

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

Tesis de Doctorado:

**Expresión Génica Diferencial
durante la Espermatogénesis de
la Rata**

Adriana Geisinger Wschebor

**Orientador: Dr. Rodolfo Wettstein
Co-orientador: Dr. Ricardo Benavente**

**Tribunal de Tesis: Dra. Cristina Arruti
Dr. Alberto Solari
Dr. Gustavo Folle**

2003

*A la memoria de mi padre.
Su amor, sabiduría y ejemplo
me guían desde donde esté.*

Agradecimientos

A mi orientador, Dr. Rodolfo Wettstein, por su permanente apoyo y estímulo en el desarrollo de esta tesis, y por la confianza que siempre ha depositado en mi trabajo.

A mi coorientador, Dr. Ricardo Benavente, por su constante apoyo y orientación, tanto a la distancia como durante mis estadias en la Universidad de Würzburg (Alemania). Deseo agradecerles además a él y a su esposa Mercedes por su hospitalidad, que tanto bien me hizo estando lejos.

A todos mis compañeros del Departamento de Biología Molecular del IIBCE por su afecto y colaboración, y en particular a Carina Gaggero, por sus muchos consejos.

I want to thank everyone at Benavente's laboratory (University of Würzburg) for their help, and specially Dr. Manfred Alsheimer, for his kind orientation.

I am grateful to Prof. Dr. Ulrich Scheer for receiving me as a visitant at the Department of Cell and Developmental Biology, University of Würzburg.

Al Br. Anthony Dos Santos por su colaboración en parte de este trabajo.

A la Mag. Gabriela Cossio por su ayuda en el análisis por computadora de los repetidos ID.

Al Dr. Carlos Cerveñansky y al Mag. Federico Battistoni, del Laboratorio de Bioquímica Analítica del IIBCE, por el análisis por espectrometría de masas de la proteína pecanex.

A Mario Lalinde por su ayuda en el procesamiento de imágenes.

A la Sra. Aurelia Curtiño, encargada del bioterio del IIBCE, por proporcionarme los ejemplares necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A Patricia Cassina y Mariana Pehar, del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina (Montevideo), por cederme los embriones de rata que utilicé en algunos experimentos.

A todos los investigadores de los distintos laboratorios del IIBCE que gentilmente me prestaron equipos o reactivos, y que no nombraré por temor a olvidarme de alguno.

Al PEDECIBA por concederme una beca de doctorado.

Al CONICYT y DAAD (“Deutscher Akademischer Austauschdienst”) por la concesión de becas que me permitieron desarrollar parte de mi investigación en la Universidad de Würzburg.

A la Unión Europea y CSIC, por el financiamiento de proyectos que dieron el puntapié inicial a esta tesis de doctorado.

A mis padres por su apoyo incondicional, siempre.

Este trabajo de tesis fue desarrollado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias, y en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo (Biocentro) de la Universidad de Würzburg, Alemania.

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

a. El epitelio seminífero	1
b. Generalidades de la espermatogénesis	2
c. La meiosis	4
d. La espermiogénesis	8

I.2. EXPRESIÓN GENICA DURANTE LA MEIOSIS Y LA ESPERMIOGENESIS DE LOS MAMÍFEROS

a. Análisis molecular de la meiosis	
Introducción: Variabilidad de la división meiótica	10
Síntesis de proteínas específicas de la meiosis	13
Síntesis de ADN durante la meiosis	22
b. Análisis molecular de la espermiogénesis	23
c. Patrones peculiares de expresión génica durante la espermatogénesis de los mamíferos: isoformas testículo-específicas, sobreexpresión de genes, ARNs no codificantes	24

I.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

a. Técnicas de obtención de poblaciones celulares enriquecidas	30
b. Técnicas de análisis de la expresión génica diferencial	32

II. OBJETIVOS

38

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales	39
Disección de tejidos enteros	39
Suspensiones celulares y elutriación	39

III.1. MANIPULACIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracciones de ARN	40
Eliminación de la contaminación con ADN y “mRNA differential display”	41
Recuperación de las bandas de interés y reamplificación	42
Northern-blots	43
Reacciones de clonado de las bandas diferenciales	44
Reverse Northern dot-blots	45
Electroforesis en geles conteniendo bisbenzimidida para análisis del tamaño de insertos	46
Rastreo de genotecas de ADNc	47
Hibridación <i>in situ</i>	48
Secuenciación de ácidos nucleicos	49
Análisis de secuencias	50
Manipulaciones generales de ADN	50

III.2. ANÁLISIS PROTEICOS

Producción de anticuerpos anti- <i>pecanex</i>	52
Purificación del anticuerpo anti-PX1	52
Subclonado de la región codificante del clon de <i>pecanex</i>	

de rata en un vector de expresión de <i>Escherichia coli</i> , e inducción de la proteína de fusión	53
Extracción de proteínas	54
Fraccionamientos celulares para la obtención de proteínas de membrana	54
Electroforesis de proteínas y Western-blots	55
Inmunohistoquímica	57
Análisis por espectrometría de masas	57

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. APLICACIÓN DEL " mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY" AL ANALISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

a. Patrones diferenciales de expresión génica durante la espermatogénesis	59
b. Reamplificación, confirmación y clonado de bandas	64
c. Diseño de un método sencillo para la diferenciación de clones de igual tamaño pero distinta secuencia: Adaptaciones a la técnica del "mRNA differential display"	66
d. Reconfirmación de bandas diferenciales	70
e. Discusión	70

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE GENES DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS, IDENTIFICADOS MEDIANTE EL DD

a. ADNc identificados	
Homólogo de rata del gen <i>Tlk</i> (banda 30)	74
Homólogo de rata del gen <i>PMS2</i> (banda 31)	77
Banda 25	80
Bandas 14, 28 y 2	82
b. Identificación y caracterización de <i>Srsp1</i> , primer gen de expresión específica de la línea germinal que codifica para una proteína portadora de un tramo de homoserinas	
Identificación del gen, patrón de expresión y análisis de secuencia	84
Discusión	90
c. Identificación y análisis de la expresión del gen " <i>pecanex</i> " durante la espermatogénesis	
Identificación, caracterización del gen y análisis de expresión génica	95
Análisis proteico	103
Discusión	110
d. Estudios vinculados con la regulación de la expresión génica durante la espermatogénesis	
Aislamiento y análisis de clones conteniendo un repetido ID	117
Patrón de expresión del repetido ID	121
Discusión	121

V. CONCLUSIONES	126
-----------------------	-----

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	129
ANEXOS	149
ANEXO I. Publicaciones	
ANEXO II. Secuencias ingresadas al Genbank	

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

a. El epitelio seminífero

Los testículos de los mamíferos son órganos ovoides que aparecen envueltos en una gruesa cápsula fibrosa, la túnica albugínea, y cuyo interior contiene un gran número de túbulos seminíferos contorneados, productores de espermatozoides. Los túbulos seminíferos están revestidos por un epitelio estratificado altamente especializado, denominado epitelio germinativo o seminífero. En el adulto este epitelio está compuesto por dos poblaciones celulares: una población no proliferativa de células de sostén, las células de Sertoli, que forman la membrana basal de los túbulos, y una población proliferativa de células germinativas, que migran continuamente desde la periferia del túbulo hacia la superficie luminal libre. Los elementos germinativos consisten en sucesivas generaciones de células dispuestas en el epitelio formando capas concéntricas bien definidas y comprenden, desde la periferia hacia el lumen, las espermatogonias, los espermatocitos y las espermatidas. El desarrollo de las células germinales está íntimamente asociado con las células de Sertoli (revisión por Griswold, 1998; figura I.1).

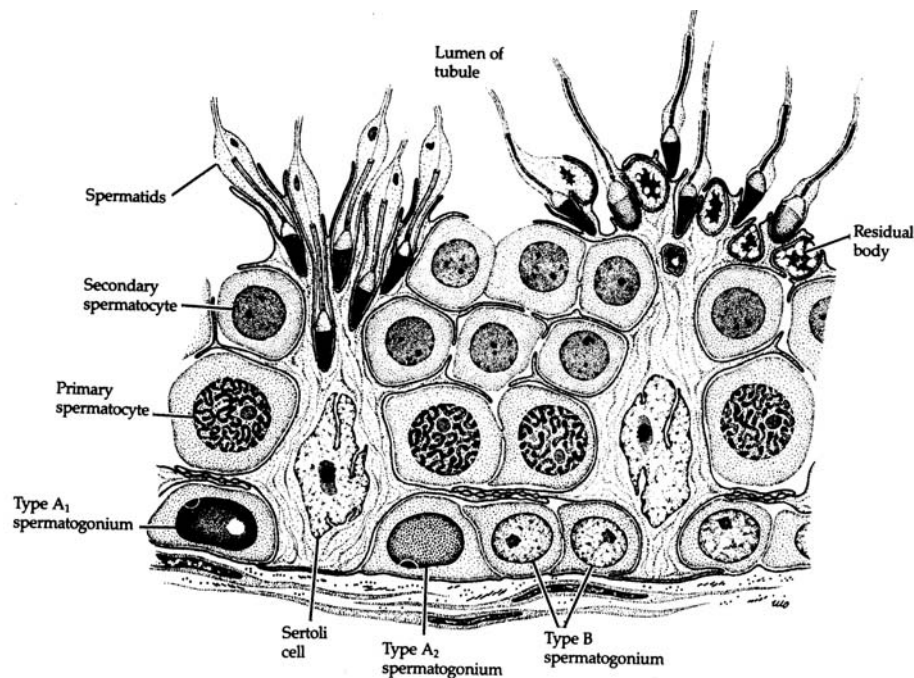


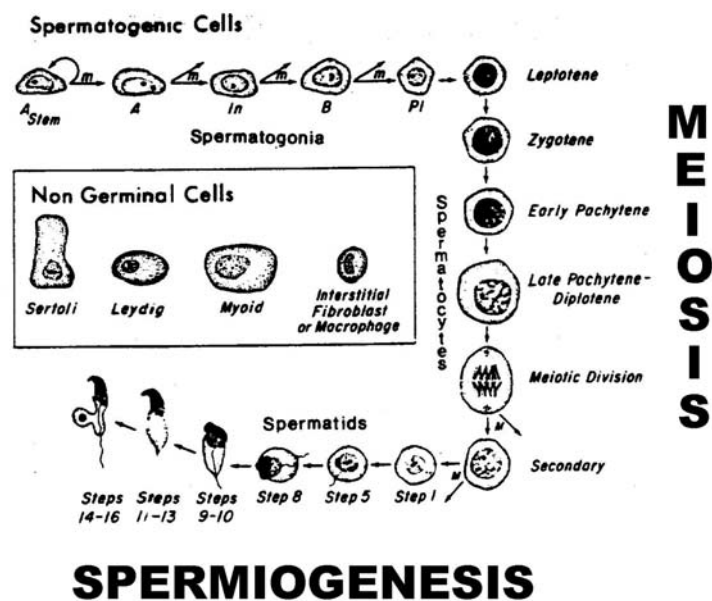
Figura I.1. Esquema de una sección de túbulo seminífero de mamífero. Se aprecia la relación entre las células de Sertoli y las de la línea germinal. A medida que las células maduran, progresan hacia el lumen del túbulo (Fuente: Dym, 1977).

Los túbulos seminíferos están unidos entre sí por tejido intersticial, que consiste en tabiques de tejido conectivo laxo con vasos linfáticos, capilares, arteriolas, vénulas, fibrocitos, macrófagos, mastocitos, linfocitos, y células de Leydig. Estas últimas son las responsables de la secreción de testosterona (Russell *et al.*, 1990).

b. Generalidades de la espermatogénesis

La espermatogénesis es un complejo proceso de diferenciación celular y proliferación esencial para todas las especies con reproducción sexuada, cuyo resultado es la formación de los gametos masculinos, los espermatozoides. Comienza con la división mitótica de células diploides, las espermatogonias, situadas en la base de los túbulos seminíferos, que se apartan del ciclo celular para transformarse en espermatocitos e ingresar en la primera división meiótica. La meiosis, descubierta por Van Beneden en 1883-1884 (revisión histórica por Hamoir, 1992), es un tipo especial de división celular presente únicamente en las células germinativas, que consiste en una duplicación de los cromosomas seguida de dos divisiones consecutivas. En tanto la primera división meiótica, o reduccional, presenta características únicas, la segunda, o ecuacional, se asemeja a una mitosis. Como resultado de ambas divisiones se obtienen cuatro células haploides, las espermátidas redondas, que ingresan en la fase de diferenciación haploide conocida como espermiogénesis. Durante la misma, las espermátidas van sufriendo elongación nuclear (espermátidas elongadas) y el surgimiento de un flagelo, a la vez que desarrollan especializaciones únicas del aparato de Golgi, que forma el acrosoma, y de las mitocondrias, que envuelven la porción anterior del flagelo (Russell *et al.*, 1990). La espermiogénesis culmina con la eliminación del citoplasma como cuerpo residual y la liberación de los espermatozoides hacia el lumen del túbulo seminífero (Gilbert, 1991). Por lo tanto, podemos dividir al proceso de espermatogénesis en tres etapas: la proliferación mitótica de las espermatogonias, la división meiótica y la espermiogénesis (figura I.2).

Durante las divisiones de las espermatogonias, la citocinesis no es completa. Las células forman un sincitio, conectándose a través de puentes citoplásmicos de 1 μm de diámetro. Las sucesivas divisiones producen grupos de células interconectadas y, dado que los puentes intercelulares son atravesados por macromoléculas y otros componentes



SPERMIOGENESIS

Figura I.2. Esquematación de las diferentes etapas de la espermatogénesis. Se muestran los tipos celulares presentes en el epitelio seminífero, representativos de cada etapa.

citoplásmicos, cada cohorte madura de forma sincrónica. Estos grupos celulares aparecen rodeados por prolongaciones de las células de Sertoli (ver figura I.1), constituyendo un microambiente para el desarrollo de las células germinativas. Como hemos visto, a medida que la espermatogénesis progresa, desde las espermatogonias hasta las espermatidas, las células se van desplazando hacia el interior del túbulo seminífero; en consecuencia, cada tipo celular puede ser encontrado en una capa particular del túbulo. Los estudios de los distintos tipos celulares componentes de los túbulos seminíferos de los roedores, y las asociaciones espacio-temporales entre los mismos, fueron llevados a cabo por el grupo de Clermont (Leblond y Clermont, 1952). Las espermatidas, situadas en el borde de la luz, pierden las conexiones citoplásmicas y se diferencian finalmente en espermatozoides (revisión por Gilbert, 1991).

c. La meiosis

Una revisión completa del metabolismo de los cromosomas durante la meiosis debería incluir una gran cantidad de aspectos, entre ellos, la fase S, los complejos sinaptonémicos, todos los aspectos de la recombinación meiótica y las interrelaciones de estos procesos con el ciclo celular. Por razones de limitación de espacio, sólo repasaremos aquí algunos de los eventos más llamativos de la meiosis. Dado que algunos de los acontecimientos más interesantes tienen lugar durante la profase de la primera división meiótica, la mayor parte de los eventos que analizaremos aquí se refieren a esta etapa.

Luego de la fase S premeiótica, caracterizada por una replicación incompleta del ADN, los espermatocitos primarios inician una larga profase, dividida en cinco estadios (figura I.3). Durante el primero de estos estadios, el leptoteno, la cromatina se encuentra como filamentos finos y delicados, de modo que en muchas especies es imposible identificar cromosomas individuales. En el estadio siguiente, el cigoteno, los cromosomas homólogos se aparean lado a lado. Este apareamiento, denominado sinapsis, es exclusivo de la profase de la primera división meiótica y aparece mediado por unas estructuras nucleares muy características, descubiertas por M.J. Moses en 1956, los complejos sinaptonémicos [CSs (El ensamblaje de estas estructuras comienza en realidad durante el leptoteno, con la formación de un eje proteico delgado, a lo largo de cada cromosoma.)]. Los CSs se extienden en forma de ejes a lo largo de los bivalentes (Wettstein y Sotelo, 1967; revisión por von Wettstein *et al.*, 1984). Están compuestos por dos bandas paralelas, los elementos laterales, separados por un espacio más claro, en el cual se encuentra una línea fina y densa, el elemento medial; la estructura y el grado de organización de este último varían en los diferentes grupos y niveles evolutivos (Wettstein y Sotelo, 1966; 1971; von Wettstein *et al.*, 1984.). Entre los elementos laterales y el elemento medial se percibe la presencia de filamentos transversos (figura I.4).

Se encuentran CSs en los meiocitos de casi todos los organismos eucariotas estudiados, desde las levaduras hasta el hombre (von Wettstein *et al.*, 1984.; Wettstein y Sotelo, 1967, 1971), exhibiendo un llamativo nivel de conservación morfológica en los distintos grupos (Sotelo y Wettstein, 1966; Wettstein y Sotelo, 1965, 1971). Ello motivó que

hasta hace poco se creyera que la presencia de complejos sinaptonémicos era absolutamente indispensable para la existencia de una división reduccional normal (Rasmussen y Holm, 1980). Sin embargo, se ha observado que la levadura

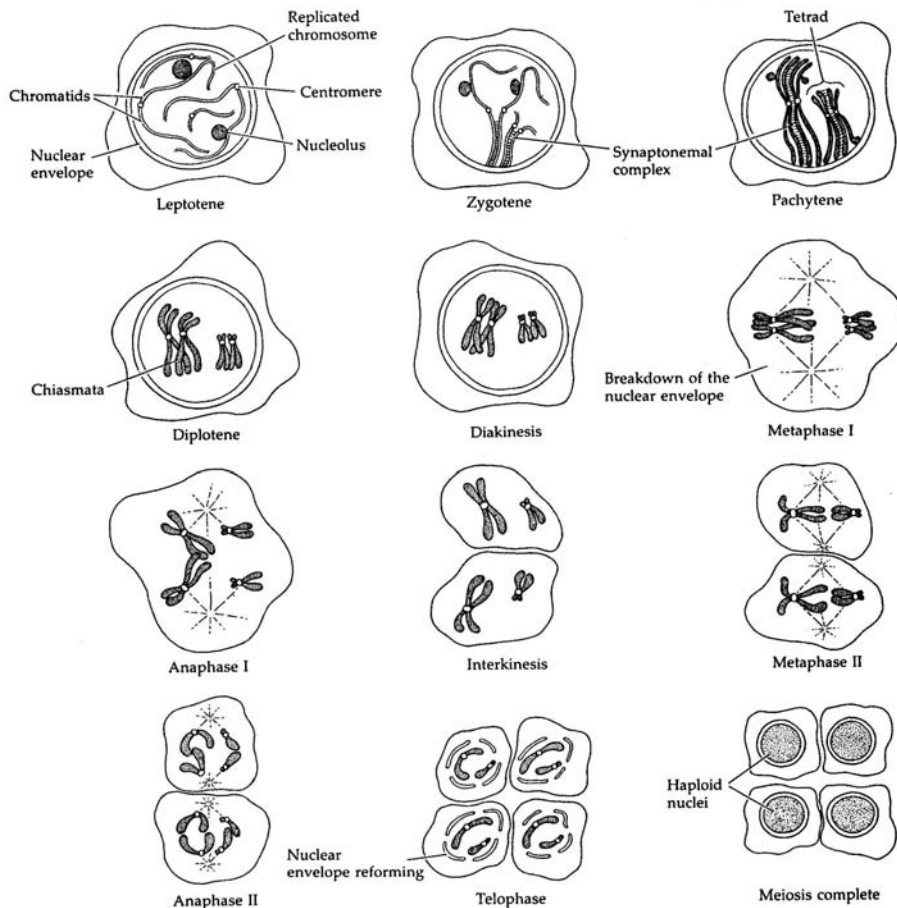


Figura I.3. Esquema representativo de la meiosis (Fuente: Gilbert, 1991).

Schizosaccharomyces pombe carece de CSs, si bien presenta unos elementos lineales (que podrían ser parcialmente equivalentes a CSs), cuya alteración ocasiona problemas para el desarrollo de divisiones meióticas normales (Roeder, 1997). De modo similar, *Aspergillus nidulans* también parece carecer de CSs en el sentido estricto (Shaw y Moore, 1998).

En la etapa siguiente al cigoteno, el paquiteno, los cromosomas se engruesan y acortan, dividiéndose cada uno en dos cromátidas unidas por un centrómero. Durante este

estadio tiene lugar la recombinación o "crossing over". La recombinación es un proceso de ruptura y reunión que conduce al intercambio recíproco de material entre las cromátidas homólogas apareadas. Representa la fuente más importante de variabilidad genética, al proveer a las generaciones sucesivas de nuevas combinaciones de genes maternos y paternos ligados y no ligados, constituyendo un sustrato fundamental para la evolución (Rice y Chippindale, 2001). La recombinación meiótica, que ocurre con una frecuencia entre cien y mil veces mayor que en las células somáticas, parece ser una versión adaptada y aumentada de los procesos de reparación por recombinación que tienen lugar en células no meióticas (Kleckner, 1996; Roeder, 1997; Smith y Nicolas, 1998). Existen evidencias de que, al menos en los mamíferos, la tasa de recombinación está estrechamente relacionada con la longitud de los CSs (por ejemplo, Lynn *et al.*, 2002).

El estadio de paquitenio es muy prolongado; estas células son, por consiguiente, visibles en la mayoría de los cortes transversales de túbulos seminíferos.

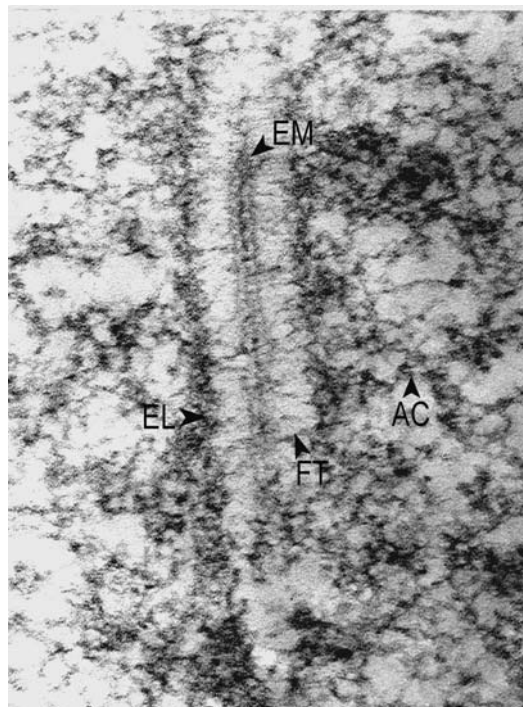


Figura I.4. Microfotografía electrónica mostrando CS de la especie *Grillus argentinus*. La microfotografía fue obtenida en el Departamento de Biología Molecular, IIBCE. EL: elemento lateral; EM: elemento medial; FT: filamentos transversos; AC: asas de cromatina.

Desde el leptoteno tardío y hasta el estadio de paquiteno, dos tipos de estructuras nodulares se hacen visibles en asociación con los ejes cromosómicos: los nódulos tempranos, que corresponden probablemente a las rupturas de doble hebra (ver más adelante) y/o interacciones de apareamiento precedentes, y los nódulos tardíos, que corresponden al subconjunto de interacciones de recombinación que efectivamente se transforman en “crossovers”. Estos nódulos tardíos se visualizan sobre la región central de los CSs durante el paquiteno (Kleckner, 1996; Zickler y Kleckner, 1998), y se postula que contendrían enzimas requeridas para las diferentes etapas de la recombinación (Smith y Nicolas, 1998).

La recombinación continúa hasta el siguiente estadio, el diploteno. Aquí, los CSs se desensamblan y los homólogos comienzan a separarse, permaneciendo, en general, unidos en varios puntos denominados quiasmas, cuyo número y distribución coinciden con los de los nódulos tardíos (Solari, 1980). Los quiasmas representan las regiones donde ocurre el "crossing over" (Zickler y Kleckner, 1999), asegurando además la orientación adecuada de los cromosomas en el huso durante la metafase I, y promoviendo una correcta segregación (Roeder y Bailis, 2000). En la última etapa, la diacinesis, los centrómeros se separan y los cromosomas se mantienen unidos únicamente por los extremos de las cromátidas.

Otro rasgo característico de la primera profase meiótica es la agrupación de los telómeros de los cromosomas en un sector del núcleo, en asociación con la superficie interna de la envoltura nuclear, adquiriendo una conformación particular que recuerda a un arreglo floral, y que se ha dado en llamar "bouquet". Esta disposición, que se hace evidente a principios de la profase, se resuelve durante el cigoteno o inicios del paquiteno en la mayoría de las especies. Su función se desconoce con certeza. Si bien análisis ultraestructurales y genéticos han demostrado que su formación es independiente de la existencia de sinapsis y recombinación (Trelles-Sticken *et al.*, 1999), algunas evidencias indican que su topología podría facilitar el apareamiento de los cromosomas (Scherthan *et al.*, 1996), y que los homólogos se alinean y comienzan el proceso de apareamiento durante el estadio de "bouquet" (Bass *et al.*, 2000; Cooper, 2000; Scherthan, 2001). La formación del “bouquet” parece ser muy ubicua. Aunque se ha informado de su ausencia en un importante número de especies, las conclusiones podrían haber estado basadas en datos experimentales erróneos. Todos los organismos

estudiados parecen poseer esta formación o una variante de ella, aunque sea durante un período muy corto (Zickler y Kleckner, 1998).

La profase I culmina finalmente con la ruptura de la envoltura nuclear y la migración de los cromosomas hacia la placa ecuatorial, en metafase I. Durante la anafase I los cromosomas homólogos se segregan, desplazándose hacia los polos opuestos. En la telofase I se forman dos células hijas, los espermatocitos secundarios, conteniendo, cada uno, un miembro de cada par de cromosomas homólogos, lo que confiere el carácter reduccional a la primera división del proceso meiótico. Los espermatocitos secundarios entran rápidamente en la profase de la segunda división, sin duplicar su ADN. La segunda división meiótica lleva a la separación de las cromátidas hermanas. Como resultado, se obtienen cuatro espermátidas redondas (ver figura I.3).

La sinapsis de los homólogos y su posterior segregación a núcleos separados son mecanismos meióticos esenciales por medio de los cuales los organismos con reproducción sexuada producen células con un genoma único a partir de células con dos genomas, contribuyendo, de ese modo, a mantener el número cromosómico de la especie.

d. La espermiogénesis

La espermiogénesis consiste en la diferenciación de las espermátidas recién formadas en espermátidas maduras y posteriormente en los espermatozoides, que serán liberados hacia el lumen. Las primeras etapas de la diferenciación del espermio involucran la construcción de la vesícula acrosómica a partir del aparato de Golgi. El acrosoma forma un casquete que cubre el núcleo del espermio. A medida que el casquete se forma, el núcleo rota de manera que el casquete acrosómico quedará enfrentado a la membrana basal del túbulo seminífero. Esta rotación es necesaria, dado que el flagelo está comenzando a formarse a partir del centriolo en el lado opuesto del núcleo, y este flagelo habrá de extenderse hacia el lumen. Durante la última etapa de la espermiogénesis el núcleo se condensa y el citoplasma remanente es eliminado (figura I.5); las mitocondrias, por su parte, se agrupan alrededor de la base del flagelo, formando en algunos grupos como los insectos, una gran mitocondria, en tanto en otros,

como los roedores y la especie humana, se alinean tocándose por un extremo y formando una hélice izquierda, aunque sin llegar a unirse en una mitocondria única (Otani *et al.*, 1988).

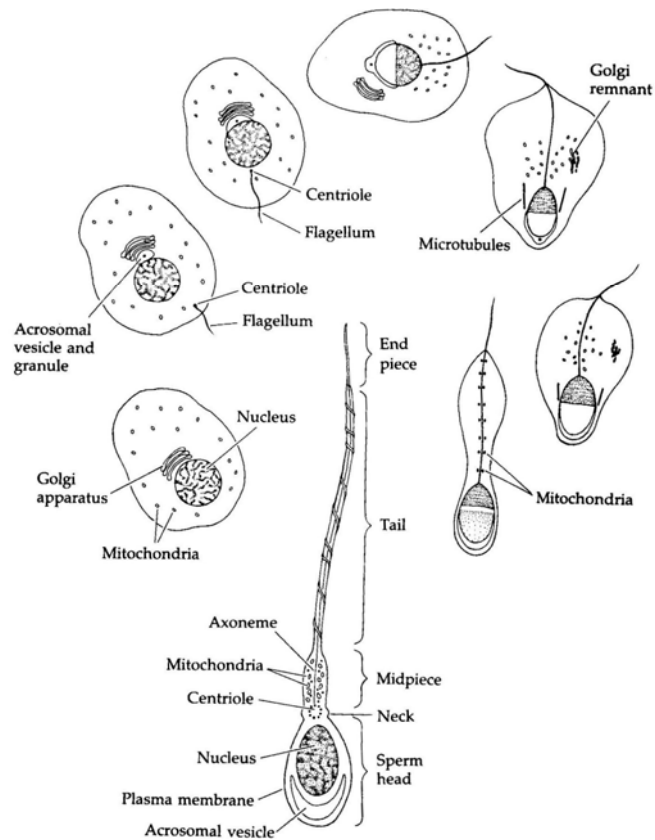


Figura I.5. Representación de los eventos que ocurren durante la espermiogénesis (Fuente: Clermont y Leblond, 1955).

