complejidad en las diferentes especies, y elementos transversos, dispuestos entre los elementos laterales y el elemento central. Los CS median el apareamiento de los cromosomas homólogos y podrían permitir la recombinación meiótica ("crossing over"; Heyting, 1996; Roeder, 1997; Zickler, 2006).

Durante el paquiteno, los cromosomas comienzan a condensarse y, debido a que antes de comenzar la división ocurrió una duplicación del ADN, cada cromosoma está constituido por cuatro cromátidas, dando lugar a formaciones cromosómicas denominadas tétradas. En esta etapa tiene lugar la recombinación, un proceso de ruptura y reparación de cromátidas que da lugar al intercambio de material genético recíproco entre cromátidas homólogas. La recombinación meiótica puede incrementar de gran manera la variabilidad de los gametos al asociar alelos que no estaban previamente juntos. En consecuencia, provee a las generaciones sucesivas de nuevas combinaciones de genes maternos y paternos ligados y no ligados. (Wettstein & Sotelo 1971; Tamarín, 1996; Alberts *et al.*, 2002).

9

Luego, en el diploteno, mientras los cromosomas continúan su proceso de compactación, los homólogos comienzan a separarse, el complejo sinaptonémico se desensambla y se pueden observar configuraciones en forma de X a lo largo de las tétradas, denominadas quiasmas. Los quiasmas indican los puntos donde ha ocurrido recombinación genética.

Hacia el final de la profase I, en el estadío de diacinesis, la envoltura nuclear comienza a desensamblarse hasta desaparecer, y los quiasmas se deslizan hasta alcanzar los extremos de los cromosomas, liberando a los homólogos uno del otro en toda su longitud, a excepción de los extremos (Tamarín, 1996). A su vez, comienzan a ensamblarse las fibras del huso meiótico, filamentos de microtúbulos que se insertan en los cetrómeros de los cromosomas.

En la metafase I, los cromosomas migran hacia la placa metafásica unidos a las fibras del huso, enfrentándose los homólogos entre sí. En la anafase I los centrómeros homólogos comienzan a separarse y los cromosomas, con dos cromátidas cada uno, migran hacia polos opuestos. En telofase I, cada cromosoma homólogo constituido por dos cromátidas hermanas ha migrado a un polo de la célula. Finalmente, en la citocinesis ocurre la división del citoplasma para dar lugar a dos células hijas. Al final de la meiosis I se obtienen dos células con un contenido de ADN 2C y un número cromosómico haploide N.

Las células hijas producto de la meiosis I, no replican su material genético y comienzan inmediatamente la meiosis II. A diferencia de la profase I, la profase II es corta y progresa rápidamente hacia metafase II. En la anafase II cada una de las dos cromátidas hermanas de los cromosomas comienza a separarse y a migrar hacia uno de los polos. De este modo, en la telofase II se puede observar un solo cromosoma compuesto por una única cromátida en cada polo. Finalmente ocurre la citocinesis II, de la cual se obtienen dos células hijas con un número cromosómico haploide y un contenido de ADN C.

Se destacan dos eventos que ocurren durante la meiosis. En primer lugar, la recombinación meiótica, que constituye una fuente fundamental de variabilidad para las especies con reproducción sexuada, y es uno de los sustratos más importantes de la evolución. Por otra parte, el apareamiento y la segregación de cromosomas homólogos que ocurren durante la primera división meiótica, son los responsables del mantenimiento del número cromosómico de la especie. Eventuales alteraciones en estos importantes procesos son normalmente detectadas por los

puntos de control ("checkpoints"), desencadenando apoptosis de las células germinales o causando detenciones de la espermatogénesis con la consiguiente infertilidad. Entre las proteínas identificadas hasta ahora involucradas en el apareamiento y recombinación meióticas en los mamíferos, varias resultan ser esenciales dado que su alteración, además de causar infertilidad, se encuentra en la base de gran cantidad de patologías (Baker *et al.*, 1995, Cohen *et al.*, 2006).

#### 2.1.5. Estudio molecular de la meiosis en los mamíferos

A pesar de su enorme importancia, la meiosis, y en general la espermatogénesis, de los mamíferos así como los mecanismos involucrados en su regulación son, aún en la actualidad, poco comprendidos al nivel molecular. Esto se debe principalmente a que el testículo es un órgano muy complejo y heterogéneo, en cuyos túbulos seminíferos coexisten células germinales cursando distintas etapas de cada uno de los programas de expresión génica (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas en distintos estadios de maduración) y células de Sertoli [Figura 2.1A] (Bellvé et al., 1977). A su vez, los túbulos se encuentran rodeados de un estroma conteniendo otros tipos celulares [Figura 2.1B]. A esta complicación se suma la ausencia de un sistema de cultivo in vitro de células de línea germinal, si bien en los últimos años ha habido algunos avances muy parciales en el intento por desarrollarlos (Sato et al., 2011). Aunque existen reportes que indican que es posible trabajar con cultivos primarios, las células no logran dividirse y se desdiferencian muy rápidamente (Russel & Steinberg, 1989; Donovan et al., 2001). Todo esto dificulta la obtención de células germinales en un estadío determinado en cantidad y grado de pureza suficientes como para realizar estudios moleculares. Por consiguiente, un pre-requisito para el análisis de la expresión génica diferencial en células meióticas es la disponibilidad de métodos que permitan la rápida obtención de poblaciones altamente enriquecidas en espermatocitos en la etapa meiótica que se desee estudiar.

Con el objetivo de sortear esta dificultad, se han implementando dos tipos de estrategias:

A. La utilización de la gónada de individuos de diferentes edades como fuente de material para estudiar la expresión de genes en el testículo en diferentes etapas del desarrollo (Geisinger, 2008), dado que los tipos celulares que pueden encontrarse en los testículos de individuos pre-púberes depende de su edad. Por ejemplo en la

rata, como se mencionara anteriormente (sección 2.1.3.), a los 12 días comienza la primera onda espermatogénica, la cual se completa en el individuo adulto a los 40 días. Durante el desarrollo del testículo, en las edades comprendidas entre 12 y 40 días, se puede observar que los túbulos seminíferos de individuos juveniles presentan sólo espermatogonias y células de Sertoli, los correspondientes a púberes incluyen además espermatocitos meióticos y espermátidas redondas, y los primeros espermatozoides aparecen pocos días antes de llegar a la madurez sexual. Debemos recordar que esta estrategia sólo permite obtener testículos enriquecidos en cierta población celular, debido a que le faltan otras. Si bien este abordaje ha permitido analizar la expresión génica en distintas edades mediante técnicas como los microarreglos (Maratou et al., 2004), tiene la limitante de solamente permitir asignar un patrón de expresión particular a cierta edad, es decir, a cierta combinación de tipos celulares presentes en el testículo, y no a un tipo celular específico. Se hace necesario entonces recurrir a técnicas que validen los resultados obtenidos, como la hibridación in situ, para poder asignar la expresión de cierto ARNm a cierto tipo celular.

B. La obtención de fracciones altamente enriquecidas mediante técnicas de separación celular. Entre ellas se pueden mencionar métodos ampliamente usados como la elutriación (Meistrich, 1977), y otros abordajes más modernos desarrollados en nuestro laboratorio como la citometría de flujo con clasificación celular (Rodriguez Casuriaga et al., 2009). La elutriación se basa en el uso de un rotor especial de centrífuga con una sola cámara de separación, y combina la velocidad de flujo de las células a través de un líquido con la intensidad de la fuerza centrífuga. Un gradiente de flujo inverso a la fuerza centrífuga se establecerá dentro de la cámara. De este modo, las células son recolectadas según su tasa de sedimentación característica (debida fundamentalmente al tamaño celular y a la cantidad de ADN presente en ellas). Esta técnica permite obtener fracciones enriquecidas en espermatocitos paquiténicos y espermátidas redondas con un 80% de pureza, partiendo de testículo adulto (Meistrich, 1977). Con respecto a la citometría de flujo con separación de células, la misma ha permitido identificar exitosamente tipos celulares tanto con fines de investigación como clínicos (Wistuba 2003; Rossi, 2004). Actualmente existen reportes exitosos de la clasificación de meiocitos y su utilización para el estudio de la expresión génica (Rodriguez Casuriaga et al., 2009; 2011). En este método, el ADN es marcado con moléculas intercalantes fluorescentes y las células son separadas de acuerdo al contenido de ADN en poblaciones C, 2C y 4C, sumado a otros parámetros como tamaño celular, complejidad celular y complejidad nuclear (clasificación multiparamétrica;

Rodriguez Casuriaga *et al.*, 2011). El uso de otro tipo de estrategias, como la disección de segmentos de túbulos seminíferos bajo microscopio de contraste de fase (Kotaja *et al.*, 2004) ha tenido poca aceptación, probablemente en gran parte por las dificultades que entraña.

Con respecto al conocimiento a nivel molecular sobre la etapa meiótica, en la actualidad éste se encuentra bastante avanzado en las levaduras, dada la simplicidad del modelo en comparación con los eucariotas superiores (revisión por Kassir *et al.*, 2003). Si bien algunos de los genes implicados en la meiosis de los mamíferos han sido aislados por su homología con su contraparte en levaduras (Keeney *et al.*, 1999) es más frecuente la analogía de función que la homología de secuencias. Además, es importante recordar que en las levaduras la meiosis es un proceso que se activa en respuesta a una deprivación de nutrientes, y no es parte de un proceso más complejo, como lo es la gametogénesis que ocurre en los organismos multicelulares (Watanabe & Nurse, 1999). Por estos motivos, en la mayor parte de los casos los resultados obtenidos en levaduras no pueden ser extrapolados a eucariotas superiores (Geisinger, 2003).

En los últimos años se han realizado importantes avances en lo que respecta a la caracterización molecular de la meiosis de los mamíferos. El estudio de modelos animales, especialmente roedores, ha permitido profundizar en el conocimiento del control molecular de la espermatogénesis, y particularmente la meiosis (revisión por Jan et al., 2012). Por un lado, se han comenzado a identificar algunos de los factores involucrados en el inicio y el control de la meiosis (revisiones por Handel & Schimenti, 2010; Yanowitz, 2010; Kimble, 2011; Griswold et al., 2012), y se conocen algunas proteínas involucradas en los distintos pasos de la recombinación, generación y reparación de rupturas de doble hebra, resección de los extremos 5' generados, invasión de hebras (revisiones por Cromie & Smith, Lichten & de Massy, 2011; Phadnis et al., 2011), pero el conocimiento en este sentido es aún muy incipiente. Por otra parte, se han identificado, caracterizado y en muchos casos realizado análisis funcionales de proteínas esqueléticas del núcleo de las células meióticas, como las proteínas componentes de los CS (revisiones por Page & Hawley, 2004; de Boer & Heyting, 2066; Costa & Cooke, 2007; Yang & Wang, 2009; Fraune et al., 2012): SYCP2 y SYCP3 (componentes de los elementos axiales y laterales), SYCP1 (principal componente de los filamentos transversos), y SYCE1, SYCE2, SYCE3 y TEX12 (componentes específicos del elemento central) [Figura 2.3]. A su vez, se han identificado cohesinas y condensinas meiosisespecíficas (STAG3, REC8 y SMC1 $\beta$ ) que juegan roles fundamentales en el ensamblaje de los CS (Prietto *et al.*, 2001; Ejipe *et al.*, 2003; Revenkova, *et al.*, 2004; Firooznia *et al.*, 2005). También se han realizado avances en el conocimiento de las proteínas responsables de la unión de los CS a la envoltura nuclear interna. Se conoce como complejos LINC a las asociaciones proteicas que establecen un puente entre las membranas nucleares interna (MNI) y externa (MNE), y a su vez proveen una conexión física entre estructuras nucleares y el citoesqueleto. Estos complejos están compuestos por proteínas con dominio SUN, ubicadas a nivel de la MNI, y proteínas con dominio KASH a nivel de la MNE, y se encuentran involucrados en una variedad de procesos además del anclaje de los CS a la envoltura nuclear, como son la movilidad y el mantenimiento de la forma del núcleo celular, y los movimientos dinámicos de los cromosomas meióticos dentro del mismo (Schmitt *et al.*, 2007; Lombardi *et al.*, 2011).



Figura 2.3. Esquematización del CS de los mamíferos. Se muestra la posición de sus elementos y de los principales componentes proteicos de los mismos: SYCP2 y SYCP3 se ubican en los elementos laterales (EL), SYCP1 en los filamentos transversos (FT), У el elemento central (EC). Se muestra también la forma en que la cromatina se dispone sobre los EL y la posición que ocuparía un nódulo de recombinación (NR) durante el intercambio de material genético (ADN) entre cromátidas de cromosomas homólogos.

La actual disponibilidad de métodos de secuenciación masiva, que permiten la secuenciación de transcriptomas completos (RNASeq) (Wang *et* al., 2009; Nagalakshmi *et al.*, 2010) a un costo razonable, proporcionará, sin duda, una valiosísima herramienta para el avance en el conocimiento a nivel molecular de la célula meiótica en el futuro próximo.

# 2.1.6. Expresión génica durante la meiosis y a lo largo de la espermatogénesis en general: características peculiares

Uno de los abordajes empleados desde hace algo más de una década para el estudio de la expresión génica en la línea germinal masculina, ha sido el uso de microarreglos (Shima *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2007; Feig *et al.*,

2007). Los resultados de estos estudios comenzaron a revelar al testículo como un sistema sumamente interesante para los análisis de expresión génica, dado el enorme número de genes que son expresados en forma diferencial (Wrobel & Priming, 2005), y los patrones de regulación sumamente peculiares que rigen la expresión génica en las células espermatogénicas (Elliot, 2003; Huang *et al.*, 2005; Geisinger, 2008).

La heterogeneidad y complejidad del testículo, en el cual coexisten distintos tipos de células somáticas con células en numerosos estados de avance del proceso de espermatogénesis, y los continuos cambios que las mismas atraviesan (modificaciones morfológicas, eventos de recombinación, sinapsis y segregación cromosómica entre otras cosas) hacen que el número de genes que se expresan en dicho órgano sea extremadamente alto en relación con el genoma completo (aproximadamente 50% del genoma en la rata; Shima *et al.*, 2004) y en comparación con otros tejidos. Un ejemplo de los genes que se expresan específicamente en las células meióticas son aquellos que codifican las proteínas que componen el CS (Smith y Benavente, 1992; Liu *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2005. El elevado número de genes específicos, sumado al hecho de que muchos de esos genes se expresan diferencialmente en distintos estadios, hace necesario un fino y muy cuidadoso proceso de regulación de la expresión génica en dicho órgano, la cual ocurre tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Kleene, 2001).

Por otra parte, el alto número de proteínas tejido-específicas, isoformas de proteínas y enzimas con nuevas funciones que se sintetizan en el testículo, pueden ser tanto producto de un gen que se expresa específicamente en las células de la línea germinal, como producto de modificaciones que sufre el transcripto que no ocurren en células somáticas. Dichas modificaciones pueden ser generadas por el uso de promotores alternativos, poliadenilación alternativa y principalmente por procesamiento alternativo; este último es más frecuente en el testículo que en cualquier otro órgano (Elliott & Grellscheid, 2006). Un importante número de transcriptos alternativos codifica isoformas de proteínas testículo-específicas tales como isoenzimas metabólicas (Rossi *et al.*, 2004), histonas (Govin *et al.*, 2004), chaperonas (Eddy, 1999), lamininas y factores de transcripción (Govin *et al.*, 2004).

Los promotores alternativos empleados por genes de las células de línea germinal presentan características diferentes a los presentes en células somáticas, y su accesibilidad a ellos, dada por cambios en el comportamiento de la cromatina, involucra diferentes mecanismos reguladores que afectan drásticamente la

15

expresión génica de las células espermatogénicas. Es importante destacar la "notoria preferencia" que exhiben los genes específicos de células de la línea germinal por el uso de promotores cuya característica más destacada es la ausencia de la caja TATA (promotores TATA-independientes; Goldberg, 1996; Hetcht, 1998; Kleene, 2001; Kimmins *et al.*, 2004; Geisinger, 2008).

Es de notar que muchos genes se ven sobreexpresados en las células espermatogénicas con respecto a las somáticas, principalmente en los espermatocitos paquiténicos y en espermátidas redondas, haploides (Kleene, 2001; Kleene, 2003). El fenómeno de sobreexpresión de mensajeros se debe en parte a que el testículo muestra una enorme expresión y actividad de la proteína TBP ("Tata Binding Protein"), que es un factor de transcripción capaz de producir expresión a partir de los promotores de los genes que contienen la secuencia TATA box, como es el caso de los genes que codifican proteínas del sistema de compactación y remodelación de la cromatina (*e.g.* histonas y protaminas), proteínas del CS, del sistema de procesamiento del ARN y algunas proteínas específicas de la meiosis y espermiogénesis. Además, se ha demostrado que TBP también se encuentra involucrada en la transcripción a partir de promotores TATA-independientes que, como hemos mencionado anteriormente, son muy frecuentes en genes de expresión testículo-específica (Kleene, 2001; Kleene, 2003).

Por otra parte, y tal vez como mecanismo compensatorio de la sobreexpresión de mensajeros, se ha observado un importante nivel de represión traduccional en células espermatogénicas, tanto que los niveles de proteína resultan notoriamente bajos en comparación con los de los ARNm, e incluso en muchos casos los transcriptos expresados y las variantes de procesamiento alternativo nunca llegan a traducirse. Uno de los mecanismos empleados para la represión traduccional en células meióticas y posmeióticas es el secuestro de moléculas de ARNm en complejos de ribonucleoproteína (RNP; Iguchi et al., 2006). Otros transcriptos exhiben marcos abiertos de lectura vecinos a secuencias reconocidas por riboproteínas específicas de transcripto las cuales son capaces de bloquear el sitio de unión con el ribosoma y retardar, de esta manera, la traducción. Un ejemplo son las secuencias reguladoras en la región 3´UTR, como aquellas que permiten la unión de proteínas Y-Box (Somerville & Ladomery, 1996; Matsumoto & Wolffe, 1998). En otros casos, microARNs impiden la traducción de sus ARNm blanco uniéndose a ellos y formando una doble hebra de ARN, lo que marca a esos transcriptos para su destrucción (Smith & Murray, 2012; Treiber et al., 2012). Finalmente, el secuestro de ARNs en el cuerpo cromatoideo en las espermátidas podría representar un importante mecanismo de regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. Si bien el cuerpo cromatoideo, una estructura filamentosa particular específica de testículo que se encuentra en el citoplasma del mencionado tipo celular se conoce desde hace algunas décadas (Walt & Armbruster, 1984; Figueroa & Burzio, 1998), su función ha comenzado a elucidarse en los últimos años. Hallazgos recientes indican que en el mismo convergen las vías de control que implican la participación de los microARNs, Dicer y otros complejos de RNP (Kotaja *et al.*, 2006); es así que esta estructura altamente especializada funcionaría como un centro de control del procesamiento de ARNs en células de la línea celular masculina (Kotaja & Sassone-Corsi, 2007; Nagamori *et al.*, 2011).

Una de las explicaciones para la sobreexpresión de mensajeros y la consecutiva inhibición de la traducción, es que las espermátidas elongadas no presentan transcripción debido al alto grado de compactación que muestra el ADN unido a las protaminas [proteínas compactadoras de la cromatina que sustituyen a las histonas durante la espermiogénesis; (Oliva & Dixon, 1991; Balhorn, 2007)], por lo cual los ARNm que se utilizan como molde para la síntesis de proteínas por estas células provendrían de fases anteriores en forma de RNPs y se verían traducidos en esta etapa. Es así que los propios genes de las protaminas 1 y 2, nos proveen el ejemplo de sobrexpresión y represión traduccional por excelencia: sus ARNm se expresan en grandes cantidades en el espermatocito primario y son traducidos hasta veinte días después por la espermátida elongada (Kleene, 2001; Kimmins et al., 2004). Sin embargo, como la eficiencia de la traducción nunca es 100% comparada con la síntesis excesiva de ARNm, se plantea que la inhibición podría no ser sólo un mecanismo que contrarreste la sobreexpresión, sino que los genes se sobreexpresarían y compensarían así la baja eficiencia de traducción (Kleene, 2001). Por otro lado, se ha propuesto que en el testículo se han seleccionado altísimos niveles de regulación postranscripcional porque ésta permite rápidos cambios adaptativos frente a las condiciones cambiantes (cambios del medio, estímulos hormonales, cambios en los miembros de un sexo que deben ser rápidamente acompasados en los del otro). Es importante destacar que la rápida adaptación a los cambios es un requisito básico de los sistemas reproductivos (Kleene, 2005).

#### 2.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DE ESTE TRABAJO

En el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) se ha estudiado desde hace décadas la meiosis, como etapa fundamental del proceso de generación de los gametos masculinos, es decir, la espermatogénesis, en primera instancia mediante técnicas de citogenética ultraestructural (e.g.: Wettstein y Sotelo, 1967; 1971). Con la creación del Departamento de Biología Molecular, los estudios apuntaron particularmente a la identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente en la profase meiótica masculina de los roedores. Gracias a la disponibilidad de métodos para la purificación de poblaciones celulares altamente enriquecidas en células en profase meiótica (elutriación), y al conocimiento de la histología testicular, durante la década del '90 el grupo abordó el estudio de la expresión génica diferencial en la meiosis masculina mediante electroforesis bidimensional de proteínas (Cossio et al., 1995; 1997), y DD (e.g. Geisinger et al., 1996; 1997). Estos ensayos permitieron la identificación de un número considerable de genes expresados diferencialmente durante la meiosis, algunos de los cuales han sido y continúan siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio.

Más recientemente, el hallazgo de modelos apropiados (Rodríguez Casuriaga & Wettstein, 2004) y la incorporación de la citometría de flujo como técnica eficiente de purificación de poblaciones celulares meióticas (Rodríguez Casuriaga *et al.*, 2009; Geisinger & Rodríguez Casuriaga, 2010) han permitido al grupo abordar con éxito estudios moleculares de la profase meiótica temprana (lepto/cigoteno) de los mamíferos (Rodríguez Casuriaga *et al.*, 2011), muy poco conocida hasta ahora precisamente por la falta de modelos y abordajes que permitieran la purificación de este tipo de células.

Los modelos biológicos empleados han sido roedores: rata, ratón, y más recientemente cobayo. Gracias a la disponibilidad de la secuencia completa de los genomas de muchas especies, y al amplio desarrollo de las herramientas bioinformáticas que permiten su comparación y análisis, los resultados se extrapolan al hombre y a otros mamíferos.

#### 2.2.1. "mRNA Differential Display"

Los ensayos de DD se basan en la comparación de perfiles de expresión de ARNm obtenidos por transcripción reversa con un oligo-dT con dos bases de anclaje como cebador seguida de PCR (RT-PCR) a partir de dos muestras que se desea comparar. Para el RT-PCR se utiliza el mismo cebador y un decámero de secuencia arbitraria como segundo cebador, y se emplea un desoxirribonucleótido radiactivo en la reacción de PCR. Los ARNs de expresión diferencial se visualizan como bandas de ADN copia (ADNc) en un gel de poliacrilamida revelado por autorradiografía (Liang & Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993).

En el trabajo realizado previamente por nuestro equipo de investigación, se utilizó ARNm extraído de poblaciones celulares de testículo de rata (*Rattus norvegicus*) separadas por elutriación. Mediante la aplicación del DD, y empleando diversas combinaciones de cebadores oligo-dT y decámeros de secuencia arbitraria del kit "RNAimage" (Genhunter Corporation) fue posible identificar bandas correspondientes a genes o isoformas expresados diferencialmente en las etapas meióticas (espermatocitos paquiténicos) y posmeióticas (espermátidas redondas) de la espermatogénesis de la rata (Geisinger, 2003).

En la figura 2.4 se observa un ejemplo de uno de los geles de poliacrilamida resultantes del DD, en el cual se pueden apreciar numerosas bandas correspondientes a fragmentos de ADNc obtenidos a partir de RT-PCR. Si se comparan los carriles correspondientes a las dos poblaciones celulares analizadas, se pueden observar bandas que se encuentran presentes solamente en una u otra de las poblaciones así como bandas que, si bien se encuentran presentes en ambas, muestran claras diferencias de intensidad. Del total de bandas observadas en todos los geles de poliacrilamida empleados, un 23% se mostró como diferencial de una de las dos poblaciones. De éstas, 74% fueron bandas específicas de espermátidas y 26% de espermatocitos. Las bandas seleccionadas fueron escindidas de la acrilamida y reamplificadas por PCR con los mismos juegos de iniciadores. Los resultados obtenidos en el DD para un conjunto de bandas específicas de uno u otro estadío fueron confirmados mediante ensayos de Northern Blot, empleando como sondas los productos de reamplificación de las propias bandas eluídas de los geles, marcados radiactivamente. Todas las bandas diferenciales de meiocitos que resultaron positivas y algunas de las positivas de células posmeióticas se purificaron, se clonaron en el vector pGEM-T (Promega), y su ADN se empleó para transformar células competentes de Escherichia coli (cepa XL1-Blue). Los clones

obtenidos fueron almacenados en glicerol a -80 °C, generándose así un reservorio de 40 bandas de expresión diferencial de distintos estadíos de la espermatogénesis de la rata (Geisinger *et al.*, 1996; Geisinger, 2003).



**Figura 2.4. "Differential Display" de ARNm de espermatocitos paquiténicos y espermátidas redondas de rata, empleando como iniciador derecho T12MG, en combinación con uno de 5 decámeros arbitrarios como iniciador izquierdo.** Se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida para el cual los experimentos se realizaron por duplicado, y los duplicados se migraron en carriles adyacentes. **C:** espermatocitos paquiténicos; **T:** espermátidas redondas; **RP** ("right primer"): Iniciador T12MG; **AP** ("arbitrary primer"): Iniciador 5' arbitrario. **C**<sub>c</sub> y **C**<sub>T</sub> hacen referencia a los controles sin transcriptasa inversa para los ARNs de espermatocitos y espermátidas respectivamente, para cada juego de iniciadores. En rojo se señala una banda que muestra igual intensidad en ambas poblaciones, en violeta una banda que aparece en ambas poblaciones pero con diferente intensidad, y en verde un banda específica de una de las poblaciones en estudio (Tomado de Geisinger, 2003).

## 2.2.2. Análisis de bandas diferenciales: identificación y caracterización de los genes *pecanex-1* y *Spats1*

De unos años a esta parte, el grupo de investigación se ha abocado, entre otros temas, al análisis e identificación de las bandas obtenidas en el DD, particularmente de algunas bandas correspondientes a ARNm expresados diferencialmente en espermatocitos paquiténicos. Algunas resultaron corresponder a genes previamente conocidos tales como los homólogos de rata de *Tlk*, gen que codifica para una serín/treonín kinasa vinculada con la espermatogénesis, y *PMS2*, vinculado a la reparación de errores de apareamiento, y cuya mutación en ratón da como resultado machos infértiles (Geisinger, 2003). Otros resultaron ser genes nuevos, no descritos previamente. La caracterización en mayor profundidad de algunos de estos genes y de su producto proteico permitió profundizar a distintos grados en el conocimiento de su función en relación con el desarrollo de la espermatogénesis normal, a la vez que dio lugar a varias publicaciones en revistas internacionales arbitradas por parte del grupo.

Entre los genes de expresión diferencial identificados por primera vez en nuestro laboratorio se destaca *pecanex-1*, que codificaría para una gran proteína con siete dominios de transmembrana específica de la espermatogénesis, y que podría pertenecer a la gran familia de receptores 7-TM (receptores que poseen siete dominios de transmembrana). Estos receptores suelen desempeñar funciones fundamentales en la transmisión de señales (revisiones por Gether, 2000 y Pierce *et al.*, 2002), y constituyen los blancos de aproximadamente un 60% de las drogas comercializadas actualmente en el mundo entero (Geisinger *et al.*, 2005).

Otro de los genes no conocidos previamente, identificados por el grupo como de expresión diferencial durante la meiosis, codifica para la primera proteína específica de la línea germinal portadora de un tramo de serinas, a la que se ha denominado Spats1 ("Spermatogenesis associated, serine-rich 1"; Geisinger *et al.*, 2002). Durante un trabajo de tesis de maestría realizado en nuestro laboratorio (Capoano, 2008) se clonó la porción codificante de *Spats1* en un vector de expresión, se expresó y purificó la proteína, y se produjo un suero policional contra la misma en conejos. Este suero permitió identificar y caracterizar a la proteína Spats1 en experimentos de Western-blot y de inmunohistoquímica en cortes histológicos por microscopía confocal de fluorescencia (Capoano *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos durante la tesis mencionada sugieren que *Spats1* desempeñaría un rol importante en relación con el desarrollo testicular y el

establecimiento de la meiosis en la primera onda espermatogénica, en la línea germinal masculina. Existen algunas evidencias que nos permiten sospechar que la proteína Spats1 podría funcionar como un producto "anti-ovario" en la diferenciación testicular, al actuar como un inhibidor en algún punto de la vía *Wnt* (Zhang *et al.*, 2010), y que dicha función sería necesaria hasta establecida la primera división meiótica en la primera onda espermatogénica, a juzgar por el patrón de expresión (Capoano *et al*, 2010). La caracterización funcional de Spats1 mediante la producción de ratones *knock-out* es actualmente objeto de una tesis doctoral en desarrollo en nuestro laboratorio.

Si bien es mucha la información que hasta el momento se ha obtenido, la mayor parte de las bandas de ADNc que se obtuvieron como de expresión diferencial no ha sido caracterizada aún. En ese sentido, la presente tesis de maestría apuntó a avanzar en la caracterización preliminar de algunas de las bandas de ADNc que habían sido seleccionadas inicialmente como de expresión diferencial de la profase meiótica de la rata y clonadas en el vector pGEM-T, y que se encontraban conservadas en glicerol a -80 °C. Adicionalmente, se seleccionó una de ellas (*CCDC14*, ver "Resultados") para profundizar en su caracterización.

#### 3. OBJETIVOS

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta tesis consistió en enriquecer el conocimiento sobre las bases moleculares de la espermatogénesis de los mamíferos, con especial énfasis en la profase meiótica, a través de la identificación y caracterización de genes de expresión diferencial de dicha etapa en la rata, y la profundización en el estudio del producto de alguno de los genes, que por sus características pueda cumplir un rol en la meiosis.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar bandas del DD de rata obtenidas como diferenciales de profase meiótica, que se encontraban clonadas en el vector pGEM-T.

- Seleccionar los clones de interés, obtener y analizar su secuencia y confirmar el patrón de expresión diferencial de la profase meiótica.

- Seleccionar una de dichas secuencias para profundizar su estudio, determinar la secuencia codificante completa del gen al que corresponde y realizar los análisis bioinformáticos pertinentes.

- Ampliar el estudio del patrón de expresión del gen y caracterizar la expresión del mismo en el testículo.

- Obtener anticuerpos contra el producto codificante de dicho gen, que permitieran su ulterior identificación y caracterización.

- Identificar y caracterizar el producto proteico del gen seleccionado.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

#### 4.1.1 Soluciones

*Buffer CAPS 1*/2: 25mM ácido 3-ciclohexilamino 1-propano sulfónico (CAPS), 10% metanol, 0,025% SDS, 5mM ácido mercaptopropionico, pH 10-11.

*Buffer de corrida de proteínas (SDS-PAGE)*: Solución *stock 1*0X: 250mM Tris (pH 8,5), 1,92M glicina, 1% SDS. Solución de trabajo 1X: 25mM Tris (pH 8,5), 0,192M glicina, 0,1% SDS, se prepara diluyendo la solución *stock* 10 veces en H<sub>2</sub>O.

*Buffer de inmunoprecipitación:* 10mM Tris pH 8, 140mM NaCl, 1% triton x-100.

*Buffer de Laemmli*: 0,12M Tris, 10% SDS, 20% glicerol, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,02% Azul de Bromofenol.

Buffer PHEM: 25mM HEPES, 10mM EGTA, 60mM PIPES, 2mM MgCl2, pH 7,2-7,4.

Buffer SM: 100mM NaCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50mM Tris-Cl (pH 7,5), 0,002% gelatina.

*Buffer TAE*: Solución *stock* 50X: 2M Tris, 1M ácido acético glacial, 50mM EDTA. Solución de trabajo 1X: se prepara diluyendo la solución *stock* en  $H_2O$ .

PBS 1X: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

SSC: Solución stock 20X: 3M NaCl, 300mM citrato de sodio, pH 7. Las diluciones de trabajo se realizan diluyendo la solución stock en  $H_2O$ .

Solución I (minipreparaciones de ADN plasmídico): 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100 μg de RNasa A por mL de solución.