I.2. EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA MEIOSIS Y LA ESPERMIOGÉNESIS DE LOS MAMÍFEROS

El proceso de espermatogénesis puede entenderse como la ejecución coordinada de tres programas individuales de expresión génica, superpuestos temporalmente en el testículo. El primero de dichos programas corresponde a la proliferación mitótica de las espermatogonias, y no será analizado aquí. El segundo provee al espermatozoides primario (célula meiótica) de la maquinaria necesaria para el apareamiento (sinapsis), recombinación y segregación que tienen lugar durante la meiosis. El tercer programa de expresión proporciona a la espermátida las proteínas necesarias para los profundos cambios nucleares y citoplásmicos que tienen lugar durante la espermiogénesis, y que culminan en el espermatozoide maduro.

Un rasgo destacable de la espermatogénesis en los eucariotas superiores es la gran cantidad de genes expresados diferencialmente en las células de la línea germinal con respecto a las células somáticas. Dentro de éstos podemos encontrar un grupo de genes que son expresados única o predominantemente en el testículo; en la mayoría de los casos, se ha demostrado que son expresados por las células de la línea germinal. Otros genes codifican para isoformas o variantes testículo-específicas de proteínas expresadas en otros órganos.

a. Análisis molecular de la meiosis

Introducción: variabilidad de la división meiótica

Si bien la meiosis ha sido descrita por los citólogos durante muchas décadas, sólo recientemente han comenzado a aplicarse las modernas técnicas de la biología celular y la genética al análisis de los mecanismos moleculares fundamentales implicados. Los estudios detallados de la meiosis han estado limitados a unas pocas especies en el pasado, lo que contribuyó al desarrollo de la idea de que, al igual que en la mitosis, el mecanismo fundamental estaba universalmente conservado y que, por lo tanto, las pocas especies estudiadas constituían buenos modelos para todas las demás especies.

A medida que los distintos aspectos de la meiosis van siendo disecados en detalle en diferentes organismos, sin embargo, se va haciendo evidente que muchos de los rasgos definidos clásicamente como comunes a la meiosis pueden ser prescindibles o verse sustancialmente modificados en distintas especies. A modo de ejemplo, mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en la formación de rupturas de doble hebra (ver más adelante) exhiben igualmente asociación homóloga, aunque a un menor nivel que el fenotipo salvaje (Loidl *et al.*, 1994). Del mismo modo, se ha visto que hembras mutantes de *Drosophila* que carecen de dichas rupturas mantienen, sin embargo, la capacidad de alinear, asociar y sinapsar sus cromosomas en meiosis (McKim *et al.*, 1998). El número de rupturas de doble hebra es mucho mayor en *S. cerevisiae* que en *Schizosaccharomyces pombe* (Cervantes *et al.*, 2000). En *Caenorhabditis elegans* existe un locus específico ("homology recognition region"), que sería utilizado como el sitio de inicio para la sinapsis cromosómica, representando un mecanismo alternativo a las rupturas de doble hebra aparentemente requeridas en otros organismos (Loidl, 2001). En *S. cerevisiae*, existen mutantes que no exhiben formación de CSs y, sin embargo, recombinan. Más aún, nos hemos referido anteriormente, a la ausencia de CSs convencionales en *S. pombe* y *A. nidulans*. Por lo tanto, la existencia de CSs no parece ser un requisito absoluto en todas las especies (Shaw y Moore, 1998). Por otra parte, en los machos de *Drosophila* el apareamiento y segregación ocurren sin formación de CSs ni recombinación y, aparentemente, el ADN ribosomal estaría involucrado en el apareamiento y segregación de los cromosomas X e Y (McKee y Karpen, 1990). En las hembras de *Drosophila*, por su parte, el par cromosómico 4 es aquíasmático pero igualmente segrega, y la heterocromatina centromérica participaría en la asociación de estos cromosomas (Karpen *et al.*, 1996). Los eventos de recombinación en las plantas parecen ocurrir principalmente en regiones ricas en genes, en tanto en *C. elegans* las regiones pobres en genes son las que exhiben el mayor nivel de recombinación. Por otro lado, en un número de especies, incluyendo trigo, arroz, *Drosophila* y levaduras, los cromosomas se encuentran en una configuración de Rabl (es decir, con los centrómeros agrupados en un polo y los telómeros alrededor del otro polo) previo a la meiosis, en tanto otras, como ratón y humano, no presentan una configuración de Rabl clara (Scherthan *et al.*, 1996). Asimismo, el tiempo de aparición del "bouquet" y la asociación cromosómica varía en las diferentes especies.

La mayor parte de los estudios moleculares acerca de la meiosis ha sido efectuada en las levaduras. La utilidad de la levadura como modelo de estudio resulta obvia, ya que se trata de un organismo simple, unicelular, fácil de cultivar y en el cual la obtención de mutantes es sencilla. Además, las secuencias completas de los genomas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* se encuentran actualmente disponibles, lo que facilita enormemente los estudios de expresión génica (por ejemplo, Chu *et al.*, 1998). Las células de *S. cerevisiae* que se encuentran en crecimiento vegetativo pueden, en determinado momento, tomar la decisión de transitar un camino diferente, el apareamiento y la esporulación, que representan una interesante vía alternativa de desarrollo. Para ser capaces de esporular, las células deben expresar los genes de los loci *MATa* y *MAT α* , y verse privadas de una fuente de nitrógeno (Mitchell y Bowdish, 1992; Vershon y Pierce, 2000). Durante la esporulación, la levadura se divide por meiosis. Como resultado de la segunda división meiótica se obtienen cuatro núcleos haploides encapsulados (esporas o gametos), llamados colectivamente una tetraada (Malone, 1990). Esto requiere la expresión coordinada de grupos de genes específicos de meiosis y esporulación.

A los genes identificados en *S. cerevisiae* por aislamiento de mutantes defectivos en recombinación meiótica, sinapsis y/o segregación cromosómica, se suman en los últimos años los resultados de los experimentos empleando microarreglos de ADN (Chu *et al.*, 1998). El análisis mediante microarreglos de los patrones de expresión de genes a través de los diferentes estadios de la meiosis ha permitido la identificación de más de 500 genes inducidos durante la meiosis y la esporulación, y un número casi igual de genes reprimidos en las mismas condiciones (Vershon y Pierce, 2000).

Sin embargo, la variabilidad de algunos aspectos de la división meiótica se ha hecho evidente también al nivel molecular, y los intentos de extrapolación de resultados de las levaduras a los mamíferos han fracasado en la mayoría de los casos, ya que la mayor parte de los genes de expresión específica de la meiosis hallados en las levaduras no parece tener homólogos en los genomas de otras especies (parece ser mucho más frecuente la analogía de funciones que la homología de secuencias génicas). Estos resultados podrían hallarse vinculados con las diferencias de fertilidad entre especies. Debe tenerse presente, además, que en tanto en las levaduras, como hemos visto, la meiosis tiene lugar en respuesta a una deprivación de nutrientes, en los eucariotas

multicelulares ésta ocurre dentro de un proceso más complejo, de diferenciación terminal, la gametogénesis. Muchos de los genes específicos de la meiosis no son compartidos ni siquiera entre *S. pombe* y *S. cerevisiae*, a pesar de tratarse de dos especies de levaduras (Watanabe *et al.*, 2001). Ello hace que, si bien la estrategia de identificar genes en las levaduras y extrapolar luego los resultados a los eucariotas superiores ha sido útil en algunos casos, no pueda eliminarse la necesidad de efectuar estudios directamente en los eucariotas superiores.

Síntesis de proteínas específicas de la meiosis

Se dispone actualmente de un buen caudal de información acerca de las proteínas involucradas en los distintos eventos de la meiosis de *S. cerevisiae*. La tabla I.1 describe la función de algunos de los genes cuyos productos participan en la formación de CSs, así como también en la recombinación meiótica, u otros (esta lista, por supuesto, es incompleta, y no incluye genes necesarios para la replicación del ADN, por ejemplo).

La mecánica de la recombinación ha sido también estudiada a fondo en las levaduras (figura I.6). En estos organismos, la mayoría de la recombinación es iniciada por medio de rupturas de doble hebra (Sun *et al.*, 1991; Goyon y Lichten, 1993), que son luego convertidas en uniones dobles de Holliday y, en consecuencia, en productos de recombinación. La cantidad de rupturas de doble hebra estaría vinculada con la accesibilidad de la cromatina, ya que éstas parecen ubicarse, en general, en regiones hipersensibles a la DNasa I y a la nucleasa micrococcal (Wu y Lichten, 1994; Smith y Nicolas, 1998). No nos detendremos aquí en el análisis de los eventos cromosómicos que tienen lugar durante la recombinación de las levaduras, si bien existe un importante número de revisiones que abordan el tema en detalle (por ejemplo, Kleckner, 1996; Roeder, 1997; Smith y Nicolas, 1998; Paques y Haber, 1999; Haber, 2000; Roeder y Bailis, 2000). La figura I.6 muestra un esquema de los eventos moleculares que tienen lugar durante la recombinación meiótica en las levaduras, basado en el modelo más aceptado de las rupturas de doble hebra, y señalando los niveles a los que actúan algunos de los principales productos implicados. Aunque el panorama es aún incompleto, es de esperar que el número de proteínas con función conocida aumente

Tabla I.1. Genes implicados en la formación de CSs y recombinación meiótica en *S. cerevisiae*

Genes de expresión meiosis-específica

Genes codificantes para componentes de los CSs

Gen	Función propuesta de la proteína. Comentarios	Citas bibliográficas
<i>Red1</i> , <i>Hop1</i>	Contribuyen al desarrollo de los CSs. Colocalizan sobre los ejes de los cromosomas meióticos, interactuando entre sí.	Hollingsworth <i>et al.</i> , 1990; Hollingsworth y Johnson, 1993.
<i>Hop2</i>	Posiblemente impide sinapsis entre cromosomas no homólogos. Localiza sobre los cromosomas meióticos.	Leu <i>et al.</i> , 1998.
<i>ZIP1</i>	Codifica un componente del elemento central de los CSs, posiblemente de los filamentos transversos. Quizás también función en el control del entrecruzamiento.	Sym <i>et al.</i> , 1993; Sym y Roeder, 1995; Storlazzi <i>et al.</i> , 1996.
<i>Zip2</i>	Requerida para la distribución normal de Zip1. No localizada a lo largo del eje, sino formando focos sobre los CSs.	Chua y Roeder, 1998; Paques y Haber, 1999.
<i>Zip3</i>	Posible componente de los nódulos de recombinación, vinculando la iniciación de la sinapsis con la recombinación. Colocaliza con Zip2, interactuando con varios productos involucrados en la recombinación meiótica (<i>Mre11</i> , <i>Rad51</i> , <i>Rad57</i> , <i>Msh4</i> y <i>Msh5</i>).	Agarwal y Roeder, 2000.

Genes que codifican productos involucrados en la recombinación, esenciales para la ocurrencia de rupturas de doble hebra

Gen	Función propuesta de la proteína. Comentarios	Citas bibliográficas
<i>SPO11</i>	Nucleasa responsable de las rupturas de doble hebra, necesaria para el apareamiento homólogo y formación de CSs.	Atcheson <i>et al.</i> , 1987; Mezard <i>et al.</i> , 1999; Weiner y Kleckner, 1994; Merino <i>et al.</i> , 2000.
<i>MER1</i> <i>MER2</i> <i>MRE2</i>	Participación en procesamiento meiosis-específico del ARN.	Engbrecht y Roeder, 1990; Engbrecht <i>et al.</i> , 1990. Cool y Malone, 1992.
<i>MEI4</i> , <i>REC102</i> , <i>REC104</i> , <i>REC114</i>	Participación en la recombinación meiótica.	Menees <i>et al.</i> , 1992. Cool y Malone, 1992; Bhargava <i>et al.</i> , 1992. Hollingsworth y Johnson, 1993.

Otros genes que codifican productos involucrados en la recombinación

Gen	Función propuesta	Citas bibliográficas
<i>Dmc1</i>	Esencial para la recombinación meiótica y viabilidad de esporas (reparación de rupturas de doble hebra). Comparte homología con <i>Rad51</i> y <i>RecA</i> . Colocaliza con <i>Rad51</i> .	Bishop <i>et al.</i> , 1992. Bishop, 1994.

<i>Rdh54</i> (<i>Tid1</i>)	Unión a Dmc1 y a Rad51 (¿función de puente intermolecular entre ambas proteínas?).	Shinohara <i>et al.</i> , 2000.
<i>SAE3</i>	Necesario para la función de Dmc1.	Gasior <i>et al.</i> , 2001.
<i>REC103</i>	Supresión de la traducción de ARNs mensajeros poliadenilados en meiosis.	Smith y Nicolas, 1998.
<i>COM1/</i> <i>SAE2</i>	Resección de rupturas de doble hebra, actuaría en complejo con Rad50/Mre11/Xrs2.	Smith y Nicolas, 1998.
<i>TAM1/</i> <i>NDJ1</i>	Función vinculada con la disyunción. Localizada en los extremos de los cromosomas.	

Genes que codifican productos con función en la recombinación meiótica, implicados también en mitosis

Genes que codifican productos participantes en la ocurrencia de rupturas de doble hebra

Gen	Función propuesta	Citas bibliográficas
<i>RAD50</i> , <i>MRE11</i> , <i>XRS2</i>	Necesarios para recombinación, formación de CSs y viabilidad de esporas; interactuarían en un complejo.	Alani <i>et al.</i> , 1990; Chamankhah y Xiao, 1999.
<i>RAD52</i> , <i>RAD51</i> , <i>RAD54</i> , <i>RAD55</i> , <i>RAD57</i>	Participación en el intercambio para creación de rupturas de doble hebra. No esenciales, salvo Rad52 (Rad51, 55 y 57 comparten homología con RecA) Todos estos productos podrían encontrarse formando un recombinosoma.	Passy <i>et al.</i> , 1999; Haber, 2000. Shinohara <i>et al.</i> , 1992. Paques y Haber, 1999.

Genes con función mitótica en la reparación de errores de apareamiento

Gen	Función propuesta	Citas bibliográficas
<i>Msh2</i> , <i>Msh3</i> , <i>Pms1</i> , <i>Mlh1</i>	Control de los gradientes de conversión génica en los puntos de recombinación (homólogos de genes de reparación de errores <i>MUTS</i> y <i>MUTL</i> de <i>E. coli</i>).	Arnheim y Shibata, 1997.
<i>Msh4</i> , <i>Msh5</i>	Posibles componentes de los nódulos tardíos de recombinación. Colocalización en sitios discretos a lo largo de los cromosomas sinapsados (homólogos de gen de reparación <i>MUTS</i> de <i>E.coli</i>).	Arnheim y Shibata, 1997.

considerablemente en el futuro próximo, a consecuencia de los resultados obtenidos a partir de los análisis efectuados con microarreglos (Vershon y Pierce, 2000).

También en los mamíferos la recombinación involucraría rupturas de doble hebra (Mahadevaiah *et al.*, 2001; Zenvirth *et al.*, 2003). Algunos genes cuyos productos se

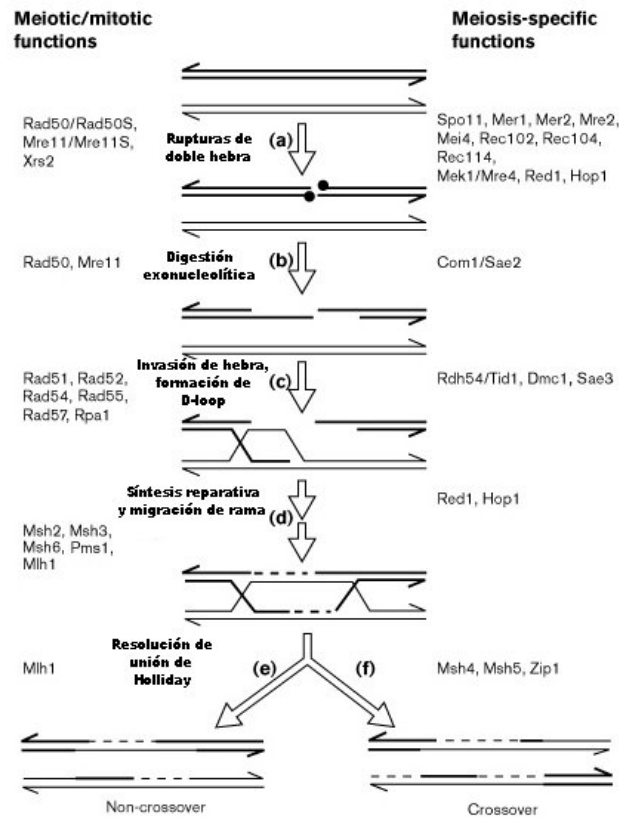


Figura I.6. Eventos moleculares de la recombinación meiótica en *S. cerevisiae*, basado en el modelo de las rupturas de doble hebra. Se muestran los intermediarios, y las proteínas implicadas en su formación. Se distingue entre las proteínas según sean específicas de meiosis, o sean requeridas también durante la mitosis. Los puntos en los que actúan varias de las proteínas siguen bajo investigación, y algunas podrían ser requeridas en muchos pasos (Fuente: Smith y Nicolas, 1998).

encuentran vinculados con la recombinación han sido aislados de los eucariotas superiores, por homología con su contraparte de las levaduras. Tal es el caso de *SPO11*, responsable de las rupturas de doble hebra en *S. cerevisiae* (ver tabla I.1) y *S. pombe* [en esta última, el homólogo de *SPO11* es la proteína *Rec12* (Keeney *et al.*, 1997; Cervantes *et al.*, 2000)]. Este gen presenta homólogos en *C. elegans*, *Arabidopsis* (Hartung y Puchta, 2000), ratón y humano (Keeney *et al.*, 1999; Romanienko *et al.*, 1999), lo que sugiere que el mecanismo de recombinación basado en rupturas de doble hebra descrito para *S. cerevisiae* ocurriría también en los mamíferos (Mahadevaiah *et al.*, 2001). Además, experimentos realizados en ratones con la expresión del gen *Spo11* bloqueada mostraron la ausencia de intermediarios del procesamiento de rupturas de doble hebra, a diferencia de lo observado en ratones con el fenotipo salvaje; esto indica

que este gen sería, al igual que en las levaduras, esencial para la recombinación en los mamíferos (Zenvirth *et al.*, 2003).

Se han encontrado asimismo en el humano, homólogos de los genes de la serie *RAD50-57* (por ejemplo, Gottlieb *et al.*, 1989; Alani *et al.*, 1990; Shinohara *et al.*; 1992; Milne y Weaver, 1993; Plug *et al.*, 1996; Gasior *et al.*, 2001), integrada por genes cuyos productos son importantes para la meiosis, pero que actúan también en las células que se dividen mitóticamente (ver tabla I.1). El conocimiento acerca de la función de algunas de estas proteínas en *S. cerevisiae* está bastante avanzado, y el mecanismo por el cual las proteínas RAD se asocian para producir el intercambio de hebra se conoce bastante bien actualmente (Plug *et al.*, 1996; Gasior *et al.*, 2001). Rad51 integra una familia de proteínas conservadas en todos los grupos examinados, incluyendo Archea, hongos, plantas y animales, y la proteína Rad51 humana se localiza sobre los cromosomas meióticos. Sin embargo, en tanto *RAD51* no es un gen esencial en las levaduras (tabla I.1), sí lo es en los vertebrados. Por el contrario, *RAD52*, que es el principal gen en la recombinación en las levaduras, no es indispensable en los eucariotas superiores. Significativamente, las secuencias completas de los genomas de *C. elegans* y *Drosophila* no proporcionan evidencias de la existencia de un homólogo de *RAD52* en estas especies (Haber, 2000). Surge por lo tanto la interrogante de si estos genes han evolucionado para desempeñar funciones diferentes en los eucariotas superiores. Se han encontrado asimismo en el humano homólogos del gen *RAD54*, así como de *RAD50* y *MRE11* (Smith y Nicolas, 1998), cuyos productos actuarían como parte de un complejo proteico mayor, preparando a la cromatina para la formación de las rupturas de doble hebra (Mahadevaiah *et al.*, 2001).

Todos los eucariotas examinados hasta ahora poseen un homólogo del gen *DMC1* (ver tabla I.1), expresado únicamente en las células meióticas [aunque en el ratón se ha detectado en tejidos somáticos una segunda forma, más corta, y en *Arabidopsis Dmc1* es inducido durante la mitosis (Li *et al.*, 1997a; Passy *et al.*, 1999)]. La proteína Dmc1 humana promueve el apareamiento homólogo y el intercambio de hebra (Gupta *et al.*, 2001). Estudios recientes indican que el producto de este gen colocaliza con Rad51 en el ratón y en el humano, al igual que en *S. cerevisiae* (Tarsounas *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 1999). En el lirio (cuyo homólogo de Dmc1 se llama Lim15) y en los roedores,

ambas proteínas han sido localizadas en los nódulos tempranos (Moens *et al.*, 1997), y esta localización es dependiente de la presencia de Spo11, lo que brinda soporte a la hipótesis de que estos nódulos podrían estar implicados en los eventos de recombinación meiótica (Anderson *et al.*, 1997). La mayoría de estas interacciones tempranas sería resuelta por un complejo de tipo topoisomerasa, impidiendo la formación de eventos de recombinación supérfluos (Moens *et al.*, 2002). Otras proteínas se han encontrado sobre los cromosomas meióticos de los mamíferos, colocalizando con Rad51, como la proteína supresora de tumores BRCA1 y la enzima conjugante de ubiquitina, Ubc9; esta última, probablemente desempeñe una función regulatoria durante la meiosis [En las levaduras, el producto del gen Ubc9 ha sido implicado en varios procesos, entre ellos la degradación de ciclinas en la mitosis (Kovalenko *et al.*, 1996)].

Por otra parte, se han encontrado tanto en el ratón como en el humano, homólogos de los genes vinculados con la reparación de errores de apareamiento, y en ambos organismos las mutaciones en estos genes se han asociado con el cáncer. Al igual que en las levaduras (ver tabla I.1), los homólogos de MUTS se hallan implicados en los mamíferos en el control del entrecruzamiento, y la ausencia de algunos de ellos como Msh5 produce un fenotipo mucho más anómalo en los ratones que en las levaduras (Haber, 2000). Las proteínas humanas Pms2 y Mlh1 son requeridas para la reparación de errores somáticos, pero poseen diferentes funciones en la meiosis. La proteína Mlh1 de ratón y pollo se localiza en los sitios que corresponden a los quiasmas [nódulos de recombinación tardíos (Anderson *et al.*, 1999; Moens *et al.*, 2001; (Pigozzi, 2001)], y es esencial para la meiosis en ambos sexos. El producto del gen *Pms2*, en cambio, sólo sería esencial para los machos, ya que el bloqueo de la expresión de este gen les provoca anomalías sinápticas e infertilidad (Baker *et al.*, 1995; Arnheim y Shibata, 1997), no ocurriendo lo mismo en las hembras.

El reciente análisis de las cohesinas, involucradas en mantener unidas a las cromátidas hermanas, ha agregado otro nivel de complejidad a la manera en que la recombinación ocurre. La proteína Rec8 de *S. cerevisiae* es un componente de un complejo cohesina meiosis-específico que parece estar estableciendo asociaciones entre cromátidas

hermanas, a la vez que crea el contexto cromosómico necesario para la recombinación interhomóloga (Watanabe y Nurse, 1999; Haber, 2000). También en los mamíferos se ha descrito la presencia de cohesinas. Sin embargo, mientras que en *S. cerevisiae* Rec8 es la única cohesina específica de meiosis descrita hasta la fecha, en los mamíferos se han encontrado por lo menos dos componentes meiosis-específicos, REC8 y STAG3 (Prieto *et al.*, 2001).

Al igual que las células mitóticas, las células meióticas controlan el orden en que los eventos ocurren. El control del ciclo meiótico ha sido exhaustivamente estudiado en *S. cerevisiae*, habiéndose identificado dos puntos de control ("checkpoints") del ciclo: el primero verifica que la recombinación sea completa antes que las células abandonen el paquiteno; el segundo, retarda la primera división meiótica hasta que todos los homólogos apareados estén correctamente unidos al huso meiótico (Li y Nicklas, 1995). En caso de fallas en alguno de los genes anteriormente descritos, la meiosis se detiene y se acumulan intermediarios. La detención puede ser suprimida por mutación en los genes de control, o por sobreproducción de una proteína que permita tomar una ruta alternativa [por ejemplo, una mutación en el gen *Spo13* permite saltar la meiosis I, resultando en dos esporas diploides viables (Smith y Nicolas, 1998)]. El gen *MEK1/MRE4* codifica una proteína quinasa meiosis-específica que poseería una función regulatoria en el control del ciclo, fosforilando a otra proteína, Red1 (Bailis y Roeder, 1998) al inicio de la profase. Red1 fosforilada se localiza sobre los cromosomas meióticos; esta proteína es luego desfosforilada al final del paquiteno, no encontrándose más sobre los cromosomas (Smith y Roeder, 1997). La fosforilación de Red1 sería una señal inhibitoria, indicando que la recombinación está teniendo lugar (Bailis y Roeder, 2000). Otra proteína, la quinasa Mec1, sería también necesaria para generar esta señal inhibitoria, fosforilando a varias otras proteínas como Rad9 (Weber y Byers, 1992), Ddc1, Rad53, Chk1 y, tal vez, Mek1 (Roeder y Bailis, 2000). Una vez finalizada la recombinación, se activan los genes *SWE1* y *NDT80*; este último, codifica un factor de transcripción que activa genes requeridos para la salida del paquiteno (Tung *et al.*, 2000). Los productos de otros genes, como *SPO14*, estarían involucrados en la inducción de los eventos meióticos tardíos (Honigberg *et al.*, 1992). La existencia de puntos de control a lo largo de la meiosis tampoco es exclusiva de las levaduras. Varias de las proteínas de control, en particular del punto de control ejercido a nivel del

paquitenos, también presentan homólogos en otros organismos, como Atm, una proteína de mamíferos que sería homóloga de Mec1. Sin embargo, en contraste con lo ocurrido en las levaduras, las células de mamífero que se detienen en los puntos de control sufren apoptosis, mediada por señales derivadas de las células de Sertoli (Roeder y Bailis, 2000; Print y Lakoski Loveland, 2000). Por otra parte, la asociación de proteínas del punto de control con los cromosomas meióticos en el ratón, pero no en *S. cerevisiae*, sugiere un tipo de control en los organismos superiores, que no es evidente en las levaduras (Moens *et al.*, 2001).

Muchos de los genes que codifican para productos involucrados en la meiosis de las levaduras no presentan homólogos en los eucariotas superiores, y viceversa. Más aún, muchos de los genes de expresión específica de la meiosis en *S. cerevisiae* tales como Rec102, Rec104, Mei4, Sae2, Xrs2, Hop1, Red1, Msh4 y Msh5 (ver tabla I.1), no poseen homólogos ni siquiera en la levadura *S. pombe*. Del mismo modo, varias proteínas involucradas en la meiosis de *S. pombe* no presentan homólogos en *S. cerevisiae* (Davis y Smith, 2001). Además, existen proteínas con homología aminoacídica evidente que, sin embargo, poseen funciones diferentes en ambas levaduras (Cervantes *et al.*, 2000; Davis y Smith, 2001). Ejemplo de esto lo constituyen las proteínas Dmc1 y Rec8, que son esenciales para la meiosis de *S. cerevisiae*, pero no para la de *S. pombe* (Fukushima *et al.*, 2000; Haber, 2000; Davis y Smith, 2001). Las diferencias existentes tanto a nivel estructural como molecular en algunos aspectos de la meiosis entre ambas levaduras sugieren que al menos algunos de los mecanismos implicados, así como su regulación, podrían diferir incluso en estos dos organismos.

Es por lo tanto esperable que las diferencias entre las levaduras y los mamíferos sean bastante mayores. Entre los genes de expresión específica de la meiosis de los mamíferos que no se corresponden con genes identificados en las levaduras, se encuentran los que codifican algunos de los componentes de los CSs (algunas proteínas integrantes de los CSs de las levaduras se describen en la tabla I.1). La proteína SCP1 de la rata, para la cual se han identificado homólogos en el hamster (Syn1), ratón y humano (Offenberg *et al.*, 1991), es un componente de los elementos transversos de los CSs (Meuwissen *et al.*, 1992). SCP2, por su parte, es una proteína constitutiva de los elementos laterales. Se trata de una probable proteína de unión al ADN, con varios

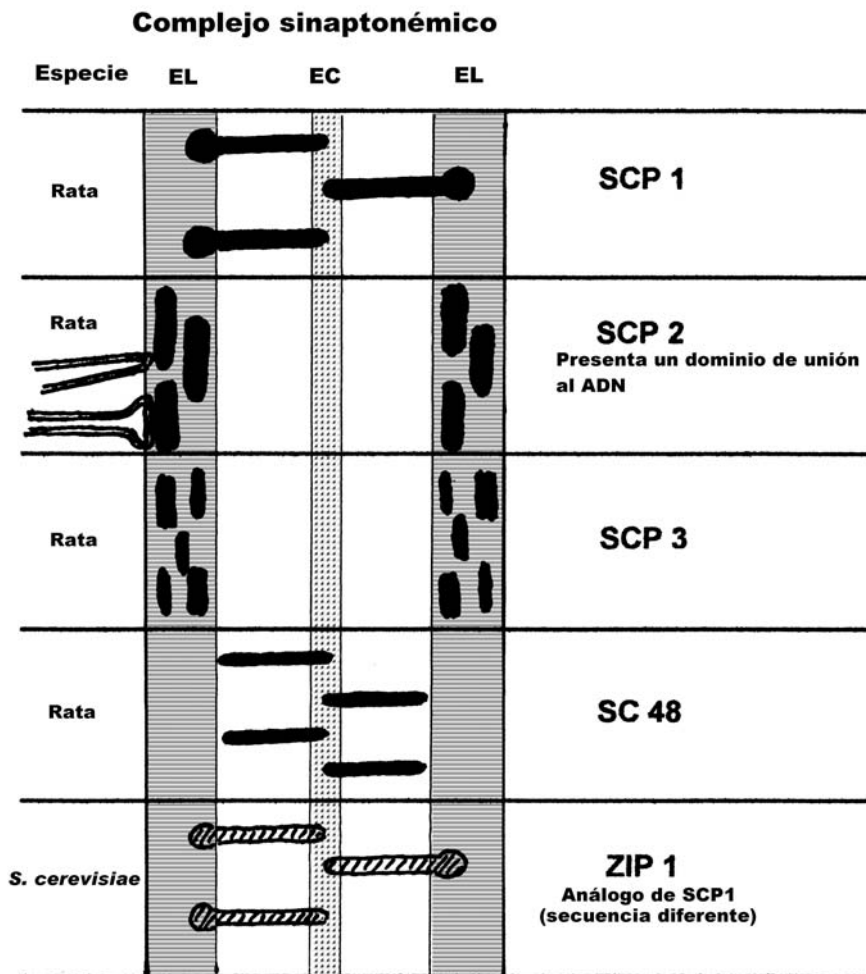


Figura I.7. Proteínas componentes de los CSs de la rata. EL: elemento lateral; EC: elemento central.

sitios potenciales blanco de fosforilación. Es interesante que esta proteína presenta un cierto nivel de similitud tanto a nivel de secuencia aminoacídica como de estructura secundaria con Red1, que está involucrada en la recombinación meiótica y el ensamblaje de los elementos axiales de los CSs de *S. cerevisiae* (Offenberg *et al.*, 1998, tabla I.1). Otra proteína, SCP3 de ratón (Lammers *et al.*, 1994) y su homóloga de hamster, Cor1 (Dobson *et al.*, 1994), se localizan sobre los elementos laterales, y se ha propuesto que constituirían una especie de esqueleto central de los mismos, al cual se unirían otros componentes (Yuan *et al.*, 1998). SCP3 sería requerida para el ensamblaje de CSs y la sinapsis, y en su ausencia se afecta la distribución de otras proteínas participantes en la recombinación como Rad51, así como también la de SCP1 (Yuan *et al.*, 2000). En las hembras de ratón se ha visto que SCP3 es requerida para la formación de quiasmas, y que su ausencia induce defectos en la segregación de los cromosomas meióticos (Yuan *et al.*, 2002). Tanto SCP1 como SCP2 y SCP3 son capaces de formar

hélices alfa anfipáticas ("coiled-coil"). Otro componente de los CSs es la proteína SC48, que se localiza sobre el espacio central, posiblemente en forma de puentes, y podría estar involucrada en el apareamiento de los cromosomas homólogos (Smith y Benavente, 1992b). Todas las proteínas componentes de los CSs mencionadas (figura I.7) son específicas de los meiocitos, y no se encuentran en otros tejidos.

Otro ejemplo de proteínas participantes en la meiosis que no se encuentran en tejidos somáticos lo constituyen proteínas específicas del cuerpo XY (Smith y Benavente, 1992a; Alsheimer *et al.*, 1997; Kralewski *et al.*, 1997), una estructura formada durante el paquiteno, cuando las regiones diferenciales de los cromosomas X e Y se condensan para formar dicho cuerpo, en tanto las regiones pseudoautosómicas presentan sinapsis parcial (revisión por Solari, 1974).

Síntesis de ADN durante la meiosis

Una característica distintiva de la replicación del ADN durante la fase S premeiótica, surgida de los estudios efectuados durante las décadas del '70 y '80 por el grupo de Stern y Hotta en lirio y observada posteriormente en los mamíferos, es que no es completa. Aproximadamente un 0,2% del genoma queda sin replicar, permaneciendo su replicación retardada hasta el estadio de cigoteno (Stern y Hotta, 1969). Estas secuencias, conocidas como ADNzyg, son secuencias medianamente repetidas de 5 a 10 Kb de longitud, que se encuentran distribuidas, en general, de manera uniforme en todos los cromosomas (Stern y Hotta, 1985; 1987). Su replicación en el cigoteno es incompleta, y según Stern, 1981, finalizaría después del diploteno. Se ha propuesto que el ADNzyg desempeñaría una función en la sinapsis cromosómica que ocurre durante la formación del CS (Stern y Hotta, 1985).

Un segundo período de síntesis de ADN en la profase meiótica fue observado por los mismos autores durante el paquiteno, pero en este caso se trata de una síntesis reparativa y no semiconservativa como la del ADNzyg. Este ADN, medianamente repetido y de secuencia altamente conservada, ha sido denominado ADN-P. Consiste en unas

seiscientas familias, con una divergencia menor al 1% dentro de cada una (Stern, 1981). La introducción de cortes en una sola hebra en determinadas regiones de ese ADN, llamadas ADN-Psn (de “small nuclear”, pequeño ADN nuclear) a principios del paquiteno, y la reparación de esos cortes hacia fines del mismo estadio, llevó a los autores a postular que los sitios que albergan a ese ADN serían sitios potenciales para el inicio de la recombinación (Hotta y Stern, 1974; Hotta y Stern, 1984; Stern y Hotta, 1987). Sin embargo, esta propuesta respecto al inicio de los eventos de recombinación a partir de cortes de hebra simple se contradice con lo acontecido en *S. cerevisiae* y aparentemente también en los roedores, en que, como hemos visto, la recombinación meiótica se iniciaría a partir de cortes de doble hebra.

b. Análisis molecular de la espermiogénesis

Durante mucho tiempo se creyó que en la fase haploide de la espermatogénesis prácticamente no existía expresión génica. Sin embargo, se ha visto que la transcripción continúa hasta la etapa en que los nucleosomas son reemplazados, a mediados de la espermiogénesis (Erickson, 1990; Venables y Eperon, 1999). Nosotros, conjuntamente con otros grupos, hemos observado que, si bien las espermátidas elongadas van sufriendo progresiva inactivación transcripcional, las espermátidas redondas exhiben niveles muy elevados de transcripción (ver "Resultados y Discusión"). Esta elevada actividad transcripcional se acompaña de la síntesis de proteínas específicas de la espermiogénesis.

Tal es el caso de las proteínas de transición y las protaminas, una familia de proteínas estructurales cromosómicas sumamente básicas que sustituyen secuencialmente a las histonas durante la fase de elongación de las espermátidas, convirtiendo a la cromatina, de organización nucleosomal, en fibrillas uniformes (Meistrich, 1989; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998). Esta sustitución de proteínas está controlada por eventos de fosforilación/desfosforilación, y parece implicar al sistema de ubiquitina, que es muy activo posmeióticamente (Sassone-Corsi, 2002). La razón de esta conversión posiblemente esté relacionada con la necesidad de una arquitectura cromatínica única, que permita un programa específico de transcripción luego de la fertilización (Sassone-

Corsi, 2002). Otro ejemplo de síntesis proteica posmeiótica lo constituyen ciertas proteínas constitutivas del espermatozoide, como por ejemplo la proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermio, que se localiza en las membranas queratinosas externas de las mitocondrias de los espermatozoides de los roedores (Kleene, 2001).

c. Patrones peculiares de expresión génica durante la espermatogénesis de los mamíferos: isoformas testículo-específicas, sobreexpresión de genes, ARNs no codificantes

Una característica destacable de la espermatogénesis de los mamíferos es que muchos genes exhiben patrones de expresión particulares. Un gran número de los ARNm que son transcritos en las células de la línea germinal son isoformas que difieren en tamaño y estructura de los mismos genes expresados en las células somáticas. Las distintas estrategias empleadas incluyen el uso de sitios diferentes de inicio de la transcripción, el procesamiento alternativo del ARN (Venables, 2002), o sitios "corriente arriba" de poliadenilación. Algunos de los transcritos codifican proteínas truncadas en tal grado que son incapaces de llevar a cabo la función que desempeñan en las células somáticas. Otro grupo está constituido por mensajeros que se encuentran sobreexpresados en el testículo en comparación con sus niveles de expresión en otros tejidos, y con el nivel de proteína expresada (Cataldo *et al.*, 1999). En tanto algunos ARNm de la línea germinal son detectados esencialmente al mismo tiempo o apenas antes que sus productos proteicos (Meistrich, 1989; Thomas *et al.*, 1990), otros mensajeros son secuestrados en partículas ribonucleoproteicas para ser traducidos recién en el estadio de espermátida elongada (revisión por Venables y Eperon, 1999). Es más: casi todos los ARNm de las células meióticas y haploides están, al menos parcialmente, reprimidos traducionalmente durante toda su vida, indicando que los niveles de ARNm exceden a los de proteína producida (Kleene, 1996). La traducción ineficiente podría constituir un mecanismo para impedir la sobreproducción de proteínas, y se ha visto que numerosos ARNm de las células germinales contienen, en sus regiones 5' no traducidas, secuencias y estructuras que, al menos en las células somáticas, se sabe que son capaces de obstruir la traducción (Kleene, 2001).

Entre las variantes específicas de la meiosis de proteínas expresadas en otros tejidos, encontramos isoformas testículo-específicas de histonas [H1t, H1a (Meistrich, 1989)], chaperonas [HSP70-2 (Eddy, 1999)], factores de transcripción [TFIIA τ (revisión por Sassone-Corsi, 2002)] y enzimas como la lactato deshidrogenasa C (Meistrich *et al.*, 1978), citocromo c_t , fosfoglicerato kinasa 2 y una subunidad del complejo estimulador de clivaje, la proteína CstF-64 (Wallace *et al.*, 1999). Un grupo adicional de proteínas que presenta isoformas meiosis-específicas es el de las laminas nucleares. Se han identificado en el testículo de roedor las laminas C2 (Smith y Benavente, 1992c; Alsheimer y Benavente, 1996) y B3 (Furukawa y Hotta, 1993; Vester *et al.*, 1993), que son variantes de procesamiento de las laminas somáticas A y B2, respectivamente. La expresión de estas isoformas meióticas de las laminas, conjuntamente con un menor contenido de laminas, se ha relacionado con la menor estabilidad de la envoltura nuclear de los meiocitos, que dispondría así de la flexibilidad estructural necesaria para permitir la dinámica interna del núcleo meiótico y el eventual desplazamiento de los telómeros sobre la misma (Alsheimer *et al.*, 1999; von Glasenapp y Benavente, 2000). Por otro lado, muchos genes activados posmeiáticamente poseen CREs (elementos de respuesta a AMPc), que en las células somáticas suelen reclutar al factor de transcripción CREB. Sin embargo, *CREB* es muy pobremente expresado en el testículo; en cambio, otro miembro de la familia de *CREB*, *CREM*, es expresado a muy alto nivel (Sassone-Corsi, 2002).

El caso de mensajeros que son sobreexpresados en el testículo puede ser ilustrado por el gen de la proteína de unión a caja TATA, *TBP*. Los niveles de ARNm de este gen son sumamente elevados en el estadio de espermátida redonda, en comparación con su expresión en los tejidos somáticos (Schmidt y Schibler, 1997). La sobreexpresión de este gen es llamativa, dado que las células de la línea germinal exhiben una notoria preferencia por los promotores independientes de caja TATA, y dirigen la síntesis de varios factores "de tipo TBP", con funciones especializadas durante la espermatogénesis (Sassone-Corsi, 2002). Otras proteínas muy fuertemente expresadas en el testículo en relación con su expresión en otros tejidos son la ADN polimerasa β , sugiriendo su participación en los eventos meióticos asociados con la sinapsis y la recombinación (Plug *et al.*, 1997), y las proteínas "Y-box"; se ha postulado que estas últimas podrían

ser las principales responsables de los altos niveles de represión traduccional en células de la línea espermática (Sommerville y Ladomery, 1996).

Muchos genes inician la transcripción en las células de la línea germinal "corriente arriba" o "corriente abajo" de los sitios de iniciación en las células somáticas. En primer lugar, como hemos señalado, gran parte de los genes identificados como testículo-específicos emplean promotores independientes de caja TATA. Existen inclusive genes que son transcritos a partir de promotores TATA-dependientes en las células somáticas, y TATA-independientes en las células de la línea germinal (Garrity y Wold, 1990). Además, muchos genes específicos de la línea germinal presentan marcos abiertos de lectura, incluso a veces múltiples, "corriente arriba" del codón de iniciación en las células somáticas (Kleene, 2001).

Un caso muy llamativo es el de proteínas que desempeñan funciones diferentes en los tejidos somáticos y en la línea germinal. El proto-oncogén *c-kit* codifica para una tirosín-kinasa de transmembrana en las células somáticas. En las espermátidas redondas, en cambio, dirige la síntesis de una proteína trunca que no puede actuar como tirosín-kinasa de transmembrana (Albanesi *et al.*, 1996). Sette y colaboradores (1997) han observado que la proteína trunca se localiza en la pieza media del espermatozoide durante la fertilización, y posiblemente intervenga en la activación del desarrollo en los ovocitos fertilizados. La isoforma somática de la fosfolípido hidroperóxido glutation-peroxidasa (PHGPx), por su parte, es citosólica. En las células meióticas, el gen para esta enzima es transcrito a partir de un sitio de iniciación "corriente arriba" del empleado en células somáticas, que agrega una secuencia de localización mitocondrial, ubicando a la forma testículo-específica en la mitocondria (Ursini *et al.*, 1999). Estos ejemplos parecen indicar que las células de la línea germinal podrían poseer una capacidad especial de reclutar proteínas para desempeñar funciones nuevas.

Otra característica de los genes expresados en las células de la línea espermática es la tendencia a utilizar sitios de poliadenilación "corriente arriba" de los usados en las células somáticas. Además, las señales de poliadenilación expresadas en las células meióticas y haploides suelen ser mucho más variables (AACAAA, AAGAAA,

TGTAAA, ATATAA) que la señal AATAAA, virtualmente invariable, de las células somáticas. La proteína CstF-64, que hemos mencionado anteriormente, y que constituye una subunidad testículo-específica del complejo estimulador de clivaje, estaría aparentemente involucrada en el reconocimiento de señales de poliadenilación no consensuales (Wallace *et al.*, 1999).

La "promiscuidad" en la expresión génica también se manifiesta por la transcripción de secuencias no codificantes como elementos repetidos y secuencias antisentido. A modo de ejemplo, se ha observado en el lirio y también en el ratón que el ADN_{zyg} no sólo se comporta como un componente estructural en el proceso sináptico, sino que un 1 ó 2% del mismo es transcrito en un ARN poliA+ (Hotta *et al.*, 1985). En su momento de máxima concentración, este ARN constituye un 40% de la población total de ARN poliA+. Se ha propuesto que estos transcritos podrían ser traducidos en proteínas que funcionarían catalítica o estructuralmente en la formación de CSs, pero nunca se identificó un producto proteico del ARN_{zyg} (Stern y Hotta, 1987). Asimismo, el ADN_{Psn} es transcrito en un ARN_{Psn}, que podría estar regulando la accesibilidad de las regiones de cromatina que contienen el ADN_P, a la acción de las nucleasas (Hotta y Stern, 1981). Por otra parte, se ha visto que otros elementos medianamente repetidos, pertenecientes al grupo de las secuencias SINE ("short interspersed DNA repetitive elements"), y denominados ID ("identifier"), son transcritos en los roedores, principalmente en la rata. Estos elementos, que además actúan como retrosposones, se expresan diferencialmente en algunos tejidos, fundamentalmente el cerebro y el testículo, existiendo transcritos específicos de cerebro y otros específicos de testículo (Kim *et al.*, 1995). Resulta llamativo que una de las revisiones más exhaustivas y actualizadas en este tema (Kleene, 2001) desconoce la existencia de transcritos de ADNs repetidos en la línea germinal de los mamíferos, aunque sí la reconoce en *Drosophila* y en los anfibios. También en *S. pombe* se han identificado varios ARNs no codificantes, específicos de la meiosis. Es sabido que la meiosis en esta levadura es regulada mediante la cooperación de un ARN funcional con una proteína de unión a ARN (Ohno, 1999). Se han aislado además, ARNs que poseerían estructuras secundarias en forma de horquilla, cuya función se desconoce. Se ha identificado inclusive un ARN que es un transcrito complementario parcial de un mensajero, y se

ha postulado que podría actuar como antisentido, en la represión de otros ARNs (Watanabe *et al.*, 2001).

La espermatogénesis de los mamíferos se caracteriza también por la necesidad de un gran número de proteínas de unión a ARN (por ejemplo, TRA2 α y β , RBM, DAZ, y las proteínas "Y-box"). Estas se encuentran involucradas en el desarrollo de funciones tan diversas como la generación de isoformas y la condensación de la cromatina (revisión por Venables y Eperon, 1999).

El significado de los patrones peculiares de expresión génica en los espermatoцитos y las espermátidas es controversial. Algunos creen que están vinculados con funciones particulares en la meiosis y la espermiogénesis. Otros, en cambio, han sugerido que constituyen un síntoma de una transcripción inapropiada, promiscua, poco regulada. Kleene (2001) sostiene que estos patrones particulares de expresión deben ser interpretados en relación con las poderosas fuerzas evolutivas que influyen sobre la adecuación de los espermatozoides a la función reproductiva. Varios de los rasgos distintivos de la expresión génica pueden ser explicados por el aumento en la motilidad (recordemos que un espermatozoide en cien millones fertiliza el ovocito). Por ejemplo, la íntima asociación de la membrana de la mitocondria e isoformas testículo-específicas de enzimas involucradas en el metabolismo energético (hexoquinasa I, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa 2) con el flagelo, podría facilitarle a éste el suministro de ATP (Bunch *et al.*, 1998). Además, la eliminación del citoplasma de la espermátida y la reducción del volumen nuclear al empaquetar el ADN con protaminas, disminuyen la resistencia hidrodinámica. La importancia atípica de la regulación postranscripcional podría contribuir a la selección de nuevas proteínas de unión al ARN. Asimismo, la existencia de características distintivas como el uso de sitios alternativos de inicio de la transcripción, facilitaría el surgimiento de nuevas funciones (Kleene, 2001).

Como hemos visto, la espermatogénesis es un proceso de desarrollo gobernado por un programa genético y molecular único. Se ha identificado un número considerable de genes vinculados con la expresión específica en la línea germinal. Sin embargo, estamos aún muy lejos de entender estos fenómenos al nivel molecular, así como de elucidar los

mecanismos implicados en su regulación. Una comprensión más profunda de los eventos moleculares que tienen lugar durante la espermatogénesis resulta esencial, ya que será de gran utilidad para el entendimiento de las bases de la mayor fuente de biodiversidad, así como para el desarrollo de procesos biomédicos y terapéuticos.

I.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

a. Técnicas de obtención de poblaciones celulares enriquecidas

Los estudios bioquímicos sobre la meiosis y la espermiogénesis en los organismos superiores se han visto complicados por el hecho de que, como hemos mencionado anteriormente, la población de un túbulo seminífero es muy heterogénea. Ello hace que la obtención de poblaciones celulares de un estadio determinado, en cantidad y pureza suficientes, sea muy difícil. A esto se suma la imposibilidad de disponer de líneas celulares de células germinales. Si bien se han hecho algunos intentos por establecer sistemas de cultivo de células germinales, los resultados han sido muy limitados (Russell y Steinberger, 1989; Rassoulzadegan *et al.*, 1993; McCarrey, 1998; Donovan *et al.*, 2001). Por lo tanto, sólo es posible trabajar con cultivos primarios, que no sufren división, se des-diferencian y pierden su sincronización rápidamente.

No obstante, han sido desarrolladas diferentes estrategias que han permitido abordar el estudio de la espermatogénesis al nivel molecular en los eucariotas superiores. De entre ellas, las más comunes han sido:

- La elección como modelo, de organismos que presentan la meiosis sincronizada. Tal es el caso de las anteras de lirio (género *Lillium*), que poseen maduración sincrónica de las poblaciones celulares de los distintos estadios, y cuya maduración puede ser inducida mediante exposición del material al frío (Stern y Hotta, 1987). Los estudios de la meiosis en el lirio, llevados a cabo durante las décadas del '60 al '80 por el grupo de Stern y Hotta, hicieron posibles los descubrimientos acerca del ADNzyg y ADN-P, así como de algunas proteínas específicas de la meiosis. Sin embargo, para abordar los análisis en los mamíferos debe recurrirse a estrategias alternativas, ya que no presentan meiosis sincronizada.

- La utilización de individuos juveniles, en los que la onda espermática es incompleta. Esto permite excluir los estadios posteriores de la espermatogénesis, a la vez que hace posible disponer de una proporción mucho mayor de células en los primeros estadios que en el adulto (Bellvé *et al.*, 1977; Vilardeell *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1989). No obstante, el nivel de contaminación del tipo celular de interés con otras células del testículo es alto. Además, la utilización de individuos juveniles como método exclusivo no parece conveniente, ya que no podemos asegurar que la síntesis de ARN y proteínas sea idéntica en individuos pre-púberes que en otros que hayan ya pasado por varias ondas espermáticas.

- El empleo de poblaciones celulares enriquecidas en células de los distintos estadios de la meiosis. La utilización de los métodos de separación de células ha permitido la experimentación en organismos en que la meiosis no está sincronizada naturalmente, haciendo posible la obtención de poblaciones celulares de testículo enriquecidas en células de algunos de sus diferentes estadios. De entre los métodos de separación de células, los más comúnmente utilizados son la separación por velocidad de sedimentación, o Staput, que funciona mediante la decantación gravimétrica de células en un gradiente de albúmina (Lam *et al.*, 1970; Meistrich *et al.*, 1973; Romrell *et al.*, 1976), y la elutriación. Este último se basa en el empleo de un rotor de centrífuga con cámara única lateral (elutriador), en el interior del cual se establece un gradiente de flujos. La partícula se mueve a una posición en que el flujo compensa exactamente la tasa de sedimentación; si la tasa de sedimentación de la partícula es menor que el menor flujo dentro de la cámara, ésta será expulsada y colectada (Meistrich, 1977). Este método es notoriamente más rápido que el de Staput (el tiempo de separación debe ser tenido especialmente en cuenta cuando se desea trabajar con moléculas de vida media corta y muy susceptibles a la degradación, como los ARNm), y el rendimiento es mayor. El nivel de pureza de las fracciones celulares obtenidas, enriquecidas en espermátocitos paquiténicos, por un lado, y espermátidas redondas, por otro, es bastante superior al 80% (Benavente, comunicación personal). Es posible el enriquecimiento en otros tipos celulares, pero con un grado de pureza menor (Romrell *et al.*, 1976).

b. Técnicas de análisis de la expresión génica diferencial

La identificación de genes expresados en forma diferencial ha sido utilizada como un abordaje experimental para comprender la función génica, así como los mecanismos moleculares subyacentes a los diferentes procesos biológicos.

Los métodos más utilizados hasta hace poco tiempo para el análisis de la expresión génica diferencial eran el análisis diferencial de genotecas de ADNc (Cochran *et al.*, 1987) y la hibridación sustractiva. Este último se basa en la hibridación del ADNc sintetizado a partir del tejido de interés contra un exceso veinte veces mayor de ARNm de un control, seguido de la separación de los híbridos de ácido nucleico de doble hebra (ARNm en común) de los ADNc de hebra simple (mensajeros diferencialmente expresados) mediante hidroxapatita o por interacción con streptavidina-biotina. El ADNc sustraído resultante es luego empleado como sonda marcada para el rastreo de genotecas, o para la construcción de una genoteca de ADNc sustraída (Duguid *et al.*, 1988). Aunque la sustracción es bastante sensible y permite la detección de ARNs mensajeros relativamente raros (de hecho, importantes genes fueron identificados mediante estas técnicas), es una metodología laboriosa y difícil de estandarizar, lleva mucho tiempo, y los resultados no se ven hasta el final del proceso. Además, no es reproducible, recupera genes incompletos, permite la selección en una sola dirección, y requiere grandes cantidades de ARN.

Peng Liang y Arthur Pardee desarrollaron en 1992-1993 un método novedoso para la identificación y selección de genes expresados diferencialmente. Este método, al que denominaron "mRNA differential display" (Liang y Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1993), se basa en la transcripción reversa de ARNm de dos o más poblaciones celulares diferentes utilizando iniciadores oligo-dT anclados a la cola de poliA+. Dichos iniciadores consisten en doce Ts más dos bases de anclaje (T₁₂MN), la primera de las cuales puede ser degenerada (esto permite reducir el número de iniciadores oligo-dT necesarios para copiar la totalidad de los ARNm, de doce a cuatro). Se obtienen de ese modo subpoblaciones de ADNc de hebra simple, correspondientes a los mensajeros que presentaron complementariedad en esas bases de anclaje 3'. Esto es

seguido de una reacción de PCR en presencia del mismo iniciador oligo-dT y un decámero de secuencia arbitraria empleado como segundo cebador, incluyéndose en la reacción uno de los desoxinucleótidos trifosfato marcado radiactivamente. Las subpoblaciones de ADNc resultantes son luego visualizadas y comparadas mediante un gel de poliacrilamida similar a un gel de secuencia, que permite separar fragmentos de hasta 500 pb de longitud (Liang et al., 1994a), y que es revelado mediante autorradiografía (figura I.7). Los iniciadores están diseñados de modo que cada par permite desplegar 50 a 100 bandas en el gel. Es decir, que la combinación de los cuatro oligo-dT degenerados ($T_{12}MA$, $T_{12}MC$, $T_{12}MG$ y $T_{12}MT$, donde M es la base degenerada) con veinte decámeros distintos de secuencia arbitraria, sería suficiente para desplegar unos 8.000 ARNm diferentes; esta cifra es cercana al número total de 10.000 mensajeros estimados para una célula de mamífero (Liang et al., 1994a). El "mRNA differential display" (DD) exhibe varias ventajas en comparación con la hibridación sustractiva: es más rápido y sencillo (está basado en transcripción reversa y PCR), más fácilmente reproducible, y requiere una cantidad mucho menor de ARN de partida [aproximadamente 1 μ g de ARN total sería suficiente para desplegar un número de bandas equivalente al total de los mensajeros expresados en un tipo celular dado, en tanto se necesita por lo menos cincuenta veces más para la hibridación sustractiva (Liang y Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1994a)]. Además, permite el análisis simultáneo de genes expresados diferencialmente en dos o más poblaciones celulares diferentes, así como también la identificación de genes que son silenciados en determinados grupos o procesos celulares. Las bandas identificadas como de expresión diferencial por el DD pueden ser fácilmente recuperadas del gel de poliacrilamida, reamplificadas por PCR, clonadas, empleadas como sondas en ensayos de Northern o Southern-blot, y secuenciadas. Otra técnica muy similar, llamada "RNA fingerprinting", ha sido descrita, y su principal diferencia con el DD es que utiliza iniciadores de secuencia arbitraria para amplificar ambas hebras, en lugar de un iniciador oligo-dT (Welsh *et al.*, 1992; McClelland *et al.*, 1995).

El DD se ha vuelto una metodología muy utilizada en los últimos años (revisiones por Matz y Lukyanov, 1998; Vedoy *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2001), y se han descrito un gran número de aplicaciones diferentes, así como de adaptaciones a la técnica (en diciembre del año 2001 se registraban más de mil seiscientas citas bibliográficas en las bases de

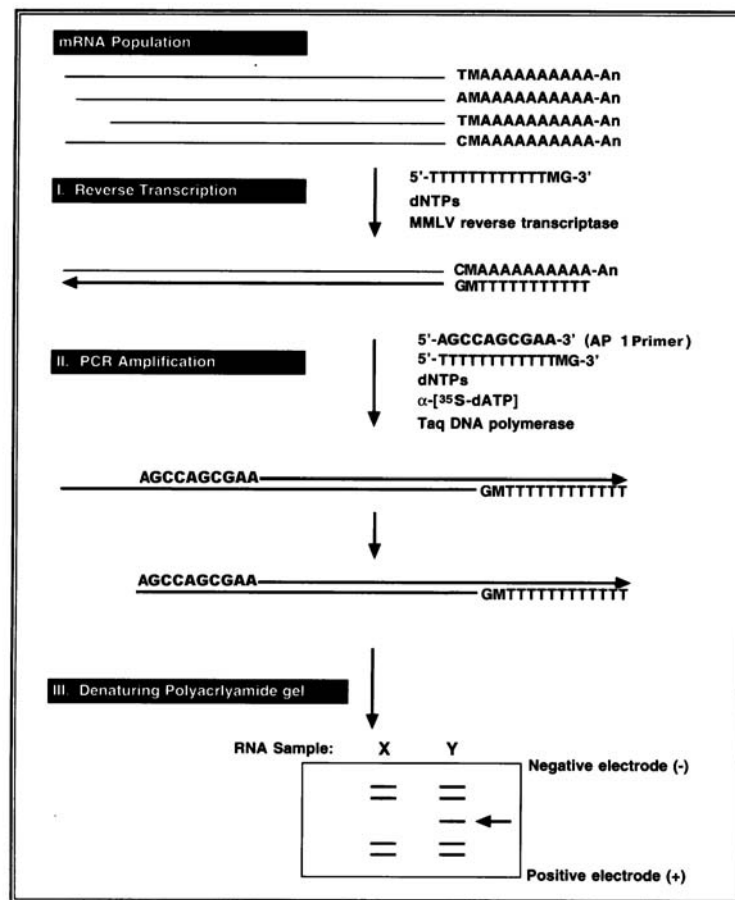


Figura I.8. Esquema del DD (Fuente: Manual del kit RNA map, GenHunter).

datos, entre aplicaciones de la técnica y adaptaciones). Las modificaciones descritas incluyen, entre otras, el uso de iniciadores oligo-dT con una base de anclaje en lugar de dos (Liang *et al.*, 1994b), geles mucho más largos para una mejor resolución (Averboukh *et al.*, 1996) y métodos para desplegar bandas de mayor tamaño (Diachenko *et al.*, 1996), el empleo de diferentes radioisótopos (Trentmann *et al.*, 1995) y de métodos no radiactivos como alternativa de marcado de los productos de PCR (Chen y Peck, 1996; An *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999), la modificación de la técnica para su uso con secuenciador automatizado de ADN (Bauer *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1997), la adaptación a números pequeños de células (Zhao *et al.*, 1998) y cantidades mínimas de ARN de partida (Bosch *et al.*, 2000; Melichar *et al.*, 2000), el DD en fase sólida (Stahl *et al.*, 1999), el DD dirigido [empleando oligonucleótidos degenerados para secuencias correspondientes a dominios proteicos conservados, en lugar de

iniciadores de secuencia arbitraria (Matz y Lukyanov, 1998)], e incluso la utilización de un paso de sustracción previo a la aplicación de la técnica (Fuchs *et al.*, 2000).