Solución II (minipreparaciones de ADN plasmídico): 200mM NaOH, 1% SDS.

Solución III (minipreparaciones de ADN plasmídico): 3M acetato de potasio, pH 5,5.

Solución D (extracción de ARN): 4M Tiocianato de guanidinio, 0,1M Tris-HCl, 0,14M  $\beta$ -mercaptoetanol (agregado inmediatamente antes de usar).

Solución de azul de Coomasie: 0,125% azul de Coomasie, 40% metanol, 10% ácido acético.

Solución de desteñido: 25% etanol, 10% ácido acético.

Solución de rojo Ponceau-S: 0,5% rojo Ponceau-S, 1% ácido acético.

Solución de hibridación (hibridación in situ): 10% dextran-sulfato, 9,7 mg/mL ARNt de levadura, 11 mg/mL ADN de esperma de salmón, 50% formamida, en SSC 4X.

*Solución de incubación (hibridación in situ)*: 50 mM glicina, 0,1 % BSA, en buffer PHEM.

Solución desnaturalizante (rastreo de genoteca): 1,5M NaCl, 0,5M NaOH.

Solución neutralizante (rastreo de genoteca): 1,5M NaCl, 0,5M Tris-Cl, pH 7,5.

*TBST*: Solución *stock* 10X: 100mM Tris, 1,5M NaCl,1% Tween-20, pH 7,4. Solución de trabajo 1X: se prepara diluyendo la solución *stock* en H<sub>2</sub>O.

#### 4.1.2. Medios de cultivo

2X YT: 16g de triptona, 10g de extracto de levadura y 5g de NaCl por litro de medio, pH 7,2.

*LB líquido*: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl por litro de medio, pH 7,0. Los antibióticos se adicionan a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (amp) 50  $\mu$ g/mL, tetraciclina 12,5  $\mu$ g/mL.

*LB agar*: se agregan 15g de agar-agar por litro de medio.

*NZY-top agarosa*: 10g de extracto de levadura, 5g de NaCl, 2g de MgSO<sub>4</sub>.7 $H_2$ O, 10g de NZ-amina y 7g de agarosa por litro de medio, pH 7,0.
#### 4.2. ANIMALES

#### 4.2.1. Especies y cepas empleadas

Para la obtención de ARN total, lisados proteicos y cortes histológicos de testículo y otros tejidos, se emplearon ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa Sprague Dawley de 40 y 21 dpp. Las mismas provenían del bioterio del IIBCE, y su sacrificio fue realizado por personal capacitado, mediante dislocación cervical (juveniles) o administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (adultos), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

Para la producción de anticuerpos policionales anti-CCDC14 se utilizó un conejo (*Oryctolagus cuniculus*) macho adulto de la cepa New Zeland White, cedido por MERIAL S.A. La producción del suero fue llevada a cabo por nosotros en las instalaciones del IIBCE, de acuerdo a los procedimientos indicados en el punto 4.4.2.

#### 4.2.2. Disección de tejidos

Todas las disecciones realizadas para la obtención de los tejidos se efectuaron inmediatamente luego del sacrificio de los animales, en campana de gases, utilizando material estéril y siguiendo las recomendaciones de la CNEA. Los órganos extraídos se lavaron en PBS 1X estéril, se pesaron y se procesaron de inmediato, en frío.

#### 4.2.3. Suspensiones celulares y preparación de lisados proteicos

Las suspensiones celulares de testículo de individuos de distintas edades fueron obtenidas mediante disgregación mecánica del tejido, primeramente con bisturí, luego por pipeteo suave, y finalmente mediante pasaje por jeringas con agujas de pequeño calibre. Las suspensiones fueron filtradas a través de una malla de acero inoxidable de 300 µm de tamaño de poro, y posteriormente a través de una membrana de nylon de tamaño de poro de 25 µm. Durante toda la manipulación, los tejidos fueron mantenidos en PBS 1X en frío para evitar la degradación de las macromoléculas. Las suspensiones celulares utilizadas para las

extracciones de ARN fueron resuspendidas en solución D (ver punto 4.3.1.), en tanto aquellas utilizadas para la obtención de lisados proteicos se resuspendieron en buffer de Laemmli (Laemmli, 1970).

Los demás órganos utilizados en los análisis proteicos (hígado y cerebro) fueron homogeneizados con homogeneizador de teflón y resuspendidos en buffer de Laemmli. Todos los lisados proteicos se calentaron durante 5 min. a 100 °C para facilitar la solubilización de las proteínas, y se conservaron a -20 °C.

#### 4.2.4. Cortes histológicos

Los cortes histológicos empleados para los ensayos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica se realizaron por congelación. Se extrajeron testículos de ratas macho adultas (40 dpp) y juveniles (21 dpp), se retiró la túnica albugínea y se cortaron trozos de 1-2 mm de lado, los que fueron fijados por inmersión en buffer PHEM conteniendo paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 1 hora a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó para fijar hígado y cerebro de individuos adultos, tejidos que fueron usados como controles negativos en los análisis proteicos.

Los trozos de tejido fijado fueron crioprotegidos por inmersión en soluciones crecientes de sacarosa del 10 hasta el 30% en buffer PHEM, luego inflitrados en diluciones crecientes de medio de congelación de tejidos (Jung) y decrecientes de sacarosa, hasta llevarlos a medio de congelación puro. Los fragmentos de tejido infiltrado se colocaron en un molde con medio de congelación puro y se congelaron a -20 °C. Se dejó solidificar los bloques o.n., luego se procedió a montarlos en un crióstato SLEE modelo MEV (previamente enfriado a -23 °C), y se realizaron cortes de 10 µm de espesor. Los cortes fueron recogidos sobre portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (según los procedimientos habituales) para favorecer la adhesión de los mismos al vidrio, y finalmente conservados a -20 °C hasta su utilización.

## **4.3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

#### 4.3.1. Extracciones de ARN total

Se utilizaron guantes limpios para todas las manipulaciones que involucraron ARN. Todas las soluciones fueron tratadas o.n. a temperatura ambiente y en campana de gases con dimetil pirocabonato (DMPC, Sigma) al 0,1%, y luego fueron autoclavadas para inactivar las ARNasas. El material de vidrio fue horneado en estufa a 180 °C durante 4 horas, y en los casos en que fue posible se empleó material de plástico estéril y descartable. Todo el material utilizado en las corridas electroforéticas (cubas, peines, etc.) se lavó cuidadosamente, se enjuagó con agua de ósmosis inversa y finalmente con agua ultrapura.

Las extracciones de ARN fueron realizadas a partir de suspensiones celulares en el caso de testículos, y de homogeneizados para el resto de los tejidos. Se empleó una técnica basada en el uso de tiocianato de guanidinio y fenol ácido (pH 5,2) (Sambrook *et al.*, 1989). La solución D, empleada para desnaturalizar el ARN, se preparó según se indica en el punto 4.1.1.

La determinación de la calidad y concentración de las muestras de ARN obtenidas se realizó mediante electroforesis y medidas espectrofotométricas, según se detalla en las secciones 4.3.3. y 4.3.5.

#### 4.3.2. Minipreparaciones y midipreparaciones de ADN plasmídico

Para las minipreparaciones de ADN plasmídico, a partir de colonias aisladas obtenidas de estrías en medio LB agar conteniendo el antibiótico correspondiente, se iniciaron cultivos líquidos de 3 mL de las células de interés en medio LB con antibiótico, y se dejaron crecer o.n. a 37 °C con agitación. Al día siguiente las células fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 0,3 mL de solución I de minipreparaciones de ADN plasmídico. Luego se agregaron 0,3 mL de la correspondiente solución II, se mezcló por inversión para lograr una lisis celular alcalina, y se incubó por 5 min. a temperatura ambiente. A continuación se precipitó el ADN genómico mediante el agregado de 0,3 mL de solución III, se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio, se agregaron 0,7 volúmenes de

isopropanol, se mezcló por inversión varias veces y se incubó al menos 30 min. a - 20 °C para lograr la completa precipitación del ADN plasmídico. Se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% frío y se centrifugó nuevamente durante 5. min. Finalmente se descartó el etanol, el precipitado se secó en centrífuga con bomba de vacío (Savant) durante 10 min., se resuspendió en 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril, y el ADN plasmídico obtenido se conservó a -20 °C.

En aquellos casos en que fue necesario obtener cantidades mayores de ADN plasmídico, se realizaron midipreparaciones empleando el kit "Qiagen Plasmid Midi Kit" (Qiagen), partiendo de 25 mL de cultivos incubados o.n. a 37°C con agitación y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos finales se eluyeron en 200  $\mu$ L de de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril, y se conservaron a –20 °C.

#### 4.3.3. Electroforesis en geles comunes de agarosa

La calidad de todas las muestras de ácidos nucleicos obtenidas y utilizadas se determinó por migración en geles de agarosa en buffer TAE 1X, conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 0,3 µg/mL. Se emplearon geles de distinta concentración de agarosa según el tamaño de los fragmentos a visualizar: en el caso de ADN plasmídico y vectores se empleó una concentración de agarosa de 0,8%, en el caso de los productos de PCR y los productos de digestiones se emplearon concentraciones de entre 1 y 2%, en tanto para visualizar ARN se utilizaron geles al 1%.

Como marcadores de pares de bases se emplearon ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con la enzima *Hin*dIII ( $\lambda$ /*Hind*III, que da un patrón de bandas de 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 y 23130 pb), el plásmido pUC18 digerido con la enzima *Hae*III (pUC18/*Hae*III, que da un patrón de bandas de 80, 102, 174, 257, 267, 294, 434, 458 y 587 pb), o las escaleras de ADN comerciales "123 bp DNA Ladder" (Life Technologies) y "GeneRuler 100 bp DNA Ladder" (Fermentas), según se señala al pie de cada una de las figuras.

Los geles utilizados para visualizar ADN se dejaron migrar a 80V durante tiempos variables, de acuerdo al tamaño de los fragmentos. Aquellos geles utilizados para visualizar ARN se migraron a 140 V durante 15 a 20 min. Luego de su migración, los geles fueron observados sobre un transiluminador de luz UV y fotografiados empleando una cámara digital Kodak EDAS 290.

#### 4.3.4. Elución y purificación de bandas de geles de agarosa

La elución de bandas de ácido nucleico de los geles de agarosa se llevó a cabo empleando el kit "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen) o el kit "Wizard SV Gel and PCR clean-up sistem" (Promega), y siguiendo en ambos casos el protocolo del respectivo fabricante. Los productos finales se eluyeron en volúmenes adecuados de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril, y se conservaron a -20 °C.

## 4.3.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de todas las muestras de ácidos nucleicos se determinó en espectrofotómetro UV Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) realizando medidas de absorbancia a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}$  y  $A_{280}$ , respectivamente), y teniendo en cuenta que un valor de  $A_{260}$  igual a 1 corresponde a una concentración de ADN doble hebra de 50 ng/µL o a una concentración de ARN simple hebra de 40 ng/µL. Para evaluar la calidad de las muestras se determinó la relación  $A_{260}/A_{280}$ , teniendo en cuenta que valores de 1,8 y 2 son indicativos de buena calidad para ADN y ARN respectivamente.

#### 4.3.6. Digestión con enzimas de restricción

Todas las digestiones, ya sea aquellas realizadas con el objeto de visualizar insertos así como las digestiones preparativas de fragmentos y vectores para clonado, se realizaron utilizando una relación de 10 U de enzima por µg de ADN a digerir, en el buffer recomendado y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se dejaron transcurrir durante 1 hora a la temperatura correspondiente y se detuvieron mediante congelación.

Las dobles digestiones del vector de expresión pGEX-5X-3 (Amersham/GE) y el fragmento de la secuencia codificante para CCDC14 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (Fermentas), debieron realizarse en dos etapas, pues si bien ambas enzimas son activas a la misma temperatura (37 °C), funcionan a diferente concentración del buffer Tango (Fermentas). En un primer paso se digirió con *BamH*I en buffer Tango a una concentración final 1X, dejándose transcurrir la reacción durante 1 hora a 37 °C. A continuación, como segundo paso, el producto de la primera digestión fue digerido con *Xho*I en buffer Tango a una concentración final 2X, dejando nuevamente transcurrir la reacción durante 1 hora a 37 °C.

Las dobles digestiones para la liberación de insertos clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) con las enzimas de restricción *Apa*I y *Pst*I (Fermentas) debieron realizarse también en dos etapas, pues si bien ambas son activas en un mismo buffer funcionan óptimamente a diferente temperatura. En un primer paso se digirió con *Apa*I en buffer B (Fermentas) a concentración final 1X, dejándose transcurrir la reacción durante 1 hora a 28 °C. A continuación, como segundo paso, el producto de la primera digestión fue digerido con *Pst*I en el mismo buffer incubando nuevamente la reacción durante 1 hora, pero a 37 °C.

#### 4.3.7. Electroforesis en geles de agarosa conteniendo bisbenzimida-PEG

Con el propósito de separar aquellos fragmentos de igual tamaño, que comigran en los geles de agarosa pero tienen diferente secuencia, se empleó una simple técnica de electroforesis adaptada en nuestro laboratorio (Geisinger *et al.*, 1997), que se basa en el uso del reactivo HA-Y (Hanse Analytic, GmbH). El mismo consiste en bisbenzimida acoplada covalentemente a polietilenglicol (PEG) 6000 (el fundamento del uso de esta metodología se explica en "Resultados"). Esta técnica permite separar secuencias de ADN en el gel según su contenido en A+T, haciendo posible resolver diferencias menores al 1% (Wawer *et al.*, 1995).

Se realizaron geles de agarosa al 1,5% en EDTA 25 mM pH 5,9, sin adicionarles bromuro de etidio. Se fundió la agarosa de la forma habitual y luego de que la temperatura estuviera por debajo de los 70 °C se agregó el reactivo HA-Y a una concentración final de 1 U por cada mL de solución de agarosa. Las corridas se realizaron en el mismo buffer en que se fabricaron los geles, evitando que los mismos quedaran sumergidos y que así se "lavara" el reactivo HA-Y de dentro de los geles. Este reactivo tiene una fluorescencia intrínseca que dificulta la visualización de las bandas, por lo cual fue necesario sembrar cantidades de ADN por pocillo mayores que lo que se suele sembrar en geles de agarosa comunes (aproximadamente un 50% adicional). Una vez iniciadas las corridas, y luego de que el ADN ingresó al gel, se cubrió con film adherente para evitar la evaporación del buffer. Las corridas se realizaron a una velocidad de 3V/cm hasta que el frente de corrida alcanzara 2/3 del gel (2 a 3 horas, aproximadamente), deteniendo la corrida cada 20 a 30 min. para mezclar el buffer de los reservorios de los polos positivo y negativo de la cuba, con el fin de evitar el agotamiento de la capacidad del mismo y el consecuente aumento de temperatura. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio en solución (2  $\mu$ g/mL) durante 30 min., se observaron bajo transiluminador de luz UV y se fotografiaron.

#### 4.3.8. Secuenciación de ácidos nucleicos

Las reacciones de secuenciación de minipreparaciones de ADN plasmídico para determinar la secuencia de insertos, se realizaron en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo (IPMON), empleando un secuenciador automático de 4 capilares ABI3130 (Applied Biosystems). Las mismas se llevaron a cabo a partir de iniciadores del vector correspondiente.

Los productos de PCR cuya secuencia se deseaba determinar fueron enviados a la empresa Macrogen (www.macrogen.com) en Seúl (Corea), la cual dispone de secuenciadores automáticos de 96 capilares ABI3730XL (Applied Biosystems). Los iniciadores utilizados en las reacciones de secuenciación fueron, en cada caso, los mismos con los que se amplificaron los fragmentos.

#### 4.3.9. Análisis bioinformático de secuencias

El análisis y la edición de las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, así como el ensamblado de la secuencia completa del gen *CCDC14* se realizaron empleando el programa "Bioedit Sequence Alignment Editor" (North Carolina State University, U.S.A.).

La búsqueda de homologías se llevó a cabo con el programa BLAST (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</u>), opciones de programa Blastx, tBLASTn y tBLASTx, y contra todos los bancos de datos de secuencias. Las búsquedas se

efectuaron contra genomas completos, ESTs ("expressed sequenced tags"), ADNc y nr (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB).

Para la determinación de estructuras secundarias y motivos proteicos se utilizaron los programas disponibles en el sitio Expasy (http://expasy.org). La búsqueda de motivos de tipo "coiled-coil" se efectuó mediante el programa COILS (<u>http://embnet.vital-it.ch/software/COILS form.html</u>) (Lupas *et al.*, 1991).

#### 4.3.10. RT-PCR

A lo largo de este trabajo se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR para:

- a. La realización de estudios de expresión diferencial de ARNs correspondientes a bandas obtenidas en los análisis de DD;
- b. La obtención de la secuencia codificante completa del gen CCDC14; y
- c. La obtención de un fragmento de la secuencia codificante de *CCDC14* para su clonado en un vector de expresión.

### 4.3.10.1. Diseño de iniciadores

El diseño de todos los iniciadores empleados en las reacciones de PCR para amplificar distintos fragmentos de interés se llevó a cabo en el laboratorio utilizando combinación de "Primer3Plus" una los programas (<u>http://www.primer3plus.com/cqi-bin/dev/primer3plus.cqi</u>) y "Oligo Analyzer" (<u>http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware</u>). La fabricación de los oligonucleótidos se encargó a la empresa IDT (Iowa, U.S.A.). Los mismos se recibieron liofilizados, se resuspendieron en Tris 10 mM pH 8 estéril a una concentración stock de 250 µM, y se prepararon alícuotas de trabajo a una concentración de 25 µM en agua ultrapura estéril.

Los iniciadores diseñados para estudios de expresión con las distintas bandas del DD, así como aquellos empleados para la obtención de la secuencia codificante completa de *CCDC14*, constaban de entre 19 y 20 pares de bases, y eran específicos de la secuencia de interés [Tabla 4.1].

Iniciador	Secuencia	Tamaño	% GC	Tm*	
		(pb)		(°C)	
Banda I <sub>2</sub> Fw	5'-GCGGGTTAGAGCAAAACATC-3'	20	50	60	
Banda $I_2 Rv$	5'-GAGACAGAGAAGCCGGTGAC-3'	20	60	64	
Banda I₅ Fw	5'-TAACAAAACAGAGCACCACC-3'	20	45	58	
Banda $I_5 Rv$	5'-GAAGAGGAAAATGGCAAACG-3'	20	45	58	
Banda $II_1$ Fw	5'-AAATGTCACTGTCCCTGCTC-3'	20	50	60	
Banda $II_1 Rv$	5'-GGTGGATCTCCTCCTTACTC-3'	20	55	62	
Banda II <sub>4</sub> Fw	5'-GTCGTTTCTTCTAGGGTCTC-3'	20	50	60	
Banda II $_4$ Rv	5'-TTCTTAACAGGCTCCTCTGG-3'	20	50	60	
Banda III <sub>15</sub> Fw	5'-CTCAGGGTTCACTTATCACC-3'	20	50	60	
Banda III <sub>15</sub> Rv	5'-TCCTAGTGCATCCTGGTATC-3'	20	50	60	
Banda VIII $_3$ Fw	5'-GGGATTGCCTAGATGATTTG-3'	20	45	58	
Banda VIII $_3$ Rv	5'-AATTCCTTCTGCAGCTTAGG-3'	20	45	58	
Banda $X_3$ Fw	5'-GGGTGGTTACATGGATGGAG-3'	20	55	62	
Banda X <sub>3</sub> Rv	5'-ACTTCCTGACCCTGCATTTG-3'	20	50	60	
CCDC14 Fw1	5'-CCCGACCCGAAGGAAAAAC-3'	19	57,9	60	
CCDC14 Rv1	5'-GACCAGCCAAAACCAGAATG-3'	20	50	60	
CCDC14 Fw2	5'-AATATACCAAGCCCTCTGTG-3'	20	45	58	
CCDC14 Rv2	5'-AGCGTTCTCACTTCTCAAC-3'	19	47,4	56	
CCDC14 Fw3	5'-CTCAGAAGTTCAGAGATTG-3'	19	42,1	54	
CCDC14 Rv3	5'-GCAGCACATTTTCACAGAG-3'	19	47,4	56	
CCDC14 Fw4	5'-AGCCCCTCCTCACATCTCC-3'	19	63,2	62	
CCDC14 Rv4a	5'-CTGAAGTCCTGCTCATCACG-3 '	20	55	62	
CCDC14 Rv4b	5'-ACTCCATCATTTCCAAAGAC-3'	20	40	56	
CCDC14 Fw5	5'-GTAATGCTAAATAACCAAG-3'	19	31,6	50	
CCDC14 Rv5a	5'-AGACCTAAAACAAACAAAC-3'	19	31,6	50	
CCDC14 Rv5b	5'-GAAGTAGGAATCTGAACTG-3'	19	42,1	54	
β-actina Fw	5'-CCATGTACGTAGCCATC-3'	17	53	52	
β-actina Rv	5'-GTACCACCAGACAGCA-3'	16	56	50	
CCDC14 BamHI Fw	5'-CCTTAA <u>GGATCC</u> CTGCCTGTCCTGCTTATTC-3'	31	51,6	n/c	
CCDC14 XhoI Rv	5'-CATGAA <u>CTCGAG</u> ACTTGGGTGTGCCTGACTG-3'	31	54,8	n/c	

Tabla 4.1. Propiedades de los iniciadores de PCR

\*Tm: temperatura de desnaturalización (temperatura de "melting"). n/c: no corresponde.

Los iniciadores empleados para la obtención del ADNc correspondiente a parte de la secuencia codificante del gen *CCDC14* para su clonado en un vector de expresión, se diseñaron en base a la secuencia del ARNm previamente confirmada mediante secuenciación, y adicionando algunas bases necesarias para poder proceder luego al clonado (Ver tabla 4.1). El iniciador izquierdo, CCDC14 *Bam*HI Fw, posee una

longitud de 31 pb. Contiene 20 bases específicas del gen (en itálica), y una cola de 11 bases que incluye una secuencia de corte para la enzima de restricción *Bam*HI (subrayada) más 6 bases flanqueantes (en gris) para facilitar el corte de la enzima en el extremo del fragmento (Fermentas, catálogo 2007). La secuencia específica y el sitio de corte de la enzima comparten una base. El iniciador derecho, CCDC14 *Xho*I Rv, posee también una longitud de 31 pb. Contiene 19 bases específicas del gen (en itálica) y una cola de 12 bases que incluye el sitio de corte de la enzima *Xho*I subrayada) más 6 bases flanqueantes necesarias para que la enzima pueda cortar (en gris).

#### 4.3.10.2. Transcripción reversa (RT)

El ARN total obtenido a partir de poblaciones celulares de testículo y otros tejidos de rata se empleó como molde en reacciones de transcripción reversa utilizando como iniciador un oligómero "oligo  $dT_{18}$ ", con el fin de obtener una primera hebra de ADNc correspondiente a todos los genes expresados en cada tipo celular. Para todas las reacciones se partió de 1 µg de ARN total y se empleó la siguiente mezcla de reacción [Tabla 4.2A y 4.2B], utilizando soluciones y reactivos libres de ARNasas:

Tabla 4.2. Mezclas de transcripción reversaA. Mezcla de transcripción reversa, tubo 1.

Muestra de ARN	Volumen correspondiente a 1 µg
Oligo dT <sub>18</sub> (0,5 μg/μL)	1 µL
Agua DMPC	Cantidad necesaria para 11 µL
Volumen Parcial <sub>1</sub>	11 µL

#### B. Mezcla de transcripción reversa, tubo 2.

Buffer de la transcriptasa reversa (5X)	4 µL
dNTPs (2,5 mM)	2 µL
Inhibidor de ARNasas (40U/µL, Fermentas)	0,25 µL
Agua DMPC	1,75 µL
transcriptasa reversa M-MuLV RT (200U/µL, Fermentas)	1µL
Volumen Parcial <sub>2</sub>	9 µL

El tubo 1, conteniendo el ARN y el iniciador, se incubó durante 5 min. a 70 °C, para permitir la desnaturalización del ARN. Se colocó en frío, se adicionó el contenido del tubo 2 y el volumen final de 20  $\mu$ L se mezcló por pipeteo suave. Luego se incubó en termociclador "GeneAmp 2400" (Perkin-Elmer) durante 5 min. a 37 °C, 1 hora a 42 °C y 10 min. a 70 °C sucesivamente. En paralelo, se preparó el control negativo de la RT en otro tubo conteniendo idénticas cantidades de ARN y de todos los reactivos excepto la enzima RT (cuyo volumen se sustituyó por agua), y se incubó de la misma forma. El producto obtenido se almacenó en alícuotas de uso de 2  $\mu$ L a -80 °C.

#### 4.3.10.3. Condiciones de amplificación

Los estudios de expresión se realizaron comparando los ARN totales extraídos de 11 tejidos de rata (testículo total de adulto, testículo total de neonato, epidídimo, ovario, cerebro, hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón e intestino delgado). Asimismo, en los estudios se incluyó ARN extraído de poblaciones celulares de testículo de rata enriquecidas en espermatocitos paquiténicos y espermátidas redondas, previamente obtenidas por medio de elutriación y preservadas a -80 °C, disponibles en el laboratorio.

Para ello, los ADNc obtenidos mediante transcripción reversa se emplearon como molde en reacciones de PCR a bajo número de ciclos (semicuantitativas). La mezcla de reacción empleada en todos los casos fue la siguiente [Tabla 4.3]:

Та	bla 4.3	8. Mezcla	de read	tivos de	PCR	para	estudi	os
de	expre	sión dife	rencial					

Agua	37 µL
Buffer Taq (10X)	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
dNTPs (25 mM)	0,2 µL
Iniciador Izquierdo (25 µM)	0,8 µL
Iniciador Derecho (25 µM)	0,8 µL
Taq Polimerasa (5u/µL, Fermentas)	0,2 µL
ADNc	2 µL
Volumen total	50 µL

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado, partiéndose para los duplicados de productos de RT obtenidos en reacciones independientes. Se utilizó el termociclador ya indicado, y el programa empleado fue: 92 °C 2 min., un número variable de ciclos (menor o igual a 30, dependiendo del número mínimo de ciclos de amplificación necesarios para visualizar la banda) de 30 seg. a 92 °C, 30 seg. a la temperatura de hibridación de cada juego de iniciadores y 30 seg. a 72 °C, y una extensión final de 5 min. a 72 °C para completar la reacción. Para cada juego de iniciadores utilizado se ajustó la temperatura de hibridación y el número de ciclos, según se presenta en la Tabla 4.4.

Iniciador	Iniciador	Tamaño del	Temperatura de hibridación	Número
directo	reverso	amplicón (pb)	de iniciadores (°C)	de ciclos
Banda I <sub>2</sub> Fw	Banda $I_2 Rv$	186	58	28
Banda I₅ Fw	Banda I₅ Rv	172	54	25
Banda II $_1$ Fw	Banda $II_1 Rv$	183	57	18
Banda II <sub>4</sub> Fw	Banda $II_4 Rv$	158	55	25
Banda III <sub>15</sub> Fw	Banda III <sub>15</sub> Rv	217	52	30
Banda VIII <sub>3</sub> Fw	Banda VIII <sub>3</sub> Rv	313	55	25
Banda X₃ Fw	Banda X <sub>3</sub> Rv	245	58	27
B-actina Fw	β-actina Rv	517	48	40

Tabla 4.4. Combinaciones de iniciadores y condiciones de amplificación, para estudios de expresión

Como control positivo de las reacciones de RT-PCR, se partió de igual cantidad de ADNc y se amplificó un fragmento del gen de la  $\beta$ -actina en todos los tejidos y poblaciones celulares que se estudiaron. Como control negativo, se realizó en paralelo la reacción de PCR para cada juego de iniciadores con el control negativo de RT indicado en la sección anterior.

La misma mezcla de reacción presentada en la Tabla 4.3, se empleó para la amplificación de la secuencia codificante completa de *CCDC14*. La misma se obtuvo amplificando por separado 4 fragmentos solapantes entre sí, mediante el uso de 4 juegos de iniciadores complementarios a zonas flanqueantes de los intrones del gen (ver "Resultados", Figura 5.6). Para cada juego de iniciadores utilizado se ajustó la temperatura de hibridación y el número de ciclos, según se presenta en la Tabla 4.5.

Estas reacciones de PCR se realizaron en el mismo termociclador que las reacciones anteriores, empleando el programa: 92 °C 2 min., 30 ciclos de 30 seg. a 92 °C, 30 seg. a la temperatura de hibridación correspondiente a cada juego de iniciadores y 1:30 min. a 72 °C, y finalmente una extensión final de 7 min. a 72 °C.

Iniciador	Iniciador	Tamaño del	Temperatura de hibridación
directo	reverso	amplicón (pb)	de iniciadores (ºC)
CCDC14 Fw1	CCDC14 Rv1	783	55
CCDC14 Fw2	CCDC14 Rv2	856	53
CCDC14 Fw3	CCDC14 Rv3	810	51
CCDC14 Fw4	CCDC14 Rv4b	1506	53

Tabla 4.5. Combinaciones de iniciadores y condiciones de amplificación, parala obtención de la secuencia codificante completa de CCDC14

Finalmente, para la amplificación del ADNc correspondiente a parte de la secuencia codificante del gen *CCDC14* para su clonado en un vector de expresión, se realizó la siguiente mezcla de reacción [Tabla 4.6]:

Tabla 4.6. Mezcla de reactivos de PCR para la obtención de un fragmento de la secuencia codificante de *CCDC14* con miras a su clonado en vector de expresión

17,2 μL
2,5 µL
2 µL
0,2 µL
0,4 µL
0,4 µL
0,3 µL
2 µL
25 µL

Se utilizaron los iniciadores CCDC14 *Bam*HI Fw y CCDC14 *Xho*I Rv, diseñados para amplificar un fragmento de 854 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador indicado más arriba, y el programa empleado fue: 2 min. a 94 °C, 5 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 60 °C y 1 min. a 72 °C, seguidos de 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 65 °C y 1 min. a 72 °C, y 1 ciclo de extensión final de 5 min. a 72 °C. La razón de efectuar la reacción de PCR

en dos etapas es que durante los primeros ciclos se permite que la "cola" de 11 nucleótidos de cada iniciador, conteniendo el sitio de restricción y la secuencia flanqueante, quede integrada a los amplicones, lo que hace posible el uso de una temperatura mayor de hibridación durante los ciclos siguientes.

Todos los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa (Ver 4.3.3.) y se conservaron a -20 °C para su posterior utilización.

#### 4.3.11. Northern blot

Para el ensayo de Northern blot se siguió el protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Se migraron 40 µg de cada una de las muestras de ARN total a comparar, en geles de agarosa desnaturalizantes conteniendo formaldehído. Se agregó 1 µL de bromuro de etidio (1mg/mL) a cada muestra antes de cargar el gel, para poder monitorear la corrida y evaluar la eficiencia de la transferencia. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron transferidos a una membrana de hibridación de nylon con carga positiva Hybond N+ (Amersham/GE) siguiendo el protocolo de transferencia líquida mencionado.

Como sonda se empleó el producto de RT-PCR correspondiente a la banda obtenida con los iniciadores CCDC14 Fw4 y CCDC14 Rv4a (Ver figura 5.6). Este fragmento de PCR poseía 711 pb de la región codificante de *CCDC14*. El marcado de la sonda se efectuó empleando el kit "Ready-To-Go DNA Labeling Beads" (-dCTP, GE Healthcare) que se basa en la técnica de *Random Priming*, siguiendo el protocolo del fabricante. Se incluyó en la reacción de marcado el radioisótopo  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP (MP Biomedicals). Las reacciones de marcado se hicieron por 1 hora a 37 °C. Las sondas marcadas se purificaron mediante columnas "Illustra MicroSpin G-50" (GE Healthcare), para eliminar los nucleótidos no incorporados, según las instrucciones del manual incluído.

El protocolo de hibridación se llevó a cabo en un horno de hibridación (Hybaid), empleando ULTRAhyb (Ambion) como solución de hibridación. La prehibridación se hizo durante 2 horas a 42 °C. Para la hibridación, la sonda se hirvió durante 5 min. y se agregó a la solución de prehibridación, permitiéndose a la hibridación transcurrir por 20 horas a 42 °C. Se realizaron dos lavados de 5 min. cada uno en SSC 2X, SDS 0,1% a 42 °C, y luego dos lavados de 15 min. cada uno en SSC 0,1%, SDS 0,1% a la misma temperatura. Debido a la aparición de ruido de

fondo en un primer revelado, se efectuó un nuevo lavado en la segunda solución por 30 min. a una temperatura de 45 °C. La membrana se envolvió cuidadosamente en dos capas de film adherente, se colocó en un casete BAS Cassette2 2040 (FUJIFILM Corporation) y se expuso con una pantalla BAS IP 2040E (FUJIFILM Corporation) a temperatura ambiente, por tiempos que variaron desde 24 horas horas hasta una semana. El escaneo de la pantalla IP para detectar la presencia de bandas se realizó en un escáner de fluorescencia FUJIFILM FLA-9000 (FUJIFILM Corporation), empleando el programa Image Reader FLA-9000 (FUJIFILM Corporation).