Sin embargo, a pesar de presentar la enorme ventaja de su simplicidad, el DD exhibe algunas limitaciones que sólo se han ido conociendo a medida que el uso de la técnica se ha extendido. Las principales críticas han sido que se obtiene un alto número de falsos positivos (este problema se reduce haciendo todos los experimentos por duplicado desde la transcripción reversa, aunque no se elimina), que en general no se clonan regiones codificantes (ya que se amplifican las regiones 3') y que, si bien es cierto que el DD requiere de cantidades muy pequeñas de ARN, el proceso de verificación requiere cantidades considerables; además, se ha cuestionado la capacidad de la técnica para identificar ARNs raros (Bertioli *et al.*, 1995). Numerosos investigadores han dedicado esfuerzos a intentar solucionar, al menos en parte, estas limitaciones. Los principales esfuerzos se han centrado en cómo eliminar los falsos positivos (Li *et al.*, 1994; Sompayrac *et al.*, 1995; Vögeli-Lange *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Mathieu-Daudé *et al.*, 1996; Shoham *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997; Poirier *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1997), aunque también se han realizado esfuerzos por lograr un DD que permita obtener información de regiones hacia el extremo 5' (Sompayrac *et al.*, 1995; Guimaraes *et al.*, 1995), una mayor sensibilidad en la detección de ARNs raros (Bertioli *et al.*, 1995), y otros (Buess *et al.*, 1997; Malhotra *et al.*, 1998).

Con posterioridad al surgimiento del DD, se han ido desarrollando algunas otras técnicas de análisis de la expresión génica diferencial. Una de ellas es el "Representational Difference Analysis" (RDA). Esta técnica, basada en sustracción acoplada a amplificación por PCR, ha sido utilizada para enriquecer en fragmentos genómicos que difieren en tamaño y representación (Lisitsyn *et al.*, 1993; Myers, 1993), aunque también se ha usado para clonar ADNc diferencialmente expresados (Hubank y Schatz, 1994). Estudios en que se han utilizado las metodologías del DD y el RDA simultáneamente, no han mostrado superposición entre los clones aislados por uno y otro método, indicando que ambos abordajes podrían ser complementarios (Harris *et al.*, 1996).

Otra de las metodologías desarrolladas es la sustracción electrónica [incluyendo la técnica conocida como análisis serial de la expresión génica, o SAGE, (Velculescu *et al.*, 1995)], que se basa en la secuenciación de ADNc seleccionados al azar. Se va formando así una lista de transcritos (en realidad, regiones pertenecientes a transcritos) expresados en un tipo celular, los que pasan a formar parte de las bases de datos de ESTs ("expressed sequence tags"). Esta tecnología exhibe la ventaja de que proporciona datos digitales, reusables; sin embargo, es demasiado costosa, además de permitir identificar sólo los ARNm abundantes, conduciendo de ese modo a que gran cantidad de los transcritos diferencialmente expresados escapen a su identificación (Wan *et al.*, 1996).

Con el objeto de hacer posible la detección de secuencias expresadas en muy bajo nivel, se diseñó la hibridación sustractiva supresiva (SSH). Esta técnica combina un paso de hibridación (normalización), que elimina las diferencias de abundancia entre los distintos ARNm, y un paso de sustracción, que excluye las secuencias comunes a ambas poblaciones (Diatchenko *et al.*, 1996; Wang y Feuerstein, 2000; Villalva *et al.*, 2001). De acuerdo a sus autores, la SSH permitiría un enriquecimiento mayor a mil veces en secuencias raras (Diatchenko *et al.*, 1996). Si bien es muy sensible, es una técnica complicada, además de requerir cantidades relativamente grandes de ARN (este problema puede eliminarse incluyendo un paso previo de preamplificación por PCR, aunque no es deseable ya que puede conducir a la pérdida de algunas secuencias). Otro inconveniente es que el número de falsos positivos puede ser muy alto, excediendo a veces incluso al número de positivos reales (Rebrikov *et al.*, 2000).

La más reciente y revolucionaria metodología para el estudio de la expresión génica diferencial involucra el uso de microarreglos (chips) de ADN (Lockhart *et al.*, 1996; Marshal y Hodgson, 1998). La idea básica consiste en la disposición de diferentes secuencias de ADN (ESTs u oligonucleótidos) de forma ordenada sobre una pequeña superficie de vidrio. Las dos poblaciones de ARN a comparar son convertidas a ADNc, marcadas mediante diferentes fluorocromos, desnaturalizadas y simultáneamente hibridadas a las muestras inmovilizadas de ADN. Luego de la hibridación, el chip es "scaneado" a las longitudes de onda apropiadas, y la comparación de las imágenes generadas por las dos longitudes de onda diferentes permite la identificación de las

secuencias expresadas diferencialmente. Algunas compañías se están concentrando en la producción de microarreglos de ADN conteniendo ESTs correspondientes a todos los genes expresados por un organismo determinado, a medida que los genomas completos de las especies van siendo elucidados (por ejemplo, Wodicka *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1998). Esto está comenzando a permitir la identificación de genes que son expresados en diferentes tipos celulares, condiciones fisiológicas o diversos tratamientos. Se dispone actualmente de microarreglos de algunas especies, como humano y ratón, conteniendo más de 40.000 ESTs (Vedoy *et al.*, 1999). Con respecto a la rata, hace muy poco que están disponibles microarreglos, y éstos corresponden sólo a una porción (aproximadamente un 25%) de los ADNc de la rata. Han sido inclusive descritas técnicas que combinan el DD con los microarreglos de ADN (Trenkle *et al.*, 1998; Trenkle *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2001).

II. OBJETIVOS

Objetivos generales

El objetivo general de este proyecto consistió en el análisis de la expresión génica durante la espermatogénesis de los mamíferos. El estudio de la espermatogénesis al nivel molecular exhibe una serie de dificultades, debido a las cuales los conocimientos en esta área siguen siendo aún muy escasos, a pesar de tratarse de un proceso de diferenciación terminal fundamental para todos los organismos con reproducción sexuada, y durante el cual tienen lugar eventos de gran importancia, como el apareamiento de los cromosomas homólogos y la recombinación meiótica, y la diferenciación del espermatozoide maduro. Un mayor conocimiento de los eventos moleculares que tienen lugar durante la espermatogénesis resulta indispensable para la comprensión de las bases de una de las principales fuentes de la biodiversidad, así como para el desarrollo de avances terapéuticos en relación con las patologías del testículo.

Objetivos específicos

El presente proyecto tuvo por objetivo la identificación de genes de expresión diferencial en la espermatogénesis y, en particular, la meiosis de la rata. Una vez identificados, el siguiente objetivo consistió en la caracterización de esos genes en función de su secuencia, modalidades de expresión y grado de similitud con otras secuencias publicadas; el proyecto incluyó también, en ciertos casos, la producción de anticuerpos que permitieran una caracterización del producto proteico (por ejemplo, en relación con su localización y distribución), de modo de aportar información tendiente a elucidar su posible función en la espermatogénesis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para las elutriaciones se emplearon ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar macho de 40 días de edad, procedentes de Charles River Wiga (Sulzfeld, Alemania). Las extracciones de ARN de testículo, así como de otros tejidos enteros de rata adulta se realizaron utilizando individuos macho de la misma cepa y edad, provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE); para la disección de ovarios, se usaron hembras de la misma cepa y edad. Los neonatos de un día empleados fueron de la misma procedencia, en tanto los embriones de 15 días fueron cedidos por la Cátedra de Histología de la Facultad de Medicina (Montevideo). Los fraccionamientos proteicos a partir de testículo entero se realizaron con machos de 26 a 27 días del bioterio del IIBCE.

Disección de tejidos enteros

Los animales fueron disecados rápidamente, y los distintos órganos extraídos lavados en NaCl al 0,8% estéril, pesados, congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C hasta el momento de realizar las extracciones de ARN.

En el caso de los embriones de 15 días, las cabezas fueron transportadas en solución para conservación de tejidos RNAlater (Ambion) y disecadas bajo lupa. A continuación se conservaron del mismo modo que los órganos de individuos adultos.

Suspensiones celulares y elutriación

La purificación de fracciones celulares enriquecidas en los diferentes estadios de la espermatogénesis se llevó a cabo durante estadías en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo de la Universidad de Würzburg (Alemania). Partiendo de cinco ratas cada vez, se prepararon suspensiones celulares de testículo por el método de tripsina de Meistrich (1977). Las suspensiones celulares 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 (tamaño de poro 25 µm). La elutriación se efectuó en una centrífuga Beckman J2-21 M/E, con rotor JE-6B (Beckman Instruments), de acuerdo

con los protocolos ya descritos (Meistrich *et al.*, 1981; Smith y Benavente, 1992b). Las fracciones altamente enriquecidas en espermátocitos paquiténicos (fracción 6) y espermátidas redondas (fracción 3) fueron colectadas separadamente, centrifugadas a 450 g durante 10 minutos y lavadas tres veces en buffer PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) estéril. En los casos en que las células iban a ser utilizadas posteriormente para la extracción de ARN, los lavados se realizaron en PBS libre de ARNasas. Se tomó una alícuota del primer lavado para evaluar la calidad y rendimiento de la elutriación mediante observación microscópica, y conteo de células en cámara de Neubauer.

Los precipitados celulares se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

III.1. MANIPULACIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracciones de ARN

Todas las soluciones empleadas en las extracciones y en la manipulación de ARN, al igual que el material no resistente al horneado, fueron incubadas a temperatura ambiente durante ocho horas con dimetil pirocarbonato (DMPC, Sigma) al 0,1% y autoclavadas posteriormente para eliminar la contaminación con ARNasas. El material de vidrio se trató mediante horneado o.n. en estufa a 180 °C. En todos los casos en que fue posible, se sustituyó el uso de material de vidrio por material de plástico descartable estéril. Las cubas y demás material de electroforesis se trataron según lo indicado por Sambrook *et al.* (1989).

Las extracciones de ARN se efectuaron según el protocolo del "RNA isolation kit" (Stratagene), basado en el uso de tiocianato de guanidinio y fenol ácido, pero con soluciones preparadas en el laboratorio. Como solución desnaturizante se empleó un buffer conteniendo tiocianato de guanidinio 4 M y Tris-HCl 0,1 M, a los que se agregó β-mercaptoetanol (100 µl cada 14 ml de solución) inmediatamente antes de usar. En el caso de las extracciones de ARN efectuadas a partir de fracciones celulares elutriadas, la solución desnaturizante fue vertida directamente al tubo conteniendo el precipitado

celular congelado. Para las extracciones realizadas a partir de tejidos, éstos fueron homogeneizados en la solución desnaturalizante en homogeneizador manual de teflón previamente tratado contra RNasas.

La calidad y concentración de los ARNs obtenidos se evaluaron mediante electroforesis y lectura espectrofotométrica. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa en buffer TAE 1X (40Mm Tris-acetato, 1mM EDTA pH 8.0) estéril conteniendo bromuro de etidio en el gel (4 µl de un stock 10 mg/ml cada 100 ml de agarosa), corridos a alta velocidad (aproximadamente 150 voltios), hasta un tercio a un medio del gel, y observados bajo transiluminador de luz ultravioleta. La cuantificación se hizo mediante lectura espectrofotométrica de la absorbancia (A) a 260 nm. Se tomó además, en todos los casos, el índice de $A_{260/280 \text{ nm}}$ como indicador de pureza de la muestra (Sambrook *et al.*, 1989).

Las muestras de ARN así obtenidas se utilizaron tanto para el "mRNA differential display" como para los ensayos de Northern-blot.

Eliminación de la contaminación con ADN y "mRNA differential display"

Previo a la realización del "differential display (DD)", muestras conteniendo 50 µg de ARN total extraído de la fracción espermatocitos y 50 µg de la fracción espermátidas redondas respectivamente fueron incubadas, cada una, con 10 unidades de DNasa I libre de RNasas, de modo de eliminar el ADN remanente. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del "Message Clean Kit" (GenHunter), con la modificación de que se agregaron 20 unidades de inhibidor de ARNasas "Rnase block I" (Stratagene) a cada mezcla de incubación.

La técnica del "mRNA differential display" se llevó a cabo esencialmente de acuerdo con Liang *et al.* (1993, ver figura I.6), mediante el uso del sistema "RNA map" (GenHunter), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las reacciones de transcripción reversa se emplearon 0,2 µg de ARN de las fracciones altamente enriquecidas en espermatocitos paquiténicos y espermátidas redondas respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Quatro TC-40 (Quatro) con la

enzima "AmpliTaq DNA Polymerase" de la firma Perkin-Elmer Cetus (Applied Biosystems) y el radioisótopo α [³⁵S]dATP (Amersham Pharmacia Biotech). El resto de los reactivos para el DD, incluyendo los iniciadores oligo-dT y los decámeros de secuencia arbitraria 1 al 6, 8 y 9, según la denominación de la empresa GenHunter, fueron obtenidos de dicha firma. Los parámetros de ciclado fueron los indicados en el protocolo, excepto que se incluyó un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos.

Todas las reacciones (transcripción reversa y PCR) se realizaron por duplicado, incluyéndose además, para cada juego de iniciadores, un control negativo correspondiente al ensayo completo en ausencia de transcriptasa inversa, de modo de comprobar que lo amplificado no correspondiera a ADN remanente. Las muestras fueron corridas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%, de acuerdo con el protocolo. Los geles fueron transferidos a papel Whatman 3M, secados mediante vacío, expuestos por un máximo de cinco días con una placa radiográfica Konica AX y revelados por medio de autorradiografía. Para el alineamiento preciso del gel con la placa, esta última se cortó del tamaño exacto del gel y se sujetó al mismo mediante grampas haciéndose, además, perforaciones con una aguja a través de ambos, ya que el correcto alineamiento constituye uno de los pasos críticos de la técnica.

La escalera de 123 pb empleada como marcador de peso molecular en los geles (Life Technologies) fue marcada con α [³⁵S]dATP por el método de marcación de extremos ("end labeling"), según lo indicado por Sambrook *et al.* (1989).

Recuperación de las bandas de interés y reamplificación

Las bandas del DD que aparecieron como de expresión diferencial de espermátocitos o de espermátidas en los experimentos por duplicado fueron cortadas de la acrilamida (mediante alineamiento de la placa de autorradiografía con el gel) y eluidas por hervido durante 15 minutos en 100 μ l de agua ultrapura estéril (se hirvió el fragmento de poliacrilamida junto con el papel 3M). Se centrifugó por 2 minutos para concentrar en el fondo del tubo los desechos de gel y papel, y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y precipitado con 10 μ l de acetato de sodio 3M, 5 μ l de glicógeno 10 mg/ml, y 4 volúmenes de etanol absoluto por 30 minutos a -80°C . Las muestras fueron

centrifugadas 10 minutos a 4 °C a máxima velocidad, lavadas con etanol 85% y resuspendidas en 10 µl de agua ultrapura estéril.

Para la reamplificación se utilizaron 4 µl del volumen de elución en un volumen final de reacción de 40 µl. Los pares de iniciadores y las condiciones de PCR fueron los mismos que para el DD, salvo que la concentración de los dNTPs fue 20 µM (en lugar de 2 y 4 µM, como en la fase anterior, según lo indicado en el protocolo), y que no se incluyó isótopo radiactivo en la mezcla de reacción. Se realizó un control negativo para cada combinación de iniciadores, sustituyendo en la reacción de reamplificación el ADN por agua.

Las bandas reamplificadas se visualizaron mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio (2µg/ml en TAE 1X durante 10 minutos). En cada pocillo de gel se cargaron 30 µl de las reacciones de reamplificación, guardando los 10 µl restantes para su eventual clonado.

Northern-blots

Para los ensayos de Northern-blot se emplearon 40 µg de ARN total por carril. Las muestras se corrieron en geles desnaturalizantes de agarosa conteniendo formaldehído, de acuerdo con el protocolo de Sambrook *et al.* (1989), con la modificación de que se agregó 1 µl de bromuro de etidio (1mg/ml) a cada muestra antes de cargar el gel, de modo de poder monitorear la calidad de la corrida y la eficiencia de la transferencia.

Se empleó el protocolo de transferencia líquida de Sambrook *et al.* (1989). Los geles fueron transferidos a membrana de hibridación de nylon con carga positiva de las firmas Boehringer Mannheim o Amersham Pharmacia Biotech (Hybond N+).

El marcado de las sondas se efectuó por la técnica de "random priming", mediante el kit "Megaprime DNA labelling system" (Amersham). El protocolo de elección fue el "New Megaprime protocol", y se incluyó en la reacción de marcado el radioisótopo α [³²P]dATP (3000 Ci/mmol), de las firmas Amersham o NEN indistintamente. Las

reacciones de marcado se hicieron por una hora a 37 °C y se detuvieron mediante el agregado de 0,8 µl de EDTA 0,5 M. En los casos en que se usaron las bandas del DD como sondas, se incluyó siempre en la reacción de marcado 1 µl del mismo iniciador T₁₂MN 10 µM empleado en el DD (además de los nonúmeros que incluye el kit), de modo de mejorar la marca, ya que se trataba de fragmentos cortos, en general no mayores de 300 pb.

Las sondas marcadas se purificaron, ya sea por precipitación (se agregaron 10 µg de ARN_t 1 mg/ml, 25 µl de acetato de amonio 7,5 M y 150 µl de etanol absoluto, y se incubó por 2 a 3 horas a -80 °C; se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos, se lavó con etanol 85% y se resuspendió en agua estéril), o por columna, mediante las "Microspin Columns" (Amersham), en un volumen final de 50 µl. Para ambos casos, 1 µl del volumen final fue medido en un contador de centelleo Beckman LS 100C, de modo de estimar la radiactividad incorporada.

Las hibridaciones se llevaron a cabo en un horno de hibridación (Hybaid), empleando ULTRAhyb (Ambion) como solución de hibridación. Las prehibridaciones se hicieron durante una hora a 42 °C. Para la hibridación, las sondas se hirvieron durante 5 minutos y se agregaron a la solución de prehibridación a una concentración de 10⁶ cpm/ml. Se hibridó por 16 a 20 horas a la misma temperatura de la prehibridación. Se efectuaron dos lavados de 5 minutos cada uno en SSC 2X (a partir de stock 20X: 175,3 g de NaCl y 88,2 g de C₆H₅Na₃O₇ por litro, pH 7,0), SDS 0,1% a 42 °C, seguidos de dos lavados de 15 minutos cada uno en SSC 0,1X, SDS 0,1% a la misma temperatura. En los casos en que apareció mucho ruido de fondo, se efectuó un último lavado en la segunda solución, por más tiempo (máximo 30 minutos) y/o a más alta temperatura (en ningún caso la temperatura se dejó elevar más allá de los 60 °C). Las membranas fueron expuestas con film de autorradiografía a -80 °C con doble pantalla intensificadora por tiempos que variaron desde cuatro horas hasta un máximo de 5 días.

Reacciones de clonado de las bandas diferenciales

4 µl de las reacciones de reamplificación de las bandas 2, 14, 18, 25, 28, 30 y 31 del DD (ver "Resultados y Discusión") fueron ligados a un vector T para clonado de productos

de PCR, mediante el uso del kit "pGEM-T Vector System II" (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transformaron células super-competentes JM109 (Promega), con la modificación de que para la transformación se emplearon 5 μ l de la mezcla de ligación (de un volumen final de 10 μ l) y no 2 μ l como indica el protocolo. Se hicieron dos estrías de purificación sobre medio de cultivo LB-agar (10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, pH 7; para placas, se agregan 15 g de agar por litro) con ampicilina (50 μ g/ μ l) de todos los clones blancos seleccionados, previo a la purificación del ADN.

Se empleó también como vector de clonado en paralelo, el vector PCR-TRAP (GenHunter). Se trata de un vector muy novedoso, de tercera generación, diseñado para el clonado de productos de PCR, y que está basado el gen represor cI del bacteriófago lambda. El clonado se efectuó siguiendo el protocolo indicado en el manual del kit "PCR-TRAP Cloning System". Si bien ambos vectores funcionaron correctamente, se eligió el pGEM-T dado que el clonado en el vector basado en cI presentó el inconveniente de que, al carecer éste de sitio múltiple de clonado, el rastreo de insertos sólo podía hacerse por PCR, lo que hacía que este protocolo resultara más costoso.

Reverse Northern dot-blots

Los ADNs de cada una de las minipreparaciones procedentes del clonado de las bandas diferenciales se aplicaron sobre una membrana de hibridación de nylon con carga positiva (Boehringer) en forma de dot-blots, mediante un aparato Minifold (Schleicher & Schuell). Cantidades correspondientes a 1 μ g y 0,1 μ g de ADN se utilizaron en cada caso. Se emplearon cantidades equivalentes del mismo plásmido (pGEM) sin inserto, como control negativo. Previo a su aplicación sobre las membranas, los ADNs fueron desnaturalizados por medio de incubación a 100 $^{\circ}$ C por cinco minutos e inmediata transferencia a hielo. Las membranas fueron fijadas por calor a 80 $^{\circ}$ C durante una hora.

Se utilizaron como sondas ADNc de las fracciones enriquecidas en espermátocitos paquiténicos, por un lado, y espermátidas redondas, por el otro. Las reacciones de transcripción reversa se realizaron como ya fue descrito (Zhang *et al.*, 1996), incluyendo α [32 P]dATP (3000 Ci/mmol) procedente de Amersham, y empleando 70 μ g

de ARN total de cada una de las fracciones, por reacción de transcripción reversa. Se empleó "church buffer" (stocks: A, 1M NaH₂PO₄, B, 1M Na₂HPO₄; se mezclan 140 ml de A y 360 ml de B por litro, pH 7,2) como solución de prehibridación e hibridación. Se realizaron dos lavados de 30 minutos a 65 °C en 1X SSC, 0,1% SDS y dos lavados de 30 minutos a 65 °C en 0,25X SSC, 0,1% SDS, y las membranas se expusieron a -80 °C con doble pantalla intensificadora.

Electroforesis en geles conteniendo bisbenzimidida para análisis del tamaño de insertos

Para las corridas electroforéticas en geles conteniendo bisbenzimidida/polietilenglicol (Wawer *et al.*, 1995) como medio de separar fragmentos de ADNc del mismo tamaño y diferente secuencia, se empleó el reactivo HA-Y (Hanse Analytic GmbH), consistente en bisbenzimidida acoplada a polietilenglicol (PEG) 6000.

Se realizaron geles de agarosa a concentración variable del 1 al 2% en 25 mM EDTA a pH 5,9. Luego de fundir la agarosa, se esperó a que ésta estuviese por debajo de los 70 °C, y se agregó HA-Y a una unidad (0,025 unidades de DO) por ml de solución. Los geles se vertieron del modo usual y se corrieron en el mismo buffer de fabricación del gel, teniendo la precaución de que no quedasen sumergidos en el buffer (en caso contrario, el HA-Y podría lavarse durante la corrida). Se cargó entre 50% y 100% más de ADN por pocillo que para un gel normal de agarosa, ya que la fluorescencia propia del HA-Y hacía más difícil la visualización de las bandas al teñirlas con bromuro de etidio. Las corridas se efectuaron a 3 voltios/cm. Una vez que el ADN ingresó al gel, los pocillos se rellenaron con buffer y el gel se cubrió con un trozo de RolopacTM, evitando la formación de arrugas. Se corrió durante 3 a 4 horas, interrumpiendo la corrida cada aproximadamente 30 minutos para mezclar los buffers de ambas cámaras de la cuba. Los geles se teñieron con bromuro de etidio (2 µg/ml) entre 30 minutos y una hora, y se visualizaron bajo transiluminador de luz UV.

Rastreo de genotecas de ADNc

Las bibliotecas de ADNc utilizadas fueron fabricadas en el vector λ -ZAP (Stratagene). Se empleó una biblioteca construida a partir de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátocitos paquiténicos de rata mediante elutriación, realizada en la Universidad de Würzburg (gentilmente donada por el Dr. Manfred Alsheimer), así como una realizada a partir de poblaciones altamente enriquecidas en espermátidas redondas, fabricada en nuestro laboratorio.

Los plaques de las genotecas se realizaron siguiendo el protocolo del "ZAP cDNA Synthesis Kit" (Stratagene) con el cual se habían sintetizado las genotecas, empleando los medios de cultivo, cepas bacterianas y condiciones indicadas en el protocolo. Los rastreos primarios se efectuaron en placas de petri de 150 mm de diámetro, con aproximadamente 30.000 ufp por placa. Para las siguientes rondas de purificación se emplearon placas de petri de 80 mm de diámetro conteniendo entre 100 y 300 playas de lisis por placa, de modo de poder aislar fácilmente las positivas, y así evitar sucesivas rondas de purificación. Las playas de lisis se transfirieron a membranas de nylon Hybond N y Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech), empleando básicamente las técnicas de transferencia e hibridación en placa descritas en el manual "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Boehringer Mannheim), con las siguientes modificaciones: no se efectuó incubación con proteinasa K, para cada ronda primaria de rastreo se levantaron filtros por duplicado, dejando el segundo filtro el doble de tiempo sobre la placa que el primero, y las membranas se fijaron a 80 °C durante una hora.

Los fragmentos a utilizar como sondas fueron escindidos del vector de clonado mediante digestión por enzimas de restricción y purificados a partir de geles de agarosa. El marcado se efectuó por la técnica de "random priming", mediante el kit de marcado por quimioluminiscencia "DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II" (Boehringer Mannheim). Entre 30 y 100 ng de ADN se marcaron durante 20 horas en

las condiciones indicadas en el protocolo, y las reacciones se detuvieron por agregado de 0,8 µl de EDTA 0,5 M, no removiéndose los nucleótidos no incorporados. La cuantificación de la eficiencia de marcado se hizo por el método de tirillas indicado en el protocolo. Las prehibridaciones e hibridaciones se llevaron a cabo en horno de hibridación (Hybaid) con ULTRAhyb (Ambion) como solución de hibridación. Se emplearon 12 ml de solución de hibridación por botella de 275 ml, conteniendo 0,1 ng de sonda por cada ml. Se hibridó o.n. a 42 °C. Se efectuaron dos lavados de 5 minutos cada uno en SSC 2X, SDS 0,1% a 42 °C, seguidos de dos lavados de 15 minutos cada uno en SSC 0,1X, SDS 0,1% a la misma temperatura. 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, incubando secuencialmente de a cinco minutos 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 37 °C de 10 a 25 minutos, y se reveló de la forma habitual.

Las playas de lisis positivas fueron levantadas de la placa con la parte posterior de un puntero amarillo de pipeta automática e incubadas en 1 ml de buffer SM (para 1 litro: 5,8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄, 50 ml de Tris 1M pH 7,5, 5 ml de gelatina al 2%) con 20 µl de cloroformo. Luego de vortexear durante 1 minuto para liberar los bacteriófagos, los tubos conteniendo el SM con las playas de lisis se conservaron a 4 °C. Las soluciones conteniendo los bacteriófagos fueron tituladas previo a cada etapa de rastreo.

La escisión "in vivo" de fásmidos pBluescript se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit "ZAP-cDNA Synthesis Kit" (Stratagene), salvo que la incubación o.n. de las placas se hizo a 42 °C y no a 37, de modo de evitar la coinfección con bacteriófago "helper".

Hibridación *in situ*

Testículos de rata fueron fijados con metanol : ácido acético (3:1) a temperatura ambiente e incluidos en parafina. El marcado de las sondas se efectuó con el "DIG RNA Labeling Kit" (Boehringer Mannheim), transcribiendo a partir de los promotores T3 y T7 las sondas sentido (control negativo) y antisentido respectivamente. El tratamiento de los preparados y la hibridación y detección con anticuerpos anti-digoxigenina se realizaron como ya fue descrito (Alzheimer y Benavente, 1996).

Secuenciación de ácidos nucleicos

Para las reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos se recurrió tanto a secuenciación en forma manual como automatizada.

Secuenciación manual

Las reacciones manuales de secuencia se efectuaron, alternativamente, por dos métodos diferentes:

1. Mediante el uso de la enzima "Sequenasa", empleando el "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" (Amersham), con el protocolo para secuenciación de moldes de hebra doble. Se incorporó α [³⁵S]dATP (Amersham Pharmacia Biotech) en las reacciones de secuencia. Estas fueron corridas en geles de poliacrilamida/urea al 6%, y se reveló mediante autorradiografía.
2. Por ciclos, mediante el "Silver Sequence DNA Sequencing System" (Promega). Se corrieron geles de poliacrilamida/urea al 4%. El revelado se realizó por la técnica de tinción con nitrato de plata, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante.

Secuenciación automática

Las reacciones de secuenciación automática se llevaron a cabo a partir de los iniciadores del vector, en el Servicio de Secuenciación Automática de la Facultad de Ciencias (Montevideo), mediante el uso de un equipo ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems), y en el Centro Internacional para la Investigación Biológica (ICBR) de la Universidad de Florida (USA), empleando un Secuenciador Capilar 3700 (PE Applied

Biosystems). En los casos en que se requirió el diseño y síntesis de iniciadores para secuenciación interna (secuencia completa del ADNc de *Srsp1*), la síntesis de los mismos se encargó a la Universidad de Florida.

Análisis de secuencias

La comparación de secuencias de ADN en el Genbank/EMBL y de secuencias proteicas predichas en las bases de datos SWALL y SWISS PROT, se efectuó mediante los programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y FASTA ([http://www.ebi.ac.uk/ fasta33/](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/); UTRfasta para secuencias 3' y 5' no traducidas).

Para el análisis de ácidos nucleicos se emplearon los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y CGG Nucleotide Sequence Analysis Software (<http://genomic.sanger.ac.uk/gf/gf.html>). Los análisis de secuencias proteicas predichas se realizaron con la ayuda de los diversos programas disponibles en el servidor Expasy. Los alineamientos de secuencias fueron llevados a cabo por medio de los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y Boxshade (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade.html>). Las búsquedas de secuencias genómicas para el gen *Srsp1* se hicieron contra el Proyecto Genoma de Rata de NIH (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/index.html>). El modelado parcial de la proteína *Srsp1* fue realizado mediante el servidor Swiss-Model.

Manipulaciones generales de ADN

Las minipreparaciones de ADN de plásmidos y fásmidos para análisis de insertos mediante enzimas de restricción se hicieron por la técnica de hervido (Sambrook *et al.*, 1989). Las minipreparaciones para secuenciación se realizaron mediante el "Qiagen Spin Miniprep Kit" (Diagen GmbH). Para las midipreparaciones de ADN plasmídico se emplearon el "Qiagen Plasmid Midi Kit" (Diagen GmbH), partiendo de 25 a 30 ml de cultivo o.n., o el "Qiagen Plasmid Kit, tip 20", de la misma firma, partiendo de 5 ml de cultivo. Los ADNs así obtenidos se emplearon para secuenciación y para la fabricación de sondas de hibridación.

Para las distintas digestiones con enzimas de restricción se utilizaron enzimas procedentes de Life Technologies y New England Biolabs, en los buffers 10X correspondientes de cada compañía.

Todos los fragmentos de ADN a ser empleados como sondas en los ensayos de hibridación o para clonado se purificaron a partir de geles de agarosa mediante el kit Qiaex (Qiagen) o mediante el "Concert Rapid Gel Extraction System" (Life Technologies). En el caso de los fragmentos clonados, los insertos fueron previamente escindidos del vector mediante digestión con enzimas de restricción, para luego proceder a su separación en corridas electroforéticas y posterior elución de las bandas.

III.2. ANÁLISIS PROTEICOS

Producción de anticuerpos anti-pecanex

Se sintetizó un péptido PX1 de quince aminoácidos con la secuencia HRWVPCSRDPSTRSH, correspondiente a residuos ubicados en el extremo carboxilo terminal de la proteína pecanex de rata (ver figuras IV.14A y IV.17). La elección de esa secuencia se basó en análisis realizados con el programa de computación SEQAID II, que señaló esa región de la presunta proteína como potencialmente antigénica, tanto por su secuencia como por conformación. El péptido fue sintetizado por la empresa Sequence Laboratories Göttingen (Alemania) y acoplado a hemocianina de lapa, de acuerdo con los procedimientos estándar. Se inocularon dos conejos con este péptido, y se recogió el suero de ambos individuos mediante sangrado.

Purificación del anticuerpo anti-PX1

Preparación de la columna de inmunocromatografía

Con el objeto de purificar el anticuerpo del suero policlonal, 30 mg de bromuro de cianógeno-sefarosa fueron suspendidos en 1,5 ml de HCl 10mM, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó (todas las centrifugaciones se realizaron por 5 minutos a 500 g, 4 °C). El precipitado se resuspendió en 1,5 ml de buffer de unión (2,92 g de NaCl y 2,1 g de NaHCO₃ por cada 100 ml de agua, pH 8,8), se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y se volvió a centrifugar. Se resuspendió el precipitado en 1,5 ml de buffer de unión conteniendo aproximadamente 800 µg del péptido PX1 [la concentración del péptido se determinó por la técnica de BCA, mediante el “BCA Protein Assay Reagent” (Pierce)], se incubó durante dos horas a temperatura ambiente

en agitador rotatorio, se centrifugó, y el precipitado fue resuspendido en glicina al 0,2 M en buffer de unión. Se volvió a incubar por dos horas en agitador rotatorio, se centrifugó y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de buffer de unión. Luego de una nueva centrifugación, se resuspendió en 1 ml de buffer 1 de lavado (0,82 g de $C_2H_3NaO_2$, 2,92 g de NaCl cada 100 ml de agua, pH 4), y se centrifugó. Se repitió este paso dos veces más, se resuspendió en 1 ml de buffer 2 de lavado (50 μ l de Tritón X-100 por cada 10 ml de PBS), luego en buffer 3 de lavado (dilución 1:5 del buffer 2 de lavado en PBS), y finalmente en buffer 4 (0,292 g de NaCl por cada 10 ml de PBS), centrifugando inmediatamente luego de cada resuspensión. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 1 ml de buffer de separación (2,91 g de KSCN por cada 10 ml de buffer fosfato: Na_2HPO_4 10mM, pH ajustado a 7,4 con NaH_2PO_4 10mM), se centrifugó, y el precipitado se lavó tres veces en 1 ml de PBS.

Purificación del anticuerpo anti-PX1 por inmunoafinidad

Una vez preparada la columna, se añadieron 100 μ l del suero policlonal, y se incubó durante dos horas en agitador rotatorio a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 minutos a 500 g, 4 $^{\circ}$ C, y el precipitado se lavó 3 veces con PBS. La matriz fue resuspendida en 75 μ l de buffer de elución (glicina 100 mM, pH 2,5), se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugó del mismo modo que anteriormente. Se recuperó el sobrenadante, al que se añadió de inmediato 1/10 del volumen de buffer de neutralización (Tris-HCl 1 M, pH 9,5). Este paso se repitió durante ocho veces consecutivas. Las ocho fracciones colectadas se centrifugaron separadamente 5 minutos a 12.000 g, 4 $^{\circ}$ C, y los sobrenadantes se recuperaron a tubos nuevos, de modo de evitar la sefarsa que hubiese podido ser arrastrada durante la elución. La verificación de la elución correcta del anticuerpo, así como la determinación de las fracciones que lo contenían en mayor concentración y grado de pureza, se realizó mediante ensayos de Western-blot.

Subclonado de la región codificante del clon de *pecanex* de rata en un vector de expresión de *Escherichia coli* e inducción de la proteína de fusión

Para el subclonado del fragmento de ADNc de *pecanex* correspondiente a la región codificante de nuestro clon (a esta región, de 50 aminoácidos, le llamaremos PX), se

escogió el vector pGEX-5x-3 (AMRAD, Australia). Este vector dirige la síntesis del producto de interés como una proteína de fusión con glutathion-S-transferasa (GST). Previo al clonado, el vector fue desfosforilado mediante el uso de fosfatasa alcalina (Boehringer), según las instrucciones del fabricante. El subclonado se realizó siguiendo el marco de lectura, en el sitio de restricción *EcoR* I del vector, como ya fue descrito (Sambrook *et al.*, 1989). Se transformaron células competentes XL1-Blue. La orientación correcta de los clones se estudió mediante análisis de restricción y electroforesis en geles de agarosa.

Para la inducción de la síntesis de la proteína de fusión se utilizaron clones conteniendo el vector con el inserto en la dirección correcta (pGEX-PX), así como un clon conteniendo el vector con el inserto en la dirección incorrecta, para ser empleado como control negativo (pGEX-PX'). Los clones se cultivaron en medio LB-ampicilina a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Se les indujo con IPTG (isopropil-β-D-thiogalactopiranosido) a concentración final 1 mM y se prosiguió con la incubación. A las cuatro horas de la inducción, los cultivos se centrifugaron a alta velocidad y las proteínas se resuspendieron en buffer de Laemmli (Laemmli, 1970). La síntesis de la proteína de fusión se confirmó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y se reconfirmó por Western-blot.

Extracción de proteínas

Para la obtención de proteínas totales, los tejidos o las poblaciones celulares procedentes del elutriador fueron directamente lisados en buffer de Laemmli. Con el fin de obtener proteínas de membrana, las poblaciones celulares fueron sometidas a diferentes técnicas de fraccionamiento (ver a continuación).

Fraccionamientos celulares para la obtención de proteínas de membrana

Fraccionamientos con Tritón

Para los fraccionamientos con Tritón X-100 se empleó un protocolo similar a los descritos anteriormente (Alzheimer *et al.*, 1999). Las suspensiones celulares fueron lisadas en un buffer Tris-HCl 10mM (pH 7,4) conteniendo EDTA 4 mM, DTT 0,5 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoride (PMSF) 1 mM, inhibidor de tripsina de soya (0,1 mg/ml) y Tritón X-100 al 1%. El detergente permite solubilizar las proteínas de membrana (Deutscher, 1990), las que son recogidas en la fracción sobrenadante. Luego de una incubación de 10 minutos en hielo, la suspensión fue centrifugada por 10 minutos a 3000 g, 4 °C, y se conservó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en Tris 10 mM (pH 7,8), MgCl₂ 4 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 1 mM, inhibidor de tripsina de soya (0,1 mg/ml), y 10 unidades por ml de DNasa I. Luego de la digestión (10 minutos en hielo), las proteínas no solubles fueron precipitadas por centrifugación durante 10 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante se combinó con el del paso anterior. Los precipitados se resuspendieron directamente en buffer de Laemmli. Los sobrenadantes se precipitaron con igual volumen de metanol y un cuarto de volumen de cloroformo. Luego de centrifugar 5 minutos a máxima velocidad, la fase inferior se precipitó con tres cuartas partes del volumen original de metanol, se centrifugó durante 1 minuto y se resuspendió en buffer de Laemmli. Los precipitados y sobrenadantes fueron luego analizados mediante electroforesis en minigeles unidimensionales de poliacrilamida (SDS-PAGE; Laemmli, 1970).

Fraccionamientos con urea

Las fracciones celulares procedentes del elutriador fueron lisadas en un buffer conteniendo urea en concentración 8 M y DTT 1 mM. Se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos, 4 °C, en un rotor SW 60 en ultracentrífuga Beckman L7-80 (Beckman Instruments).

Los precipitados y sobrenadantes se dializaron en contenedores separados o.n. contra PBS, y se trataron de igual modo que los procedentes de los fraccionamientos con Tritón. Esta técnica permite recoger las proteínas de membrana en la fracción correspondiente al precipitado.

Electroforesis de proteínas y Western-blots

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en minigeles unidimensionales de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. La transferencia se realizó a membranas de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell) por el método de transferencia semi-seca (Matsudaira, 1987) o líquida. Para las transferencias semi-secas se utilizó un equipo "Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (BioRad). Las transferencias en tanque se efectuaron mediante el "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell" de la misma firma, siguiendo las instrucciones del manual de operación del equipo. Como buffer de transferencia se utilizó, en ambos casos, CAPS 50 mM (pH 10), ácido 3-mercaptopropiónico 1 mM, y metanol al 10%. Para el caso de las transferencias líquidas, el buffer contenía además SDS al 0,05%. La eficiencia de la transferencia se evaluó, en todos los casos, tiñendo las membranas transferidas con una solución de Rojo Ponceau-S (Sigma) al 0,5% en ácido acético (1%).

Las membranas fueron bloqueadas o.n. a temperatura ambiente en TBST (140 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) conteniendo leche en polvo al 10%. Luego de lavarlas algunos segundos en TBST, fueron incubadas con el suero anti-PX1 a dilución 1:15.000 ó con el anticuerpo purificado a dilución 1:500 en TBST por dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno en TBST, y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado a peroxidasa) 1:10.000 en TBST-leche 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos nuevos lavados de 10 minutos cada uno en TBST. Los anticuerpos unidos se detectaron por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para los experimentos en que se empleó el suero sin purificar, se realizó, en paralelo, un experimento de competición con el objeto de evaluar si la reacción era específica para nuestro anticuerpo. En estos casos, el mismo volumen de suero que el usado en el experimento sin competición (dilución 1:15.000) se incubó con 145 µg de péptido PX1 durante una hora con agitación, previo a su incubación con la membrana. El resto del

experimento se llevó a cabo en condiciones idénticas que en el caso de los experimentos sin competición. Como control de la competición se corrió, en cada caso, un carril con el lisado de un cultivo inducido de *E. coli* conteniendo el vector pGEX-PX.

Inmunohistoquímica

Secciones de crióstato de testículos de rata congelados fueron fijadas en acetona (10 minutos a -20°C) o paraformaldehído al 1 % en PBS por 3 minutos. En este último caso, los preparados se incubaron luego 10 minutos en Tritón X-100 al 0,1% en PBS, y posteriormente en glicina 0,1 M en PBS por 10 minutos. Las secciones fijadas por ambos métodos fueron luego procesadas para microscopía de inmunofluorescencia siguiendo los métodos ya descritos (Smith y Benavente, 1992b; Kralewski y Benavente, 1997), e incubadas con el anticuerpo anti-pX1 purificado por columna (diluciones 1:10 y 1:30). Luego de dos lavados de 5 minutos cada uno en PBS, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Rojo Texas (Dianova), y con el fluorocromo específico para ADN Hoechst 33258 (Hoechst; concentración final $5\mu\text{l/ml}$). Las secciones fueron luego secadas al aire, incluidas en Mowiol y cubiertas con un cubreobjetos.

Análisis por espectrometría de masas

Las proteínas de interés fueron obtenidas a partir de geles SDS-PAGE, teñidos mediante el protocolo de tinción con plata de Wray y Hancock (1981). Las bandas seleccionadas fueron cortadas manualmente con un escalpelo en cámara de flujo laminar y colocadas dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El desteñido, lavado, digestión proteolítica y extracción peptídica fueron realizados según protocolos previamente descritos (Hellman, 2000). Se digirió o.n. a 37°C con tripsina (Promega) en NH_4HCO_3

0,1 M (0,63 μg de tripsina/ μl). Las muestras conteniendo los péptidos resultantes del clivaje proteolítico fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF ("matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight"), con un espectrómetro de masas Voyager-DE-PRO (Perspective Biosystems) en el Laboratorio de Bioquímica Analítica del IIBCE (Montevideo). Las masas peptídicas medidas fueron comparadas con las masas teóricas de las digestiones proteolíticas para las proteínas disponibles en la base de datos del "National Center for Biotechnology Information", mediante el programa de software Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/cbi-bin/Profound>). La digestión teórica de las secuencias proteicas con tripsina se llevó a cabo empleando el programa Protein Prospector 3.4.1 MS-Digest (<http://www.prospector.ucsf.edu>).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. APLICACIÓN DEL " mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY" AL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

a. Patrones diferenciales de expresión génica durante la espermatogénesis

Con el objeto de definir patrones diferenciales de expresión génica durante la espermatogénesis, se trabajó con poblaciones celulares de rata altamente enriquecidas en espermatoцитos paquiténicos (profase meiótica) por un lado y espermátidas redondas (espermiogénesis) por el otro, las que fueron obtenidas mediante la técnica de elutriación (Meistrich, 1977). Habiéndose partido, en cada caso, de cinco ratas macho de cuarenta días, el rendimiento de la técnica fue, promedialmente, 2×10^7 células para la fracción espermatoцитos y 6×10^7 para la fracción espermátidas.

Los ARNs totales fueron purificados obteniéndose, en promedio, 200 μg de ARN a partir de las fracciones enriquecidas en espermatoцитos y 350 μg a partir de las fracciones enriquecidas en espermátidas. Una vez obtenidos los ARNs, se eliminó la posible contaminación con ADN mediante incubación con ADNasa libre de ARNasa. Los ARNs fueron luego sometidos a la técnica del "mRNA differential display" (DD; Liang y Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993) para la comparación de los mensajeros de ambas poblaciones celulares. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, tanto las reacciones de transcripción reversa como de PCR. Para cada combinación de iniciadores se realizaron, además, las reacciones de PCR en idénticas condiciones pero sin transcripción reversa previa, las que fueron corridas en paralelo, de modo de asegurarse que las bandas obtenidas correspondieran a ARNm y no a ADN que pudiera haber quedado como contaminante aún luego del tratamiento con ADNasa.

Se realizó el análisis en primera instancia con ocho combinaciones diferentes de iniciadores las que, de acuerdo con Liang *et al.* (1993), cubrirían aproximadamente un 10% de los ARN poliA+ expresados en un tipo celular definido. Cuando los productos de PCR de esas ocho combinaciones de iniciadores fueron desplegados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (figura IV.1), se pudo identificar un total de 268

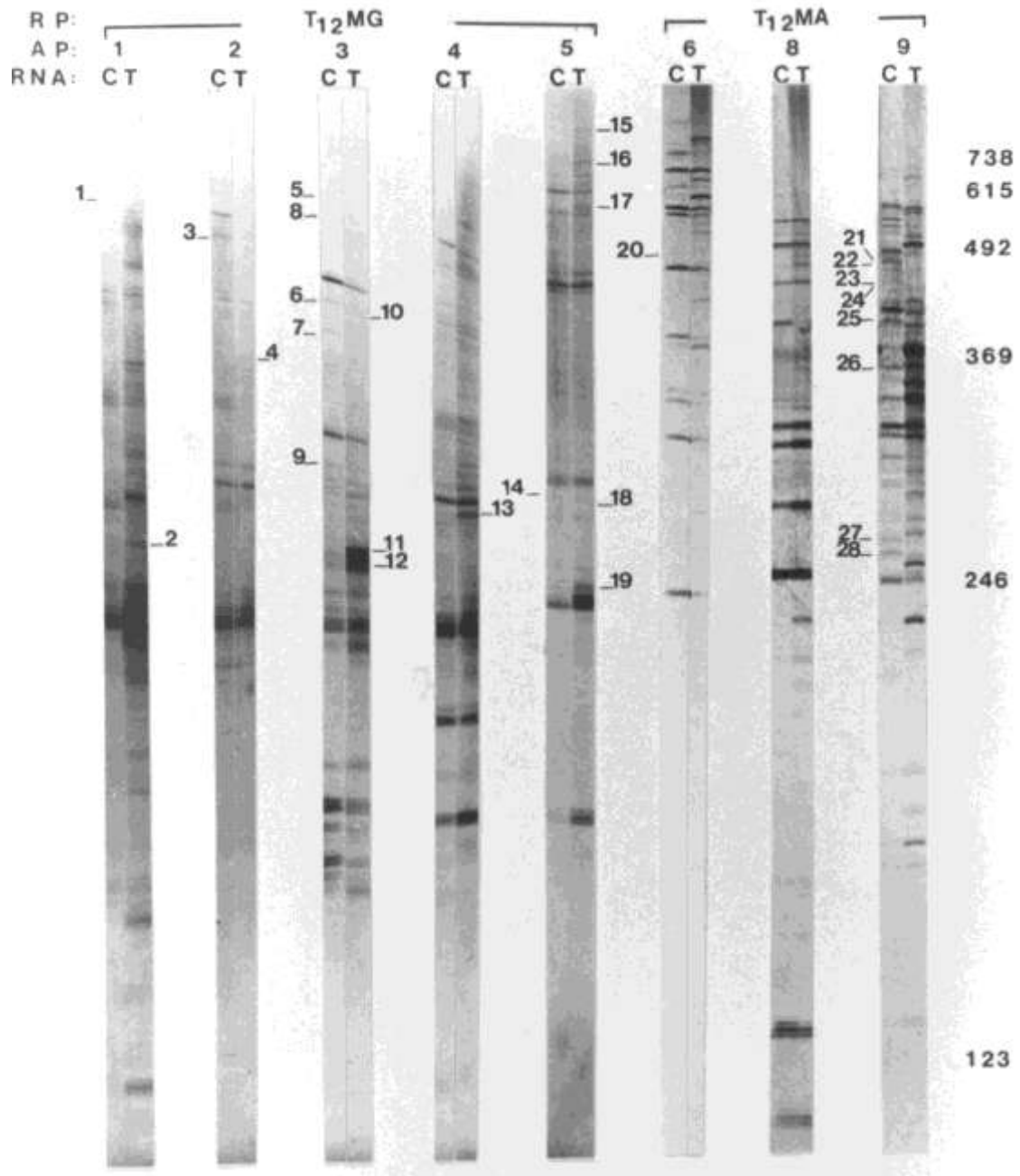


Figura IV.1. DD de ARNm de espermatocitos y espermatidas empleando ocho combinaciones de iniciadores diferentes, basadas en los iniciadores oligo-dT T₁₂MG y T₁₂MA y ocho decámeros de secuencia arbitraria. C: espermatocitos; T: espermatidas; RP: iniciador derecho ("right primer"), para unirse a la cola de polyA; AP: iniciador de secuencia arbitraria ("arbitrary primer"). Las bandas de ADNc seleccionadas para su reamplificación están numeradas del 1 al 28. A la derecha se observan los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular (escalera de 123 pb, BRL).

bandas que aparecieron en experimentos por duplicado, y claramente diferenciables del ruido de fondo. El 77% de ellas fue común a espermatoцитos y espermátidas, en tanto el 23% restante (62 bandas) resultó de expresión diferencial. De entre estas últimas, 46 (74%) fueron específicas de las espermátidas en tanto 16 (26%) fueron halladas exclusivamente en los espermatoцитos (tabla IV.1A; Geisinger *et al.*, 1996).

En una segunda instancia, se extendió el experimento a cinco combinaciones más de iniciadores. En esta etapa, de un total de 218 bandas claramente identificadas en experimentos por duplicado, 32 resultaron de expresión diferencial (14,7%). De las bandas expresadas diferencialmente, 23 (71,9%) fueron específicas de las espermátidas y 9 (28,1%) de los espermatoцитos, manteniendo prácticamente incambiadas las proporciones obtenidas previamente (tabla IV.1B).

En la figura IV.2 se observan los resultados obtenidos en experimentos por duplicado con cinco juegos de iniciadores; como se aprecia, los resultados fueron repetibles. Se observa asimismo, que para un mismo par de iniciadores, la mayor parte de las bandas resultó común a espermatoцитos y espermátidas. Los patrones de bandas resultaron completamente diferentes, en cambio, cuando se emplearon combinaciones diferentes de iniciadores. Ninguna de las 486 bandas obtenidas en total apareció en los controles negativos sin transcriptasa inversa, lo que significa que correspondían, efectivamente, a amplificación de ARNs expresados y no de ADN contaminante.

Tabla IV.1A. Bandas de ADNc de espermatoцитos y espermátidas expresadas diferencialmente, obtenidas usando ocho combinaciones de iniciadores

Iniciador derecho	iniciador izquierdo	número total de bandas	bandas expresadas diferencialmente*	bandas específicas de espermatoцитos	bandas específicas de espermátidas
T ₁₂ MG	AP1	33	2	1	1
T ₁₂ MG	AP2	20	1	0	1
T ₁₂ MG	AP3	32	9	5	4
T ₁₂ MG	AP4	26	4	0	4
T ₁₂ MG	AP5	19	5	1	5
T ₁₂ MA	AP6	26	4	1	3
T ₁₂ MA	AP8	38	8	0	8
T ₁₂ MG	AP9	74	28	8	20
Totales		268	62	16	46
Porcentaje del total		100%	23%	6%	17%
Porcentaje del total de bandas diferencialmente expresadas				26%	74%

Tabla IV.1B. Bandas de ADNc de espermatoцитos y espermátidas expresadas diferencialmente, obtenidas usando cinco combinaciones adicionales de iniciadores

Iniciador derecho	iniciador izquierdo	número total de bandas	bandas expresadas diferencialmente*	bandas específicas de espermatoцитos	bandas específicas de espermátidas
T ₁₂ MC	AP1	46	10	3	7
T ₁₂ MC	AP2	41	16	5	11
T ₁₂ MC	AP3	54	3	1	2
T ₁₂ MC	AP4	45	1	0	1
T ₁₂ MC	AP5	32	2	0	2
Totales		218	32	9	23
Porcentaje del total		100%	14,7%	4,13%	10,55%
Porcentaje del total de bandas diferencialmente expresadas				28,1%	71,9%

* Únicamente las bandas claramente distinguibles del ruido de fondo en experimentos por duplicado fueron consideradas.

Total de bandas (Tabla 1 + Tabla 2): 486

Porcentaje de bandas diferencialmente expresadas: 19,34% (94)

Porcentaje de bandas específicas de espermatoцитos, del total de bandas: 5,1% (25)

Porcentaje de bandas específicas de espermátidas, del total de bandas: 14,19% (69)

Porcentaje de bandas específicas de espermatoцитos, de las diferencialmente expresadas: **26,6%**

Porcentaje de bandas específicas de espermátidas, de las diferencialmente expresadas: **73,4%**

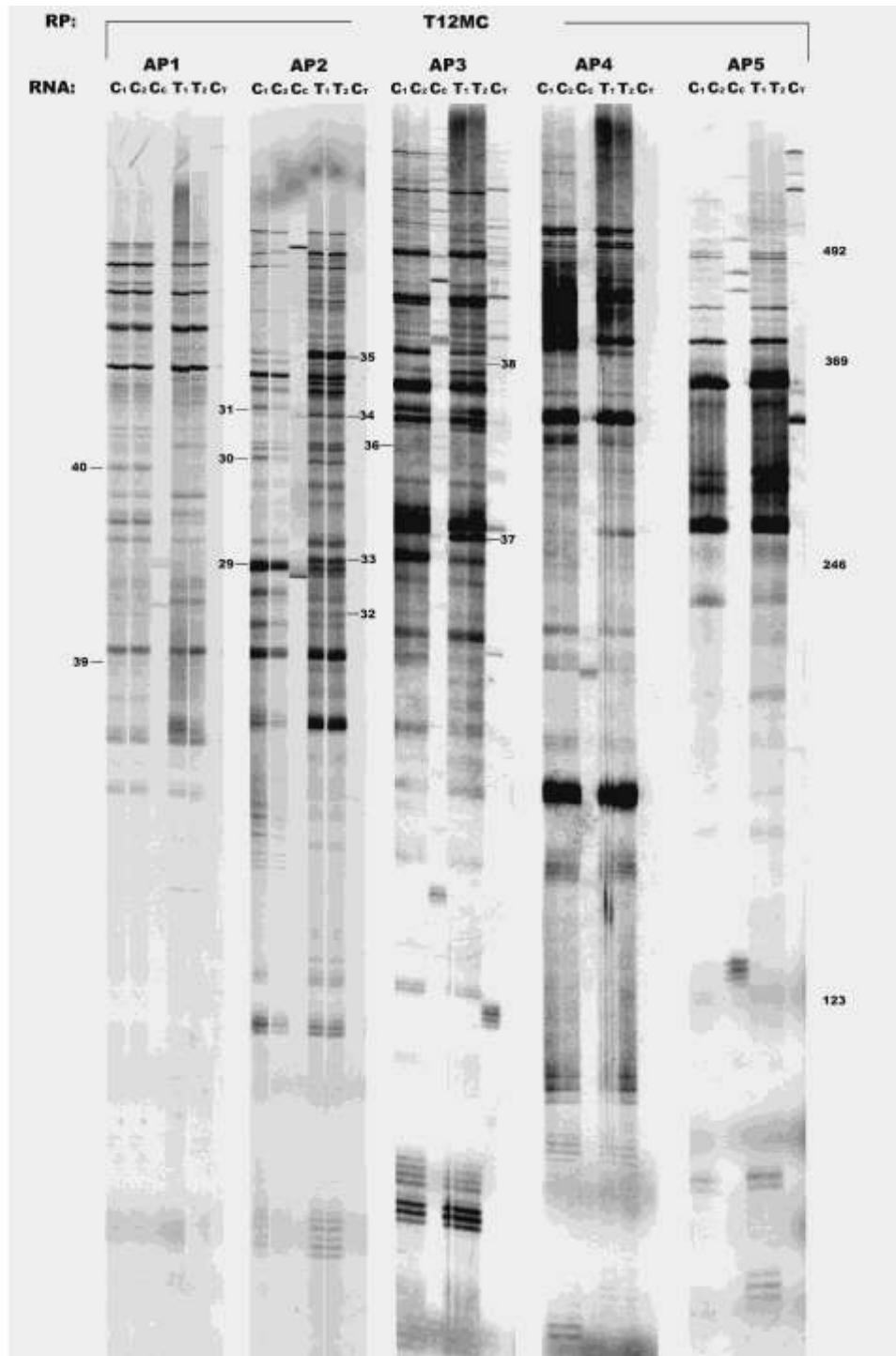


Figura IV.2. DD de ARNm de espermatocitos y espermatidas empleando cinco combinaciones de iniciadores diferentes, basadas en el iniciador oligo-dT T₁₂MC y cinco decámeros de secuencia arbitraria. Los subíndices 1 y 2 corresponden, en cada caso, a un mismo experimento realizado por duplicado. C: espermatocitos; T: espermatidas; C_c: control espermatocitos; C_T: control espermatidas; RP: iniciador derecho; AP: iniciadores de secuencia arbitraria. Las bandas de ADNc seleccionadas para su reamplificación están numeradas del 29 al 40. El marcador de peso molecular utilizado (a la derecha) es el mismo que en la figura IV.1.

b. Reamplificación, confirmación y clonado de bandas

Cuarenta bandas procedentes de los experimentos de DD, que aparecieron como específicas de uno u otro estadio en experimentos por duplicado, fueron seleccionadas para su reamplificación; para ello, se las eluyó de la acrilamida, reamplificó y corrió en geles de agarosa, según lo indicado en "Materiales y Métodos". Prácticamente todas las bandas pudieron ser reamplificadas, obteniéndose, en la gran mayoría de los casos, una banda única o fuertemente predominante (figura IV.3). El tamaño de las bandas de ADNc reamplificadas correspondió, en todos los casos, al de las bandas originales eluidas del gel de poliacrilamida. No se apreció amplificación en ninguno de los controles negativos.