#### 4.3.12. Hibridación in situ con inmunohistoquímica

Para los ensayos de hibridación *in situ* se emplearon cortes de testículo de ratas juveniles y adultas, e hígado, realizados por el método de congelación (sección 4.2.4.).

Como sonda se usó un fragmento de la secuencia codificante del ARNm de CCDC14, que se encontraba clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega). Este fragmento de PCR poseía 831 pb de la región codificante y coincidía con el fragmento que se empleó para la expresión de una proteína recombinante y la producción de un anticuerpo anti-CCDC14 (Ver 4.3.14 y figura 5.7). El marcado de las sondas se efectuó con el "Biotin RNA Labeling Mix" (Roche), transcribiendo a partir de los promotores T7 y Sp6 las sondas sentido (control negativo) y antisentido respectivamente, y empleando las correspondientes ARN polimerasas (Roche). Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo del fabricante en un volumen de 20 µL, incubando durante 3 horas a 37 °C. Luego se agregaron 2 µL de ADNasaI libre de ARNasas (Roche), se incubaron las reacciones durante otros 30 min. a 37 °C y se detuvieron mediante el agregado de 0,75 µL de 0,5 M EDTA pH 8,0. Las sondas se purificaron a través de su pasaje por columnas ProbeQuant G-50 Microcolumns (Amersham/GE), para eliminar los nucleótidos no incorporados. La determinación de la calidad y concentración de las sondas sintetizadas se realizó por electroforesis y medidas espectrofotométricas, según lo detallado en las secciones 4.3.3. y 4.3.5.

Para cada tejido a estudiar se seleccionaron tres portaobjetos conteniendo dos cortes cada uno: un portaobjetos para incubar con la sonda antisentido, otro para incubar con la sonda sentido, y finalmente un tercero para emplear como control del pegado inespecífico de la estreptavidina conjugada a fluoróforo, sin sonda. Los portaobjetos se descongelaron y los cortes se lavaron con SSC 4X a temperatura ambiente durante 1-2 min. La permeabilización se realizó incubando con Tritón X-100 al 0,1% en SSC 4X durante 10 min. a 37 °C, seguido de dos lavados de 5 min. on SSC 4X a 37°C. Los aldehídos y las cetonas libres se bloquearon con borohidruro de sodio 1% en SSC 4X durante 30 min. a 37 °C, lavando luego dos veces con SSC 4X durante 5 min. a temperatura ambiente.

Dado que las sondas antisentido y sentido fueron marcadas con biotina, fue necesario realizar un bloqueo previo de la biotina endógena de los tejidos. El mismo se efectuó empleando el kit "Streptavidin/Biotin Blocking Kit" (Vector Laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: se incubaron los cortes con solución de streptavidina durante 15 min., se lavaron 5 min. con SSC 4X, luego se incubaron con solución de biotina durante 45 min. y finalmente se lavaron dos veces por 5 c min. en SSC 4X. Todas estas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Luego se comenzó con el proceso de hibridación. Para ello se prehibridaron los cortes durante 50 min. a 50 °C en solución de hibridación (ver 4.1.1), incubándose luego o.n. a la misma temperatura, con la correspondiente sonda, previamente desnaturalizada, a una concentración de 5 ng/µL en solución de hibridación. El control sin sonda se incubó solamente con solución de hibridación. Al otro día se realizó la siguiente serie de lavados, de manera de realizar la selección de los híbridos específicos formados llevando el nivel de rigurosidad desde 4X SSC hasta 0,25X SSC:

- 2 lavados de 5 min. a 50 °C en 4X SSC con 30% de formamida,
- 2 lavados de 10 min. a temperatura ambiente en 4X SSC,
- 2 lavados de 5 min. a temperatura ambiente en 2X SSC,
- 2 lavados de 5 min. a temperatura ambiente en 1X SSC,
- 2 lavados de 5 min. a temperatura ambiente en 0,5X SSC,
- 2 lavados de 5 min. a temperatura ambiente en 0,25X SSC.

El híbrido ARN-ARN se fijó durante 5 min. con PFA al 3% en buffer PHEM (preparado inmediatamente antes de su uso) a temperatura ambiente, lavando luego 3 veces por 5 min. con buffer PHEM. Para el reconocimiento de la sonda se incubó durante 1 hora a 37 °C con streptavidina conjugada al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen, S-32345) a una concentración de 1/200 en solución de incubación (ver

4.1.1), realizándose luego tres lavados de 5 min. en solución de incubación y otros tres lavados de 5 min. en buffer PHEM, todos a temperatura ambiente.

Posteriormente se procedió a la realización de la inmunohistoquímica sobre los mismos cortes. En todos los casos, la inmunohistoquímica fue realizada con posterioridad a la hibridación in situ debido a la diferencia en los niveles de astringencia entre ambos procedimientos. Los cortes se bloquearon o.n. a 4 °C con solución de incubación conteniendo un 5% de suero normal de cabra. Al día siguiente se incubaron los cortes con un anticuerpo primario monoclonal antivimentina (Abcam, VI-10, ab20346) a una concentración de 1/500 en solución de incubación, durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo no unido se lavó tres veces por 5 min. a 37 °C con solución de incubación. Luego se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra, conjugado al fluoróforo Cy5 (Abcam, ab97037) a una concentración de 1/800 en solución de incubación, durante 45 min. a 37 °C. Se lavó cuatro veces por 5 min. a 37 °C con solución de incubación y 2 veces por 5 min. con buffer PHEM. Finalmente se montaron los preparados agregando una gota del medio "UltraCruz Mountig Medium" (Santa Cruz, sc-24941), que contiene DAPI, se dejaron secar y se sellaron, conservándolos a 4 °C en oscuridad hasta su observación.

La observación y adquisición de imágenes se llevó a cabo en un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV300 equipado con una cámara digital DP70 y usando el programa Fluoview v. 4.3. (Servicio de Microscopía de Epifluorescencia y Confocal del IIBCE).

#### 4.3.13. Rastreo de genoteca de ADNc

La biblioteca de ADNc de espermatocitos paquiténicos de rata empleada en el rastreo se encontraba disponible en el laboratorio. La misma fue construída en el vector  $\lambda$ -ZAP (Stratagene), a partir de una población celular altamente enriquecida en dicho tipo de célula mediante elutriación. Se empleó una alícuota de la misma con un título de 1 x 10<sup>10</sup> ufp/mL y diluciones seriadas de la misma, las cuales se conservaron a 4 °C durante todo el rastreo.

Los plaqueos de las genotecas se realizaron siguiendo el protocolo del "ZAP cDNA Synthesis Kit" (Stratagene) con el cual se había sintetizado la genoteca. Para los rastreos primarios se iniciaron cultivos de células de *Escherichia coli* XL1-Blue en LB conteniendo 0,2% de maltosa y 10 mM MgSO<sub>4</sub>, se dejaron crecer hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0,5-0,6, se centrifugaron 10 min. a 6000 rpm y 4 °C, y se resuspendieron en 10 mM MgSO<sub>4</sub> a DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Por cada placa a realizar se mezclaron 600 µL de estas células con un volumen de una dilución de la genoteca equivalente a 40.000 ufp y se incubó durante 15 min. a 37 °C con agitación. Se agregaron 6,5 mL de medio NZY-top agarosa fundido y termostatizado a 45-48 °C, se mezcló y se vertió sobre placas de LB agar de 150 mm de diámetro, termostatizadas a 37 °C. Se incubó a 37 °C hasta la aparición de playas de lisis de 1-1,5 mm de diámetro (8-10 horas). Luego se incubó durante algunas horas a 4 °C.

Las playas de lisis se transfirieron a discos de membrana de nylon Hybond N+ (Amersham/GE), siguiendo las pautas descritas en el manual "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Boehringer Mannheim), con modificaciones. Para cada placa de ronda primaria de rastreo se levantaron filtros por duplicado; el primer filtro se apoyó sobre la placa durante 2 min. y el segundo filtro durante 4 min. Los filtros se colocaron boca arriba secuencialmente sobre 2 discos de papel Whatman embebidos en solución desnaturalizante durante 5 min., solución neutralizante (ver 4.1.1) durante 15 min., y 2X SSC durante 10 min. Entre cada solución se secaron rápidamente sobre papel. Finalmente, las membranas se fijaron por horneado a 80 <sup>o</sup>C durante una hora y media.

El fragmento a utilizar como molde para la síntesis de la sonda se escindió del vector de clonado pGEM-T Easy mediante digestión con las enzimas de restricción *Apa*I y *Pst*I, se migró en gel de agarosa y la banda se purificó según se establece en la sección 4.3.4. El marcado se efectuó por la técnica de "random priming", empleando el kit de marcado por quimioluminiscencia "DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II" (Roche). Se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante, y se marcaron 500 ng de ADN durante 20 horas a 37 °C en un volumen de reacción de 50  $\mu$ L, deteniéndose la reacción por agregado de 0,75  $\mu$ l de EDTA 0,5 M, y no removiéndose los nucleótidos no incorporados. La eficiencia de marcado se determinó realizando un dot blot, como se indica en el protocolo del kit.

Las prehibridaciones e hibridaciones se llevaron a cabo en horno de hibridación (Hybaid) utilizando los reactivos provistos en el kit. Se prehibridó en solución de hibridación DIG Easy Hyb durante 1 hora a 42 °C. Luego se agregaron 25 ng de sonda marcada por cada mL de solución de hibridación y se hibridó o.n. a

42 °C. Se efectuaron dos lavados de 5 min. cada uno en SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente, seguidos de dos lavados de 15 min. cada uno en SSC 0,1X, SDS 0,1% a 68 °C. Para la detección quimioluminiscente se siguió el protocolo del mismo kit que para el marcado de las sondas. La incubación en la reacción luminiscente (CSPD) se hizo en placa de petri con protección de la luz, incubando secuencialmente de a cinco min. por membrana, con 7 mL de CSPD para las placas de 150 mm de diámetro y 4 mL para las placas de 80 mm. Las membranas se expusieron con placa de autorradiografía a temperatura ambiente, entre 30 min. y 2 horas, y se reveló de la forma habitual.

Las playas de lisis positivas fueron levantadas de la placa con la parte posterior de una punta amarilla de pipeta automática e incubadas en 1 mL de buffer SM con 20 µL de cloroformo. Se mezcló con agitador vortex durante 1 minuto para liberar los bacteriófagos y se conservó a 4 °C. Las soluciones conteniendo los bacteriófagos se diluyeron, y fueron tituladas previo a cada ronda de rastreo, según lo indicado en el manual del "ZAP cDNA Synthesis Kit".

Para la siguiente ronda de purificación se siguió el mismo procedimiento con la diferencia de que se emplearon placas de petri de 80 mm de diámetro en las cuales se sembraron en paralelo 100 y 300 playas de lisis (de acuerdo con lo estimado a partir de la titulación), de modo de poder aislar fácilmente las positivas. Se utilizaron 200 µL de células XL1-Blue DO<sub>600nm</sub> 0,5 y 3 mL de medio NZY-top por placa, y se levantó un único filtro por cada placa. En los casos en que se obtuvieron playas de lisis positivas aisladas, una de ellas se levantó del mismo modo que para la primera ronda de rastreo, y se conservó en 1 mL de medio SM con cloroformo a 4 °C. Para aquellos casos en que no se obtuvieron playas positivas aisladas, se procedió a efectuar una tercera ronda de purificación.

La escisión *in vivo* de fásmidos pBluescript SK+ se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit "ZAP-cDNA Synthesis Kit". Se combinaron 200 µL de células XL1-Blue  $DO_{600nm} = 1$  en 10 mM MgSO<sub>4</sub>, con un volumen equivalente a una cantidad mayor a 1 x 10<sup>5</sup> ufp de las playas de lisis postivas levantadas, y un volumen equivalente a una cantidad mayor a 1 x 10<sup>6</sup> ufp del bateriófago "helper" R408 (Stratagene), y se incubó durante 15 min. a 37 °C con agitación. Se agregaron 4 mL de medio 2X YT, se volvió a incubar a 37 °C durante 3 horas, y finalmente 20 min. a 70 °C. Luego se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. a 4 °C y se transfirió el sobrenadante conteniendo los fásmidos pBluescript a un nuevo tubo. De ese sobrenadante se tomaron 100 µL y se combinaron con 200 µL de células XL1-Blue

 $DO_{600nm} = 1$ , y se incubó durante 15 min. a 37 °C con agitación. Se sembraron 100 µL sobre placas de LB conteniendo amp y se incubó o.n. a 42 °C y no a 37 °C, de modo de evitar la co-infección con bacteriófago "helper" (ya que el mismo posee una mutación que lo hace termosensible). Se seleccionaron colonias aisladas y se realizaron dos estrías sucesivas sobre nuevas placas. Nuevamente a partir de colonias aisladas se iniciaron cultivos y se realizaron minipreparaciones con el fin de obtener ADN plasmídico de los fásmidos pBluescript conteniendo las secuencias de interés. Los ADNs purificados se digirieron con las enzimas restricción *Apa*I y *Pst*I, y los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa para chequear la presencia de insertos y estimar el tamaño de los mismos (ver 4.3.2., 4.3.3. y 4.3.6.). Dos clones representantes de cada una de las playas de lisis positivas se secuenciaron, para conocer la identidad de la secuencia y verificar su homología con la sonda empleada.

#### 4.3.14. Reacciones de clonado

#### 4.3.14.1. Preparación de células competentes

Se prepararon células competentes de las cepas de *E. coli* DH10B (GIBCO-BRL, Life Technologies) y BL21 STAR (Invitrogene). La primera se utilizó con el fin de conservar secuencias de interés y facilitar el proceso de clonado, en tanto la cepa BL21 STAR se empleó para la síntesis de la proteína de fusión, dado que posee características especiales para la producción de proteínas recombinantes, al ser inducida con IPTG. Esta cepa es deficiente en la producción de RNasa E y de la proteasa OmpT, lo que les da mayor estabilidad a los ARNm y a las proteínas resultantes de la inducción [manual de uso de Invitrogene "One Shot BL21 Star (DE3) and One Shot BL21 Star (DE3) pLysS Competent Cells"].

Para la preparación de células competentes, se crecieron células de ambas cepas en cultivos de 3 mL de LB líquido a 37 °C o.n. con agitación. En el caso de DH10B se adicionó tetraciclina al cultivo, en tanto BL21 STAR no posee sistema de selección por antibiótico. Al día siguiente, se tomó una alícuota del cultivo inicial y se realizó una dilución 1/100 en 200 mL de LB y se dejó crecer hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0,2-0,3 (aproximadamente 3 horas). Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm por 5 min., se descartó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 80 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío, y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 5 min., se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado 2

mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío y se dejó o.n. a 4 °C. Finalmente se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de células, se mezclaron con glicerol a concentración final 20%, y se congelaron en un contenedor con etanol en freezer de -80 °C.

# 4.3.14.2. Ligación en vector pGEM-T Easy y transformación de células DH10B

El producto de amplificación de parte de la secuencia codificante del gen *CCDC14* se ligó inicialmente al vector pGEM-T Easy (Promega), específico para la ligación de productos de PCR, de modo de facilitar la digestión del fragmento y su posterior ligación al vector de expresión pGEX-5x-3 (Amersham/GE).

La reacción de ligación en el vector pGEM-T Easy se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, y empleando una relación molar inserto:vector de 3:1 (50 ng de vector y 42,5 ng de producto de PCR). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10  $\mu$ L, y se emplearon 5 U de ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas) en el correspondiente buffer. La reacción se dejó transcurrir, en primer lugar durante una hora a temperatura ambiente y a continuación o.n. a 4 °C.

El total del volumen del producto de ligación se empleó para transformar 100  $\mu$ L de células competentes *E. coli* DH10B. Para ello, la mezcla se incubó por 30 min. en hielo, luego se la sometió a un choque térmico durante 90 seg. a 42 °C y se la volvió a incubar durante 2 min. en hielo. Luego se adicionaron 600  $\mu$ L de medio de cultivo LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Se sembraron 200 µL de la mezcla de transformación en placas de petri con LB agar/amp a una concentración final de 50 µg/mL, 30 µL de X-gal (20 mg/mL) y 9 µL de IPTG (200 mg/mL). Las placas se incubaron o.n. a 37 °C. El sitio de clonado múltiple del vector pGEM-T Easy se encuentra inmerso en la secuencia codificante para la porción N-terminal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Cuando la síntesis de ese péptido, que es inducible por el agregado de IPTG, se ve truncada por la inserción de una secuencia exógena, no se produce la complementación en  $\alpha$  de la porción C-terminal de la enzima, que es sintetizada por la propia bacteria. De este modo el reactivo cromogénico X-gal no puede ser metabolizado para dar un producto de color azul, y las colonias resultantes son de color blanco. De las colonias crecidas, se seleccionaron las de color blanco y se realizaron dos estrías de purificación en placas con LB agar/amp. A partir de las estrías, se seleccionaron

colonias aisladas y se iniciaron cultivos en 3 mL de LB líquido conteniendo 50 µg/ml de amp o.n. a 37 °C. A continuación se procedió a la extracción de los ADN plasmídicos de cada colonia, seguido de digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I, y corrida electroforética en gel de agarosa para control de insertos, según lo detallado en las secciones 4.3.2., 4.3.3. y 4.3.6.

#### 4.3.14.3. Ligación en vector pGEX-5X-3 y transformación de células BL21

El sistema de clonado en vectores pGEX-5x (Amersham/GE) se basa en la inserción de la secuencia de interés en un sitio múltiple de clonado ubicado a continuación de la secuencia codificante para la enzima GST (glutatión-Stransferasa) de Schistosoma japonicum, para ser expresada en E. coli como proteína de fusión (Harper & Speicher, 2008). La denominación pGEX-5x-3 corresponde a la inserción del fragmento de interés en el marco de lectura número 3. La GST se expresa naturalmente en E. coli como proteína soluble que se acumula en el citoplasma de la bacteria, favoreciendo la obtención de un buen rendimiento de la proteína de fusión en la fracción soluble de la célula (http://teachline. Is.huji.ac.il/72682/Booklets/PHARMACIA GST Gene Fusion System\_Handboook.pd f). La expresión del gen de fusión está bajo el control del promotor tac, el cual es inducido por IPTG. Los vectores pGEX-5x tienen además el gen lacIq, cuyo producto es una proteína represora del promotor del gen *tac*, lo que permite que el gen de fusión no se exprese hasta que sea inducido con IPTG. Además poseen el gen de resistencia a la amp, permitiendo a las células crecer en un medio de cultivo selectivo [Figura 4.1] (Harper & Speicher, 2008).

Las proteínas de fusión a GST son purificadas de lisados bacterianos inducidos, por cromatografía de afinidad con glutatión (sustrato natural de GST) inmovilizado en esferas de agarosa. La proteína de fusión es capturada por las esferas de glutatión-agarosa y las impurezas son removidas en los lavados. Luego, la proteína de fusión es eluída empleando glutatión reducido libre (Harper & Speicher, 2008).



Figura. 4.1. Mapa del vector pGEX-5x-3. Se muestra la secuencia del sitio de clonado múltiple, destacándose los sitios de corte para las enzimas BamHI y XhoI, entre los cuales se clonó parte de la secuencia codificante CCDC14. Se muestra para también la ubicación de la secuencia codificante para la GST, el promotor tac (Ptac), el gen de resistencia a amp (Amp<sup>r</sup>) y el gen de la proteína represora del promotor tac (lacIq) (extraído del manual de Amersham/GE, 2012).

El fragmento de la secuencia codificante de *CCDC14*, escindido del vector pGEM-T Easy mediante digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, para las cuales el inserto posee sitios de corte en sus extremos agregados por los iniciadores con que se lo amplificó (ver sección 4.3.10.2.), se purificó ligó al vector de expresión pGEX-5x-3, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (ver sección 4.3.6.).

La reacción de ligación en el vector se realizó empleando una relación molar inserto:vector de 10:1. Considerando que el inserto digerido posee un tamaño de 836 pb y el vector digerido 4949 pb, se utilizaron 100 ng y 167 ng, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL, y se emplearon 5 U de T4 ligasa (Fermentas) en el correspondiente buffer. La reacción se dejó transcurrir sucesivamente durante 1 hora a 22 °C y o.n. a 16 °C. Finalmente se inactivó la enzima calentando a 65 °C durante 15 min.

En paralelo, se realizó una reacción de ligación idéntica a la anterior pero con 100 ng de vector pGEX-5x-3 digerido con las mismas dos enzimas, sin agregar inserto, para ser empleada como control de la doble digestión, ya que sólo se religarían las moléculas de vector que se hubieran digerido con una sola enzima (es decir, en que la digestión con alguna de ambas enzimas hubiese fallado). Esto ayuda en cierta forma a estimar la cantidad de clones positivos que se puede obtener, ya que el vector pGEX-5x-3 no posee el sistema de selección blanco/azul que se encuentra presente en el pGEM-T Easy.

El total del volumen del producto de ligación se empleó para transformar 100 µL de células competentes *E. coli* DH10B de alta eficiencia, para maximizar la posibilidad de obtener clones recombinantes. El protocolo de transformación química empleado fue el mismo que el detallado en la sección 4.3.14.2. De las colonias crecidas, se seleccionaron 20 colonias aisladas y se efectuaron dos estrías sucesivas en placas con LB agar/amp. A partir de las estrías, se seleccionaron colonias aisladas y se iniciaron cultivos en 3 mL de LB líquido conteniendo 50 µg/ml de amp, los que se incubaron o.n. a 37 °C. A continuación se procedió a la extracción de los ADN plasmídicos de cada colonia, seguido de digestión con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, y corrida electroforética en gel de agarosa para chequear la presencia de insertos, según lo detallado en las secciones 4.3.2, 4.3.3 y 4.3.6. De los clones positivos, uno fue secuenciado para verificar la identidad del inserto, y que el fragmento se encontrara insertado en el marco de lectura correcto. El ADN plasmídico del clon cuya secuencia se había confirmado se utilizó para retransformar células BL21 Star competentes (cuya eficiencia de transformación no es tan alta como la de las DH10B), siguiendo el mismo protocolo que en las transformaciones anteriores. Se realizó el mismo procedimiento para el chequeo de la presencia e identidad del inserto. Finalmente, se seleccionó un clon conteniendo el vector con el inserto en la dirección correcta (pGEX-CCDC14) para la inducción de la síntesis de la proteína de fusión.

Dos clones positivos obtenidos en cada uno de los pasos seguidos en el proceso de clonación se seleccionaron para su conservación. Para ello se mezclaron 800  $\mu$ L de cultivo o.n de cada uno de los clones, obtenido a partir de una colonia aislada, con 200  $\mu$ L de una solución estéril de glicerol al 80%, y se conservaron a – 80 °C.

#### 4.4. MANIPULACIONES DE PROTEÍNAS

Durante un trabajo de tesis de grado llevado a cabo en nuestro laboratorio, el fragmento de ADN codificante para la proteína de fusión GST-CCDC14 clonado en el vector pGEX-5x-3 y contenido en células de la cepa BL21-Star según lo descrito en las secciones anteriores, fue empleado para la obtención de la proteína de fusión. Con ese objetivo, se analizaron distintas condiciones de inducción (concentraciones de IPTG y tiempos de inducción), así como la presencia de la proteína de fusión en las fracciones soluble e insoluble de extractos celulares. Finalmente, en base a los resultados obtenidos, la expresión de la proteína recombinante GST-CCDC14 fue inducida mediante IPTG a una concentración final de 0,3 mM durante 4 horas, y se recuperaron sólo las proteínas presentes en la fase soluble de las células, ya que al menos un 50% de la proteína de fusión aparecía en dicha fracción. La purificación se llevó a cabo por medio del empleo de columnas de glutatión, obteniéndose un total de 2,16 mg de proteína. Todo el proceso de expresión y purificación se monitoreó por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y ensayos de Western blot con un suero policlonal anti-GST de *Schistosoma japonicum* (tesis de grado de Gabriel Lassabe, 2011, Biblioteca de Facultad de Ciencias, Montevideo).

#### 4.4.1. Producción de anticuerpos policionales

La proteína recombinante GST-CCDC14 purificada fue precipitada mediante el agregado de 1 volumen de acetona, incubada durante 15 min. a -20 °C y centrifugada a 5000 rpm por 10 min. Luego, se resupendió en PBS 1X a una concentración adecuada y se conservó a -80 °C en alícuotas ya preparadas para inocular al conejo.

El conejo utilizado se recibió y mantuvo 4 días en la conejera del IIBCE para permitir su aclimatación. Luego, se procedió a tomar una muestra de 5 ml de su sangre con el fin de obtener suero del conejo no inmunizado (suero preinmune, control negativo), y se comenzó con el protocolo de inmunización.

La primera inoculación (día 0) se realizó en forma subcutánea en la zona del lomo, inyectándose 800 µg de proteína GST-CCDC14 en una emulsión conteniendo 50% de proteína en PBS más 50% de adyuvante completo de Freund (Sigma). Se dejó reaccionar durante 20 días y se recogieron 2 mL de sangre del conejo a partir de la vena de la oreja. Posteriormente, se le inocularon un total de 3 refuerzos ("boosters"), en los días 30, 60 y 90, con 400 µg de proteína en PBS más 50% de adyuvante incompleto de Freund (Sigma) cada uno. Diez días después de cada uno de los dos primeros refuerzos se recogieron 2 mL de sangre del conejo inmunizado, y 10 días después de la inoculación final se realizó un sangrado final, recogiéndose 100 mL de sangre.

El suero del conejo fue obtenido incubando la sangre a 37 °C 1 hora y luego 2 horas en hielo en la heladera. Una vez separado el suero del coágulo, se recuperó el suero con pipeta; el mismo fue transferido a un tubo limpio y centrifugado a 5000 g por 5 min. El sobrenadante (el suero) fue guardado a -80 °C en alícuotas de a 1 mL.

#### 4.4.2. Purificación del suero mediante cromatografía de afinidad

Una alícuota del suero conteniendo los anticuerpos anti-CCDC14, se purificó por cromatografía de afinidad a través de una columna realizada con la proteína de fusión GST-CCDC14 previamente obtenida, de modo de retener sólo los anticuerpos de interés. Para la confección de la columna se empleó el kit "HiTrap NHS-activated HP" (Amersham/GE), y se siguieron las instrucciones del fabricante.

# 4.4.3. Depleción de los anticuerpos anti-GST mediante inmunoprecipitación

Con el objeto de limpiar el suero de anticuerpos anti-GST, se realizó una inmunoprecipitación de los mismos. Para ello se crecieron dos cultivos de 3 mL de la cepa BL21 conteniendo el plásmido pGEX-5X-3 vacío (sin inserto), y se los incubó con IPTG en las condiciones indicadas anteriormente, de modo de inducir la expresión de la proteína GST. Los cultivos se centrifugaron a baja velocidad para precipitar las células, y las mismas se resuspendieron en 200 µL de buffer de inmunoprecipitacion. Las células se lisaron y los lisados se centrifugaron a 15000 rpm por 15 min. a 4 °C, recuperándose finalmente el sobrenadante.

Luego, se mezclaron 100 µL de suero con el sobrenadante anteriormente recuperado y 700 ul de buffer de inmunoprecipitacion. La mezcla se incubó o.n. 4 °C. Al día siguiente se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min. a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante, conteniendo los anticuerpos anti-CCDC14, depletados de anticuerpos anti-GST.

#### 4.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Los lisados proteicos de tejidos se obtuvieron como se describe en la sección 4.2.3, en tanto los provenientes de cultivos bacterianos se obtuvieron por

resuspensión de los precipitados de células en buffer de Laemmli. En todos los casos, los lisados se calentaron 5 min. a 100 °C para facilitar la solubilización de las proteínas, y se congelaron a -20 °C.

Las separaciones de proteínas de acuerdo a su tamaño se llevaron a cabo mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Se utilizó una cuba de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad), y el montaje del gel se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles separadores de poliacrilamida se hicieron a una concentración del 12%, en tanto los geles concentradores se realizaron al 5%. Las corridas se efectuaron en buffer de corrida de proteínas (ver sección 4.1.1.), a 100 V mientras que la muestra estaba en el gel concentrador, y a 140 V en el gel separador. En todos los casos, en uno de los carriles fue sembrado el marcador de peso molecular "PageRuler Unstained Protein Ladder" (Fermentas).

En los casos en que los geles no se iban a transferir posteriormente, se los tiñó o.n. en solución de azul de Coomasie. A continuación se incubó con solución de desteñido por aproximadamente 2 horas, o hasta poder observarse claramente las bandas de interés.

#### 4.4.5. Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa PROTRAN (Schleicher & Schuell), por el método de transferencia líquida. Se utilizó un equipo de transferencia "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell II" (BioRad), con buffer CAPS 1/2 durante 1 hora a 95 V (0,5-0,6 A) y siguiendo las instrucciones del manual de operación del equipo.

Para evaluar la eficiencia de las transferencias, inmediatamente finalizadas las mismas se desmontó el equipo y se realizó una tinción de las membranas con solución de rojo Ponceau [0,5% rojo Ponceau-S (Sigma), 1% ácido acético] durante 5 min. Luego, se recuperó la solución de tinción, se lavó con H<sub>2</sub>O ultrapura hasta visualizarse las bandas de proteína, y se fotografió la membrana teñida.

Inmediatamente después de la tinción, y sin permitir que las membranas se secaran, se bloquearon en TBST 1X conteniendo leche descremada en polvo al 10% a 4 °C, entre 2 horas y o.n. Luego, se las retiró de la heladera y se incubó a temperatura ambiente con agitación por 1 hora. Se lavó 2 veces con TBST 1X durante 5 min cada vez, se agregó el anticuerpo primario diluído en TBST 1X a una dilución 1/1000 y se incubó 2 horas a temperatura ambiente, con agitación constante. A continuación se efectuaron 2 lavados con TBST 1X de 15 min. cada uno y se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce) diluído 1/30.000 en TBST 1X-leche, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados de 15 min. cada uno con TBST 1X y se procedió a la detección de los anticuerpos unidos por quimioluminiscencia, empleando el kit "Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit" (Pierce) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se expusieron con placas de autorradiografía por tiempos variables (5 seg. a 5 min.), las que fueron posteriormente reveladas por los métodos habituales.

#### 5. RESULTADOS

#### 5.1. ANÁLISIS DE BANDAS DIFERENCIALES OBTENIDAS EN EL DD

#### 5.1.1. Selección y análisis inicial de bandas

En experimentos de DD realizados previamente en el laboratorio se habían obtenido 40 bandas de expresión diferencial de distintos estadíos de la espermatogénesis de la rata (Ver Introducción). De ellas, 11 habían sido detectadas como diferenciales de la profase meiótica (Geisinger, 2003). Dichas bandas habían sido reamplificadas, clonadas en el vector pGEM-T (Promega), empleadas para transformar células *E. coli* XL1-Blue, y conservadas en glicerol a -80 °C. Sin embargo, el patrón diferencial de expresión no había sido confirmado para ninguna de ellas (se habían clonado sin confirmar). La confirmación del patrón diferencial de expresión es esencial, dado el elevado número de falsos positivos que suele arrojar la técnica (Liang *et al.*, 1993).

En el marco de esta tesis de maestría, las células transformadas correspondientes a todos los clones de cada una de las 11 bandas se descongelaron, se estriaron sobre placas de LB/amp, y se dejaron crecer o.n a 37 °C. Para cada uno de los clones, se iniciaron cultivos líquidos en LB/amp con los que se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico. Las mismas fueron sometidas a digestión con enzimas de restricción cuyos sitios de corte estuvieran localizados a los lados del sitio de clonado múltiple del vector, de modo de liberar los insertos. Los productos de digestión se migraron en geles de agarosa para verificar la presencia de insertos y estimar el tamaño de los mismos.