Las bandas reamplificadas se eluyeron del gel de agarosa, y doce de ellas fueron marcadas radiactivamente para su utilización como sondas en ensayos de Northern-blot contra ARN de espermatoцитos, por un lado, y espermátidas, por otro, de modo de confirmar el patrón de expresión de las mismas. Siete bandas dieron una señal positiva en los ensayos de Northern-blot, confirmando el patrón diferencial de expresión observado en el DD (figura IV.4). Las cinco restantes no dieron señal. Una de las causas habituales del fracaso en la obtención de señales suele ser la menor sensibilidad del ensayo de Northern-blot en comparación con la del PCR (Liang y Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993). La proporción de señales positivas obtenidas en nuestro caso resultó, de todos modos, muy buena en comparación con los resultados informados por otros investigadores (Sun *et al.*, 1994; Sompayrac *et al.*, 1995). Las bandas no analizadas en ensayos de Northern-blot fueron conservadas a -20°C para futuros análisis.

Las siete bandas positivas fueron clonadas en un vector pGEM-T (Promega). En algunos casos se clonó también, en paralelo, en un vector diseñado para el clonado de productos de PCR, basado en el gen represor cI del bacteriófago lambda (GenHunter). Si bien ambos vectores funcionaron correctamente, se eligió el pGEM-T dado que resultó más práctico (ver "Materiales y Métodos"). El ADN de los clones resultantes del clonado de cada banda fue purificado y analizado por medio de enzimas de restricción, de modo de seleccionar los clones que contuviesen insertos del tamaño esperado.

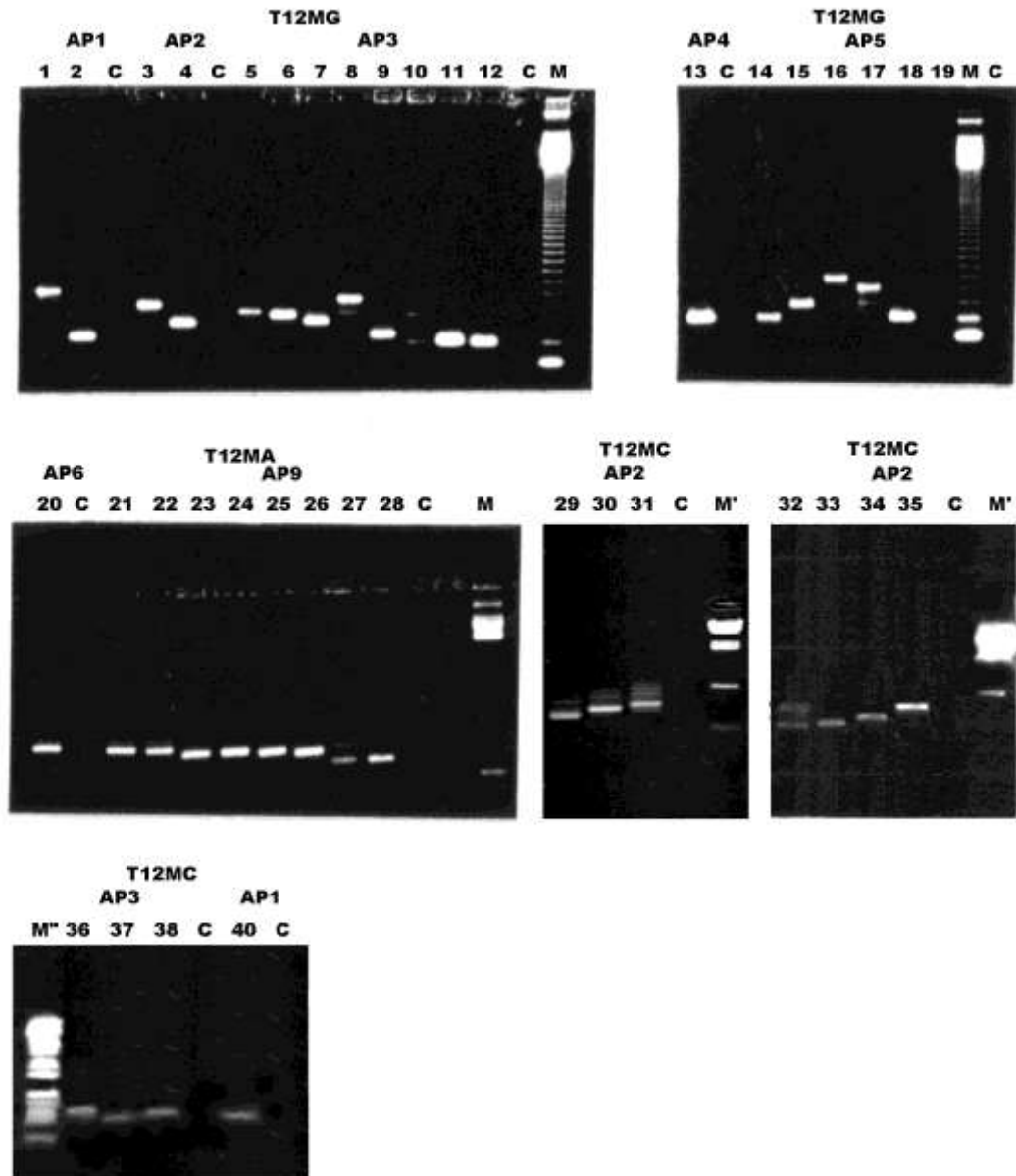


Figura IV.3. Reamplificación de bandas del DD. Las bandas de ADNc indicadas en las figuras IV.1 y IV.2 fueron reamplificadas por PCR y corridas en geles de agarosa al 1,5%. El tamaño de las bandas reamplificadas correspondió al de las bandas originales eluídas del gel de poliacrilamida. Los números encima de cada carril se corresponden con los de las dos figuras anteriores. Los carriles indicados con una letra C corresponden a los controles negativos sin ADN, para cada juego de iniciadores. M (escalera de 123 pb, BRL), M' (ADN del bacteriófago λ digerido con la enzima Hind III) y M'' (ADN del bacteriófago λ digerido con la enzima Pst I) designan, en cada caso, al marcador de peso molecular.

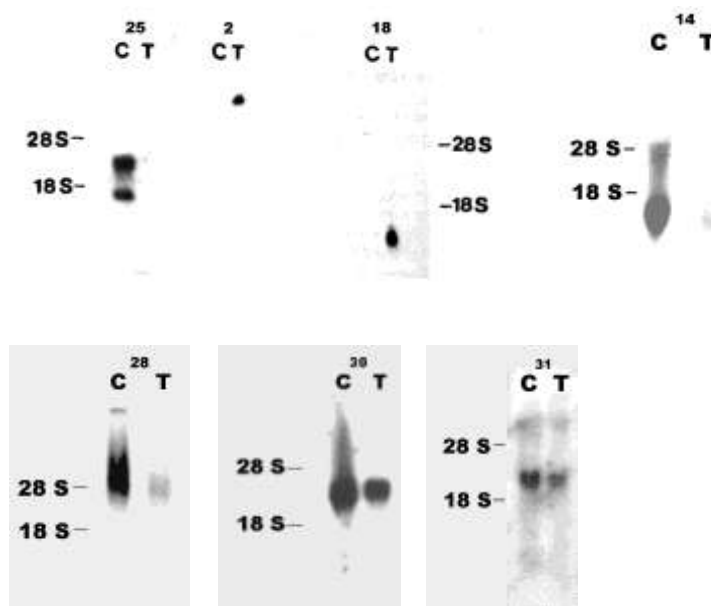


Figura IV.4. Confirmación de las bandas diferenciales del DD. Las bandas reamplificadas 25, 2, 18, 14, 28, 30 y 31 fueron marcadas con α [32 P]dATP y empleadas como sondas en ensayos de Northern blot. Cada carril contiene 40 μ g de ARN total de espermátocitos (C) y espermátidas (T) respectivamente. Se indican las posiciones de los ARNr 28 S y 18 S como marcadores de peso molecular.

c. Diseño de un método sencillo para la diferenciación de clones de igual tamaño pero distinta secuencia: Adaptaciones a la técnica del "mRNA differential display"

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. En efecto, se ha visto que cada banda obtenida del gel de poliacrilamida corresponde, en general, a por lo menos tres secuencias diferentes, aunque del mismo tamaño. Esto, si bien no invalida en lo absoluto el uso de la técnica, obliga a introducir pasos adicionales, ya que las bandas de ADNc deben ser re-testadas luego del clonado, de modo de seleccionar aquellos clones que efectivamente

correspondan a los genes que son expresados diferencialmente. El testado por Northern-blot de cada clon resulta prácticamente imposible, ya que deberíamos analizar un gran número de clones para cada una de las bandas. Esto, además de ser muy tedioso, involucraría el uso de grandes cantidades de ARN (generalmente no disponibles) y material radiactivo. Por este motivo, se han diseñado diferentes estrategias de modo de simplificar esta etapa de análisis (Li *et al.*, 1994; Callard *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996). No obstante, la mayoría de las estrategias propuestas, aunque más simple que los Northern-blots, sigue siendo tediosa e implica el uso de material radiactivo y, en algunos casos, grandes cantidades de ARN (Li *et al.*, 1994). Además, algunas de ellas no dan buen resultado si el ADNc predominante en la banda no es el producto diferencial (Callard *et al.*, 1994). Una adaptación de la técnica de "single strand conformation polymorphism" (SSCP) ha sido descrita como método para el análisis de las bandas amplificadas diferencialmente (Mathieu-Daudé *et al.*, 1996). Sin embargo, su aplicación es difícil y las condiciones del protocolo deben ser ajustadas para cada muestra. Más aún, como resultado de la migración de cada producto de PCR se obtienen dos bandas (o tres, una para cada hebra y una para la doble hebra), lo que puede complicar la interpretación de los resultados.

De entre las estrategias descritas, decidimos probar la técnica de "Reverse-Northern-dot blot" (Zhang *et al.*, 1996, ver "Materiales y Métodos") como método de diferenciar, del total de clones obtenidos, aquellos que contuvieran como inserto la secuencia de interés. Sin embargo, la técnica no resultó exitosa. Únicamente obtuvimos señal claramente positiva y discriminable del ruido de fondo con los clones provenientes del clonado de la banda 2, que posteriormente supimos que contenía en su interior un fragmento de ADN medianamente repetido del tipo de las secuencias "SINE" y, por lo tanto, muy representado en el ARN (ver capítulo IV.2.d). No pudimos, en cambio, detectar de manera inequívoca los clones correspondientes a mensajeros con niveles normales de expresión (datos no mostrados). Ello nos permitió deducir que la sensibilidad de la técnica era insuficiente, al menos con las cantidades de ARN de que disponíamos para la síntesis del ADNc a ser empleado como sonda.

Ante la insuficiente sensibilidad del "Reverse-Northern-dot blot", y frente a lo poco prácticas que resultaban las otras alternativas disponibles, nos vimos en la necesidad de

idear una solución que nos permitiese evitar la tediosa tarea de realizar múltiples ensayos de Northern-blot, protección a ARNasa o secuenciación (inviabiles en nuestro medio) y, por lo tanto, ahorrar material radiactivo y tiempo. A tales efectos, hemos adaptado una técnica simple de electroforesis basada en el uso de bisbenzimidida (colorante fluorescente que se liga al ADN) acoplada covalentemente a polietilenglicol (PEG) 6000. El colorante bisbenzimidida se une preferencialmente a los motivos A+T y el PEG, que es una molécula pesada, retarda la migración de las secuencias de ADN en el gel, en relación directa con su contenido en A+T. Esta técnica, desarrollada para la detección de variaciones de secuencia en bacterias (Wawer *et al.*, 1995), es capaz de resolver diferencias en el contenido en A+T menores al 1%. En consecuencia, los productos del clonado de bandas del DD resultaron fácilmente distinguibles ya que, aunque el producto de interés y los contaminantes fuesen del mismo tamaño, diferían por completo en su secuencia.

Se hicieron minipreparaciones de ADN a partir de varios clones resultantes del clonado de cada banda del DD, y los insertos fueron escindidos mediante digestión con las enzimas de restricción *Pst* I y *Sac* II. Los plásmidos digeridos fueron sometidos a electroforesis directamente, sin previa purificación de las bandas. Las condiciones de electroforesis fueron las descritas en "Materiales y Métodos". Se efectuaron, en cada caso, corridas en paralelo en geles de agarosa convencionales y en geles de agarosa conteniendo bisbenzimidida/PEG. Aunque sospechábamos que las corridas electroforéticas realizadas sin previa purificación de las bandas podrían no resultar, ya que el plásmido migrando en la parte superior del gel secuestraría el colorante, nuestros resultados indican que ello no ocurre y que, en consecuencia, las corridas pueden efectuarse directamente luego de la digestión (figura IV.5). Los resultados fueron confirmados mediante reacciones de secuencia (ver pie de figura IV.5), y la migración de las diferentes bandas fue consistente con el comportamiento esperado de acuerdo con su contenido en A+T.

Mediante este método, de uso muy simple, pudimos separar los clones obtenidos en subpoblaciones de acuerdo a su contenido en A+T con altísima sensibilidad, de un modo mucho más sencillo y económico que efectuando innumerables reacciones de Northern-blot o secuenciación.

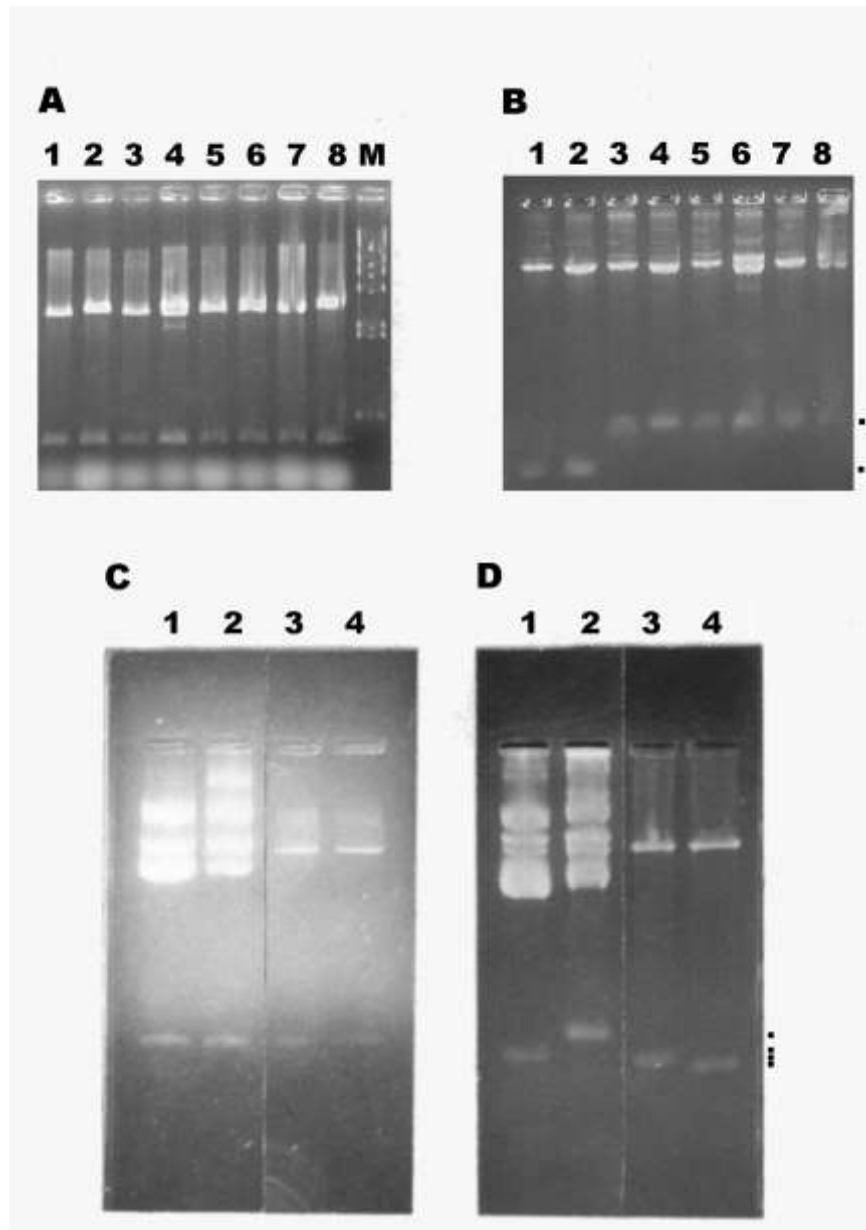


Figura IV.5. Análisis de los productos de clonado de bandas del DD en geles conteniendo bisbenzimidida/PEG. Minipreparaciones de ADN plasmídico conteniendo las bandas del DD clonadas fueron digeridas con *Pst* I y *Sac* II y corridas en geles de agarosa al 2%. Se muestran los resultados obtenidos con una banda clonada de 420 pb (**A, B**) y con otra de 355 pb (**C, D**), corridas en geles convencionales de agarosa (**A, C**), y en geles conteniendo bisbenzimidida/PEG en paralelo (**B, D**). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio del modo habitual. En **B** y **D** se cargó el doble de ADN por carril que en **A** y **B**. El contenido en A+T de las bandas en los diferentes carriles de las figuras **C** y **D** es el siguiente: 1: 60,06%; 2: 64,93%; 3: 59,5%; 4: 48%. La secuenciación reveló que la bandas de los carriles 1, 2 y 4 tenían exactamente el mismo tamaño, en tanto la del carril 3 poseía dos bases menos. Los puntos a la derecha de las figuras B y D indican las diferencias de migración entre las bandas.

La separación en geles con bisbenzimidida/PEG nos permitió obtener entre un mínimo de una y un máximo de cinco subpoblaciones de ADNc diferentes para el producto de clonado de cada banda procedente del DD (Geisinger *et al.*, 1997).

d. Reconfirmación de bandas diferenciales

Con el objeto de identificar aquellos clones que reconfirmaran el patrón de expresión diferencial obtenido con la banda del DD previo al clonado, se seleccionaron, para cada una de las siete bandas diferenciales clonadas, representantes de las distintas subpoblaciones de clones separadas mediante la técnica de bisbenzimidida/PEG. Los insertos fueron escindidos del vector por medio de digestión con enzimas de restricción, y marcados para su utilización como sondas en ensayos de Northern-blot contra ARN total obtenido a partir de poblaciones celulares enriquecidas en espermátocitos paquiténicos por un lado, y espermátidas redondas por otro. Como control negativo se incluyó, en todos los casos, un carril conteniendo ARN total extraído de hígado de rata.

Se logró reproducir la señal diferencial en los Northern-blots con cinco de las bandas, correspondientes a los números 14, 25, 28, 30 y 31 (ver figuras IV.1 a IV.3). Una de las dos bandas restantes, la número 18, no dio señal, a partir de lo cual se podría interpretar que el fragmento que se clonó de modo preferencial, a pesar de poseer el tamaño correcto, no correspondió al ADNc expresado diferencialmente. La otra banda que no reprodujo la señal obtenida en el primer experimento de Northern-blot fue la número 2, que apareció en el primer experimento de Northern-blot como diferencialmente expresada en el ARN de espermátidas. Sin embargo, una vez secuenciada, exhibió la presencia de un elemento medianamente repetido de tipo ID (esta última banda será analizada en el capítulo IV.2.d).

e. Discusión

Se dispone actualmente de una gama de técnicas para la identificación de genes expresados diferencialmente. Aparentemente, ninguna de ellas puede ser considerada la mejor, sino que la elección del método debería depender de las características particulares de cada experimento y de cada proyecto. Sin duda, el análisis de

microarreglos es, hoy en día, la técnica más poderosa para la identificación de genes de expresión diferencial. Sin embargo, sólo es aplicable al estudio de organismos cuyos genomas hayan sido total o parcialmente secuenciados, y para los cuales existan microarreglos disponibles y, aún en estos casos, se trata de una tecnología muy costosa. Además, los microarreglos se diseñan, por lo general, exclusivamente basados en los ARNm, de modo que no resultan informativos en relación a ARNs regulatorios, por ejemplo. La tecnología de microarreglos no estaba accesible al momento de dar inicio este proyecto; para el caso particular de la rata, recién existen actualmente microarreglos conteniendo secuencias correspondientes a ocho mil genes (aproximadamente una cuarta parte de los genes expresados).

Con respecto al "mRNA differential display", a pesar de los problemas ya discutidos (ver "Introducción"), posee una ventaja significativa por encima de los otros métodos para comparar ARNs mensajeros: es la técnica más simple, no requiriendo reactivos o materiales especiales (incluso los iniciadores de secuencia arbitraria pueden ser sustituidos por otros oligonucleótidos de que se disponga). Esto, en nuestra opinión y también en la de otros investigadores (Matz y Lukyanov, 1998), convierte al DD en un método de uso muy conveniente, al menos en los casos en que se esperan diferencias pronunciadas entre las poblaciones celulares a comparar, y que no es necesario detectar la totalidad de los ARNs de expresión diferencial (si ese fuera el caso, podría ser recomendable el uso del SSH e, inclusive, la realización en paralelo de más de una técnica).

La utilización del "mRNA differential display" resultó, en nuestra experiencia, muy útil para el análisis de la expresión génica diferencial en un proceso complejo de diferenciación como es la espermatogénesis, permitiéndonos la identificación de un importante número de bandas de expresión diferencial. De entre las bandas analizadas, algunas correspondieron a las secuencias homólogas de rata de genes previamente vinculados con la espermatogénesis en otras especies, lo que nos permitió validar la técnica (ver capítulo IV.2.a). Por otra parte, hemos podido identificar secuencias nuevas, no caracterizadas previamente, y confirmado que, efectivamente, se trataba de

secuencias de expresión diferencial durante la espermatogénesis (éstas serán analizadas en los capítulos IV.2.b y c).

El DD nos permitió, además, la identificación de características generales de la expresión génica, determinando la presencia de un alto número de bandas en los carriles correspondientes al ADNc de las espermátidas redondas pero ausentes en los de los espermatoцитos. Estos ADNc corresponderían a genes transcritos durante las primeras etapas de la espermiogénesis. Un número menor de bandas fue hallado exclusivamente en los espermatoцитos, correspondiendo a genes que se expresarían durante el paquiteno o en etapas previas de la meiosis. La identificación de un elevado porcentaje de bandas específicas de las espermátidas en comparación con los espermatoцитos coincide con los resultados de intentos previos de aislamiento a gran escala de ADNc específicos de la espermatogénesis, que empleaban como estrategia el análisis diferencial de genotecas de testículo (Thomas *et al.*, 1989; Höög, 1991). Nuestros experimentos, más exhaustivos que los estudios anteriores (ya que abarcarían más de un 15% de los genes expresados), brindan apoyo a la noción de que existen activos niveles de transcripción durante los estadios posmeióticos de la espermatogénesis de los mamíferos, y se oponen a las antiguas creencias, que sostenían que las espermátidas eran transcripcionalmente inactivas o casi inactivas. Este concepto se basaba fundamentalmente en los datos conocidos de la línea germinal de *Drosophila*, en que prácticamente no existe transcripción posmeiótica (revisiones en Willison y Ashworth, 1987; Hecht, 1993), y en análisis autorradiográficos cuantitativos con uridina tritiada en los que no se tenía en consideración correctamente el valor C de espermatoцитos y espermátidas (Kierszenbaum y Tres, 1974). Sin embargo, Geremia y colaboradores (1977), luego de corregir las diferencias en el contenido de ADN de los distintos tipos celulares, informaron que las tasas de incorporación de uridina tritiada en el ARN por parte de los espermatoцитos paquiténicos y las espermátidas redondas eran equivalentes, aunque esos resultados nunca fueron confirmados.

Por su parte, la adaptación de una técnica basada en el uso de bisbenzimidida/PEG nos permitió separar en subpoblaciones los clones obtenidos, de acuerdo a su contenido en A+T. Esta técnica tiene altísima sensibilidad, y es mucho más sencilla y económica que el efectuar innumerables reacciones de Northern-blot o secuenciación (Geisinger *et al.*,

1997). Es además, en nuestra opinión, mucho más simple y económica que la mayoría de las alternativas propuestas por otros investigadores, como lo demuestra la gran aceptación que nuestra propuesta ha tenido entre los diferentes usuarios del DD en distintos laboratorios de todo el mundo. Si bien nosotros hemos utilizado esta técnica para la separación de las bandas clonadas, es importante señalar que la misma podría también ser empleada para analizar las bandas reamplificadas previo a su clonado, de modo de saber si son homogéneas o no. De ese modo, se podría separar las bandas en aquellas que son puras y, por tanto, se podrían clonar directamente, y las que deberían ser purificadas de la agarosa previo al clonado.

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE GENES DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS, IDENTIFICADOS MEDIANTE EL DD

a. ADNc identificados

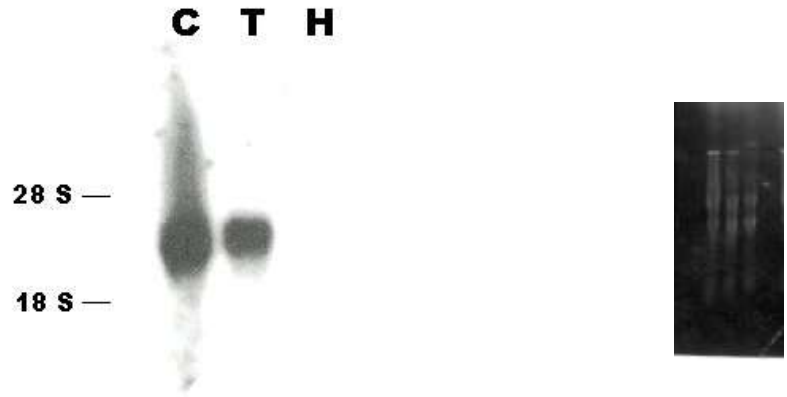
Homólogo de rata del gen *Tlk* (banda 30)

La hibridación utilizando como sonda uno de los clones resultantes del clonado de la banda número 30 (ver figuras IV.2 y IV.3), que había sido seleccionada como de expresión diferencial de los espermátocitos, dio una señal muy fuertemente positiva tanto en el ARN procedente de espermátocitos paquiténicos como de espermátidas redondas, siendo la intensidad de la misma prácticamente el doble en los espermátocitos que en las espermátidas. No se apreció señal alguna en el control negativo correspondiente a ARN de hígado (figura IV.6A).

La banda clonada, que posee un tamaño de 225 pb, fue secuenciada (figura IV.6B). Del análisis de la secuencia en las bases de datos Genbank/EMBL se desprende que presenta 93,7% de identidad a lo largo de 222 nucleótidos con un clon de ADNc correspondiente a la región 3' no traducida del gen que codifica para la proteína Tlk ("Tousled-like kinase", ver más abajo), una serín/treonín kinasa de *Mus musculus* (Shalom y Don, 1999; figuras IV.6C y IV.6D).

Mediante hibridación *in situ* se ha observado que, en el testículo normal del ratón, *Tlk* se expresa en los espermátocitos paquiténicos principalmente, y a menor nivel en las espermátidas redondas. Han sido detectados cuatro transcritos diferentes, de 3,9, 3,2, 2,1 y 1,6 kb, respectivamente. Al menos uno de estos transcritos, el de 3,2 kb, es testículo-específico (Shalom y Don, 1999), en tanto la expresión del de 3,9 kb ha sido detectada en todos los tejidos analizados, aunque es mucho mayor en el testículo. Los distintos transcritos difieren entre sí en su región 3' no traducida, la que resulta del uso de diferentes sitios de poliadenilación, y en la longitud de la región 5'. El tamaño de la

A.



B.

**GACCGCTTGTGAATGCTTCTCTCACCTCAGTAGGGAGAAACGGGGTTCTGAGATGCGTGGGTTTT
GCCATCGGACAAAGAATGAGGTTAGAAGACCGCAGTTTGGAGTCTCTAGGTTTTCAGATATTTCTT
CACAAATTTGAACACTTGACGGTTGTCCCTTTAATTTATTTGAAGTGCTATTTTTTAAATAAAGGTT
CATCTGTCCATGCAAAAAAAAAAAAA**

C.