En la Tabla 5.1 se muestran algunas características de las 11 bandas analizadas: los iniciadores entre los cuales se había amplificado cada una, la combinación de enzimas de restricción utilizada para escindir los insertos en cada caso, y los resultados obtenidos a partir de dicho análisis de restricción. Como se desprende de dicha tabla, la digestión con las enzimas de restricción nos permitió realizar un primer análisis de los clones correspondientes a 6 de las 11 bandas. Por una parte, se observó que ninguno de los clones resultantes del clonado de las bandas VI, VII y IX poseía insertos tal vez porque los clones en cuestión pudieran haberlos perdido, o porque las colonias blancas seleccionadas en los experimentos de complementación en  $\alpha$  en realidad no contuvieran insertos y fueran blancas, por ejemplo, a consecuencia de deleciones en la región codificante para la  $\beta$ galactosidasa. La comparación del tamaño de los vectores digeridos con el del vector lineal sin inserto mediante su migración en un gel de agarosa mostró que realmente dichos clones no poseían inserto (datos no mostrados). Como consecuencia de esto, los clones de las mencionadas bandas se descartaron. En el caso de la banda V, de 11 clones analizados uno solo liberó un inserto del tamaño esperado [Figura 5.1]. Los otros 10 clones no liberaron insertos y migraron a la misma altura que el vector lineal (datos no mostrados).



**Figura 5.1.** Análisis inicial de la **banda V.** Se muestra la fotografía del gel de agarosa que se migró para chequear la doble digestión con las enzimas *Sst*I y *Nco*I, realizada con el fin de liberar el inserto del clon 5 (5/d). La misma se comparó con el plásmido del clon 5 sin digerir (5s/d), el vector pGEM-T vacío digerido con *Pst*I (pG/P), y el vector pGEM-T vacío sin digerir (pGs/d). Los resultados fueron confirmados por medio de secuenciación. La punta de flecha señala la posición del inserto.

En otros dos casos (bandas VIII y X), los insertos pudieron ser clasificados de acuerdo a los patrones de restricción observados: para la banda X, de 35 clones analizados, todos excepto uno mostraron igual patrón de restricción, con un sitio interno de corte en el inserto, al efectuarse la digestión con las enzimas *Apa*I y *Pst*I [Tabla 5.1, Figura 5.2. A y B]. La existencia de estos dos grupos de clones con diferente inserto se confirmó mediante digestión con otra combinación de enzimas de restricción [Figura 5.2.C]. Con respecto a la banda VIII, los cuatro clones analizados presentaron un sitio interno de corte para una de las enzimas de restricción empleadas, y fueron considerados todos iguales pues liberaron los mismos 2 fragmentos [Figura 5.2.D].



Figura 5.2. Análisis inicial de las bandas VIII y X. A y B. Se muestran las fotografías de los geles de agarosa que se migraron para chequear las dobles digestiones con *Apa*I y *Pst*I, realizadas con el fin de liberar insertos de los clones de la banda X. Se puede observar que 25 de 35 clones liberan dos fragmentos, en tanto sólo el clon 29 libera un único fragmento de unos 200 pb. Los clones 12, 17, 22, 23 y 25 no liberan inserto, en tanto los clones 8, 15, 16 y 35 muestran un patrón de restricción no esperado, por lo cual no se tuvieron en cuenta. Se indican los números de los clones y los marcadores de pares de bases empleados ( $M_{\lambda/H} = \lambda/HindIII$ ;  $M_{123} = 123$  pb DNA Ladder). Las puntas de flecha negras indican las dos bandas de inserto, en tanto la punta de flecha blanca señala la única banda liberada por el clon 29. C. Gel de agarosa que se migró para chequear la doble digestión de los clones 3, 10 y 29 de la banda X con las enzimas SstI y SstII. Se puede observar que se mantienen los 2 tipos de patrones de restricción detectados: el clon 29 libera el mismo único fragmento, en tanto los clones 3 y 10 liberan un solo fragmento cuyo tamaño corresponde a la suma de los dos liberados al cortar con ApaI y PstI, indicando que el inserto posee un sitio de restricción interno para una de estas dos enzimas. De este modo, se pueden separar los clones en dos grupos. D. Gel de agarosa que se migró para chequear las dobles digestiones con ApaI y PstI, realizadas con el fin de liberar insertos de los clones de la banda VIII. Las mismas se compararon con el vector pGEM-T vacío digerido con PstI (pG/P). Los 4 clones analizados presentan el mismo patrón de restricción, liberando 2 fragmentos. Esto indica que el inserto tiene un sitio de restricción para una de las dos enzimas, y nos permite considerar a los 4 clones iguales. V: carril vacío.

abla 5.1. Análisis inicial de clones de	e 11 bandas del DD	diferenciales de la	profase meiótica
---	--------------------	---------------------	------------------

Número	Iniciador	Iniciador	Cantidad	Enzimas	Resultado del
de banda	derecho	izquierdo	de clones	empleadas para	análisis de
	(T <sub>12</sub> MN)*	(AP)*	analizados**	liberar insertos	restricción
Ι	T <sub>12</sub> MC	AP1	5	ApaI y PstI	Todos los clones
					liberaron un inserto
					de similar tamaño
II	T <sub>12</sub> MC	AP2	8	ApaI y PstI	Todos los clones
					liberaron un inserto
					de similar tamaño
III	T <sub>12</sub> MG	AP3	15	ApaI y PstI	Todos los clones
					liberaron un inserto
					de similar tamaño
IV	T <sub>12</sub> MA	AP9	6	ApaI y PstI	Todos los clones
					liberaron un inserto
					de similar tamaño
V	T <sub>12</sub> MA	AP9	11	SstI y NcoI	Un solo clon liberó
					inserto
VI	T <sub>12</sub> MA	AP9	9	ApaI y PstI	No se liberaron
					insertos
VII	T <sub>12</sub> MA	AP9	10	ApaI y PstI	No se liberaron
					insertos
VII	T <sub>12</sub> MA	AP9	4	ApaI y PstI	Todos los clones
					mostraron un patrón
					de restricción de 2
					bandas, evidenciando
					un sitio de digestión
					interno para una de
					las dos enzimas
		<u> </u>	<b>_</b>		empleadas
IX	T <sub>12</sub> MA	AP9	8	ApaI y PstI	No se liberaron
					insertos
X	T <sub>12</sub> MA	AP9	35	ApaI y PstI;	Todos los clones
				SstI y SstII	excepto uno
					mostraron un patron
					bandas, evidenciarido
					UN SITIO de digestion
					Interno para una ue
					omploadas
VT			12	Apply Detl	No co liboraron
71	1 <sub>12</sub> MA	AP9	12	Apal y PSU	insertos
					Insertos

\*Corresponde a los iniciadores (nomenclatura de GenHunter) utilizados en el experimento de DD en el cual se obtuvo la banda en cuestión.

**\*\***Corresponde a la totalidad de clones disponibles para dicha banda.

Con respecto a los clones obtenidos del clonado de las restantes 5 bandas, en cada uno de los casos las digestiones con enzimas de restricción liberaron un inserto único de igual tamaño para todos los clones [Figura 5.3 y Tabla 5.1], por lo cual el análisis de restricción no permitió clasificar dichos insertos en subpoblaciones.

# 5.1.2. Diferenciación de clones de igual tamaño y distinta secuencia: análisis de patrones de restricción y electroforesis en geles de agarosa con bisbenzimida-PEG

Uno de los principales inconvenientes del DD es la frecuente contaminación de las bandas de ADNc de interés con secuencias heterogéneas que comigran con ellas en los geles de poliacrilamida, pero que pueden no ser diferenciales. En efecto, se ha visto que cada banda obtenida del gel de poliacrilamida corresponde, en general, a por lo menos tres secuencias diferentes, aunque de tamaño similar. Por este motivo las bandas de ADNc deben ser analizadas luego del clonado, de modo de seleccionar aquellos clones que efectivamente correspondan a los genes que son expresados diferencialmente (Geisinger, 2003, y citas allí incluidas).

Para el análisis y la diferenciación de los clones correspondientes a las restantes 5 bandas, se empleó una variante de una técnica desarrollada para la detección de variaciones de secuencia en bacterias (Wawer *et al.*, 1995), que fuera previamente adaptada y puesta a punto por nuestro grupo de trabajo (Geisinger *et al.*, 1997). Esta es una técnica simple de electroforesis que consiste en el uso de geles de agarosa conteniendo bisbenzimida (principio del colorante Hoechst, empleado en microscopía de fluorescencia) unida covalentemente a una molécula de gran tamaño, como el polietilenglicol (PEG) 6000 (Ver "Materiales y Métodos").

Los productos de digestión de los clones resultantes del clonado de las bandas I, II, III, IV y VI fueron sometidos a electroforesis tanto en geles de agarosa convencionales como en geles de agarosa conteniendo bisbenzimida-PEG (ver secciones 4.3.3. y 4.3.7.). Esto permitió finalmente separar los clones obtenidos en subpoblaciones de acuerdo a su contenido en A+T con altísima sensibilidad. Para las cinco bandas mencionadas, se pudieron detectar 4, 4, 1, 1 y 2 subpoblaciones, respectivamente [Figura 5.3A-D y Tabla 7.2], y un clon representativo de cada subpoblación se eligió para su secuenciación.



**Figura 5.3.** Análisis inicial de las bandas I, II, III, IV y VI. Se muestran en cada caso, a la izquierda (en **D** también al centro) las fotografías de los geles de agarosa normales que se migraron para chequear las dobles digestiones con *ApaI* y *PstI*, realizadas con el fin de liberar insertos, y a la derecha las fotografías de los geles conteniendo bisbenzimida-PEG migrados para evidenciar clones de una misma banda que tuvieran insertos de similar tamaño pero distinta secuencia. Se indican los números de los clones y los marcadores de pares de bases empleados ( $M_{\lambda/H} = \lambda/HindIII$ ;  $M_{123} = 123$  pb DNA Ladder). Las puntas de flecha blancas indican la posición de los insertos en los geles de agarosa normales. **A.** Los 5 clones de la banda I analizados poseían inserto y pudieron ser diferenciados en 4 grupos. V: carril vacío. **B.** De los 9 clones de la banda VI analizados, sólo 2 liberaron inserto. Su análisis en geles con bisbenzimida demostró que eran diferentes. **C.** Los 8 clones de la banda II analizados, sólo 2 liberaron inserto y eran iguales entre sí. **E.** De los 15 clones de la banda III analizados, 8 liberaron inserto y eran iguales. Los resultados observados pudieron ser confirmados para todos los casos, mediante la secuenciación de un clon representante de cada grupo. Las líneas de colores indican los grupos de clones diferenciados con esta metodología, para cada banda.

Número de	Grupos de clones en geles con	Clones	Tamaño de
banda	bisbenzimida-PEG	secuenciados	insertos (pb)*
Ι	<b>4:</b> I <sub>1</sub> ; I <sub>2</sub> ; I <sub>3</sub> y I <sub>4</sub> ; I <sub>5</sub>	I2; I4; I5	274; 277; 277
II	<b>4:</b> II <sub>1</sub> y II <sub>2</sub> ; II <sub>3</sub> , II <sub>4</sub> y II <sub>5</sub> ; II <sub>6</sub> ; II <sub>7</sub> y II <sub>8</sub>	II <sub>2</sub> ; II <sub>4</sub> ; II <sub>6</sub> ; II <sub>8</sub>	327; 327; 327; 325
III	<b>1:</b> $III_1$ , $III_3$ , $III_5$ , $III_{10}$ , $III_{12}$ , $III_{13}$ , $III_{14}$ y $III_{15}$	III <sub>15</sub>	426
IV	<b>1:</b> IV <sub>4</sub> y IV <sub>5</sub>	IV <sub>5</sub>	488
VI	<b>2:</b> VI <sub>2</sub> ; VI <sub>6</sub>	VI <sub>2</sub> ; VI <sub>6</sub>	447; 443

Tabla 5.2. Análisis de los clones de 5 bandas del DD mediante geles de agarosa conteniendo bisbenzimida-PEG

\*El tamaño de insertos fue determinado posteriormente por secuenciación.

En todos los casos el subíndice corresponde al número de clon.

# 5.1.3. Análisis de secuencias, selección de bandas de interés y confirmación del patrón de expresión diferencial

En conjunto, la diferenciación de clones mediante la observación de distintos patrones frente a digestión con enzimas de restricción o variaciones en la migración en geles de agarosa conteniendo bisbenzimida-PEG, métodos relativamente sencillos y económicos, nos permitió reducir la cantidad de reacciones de secuenciación de más de 100 a sólo 17, al evitar la secuenciación de clones que contuvieran insertos con igual secuencia. Las reacciones de secuenciación se realizaron como se describe en la sección 4.3.8, y permitieron la confirmación de la totalidad de los resultados obtenidos a partir de la electroforesis en geles conteniendo bisbenzimida/PEG. En algunos casos además (bandas I y VI), probablemente diferencias muy pequeñas en el tamaño de los insertos (3 pb en un caso, y 4 pb en otro), las cuales no son posibles de detectar en geles de agarosa convencionales, hayan contribuido a la discriminación en los geles con bisbenzimida/PEG.

Las secuencias obtenidas de los 17 clones se analizaron en los bancos de datos, y a partir del análisis bioinformático se seleccionaron 7 clones para continuar su estudio, de acuerdo al potencial interés de las secuencias, ya sea porque pareciera tratarse de genes con probable rol en la meiosis, o de secuencias aún no descritas.

Para las 7 secuencias seleccionadas se diseñaron iniciadores específicos (ver sección 4.3.10.1.), los que se usaron en reacciones por duplicado de RT-PCR con bajo número de ciclos (semi-cuantitativas). Debido a la cinética de acumulación del producto específico de la reacción de PCR, una vez que se han fijado las

temperaturas y los tiempos del ciclo, la fase exponencial, que se refiere al período temprano de ciclos en que los productos se acumulan de forma exponencial, puede usarse para análisis cuantitativos (Cha & Thilly, 1995). Siempre y cuando la amplificación se haya llevado a cabo en la fase exponencial, la intensidad de las bandas obtenidas al correr los productos de igual tamaño de reacciones de PCR simultáneas en un gel de agarosa con BrEt puede usarse como una medida comparativa aproximada de la cantidad de producto presente.

De este modo, se establecieron las condiciones de trabajo para cada juego de iniciadores y se llevó a cabo la confirmación del patrón de expresión diferencial de profase meiótica mediante RT-PCR con bajo número de ciclos. El material de partida fue ARNm de los dos tipos celulares de testículo originalmente comparados en el DD (espermatocitos paquiténicos, es decir, células en profase meiótica, y espermátidas redondas, o sea, células en proceso de espermiogénesis). Asimismo, se estudió por RT-PCR con bajo número de ciclos el patrón de expresión de estas secuencias, comparando la expresión en el ARN total de testículo adulto y neonato, con otros nueve tejidos. Todos los experimentos se hicieron por duplicado (tanto la reacción de RT como el PCR). A su vez, se emplearon iniciadores para amplificar parte del ARNm de la  $\beta$ -actina como control positivo, que pusiera en evidencia que todas las muestras estaban en condiciones de ser amplificadas [Figura 5.4]. Las condiciones en que se realizó esta comparación fueron las descritas en la sección 4.3.10.3. de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de secuencia y los estudios de RT-PCR semicuantitativos para estos 7 clones se describen a continuación.

#### Banda I, clon 2

La secuencia del inserto de este clon se había amplificado originalmente entre un iniciador AP1 (decámero de secuencia arbitraria) y un T<sub>12</sub>MC. El estudio de la secuencia muestra que la misma tiene 274 pb, tamaño acorde a lo previamente observado en el DD, y que contiene ambos iniciadores de PCR, uno en cada extremo (Ver anexo A). El análisis bioinformático indica que corresponde al transcripto de una secuencia del cromosoma 14 de la rata. Se trataría del extremo 3´del ARNm codificante para un nuevo miembro de la familia de proteínas de transmembrana "Leucine-rich repeat containing 8-family", no anotado aún, o de
una nueva variante de procesamiento, más larga, de una secuencia de ARNm predicha en el Genbank para un miembro de esta familia.

Los repetidos ricos en leucinas son motivos de 20 a 30 aminoácidos con un patrón repetitivo de leucinas característico, que los hace muy apropiados para las interacciones proteína-proteína. Los métodos automáticos de anotación han detectado miles de proteínas con este motivo, y los estudios de estructura tridimensional permiten prever una enorme variabilidad estructural, lo que se traduciría en una versatilidad funcional muy grande para esta superfamilia (Bella *et al.*, 2008).

La secuencia por nosotros identificada mostró mayor nivel de expresión en los espermatocitos que en las espermátidas, confirmando el patrón diferencial obtenido previamente en los estudios de DD, que la indicaban como una banda de expresión diferencial de espermatocitos (Geisinger, 2003). Se detectaron niveles de expresión intermedios en el testículo adulto (probablemente explicables por la presencia de espermatocitos, aunque diluídos entre otros tipos celulares), y un bajo nivel de expresión en el epidídimo. No se detectó expresión en ningún otro tejido estudiado, incluyendo el ovario [Figura 5.4A]. Nuestros resultados sugieren que podría tratarse de un gen nuevo de la mencionada familia o una variante nueva de procesamiento de un gen ya predicho, que se expresaría principalmente en el testículo adulto de la rata, y diferencialmente durante la meiosis.

### Banda I, clon 5

La secuencia del inserto de este otro clon de la banda I es diferente de la del clon 2, confirmando las diferencias detectadas mediante electroforesis en geles conteniendo bisbenzimida/PEG. La lectura de la secuencia también mostró en este caso la presencia de los iniciadores AP1 y T<sub>12</sub>MC, uno a cada lado. El inserto tiene 277 pb (Ver anexo A), es decir, 3 pb más que el inserto del clon 2; esta diferencia, si bien es indetectable en los geles de agarosa común, seguramente contribuyó (además del contenido en A+T), a la migración diferencial en los geles con bisbenzimida-PEG. El análisis bioinformático indica que la secuencia corresponde a un transcripto originado a partir del cromosoma 17 de la rata, que codificaría para una proteína hipotética homóloga de la proteína humana "PAK/PLC interacting protein" (hPIP1).

Las proteín-kinasas activadas por p21 (PAKs/PLC) constituyen una familia de serín-treonín kinasas implicadas en la transducción de señales, regulación de cascadas mitogénicas de MAP kinasas, expresión génica, arquitectura del citoesqueleto y apoptosis. En las levaduras, un homólogo de PAK se encuentra involucrado en la transmisión de señales de la feromona de apareamiento durante el ciclo de reproducción "sexual" de la levadura, a una cascada regulada por MAP kinasas (Leberer *et al.*, 2000). La aparente multiplicidad de vías mediadas por PAKs sugiere que su actividad debe estar estrictamente regulada. Si bien la regulación positiva de PAKs ha sido más estudiada, sólo se ha identificado hasta ahora un probable regulador negativo, en la especie humana, el que se ha denominado "PAK interacting protein" (hPIP1), y cuya función exacta no se conoce (Xia *et al.*, 2001).

Nosotros habríamos identificado el homólogo de hPIP1 en la rata. Nuestros resultados sugieren que "PAK/PLC interacting protein" sería el producto de un gen expresado principalmente en espermatocitos y en testículo adulto (sugiriendo posible expresión también en espermatogonias y/o células de Sertoli). No se detectó expresión en espermátidas (confirmándose nuevamente el patrón observado en el DD), escasos niveles de expresión en testículo de neonatos y epidídimo, y muy bajos niveles en algunos otros tejidos [Figura 5.4B]. A su vez, resultados preliminares obtenidos por nosotros sugieren la posibilidad de que existan dos transcriptos diferentes de esta proteína en el testículo de la rata, siendo uno homólogo al identificado en células humanas, y el otro algo más corto (datos no mostrados).

#### Banda II, clon 1

Este clon presenta un inserto de 327 pb y contiene los iniciadores  $T_{12}MC$  y AP2 en los extremos (Ver anexo A). Corresponde al transcripto de una secuencia situada en el cromosoma 3 de la rata. La secuencia genómica correspondiente al fragmento amplificado se encuentra interrumpida por intrones que no están en el inserto, lo cual demuestra que hemos clonado parte del transcripto procesado. Su análisis bioinformático indica que se trata de parte del ADNc del gen que codifica para la proteína hipotética de rata "Mitochondrial carrier homolog 2 (Mtch2)", miembro de una familia de proteínas integrales de la membrana mitocondrial, con dominios de transmembrana (Zaltsman, 2010). El análisis de la secuencia nos muestra además que el fragmento amplificado contiene parte de la secuencia

Las evidencias disponibles sugieren que Mtch2 desempeñaría un importante papel en el programa apoptótico mitocondrial, quizás en la transferencia de metabolitos/señales a través de la membrana mitocondrial externa (Gross, 2005; Zaltsman, 2010). Si bien el ADNc se aisló por primera vez a partir de células madre de la línea hematopoyética, y la proteína se identificó en mitocondrias de hígado de ratón (Grinberg et al., 2005), nuestros estudios indican que Mtch2 es un gen expresado diferencialmente en el testículo, y especialmente durante la meiosis masculina [Figura 5.4C]. Se detectaron niveles menores de expresión en células posmeióticas (nuevamente se confirman aquí los resultados preliminares del estudio de DD) y en testículo adulto (seguramente dados, al menos en parte, por la presencia de ambos tipos celulares), pero no en ningún otro tejido (incluídos ovario e hígado), ni en testículo de neonato. Esto sugiere a las claras que, si bien seguramente el gen se exprese en otros tejidos (como hemos dicho, se identificó por primera vez a partir de hepatocitos), los niveles de expresión serían abrumadoramente más elevados en el testículo, y particularmente en los meiocitos. Por otra parte, el hecho de que sólo se hayan requerido 18 ciclos de amplificación para la visualización del transcripto reverso en las células de testículo (ver Materiales y Métodos, tabla 4.4) es un indicador de que este gen estaría altamente expresado en dicho tejido.

#### Banda II, clon 4

Al igual que el clon anterior, este clon de la banda II posee un inserto que fue amplificado entre los iniciadores  $T_{12}MC$  y AP2, y un tamaño de 327 pb (ver anexo A). Su secuencia genómica correspondiente se localiza en el cromosoma 17 de la rata, y se trataría del ADNc del transcripto codificante para una isoforma no descrita de la proteína hipotética de rata "Tripartite motif protein 27 (TRIM27/RFP)".

Las proteínas de la familia TRIM poseen un motivo tripartito de unión a zinc, y están involucradas en funciones variadas como ubiquitinación, apoptosis, regulación del ciclo celular, senescencia, respuesta viral, diferenciación, vías metabólicas, meiosis y transporte vesicular (Meroni y Diez-Roux, 2005). En particular, en otras especies TRIM27 ha sido involucrada en el silenciamiento epigenético, cooperando con las proteínas del grupo Polycomb (Shimono *et al.*, 2000). TRIM27 también surgió en un estudio de microarreglos como uno de los genes cuya expresión se ve aumentada en respuesta a una disminución de hierro

en el duodeno (Collins *et al.*, 2005). En un estudio de expresión génica realizado previamente comparando varios tejidos, se vio que *TRIM27* se expresaba en el testículo a niveles muy superiores a los demás tejidos. Dentro del testículo, se hallaron dos isoformas de ARN, las que se expresaron diferencialmente en las espermátidas redondas y en elongación (Takahashi *et al.*, 1988).

La secuencia por nosotros identificada, portadora de cola de poliA, además de ser diferente de las dos identificadas previamente, se expresa mayormente en los espermatocitos, confirmando también para esta banda los resultados preliminares de los estudios de DD. Se detectaron niveles de expresión intermedios en el testículo adulto (explicables al menos parcialmente por la presencia de espermatocitos), y muy bajos niveles en epidídimo [Figura 5.4D]. Estos resultados sugieren que nos encontraríamos en presencia de una nueva isoforma de TRIM27, "específica" del testículo y diferencial de las células meióticas. Por otra parte, la coincidencia con los resultados obtenidos previamente para TRIM27 validan los resultados de expresión diferencial realizados por nosotros.



Figura 5.4. Análisis de los patrones de expresión de secuencias obtenidas en el DD. Se muestran los geles de agarosa en que se migraron productos los de amplificación por RT-PCR semicuantitativa de un fragmento de cada una de las siete secuencias seleccionadas. Se comparan los niveles de expresión en trece tipos celulares y/o tejidos, por duplicado: espermatocitos paquiténcos (EP), espermátidas redondas (ER), testículo total de adulto (TA), testículo total de neonato (TN), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (CE), hígado (H), riñón (R), bazo (B), pulmón (P), corazón (CO) e intestino delgado (ID). Marcador de pares de bases (M): escalera de 100 pb GeneRuler 100pb DNA Ladder, Fermentas. Las puntas de flecha blancas indican la posición de las bandas esperadas en todos casos. A-G. Patrones de de amplificación las secuencias del clon 2 de la banda I, el clon 5 de la banda I, el clon 1 de la banda II, el clon 4 de la banda II, el clon 15 de la banda III, el clon 3 de la banda VIII y el clon 3 de la banda X, respectivamente. H. Amplificación de un fragmento del ARNm de la β-actina. La temperatura de unión de los iniciadores y número de ciclos de PCR empleados en cada caso, se detallan en Materiales y Métodos. El número de ciclos fue menor o igual a 30 en todos los casos, excepto para el control de β-actina.

#### Banda III, clon 15

La secuencia del inserto de este clon se amplificó entre los iniciadores  $T_{12}MG$  y AP3 (resultado esperado, dado que eran los iniciadores utilizados originalmente en el experimento de DD correspondiente), y tiene 426 pb, tamaño acorde a lo observado en el DD (Ver anexo A). El análisis bioinformático indica que la misma corresponde a un transcripto del cromosoma 11 de la rata. Se trataría del transcripto del gen que codifica para el homólogo de rata de la proteína predicha "Coiled coil domain-containing 14" de ratón (CCDC14).

Los motivos "coiled-coil", como el presente en la proteína hipotética CCDC14, son muy versátiles, haciendo que las proteínas que los portan puedan adaptarse a funciones biológicas muy variadas. A modo de ejemplo, se encuentran dominios "coiled-coil" en proteínas del citoesqueleto, proteínas motoras, proteínas que forman parte de canales iónicos, y en aquellas que interactúan con otras proteínas en sistemas de reconocimiento molecular (Buckhard *et al.*, 2001). A su vez, proteínas esqueléticas específicas de la línea germinal masculina como los componentes de los CS y las proteínas de la lámina nuclear (de las cuales existen variantes específicas de testículo), presentan todas dominios de tipo "coiled-coil" (Alsheimer *et al.*, 1999; 2000; Costa *et al.*, 2005; Öllinger *et al.*, 2005; Prüfert *et al.*, 2005; Schütz *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Bolcun-Filas *et al.*, 2009; Winkel *et al.*, 2009).

Nuestros resultados indican que se trataría de un gen expresado diferencialmente durante la meiosis masculina de la rata. Se detectó un nivel considerablemente mayor de expresión en espermatocitos que en espermátidas (nuevamente, confirmando los resultados preliminares del DD), y un nivel de expresión intermedio en el testículo adulto (explicable al menos en parte por la presencia de espermatocitos). Por otro lado, no se detectó expresión en ninguno de los otros tejidos analizados, incluyendo ovario, ni en el testículo de individuos neonatos [Figura 5.4E].

#### Banda VIII, clon 3

Este clon presenta un inserto cuya secuencia posee 411 pb, tamaño acorde a lo esperado según la banda del DD. Sin embargo, el estudio de la secuencia muestra que la banda fue amplificada entre dos iniciadores AP9, no conteniendo el  $T_{12}$ MA que se había incluido como iniciador derecho en el experimento de DD (Ver anexo A); esto suele ocurrir en los experimentos de DD con cierta frecuenciaLa secuencia corresponde al cromosoma 5 de la rata, y la información disponible en los bancos de datos sugiere que se encuentra dentro de un intrón de un gen para el cual se han identificado cuatro variantes de procesamiento de ARNm diferentes, conteniendo distintos intrones. Dado que se trataba de un gen que nos resultó interesante (ver a continuación), decidimos seleccionarlo, a pesar de que el fragmento clonado no contuviera cola de poliA.

Según la información de las bases de datos Genbank/EMBL, el producto de este gen codificaría para la proteína Pik3r3 ("Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3"), que, según la información disponible de ESTs, se expresaría en cerebro y testículo. En el cerebro de la rata, se ha identificado un ARNm de 1368 bases para este gen, pero dicho ARNm no contiene la secuencia intrónica identificada por nosotros, es decir, que nuestra secuencia podría ser parte de la secuencia codificante para una variante testicular de la proteína Pik3r3.

Se ha postulado que la existencia de distintas isoformas de esta proteína podría estar vinculada a un rol regulatorio diferente para la fosfatidilinositol 3-kinasa en esos tejidos, tal vez determinando niveles diferentes de activación de esta importante kinasa en respuesta a diferentes receptores de factores de crecimiento y productos oncogénicos (Inukai *et al.*, 1996).

Se identificó una banda producto de este transcripto a partir de las células meióticas, y en menor medida a partir de células posmeióticas (lo cual confirma los resultados previos del DD), no observándose producto de amplificación en ningún otro tejido [Figura 5.4F]. Nuestros resultados sugieren que podríamos hallarnos en presencia de un nuevo transcripto, codificante para una isoforma de la unidad regulatoria de la Pik3 no descrita hasta ahora, específica de la línea germinal masculina y especialmente de las células meióticas, generada por procesamiento alternativo. Esta nueva isoforma podría estar determinando un rol regulatorio especial de la fosfatidilinositol 3-kinasa durante la meiosis masculina.

#### Banda X, clon 3

Al igual que el anterior, este clon de posee un inserto que fue amplificado entre dos iniciadores AP9. El tamaño del inserto es de 436 pb (Ver anexo A). Su

secuencia corresponde al cromosoma 4 de la rata, y de acuerdo a la búsqueda de similitudes en las bases de datos Genbank/EMBL, no se ha identificado ninguna proteína hipotética en la región genómica correspondiente a la misma.

No obstante, la secuencia identificada por nosotros se encuentra estrechamente relacionada con la secuencia del gen de la "TAR-binding protein" (TARDBP), que es codificada en el cromosoma 5 de la rata. TARDBP es una proteína a la que se ha atribuído una función dual, en la represión transcripcional y como activador en el procesamiento de ARNs ("exon skipping") (Wang et al., 2004). Se trata de una proteína que se une a ARN, a través de motivos de reconocimiento de ARN (RRM); posee también un dominio rico en glicina, implicado en la actividad de "exon skipping". Identificada en primer lugar como una proteína de unión al ARN TAR del virus VIH (Fuji et al., 2001), fue aislada posteriormente como una proteína vinculada a la regulación del procesamiento alternativo del gen de la fibrosis quística CFTR (Wang et al., 2004). Se han hallado al menos 11 variantes de procesamiento del gen TARDBP en células de mamífero, y se supone que éstas podrían estar involucradas en diferentes funciones celulares. Se ha encontrado que existe un número de secuencias relacionadas con TARDBP ubicadas en distintos cromosomas, pero ninguna de ellas es transcripta, por lo cual se ha propuesto que corresponderían a pseudogenes procesados (Wang et al., 2004).

Si bien como hemos señalado, la secuencia identificada por nosotros es codificada por el cromosoma 4, a diferencia de las correspondientes a isoformas halladas anteriormente, es transcripta. Sin embargo, dado que no existe información de ARNm completo para esta secuencia, no podemos afirmar que la misma contenga un marco abierto de lectura (ORF). Por otro lado, es habitual que no exista información reportada en los bancos de datos para transcriptos que son expresados exclusivamente durante una etapa de la espermatogénesis (al ser expresados por un número relativamente pequeño de células, escapan a la detección con las metodologías que determinan patrones generales de expresión de tejidos). Además, es una característica frecuente de la línea germinal la expresión de isoformas proteicas, a partir de variantes génicas localizadas incluso en cromosomas diferentes que las variantes expresadas en las células somáticas (Kleene, 2001).

Hemos detectado la presencia del ARN en la población de espermatocitos paquiténicos, y menor nivel en espermátidas (nuevamente, confirmando el resultado preliminar del DD) y testículo total, no apreciándose amplificación en los ensayos semicuantitativos de RT-PCR en ningún otro tejido, incluídos testículo de neonato y ovario [Figura 5.4G].

En suma, nuestros resultados sugieren que podría tratarse de un gen nuevo de la familia de *TARDBP*, codificante para una proteína testículo-específica, cuyo ARNm estaría expresado principalmente en la meiosis. En ese sentido, destacamos la existencia de un elevadísimo número de proteínas de unión a ARN, con motivos RRM, específicas de la línea germinal masculina (*e.g.* Kleene, 2001), que desempeñarían las funciones relacionadas con los elevados niveles y variados sistemas de regulación postranscripcional existentes en estas células. De todos modos, no podemos descartar la posibilidad de que esta variante, seguramente originada a partir de una translocación y posterior divergencia del gen *TARDBP*, no sea traducida en una proteína funcional.