EM_MUS:AF045252 AF045252.1 Mus musculus clone 2b tous1 (3745 nt)
initn: 966 init1: 537 opt: 960 Z-score: 682.1 bits: 137.5 E(): 5e-31
93.694% identity (96.296% ungapped) in 222 nt overlap (9-224:3517-3738)

```

                                10      20      30
                                GACCGCTTGTGAATGCTTCTCTCACCTCAGTAGGGAGA
                                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_MUS TGCAGCTTTCTCCTCCATCTGGTCTCCCGCGTGAATGCTTCCCTCGCCTCAGTAGGGAGA
      3490      3500      3510      3520      3530      3540

      40      50      60      70      80      90
AAC----GGGGTTCTGAGATGCGTGGGTTTTGCCATCGGACAAAGAATGAGGTTAGAAGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_MUS AACAGTGGGAGTTCTGAGATGCCTGGGTTTTGCCATCGGACAAAGAATGAGGTTAGAAGA
      3550      3560      3570      3580      3590      3600

      100      110      120      130      140      150
CCGCAGTTTGGAG--TCTCTAGGTTTTCAGATATTTCTTCACAATTTGAACACTTGACGG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_MUS CTGCAGTTTGGAGTCTCTCTGGGTTTTCAGATACTTCTTCACAATTTGAACACTTGACGG
      3610      3620      3630      3640      3650      3660

      160      170      180      190      200      210
TTGTCCCTTTTAATTTATTTGAAGTGCTATTTTTTTAAATAAAGGTTTCATCTGTCCATGC
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_MUS TTGTCCCTTTTAATTTATTTGAAGTGCTATTTTTTTAAATAAAGGTTTCATCTGTCCATGC
      3670      3680      3690      3700      3710      3720

      220
      AAAAAAAAAAAAA
      : : : : : : : : :
EM_MUS CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
      3730      3740
```

D.

```

2761 tcaacctctg gggcatccaa taacagttct tcgaat tgag accaactcct aaggccacaa
2821 actgttgagc acacacagtg gacatacggc attcagcagt gggtttggaa catagtgaat
2881 ccgaatggat ctcataaaac ctgtaccagg tgcttttatt ttcttgcttt ttttcccat
2941 ccatagagca tgacagcatt gattctcact gaggagaagc cttgggcagc tctggccagg
3001 cctcatagga aaaggtcccc cccaaagtcc cagcgtcaac ggtcaccatg ggtgggtctg
3061 tctgagtgag gaaaaaaatt aaaaagagaa aactggttcc atgtactgtg aacttggac
3121 atgcagactc agggggggtt cccctgacgg aggtgcttcc agagggaaaga atgtggactt
3181 gaaaaataca agactgggct aagtccagtg tctatattta aacttgctct tttcttttaa
3241 taaaatttag gtaacatctc ctgaaaagct ggtagcacia ggctcggctg gggatggtgt
3301 ttgacttggg aggaaaaaagt tgctactgcc attaaaggca ctagagttag tgtgtagcc
3361 ctgaataatc tcagtttcta aaaaacatgca gcttccttca cccctttttt atttttgaa
3421 gaatacattt ggtcataaag tgaaccccg attagcagat acgtggcaat gttacttccg
3481 gtcagatgca gctttctcct ccatctggtc tcccgcgtga atgcttccct cgctcagta
3541 gggagaaaca gtgggagttc tgagatgcct gggttttgcc atcggacaaa gaatgaggtt
3601 agaagactgc agtttggagt ctctctgggt tttcagatac ttcttcacaa tttgaacact
3661 tgacggttgt cccttttaatt ttatttgaag tgctattttt ttaataaag gttcatctgt
3721 ccatgccaaa aaaaaaaaaa aaaaa

```

Figura IV.6. Caracterización del patrón de expresión y análisis de secuencia de la banda 30 del DD.

A. Patrón de expresión caracterizado mediante ensayos de Northern-blot. Cada carril contiene 40 µg de ARN total de espermatozoides (C), espermátidas (T) e hígado (H), respectivamente. La figura de la derecha muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, para documentar que todos los carriles contenían cantidades equivalentes de ARN. **B.** Secuencia de la banda 30 clonada. Los iniciadores entre los que fue amplificada se destacan en negrita. La región de homología con *Tlk* se encuentra subrayada. **C.** La secuencia de la banda 30 fue comparada en el Genbank mediante el programa BLAST. Se observa el resultado de la primera correspondencia, con el gen *Tlk*. **D.** Región 3' del ADNc de *Tlk* de ratón, para mostrar la zona correspondiente a nuestro clon, que se encuentra subrayada. El codón de terminación en el ADNc de ratón se señala en negrita.

banda identificada por nosotros en los ensayos de Northern-blot de rata (algo menor de 4 kb) podría corresponder al del transcripto testículo-específico de *Tlk* de ratón, o al diferencialmente expresado en el testículo.

La proteína Tlk se encontraría asociada en el ratón con varios procesos en diferentes tejidos. En el testículo, se cree que Tlk desempeña un papel fundamental en las fosforilaciones involucradas en la regulación de la espermatogénesis (Shalom y Don, 1999). En la especie humana han sido identificados dos posibles homólogos del gen *Tlk*, cuyos productos se encontrarían vinculados a la replicación del ADN (Silljé *et al.*, 1999). Al menos uno de ellos se hallaría involucrado en la fosforilación de la histona H3 en relación con la condensación de la cromatina durante los eventos mitóticos/meióticos (Li *et al.*, 2001).

La proteína Tlk de ratón exhibe, a su vez, un nivel significativo de similitud (56,9% a lo largo de 283 aminoácidos) con la kinasa Tousled de *Arabidopsis* (de ahí el nombre de

"Tousled-like kinase"), que se asocia con varios procesos de diferenciación, incluyendo la diferenciación de los órganos reproductivos de la planta.

Nosotros hemos identificado por primera vez una secuencia parcial del gen codificante para el homólogo del gen *Tlk* de rata, demostrando su expresión en espermatoцитos paquiténicos y espermátidas redondas. Los niveles de expresión son, al igual que en el ratón, notoriamente mayores en los espermatoцитos (meiosis). No se observa, en cambio, expresión del gen en el hígado. Probablemente nuestro clon corresponda a un transcripto testículo-específico o diferencial de *Tlk*.

La secuencia correspondiente al clon probablemente testículo-específico de *Tlk* de rata ha sido ingresada al Genbank, con el número de acceso AF381288 (ver anexo II).

Homólogo de rata del gen *PMS2* (banda 31)

La hibridación empleando como sonda uno de los clones procedentes del clonado de la banda número 31 (ver figuras IV.2 y IV.3), seleccionada a partir de los experimentos de DD como diferencial de los espermatoцитos, reconoció una banda de aproximadamente 4,5 kb tanto en el ARN procedente de espermatoцитos como de espermátidas (figura IV.7A), si bien la señal fue más intensa en el carril correspondiente a los espermatoцитos. No se obtuvo señal alguna en el carril correspondiente a ARN de hígado, lo que nos indica que se trata de un gen expresado diferencialmente en el testículo y no de uno de uso doméstico.

El ADN de ese clon fue secuenciado y su secuencia comparada con las presentes en las bases de datos Genbank/EMBL. El análisis de la secuencia indica que este clon, de 285 pb (figura 7B), exhibe un 83,708% de identidad en los 178 pb de su región 5' con el ADNc del gen *PMS2* de *Mus musculus* (Baker *et al.*, 1995; figura IV.7C). La región donde se registra la identidad correspondería al codón de terminación del ARNm de *PMS2* y los 173 nucleótidos 3' inmediatamente siguientes. La zona que se encuentra a continuación, y que termina en la cola de poliA, presenta en nuestro clon de rata 97 nucleótidos, en tanto en el ADNc de ratón poseería 101 nucleótidos (Figura IV.7D). Es importante recordar que los niveles de similitud de secuencias aún entre especies

emparentadas son mucho menores en las regiones no codificantes que en las codificantes.

El producto del gen *PMS2* (ver "Introducción") se encuentra involucrado, en el ratón, en la reparación de errores de complementariedad en el ADN de algunos tejidos incluyendo línea germinal y cola de individuos adultos (Baker *et al.*, 1995), y observándose, en los mutantes, inestabilidad de microsatélites. Aparentemente, *PMS2* se encontraría implicado en la hipermutación somática (Narayanan *et al.*, 1997; Cascalho *et al.*, 1998). Los animales mutantes para el gen tienden a desarrollar sarcomas y linfomas (Qin *et al.*, 1999), así como adenomas y adenocarcinomas intestinales (Prolla *et al.*, 1998). En la especie humana, el producto del gen *hPMS2* también se ha involucrado en el desarrollo de cierto tipo de tumores, como el cáncer hereditario de colon no poliposo (Risinger *et al.*, 1995). Se ha observado en ratones mutantes para *PMS2*, que los machos son infértiles, produciendo espermatozoides anormales y presentando sinapsis aberrantes durante la profase de la primera división meiótica. Esto sugiere que *PMS2* podría estar vinculado con la reparación de errores, recombinación genética y sinapsis cromosómica que tienen lugar durante la meiosis (Baker *et al.*, 1995). Sería interesante efectuar estudios de localización mediante anticuerpos dirigidos contra la proteína *PMS2*, de modo de averiguar si la misma se encuentra formando parte de los nódulos de recombinación.

Hemos identificado por primera vez una secuencia parcial del gen *PMS2* de rata. Hemos además caracterizado por primera vez el patrón de expresión de este gen en el testículo, observando que se expresa tanto en la profase meiótica (donde su nivel de expresión sería algo mayor) como en estadios posmeióticos, no apreciándose expresión en el hígado.

La secuencia correspondiente al clon de *PMS2* de rata ha sido ingresada al Genbank, con el número de acceso AF381287 (ver anexo II).

A.



B.

**GACCGCTTGTGGGATAGAGCTCATTACAGATTGTTCTGTTTGGAGAGATGGTTTTACGTAATCTGAT
TATCGTTGTTCAAAAAGTAGCATGCTACTTTAATGTAAGTGGATCCATTTAAAAAGTGTAGCCAGGC
ATAATGGCCTGTGCTTCTGGCCTAGCTACTTGGGAGAGCCACCCCAGGAGTTTGAGACTATCCTGA
GCTACATTGGTGAGACTCTAATTCGAAGGACAAAAATATATATATATTTTGAACCTTTTCACCATGTCT
GCAAAAAAAAAAAAA**

C.

EM_RO:MM28724 U28724 MUS MUSCULUS DNA MISMATCH REPAIR (3056 nt)
rev-comp initn: 686 init1: 336 opt: 605 Z-score: 596.8 expect() 2.8e-27
83.708% identity in 178 nt overlap (283-110:2769-2946)

```

                                10      20      30
EMBOSS                        TGACCGCTTGTGGGATAGAGCTCATTACAGAT
                                ::: : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_RO: AATCTGGATGTCATCTCTCAGAAGTACACACCCCTTGTAGCATAGAGTTTATTACAGAT
      2740      2750      2760      2770      2780      2790

                                40      50      60      70      80      90
EMBOSS TGTTCTGTTTG--GAGAGATGGTTTTACGTAATCTGATTATCGTTGTTCAAAAAGTAGCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_RO: TGTTCCGTTTGCAGAGAGAAGGTTTTAAGTAATCTGATTATCGTTGTACAAAAATTAGCA
      2800      2810      2820      2830      2840      2850

                                100     110     120     130     140
EMBOSS TGCTACTTTAATGTACTGGATCCATTTAAAAAGTGT--AGCCAGGCATAATGGCCTGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_RO: TGCTGCTTTAATGTACTGGATCCATTTAAAAGCAGTGTAAAGGCAGGCATGATGGAGTGT
      2860      2870      2880      2890      2900      2910

                                150     160     170     180     190     200
EMBOSS GCTTCTGGCCTAGCTACTTGGGAGAGCCACCCCAGGAGTTTGAGACTATCCTGAGCTACA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_RO: TCCTTAGCTCAGCTACTTGGGTGATCCGGTGGGAGCTCATGTGAGCCCAGGACTTTGAG
      2920      2930      2940      2950      2960      2970

```

D.

```
actgacacac cccttgtagc atagagttta ttacagattg ttcggtttgc aaagagaagg 2820  
ttttaagtaa tctgattatc gttgtacaaa aattagcatg ctgctttaat gtactggatc 2880  
catttaaaag cagtgttaag gcaggcatga tggagtggtc ctctagctca gctacttggg 2940  
tgatccggtg ggagctcatg tgagcccagg actttgagac cactccgagc cacattcatg 3000  
agactcaatt caaggacaaa aaaaaaaga tatttttgaa gccttttaa aaaaa 3056
```

Figura IV.7. Caracterización del patrón de expresión y análisis de secuencia de la banda 31 del DD. **A.** Patrón de expresión caracterizado mediante ensayos de Northern-blot. Cada carril contiene 40 µg de ARN total de espermatozoides (C), espermátidas (T) e hígado (H), respectivamente. La figura de la derecha muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, para documentar que todos los carriles contenían cantidades equivalentes de ARN. **B.** Secuencia de la banda 31 clonada. Los iniciadores entre los que fue amplificada se destacan en negrita. La región de homología con *PMS2* se encuentra subrayada. **C.** La secuencia de la banda 31 fue comparada en el Genbank mediante el programa BLAST. Se muestra el resultado de la primera correspondencia, con el gen *PMS2* de *Mus musculus*. **D.** Región 3' del ADNc de *PMS2* de ratón. La zona correspondiente a nuestro clon se encuentra subrayada. El codón de terminación en el ADNc de ratón se señala en negrita e itálica.

Dado que tanto la banda 31 como la 30 correspondieron a los homólogos de rata de genes ya identificados en otras especies, no se continuó la investigación con ellas, priorizando la caracterización de secuencias aún no identificadas (ver más adelante).

Banda 25

La hibridación empleando como sonda un clon procedente del clonado de la banda 25 del DD (ver figuras IV.1 y IV.3) confirmó el patrón obtenido inicialmente, dando una señal positiva en forma de dos bandas de aproximadamente 4,5 y 2 kb respectivamente, en el carril correspondiente a ARN de espermatozoides (figura IV.8A). Sin embargo, la señal observada con la banda clonada resultó notoriamente más débil que la obtenida con la banda previamente al clonado (ver figura IV.4). No se apreció señal en los carriles correspondientes a ARN de espermátidas ni de hígado (control negativo), lo que nos permite afirmar que se trata de un ARNm de expresión específica de meiosis. La obtención de una señal en forma de dos bandas podría corresponder a la existencia de dos productos de procesamiento alternativo.

A.



B.

CGTGGCAATATGAATGAAGCTGTTATAAATATTATTTATAGATTAATATCTGCTAGACTTCTTGCTTTTTG
ATGATTTTCGATATTTACCCCAAAGTGGGATTGCCTAGATGATTTGTTAATTCTGTGTTTAACTTTTGG
AAATGACTTGATACATTTTCATATTAATTTAGTAGGCCAATTATAAATGAGTGTTTTTGATATCTAAGAG
CCATTTAAACGATACTTTAAAATCATGTTTTATTGGAAATTCAGGACTTTATGTTTTAGATTCCACTGAATA
ATGTTGTGGATTCCCTAAGCTGCAGAAGGAATTTGTTGTTAACATTAATTCAGATTAGAGAGCACTGTGT
GATAGTCTGTGAACCTTCAGTGAATTTCCCTCTTCTCAGGAACAGTACTATTGCCACG

C.

gi|21212152|emb|AL670603.6| Mouse DNA sequence from clone RP23-276M23 on chromosome 4, complete sequence [Mus musculus] Length = 173696
Score = 315 bits (159), Expect = 3e-83
Identities = 338/388 (87%), Gaps = 16/388 (4%)
Strand = Plus / Plus

Query: 8 ATATGAATGAAGCTGTTATAAATATTATTT--ATAGATTAATATCTGCTAGACTTCTTGC 65
Sbjct: 98459 ATATGAATGACGCTGTTATAAACATTTTTTTTATAAATAAATATCTGCTAGACTTCTTG- 98517

Query: 66 TTTTGTGATGATTTTCGATATTTACCCCAAAGTGGGATTGCCTAGATGATTTGTTAATTC 125
Sbjct: 98518 TTTTGTGATGATTTTGGATATTTACTCCAAAAGTGGGATTGC-TAGATGATTTGTTAATTC 98576

Query: 126 TGTGTTTAACTTTTGGAAATGACTTGATACATTTTCATATT-AAATTTAGTAGGCCAATTA 184
Sbjct: 98577 TGTGTTTAACTTTTGGAAAAGGACTTAATACATTTTATATTAAAATTCAGTAGACCAATTA 98636

Query: 185 TATAA-----TGAGTGTTTTTGATATCTAAGAGCCATTTAAACGATACTTTAAAATCATG 239
Sbjct: 98637 TATAAGAGCTAGAATGTTTTTAATTTTAAAGTGCCATTTAAACTATACTTTAAAATCATG 98696

Query: 240 TTTTATTGGAATTC-AGGA--CTTTATGTTTTAGATTCCACTGAATAATGTTGTGG--AT 294
Sbjct: 98697 TTTTATTGGAATTC AAGGATCTTTTATGTCTTGCCACTGAGTAATGTTCCCGAAAT 98756

Query: 295 TCCTAAGCTGCAGAAGGAATTTGTTGTTAACATTAATTCAGATTAGAGAGCACTGTG-TG 353
Sbjct: 98757 TCCTAAGCTGCAGAAGGAATTTGTTGTTAACACTAATTCAAATTAGAGAGCACCGTGTG 98816

Query: 354 ATAGTCTGTGAACCTTCAGTGAATTTTCC 381
Sbjct: 98817 ATGGCCTGTGAACCTTAGTGAACCTTCC 98844

Figura IV.8. Caracterización del patrón de expresión y análisis de secuencia de la banda 25 del DD.

A. Patrón de expresión caracterizado mediante ensayos de Northern blot. Cada carril contiene 40 µg de ARN total de espermatoцитos (C), espermátidas (T) e hígado (H), respectivamente. La figura de la derecha muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, al igual que en las figuras anteriores. **B.** Secuencia de la banda 25 clonada. Los iniciadores entre los que fue amplificada se destacan en negrita. Nótese que esta banda no fue amplificada entre un T₁₂MN y un decámero de secuencia arbitraria, sino que se amplificó utilizando el decámero en ambos extremos. La región de homología con el clon de

La secuenciación de esta banda, de 411 pb de longitud, puso de manifiesto que la misma se amplificó empleando como cebador el iniciador de secuencia arbitraria AP9 en cada extremo, y no el AP9 en un extremo y el T₁₂MN en el otro (figura IV.8B). Por lo tanto, la secuencia correspondiente a esta banda no tendría por qué ubicarse en el extremo 3' de un ARNm, sino que podría hallarse situada en cualquier región del mismo.

La búsqueda de similitudes en las bases de datos Genbank/EMBL demostraron que este clon presenta un 87% de identidad a lo largo de 388 pb con un clon de ADN genómico de *Mus musculus*, cuya ubicación corresponde al cromosoma 4 del ratón (figuras IV.8B y IV.8C). No se encontraron similitudes significativas con secuencias codificantes para productos conocidos, ni con la base de datos de ESTs. Esta secuencia, por lo tanto, representaría un transcripto nuevo de rata, y será caracterizada en un futuro.

Bandas 14, 28 y 2

Los ensayos de Northern-blot realizados tanto con la banda 14 como con la 28 dieron, en ambos casos, una señal claramente diferencial en el ARN procedente de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermatoцитos paquiténicos. El ADN de ambas bandas fue secuenciado. Al enviar la secuencia de la banda 14, de 255 pb, a la base de datos Genbank/EMBL, no dio niveles significativos de identidad con ninguna secuencia conocida. Al analizar la secuencia correspondiente a la banda 28 (de 247 pb) en cambio, dio niveles significativos de identidad con la secuencia 3' del ADNc de *pecanex* de ratón. Esto resultó llamativo, dado que *pecanex* había sido descrito, en *Drosophila*,

como un gen codificante para una presunta proteína vinculada al Sistema Nervioso (ver más adelante).

Estas dos bandas, ya sea por no dar identidad con secuencias conocidas previamente (14), o por dar un resultado inesperado (28), fueron seleccionadas para continuar el trabajo con ellas. En los capítulos siguientes nos ocuparemos en detalle de los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados con estas dos bandas, así como también con la banda 2, que resultó contener en su secuencia un elemento repetido, aparentemente vinculado a la regulación de la expresión génica tejido-específica en el testículo.

b. Identificación y caracterización de *Srsp1*, primer gen de expresión específica de la línea germinal que codifica para una proteína portadora de un tramo de homoserinas

Identificación del gen, patrón de expresión y análisis de secuencia

Los experimentos de Northern-blot efectuados empleando el producto de clonado de la banda número 14 como sonda detectaron una banda de aproximadamente 2,1 kb en el carril correspondiente a ARN de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátocitos paquiténicos (figura IV.9A). Se obtuvo asimismo una señal positiva en el carril correspondiente a ARN procedente de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátidas redondas, si bien la señal en estas últimas resultó notoriamente más débil. Se detectó también una señal, aunque mucho más débil, en el ARN extraído de testículo total; esto indica que la banda corresponde a un ARNm que se expresa diferencialmente en la línea germinal, y no en las células somáticas presentes en el testículo. No se detectó señal alguna en el ARN procedente de hígado (control negativo).

Este fragmento, de 255 pb (ver figura IV.10), no exhibió niveles significativos de similitud con ninguna secuencia de ADN presente en las bases de datos. En consecuencia, la banda clonada se empleó como sonda para el rastreo de una genoteca de ADNc de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátocitos paquiténicos. Se aislaron y secuenciaron seis clones, el mayor de ellos de 1232 pb (ver figura IV.10), y el resto (con longitudes variables entre 600 y 1200 pb) conteniendo secuencias parciales del mismo ADNc. Todos los clones secuenciados contuvieron la secuencia correspondiente al fragmento empleado como sonda.

Ensayos de Northern-blot efectuados con el fragmento más largo obtenido a partir de la genoteca de ADNc como sonda confirmaron el patrón de expresión testicular (figura IV.9B), exhibiendo una señal mucho más intensa en las células meióticas que en las posmeióticas. Resulta interesante que la hibridación contra ARN extraído a partir de diez tejidos diferentes de rata no mostró señal detectable en ningún otro tejido, incluyendo ovario y epidídimo. Una sobreexposición de cuatro días permitió distinguir

una señal positiva en el ARN de testículo total, pero no en ninguno de los otros nueve tejidos analizados (figura IV.9C).

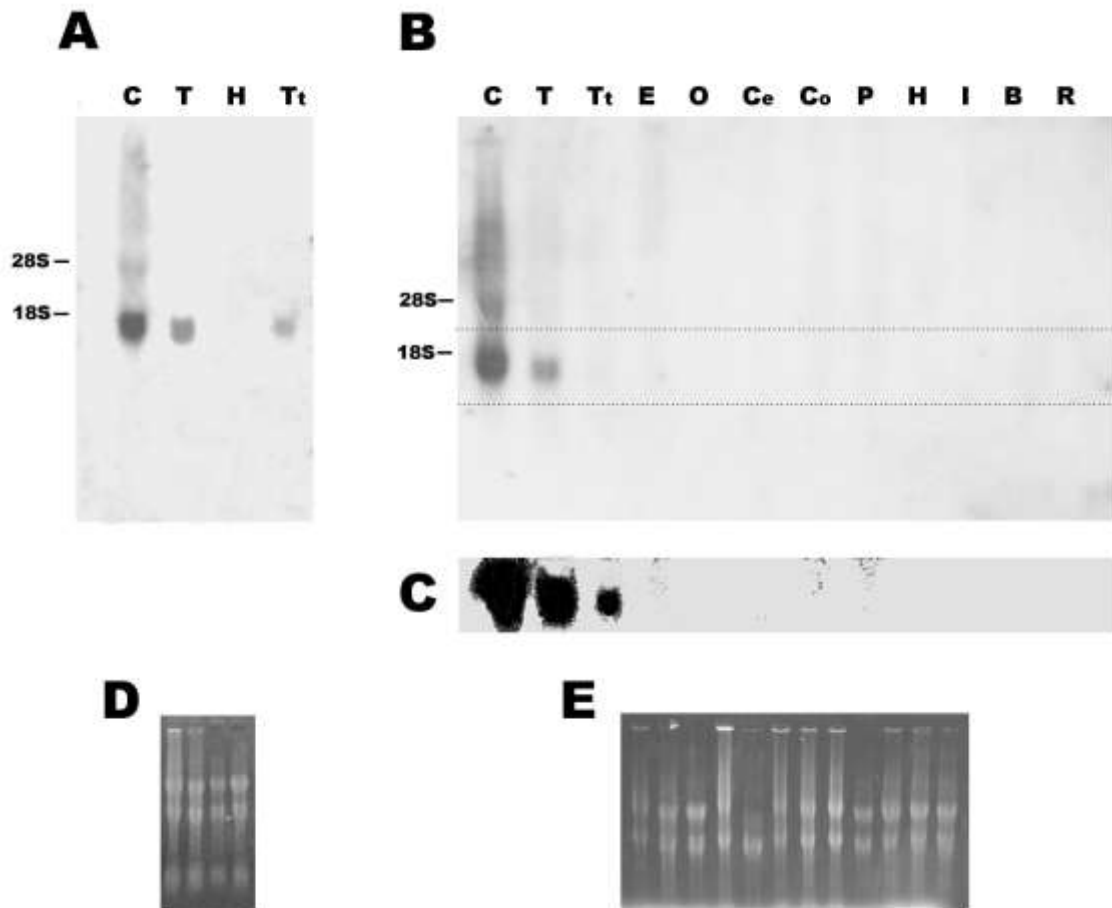


Figura IV.9. Patrón de expresión de *Srsp1* analizado mediante ensayos de Northern-blot. **A.** La banda de ADNc del DD fue empleada como sonda. **B.** Las membranas fueron hibridadas con el clon completo de ADNc y expuestas toda la noche. **C.** Sección parcial del mismo Northern-blot que en B (entre líneas punteadas), pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia de expresión en otros tejidos que el testículo. Cada carril contiene, respectivamente, 40 μ g de ARN total de: espermatoцитos paquiténicos (C), espermátidas redondas (T), testículo total (Tt), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (Ce), corazón (Co), pulmón (P), hígado (H), intestino (I), bazo (B) y riñón (R). Las figuras inferiores (**D**, **E**) muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio; como puede apreciarse, todos los carriles fueron cargados con cantidades equivalentes de ARN.

1	Met	Glu	Ala	Ala	Arg	Asp	Ala	Gln	His	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Ser	15
112	AAA	GGT	TGC	TTG	GCC	AGT	AGG	ACG	TCC	TCT	CAT	CAA	AAC	AGA	AGG	156
16	Lys	Gly	Cys	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Ser	Ser	His	Gln	Asn	Arg	Arg	30
157	GCC	AGC	CTC	TCT	TCT	GAT	GGA	ACT	GGT	CTG	AGG	GTC	ACT	GAT	GCC	201
31	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Gly	Leu	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	45
202	CCA	GGC	CTC	CCC	AGG	GTG	ATG	ACT	CCC	TCT	GAC	ACT	GCT	TCG	GGG	246
46	Pro	Gly	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Thr	Pro	Ser	Asp	Thr	Ala	Ser	Gly	60
247	CTG	GGT	CAG	AAG	ACC	TCC	TCC	ACT	TCA	TCC	TCC	TCC	TCT	TCA	TCC	291
61	Leu	Gly	Gln	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	75
292	TCC	TCC	TCC	TCT	CCC	TCC	TCC	TCC	TCC	TCT	GCC	CAG	GCT	AAT	CGG	336
76	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	Ala	Asn	Arg	90
337	TCC	TTG	AAA	GTC	TCA	CTG	CCT	GAA	ATC	CAG	AAG	GAA	AAA	TAT	CCC	381
91	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Ile	Gln	Lys	Glu	Lys	Tyr	Pro	105
382	GAG	GAA	TTC	AGC	CTG	CTC	AAG	TCA	CAG	ACA	ACA	GAT	GGG	CAG	CGT	426
106	Glu	Glu	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Gly	Gln	Arg	120
427	CCT	GAG	TGG	ACA	TTT	TAT	CCA	AGG	TTC	AGC	AGC	AAC	ATC	CAC	ACC	471
121	Pro	Glu	Trp	Thr	Phe	Tyr	Pro	Arg	Phe	Ser	Ser	Asn	Ile	His	Thr	135
472	TAC	CAT	GTT	GGA	AAG	CAG	TGT	TTC	TTC	AAT	GGG	GTC	TTC	CGG	GGC	516
136	Tyr	His	Val	Gly	Lys	Gln	Cys	Phe	Phe	Asn	Gly	Val	Phe	Arg	Gly	150
517	AAC	AGG	AAG	TCT	GTG	GCA	GAG	AGG	ACA	GTG	GAC	AAG	AGC	CTT	GGG	561
151	Asn	Arg	Lys	Ser	Val	Ala	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	165
562	AAG	AAG	AAA	TAC	GAT	ATT	GAT	CCC	AGA	AAT	GGA	ATC	CCC	AAA	TTG	606
166	Lys	Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Asp	Pro	Arg	Asn	Gly	Ile	Pro	Lys	Leu	180
607	ACA	CCA	GGA	GAT	AAT	CCA	TAC	ATG	TTC	CCA	GAA	CAG	AGT	AAA	GAG	651
181	Thr	Pro	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Met	Phe	Pro	Glu	Gln	Ser	Lys	Glu	195
652	TTC	TTC	AAA	GCT	GGG	GCA	ACT	CTG	CCG	CCA	GTG	AAC	TTC	TCA	CTG	696
196	Phe	Phe	Lys	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Asn	Phe	Ser	Leu	210
697	GGA	CCT	TAT	GAG	AAA	AAA	TTC	GAC	ACC	TTT	ATC	CCA	CTT	GAG	CCA	741
211	Gly	Pro	Tyr	Glu	Lys	Lys	Phe	Asp	Thr	Phe	Ile	Pro	Leu	Glu	Pro	225
742	CTT	CCA	CAA	ATT	CCC	AAT	CTG	CCT	TTC	TGG	GAG	AAG	GAA	AAA	GCC	786
226	Leu	Pro	Gln	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Phe	Trp	Glu	Lys	Glu	Lys	Ala	240
787	AAT	AAT	TTG	AAG	AAC	GAG	ATA	AAA	GAA	GTT	GAG	GAT	CTT	GAC	AAC	831
241	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Asn	255
832	TGG	CAG	GCG	CCG	ATG	CCC	TTC	CTC	CAC	GGT	TTT	CTC	TCC	ACT	GCT	876
256	Trp	Gln	Ala	Pro	Met	Pro	Phe	Leu	His	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	Ala	270
877	AAT	CGA	ACA	ATA	ACT	ACC	TGT	GAT	CAG	AAA	GTC	<i>TAG</i>	AAATCTAGTAGT			924
271	Asn	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Cys	Asp	Gln	Lys	Val	End				282
925	TGTTTCAGTCCCACAAGGCTGCATGTTTTCATCTGGTCTTCAGTATATGCTGCAATCCAGAAGTGGGC															990
991	TCTAAAGTCAGAAGGAATGGATGTGCTAGCAAGGTGAAGGCAAACAAGAACAAGCTTCCTTCT															1056
1057	TCTTATATAGACTCCAGCTGAAGGTGGCTCATATTAAGGTATGTTTTCTGACTCAAGATT															1122
1123	TGGATCAAAGACTGTCTTCCACCTCAAGATTCAAATGAAAGGTCTGTCTTCCACCTCAAGATTCCG															1188
1189	<u>GATTAAGTTGTGCTTCTTACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>															1232

Figura IV.10. ADNc del clon aislado con la sonda de la banda 14 y secuencia deducida de aminoácidos. La secuencia de la sonda del DD está subrayada, y los iniciadores entre los que se amplificó se muestran en letra destacada. Los codones de iniciación y terminación, así como la señal de poliadenilación se indican en negrita e itálica. La secuencia nucleotídica ha sido ingresada al Genbank con el número de acceso AY157978 (ver anexo II).