### 5.2. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE "COILED COIL DOMAIN CONTAINING 14"

El objetivo siguiente (Ver "Objetivos") era la selección de una de las secuencias de expresión diferencial durante la meiosis identificadas, para continuar con su estudio. Para ello buscamos una secuencia que nos pareciera novedosa e interesante, pero adoptamos además como criterio la elección de una secuencia que se hubiera amplificado entre un decámero de secuencia arbitraria y un  $T_{12}MN$ , descartando, en principio, las dos secuencias que se habían amplificado entre decámeros. En estas últimas, al no encontrarse en la porción secuenciada cola de poliA, no podemos descartar la posibilidad de que las mismas pudieran no corresponder a ARNs mensajeros procesados. Aunque la posibilidad de que dichas secuencias se hubieran amplificado a partir de trazas de ADN genómico remanente en la muestra de ARN de la que se partió es escasa, dado que los controles de amplificación en ausencia de RT del DD no habían dado banda (Geisinger, 2003), así como tampoco los controles sin RT para el ARN de cada tejido y juego de iniciadores de la figura 5.4 (no mostrados), no podemos eliminarla por completo, así como tampoco la posibilidad de que alguno de dichos productos pudiera corresponder a un intrón de un transcripto inmaduro. En consecuencia, si bien ambas secuencias resultan potencialmente interesantes para estudios futuros, se prefirió no elegirlas en esta instancia.

En base a los resultados de los primeros análisis y al interés que despertaron en nosotros las secuencias obtenidas, se seleccionó la secuencia de la banda III clon 15, correspondiente al gen *CCDC14*, para proseguir su estudio y profundizar en su caracterización.

## 5.2.1. Rastreo de genoteca de espermatocitos paquiténicos y obtención de la secuencia completa de *CCDC14*

Con el objeto de "avanzar" hacia el extremo 5' del ARNm de *CCDC14* y completar su secuencia, se llevó a cabo el rastreo de una genoteca de espermatocitos paquiténicos de rata disponible previamente en el laboratorio. Para ello, se empleó como sonda el inserto del clon 15 de la banda III (de 426 pb), y se procedió como se indica en la sección 4.3.13. de Materiales y Métodos.

De las cuatro rondas de rastreo realizadas (un rastreo primario y tres rondas de purificación sucesivas), se obtuvieron dos clones que poseían fragmentos del extremo 3' del ARNm de *CCDC14*: clon A, de 882 pb, y clon B, de 1625 pb (Ver anexo A). Si bien estos dos clones nos permitieron confirmar la existencia de un ARNm para *CCDC14* y avanzar en el conocimiento de la secuencia del mismo, el análisis en las bases de datos nos indicó que ambos formarían parte del extenso UTR 3' del mensajero, no pudiéndose obtener información de la secuencia codificante (Ver figura 5.5).

Para poder ahondar en la caracterización del gen *CCDC14* de la rata y realizar luego estudios a nivel proteico, se hacía imprescindible conocer la secuencia nucleotídica codificante completa. Como primer paso, se ensambló *in silico* la secuencia del ARNm de *CCDC14* de ratón, para el cual había información disponible en las bases de datos de ESTs, y luego en base a esto y a la secuencia del genoma de la rata, se ensambló *in silico* una secuencia teórica para *CCDC14* en esta especie. Este trabajo nos sugirió la existencia de un ARNm maduro de rata de 4945 b constituido por 13 exones conteniendo una región codificante de 2790 b, un largo UTR 3´de 2118 b, y un UTR 5´de al menos 37 b seguramente el UTR 5' se extienda algo más corriente arriba) [Figura 5.5].



**Figura 5.5. Rastreo de genoteca de espermatocitos paquiténicos y esquema de la estructura del gen CCDC14, deducida a partir del ensamblado in silico.** El tamaño de los exones no está en proporción, aunque sí lo están el 5 y 3 'UTR. Se indican asimismo los tamaños de la sonda utilizada y de los clones obtenidos a partir del rastreo de la genoteca de ADNc, así como la ubicación de los mismos en relación a la secuencia del ARNm de *CCDC14.* 

Para confirmar la secuencia teórica ensamblada y completar la información aportada por los rastreos de genoteca, se diseñaron iniciadores específicos flanqueando intrones, que permitieran la amplificación de la totalidad de la secuencia que restaba conocer. Dichos juegos de inciadores se diseñaron de modo que amplificaran en todos los casos fragmentos solapantes, con el objeto de permitir fácilmente el ensamblado de la secuencia completa. Estos iniciadores se emplearon en reacciones de RT-PCR de modo de ver si se lograba amplificar bandas de ADNc del tamaño esperado según la secuencia teórica, y evaluar si existía más de una isoforma. Las 7 combinaciones de iniciadores empleadas [Figura 5.6A] permitieron la amplificación de los 7 fragmentos solapantes esperados como bandas únicas, las cuales visualizadas en una corrida en gel de agarosa poseían tamaños concordantes con lo estimado previamente a partir de la secuencia ensamblada en forma teórica [Figura 5.6B].

Cuatro de los 7 fragmentos amplificados, que abarcaban la secuencia codificante completa, se purificaron a partir de geles de agarosa [Figura 5.6C], y se secuenciaron. Las secuencias obtenidas poseían los tamaños esperados, de 783, 856, 810 y 1506 pb respectivamente [Ver anexo A]. El ensamblado de las mismas, junto con la secuencia de los clones obtenidos del rastreo de la genoteca, permitió determinar con certeza la secuencia codificante predicha de *CCDC14* [Figura 5.7], y confirmar la existencia de un ARNm de al menos 4945 b (como hemos mencionado, ignoramos la longitud exacta del UTR 5'). La secuencia empírica obtenida fue muy similar a la teórica predicha previamente a partirde la secuencia genómica anotada en el Genbank, observándose sólo algunas diferencias puntuales de nucleótidos, que no modificaron ni el marco de lectura ni los sitios de iniciación y terminación pre-identificados (Ver figura 5.7).



**Figura 5.6. Amplificación de la secuencia codificante de** *CCDC14***. <b>A.** Esquema del gen con sus 13 exones (E1-E13), separados por los correspondientes intrones (ángulos). Se indican los sitios de inicio (ATG) y fin de la traducción (STOP). Se muestra la posición de los 7 juegos de iniciadores empleados para confirmar la secuencia ensamblada en forma teórica, los iniciadores directos por encima de los exones y los reversos por debajo: juego 1 en rojo, juego 2 en verde, juego 3 en naranja, juegos 4a y 4b en fucsia y juegos 5a y 5b en azul. Nótese que los juegos 4 y 5 poseen un único iniciador directo y dos reversos cada uno. Al pie de cada exón se indica su tamaño (pb), en tanto el tamaño del UTR 3 se indica encima de éste. **B.** Gel de agarosa que en que se migraron los productos de amplificación de los 7 fragmentos. Los números en la parte superior corresponden a cada combinación de PCR,  $M_{100}$ : marcador de pares de bases GeneRuler 100pb Plus (Fermentas). **C.** Gel de agarosa en que se migraron los productos de amplificación de los 4 fragmentos solapantes que abarcan la secuencia codificante de *CCDC14*, luego de purificados para secuenciación. Se indica el marcador de pares de bases empleado ( $M_{\lambda/H} = \lambda/HindIII$ ).

1 CCCGACCCGAAGGAAAAACTTTAGTACCAAAAAGACT 37 38 ATG AGG CGG GGC GTT CCG CAG TCT CCT TCC CGG AAG CGG AAG CTC GGG GGG CGG GAC AAG GGA GGT CGG GAC 109 1 Met Arg Arg Gly Val Pro Gln Ser Pro Ser Arg Lys Arg Lys Leu Gly Gly Arg Asp Lys Gly Gly Arg Asp 24 110 GTC TCG GCG GTT AAT TCT TTT TTT CTC AAG TAT TCG TTT CCC TAC GTC TGG GCT CTT CTG AGG CTG AGA GAA 181 25 Val Ser Ala Val Asn Ser Phe Phe Leu Lvs Tvr Ser Phe Pro Tvr Val Trp Ala Leu Leu Arg Leu Arg Glu 48 182 ATG GTC AGG TCT GGA TCT CGA CCG GGC CAG GTG ATA CCT TCA GGA AGG CAA CCC GGA TCG AAG TTA CCA AAT 253 49 Met Val Arg Ser Gly Ser Arg Pro Gly Gln Val Ile Pro Ser Gly Arg Gln Pro Gly Ser Lys Leu Pro Asn 72 254 GGA AAG AAA GGG ACC CAC GTG AGA AAA GTA GCA CAT TTT AAC GTA GAT CCT GCC TGT CCT GCT TAT TCT GAT 325 73 Gly Lys Lys Gly Thr His Val Arg Lys Val Ala His Phe Asn Val Thr Asp Thr Val Gln Gly Leu Asp Ser 96 326 TCA GAA AGT CAG ACG GAC ACT GTT CAG GGA CTT GAC AGT TGT GCT TCT TTG CTG CGG GAC ATT TTG AAA AAT 397 97 Asp Pro Ala Cys Pro Ala Tyr Ser Asp Ser Glu Ser Gln Cys Ala Ser Leu Leu Arg Asp Ile Leu Lys Asn 120 398 GAA GAT TCA GGT TCA GAA GTA GTA TAT TCA GAA AAT AGA TCC AAT TCT AAA CCT TTA GAA GGC AGA AAG AAC 469
121 Glu Asp Ser Gly Ser Glu Val Val Tyr Ser Glu Asn Arg Ser Asn Ser Lys Pro Leu Glu Gly Arg Lys Asn 144 470 AGA TCT AAA AAG AAA GGA CCT GAA AAA CAT GTT CCT ACA GTG GTC CG<mark>6</mark> AAG GAA ATA T</mark>TA TCA TCA GAA AAT 541 145 Arg Ser Lys Lys Lys Gly Pro Glu Lys His Val Pro Thr Val Val Arg Lys Glu Ile Leu Ser Ser Glu Asn 168 542 AAG AGA TGG ATG CCT AAT GAA ACT TCT ACT GGA AGT GAC ATA GCG CAG CAT TGG TCA GTA CAA GAT CAT TAC 613
169 Lys Arg Trp Met Pro Asn Glu Thr Ser Thr Gly Ser Asp Ile Ala Gln His Trp Ser Val Gln Asp His Tyr 192 614 AGA ATG TAC TCA CCG ATA ATA TAC CAA GCC CTC TGT GAG CAT GTG CAG ACT CAA ATG TCA CTG ATG AAT AGC 685 193 Arg Met Tyr Ser Pro Ile Ile Tyr Gln Ala Leu Cys Glu His Val Gln Thr Gln Met Ser Leu Met Asn Ser 216 686 TTC GCT TCA AAA CAT GGC CCC AAT GGA AGG CCT GCT GTG TGC CAT ACT GGG TCT AAT TCA GAC TCT CAG GCA 757 217 Phe Ala Ser Lys His Gly Pro Asn Gly Arg Pro Ala Val Cys His Thr Gly Ser Asn Ser Asp Ser Gln Ala 240 758 ATG TCA CAT TCT GGT TTT GGC TGG TCT TCC GCT TCG GTC TGG CCC CCT CAG CAG CCA TCC TGC CAT CTA ACA 829 241 Met Ser His Ser Gly Phe Gly Trp Ser Ser Ala Ser Val Trp Pro Pro Gln Gln Pro Ser Cys His Leu Thr 264 830 GTC CAC TCT GAA GTT CAG ACT GAT GAT GAT GAT AAC CAG TTT GAC TCA CAG GGT CAG ACA ACC CCT GTG CGG CAC 901 265 Val His Ser Glu Val Gln Thr Asp Asp Asp Asn Gln Phe Asp Ser Gln Gly Gln Thr Thr Pro Val Arg His 288 902 CGT GAT GCT CCC AGG ACT TTA TCC AGC GTC CAT CCT GGA GTT GCA CAT GGC CCT CCC CAC TCT GAT GGT GCC 973 289 Arg Asp Ala Pro Arg Thr Leu Ser Ser Val His Pro Gly Val Ala His Gly Pro Pro His Ser Asp Gly Ala 312 974 GCT GCT TCA AAG ATT CAG CAG CTG AAT CTT GGG AGT TGG GTT CTG CCA CAA CAG AGA GCT CCT AAG GAA GCA 1045 313 Ala Ala Ser Lys Ile Gln Gln Leu Asn Leu Gly Ser Trp Val Leu Pro Gln Gln Arg Ala Pro Lys Glu Ala 336 1046 GAG CTA CCG AAG CGT TTC CAA ACA CAC GTG TCT CTG TTT CCA GCT CAT GGA AAA GAC GCT CTC TCG GAC AGT 1117 337 Glu Leu Pro Lys Arg Phe Gln Thr His Val Ser Leu Phe Pro Ala His Gly Lys Asp Ala Leu Ser Asp Ser 360 1118 *CAG GCA CAC CCA AGT* CCC TCT CAC TTA CAG CTA GCC TTC TTG GCC ACT AAT GAA GAG AAA TGT GCC AGA GAA 1189 361 Gln Ala His Pro Ser Pro Ser His Leu Gln Leu Ala Phe Leu Ala Thr Asn Glu Glu Lys Cys Ala Arg Glu 384 1190 CAA ATT GGA GAG GCC ACA AAT GAA GGA AAG TAT TTA AGC ATC CAT GAG CAA GAT GCA AAG CTC GCC AAG AAT 1261 385 Gln Ile Gly Glu Ala Thr Asn Glu Gly Lys Tyr Leu Ser Ile His Glu Gln Asp Ala Lys Leu Ala Lys Asn 408 1262 GTG CAG CAG GCA GAA AAC GTG AGC CAG ACT GCT GAG AAA GTC AGA ATT GCC AAG TGC TTG CTG GGA GAG CTC 1333 409 Val Gln Gln Ala Glu Asn Val Ser Gln Thr Ala Glu Lys Val Arg Ile Ala Lys Cys Leu Leu Gly Glu Leu 432 1334 AAG GCC CTG ACC GAA GAA CAA GAG GAC TCA GAA GTT CAG AGA TTG CTA ACA GAA GTA GAG GCG TGC ATA TCT 1405 433 Lys Ala Leu Thr Glu Glu Gln Glu Asp Ser Glu Val Gln Arg Leu Leu Thr Glu Val Glu Ala Cys Ile Ser 456 1406 GGA CTT TCA GCA GTG AGT GGC CAC ATA AAT GTG GAA GTT GAA ATA GCC CTG GCC CTG CAG CCG TTG AGA AGT 1477 457 Gly Leu Ser Ala Val Ser Gly His Ile Asn Val Glu Val Glu Ile Ala Leu Ala Leu Gln Pro Leu Arg Ser 480 1478 GAG AAC GCT CAG TTG CGG AGG CAA CTG AGA ATT TTG AAT CAG CGC CTC CGA GAA CAA GAG AAG AGT ACA GAG 1549 481 Glu Asn Ala Gln Leu Arg Arg Gln Leu Arg Ile Leu Asn Gln Arg Leu Arg Glu Gln Glu Lys Ser Thr Glu 504 1550 ACA CCT GCT AAC CTC AAA TTG TTT TCC CTT CAG TCG CTG TCA CTG CAG AAT CAG CTG CAG GAG TCG CTG AAG 1621 505 Thr Pro Ala Asn Leu Lys Leu Phe Ser Leu Gln Ser Leu Ser Leu Gln Asn Gln Leu Gln Glu Ser Leu Lys 528 1622 AGC CAG GAG TTG CTA CAG AGT AAA AAC GAA GAG CTC CTA AAA GTG ATA GAA GAC CAG CGA GAG GAA AAC AGA 1693 529 Ser Gln Glu Leu Leu Gln Ser Lys Asn Glu Glu Leu Leu Lys Val Ile Glu Asp Gln Arg Glu Glu Asn Arg 552 1694 AGG TTC TCC ACT TTG TTT AAA GAC GAA GAG CAA GCC CTG CTT CAC AGC AGA CAG CAG TTT GAC ATG GAG ATG 1765 553 Arg Phe Ser Thr Leu Phe Lys Asp Glu Glu Gln Ala Leu Leu His Ser Arg Gln Gln Phe Asp Met Glu Met 576 1766 ACC AGG GTG AAG ATG GAG TTG GAG GAA GCC TTG GCC AAT GAG AAG AAC TCT CGG TTT AAG CTC GAG ACT GCA 1837 577 Thr Arg Val Lys Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Ala Asn Glu Lys Asn Ser Arg Phe Lys Leu Glu Thr Ala 600 1838 GAA AAG GAA AAT CAG ATA CTG GGA ATA ACT CTC CGC CAG CGG GAT GCT GAG GTT GCC CGC CTT AGG GAA CTA 1909 601 Glu Lys Glu Asn Gln Ile Leu Gly Ile Thr Leu Arg Gln Arg Asp Ala Glu Val Ala Arg Leu Arg Glu Leu 624 1910 ACC AGA ACT TTA CAG AAC AGC ATG AGG AAG CTG CTC TCA GAT CTC CAT GTG GAC ACT GCC CGC TGC AAG ATG 1981 625 Thr Arg Thr Leu Gln Asn Ser Met Arg Lys Leu Leu Ser Asp Leu His Val Asp Thr Ala Arg Cys Lys Met 648 1982 GGG AAC AGC CTC ACC AGA TCA CTT CTG AAT GTC TAT GAT CAA CAA TTT CAA CGG GAC CCA GCC CCT CCT CAC 2053 649 Gly Asn Ser Leu Thr Arg Ser Leu Leu Asn Val Tyr Asp Gln Gln Phe Gln Arg Asp Pro Ala Pro Pro His 672 2054 ATC TCC ATA ATG AGC TAC CTC AAT AAA TTA GAA ACA AAT CAG AGC TTT ATA CAG TCA GAA CTG CCT AAT AAT 2125 673 Ile Ser Ile Met Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Glu Thr Asn Gln Ser Phe Ile Gln Ser Glu Leu Pro Asn Asn 696 2126 GAG GAA ACC CCC GAG TCA GAC AGT CTC TGT GAA AAT GTG CTG CCC TCA CAA AGA CCT CCT CAC AGT GAC GCT 2197 697 Glu Glu Thr Pro Glu Ser Asp Ser Leu Cys Glu Asn Val Leu Pro Ser Gln Arg Pro Pro His Ser Asp Ala 720

0100	1.00		0.000	<b>C D m</b>	000	000	0.07	000	0.05	0.03	2.07	0.000		0.07	0.07		0.000	<b>C D C</b>	0.7 m			1.01	010	mom	0000
2198	AGG	Ala	Val	GAT	GGG	GGC	Pro	Ala	Pro	GGA	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Leu	Val	GAG	GAT	Ser	GAC Asp	Thr	GAC	CVS	2269
			141	nop	011	011	110	1120		011		, at	001	1120	1120	204	var	014	nop	001	110 p		110 P	010	
0070	C 7 7	<u> </u>	сто	N C III	CERN	CILIA	C 7 7	CAM	~~~~	mcm	C 1 C	CILC	<b>C A C</b>	3 C III	101		<b>— — —</b>		000		C C 7	202	200	N CIT	0241
745	GAA	Ala	Val	Thr	Val	Val	GAA	Asp	Glv	Cvs	Asp	Val	Asp	Ser	Thr	Phe	Tvr	Tle	Pro	Phe	Ala	Ara	Ser	Thr	768
								1101	1	-1-	F		I-				-1-					5			
2342	TCT	AAA	AAG	CAC	TCG	CCA	CCT	TCT	AAG	AGA	CTG	TCC	CCC	CAG	GCG	AAG	GTG	AGC	GCT	GCT	GCC	AGC	GCC	GGT	2413
769	Ser	Lys	Lys	His	Ser	Pro	Pro	Ser	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	Ala	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	792
2414	GCC	TGT	GCC	TCC	AAA	AAA	GAA	AGT	AAA	CCG	TGT	GCA	CCC	GCA	GTT	TGT	CCC	TCA	CGA	GAC	AAA	GCG	GAA	GAT	2485
793	Ala	Cys	Ala	Ser	Lys	Lys	Glu	Ser	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	Ala	Val	Cys	Pro	Ser	Arg	Asp	Lys	Ala	Glu	Asp	816
2486	GCA	CCT	GGA	AAT	CTT	TCT	GGC	ACA	TAC	GAC	ACA	GAG	GAC	GTG	CAG	CTC	CTC	AGG	AAA	ATC	AGA	GAA	GCA	CTT	2557
817	Ala	Pro	Gly	Asn	Leu	Ser	Gly	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Asp	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	840
2558	GGT	AAG	ATC	CCT	GCT	GCT	GCT	GGG	CAC	ccc	AAG	GAA	CAG	GCC	ACC	CAT	CGT	GGC	CCA	CCA	GCT	CCG	CTC	AGC	2629
841	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	His	Pro	Lys	Glu	Gln	Ala	Thr	His	Arg	Gly	Pro	Pro	Ala	Pro	Leu	Ser	864
					070					0.000	0.07					070	<b></b>		~~~				<b>a a</b>		0701
2630	Pro	GGC	GTT Val	Pro	GTG Val	AAG	GGC	AAC	ATT	GTC Val	GCT Ala	GAC	AGC	AGC	Pho	Leu	CAT	TCT	GAC	TTG	A'I'G Mot	TCA	GAC	TGG	2701
000	110	OLY	vui	110	Vul	ПЛО	OTY	11011	110	Vul	mu	nop	DCI	DCI	1110	шец	1110	DCI	110 p	шец	1100	DCL	110 p	ттр	000
0700			m.c.c.						100		0.05		~~~	~ ~ ~	~~~				~~~						0770
2702	Ser	Tle	Ser	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Arg	Asp	Glu	Gln	Asp	Phe	AGA	Asn	Glv	Leu	Ala	Ala	Leu	Asp	2773 912
											5	110 F					5		1					F	
0774	000	7 7 M	200	COM	000	CTTC	C 7 C		ПОО	mmc	3 3 C	3 C III	~~~~	0.000	OTTO	C 1 C		TCA							0007
913	Ala	Asn	Tle	Ala	Ara	Leu	Gln	LVS	Ser	Leu	LVS	Thr	Glv	Leu	Leu	Glu	LVS	End							2027 930
					5			-1-			-1-		1				-1-								
2828	TTC	TGGG.	AGGA	AACT	GATT	GAGT	CCTT	TTTT	TAAA	GTAC	AGAA	CTTG	ACTA	CATT	CATA	GTAT.	ATTT	TGGG	TTTT	CTTA	GAGA	GAAC	ATTT	TAT	2921
2922	ATT	ATTA	ATTA	IGTA:	TGAA	ATAA	raaa'	TGGA	GTAAA	ATTT2	ACTG	rtaa(	GAATA	ATTT	FAACA	ACCTO	GAAA	CTTAC	CAAA	AACAA	AATT	TTCT:	rgaa <i>i</i>	ACC	3015
3016	AAC/	AGTCI	rggg2	AGAA	GAAA	GCCG	rgga:	TCAG	AAAGI	TTAT	GATT	CAA	GCCG	CTTT <i>I</i>	ACTTO	GACAC	GCTTO	CGGCI	TCAC	CAGA	GAAT	PCTTO	CACTO	GTG	3109
3110	CAA	IGGC	rggg	rcgg	CGGT	GCAG	CCAC	CGAG	CATCI	CTG	FCTG	GAAG	GAGAC	GTACO	GAAAG	GGATO	CAGTA	ACTGI	TTA	AATG	FTCC	PCTC:	IGCA	GTG	3203
3204	GAA	IGTTO	GGTT	TCAT	GGTA	GTGT	FCTTO	GTGT	ATGGO	GAATI	ACTC	rgtg	TACO	GAGCI	TAGTO	GCTG	CCAA	GAC	ATGCO	GCTA	ACGT	TTCA	GAGA	GAG	3297
3298	AGA	AGAGO	GCAG	GTGC	ACCC	ACCTO	CACA	CAAA	GCATI	GAT	TTGT	CCAG	AGAAA	ATACO	GATO	GATTO	GATT	ATAC	CATAC	GTTT	TTAA	ACCT	rggg	CAT	3391
3392	TTT	ATTT	ATAT	TTGT	CCTG	AATG	CATG	TTTT2	AAGAG	CTT	raaa <i>i</i>	AAT	AAGI	CAG	ACTGF	ATAA	GTA	ATGCI	TAAAT	FAAC	CAAG	rttt <i>i</i>	ACCT	ГАG	3485
3486	тааг	דיייי	ንጥጥጥ	ΓΤΤΑ	GTAA	GAATT	ГАТТ	GGGT	TTTC	TTA	ATGTO	27777	GAAA	TGAT	rggad	ንጥጥጥባ	GCA	ATCI	CAG	САСТО	GTG	TAA	гтсто	GCC	3579
3580															3673										
3674															3767										
3769															3861										
3060		10011		DCAC'				~~~~~	, Dumon			CI									~ 7 7 00		\ \ C m 1		3055
2002	1 1 MA	num II		GAC	1 1 1 A	- 9996		3111 <sup>°</sup> .						1911		L I I A(	ore:		GIAN		JAAT.		no ri		19999
3956	.11'A <i>l</i>	AAGA(	_111G(	JTCA!	T.I.AU	_A'I''I''	FTCA	ATT'I' <i>I</i>	4C1'1'(	.C1'1'(	JTAG.	LA1''1'(	_A'I'AZ	AATGI	4A.11.6	5TTT7	ACT'TZ	ATTTT	GAGI	4.I.Y.I.(	_AGG!	L'CAC'	rC1"1".	FCC	4049
4050	ATT	I'TCG'	FTCA	GAAG	CACA	AACTO	CATA	AAGA	AGAAA	ACCO	GGT	CGTC	PAAAC	CAAG	ACTI	GTAI	"AGA	AGCTI	ATC	FTAT2	AGAG	GAAT:	TTTC	ГСА	4143
4144	GTTO	CAGA	FTCC	FACT	TCCC	GGCC1	AGGT	GTGG	FAAT?	ACAC	ACTT	[AAT:	PCCAG	GTATO	GCAGO	GAGG	CAGAG	GCAC	GCA	GATC	rctg:	AGCTO	CGAAG	GCC	4237
4238	8 AGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACTGCCAGGGCCATACAGAGAAATCCTATTTAAAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACTGGG														4331										
4332	2 CAAATTCCCTCTTCCCAGATAGGTCTGTTTATGCTACATTGACAAAACTACCCAGTATCCTGATCTAGTCTGCTACCAAGGGGGGTCATAAGAAC														4425										
4426	CCTO	GATG	CATAC	GCTG	GCCG	GTCA	GTTG	IGGG	CTTGI	GAC	raac <i>i</i>	ATGT	GAGG	CAAGI	rgtc <i>i</i>	AGTCI	GTT	GCAC	CTGAG	GACCI	ACAC	CTGT	TTGA	CTC	4519
4520	TACO	CTTTC	CAGG	GTGA	CCGT	GTCT	FAAG	GGAC	rtgg <i>i</i>	ATTG	GTGT	TCT	GCAC	ACCA	AGTTO	GTTO	GCTG	GTGAG	GTG	AAAT	CCTA	GTGCA	ATCC	IGG	4613
4614	TACCTTTCAGGGTGACCGTGTCTTAAGGGACTTGGATTGGTGTTTCTGCACAACCAGTTGGTTG																								
	TAT															GATT2	ATTT	4707							
4708	TATO	CATAC	GAAA: GTGT7	IGAA(	GTGT' ATAA	IGCC <i>I</i> STGT(	AACA:	TAAT: GCAT(	ICTT( GGATT	CCTG:	PATC: CGTGC	TCA TGC	GAATA ATATO	ACCAG	CATT <i>I</i> AGGT(	AAAAA CAGAC	AGTC:	ACTO	GAA'I'' CTTGO	ITAC' GGGG'	PTAGO PCAG'	GATT <i>I</i> ICTCI	ATTT: CCCT7	ITT ACC	4707 4801
4708	CAT	CATAC TAGTO	GAAA' GTGT <i>i</i> PTGCI	rgaa( ACACi rtct/	GTGT ATAA(	IGCCA STGT( TTGC)	AACA GTGG( GTG2/	TAAT GCAT	FCTT( GGAT) FGAT?	CTG: TTAC	CGTGC	FTCA GTGCI	GAATA ATATO	ACCAC CTGTA	CATTA AGGTC	AAAAA CAGAC	GAC!	ACTO	GAAT CTTG(	GGGG	FTAGO FCAG	GATTA FCTC:	ATTT: FCCT <i>I</i>	PTT ACC TGA	4707 4801 4895
4708 4802	TATO CATO CCCA	CATAC TAGTO ACATI	GAAA' GTGTI FTGC:	rgaa ACAC ITGT	GTGT ATAA GTTT	IGCC/ GTGT( ITGC(	AACA GTGG GTGA	TAAT: GCAT( CCGT:	FCTT( GGAT1 FGAT4	CCTG: TTAC( ATGG(	FATC: CGTGC GAGT:	TTCA GTGCI TTCT	GAATZ ATATC GCCTC	ACCAG	CATT7 AGGTC GTTCC	AAAAA CAGAC CAGCC	AGTC: GGAC <i>l</i> CTTG <i>l</i>	ACTO ACTO	CTTGO	FTAC: GGGG: CCCT(	ftago fcag' gact'	GATT <i>I</i> FCTC: FCCC:	ATTT: FCCT <i>i</i> FCGG:	ITT ACC IGA	4707 4801 4895

**Figura 5.7. Secuencia codificante del gen** *CCDC14* **y de su producto proteico predicho.** Se muestra la secuencia del ADNc, de 4945 bases. Debajo de la región codificante se muestra la secuencia de aminoácidos predicha. Se resalta en verde la posición de los codones de inicio (ATG) y terminación (TGA) de la traducción. Resaltadas en amarillo se muestran las bases que mostraron diferencias con respecto a la secuencia teórica ensamblada a partir del genoma de rata presente en el Genbank. La secuencia subrayada en negro corresponde al fragmento que fuera seleccionado para su clonado, utilización como sonda para hibridación *in situ*, y expresión como proteína recombinante; resaltados en gris se muestran los fragmentos que fueron incluidos en el diseño de los iniciadores para la amplificación del mismo (ver más adelante). La secuencia subrayada en rojo corresponde al fragmento de PCR empleado como sonda en los experimentos de Northern blot.

Los análisis bioinformáticos indican que este ARNm codificaría para una proteína predicha de 929 aminoácidos, sin señal de localización nuclear ni ninguna otra señal de direccionamiento evidente, y que poseería una región de unos 315 aminoácidos en el centro de la misma, comprendida aproximadamente entre los aminoácidos 372 y 641, capaz de adoptar estructura de *coiled coil* [Figura 5.8].



## 5.2.2. Reconfirmación del patrón de expresión diferencial y profundización en la caracterización de la expresión testicular de *CCDC14*

Los ensayos de DD, así como los experimentos de RT-PCR semicuantitativo evidenciaron la amplificación de una banda de intensidad importante en espermatocitos paquiténicos, en tanto la intensidad observada en espermátidas redondas era significativamente menor (Ver figura 5.4E). A modo de reconfirmar este resultado, el fragmento de PCR amplificado entre los iniciadores CCDC14 Fw4 y CCDC14 Rv4a (Ver figuras 5.6 y 5.7) se marcó para su utilización como sonda en un ensayo de Northern blot contra ARN total obtenido a partir de poblaciones celulares enriquecidas mediante la técnica de elutriación (Geisinger, 2003) en espermatocitos paquiténicos por un lado, y espermátidas redondas por otro. Se incluyó además un carril conteniendo ARN total extraído de hígado de rata, como control. Las manipulaciones fueron realizadas como se indica en la sección 4.3.11. de Materiales y Métodos.

En la Figura 5.9 se muestra una fotografía del ensayo de Northern blot realizado. Como se puede observar, se detecta una banda intensa en el carril correspondiente a espermatocitos paquiténicos que migra apenas por encima de la banda del ARNr 28S, que posee 4802 nucleótidos en la rata (Hadjiolov *et al.*, 1984). Este tamaño está de acuerdo con el del ARNm ensamblado *in silico* y confirmado por secuenciación (4945 bases). La misma banda se detecta en el carril correspondiente a espermátidas redondas pero con una intensidad mucho menor, y no se detecta en hígado. Podemos concluir entonces, que se logró reproducir la señal diferencial previamente obtenida en los ensayos de DD y RT-PCR. En función de este resultado, se decidió continuar con el estudio del gen *CCDC14*.



Figura 5.9. Confirmación del patrón de expresión de CCDC14 mediante ensayo de Northern blot. A. Northern blot realizado empleando un fragmento del ADNc de CCDC14 como sonda. Cada carril contiene respectivamente 40 µg de ARN total de espermatocitos paquiténicos (EP), espermátidas redondas (ER) e hígado (H). La punta de flecha señala la posición de la banda correspondiente al ARNm de CCDC14. B. Gel de agarosa teñido con EtBr a partir del cual se realizó el ensayo. Puede apreciarse que en todos los carriles se cargaron cantidades equivalentes de ARÑ.

Dado que todos los estudios de expresión comparativa con otros tejidos mediante RT-PCR con bajo número de ciclos habían sido realizados con el extremo final del extenso 3' UTR del ARNm (única secuencia disponible en primera instancia), y que en este punto se disponía de iniciadores que permitían amplificar el ARNm de CCDC14 completo, se realizó un nuevo análisis del patrón de expresión del mismo, pero a nivel de otras regiones del ARNm, de modo de descartar que el patrón de expresión diferencial de espermatocitos (y en general de testículo) correspondiera exclusivamente a, por ejemplo, la presencia de una variante transcripcional con un 3'UTR más largo. En este estudio, realizado también empleando el abordaje de RT-PCR semicuantitativo, se utilizaron iniciadores que permitieron amplificar fragmentos del centro del mismo (Ver figura 5.6), ya sea de la porción codificante (juego 2), o de la región inicial del 3 UTR (juegos 5a y 5b), y se compararon espermatocitos paquiténicos (células meióticas) con espermátidas redondas (células posmeióticas) y con 4 tejidos, entre ellos testículo total. Se reprodujo el resultado obtenido anteriormente en el análisis de secuencias del extremo 3' del ARNm por RT-PCR semicuantitativo (ver sección 5.1.3) y su reconfirmación mediante Northern blot. Las bandas observadas presentaron los tamaños esperados, y a bajo número de ciclos se observó mayor intensidad en los correspondientes espermatocitos paquiténicos carriles а en los que correspondientes a espermátidas redondas. No se detectó expresión en ovario, hígado y cerebro [Figura 5.10.A]. Es más, cuando el número de ciclos se aumentó a 35, si bien el nivel de intensidad de la banda de espermátidas equiparó al de la de espermatocitos, únicamente se detectó una banda en el ARN procedente de testículo total pero no en los otros 3 tejidos, indicando que los niveles de ARNm de CCDC14 en dichos tejidos, si es que hay, están por debajo del mínimo amplificable por esta técnica [Figura 5.10.B].



Figura 5.10. Análisis del patrón de expresión de CCDC14 mediante iniciadores que hibridan hacia 5´del **ARNm.** Se muestran los geles de agarosa en que se migraron los productos de amplificación por RT-PCR semicuantitativo de fragmentos del centro (más hacia el extremo 5', juego 2, y más hacia 3', juegos 5a y 5b) de *CCDC14*. Se comparan los siguientes 6 tipos celulares y/o espermatocitos teiidos: paquiténicos (EP), espermátidas redondas (ER), testículo total de adulto (TA), ovario (O), cerebro (CE) e hígado (H). C-: control negativo. marcador de pares de bases (M<sub>100</sub>): GeneRuler 100pb DNA Ladder, Fermentas, indicándose los tamaños de cada banda a la izquierda de los geles. A. Patrones de expresión para los juegos de iniciadores 2, 5a y 5b, mediante RT-PCR semicuantita-tivo, a 25 ciclos (igual número que el empleado para los análisis iniciales de la banda III, clon 15). B. Patrón de expresión para el juego de iniciadores 2, mediante RT-PCR a 35 ciclos. Se muestra también una fotografía del gel de agarosa en que se migraron los productos de amplificación de un fragmento de gen de la  $\beta$ -actina, como control. Las puntas de flecha señalan la posición de los amplicones obtenidos con cada juego de iniciadores.

Con el objeto de profundizar en la caracterización del ARNm de *CCDC14*, así como de estudiar su localización en los distintos tipos celulares del testículo y a lo largo del desarrollo testicular, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* sobre cortes de testículo de ratas adultas (40 dpp) y juveniles (21 dpp). Se emplearon cortes de hígado como control negativo. Los ensayos se realizaron en las condiciones establecidas en la sección 4.3.12. de Materiales y Métodos, empleando como sonda el producto de transcripción del mismo fragmento de *CCDC14* que se clonó para su expresión como proteína de fusión (Ver figura 5.7 y texto a continuación). Esta sonda poseía 831 b, correspondientes a 277 aa de la proteína.

La sonda antisentido logró detectar el ARNm de *CCDC14* en los cortes de testículo de rata de las dos edades estudiadas [Figuras 5.11.A y 5.12.A]. La sonda sentido, en cambio [Figuras 5.11.D y 5.12.D], no mostró señal detectable para los niveles del fotomultiplicador establecidos a partir de los controles sin sonda [Figuras 5.11.G y 5.12.G]. Tampoco se detectó señal en cortes de hígado [Figura 5.13], lo cual es coincidente con los resultados obtenidos mediante RT-PCR con bajo número de ciclos y Northern blot.



**Figura 5.11. Hibridación** *in situ* **para** *CCDC14* **en cortes de testículo de rata de 40 dpp.** Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia para los ensayos de hibridación *in situ* realizados sobre cortes de testículo de 40 dpp, empleando una sonda específica para el ARNm de *CCDC14*, seguidos de inmunohistoquímica. **A-C.** Ensayo con sonda *CCDC14* antisentido. **D-F.** Ensayo con sonda *CCDC14* sentido. **G-I.** Ensayo sin sonda realizado como control. En **A**, **D** y **G** se observan imágenes de detección de las sondas (marcadas con biotina) con streptavidina conjugada al fluorocromo Alexa 488 (verde). En **B**, **E** y **H** se muestra el inmunomarcado de las células de Sertoli con un anticuerpo antivimentina (rojo). En **C**, **F e I** se pueden apreciar los núcleos celulares marcados con DAPI (azul).



**Figura 5.12. Hibridación** *in situ* **para** *CCDC14* **en cortes de testículo de rata de 21 dpp.** Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia para los ensayos de hibridación *in situ* realizados sobre cortes de testículo de individuos de 21 dpp, empleando una sonda específica para el ARNm de *CCDC14*, seguidos de inmunohistoquímica. **A-C.** Ensayo con sonda *CCDC14* antisentido. **D-F.** Ensayo con sonda *CCDC14* sentido. **G-I.** Ensayo sin sonda realizado como control. En **A**, **D y G** se observan imágenes de detección de las sondas (marcadas con biotina) con streptavidina conjugada al fluorocromo Alexa 488 (verde). En **B**, **E** y H se muestra el inmunomarcado de las células de Sertoli con un anticuerpo anti-vimentina (rojo). En **C**, **F** e **I** se pueden apreciar los núcleos celulares marcados con DAPI (azul).

De acuerdo a lo observado en estos ensayos de hibridación *in situ*, el ARNm parece encontrarse presente, además de en el citoplasma de los espermatocitos (lo que apoya los resultados de los estudios mostrados anteriormente), en espermatogonias y en células de Sertoli. Esto es consistente con el hecho de que en el ARN de testículo adulto se identificaran niveles intermedios de expresión con respecto a espermatocitos y espermátidas (Ver figura 5.4.E), y permite atribuir dichos niveles, al menos parcialmente, a la presencia de estos tipos celulares, además de los espermatocitos. Con respecto a las células de Sertoli, el ARNm fue detectado especialmente en sus prolongaciones citoplásmicas. Con el objeto de confirmar esto, se incubó en simultáneo con un anticuerpo anti-vimentina. La vimentina es una proteína fibrosa, que forma parte los filamentos intermedios del citoesqueleto, y los anticuerpos anti-vimentina en el testículo marcan exclusivamente el citoplasma de las células de Sertoli (Show *et al.*, 2003). La comparación de los patrones de hibridación *in situ* con la sonda antisentido (Ver figura 5.11.A) y de tinción con el anticuerpo anti-vimentina [Figura 5.11.B] evidencian claramente la concentración de transcriptos de *CCDC14* en las prolongaciones de las células de Sertoli, es decir, las regiones de contacto entre las células de Sertoli y las de la línea germinal. La señal en espermátidas en elongación y espermatozoides maduros, si es que la hay, sería bastante menor, lo que coincide con los resultados de los estudios semicuantitativos de RT-PCR (ver figura 5.4.E).

En los cortes correspondientes a testículos de individuos de 21 dpp, es decir la edad en que la primera onda espermatogénica ha comenzado y los espermatocitos alcanzan el estadío de paquiteno, la señal de la sonda antisentido se concentra en forma de anillo coincidentemente con el límite de la señal positiva para el anticuerpo anti-vimentina. Es decir, que el ARNm parece acumularse especialmente en la región en que los espermatocitos primarios interactúan con el final de las protrusiones de las células de Sertoli [Figuras 5.12A y 5.12.B].



Figura 5.13. Hibridación in situ para CCDC14 en cortes de hígado de rata. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia para los ensayos de hibridación in situ realizados sobre cortes de hígado de empleando rata, una sonda para el ARNm específica de CCDC14. A-B. Ensayo con sonda CCDC14 antisentido. C-D. Ensayo con sonda CCDC14 sentido. E-F. Ensayo sin sonda realizado como control. En A, C y E se observan imágenes de detección de las sondas (marcadas con biotina) con streptavidina conjugada al fluorocromo Alexa488 (verde). En **B**, **D** y **F** se pueden apreciar los núcleos celulares marcados con DAPI (azul).

# 5.2.3. Clonado de parte de la secuencia codificante de *CCDC14* en un vector de expresión y producción de un suero policlonal anti-CCDC14

#### 5.2.3.1. Clonado de la secuencia

Con el fin de producir anticuerpos que nos permitieran identificar a la proteína CCDC14 y abordar su estudio, se procedió a clonar parte de la secuencia codificante para la misma en un vector de expresión. Una vez clonada, el objetivo era expresar la proteína y emplearla para la inoculación de conejos, con el objeto de obtener un suero policlonal anti-CCDC14. La selección del fragmento a clonar se basó en abarcar una región del gen de un tamaño considerable y a la vez excluir la región *coiled coil*, ya que este dominio, al encontrarse presente en otras proteínas, podría generar anticuerpos que dieran reacción inmunológica cruzada, especialmente con proteínas de la familia de los filamentos intermedios (Ricardo Benavente, comunicación personal). El fragmento seleccionado constó de 831 pb codificantes para 277 aminoácidos de la proteína predicha CCDC14, y se localizaba cercano al extremo 5' del ADNc [Ver figura 5.7].

La secuencia codificante para el fragmento elegido fue amplificada mediante RT-PCR y luego corrida en un gel de agarosa como se detalla en Materiales y Métodos. Los iniciadores diseñados para ello portaban, en su extremo 5', un sitio de restricción cada uno, uno para la enzima *Bam*HI y el otro para *Xho*I, de modo de poder luego clonar el fragmento en un vector de expresión pGEX-5X-3.

En el gel de agarosa en que se migró el producto de amplificación se observaron dos bandas: una mayoritaria del tamaño esperado, 854 pb [Figura 5.14.A], correspondiente al fragmento seleccionado más las secuencias de restricción agregadas, y otra minoritaria de un tamaño cercano a los 900 pb generada probablemente por amplificación inespecífica. Para la purificación de la banda de interés, y su discriminación con respecto a la de 900 pb, se realizó un gel de agarosa preparativo. Luego de la elución del producto se obtuvo una única banda, correspondiente al fragmento de 854 pb [Ver figura 5.14.A].

El fragmento purificado se ligó en un vector pGEM-T Easy, especialmente diseñado para el clonado de productos de PCR, y el producto de esta ligación se empleó para transformar células competentes *E. coli* DH10B, de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Este pasaje del fragmento por un vector auxiliar, previo a su ligación en el vector de expresión, se realizó a fin de proveer una cierta

cantidad de nucleótidos extra y facilitar el anclaje y funcionamiento de las enzimas de restricción que cortan en los extremos del producto amplificado.

Luego de la transformación se seleccionaron dos colonias aisladas a partir de las cuales se realizaron minipreparaciones de ADN. Los productos de las mismas fueron sometidos a digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, y migrados en gel de agarosa. En ambos casos se liberó un inserto de un tamaño estimado un poco mayor a 800 pb, correspondiente al fragmento ligado. La secuenciación de los insertos mostró dos secuencias de 836 pb exactamente idénticas entre sí, las cuales correspondían efectivamente al fragmento de *CCDC14* seleccionado, flanqueado por los correctos sitios de restricción insertados en los iniciadores, y sin ningún cambio puntual de bases introducido durante la síntesis. El fragmento liberado mediante el corte con las enzimas de restricción fue eluído y purificado, quedando así pronto para su ligación en el vector de expresión (datos no mostrados).

El vector de expresión pGEX-5x-3 también fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y purificado mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de elución de la banda correspondiente [Figura 5.14.B]. La digestión del vector e inserto con dos enzimas de restricción que generan como resultado extremos cohesivos no compatibles, se hizo de modo de favorecer el clonado direccional.

El fragmento de *CCDC14* escindido del vector pGEM-T y purificado se ligó al vector pGEX-5X-3 lineal, y el producto de ligación se utilizó para transformar células de la cepa BL21 Star. Dado que esta cepa presentó baja eficiencia de transformación, se realizó un pasaje intermedio del producto de ligación por células de la cepa DH10B, de alta eficiencia. La transformación del producto de ligación en DH10B dio como resultado un alto número de colonias con respecto al control negativo, y el ADN de una de ellas se utilizó finalmente para transformar las células BL21 Star.

El vector de expresión utilizado no posee un método de selección para los clones que presentan el inserto. Por lo tanto, la presencia del inserto en las células transformadas se confirmó, como primera aproximación, por digestión con enzimas de restricción. Para ello, se procedió a la purificación de ADN plasmídico a partir de 10 clones seleccionados al azar, crecidos sobre LB/amp. Los ADN plasmídicos fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y analizados

mediante electroforesis en gel de agarosa, la cual evidenció que 8 de los 10 clones presentaban un inserto del tamaño esperado [Figura 5.14.C].

El ADN plasmídico de dos de los 8 clones positivos fue secuenciado de modo de confirmar la presencia de la secuencia deseada y la ausencia de mutaciones, así como de verificar el correcto empalme de la secuencia codificante de *CCDC14* con la secuencia de GST presente en el vector. Las secuencias obtenidas confirmaron la presencia de la región codificante de *CCDC14* sin alteraciones y siguiendo el marco de lectura correcto [Figura 5.14.D].



#### Figura 5.14. Clonado de una región de la secuencia codificante de *CCDC14* en el vector pGEX-5x-3. A. Amplificación y purificación del fragmente

Amplificación y purificación del fragmento de CCDC14 a clonar. Se muestra la fotografía del gel de agarosa en que se migró el producto de amplificación del fragmento de CCDC14 a clonar sin purificar (s/pur) y luego de purificar (pur) la banda de interés (854 pb) del gel de agarosa. Marcador de pares de bases (M100): GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). A la derecha del gel se indican las bandas del marcador de pares de bases empleado. B. Digestión secuencial del vector pGEX-5X-3 con las enzimas BamHI y XhoI para generar sitios de clonado para el fragmento de CCDC14. Se cargó una alícuota extraída luego de la primera digestión con la enzima BamHI (pG/B), una alícuota del vector digerido con ambas enzimas (pG/B-X) y una alícuota de vector sin digerir (pGs/d). Se puede apreciar que al finalizar la primera digestión no se observa vector en forma no lineal. Marcador de pares de bases ( $M_{\lambda/H}$ ):  $\lambda/HindIII$ . **C.** Identificación de clones portadores de vectores pGEX-5X-3 recombinantes. 10 clones de los obtenidos en la transformación con el producto de ligación fueron digeridos con las enzimas BamHI y XhoI para chequear la presencia de insertos. Los productos de la digestión (1-10) se migraron en gel de agarosa, comparados con el vector pGEX-5X-3 digerido con PstI (pG/P) y el vector sin digerir (pGs/d). Se indica el marcador de pares de bases empleado ( $M_{\lambda/H}$ :  $\lambda$ /*Hind*III). 8 de los 10 clones liberaron un inserto de tamaño acorde al esperado. La punta de flecha blanca indica la posición del inserto. D. El ADN plasmídico de dos de los clones que liberaron inserto fue secuenciado. Se muestra parte del cromatograma de una de las secuencias obtenidas. Se indican con líneas coloreadas las regiones correspondientes a la secuencia de clivaje de la proteasa Factor Xa (rojo), el sitio de restricción de BamHI (verde), y el extremo 5' del fragmento de la secuencia de CCDC14 clonada (violeta). La secuencia fue clonada en fase y en su correcto marco de lectura, y no se observaron errores en la secuencia.

El ADN purificado a partir uno de los clones se empleó para la transformación de células competentes BL21 Star que, como se señaló, presentan baja eficiencia de transformación pero son más aptas para la expresión de proteínas (ver Materiales y Métodos, sección 4.3.14.1). Se procedió de igual modo que en la transformación anterior, obteniéndose 2 clones, ambos conteniendo el vector pGEX-5x-3 con el fragmento de la secuencia codificante de *CCDC14* insertado en su correcto marco de lectura (no mostrado).

#### 5.2.3.2. Obtención de la proteína de fusión

El fragmento de ADNc codificante para parte de la proteína CCDC14 clonado en el vector pGEX-5x-3, y contenido en células BL21-Star según lo descrito en las secciones anteriores, fue empleado para la obtención de una proteína de fusión GST-CCDC14, durante un trabajo de tesis de grado desarrollado en nuestro laboratorio.

Dicho trabajo implicó la inducción con IPTG de cultivos de ambos clones, variando las condiciones de inducción (temperatura de inducción, tiempo de inducción, DO<sub>600nm</sub> a la que se indujo y concentración de IPTG), de modo de determinar las mejores condiciones de producción de la proteína recombinante. Se evaluaron también los niveles de proteína obtenidos en las fracciones soluble e insoluble, y el nivel de proteólisis que existía durante la expresión y purificación. El objetivo era obtener así la cantidad de proteína necesaria [entre 1 y 2 mg de proteína purificada, de acuerdo con experiencias previas del laboratorio (Capoano, 2008)] para cumplir con el protocolo de inmunización de conejos y la producción de anticuerpos anti-CCDC14. De estas evaluaciones se estableció que las mejores condiciones para la expresión de la proteína recombinante GST-CCDC14 eran la inducción con una concentración de IPTG de 0,3 mM, durante 4 horas a 37°C, recuperando al final únicamente la fracción soluble de los extractos celulares. Los resultados fueron los mismos para los dos clones evaluados. La purificación de la proteína de fusión en cantidad suficiente para la producción de un suero policional se llevó a cabo partiendo de 2 L de cultivo, mediante un kit comercial que se basa en la técnica de cromatografía de afinidad y el uso de columnas de glutatiónagarosa.

Trabajando en las condiciones anteriormente descritas, durante la tesis de grado mencionada se logró obtener un total de de 2,16 mg de la proteína recombinante GST-CCDC14 pura, con un tamaño estimado de 56,5 kDa, acorde al esperado (26 kDa correspondientes a GST y 30,5 kDa correspondientes al fragmento CCDC14), así como bandas menores, probables productos de proteólisis. Un ensayo de Western blot con un suero policional anti-GST demostró que tanto la banda de 56,5 kDa como las bandas de menor peso molecular obtenidas en la purificación correspondían a la proteína de fusión. Por otra parte, todas las bandas reaccionantes con el anticuerpo anti-GST poseían un tamaño superior al de la GST libre. Las bandas más pequeñas del producto de purificación poseían 35 kDa: dado que la GST pesa 26 kDa, aún las bandas más pequeñas contenían al menos 9 kDa extra, es decir aproximadamente 80 de los 277 aminoácidos del fragmento CCDC14 clonado. Estos resultados han sido presentados en la tesis de grado del Lic. Gabriel Lassabe (Biblioteca de Facultad de Ciencias, Montevideo, 2011), realizada en nuestro laboratorio y en colaboración con el presente trabajo, y se consignan en el anexo B, figuras I y II de esta tesis.

En suma, todas las bandas obtenidas contenían un buen tamaño de péptidos correspondientes a CCDC14, apropiados para ser empleados como antígeno, y en consecuencia se decidió utilizar la proteína de fusión purificada para la producción de anticuerpos anti-CCDC14.

# 5.2.3.3. Inyección de conejos, obtención del suero y ensayos de inmunodetección

Una vez obtenida la proteína GST-CCDC14 en forma pura y confirmada su identidad, como continuación de nuestro trabajo se procedió a la producción de un suero policional anti-CCDC14, con el objeto de emplearlo en la caracterización de la proteína. Se mezclaron entonces todas las fracciones obtenidas, se precipitaron y resuspendieron en PBS según lo descrito en Materiales y Métodos, y la proteína resuspendida se utilizó para la inmunización de un conejo.

Luego de obtenido el suero según el procedimiento descrito, se procedió a su testeo mediante ensayos de Western blot contra lisados proteicos de un cultivo inducido de *E. coli* expresando la proteína de fusión. Se emplearon como controles negativos el lisado proteico del mismo clon pero sin inducir con IPTG, y un cultivo inducido de *E. coli* que poseía el vector pGEX-5X-3 sin inserto clonado. El suero

policlonal anti-CCDC14 fue capaz de reconocer a la proteína de fusión GST-CCDC14, de 56,5 kDa, a partir del lisado proteico total del cultivo inducido de *E. coli* [Figura 5.15].



Figura 5.15. Prueba del suero policional anti-CCDC14 mediante ensayos de Western blot contra lisados proteicos de un cultivo inducido de *E. coli* expresando la proteína de fusión. A. Fotografía de la placa de autorradiografía del ensayo de Western blot. **B.** En paralelo, se corrió un gel de poliacrilamida SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomasie. En los dos geles se cargaron las mismas muestras, pero en el que se usó para el ensayo de Western blot, se sembró 1/3 del volumen de las muestras que en el gel para teñir: clon con vector pGEX vacío inducido (CV ind), clon con vector recombinante pGEX-CCDC14 inducido (CI ind) y clon con vector recombinante pGEX-CCDC14 sin inducir (CI s/ind). MF representa una alícuota de la mezcla total de las fracciones de proteína de fusión pura obtenidas. Se señala con puntas de flecha la posición de: la proteína de fusión GST-CCDC14 (rojo), bandas menores, posibles productos de proteólisis (amarillo), la proteína GST sola (verde).

Sin embargo, el suero también reconoce la banda correspondiente a la proteína GST en el carril en que se corrió el lisado proteico del cultivo inducido de *E. coli* que poseía el vector pGEX-5X-3 sin inserto (Ver figura 5.15). Estos resultados nos indican que el suero policional posee anticuerpos contra la porción GST de la proteína de fusión [lo cual no suele afectar a la detección de las proteínas de interés en tejidos de mamífero, que usualmente no dan reacción cruzada con anticuerpos contra GST de *S. japonicum* (Ricardo Benavente, comunicación personal)], pero no nos permiten determinar con claridad si se han generado también anticuerpos que reconozcan únicamente la porción CCDC14. De este modo, no podemos asegurar que las bandas que observamos en el carril conteniendo la proteína de fusión se deban a reacción antigénica contra la porción de nuestra proteína de interés, y no contra la porción GST.

A continuación se procedió a realizar ensayos de Western blot utilizando el suero obtenido, con el objeto de estudiar el patrón de expresión de CCDC14 en el testículo de la rata. Por otra parte, la eventual obtención de una banda a la altura correspondiente a la migración relativa de CCDC14 nos indicaría la presencia, en el suero, de anticuerpos anti-CCDC14. Los ensayos de Western blot se realizaron contra lisados proteicos de testículos de individuos juveniles, que se encuentran cursando la primera onda espermatogénica (21 dpp) y adultos jóvenes (40 dpp), obtenidos a partir de suspensiones celulares como se establece en Materiales y Métodos. En los mismos, el suero anti-CCDC14 permitió detectar una banda de aproximadamente 103 kDa, que se correspondería con el tamaño estimado in silico para el producto del gen CCDC14, en los lisados de ambas edades, no apreciándose diferencias de intensidad [Figura 5.16]. Dicha banda no se detectó en extractos proteicos procedentes de hígado ni de cerebro de rata, tejidos en los que tampoco se había detectado el transcripto del gen mediante RT-PCR semicuantitativo, y en el caso de hígado tampoco mediante Northern blot ni hibiridación in situ, por lo cual los resultados son coherentes con los obtenidos previamente a nivel de ARN. Sin embargo, el suero detectó otras bandas, de tamaños menores a 60 kDa, en los otros tejidos analizados.





Estos resultados sugieren que si bien el suero policional obtenido posee anticuerpos capaces de reconocer a la proteína CCDC14 en lisados de testículo de rata, también posee anticuerpos que reconocen otras bandas en otros tejidos. Con el fin de obtener un suero más "limpio" y quedarnos únicamente con los anticuerpos anti-CCDC14, se realizó una purificación del suero por cromatografía de afinidad mediante una columna confeccionada con la proteína de fusión GST-CCDC14, y una posterior depleción de los anticuerpos anti-GST por inmunoprecipitación (ver Materiales y Métodos). Si bien este abordaje permitió disminuir notoriamente la señal de GST en el lisado proteico del cultivo inducido de *E. coli* que poseía el vector pGEX-5X-3 sin inserto (datos no mostrados), los resultados obtenidos en los ensayos de Western-blot contra lisados de tejidos de rata fueron los mismos con el anticuerpo purificado por columna que con el suero sin purificar, no permitiendo eliminar las bandas de menor tamaño observadas en los otros tejidos (datos no mostrados).

### 6.1. ANÁLISIS DE BANDAS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ESPERMATOCITOS PAQUITÉNICOS, OBTENIDAS MEDIANTE DD.

#### 6.1.1. Análisis inicial de 123 clones correspondientes a 11 bandas del DD.

Esta tesis de maestría comenzó emprendiendo el análisis de todos los clones producto del clonado de 11 bandas de ADNc obtenidas del DD (Geisinger, 2003), las cuales habían sido detectadas como específicas o diferenciales de células en profase meiótica I (espermatocitos paquiténicos). El abordaje experimental utilizado implicó la obtención de sus ADN plasmídicos, digestión con enzimas de restricción para la liberación de insertos, corridas electroforéticas en geles de agarosa, en los casos necesarios también corridas electroforéticas en geles conteniendo bisbenzimida-PEG, y finalmente secuenciación automática. La combinación de técnicas empleadas fue muy acertada a la hora de reducir la cantidad de secuencias a estudiar, lo cual resultó muy ventajoso y de vital importancia no sólo desde el punto de vista de los recursos económicos invertidos, sino también del tiempo insumido. De los 123 clones que poseíamos al inicio, finalmente sólo fue necesario secuenciar 17.

Se observaron varios clones que, al ser digeridos con enzimas de restricción cuyas secuencias de corte se encontraban a los lados del sitio de clonado múltiple del vector, no liberaban inserto. Este fue el caso para todos los clones de las bandas VII, IX y XI, todos excepto uno de los clones de la banda V (clon 5), todos excepto dos de los clones de la banda VI (clones 2 y 6), y algunos clones de las restantes bandas analizadas. Sabemos que cuando el producto de una secuencia de ADN presente en cualquier tipo de célula resulta no beneficioso o incluso nocivo para la misma, se estima que por razones adaptativas, dicha secuencia tiende a perderse (Orr, 2005). Para los casos de clones en que no se detectó inserto, una posibilidad entonces es que, si bien se encuentra reprimida la transcripción y posterior traducción de las secuencias que se insertan en el sitio de clonado múltiple del vector pGEM-T, el nivel basal de expresión de sus productos podría haber resultado tóxico para la célula, y por lo tanto haber conllevado a su propia eliminación (Elena & Lenski, 2003). Otra posibilidad, dado que el clonado previo se había hecho de modo masivo y la selección por complementación en  $\alpha$  sin chequearse la presencia de insertos, es que al menos en alguno de los casos los

clones blancos seleccionados obedecieran a defectos del vector (por ejemplo, deleciones).

Por otra parte, en el caso de todos aquellos clones para los que sí se detectó la presencia de un inserto, la observación de distintos patrones frente a cortes con enzimas de restricción o variaciones en la migración en geles de agarosa conteniendo bisbenzimida-PEG, permitió la diferenciación de los mismos en subgrupos. Este último método, que consiste en una adaptación de una técnica realizada en nuestro laboratorio (Geisinger *et al.*, 1997), nos permitió separar en subpoblaciones los clones de una misma banda cuyos insertos poseían tamaños similares y eran indistinguibles en geles de agarosa normales. Como se desprende de los resultados obtenidos, esta técnica tiene altísima sensibilidad y es mucho más sencilla y económica que otras empleadas con el mismo fin como el Northern blot (ya sea directo o reverso) o la secuenciación. Se destaca a modo de ejemplo el resultado obtenido en el análisis de los clones de la banda II, que *a priori* parecían ser todos iguales, pero fueron separados en 4 subgrupos con secuencias diferentes y cuyo contenido en A+T se correlaciona perfectamente con su migración.

### 6.1.2. Selección de secuencias de interés, y confirmación del patrón de expresión diferencial de meiosis.

Como se mencionara en la sección de Resultados, a partir del análisis bioinformático y la comparación de las secuencias obtenidas para los 17 clones con las bases de datos, se seleccionaron 7 clones para profundizar su estudio, cuyo patrón diferencial de expresión era necesario confirmar.

La técnica original del DD propone como método confirmatorio el Northern blot (Liang *et al.*, 1993). Alternativamente, se han utilizado la protección a ARNasa I (Hall *et al.*, 2006) o, incluso la hibridación *in situ* (Kao *et al.*, 2003). Sin embargo, nosotros decidimos emplear una técnica de confirmación basada en PCR, que nos pudiera brindar una mayor sensibilidad. Existen en la actualidad técnicas y herramientas modernas para abordar estudios de expresión génica de forma cuantitativa, como lo es el PCR en Tiempo Real. No obstante, nosotros optamos por una técnica de RT-PCR a tiempo final, aplicada de forma semicuantitativa, es decir con bajo número de ciclos, y empleando como control externo parte de la secuencia codificante del gen de la  $\beta$ -actina. Esta elección se basó en la necesidad de encontrar una técnica rápida y simple de poner a punto, que nos permitiera corroborar los resultados anteriormente obtenidos para las 7 bandas elegidas. Es importante señalar que reportes previos indicaban que al menos un 50% de las bandas diferenciales resultantes de experimentos de DD no podían nunca confirmarse en ensayos de Northern blot o experimentos equivalentes, y por lo tanto debían ser descartadas (Sompayrac et al., 1995). En cambio, los análisis de expresión realizados por nosotros mediante RT-PCR mostraron que las secuencias de los insertos de los 7 clones elegidos se expresaban diferencialmente en espermatocitos paquiténicos con respecto a espermátidas redondas, lo que permitió confirmar los resultados preliminares obtenidos en el DD con una tasa de éxito del 100%. Seguramente esta diferencia se deba a que el DD (basado en un PCR radiactivo y una reamplificación posterior) lleva a veces a la identificación de mensajeros de baja expresión, muchos de los cuales no pueden luego detectarse mediante los métodos confirmatorios de baja sensibilidad utilizados anteriormente por otros autores. En ese sentido, el método de confirmación empleado por nosotros, de relativa sencillez, ha mostrado ser mucho más apropiado, poniendo en evidencia, además, que la proporción de falsos positivos reportada previamente para la técnica del DD (Sompayrac et al., 1995) estaba ampliamente sobreestimada: lo que fracasaba era el método de confirmación.

Por otra parte, la comparación con otros órganos y tejidos indicó que las 7 secuencias seleccionadas eran de expresión diferencial del testículo. Esto no es raro, teniendo en cuenta que los experimentos de microarreglos han puesto en evidencia que el testículo es, entre todos los tejidos, el que presenta mayor número de genes expresados en forma diferencial (Schlecht, *et al.*, 2004).

Como conclusión de la primera parte este trabajo, podemos decir que hemos identificado 7 secuencias de expresión específica de meiosis, y a su vez específica o altamente diferencial del testículo con respecto a otros tejidos. El análisis inicial de estas secuencias sugiere que las mismas serían:

- a. Un nuevo gen miembro de la familia de proteínas de transmembrana "Leucine-rich repeat containing 8 family", no anotado aún, o una variante más larga de una secuencia génica predicha, expresada diferencialmente durante la meiosis masculina de la rata.
- b. Parte del gen correspondiente a la proteína hipotética de rata homóloga de la proteína humana "PAK/PLC interacting protein" (hPIP1), que es expresado principalmente en el testículo, y especialmente en las células meióticas en comparación con las células posmeióticas.

- c. Parte del gen que codifica para la proteína "Mitochondrial carrier homolog 2 (Mtch2)", miembro de una familia de proteínas integrales de la membrana mitocondrial, con dominios de transmembrana, expresado diferencialmente en el testículo y especialmente durante la meiosis masculina.
- d. Una nueva isoforma no descrita de la secuencia codificante para la proteína hipotética de rata "Tripartite motif protein 27 (TRIM27/RFP)", específica del testículo y diferencial de las células meióticas.
- e. Parte del transcripto del gen que codifica para el homólogo de rata de la proteína "Coiled coil domain containing 14" de ratón (CCDC14), que se expresa diferencialmente durante la meiosis masculina de la rata.
- f. Un nuevo transcripto, posiblemente codificante para una isoforma de la unidad regulatoria de la Pik3 ("Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3") no descrita hasta ahora, específica de la línea germinal masculina y especialmente de las células meióticas, generada por procesamiento alternativo.
- g. Un posible nuevo gen de la familia de "TAR-binding protein" (TARDBP), codificante para una proteína testículo-específica, cuyo ARNm estaría expresado principalmente en la meiosis. En particular, la identificación de una posible isoforma de una proteína de unión a ARN es de especial interés, por la enorme importancia que las proteínas de unión a ARN revisten en la regulación de la expresión génica en el testículo, ya que gran parte de ésta se regula a nivel postranscripcional (Ver Introducción).

La identificación de estas nuevas secuencias de expresión diferencial de la meiosis masculina de la rata constituye un aporte al conocimiento de dicho proceso desde el punto de vista genómico, y se suma a la gran cantidad de información que ha venido siendo acuñada durante los últimos años a través del uso de técnicas como los microarreglos (Shima *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2007; Feig *et al.*, 2007). Es más: a diferencia de la tecnología de microarreglos, que si bien aporta un volumen de información importante sobre expresión diferencial de secuencias conocidas no identifica secuencias nuevas, el DD sí permite la identificación de nuevas secuencias. En ese sentido, la secuenciación masiva del transcriptoma de células meióticas, que se está abordando actualmente en nuestro laboratorio, representará un salto cualitativo al permitir la identificación de nuevos transcriptos a gran escala y el estudio de sus patrones de expresión, comparándolos con los transcriptomas de otras etapas de la espermatogénesis.

Si bien los resultados presentados para estos 7 genes son preliminares, proveen nociones sobre las secuencias que se activan durante dicho proceso. No fue objeto de este trabajo la profundización en el análisis de todos los genes identificados, pero es importante destacar que su caracterización así como la elucidación de su función, podrá ser objeto de trabajos futuros en el laboratorio.

En particular, el estudio del patrón de expresión del gen Mtch2, identificado durante este trabajo, en las distintas poblaciones celulares del testículo y a lo largo del desarrollo testicular, así como la caracterización de su producto proteico, y la relación del mismo con la apoptosis testicular, están siendo objeto de otra tesis de maestría en nuestro laboratorio. En el marco de dicho trabajo de tesis, se ha logrado hasta ahora confirmar el patrón diferencial de expresión del gen durante la meiosis de la rata e identificar mediante ensayos de Western blot e inmunohistoquímica a la proteína Mtch2, que exhibe altísimos niveles de expresión en las células meióticas adultas, y en el testículo en relación con otros órganos y tejidos. Actualmente se está en proceso de colocalizar a Mtch2 con distintos marcadores de apoptosis testicular. La identificación de esta proteína apoptótica diferencial de meiosis, ha aportado al grupo una vía de entrada para el estudio de la muerte celular programada en la meiosis, un tema que reviste altísimo interés dada la enorme relevancia de la apoptosis en el proceso de diferenciación de las células germinales, y la abrumadora cantidad de células que mueren por apoptosis durante dicho proceso (Shaha, et al., 2010).

### 6.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *CCDC14*, UN GEN QUE CODIFICA PARA UNA PROTEÍNA CON POSIBLE FUNCIÓN EN LA ESPERMATOGÉNESIS DE LOS MAMÍFEROS.

De los 7 genes identificados en la primera parte de este trabajo, se seleccionó el gen *CCDC14* para profundizar en su estudio pues reunía varias características que lo hacían un candidato interesante. En primer lugar, el conocimiento sobre su secuencia y posible producto era escaso y meramente teórico, y provenía principalmente de algunos datos obtenidos en ratón. La posibilidad de generar conocimiento original sobre un gen identificado como de expresión diferencial de la línea germinal masculina, y particularmente de la meiosis (resultado que también se confirmó mediante Northern blot), resultaba muy interesante. Además, como el nombre asignado al propio gen lo indica, su

posible producto proteico poseería una región capaz de adoptar estructura de *coiled coil.* Se han identificado varias proteínas que contienen este tipo de motivo y cumplen funciones importantes durante la meiosis (ver más adelante), por lo cual la idea de identificar una nueva proteína con *coiled coil* que participase en ese proceso, resultaba muy prometedora.

#### 6.2.1. Confirmación del patrón de expresión de CCDC14

Todos los ensayos llevados a cabo con el objeto de confirmar el patrón de expresión del ARNm de *CCDC14* permitieron reafirmar los resultados inicialmente observados en el DD: se trata de un gen de expresión diferencial durante la meiosis masculina de la rata.

El ensayo de Northern blot demostró la existencia de un ARNm de un tamaño levemente superior al del ARNr 28S de rata (4802 b), lo cual concuerda con la secuencia determinada *in silico*. La banda correspondiente a dicho ARNm mostró una intensidad mucho mayor en células meióticas que en células posmeióticas. A su vez, este ensayo no detectó bandas de otros tamaños, lo cual sugiere que no existirían isoformas para el ARNm de *CCDC14* reconocidas por la sonda empleada.

Los ensayos de Hibridación in situ empleando sondas específicas para CCDC14 afirmaron los resultados obtenidos con las demás técnicas aplicadas y nos aportaron algunos datos interesantes. Llama particularmente la atención el patrón de distribución del ARNm de CCDC14 en testículo, observándose una concentración de transcriptos de CCDC14 en las prolongaciones de las células de Sertoli, es decir, las regiones de contacto entre las células de Sertoli y las de la línea germinal. Resulta muy curioso el patrón de expresión observado en cortes de testículos de individuos juveniles (21 dpp): en los mismos el ARNm de CCDC14 parece acumularse especialmente en la región en que los espermatocitos primarios interactúan con el final de las protrusiones de las células de Sertoli, formando una especie de anillo dentro del túbulo seminífero. Si bien no disponemos por el momento de una explicación para este curioso patrón de distribución del ARNm, el mismo fue muy evidente, y se observó en todas las repeticiones del experimento y en todos los cortes analizados de individuos de esa edad. Sin embargo, sería muy aventurado de momento buscar una interpretación para la concentración del ARNm de CCDC14 en el límite de las prolongaciones de las células de Sertoli, precisamente en la región que circunvala a la ubicación de los espermatocitos.

### 6.2.2. Identificación de la secuencia codificante completa del gen *CCDC14* y estudio de la proteína predicha

La información recabada a partir de la secuenciación del fragmento del gen *CCDC14* obtenido en los ensayos de DD, así como la provista por la secuenciación de insertos de los clones positivos obtenidos del rastreo de una genoteca de ADNc de espermatocitos paquiténicos, si bien nos permitieron identificar el gen y avanzar en su conocimiento, no nos permitieron conocer su secuencia codificante. El análisis de las secuencias en las bases de datos nos brindó información sobre el gen homólogo en ratón, y teniendo disponible el genoma completo de la rata, pudimos ensamblar *in silico* un ARNm teórico de *CCDC14* de esta última especie y conocer su secuencia codificante completa. Esta estrategia resultó exitosa dado que la secuencia teórica ensamblada pudo ser confirmada mediante secuenciación de fragmentos solapantes de RT-PCR. Fueron efectuados estudios de la secuencia genómica, los cuales nos permitieron determinar que el gen posee 13 exones con sus respectivos intrones, y presenta un UTR 3' notablemente largo (2118 pb).

Desde hace unos años, se ha comenzado a prestar más atención a las regiones no codificantes de los ARNm maduros; mientras las regiones codificantes contienen especificaciones sobre la estructura y función de las proteínas para las cuales codifican, las regiones no traducidas de los extremos 5' y 3' pueden contener secuencias altamente conservadas que actúan en cis, así como información regulatoria relevante para la correcta traducción del producto proteico de los genes (Doran, 2008). A su vez, se sabe que en las células de la línea germinal ocurren niveles inusualmente elevados de regulación postranscripcional (de hecho el testículo es el tejido de los mamíferos con mayores niveles de regulación postranscripcional; ver Introducción). Se han propuesto varios mecanismos responsables de la regulación a este nivel como el secuestro de moléculas de ARNm en complejos de ribonucleoproteína, el bloqueo del sitio de unión con el ribosoma, o la unión de microARNs (e.g. Iguchi et al., 2006). En la actualidad se han identificado un sinnúmero de secuencias en las regiones UTR 3' que participan en esos procesos (Corà et al., 2007), aunque seguramente una gran proporción de los elementos regulatorios específicos de los UTRs de transcriptos de la línea germinal masculina, así como las proteínas que los reconocen, y sus motivos de unión a ARN testículo-específicos, quedan aún por identificar. Podríamos suponer entonces, que la presencia de un UTR 3' largo en el gen CCDC14 indicaría que el mismo está sometido a regulación postranscripcional. Se efectuó una búsqueda utilizando herramientas bioinformáticas disponibles on line; la misma no nos permitió
identificar algún motivo regulatorio particular, lo cual no significa que no los posea, sino que quizás podría contener algún tipo de secuencia que no se encuentre registrada aún en las bases de datos.

El análisis bioinformático de la región codificante del gen CCDC14 indica que el mismo codificaría para una probable proteína de 929 aminoácidos, con un peso molecular de 103 kDa, que poseería una región de unos 315 aminoácidos comprendida aproximadamente entre las posiciones 372 y 641, capaz de adoptar estructura de coiled coil. Los motivos estructurales de tipo coiled coil constan de entre 2 y 7 regiones de  $\alpha$ -hélice (lo más común es que sean 2 ó 3) que giran una alrededor de la otra, formando estructuras rígidas y largas, y por lo general dan lugar a la formación de dímeros (homo o heterodímeros) o multímeros. Estos motivos generalmente poseen un patrón repetido, hpphppp, de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (h) y polares (p), llamada héptada repetitiva (Liu et al, 2006). En la figura 6.1 las posiciones de la héptada repetitiva están marcadas como abcdefg, donde a y d son las posiciones hidrofóbicas, ocupadas frecuentemente por isoleucina, leucina o valina. Plegar una secuencia con este patrón repetitivo en una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice provoca que los residuos hidrofóbicos se presenten como una "banda" que gira lentamente a lo largo de la hélice en sentido antihorario. La forma más favorable para que dos de estas hélices se organicen en el medio acuoso del citoplasma es envolver las zonas hidrófobas entre sí, ubicándose los aminoácidos hidrofílicos hacia el exterior. Debido a esto, el ocultamiento en el interior de las superficies hidrofóbicas proporciona la fuerza termodinámica impulsora para la oligomerización. El ensamblaje en una hélice superenrollada es muy compacto, interaccionando muy íntimamente mediante fuerzas de Van der Waals prácticamente todas las cadenas laterales de los residuos d. Las  $\alpha$ -hélices pueden ser paralelas o anti-paralelas y, por lo explicado anteriormente, suelen adoptar un enrollamiento en sentido antihorario. Aunque no es termodinámicamente tan favorable, se han observado en la naturaleza algunos ejemplos de enrollamiento en sentido horario, y el cual ha sido adoptado también en algunas proteínas sintéticas (Harbury et al., 1998). A pesar de la relativa simplicidad arquitectónica, estos motivos pueden brindar una variedad de propiedades a las proteínas que los contienen, permitiéndoles adaptarse a funciones biológicas muy variadas. Se han identificado en proteínas de unión al ADN, de unión a otras proteínas, en proteínas motoras, estructurales como algunas proteínas del citoesqueleto, proteínas que forman parte de canales iónicos, y en aquellas que participan en sistemas de reconocimiento molecular, entre otras, cuya función se ve influenciada por el motivo coiled coil (Burkhard et al., 2001).



**Figura 6.1. Estructura en héptada de los motivos** *coiled coil.* La estructura repetitiva en héptada, cuando es proyectada sobre una hélice, da lugar a la formación de una "línea de aminoácidos hidrofóbicos" (verde). La misma se enrolla sobre sí misma (1) y se superenrolla (2) para preservar región hidrofóbica en el interior (3). La posición de los residuos hidrofóbicos a y d se muestra en rojo [Tomada de <u>http://www.lifesci.sussex.ac.uk/research/woolfson/html/coils.html.</u>]

En relación a la meiosis, existen numerosas proteínas esqueléticas que contienen motivos coiled coil, como es el caso de las proteínas formadoras del CS (e.g. Meuwissen et al., 1992; Costa et al., 2005; Öllinger et al., 2005; Hamer et al., 2006; Baier et al., 2007a; 2007b; Bolcun-Filas et al., 2007; 2009; Winkel et al., 2009) [Figura 6.2.A], y las proteínas que forman la lámina nuclear, de las cuales existen variantes específicas de testículo y en particular de meiosis (e.g. Alsheimer et al., 1999, 2000, 2011; Strelkov et al., 2003; Prüfert et al., 2005; Schütz et al., 2005a; 2005b) [Figura 6.2.B]. Ambas estructuras presentan una dinámica muy particular, ensamblándose y desensamblándose a lo largo del ciclo celular meiótico; dicha dinámica es necesaria para acompañar y dirigir los distintos eventos que ocurren en el núcleo durante la meiosis. A modo de ejemplo podemos mencionar la formación del bouquet cromosómico durante la meiosis temprana (Scherthan, 2001; Alsheimer, 2009). Los extremos de los cromosomas, telómeros, convergen en una pequeña región de la envoltura nuclear, y como consecuencia se adquiere una disposición espacial que se asemeja a un arreglo o bouquet floral. La formación de este arreglo necesita que las estructuras sobre las que se sustentan los cromosomas, CSs, y aquellas con las que éstos interactúan en la lámina nuclear, posean interacciones proteína-proteína fuertes pero fáciles de ensamblar y desensamblar. Sin duda, los motivos coiled coil proveen dichas características (Burkhard et al., 2001).



**Figura 6.2.** Proteínas meióticas que poseen motivos *coiled coil.* **A.** Representación esquemática de las proteínas del CS de ratón. Los tamaños de las mismas así como las posiciones de las regiones capaces de adoptar estructura de *coiled coil*, de acuerdo a lo determinado mediante programas bioinformáticos, se indican con números sobre las barras [tomado de Fraune *et al.*, 2012]. **B.** Representación esquemática de la organización molecular de las laminas tipo A somáticas y específicas de la línea germinal de los mamíferos. Se indican las regiones escenciales para la formación de dímeros y para la asociación longitudinal y lateral de moléculas: en ambos casos participan dominios *coiled coil* [tomado de Alsheimer *et al.*, 2011]. **C.** Representación esquemática de 3 proteínas con dominio SUN identificadas en ratón: Sun1, Sun2 y Sun3. Se muestra su estructura y posición de dominios, indicando especialmente la presencia de dominios *coiled coil* (CC) y SUN [tomado de Göb *et al.*, 2010].

Resulta interesante destacar que los motivos *coiled coil* de las proteínas anteriormente mencionadas son esenciales para su función, pues son imprescindibles para que ocurra su polimerización (tanto las proteínas del CS como las laminas forman estructuras esqueléticas intrincadas, producto de la interacción entre sus componentes). A modo de ejemplo, se ha demostrado que la deleción del dominio *coiled coil* de la proteína SYCP3 impide que la misma polimerice y forme estructuras filamentosas, claves para el ensamblaje de los CS. Esto resulta relevante pues podría vincularse a ciertos casos de infertilidad, al menos en humano (Fraune *et al.*, 2012).

Por otra parte, en los últimos años distintos autores han develado la existencia de complejos multiproteicos anclados en la envoltura nuclear, que vinculan directamente el nucleoesqueleto con el citoesqueleto. Dichos complejos, denominados complejos LINC, conectan elementos de la lámina nuclear con filamentos de actina, a través de una intrincada red de proteínas estructurales. Los componentes de los complejos LINC pertenecen a dos subfamilias: las proteínas SUN y las proteínas KASH. El genoma de los mamíferos codifica para al menos cinco proteínas SUN, de las cuales las principales, Sun1 y Sun2 (Ostlund et al., 2009; Razafsky & Hodzic, 2009; Lombardi et al., 2011) se expresarían en numerosos tipos celulares, en tanto Sun3, Sun4 y Sun5 serían probablemente testículo-específicas (Göb et al., 2010). Al igual que las proteínas estructurales previamente mencionadas, las proteínas de la familia SUN también poseen dominios de tipo coiled coil [Figura 6.2.C]; además, se caracterizan por poseer un tipo de dominio transmembrana que se ancla en la membrana nuclear interna (Tzur et al., 2006) y que, a través de otras proteínas como la emerina, tiende puentes hasta la lámina nuclear, la cual a su vez en las células meióticas interactúa con componentes de los CS, anclándolos a la envoltura nuclear (Schmitt et al., 2007). Por otra parte, las proteínas SUN se conectan con el dominio KASH de otras proteínas, las nesprinas, que está anclado en la membrana nuclear externa. Las nesprinas protruyen hacia el citoplasma mediante una serie de repetidos de espectrina y finalmente conectan con el citoesqueleto a través de dominios de unión a elementos de éste como filamentos de actina y microtúbulos (Razafsky & Hodzic, 2009; Haque *et* al., 2010) [Figura 6.3].

Hoy por hoy existe mucha información sobre los complejos LINC y las proteínas que los integran, y hay muchas evidencias de que durante la profase meiótica participarían en funciones tales como comunicación entre núcleoesqueleto y citoesqueleto, posicionamiento del núcleo, rigidez celular, dinámica de los cromosomas y anclaje de los mismos, a través de los CS, a la envoltura nuclear durante todo el ciclo de división celular meiótica. Sin embargo, aún no se conoce cuáles podrían ser los componentes citoplasmáticos específicos de la meiosis que interactúan con tal andamiaje proteico.



**Figura 6.3. Estructura y función de los Complejos LINC.** En el espacio perinuclear, la interacción entre proteínas SUN (naranja) y proteínas que contienen dominios KASH (verde) como las nesprinas, conecta físicamente la lámina nuclear con elementos del citoesqueleto, como filamentos de actina y microtúbulos. Estas conecciones permiten la migración de los núcleos y su anclaje en lugares determinados. Las interacciones SUN–KASH también desempeñan roles importantes en la dinámica de los cromosomas y el anclaje de los mismos a la envoltura nuclear durante el ciclo de división celular meiótica [Tomado de Razafsky & Hodzic, 2009].

Una de las características del producto del gen *CCDC14* que pudo ser establecida mediante la utilización de herramientas bioinformáticas es que el mismo no presenta una señal de localización nuclear (NLS) evidente, a diferencia de la mayoría de las proteínas meióticas arriba mencionadas. Si bien las NLSs no tienen una secuencia consenso determinada, están altamente enriquecidas en aminóacidos básicos pudiendo ser continuas o bipartitas (Dingwall & Laskey, 1991; Boulika, 1993). Ninguna de estas estructuras se observa en la secuencia predicha para CCDC14, por lo cual podemos sospechar que la proteína no ingresaría al núcleo por un mecanismo mediado por NLS, dependiente de ATP (Melchior & Gerace, 1995). Sin embargo, podría ingresar al núcleo mediante otro mecanismo, como ocurre con las proteínas asociadas a las ribonucleopartículas heterogéneas (hnRNPs) (Piñol-Romas & Dreyfuss, 1993) o algunas proteínas glicosiladas (Duverger *et al.*, 1993; 1995), o mediante su asociación con otras proteínas que sí posean NLS (La Boissière *et al.*, 1999). Alternativamente, la ausencia de una NLS en la secuencia predicha para CCDCD14 podría indicar que su rol se desarrollaría en el citoplasma, quizás como integrante del citoesqueleto en las células meióticas.

Para nosotros, una proteína específica de línea germinal masculina como CCDC14, con dominio *coiled coil*, un tipo de dominio característico de proteínas estructurales, y que además no posea NLS, resulta un interesante candidato para cumplir algún rol en el estrecho vínculo con los componentes del lado citoplasmático de los complejos LINC durante la meiosis. Esta fue nuestra principal motivación para ahondar en su conocimiento, aunque tenemos muy presente que bien podría tratarse de una proteína citoplasmática (o incluso nuclear, a pesar de carecer de NLS, o al menos de una NLS evidente) con una función totalmente diferente a la propuesta. En cualquier caso, el estudio de la misma nos resultó sumamente interesante pues correspondería al producto de un gen de expresión diferencial de testículo y específico de la meiosis, del que no se dispone de información previa.

# 6.2.3. Obtención de un suero policional anti-CCDC14 y caracterización de la proteína endógena.

El siguiente objetivo de este trabajo era obtener un suero policional anti-CCDC14, que pudiera ser usado en estudios de caracterización de la proteína para poder determinar su localización y su dinámica a lo largo del desarrollo de la línea germinal masculina de la rata. Con este fin, en colaboración con el trabajo de tesina de grado del Lic. Gabriel Lassabe realizado en nuestro laboratorio, parte de la secuencia correspondiente a la región codificante excluyendo la región de *coiled coil* se amplificó por PCR, y el producto se clonó en el vector de expresión pGEX-5x-3 (Amersham/GE) para la obtención de parte de CCDC14 como proteína de fusión con GST. Como resultado se obtuvo una buena cantidad de proteína de fusión, la cual se purificó y empleó en la inyección de un conejo con el objeto de obtener un suero policional anti-CCDC14.

Mediante el seguimiento del protocolo de inyección pre-establecido se obtuvo un suero policional, el cual en ensayos de Western blot reconoció a la proteína de fusión clonada en *E. coli*, con un buen nivel de especificidad. Cuando el suero se utilizó contra lisados proteicos de testículo de rata, permitió detectar una banda de aproximadamente 103 kDa, tanto en lisados de testículos de individuos de 21 dpp (prepúberes que se encuentran en profase meiótica media de la primera onda espermatogénica) como de 40 dpp (adultos jóvenes, que ya han culminado la primera onda), la cual no se observó en los otros tejidos estudiados. El tamaño de la banda obtenida en testículo se corresponde con el estimado in silico para el producto del gen CCDC14. La observación de la mencionada banda pone en evidencia que el ARNm del gen, cuya existencia ya había sido comprobada, es traducido en una proteína, la cual presenta el tamaño esperado según los análisis bioinformáticas previamente realizados. Además, su observación en testículo y no en otros tejidos como cerebro e hígado es también coherente con los resultados previos (RT-PCR, Northern blot e Hibridación in situ). La observación de la banda correspondiente a CCDC14 en testículo de rata adulta es también coincide con los otros resultados obtenidos previamente. Por otro lado, la presencia de la proteína en testículos de individuos de 21 dpp, y a niveles similares a los del testículo adulto, es está de acuerdo con lo observado en los ensayos de hibridación in situ, y resulta lógico pues se trata de la etapa del desarrollo del testículo en que el mismo se encuentra enriquecido en meiocitos paquiténicos, que es el tipo celular donde se detectó en primer lugar la expresión diferencial del transcripto (DD). Además, los ensayos de RT-PCR e Hibridación in situ sugieren que el ARNm podría expresarse también en otros tipos celulares, principalmente las células de Sertoli, presentes tanto a los 21 dpp como a los 40 dpp, pero se expresaría en niveles bastante menores en espermátidas y espermatozoides, que son los tipos celulares que no se encuentran presentes aún a los 21 dpp.

Por otra parte, los datos obtenidos parecen sugerir la existencia de una coincidencia temporal entre la expresión del ARNm y la traducción del mismo lo que, en principio, no nos permite suponer que se trate de un transcripto de largo almacenamiento como lo son, por ejemplo, los de las protaminas (de ser así, la proteína podría no detectarse en los espermatocitos sino, a modo de ejemplo, en etapas avanzadas de la espermiogénesis).

Sin embargo, si bien en testículo el suero reconoció una banda única, se pusieron en evidencia bandas de menor tamaño (menores a 60 kDa) en cerebro e hígado. Con el fin de obtener un suero más limpio y quedarnos únicamente con los anticuerpos anti-CCDC14, se realizó una purificación del suero por diversos abordajes. Aunque estos métodos de purificación permitieron disminuir la señal de GST en el lisado proteico del cultivo inducido de E. coli que poseía el vector vacío, los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot contra lisados de tejidos de rata fueron los mismos con el anticuerpo purificado por columna que con el suero sin purificar, no permitiendo separar la señal que reconoce la banda de 103 kDa en testículo de aquellas que reconocen las bandas de menor tamaño tanto en hígado como en cerebro. Este resultado nos lleva a preguntarnos si dichas bandas en los tejidos mencionados corresponderán a una reacción cruzada del suero que no hemos logrado eliminar, o a isoformas de CCDC14 de menor tamaño presentes en el cerebro y en el hígado. Esto último parece muy poco probable dado que, en primer lugar, gran parte de la extensión del transcripto fue cubierta mediante iniciadores específicos para RT-PCR, y por lo tanto, las variantes de menor tamaño expresadas en dichos tejidos deberían carecer de al menos uno de los iniciadores de cada juego utilizado. Por otra parte, la sonda empleada en los experimentos de Northern blot, correspondiente a 711 b de la región codificante del gen, tampoco permitió identificar una banda en el hígado. Más aún, la región expresada como proteína de fusión y empleada en la producción de anticuerpos (831 pb que no coinciden con la sonda de Northern blot, sino que están ubicados más hacia el extremo 5') fue exactamente la misma que se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación in situ [Figura 6.4.]. En consecuencia, de existir una isoforma proteica de menor tamaño en el hígado, el ARNm correspondiente debería haberse detectado al menos en los experimentos de hibridación in situ en dicho tejido.

De esta manera, si bien el suero policional obtenido nos podría permitir la realización de experimentos de inmunohistoquímica en testículo, incluso sin necesidad de purificar el anticuerpo, no nos permite la utilización de otros tejidos como control, dado que no hemos logrado eliminar la probable reacción cruzada.



**Figura 6.4. Esquema representativo de las sonda empleadas en el análisis del ARNm de CCDC14.** Empleando barras de distintos colores se indica la posición y tamaño relativo de las sondas utilizadas para los ensayos de rastreo de genoteca de espermatocitos paquiténicos, northern blot e hibridación *in situ.* El fragmento clonado en un vector pGEX-5X-3 y expresado como proteína de fusión con GST, coincide con la sonda usada en la hibridación *in situ.* 

Resumiendo, hemos demostrado la existencia de un producto proteico de 103 kDa para el gen CCDC14, el cual se expresa diferencialmente en el testículo. La proteína identificada poseería, de acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados, una región capaz de adoptar estructura de coiled coil, lo cual sugiere que podría desempeñar una función estructural. Los datos obtenidos hasta ahora no nos permiten inferir información acerca de esa posible función. El próximo paso será intentar la obtención de un suero anti-CCDC14 de mejor calidad, ya sea inoculando un nuevo conejo con la proteína de fusión en forma pura de la que disponemos, o mediante el empleo de un péptido sintético, cuya fabricación ya hemos encargado a una empresa en el exterior. El suero obtenido, en caso de resultar de mejor calidad o, en su defecto, aquél de que ya disponemos, será utilizado como herramienta para continuar la caracterización de la proteína. En tal sentido, planeamos determinar su localización subcelular mediante estudios de inmunohistoquímica. Dependiendo de la localización, nos proponemos colocalizar a CCDC14 con proteínas del esqueleto meiótico portadoras de coiled coil, contra las que disponemos de anticuerpos, con el fin de contribuir a la elucidación de la función de esta proteína.

### 7. CONCLUSIONES

- Se analizaron los productos de clonado de 11 bandas de ADNc obtenidas en experimentos previos de DD como diferenciales de la profase meiótica de la rata. La combinación de abordajes metodológicos elegida, en particular el uso de la electroforesis en geles de agarosa con bisbenzimida/PEG y del RT-PCR con bajo número de ciclos como método de confirmación de expresión diferencial resultó muy acertada, permitiendo la realización de gran cantidad de trabajo en un tiempo razonable y a bajo costo, en comparación con otros posibles abordajes.

- El análisis de bandas previamente obtenidas mediante DD nos permitió identificar 7 genes nuevos o isoformas no descritas para genes de expresión específica de la meiosis de la rata, y confirmar el patrón de expresión diferencial de meiosis para todos ellos. Se determinó además, que todos estos genes son de expresión diferencial del testículo adulto en relación a otros tejidos y al testículo de individuos neonatos, que aún no han iniciado la meiosis.

- Para una de las secuencias identificadas, *CCDC14*, se confirmó y amplió el estudio del patrón de expresión: se trata de un gen expresado diferencialmente en el testículo de la rata en comparación con otros tejidos, y dentro del mismo se expresa diferencialmente en células meióticas respecto a células posmeióticas (los datos sugieren que también se expresaría a ciertos niveles en células somáticas testiculares). Se determinó la secuencia codificante completa del gen, se estableció el número de exones e intrones, y la secuencia de su producto proteico. *CCDC14* codifica para una proteína con motivo de *coiled coil*, y sin NLS evidente. En colaboración con un trabajo de tesis de grado realizado en nuestro laboratorio, se clonó y expresó parte de la secuencia codificante como proteína de fusión con GST, y se produjo un suero policlonal contra la proteína predicha CCDC14. Dicho suero nos ha permitido confirmar la existencia de una proteína CCDC14, del tamaño predicho, expresada diferencialmente en el testículo.

- Otra de las secuencias identificadas, *Mtch2*, está siendo objeto de otra tesis de maestría en el laboratorio, y el patrón de expresión ha podido ser confirmado tanto a nivel de ARNm como de producto proteico.

- Como producto de este trabajo, disponemos de otras 5 secuencias identificadas y confirmadas como diferenciales de la meiosis, cuyo análisis preliminar ya ha sido realizado y que podrán ser objeto de futuros estudios en el laboratorio.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. 2002. Biología molecular de la célula. Ediciones Omega: Barcelona, 3ª edición, **pp.**1387.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. & Benavente, R. 1999. Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol. Biol. Cell*, **10**:1235-1245.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Schnolzer, M., Heid, H. & Benavente, R. 2000. Meiotic lamin C2: the unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:13120-13125.
- Alsheimer, M., Jahn, D., Schramm, S. & Benavente, R. 2011. Nuclear lamins in mammalian spermatogenesis. En: Epigenetics and human reproduction. Ed: Rousseaux, S. & Khochbin, S. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p.279-288.
- Baier, A., Alsheimer, M. & Benavente, R. 2007a. Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**:595–602.
- Baier, A., Alsheimer, M., Volff, J. N. & Benavente, R. 2007b. Synaptonemal complex protein SYCP3 of the rat: evolutionarily conserved domains and the assembly of higher order structures. Sex. Dev., 1:161-168.
- Baker, S. M., Bronner, C. E., Zhang, L., Plug, A. W., Robatzek, M., Warren, G.,
  Elliott, E. A., Yu, J., Ashley, Y., Arnheim, N., Flavell, R. A. & Liskay, R. M.
  1995. Male mice defective in the mismatch repair gene *PMS2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell*, **82**:309-319.
- Balhorn, R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**:227.
- Barrionuevo, F. & Scherer, G. 2010. SOX E genes: *SOX9* and *SOX8* in mammalian testis development. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **42:**433-436.

- Bella, J., Hindle, K. L., McEwan, P. A. & Lovell, S. C. 2008. The leucine-rich repeat structure. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**:2307-2333.
- Bellvé, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F, O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M. & Dym,
  M. 1977. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell. Biol.*, **74**:68-85.
- Berne, R. M. & Matthew, N. L. 1998. Fisiología. Ediciones Harcourt: Madrid, 3<sup>a</sup> Edición, pp.680.
- Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij & D. G., Cooke, H. J. 2007. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair and homologous recombination. *J. Cell. Biol*, **176:**741-747.
- Bolcun-Filas, E., Hall, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., de Massy, B., Benavente, R. & Cooke, H. J. 2009. Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. PLoS Genet., 5:e1000393.
- Boulikas, T. 1993. Nuclear localization signals (NLS). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **3**:193-227.
- Braun, R. E., Peschon, J. J., Behringer, R. R., Brinster R. L. & Palmiter, R. D. 1989. Protamine 3'-untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes Dev.*, **3**:793-802.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S. V. 2001. Coiled coils: A highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.*, **11:**82-88.
- Capoano, C. A. 2008. Caracterización de Srsp1, primera proteína con tramo de serinas específica del testículo de la rata. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, UdelaR, **pp.**80.
- Capoano, C. A., Wettstein, R., Kun, A. & Geisinger, A. 2010. Spats 1 (Srsp1) is differentially expressed during testis development of the rat. *Gene Expr. Patterns*, **10**:1-8.

- Cha, S. R. & Thilly, W. G. 1995. Specificity, efficiency and fidelity of PCR. En: PCR Primer, a Laboratory Manual. Ed: Dieffenbach, C. W. & Dveksler, G. S. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, p.37-51.
- Collins, J. F., Franck, C. A., Kowdley, K. V. & Ghishan F. K. 2005. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 288:G964-971.
- Cohen, P. E., Pollack, S. E &, Pollard, J. W. 2006. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr. Revs.*, **27**:398-426.
- Corà, D., Di Cunto, F., Caselle, M. & Provero P. 2007. Identification of candidate regulatory sequences in mammalian 3' UTRs by statistical analysis of oligonucleotide distributions. *BMC Bioinformatics*, 8:174.
- Cossio, G., Sanchez, J. C., Golaz, O., Wettstein, R. & Hochstrasser, D. F. 1995. Spermatocytes and round spematids of rat testis: protein patterns. *Electrophoresis*, **16**:1225-1230.
- Cossio, G., Sanchez, J.C., Wettstein, R. & Hochstrasser, D. F. 1997. Spermatocytes and round spermatids of rat testis: the difference between *in vivo* and *in vitro* protein patterns. *Electrophoresis*, **18**:548-552.
- Costa, Y & Cooke, H. J. 2007. Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Res.*, **15**:579-589.
- Costa, Y., Speed, R., Öllinger, R., Alsheimer, M., Semple, C. A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Hoog, C., Benavente, R. & Cooke, H. J. 2005. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. J. Cell Sci., **118**:2755-2762.
- Cromie, G. A. & Smith, G. R. 2007. Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends Cell Biol.*, **17**:448-455.
- Culty, M. 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Research*, **87**:1–26.

- de Boer, E. & Heyting, C. 2006. The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma*, **115**:220-234
- De Rooij, D. G. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, **121**:347-354.
- Dingwall, C. & Laskey, R. A. 1991. Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, **16**:478-481.
- Donovan, P. J., De Miguel, M. P., Hirano, M. P., Parsons, M. S., & Lincoln, A. J. 2001. Germ cell biology - from generation to generation. *Int. J. Dev. Biol.*, 45:523-531.
- Doran, G. 2008. The short and the long of UTRs. *J. RNAi Gene Silencing*, **4:**264-265.
- Duverger, E., Carpentier, V., Roche, A. C. & Monsigny, M. 1993. Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp. Cell. Res.*, **207**:197-201.
- Duverger, E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche, A. C. & Monsigny, M. 1995. Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. J. Cell. Sci., 108:1325-1332.
- Eddy, E. M. 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev. Reprod.*, **4:**23-30.
- Elena, S. F. & Lenski, R. E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet*, **4**:457-469.
- Elliott, D. J. 2003. Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development. *Cytogenet. Genome Res.*, **103:**210-216.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E. & Heyting, C. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. J. Cell. Biol. 160:657-670.

- Elliott, D. J. & Grellscheid, S. N. 2006. Alternative RNA splicing regulation in the testis. *Reproduction*, **132**:811-819.
- Ellis, P. J., Furlong, R. A., Conner, S. J., Kirkman-Brown, J., Afnan, M., Barrat, C., Griffin, D. K. & Affara, N. A. 2007. Coordinated transcriptional regulation patterns associated with infertility phenotypes in men. *J. Med. Genet.*, 44:498-508.
- Erickson, R. P. 1990. Post meiotic gene expression. Trends Genet., 6:264-268.
- Feig, C., Kirchhoff, C., Ivell, R., Naether, O., Schulze, W. & Spiess, A. N. 2007. A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Hum. Mol. Reprod.*, **13**:33-43.
- Figueroa, J. & Burzio, L. O. 1998. Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell Tissue Res.*, **291:**575-579.
- Firooznia, A., Revenkova, E. & Jessberger, R. 2005. Minireview from the XXVII North American Testis Workshop: The function of SMC and other cohesin proteins in meiosis. J. Androl., 26:1-10.
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M. & Benavente, R. 2012. The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp. Cell Res.*, **318**:1340-1346.
- Fujii, T., Tamura, K., Masai, K., Tanaka, H., Nishimune, Y. & Nojima, H. 2002. Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis. *EMBO Rep.*, **3**:367–372.
- Geisinger, A. 2003. Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis de la rata. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, UdelaR, **pp.**148.
- Geisinger, A. 2008. Spermatogenesis in mammals: a very peculiar cell differenciation process. En: Cell Differentiation Research Developments. Ed: Ivanova, L. B. Nova Publishers: New York, p.97-123.

- Geisinger, A. 2010. José R. Sotelo y el complejo sinaptonémico. En: Aportes de Investigadores Uruguayos al Avance de la Ciencia Nacional e Internacional (Compilación: Silva y Verde, P. & Pellegrino, V.), Montevideo: ANEP. Capítulo 15, p.1-29.
- Geisinger, A., Wettstein, R. & Benavente, R. 1996. Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method. *Int. J. Dev. Biol.*, **40**:385-388.
- Geisinger, A., Rodríguez-Casuriaga, R., Romero, V. & Wettstein, R. 1997. A simple method for screening cDNAs arising from the cloning of RNA differential display bands. *Technical Tips Online*, **2**:109-111.
- Geisinger, A., Dos Santos, A., Benavente, R. & Wettstein, R. 2002. Identification and characterization of SRSP1, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch-containing protein. Cytogenet. Genome Res., 98:249-254.
- Geisinger, A., Alsheimer, M., Wettstein, R. & Benavente, R. 2005. The mammalian gene pecanex 1 is differentially expressed during spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1728:**34-43.
- Geisinger, A. & Rodriguez Casuriaga, R. 2010. Flow cytometry for gene expression studies in Mammalian spermatogenesis. *Cytogenet. Genome. Res.*, **128:**46-56.
- Gether, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.*, **21**:90-113.
- Gilbert, S. F. 2006. Developmental Biology. Sinauer Associates: Sunderland (MA), 8<sup>th</sup> Edition, **pp.**817.
- Göb, E., Schmitt, J., Benavente, R. & Alsheimer, M. 2010. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS ONE*, **5**:e12072. doi:10.1371/journal.pone.0012072
- Goldberg, E. 1996. Transcriptional regulatory strategies in male germ cells. *J. Androl.*, **17**:628-632.

- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. & Khochbin S. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.*, **271**:3459-3469.
- Grinberg, M., Schwarz, M., Zaltsman, Y., Eini, T., Niv, H., Pietrokovski, S. & Gross,
  A. 2005. Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 25:4579-4590.
- Griswold, D. Hogarth, C. A., Bowles, J. & Koopman, P. 2012. Initiating meiosis: the case for retinoic acid. *Biology of Reproduction*, **86**:1-7.
- Gross, A. 2005. Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**:113-119.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. 2001. Tratado de fisiología médica. McGraw-Hill: México D.F., 10<sup>a</sup> edición, **pp.**1280.
- Hadjiolov, A. A., Georgiev, O. I., Nosikov, V. V. & Yavachev, L. P. 1984. Primary and secondary structure of rat 28 S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, 12:3677-3693.
- Hall, G. D., Smith, B., Weeks, R. J., Selby, P. J., Southgate, J. & Chester, J. D., 2006. Novel urothelium specific gene expression identified by differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Urol.*, **175**:337-342.
- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R. & Hoog, C. 2006. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. J. Cell Sci., **119**:4025–4032.
- Handel, M. A. & Schimenti, J. C. 2010. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.*, **11**:124-36
- Harbury, P. A. 1998. Springs and zippers: coiled coils in SNARE-mediated membrane fusion. *Structure*, **6**:1487-1491.
- Harper, S. & Speicher, D. W. 2008. Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **52:**6.6.1-6.6.26.

- Haque, F., Mazzeo, D., Patel, J. T., Smallwood, D. T., Ellis, J. A., Shanahan, C. M. & Shackleton, S. 2010. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J. Biol. Chem.*, **285**:3487-3498.
- Hecht, N. B. 1998. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, **20:**555-561.
- Hess, R. A. 1999. Spermatogenesis, overview. En: Encyclopedia of reproduction.
  Ed: Knobil, E. & Neill, D. J. Academic Press University of Illinois: Burlington (MA), Vol. 4, p.534-545.
- Heyting, C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **8**:389-396.
- Huang, X., Li, J., Lu, L., Xu, M., Xiao, J., Yin, L., Zhu, H., Zhou, Z. & Sha, J. 2005. Novel development-related alternative splices in human testis identified by cDNA microarrays. J. Androl., 26:189-196.
- Iguchi, N., Tobias, J. W. & Hecth, N. B. 2006. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**:7712-7717.
- Inukai, K., Anai, M., Van Breda, E., Hosaka, T., Katagiri, H., Funaki, M., Fukushima, Y., Ogihara, T., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. & Asano, T. 1996. A novel 55kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85alpha gene. J. Biol. Chem., 271:5317-5320.
- Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. & Vormer, T. L.
  2012. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1822**:1838-1850.
- Kao, R. H., Francia, G., Poulsom R., Hanby, A. M. & Har, I. R. 2003. Application of differential display, with in situ hybridization verification, to microscopic samples of breast cancer tissue. *Int. J. Exp. Pathol.*, 84:207–212.

- Kassir, Y., Adir, N., Boger-Nadjar, E., Raviv, N. G., Rubin-Bejerano, I., Sagee, S. & Shenhar G. 2003. Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int. Rev. Cytol.*, **224**:111-171.
- Keeney, S., Baudat, F., Angeles, M., Zhou, Z. H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Manova, K. & Jasin, M. 1999. A mouse homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* meiotic recombination DNA transesterase Spo11p. *Genomics*, **61:**170-182.
- Kimble, J. 2011. Molecular regulation of the mitosis/meiosis decision in multicellular organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **3**:a002683.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Davidson, I. & Sassone-Corsi, P. 2004. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, **128:**5-12.
- Kleene, K. C. 2001. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech. Dev.*, **106:**3-23.
- Kleene, K. C. 2003. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet. Genome Res.*, **103**:217-224.
- Kleene, K. C. 2005. Sexual selection, genetic conflict, selfish genes, and the atypical patterns of gene expression in spermatogenic cells. *Developmental Biology*, **277**:16–26.
- Kotaja, N., Kimmins, S., Brancorsini, S., Hentsch, D., Vonesch, J. L., Davidson, I., Parvinen, M. & Sassone-Corsi, P. 2004. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat. Methods*, **1**:249-254.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S. N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W. & Sassone-Corsi, P. 2006. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**:2647-2652.
- Kotaja, N. & Sassone-Corsi, P. 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8:**85-90.

- La Boissière, S., Hughes, T. & O'Hare, P. 1999. HCF-dependent nuclear import of VP16. *EMBO J.*, **18**:480-489.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Lassabe, G. 2011. Secuenciación del gen expresado diferencialmente en la profase meiótica masculina de la rata *CCDC14*, y producción de una proteína CCDC14 recombinante. Tesina de Graduación de Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, **pp.**62
- Leberer, E., Dignard, D., Thomas, D. Y. & Leeuw, T. 2000. A conserved Gbeta binding (GBB) sequence motif in Ste20p/PAK family protein kinases. *Biol. Chem.*, **381**:427–431.
- Liang, P. & Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**:967-971.
- Liang, P., Averboukh, L. & Pardee, A. B. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinement and optimization. *Nucleic Acids Res.*, **21**:3269-3275.
- Lichten, M. & de Massy, B. 2011. The impressionistic landscape of meiotic recombination. *Cell.*, **147:**267-270.
- Liu, J. G., Yuan, L., Brundell, E., Bjorkroth, B., Daneholt, B. & Hoog, C. 1996. Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the Ntermini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell Res.*, **226**:11-19.
- Liu, J., Deng, Y., Zheng, Q., Cheng, C. S., Kallenbach, N. R., Lu, M. 2006. A parallel coiled-coil tetramer with offset helices. *Biochemistry*. 45:15224-15231.

- Lombardi, M. L., Jaalouk, D. E., Shanahan, C. M., Burke, B., Roux, K. J. & Lammerding, J. 2011. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. J. Biol. Chem., 286:26743-26753.
- Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J. 1991. Predicting Coled Coils from Protein Sequences. *Science*, 252:1162-1164.
- Malkov, M., Fisher, Y & Don, J. 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, **59:**84-92.
- Maratou, K., Forster, T., Costa, Y., Taggart, M., Speed, R. M., Ireland, J., Teague,
  P., Roy, D. & Cooke, H. J. 2004. Expression profiling of the developing testis in wild-type and *Dazl* knockout mice. *Molec. Reprod. Dev.*, 67:26-54.
- Matsumoto, K. & Wolffe, A. P. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.*, **8:**318-323.
- Meistrich, M. L. 1977. Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell. Biol.*, **15**:15-54.
- Melchior, F. & Gerace, L. 1995. Mechanisms of nuclear protein import. *Curr. Opin Cell Biol.*, **7**:310-318.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J. G., Westphal, H., Saarma, M. & Sariola H. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science, 287:1489-1493.
- Meroni, G. & Diez-Roux, G. 2005. TRIM/RBCC, a novel class of "single protein RING finger" E3 ubiquitin ligases. *BioEssays*, 27:1147-1157.
- Meuwissen, R. L., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J., Riesewijk, A., Van Iersel, M. & Heyting, C. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.*, **11**:5091-5100.

- Meuwissen, R. L., Meerts, I., Hoovers, J. M., Leschot, N. J. & Heyting, C. 1997. Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics*, **39**:377-384.
- Moses, M. J. 1968. Synaptonemal complex. Annu. Rev. Genet., 2:363-412.
- Nagalakshmi, U., Waern, K. & Snyder, M. 2010. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, Chapter 4:Unit 4.11.1-4.11.13.
- Nagamori, I., Cruickshanck, A. & Sassone-Corsi, P. 2011. The Chromatoid Body: A specialized RNA granule of male germ vells. En: Epigenetics and human reproduction. Ed: Rousseaux, S. & Khochbin, S. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, p.311-328.
- Oliva, R. & Dixon, G. H. 1991. Vertebrate protamine genes and the histone-toprotamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **40**:25-94.
- Öllinger, R., Alsheimer, M. & Benavente, R. 2005. Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell*, **16**:212-217.
- Orr, H. A. 2005. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat. Rev. Genet.*, **6**:119-127.
- Ostlund, C., Folker, E. S., Choi, J. C., Gomes, E. R., Gundersen, G. G. & Worman,
  H. J. 2009. Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *J. Cell Sci.*, **122**:4099-108.
- Page, S. L. & Hawley, R. S. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**:525-558.
- Peschon, J. J., Behringer, R. R, Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. 1987. Spermatidspecific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 84:5316-5319.

- Phadnis, N., Hyppa, R. W. & Smith, G.R. 2011. New and old ways to control meiotic recombination. *Trends Genet.*, **27:**411-21.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev.*, **3**:639-649.
- Piñol-Roma, S. & Dreyfuss, G. 1993. hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol.*, **3**:151-155.
- Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martínez-A, C., Rufas, J. S. & Barbero,
  J. L. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* 3:761-766.
- Prüfert, K., Alsheimer, M., Benavente, R. & Krohne, G. 2005. The myristoylation site of meiotic lamin C2 promotes local nuclear membrane growth and the formation of intranuclear membranes in somatic cultured cells. *Eur. J Cell Biol*, 84:637-646.
- Razafsky, D. & Hodzic, D. 2009. Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections. *J. Cell Biol.*, **186**:461-472.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H. & Jessberger, R. 2004. Cohesin SMC1β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biol.* 6:555-562.
- Rodríguez Casuriaga, R. & Wettstein, R. 2004. Quantitative study on guinea pig spermatogenesis shows a relative high percentage of early meiotic prophase stages. *Anat. Rec.*, **278:**493-504.
- Rodríguez Casuriaga, R., Geisinger, A., Lopez-Carro, B., Porro, V., Wettstein, R. & Folle, G. A. 2009. Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol. Proced. Online*, **11**:184-195.
- Rodríguez Casuriaga, R., Geisinger, A., Santiñaque, F. F., Lopez-Carro, B. & Folle, G.
  A. 2011. High-purity flow sorting of early meiocytes based on DNA analysis of guinea pig spermatogenic cells. *Cytometry A*, **79**:625-634.

- Roeder, G. S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango? *Genes Dev.*, **11:**2600-2621.
- Rossi, P., Dolcia, S., Settea, C., Capolunghia, F., Pellegrinia, M., Loiarroa, M., Di Agostinoa, S., Paronettoa, M. P., Grimaldia, P., Mericob, D., Marteganib, E. & Geremia, R. 2004. Analysis of the gene expression profile of mouse male meiotic germ cells. *Gene Expr. Patterns*, **4**:267-281.
- Russell, L. D. & Steinberger, A. 1989. Sertoli cells in culture: views from the perspectives of an *in vivoist* and an *in vitroist*. *Biol. Reprod.*, **41**:571-577.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2º edition. Cold Spring Harbor: New York, vols 1, 2 y 3.
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y. & Ogawa T. 2011. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature, **471**:504-507.
- Schlecht, U., Demougin, P., Koch, R., Hermida, L., Wiederkehr, C., Descombes, P., Jégou, B.& Primig, M. 2004. Expression profiling of mammalian male meiosis and gametogenesis identifies novel candidate genes for roles in the regulation of fertility. *Mol. Biol. Cell.*, **15**:1031-1043.
- Schmitt, J., Benavente, R., Hodzic, D., Höög, C., Stewart, C. L. & Alsheimer, M. 2007. Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104:**7426-7431.
- Schütz, W., Alsheimer, M., Öllinger R, Benavente R. 2005a. Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp. Cell. Res.*, **307**:285-291.
- Schütz, W., Benavente, R. & Alsheimer, M. 2005b. Dynamic properties of germ line specific lamin B3: the role of the shortened rod domain. *Eur. J. Cell Biol.*, 84:649-662.
- Sekido, R. 2010. SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **42:**417-420.

- Shaha, C., Tripathi, R. & Mishra, D. P. 2010. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **365**:1501–1515.
- Shima, J. E., McLean, D. J., McCarrey, J. R. & Griswold, M. D. 2004. The murine testicular transcriptome: Characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, **71**:319-330.
- Shimono, Y., Murakami, H., Hasegawa, Y. & Takahashi, M. 2000. RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of *polycomb* that has dual transcriptional functions. J. Biol. Chem., **275**:39411-39409.
- Show, M. D., Anway, M. D., Folmer J. S. & Zirkin, B. R. 2003. Reduced intratesticular testosterone concentration alters the polymerization state of the sertoli cell intermediate filament cytoskeleton by degradation of vimentin. *Endocrinolog*, y 144:5530–5536.
- Siu, M. M. Y. & Cheng, C. Y. 2004. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *BioEssays*, **26**:978-992.
- Smith, A. & R. Benavente. 1992. Meiosis-specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachytene spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 89:6938-6942.
- Smith, S. M. & Murray, D. W. 2012. An overview of microRNA methods: expression profiling and target identification. *Methods Mol. Biol.*, **823:**119-138.
- Solomon, E. P., Berg, R. L., Martin, D. W. & Villee, C. 1996. Biology. Saunders College Publishing: Philadelphia, 4<sup>th</sup> Edition, **pp.**1228.
- Sommerville, J. & Ladomery, M. 1996. Masking of mRNA by Y-Box proteins. *The FASEB Journal*, **10**:434-443.
- Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T. C., Tenen, D. G. & Danna, K. J. 1995. Overcoming limitations of mRNA differential display technique. *Nucleic Acid Res.*, 23:4738-4739.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. & Aebi, U. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays*, 25:243-251.

Tamarin, R. H. 1996. Principios de genética. Editorial Reverté: Barcelona, **pp.**607.

- Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. 2012. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb. Haemost.*, **107:**605-610.
- Tzur, Y. B., Wilson, K. L. & Gruenbaum, Y. 2006. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**:782-788.
- Walker, H. & Cheng, J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, **130**:15-28.
- Walt, H. & Armbruster B. L. 1984. Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.*, **236**:487-490.
- Wang, H. Y., Wang, I. F., Bose, J. & Shen, C. K. J. 2004. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*, 83:130-139.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, **10**:57-63.
- Watanabe, Y. & Nurse, P. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*, **400**:461-464.
- Wawer, C., Rüggeberg, H., Meyer, G. & Muyzer, G. 1995. A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res.*, 23:4928-4929.
- Wettstein, R. & Sotelo, J. R. 1967. Electron microscope serial reconstruction of spermatocyte nuclei at pachytene. *J. Microscopie*, **6**:557-576.
- Wettstein, R. & Sotelo, J. R. 1971. The molecular architecture of synaptonemal complexes. En: Advances in Cell and Molecular Biology. Ed: DuPraw, E. J. New York: Academic Press, 1:109-152.

- Winkel, K., Alsheimer, M., Öllinger, R. & Benavente, R. 2009. Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma*, **118**:259-267.
- Wistuba, J., Schrod, A., Greve, B., Hodges, J. K., Aslam, H., Weinbauer, G. F. & Luetjens, C. M. 2003. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biol. Reprod.*, **69**:582-591.
- Wrobel, G. & Priming, M. 2005. Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction. *Reproduction*, **129**:1-17.
- Xia, Ch., Ma, W., Statford, L. J., Marcus, S., Xiong, W. Ch. & Liu, M. 2001. Regulation of the p-21 activated kinase (PAK) by a human gb-like WD-repeat protein, hPIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:6174-6179.
- Yang, F. & Wang, P. J. 2009. The mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn.*, **5**:69-80.
- Yanowitz, J. 2010. Meiosis: making a break for it. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **22:**744-751.
- Zaltsman, Y., Shachnai, L., Yivgi-Ohana, N., Schwarz, M., Maryanovich, M., Houtkooper, R. H., Vaz, F. M., De Leonardis, F., Fiermonte, G., Palmieri, F., Gillissen, B., Daniel, P. T., Jimenez, E., Walsh, S., Koehler, C. M., Roy, S. S., Walter, L., Hajnóczky, G. & Gross, A. 2010. MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat. Cell. Biol.*, **12**:553-562.
- Zhang, H., Zhang, H., Zhang, Y., Ng, S. S., Ren, F., Wang, Y., Duan, Y., Chen, L., Zhai, Y., Guo, Q. & Chang Z. 2010. Dishevelled-DEP domain interacting protein (DDIP) inhibits Wnt signaling by promoting TCF4 degradation and disrupting the TCF4/beta-catenin complex. *Cell Signal.*, **22**:1753-1760.
- Zickler, D. 2006. From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma*, **115**:158-174.

## ANEXO A: SECUENCIAS

#### A.1. SECUENCIAS DE BANDAS DEL DD

Se muestran las secuencias de las 7 bandas del DD diferenciales de la profase meiótica, clonadas en el vector pGEM-T, cuyo análisis se inició en la presente tesis. En todos los casos se muestra la secuencia en el sentido 5' $\rightarrow$ 3', en negrita los iniciadores con los que se amplificó la banda en el ensayo de DD, y subrayados los iniciadores con los que se realizó la confirmación del patrón de expresión y el análisis del mismo en distintos tejidos mediante RT-PCR semicuantitativo.

### Banda I, clon 2 - 274 pb

AGCCAGCGAAGAGACAGAGAGAGCCGGTGACCATGCGGGCTTGCTCCAAAGTCTGTGTGGCCCTGG TGAAAGAGAAAGAAAATGGAGGCCCAAGTGTTCCAGAGGATCATATTGCATTCCTCCAAACAGAAACT CAAGACACAATGAACCACGAAATAAGCATAAGACAACAGCTGG<u>GATGTTTTGCTCTAACCCGC</u>CCGA GTATCTGATTCTTTTATAAACATTTTCTGGTGGTGGCCGTGCTTTGCAGGTGACCTCAAC**GCAAAAAA** AAAAAA

Banda I, clon 5 – 277 pb

## Banda II, clon 1 -327 pb

# Banda II, clon 4 – 327 pb

## Banda III, clon 15 - 426 pb

## Banda VIII, clon 3 – 411 pb

**CGTGGCAATA**TGAATGAAGCTGTTATAAATATTATTTATAGATTAATATCTGCTAGACTTCTTGCTTTT TGATGATTTTCGATATTTACCCCCAAAAGT<u>GGGATTGCCTAGATGATTTG</u>TTAATTCTGTGTTTAACTTTT GGAAATGACTTGATACATTTCATATTAAATTTAGTAGGCCAATTATATAATGAGTGTTTTTGATATCTAA GAGCCATTTAAACGATACTTTAAAATCATGTTTTATTGGAATTCAGGACTTTATGTTTTAGATTCCACTG AATAATGTTGTGGATT<u>CCTAAGCTGCAGAAGGAATT</u>TGTTGTTAACATTAATTCAGATTAGAGAGCACT GTGTGATAGTCTGTGAACTTCAGTGAATTTTCCCCTCTTCTCAGGAACAGTAC**TATTGCCACG** 

# Banda X, clon 3 – 436 pb

# A.2. SECUENCIAS DE CLONES POSITIVOS DEL RASTREO DE GENOTECA DE ADNC DE ESPERMATOCITOS PAQUITÉNICOS

Se muestran las secuencias de los clones detectados como positivos para la sonda del extremo 3' de *CCDC14*, en el rastreo de una genoteca de ADNc de espermatocitos paquiténicos. Los fragmentos se encontraban clonados en el vector pBluescript SK+. En todos los casos se muestra la secuencia en el sentido 5' $\rightarrow$ 3' y subrayada la región de complementariedad con la sonda.

### Clon A – 882 pb

#### *Clon B* – 1625 pb

# A.3. SECUENCIAS DE LA REGIÓN CODIFICANTE COMPLETA DE CCDC14

Se muestran las secuencias de los 4 fragmentos solapantes amplificados para obtener la secuencia codificante completa del gen *CCDC14*. En todos los casos se muestra la secuencia en el sentido 5' $\rightarrow$ 3', y resaltados en colores los iniciadores empleados: en amarillo CCDC14 Fw1 y Rv1, en verde CCDC14 Fw2 y Rv2, en celeste CCDC14 Fw3 y Rv3, en rosado CCDC14 Fw4 y Rv4b. En el fragmento 1 se señala la posición del codón de inicio, y en el fragmento 4 la posición de codón de finalización, ambos en negrita y subrayados.

## Fragmento 1 – 783 pb

### Fragmento 2 – 856 pb

AATATACCAAGCCCTCTGTG AGCATGTCAGACCCTCAGTGTGCCAGACTCAAATGTCACTGATGAATAGCTTCGCTTCAAAAC ATGGCCCCAATGGAAGGCCTGCTGTGTGCCATACTGGGTCTAATTCAGACTCTCAGGCAATGTCA CTCTGGATTTTGGCTGGTC TCCGGTTCAGACTGATGATGATGATAACCAGTTTGACTCACAGGGTCAGACAACCCCTGTGCGGCACC GTGATGCTCCCAGGACTTTATCCAGCGTCCATCCTGGAGTTGCACATGGCCCTCCCCACTCTGATGGT GCCGCTGCTTCAAAGATTCAGCAGCTGAATCTTGGGAGTTGGGTTCTGCCACAACAGAGAGCTCCTA AGGAAGCAGAGCTACCGAAGCGTTTCCAAACACACGTGTCTCTGTTTCCAGCTCATGGAAAAGACGC TCTCTCGGACAGTCAGGCACACCCAAGTCCCTCACTTACAGCTAGCCTTCTTGGCCACTAATGAAG AGAAATGTGCCAGAGAACAAATTGGAGAGGCCACAAATGAAGGAAAGTATTTAAGCATCCATGAGCA AGATGCAAAGCTCGCCAAGAATGTGCAGCAGGCAGAAAACGTGAGCCAGAACAGAGGA<mark>CTCAGAAGTCAG</mark> AATTGCCAAGTGCTTGCTGGGAGAGACCCAAATGAAGGAACAAGAAGAGACCTGCTGAGAAAGTCAG AGATTGCCAAGTGCTTGCTGGGAGAGAGCTCAAGGCCCTGACCGAAGAACAAGAGGACCACAAATGTGG AAGTTGCAAAGAAGTAGAGGCGTGCATATCTGGACTTTCAGCAGTGGCCACAATAGTGG AAGTTGAAATAGCCCTGGCCCTGCAGCCGCCGCCGCAGAAGCGCC

## Fragmento 3 - 810 pb

#### Fragmento 4 - 1506 pb

GCACCCGCAGTTTGTCCCTCACGAGACAAAGCGGAAGATGCACCTGGAAATCTTTCTGGCACATACG ACACAGAGGACGTGCAGCTCCTCAGGAAAATCAGAGAAGCACTTGGTAAGATCCCTGCTGCTGCTGG GCACCCCAAGGAACAGGCCACCCATCGTGGCCCACCAGCTCCGCTCAGCCCTGGCGTTCCTGTGAAG GGCAACATTGTCGCTGACAGCAGCTTTCTCCATTCTGACTTGATGTCAGACTGGAGCATCTCCTCGTT TTCAACATTCACGTCTCGTGATGAGCAGGACTTCAGAAATGGCCTGGCAGCGTTAGATGCCAATATTG CTCGGCTCCAGAAGTCCTTGAAGACTGGCCTTCTGGAGAAA **TGA**TTCTGGGAGGAAACTGATTGAGT CCTTTTTTTAAAGTACAGAACTTGACTACATTCATAGTATATTTTGGGTTTTCTTAGAGAGAACATTTTA TATTATTAATTATGTATGAAATAATAAATGGAGTAAATTTACTGTTAAGAATATTTTAACACCTGAAACT TACAAAAACAAATTTTCTTGAAAACCAACAGTCTGGGAGAAGAAGCCGTGGATCAGAAAGTATTGATT TCAAGGCGCTTTACTTGACAGCTTCGGCTTCACAGAGAATTCTTCACTGTGCAATGGCTGGGTCGGCG GTGCAGCCACCGAGCATCTCTGTCTGGAAGGAGAGTACGAAAGGATCAGTACTGTTTAAATGTTCCTC TCTGCAGTGGAATGTTGGTTTCATGGTAGTGTTCTTGTGTATGGGAATACTCTGTGTTACGAGCTAGT TATTTGTCCTGAATGCATGTTTTAAGACCTTTAAAAAATAAAGTCAGACTGATAAGGTAATGCTAAATA ACCAAGTTTTACCTTAGTAATTTTGTTTTTTAGTAAGAATTATTGGGTTTTCCTTAATGTCTTTGGAAAT GATGGAGT



**Figura I. Expresión de la proteína de fusión GST-CCDC14.** Se muestra la fotografía de un gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie en el cual se migraron los lisados proteicos de: clon I con vector recombinante pGEX-CCDC14 inducido (CI ind), clon I con vector recombinante pGEX-CCDC14 sin inducir (CI s/ind), clon II con vector recombinante pGEX-CCDC14 inducido (CII ind), clon II con vector recombinante pGEX-CCDC14 sin inducir (CI s/ind), clon II con vector recombinante pGEX-CCDC14 sin inducido (CI ind), clon II con vector recombinante pGEX-CCDC14 sin inducir (CI s/ind), clon Conteniendo el vector pGEX sin inserto ("vacío") inducido (CV ind), clon conteniendo el vector pGEX "vacío" sin inducir (CV s/ind). Marcador de Peso Molecular (M): PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas). Se señala con puntas de flecha la posición de: la proteína GST (verde) [Extraído de Lassabe, 2011].



**Figura II. Purificación de la proteína de fusión y confirmación de la identidad de la proteína purificada mediante ensayos de Western Blot con anticuerpo anti-GST. A.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie, mostrando los resultados de la purificación, y **B.** Ensayo de Western blot con anticuerpo anti-GST. En los dos geles se cargaron las mismas muestras, pero en B se sembró 1/3 que en A del volumen de cada muestra: clon con vector pGEX sin inserto (vacío) inducido (CV ind), clon I con vector recombinante pGEX-CCDC14 inducido (CI ind), y sin purificar ninguno de los dos, y resultado de uno de los ensayos de purificación, en que se muestran la primera y la última de las fracciones colectadas (F1<sub>1</sub> y F4<sub>1</sub>). Marcador de peso molecular (M): "PageRuler Unstained Protein Ladder" (Fermentas). Se señala con puntas de flecha la posición de la proteína de fusión GST-CCDC14 (amarillo), bandas menores, productos de proteólisis (amarillo), y la proteína GST aislada (verde) [Extraído de Lassabe, 2011].