El ADNc aislado presenta un marco abierto de lectura de 281 aminoácidos y una cola de poliA, precedida de una señal de poliadenilación alterada (figura IV.10). Como hemos mencionado, esta última es una característica propia de los ARNm expresados en la

línea germinal, cuyas señales de poliadenilación suelen ser mucho más variables que las señales virtualmente invariables de los ARNm de las células somáticas (ver "Introducción"). Una búsqueda mediante el programa BLAST mostró que el clon poseía un 93% de identidad a lo largo de 547 nucleótidos comprendidos en la región del marco abierto de lectura, con un ADNc de función desconocida de testículo de ratón (número de acceso al Genbank AK005865). Asimismo, la secuencia proteica predicha presentó homología con la secuencia traducida conceptualmente de un clon de ADNc de testículo de ratón y humano, y con la traducción conceptual de un EST de testículo del cordado primitivo *Ciona intestinalis* (figura IV.11).



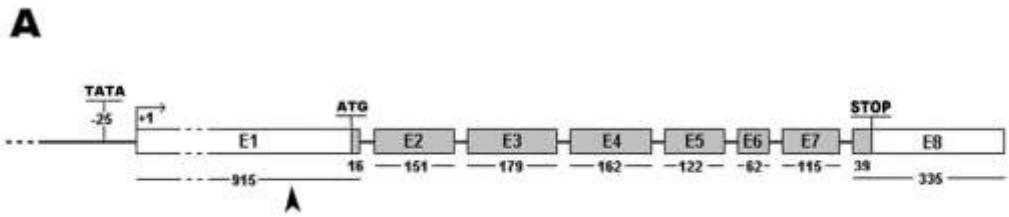
Figura IV.11. Alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha de Srsp1 (ver más adelante) y las primeras correspondencias de las bases de datos. La secuencia aminoacídica deducida mostró homología con las secuencias traducidas conceptualmente de un clon de ADNc de testículo de *Mus musculus* y uno de *Homo sapiens* (número de acceso BAB710701.1) en una búsqueda efectuada mediante el programa blastp, y con la traducción conceptual de un EST de testículo de *Ciona intestinalis* (número de acceso BP020754) en una búsqueda con el programa tblastx. Los aminoácidos idénticos están señalados en negro y los similares en gris. Las líneas punteadas indican un espacio introducido para mejorar el alineamiento. El alineamiento fue hecho mediante los programas ClustalW y Boxshade.

Las diferentes regiones de nuestro ADNc coincidieron con secuencias de ADN genómico presentes en diferentes “contigs” (contenidos en el clon de baculovirus CH230-28L18) del proyecto “Genoma de Rata” de NIH. De acuerdo con las complementariedades observadas, pudimos determinar que el gen correspondiente se localizaría en el cromosoma 9 (telocéntrico) de la rata (elemento de mapeo

NW_044162.1 del mapa de *Rattus norvegicus* de NCBI), y consta de ocho exones interrumpidos por siete intrones (figura IV.12A). De hecho, no podemos excluir la posibilidad de que exista un pequeño intrón en la región no codificante del primer exón, dado que nuestro ADNc no comprende la totalidad de la región 5' no traducida. Sin embargo, el tamaño predicho del ARNm, 2060 b (el sitio iniciador estaría localizado 907 pb “corriente arriba” del codón ATG) coincide perfectamente con el de la banda obtenida en los ensayos de Northern-blot. Mediante el software de análisis de secuencias nucleotídicas CGG hemos encontrado una potencial caja TATA, una posible secuencia iniciadora, cajas CAAT y sitios de unión para el factor Sp1 en la región promotora del gen (figura IV.12B). Asimismo, se identificó la presencia de un elemento repetido de tipo ID, el ID t-BC2-23, que pertenece a la subfamilia de estas secuencias expresada diferencialmente en el testículo (Kim *et al.*, 1995; nuestro laboratorio, resultados no publicados). Este elemento repetido situado en la región promotora del gen podría constituir una secuencia regulatoria, vinculada con la expresión génica tejido-específica del mismo (ver capítulo IV.2.d).

La proteína predicha por nuestro ADNc, a la que denominamos Srsp1 (ver más abajo), posee una probabilidad del 94,1% de ser de ubicación nuclear, según el método para la discriminación núcleo-citoplásmica de Reinhardt (Reinhardt y Hubbard, 1998). De acuerdo con esta predicción, la secuencia de Srsp1 presenta una probable señal de localización nuclear (NLS) de tipo bipartito (figura IV.13A). Sin embargo, el rasgo más llamativo es la presencia de un largo trecho de homoserinas (figuras IV.10 y IV.13A). Debido a ello hemos propuesto para esta proteína el nombre de Srsp1 (“serine-rich spermatogenic protein 1”). Se encuentran asimismo posibles señales de fosforilación para varias serín/treonín kinasas: la caseín kinasa 2 (CK2), proteín kinasa C (PKC), las proteín-kinasas dependientes de AMPc y GMPc y una kinasa dirigida por prolina.

Los análisis de computación predicen una proteína no globular de 31kD. La región comprendida entre los residuos 152 y 214 (que contiene la probable NLS bipartita) fue modelizada mediante el servidor Swiss-Model (Peitsch, 1995; 1996; Guex y Peitsch, 1997; figura IV.13B), tomándose como molde la estructura cristalográfica del dominio Sec7 del factor de intercambio de guanín-nucleótidos ARNO [ciclohedrina 2 humana



B

```

CGGTAGTTCTGGCTGTCGTAGGACTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCTTTAAGCTCACAG -473
      Sp1
ACCCACCTGCCTTTGCCTCCAGAGTGTGCTGGCATTAAAAGTGAATGCTCCTGGGGTTGG -413
GGATTTAGCTCAGTGGTAGAACGCTTGCTAGCAAGCACAAAGGCCCTGGGTTTCAGTCCCC -353
AGCTCCGAAAGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACAAAAGTGAATGCTCCAGCTCTGG -293
      Sp1
CGTCTGTTTAAACCCAGTGGCTGTCTACTATTGGATAACTCCTCAGTAAGGGGCGTGGC -233
      CAAT box
CTGGGGAGCACCTCCTGTGCAATGTTGGCTAGCTCAGTTTCGAGATCTTTACAGCCT -173
      CAAT box
TTCTGCTGTTTCTTTTACAATCAATGAAATTTATTAACAAACAGAACCACTCTGCGAGAGGG -113
TTCAGTGGGTAAAGCGCTTGCTGCACAAGCTCGGGGACCTGAGTTCGAGCCCTGGAACCC - 53
      TATA box
ACTAAAAGTCACGTGATATGTTTATAAGCGGGTGGGGCAGAGATAGGTAGATATCCTGGG + 8
ACTCCTTGCCAGTGCAGCTGTAGCAGTGAACCTCCGTGTTTCATCGAGAACCCTATTTCAA + 68
AGATAAGGCAGAGACCAATGGAGGAAGACACCTGACATTGAATTCTGGCTGCCACAACC +128
TCACCCCTCCCAACACGTGTGCACGCACGTGCATACAGCACACAAATAAATATGAGTATTT +188
AAATTAATTAAGATCTGTATTTTTTTTTCTACTTAACCATAGGAGAACTACATAACAT +248
AAATTTAGAGACTAACTTCGGGGGGGGGAAGCTGGGGGGCGTTTCTATGCGGATTTA +308
TTAGGGAGAGGTTAGAAAGATAAATTTCAATCTATACCATGGAAAGAATGCTAGCTTGT +368
AAGGTGGAACCTGGGAGTGAATCCGTTCTCTGGATGACCTTGAACGAGTCTTTGCTCCAA +428
GTCAGTTTTCTATTTGAAAATGCAGCTGGCTGTTGAGGAAGACAGCATCCAGCAGGG +488
CGCTGGCCCAGAAAAGGCGCTGTAAGTGGTGGGTGAGTCTGCCTCATCAGGATGCCA +548
ATTCTACACCGATATCTGCAAGCTTTATAGAGGGTGCATCGCTCATGGCCACCCGAGGTT +608
TACAGAAGTAGCAACGACAGATGTTGGAAAAGAGACACGAACTGTAACAAAATCCTGAGG +668
CTCTGCAGCTCTTATGTCTGAGACCCCATCCTCAACCCGGTTCAGAGCTCCCGATGCTG +728
GAAGATTGGTGCCTCTGAGTAGCGCGCCACCTCGCGGAAGTGGCGCGTAGTCTCTGACA +788
ACCCCTGGACGAGCCTTGCAAGCGGTAAGTACGCGGCCTTGTCTTCGCTTTGCCTCCGGGC +848
ATTCAGCAAGTCCGCTGCCCGTTGGTGCATCATCTGGGCCGTATCCGCAATGGAAGCGG +908

```

Figura IV.12. Secuencia genómica de *Srsy1*. **A.** El gen está organizado en ocho exones (recuadros E1- E8), separados por siete intrones (líneas negras). La región codificante se muestra como recuadros grises. El número de nucleótidos que compone cada uno de los exones se indica debajo de cada recuadro. En los casos en que el número de nucleótidos codificantes no coincide con el número de nucleótidos del exón (E1 y E8), también se indica este número. Se muestran asimismo el inicio de la transcripción (+1), y los codones ATG y de terminación. La punta de flecha debajo del recuadro E1 representa el extremo 5' del clon de ADNc. **B.** Se señalan en la región promotora las secuencias correspondientes a la probable TATA box, iniciador de la transcripción (Inr), y sitios CAAT y Sp1. La secuencia correspondiente a un elemento repetido ID está subrayada. Los sitios ATG y +1 se muestran en letra destacada.

(Cherfils *et al.*, 1998)], con el que esa región de nuestra proteína predicha presentó un nivel significativo de similitud (28%, aunque el nivel de identidad con la región correspondiente de la ciclohedrina 3 de rata, para la que no existe modelo tridimensional, fue mayor, alcanzando el 32%).

Discusión

Hemos aislado un gen nuevo, expresado diferencialmente durante la espermatogénesis de la rata. Ensayos de Northern-blot demostraron que la expresión del mismo es específica de la línea germinal del testículo, alcanzando su nivel máximo de transcripción durante la profase meiótica. Comprobamos asimismo, que no existe expresión detectable en ningún otro de nueve tejidos analizados. Hemos además determinado el número de intrones del gen, y propuesto algunas secuencias regulatorias en la región promotora. Este gen codificaría para una proteína conteniendo un tramo de homoserinas. La secuencia proteica predicha contiene además una probable señal de localización nuclear de tipo bipartito, y varios posibles sitios de reconocimiento para distintas serín/treonín kinasas (Geisinger *et al.*, 2002).

Los tramos ricos en serinas se encuentran presentes en muy diversas proteínas, como la fosfoproteína nucleolar Nopp140 (Meier and Blobel, 1992), la proteína vegetal de respuesta a ácido abscísico Rab17 (Villardel *et al.*, 1990), antígenos de parásitos (por ejemplo Strong *et al.*, 2000), factores de transcripción (Kretzschmar *et al.*, 1994; Bayarsaihan y Ruddle, 2000) y la vitelogenina (Nardelli *et al.*, 1987), entre otras. Estas regiones serían fosforiladas por serín/treonín kinasas, como ha sido demostrado para algunas de las proteínas mencionadas (Berridge y Lane, 1976; Villardel *et al.*, 1990; Kretzschmar *et al.*, 1994). Estudios de la década del '70 ya habían detectado fosforilación en la región rica en serinas de la vitelogenina, sugiriendo un nivel de fosforilación de aproximadamente el 80% para esta región (Berridge y Lane, 1976). También en Nopp140 se vio que la totalidad de las serinas se fosforilaba, lo que llevó a que se postulara que dicha fosforilación podría ocurrir de un modo cooperativo (Meier y Blobel, 1992).

A

MEAARDAQHSDVLE SKGCLASRTSSHQNRASLS SDGTGLRVTDAPGLPRVMTPSDTASGLGQKTS SSSSTSSSSSSSSSSPSSS
SSAQANRSLKVSLPEIQKEKYPEEFSLKKSQTTDGQRPEWTFYPRFSSNIHTYHVGKQCFNNGVFRGNRKSVAERTVDKSLGK
KKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFFKAGATLPPVNFSLGPYEKKFDTFIPLEPLPQIPNLFFWEKEKANNLKNEIKE
VEDLDNWQAPMPFLHGFLSTANRTITTTCDQKV

- Serine stretch
- Putative NLS, bipartite
- CK2 recognition site
- PKC recognition site
- cAMP and cGMP-dependent kinase site
- Pro-directed kinase site

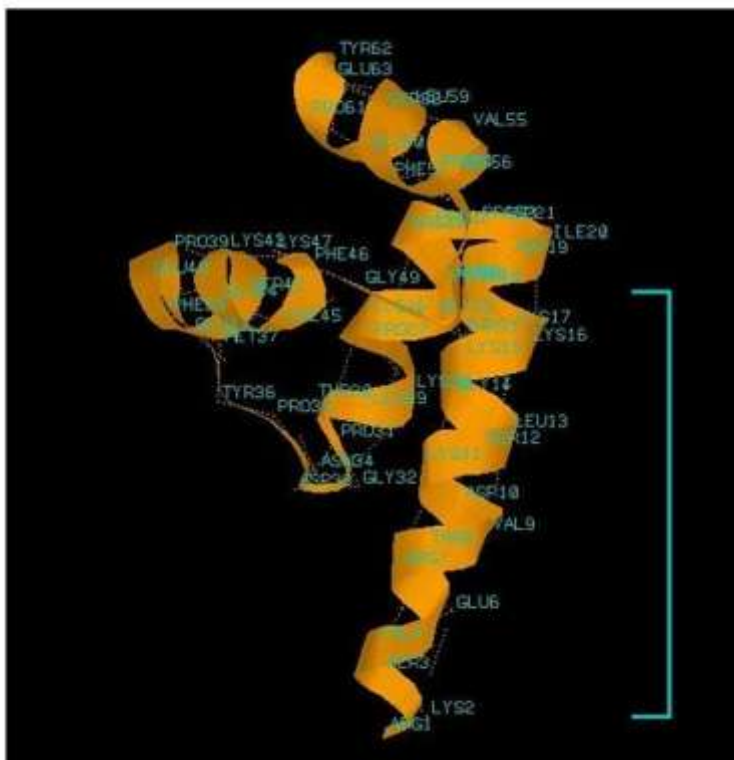
B

Figura IV.13. Proteína Srsp1. **A.** Secuencia aminoacídica predicha. El trecho de homoserinas y la NLS están coloreados. Las regiones posibles de fosforilación están subrayadas. **B.** Modelo para los residuos 152 a 214. La región correspondiente a la NLS se indica con un paréntesis recto.

La fosforilación de las regiones de homoserinas ha sido implicada en distintas funciones celulares. En el caso de Nopp140 y Rab17, ambas proteínas, al ser fosforiladas en los tramos ricos en serina por la CK2 (Li *et al.*, 1997b; Jensen *et al.*, 1998), son capaces de interactuar en forma específica con otras proteínas conteniendo NLSs (Meier y Blobel, 1992; Goday *et al.*, 1994). Además, las dos proteínas alternan su ubicación entre el núcleo y el citoplasma (Meier y Blobel, 1992; Goday *et al.*, 1994). Estas evidencias han hecho que se propusiera para las proteínas mencionadas una función en el transporte al núcleo (a modo de chaperonas), dependiente de la fosforilación de los trechos de serinas (Meier y Blobel, 1992; Goday *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Más aún, para el caso de Nopp140, que interactúa con pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs), se ha postulado que sus dominios ricos en serina, altamente fosforilados, podrían interactuar con el extremo C-terminal con alta carga positiva de al menos una de las snoRNPs a las que se une (NAP57), sugiriendo un posible mecanismo para esta interacción (Yang *et al.*, 2000). Por otra parte, existen evidencias de que las regiones de homoserinas de varios factores de transcripción virales y celulares y probablemente también de Nopp140, son requeridas para la activación transcripcional de promotores dependientes de la ARN polimerasa II, posiblemente a través de la interacción con la maquinaria de transcripción basal (Kretzschmar *et al.*, 1994; Miao *et al.*, 1997). Se ha visto que también en esta actividad, la fosforilación por parte de la CK2 se encuentra involucrada (Kretzschmar *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999).

Sin embargo, en tanto en las proteínas mencionadas los tramos de homoserinas están seguidos inmediatamente de aminoácidos ácidos, que representarían sitios de fosforilación para la CK2 (Jensen *et al.*, 1998), ese no es el caso para el trecho de serinas de Srsp1. No obstante, un posible sitio de reconocimiento para la CK2 se ubica unos pocos residuos a continuación de la región de homoserinas (ver figura IV.13A). Ignoramos si esta diferencia pueda poseer algún significado en relación con la función de nuestra proteína. Por otra parte, la presencia de una prolina como el único aminoácido que interrumpe el trecho de homoserinas de Srsp1, podría estar señalando un sitio de fosforilación para una kinasa dirigida por prolina; en ese sentido, la participación de las kinasas dirigidas por prolinas en diversos procesos celulares vinculados con la embriogénesis, proliferación celular y diferenciación es bien conocida (por ejemplo, véase Pearson *et al.*, 2001). Más aún, ha sido identificada una kinasa

dependiente de prolina que es específica del testículo, y especialmente abundante en el estadio de paquitenio tardío (Jinno *et al.*, 1993). Además, existen proteínas blanco de serín/treonín kinasas dirigidas por prolina, como por ejemplo las proteínas MARCKS de varias especies (Taniguchi *et al.*, 1994), que poseen un tramo de cinco serinas precediendo a una prolina en un sitio de reconocimiento para una enzima de este tipo. De todos modos, la existencia de secuencias consenso de fosforilación no es evidencia suficiente de que esas secuencias sean, efectivamente, blancos de fosforilación (Sedelnikova y Weiss, 2002). Por lo tanto, serán necesarios más estudios para determinar la función de la región de homoserinas de Srsp1, en relación con la espermatogénesis.

De la comparación de secuencias en los bancos de datos surge que la secuencia predicha de Srsp1 poseería homólogos en el testículo de ratón y humano. Asimismo, Srsp1 presentó similitud con la secuencia traducida conceptualmente de un EST de testículo del urocordado *Ciona intestinalis*. El genoma de este organismo, del cual existe una buena infraestructura genómica (colecciones de ESTs y ADNc, genotecas, etc.), es el más pequeño dentro de los cordados, proveyendo un buen sistema para explorar los orígenes evolutivos del linaje a partir del cual surgieron los vertebrados. El hallazgo de un homólogo de Srsp1 en el testículo del cordado más primitivo sugeriría la conservación de esta proteína a lo largo de la evolución de los vertebrados, lo que podría ser un indicio de la importancia de su función. Llamativamente, si bien la región de homoserinas se encuentra en la secuencia proteica predicha de la rata y en la del clon de ratón, en este último es más corta. La secuencia predicha de humano también presentaría una corta región de homoserinas, en la región N-terminal de la proteína (datos no mostrados).

La producción de anticuerpos dirigidos contra la proteína Srsp1 nos permitirá su localización, y el estudio de la relación entre la fosforilación de la región rica en serinas y el supuesto transporte al núcleo. En ese sentido, sería interesante analizar si esta proteína es capaz de unir otras proteínas portadoras de NLSs. Asimismo, planeamos realizar estudios de fosforilación mediante espectrometría de masas, de modo de determinar los sitios de fosforilación de Srsp1, así como la kinasa (o kinasas) responsable.

En suma, de nuestros resultados, así como del análisis en los bancos de datos, se desprende que *Srsp1* es el primer gen identificado de expresión específica de línea germinal, y diferencialmente expresado en meiosis, que codifica para una probable proteína con un tramo de homoserinas. La secuencia proteica predicha presenta también una NLS bipartita (lo que sugiere un destino nuclear) y sitios potenciales de fosforilación para varias serín/treonín kinasas. De la comparación con las bases de datos de proteínas surge que *Srsp1* no contendría otros dominios funcionales reconocibles actualmente.

c. Identificación y análisis de la expresión del gen "*pecanex*" durante la espermatogénesis

Identificación, caracterización del gen y análisis de expresión génica

Como hemos mencionado anteriormente, el análisis de la secuencia correspondiente a la banda número 28 del DD, dio un nivel de similitud con el extremo de la región 3' no codificante de un clon de *Mus musculus* presente en el Genbank bajo el nombre de *pecanex*.

Pecanex (pcx) ha sido descrito en *Drosophila melanogaster*, como un locus neurogénico de efecto materno. Se observó que en ausencia de expresión materna de este gen, los embriones desarrollaban una hiperneuralización severa, similar a la característica para los embriones mutantes *Notch*; de ese modo, la mayor parte de las células del neuroectodermo acababan diferenciándose en neuroblastos, a expensas de las estructuras epidérmicas ventrales (Perrimon *et al.*, 1984; LaBonne y Furst, 1989). Estudios de expresión de este gen demostraron la existencia de un transcripto mayoritario de 9 kb, así como de dos transcriptos minoritarios de 3,7 y 2,3 kb. La presencia de estos transcriptos fue detectable en machos y hembras adultas, y en todos los estadios del desarrollo embrionario examinados (LaBonne *et al.*, 1989). Si bien nunca se identificó un producto codificado por el gen *pecanex* de *Drosophila*, análisis mediante programas de computación indicaron que codificaría para una potencial glicoproteína integral de membrana de gran tamaño, con tres dominios de transmembrana y sin niveles significativos de identidad con ninguna proteína conocida hasta ese momento (LaBonne *et al.*, 1989).

Por otra parte, el ADNc que figura en el Genbank/EMBL como "mouse *pecanex*" (número de acceso al Genbank AF096286), fue clonado a partir del cromosoma 12 de *Mus musculus*, y designado de ese modo por homología con el gen *pecanex* de *Drosophila* (31,821% a nivel de la secuencia proteica predicha, a lo largo de toda la extensión de la proteína).

A

1																	<u>CCG</u>	3
4	<u>GAG</u>	<u>GAA</u>	<u>GGC</u>	<u>CAT</u>	<u>GTG</u>	<u>GTT</u>	<u>CAC</u>	<u>CGA</u>	<u>TGG</u>	<u>GTG</u>	<u>CCT</u>	<u>TGC</u>	<u>AGC</u>	<u>AGA</u>	<u>GAC</u>			48
1	Glu	Glu	Gly	His	Val	Val	His	Arg	Trp	Val	Pro	Cys	Ser	Arg	Asp			15
49	<u>CCA</u>	<u>AGT</u>	<u>ACA</u>	<u>AGG</u>	<u>TCC</u>	<u>CAC</u>	<u>ATC</u>	<u>GAC</u>	<u>AAG</u>	<u>ACA</u>	<u>GTG</u>	<u>CTT</u>	<u>CTT</u>	<u>GTC</u>	<u>CAG</u>			93
16	Pro	Ser	Thr	Arg	Ser	His	Ile	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Leu	Val	Gln			30
94	<u>ATC</u>	<u>GAT</u>	<u>GAT</u>	<u>AAA</u>	<u>TAC</u>	<u>GTG</u>	<u>ACT</u>	<u>GTA</u>	<u>ATT</u>	<u>GAA</u>	<u>ACC</u>	<u>GGG</u>	<u>GTT</u>	<u>CTA</u>	<u>GAG</u>			138
31	Ile	Asp	Asp	Lys	Tyr	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Thr	Gly	Val	Leu	Glu			45
139	<u>CTG</u>	<u>GGG</u>	<u>GCA</u>	<u>GAA</u>	<u>GTG</u>	<u>TGA</u>	<u>GTGTGTGCTGCACACCTGGGCTCCTCTCCTGGCTTC</u>											192
46	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	End												50
193	<u>TCAGCCCCGAGTGAGAAAGCAAGGTTAC/CGAAGATCCACCTACGGGGACCGACCGCCTGC</u>																	252
253	<u>CCTTCTCAGCAAAGGCTTGACCAGTGGTTTGGTTAAGCTCCTCTCCACCTGACTCCTGT</u>																	312
313	<u>CACGGTCTTCATCCTCAAAGCTGAAATATTTTTTAAGTTAGCTGCATGAAAGGCAGAACT</u>																	372
373	<u>GTGGGAGCCTCTGGATGGAAGGCTCTCCATGCATCCATCTTTAACCCACAGACTCTCGTC</u>																	432
433	<u>TCTAACTCTAAGCTCATATTTTTCTAATTTCTTTGCCAAAACAGTTGCCATGGTTTTTTG</u>																	492
493	<u>TTGTAGAAAATGAAATCCACTGACCATGATCTTTGCAAACAGACCCATGTGGAAACGTTG</u>																	552
553	<u>GGTTCGACATGTAATAGTGTAAAGTTAATGTACAGTGAGAAAGAGGATGGACAGACAGA</u>																	612
613	<u>CGTAGGTTTATCTTAGTCCTTGAACACTAAAACTTTAATGAAAAAACTGCACTAATTT</u>																	672
673	<u>TTTACAGCAATGCACTAAATCTGAGGTTTCTCAGAACGTTTATTTATATATAAAAAATAA</u>																	732
733	<u>AATACCATTATTTAAATTGCCTTCAGGACAAGCCCCCTCCCTTTCTGACGCAGCCAGCAA</u>																	792
793	<u>ACCGCTGCTCCTTTTTCTGTTAGCGCGCTGGGCGCTGGAGACACTGGCAGCTTCATCCCTC</u>																	852
853	<u>GCCTTTCCAGAGCAGGGGATCAGTGCATCCACCTGGCGAGGGATCGCCCGTGTGCCACA</u>																	912
913	<u>CATGTCCAGTGTGGCAGTCTGTGAGGTTACTTCTGGAATATACTTTGCTTTTTAAG</u>																	972
973	<u>ACAAAGCAAGACCCAGGAATTGAAGAAAGGATCAGTTGCCTCTTATTTAAAGAATTCC</u>																	1032
1033	<u>TAGCTCTTGACATTACTCACATGAAGTTCAGTTTCACAAGTAAAATGTTTTCAAACAAA</u>																	1092
1093	<u>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>																	1107

B

clon28 pecanex	-----CCGAGGAAGGCCATGTGGTTCACCGATGGGTGCCTTGCAGCAGAGACC GTCCACAGGAGGCATGGAAGGCCATGTGGTTCACCGATGGGTGCCTTGCAGCAGAGACC * *****	48 5100
clon28 pecanex	CAAGTACAAGGTCACATCGACAAGACAGTGTCTTGTCCAGATCGATGATAAATACG CAAGTACAAGGTCACATCGACAATACAGTGTCTTCTCGTTCAGATCGATGATAAATACG *****	108 5160
clon28 pecanex	TGACTGTAAT TGA AACCGGGTCTAGAGCTGGGGCAGAAAGTGTGAGTGTGTGCTGCAC TGACTATAAT TGA AACCGGGTACTAGAACTGGGGCCGAAGTGTGAGCCTGCGCTGCAT *****	168 5220
clon28 pecanex	ACCTGGGCTCCTCTC-CTGGCTTCTCAGCCCCGAGTGAGAAAGCAAGGTTACCGAAGATC ACCTGGGTTCCCTTCTCTGGCTTCCAGCCCTCGGAGAGAAAGCAAGGTTGCAGAAGAGC *****	227 5280
clon28 pecanex	CACCTACGGGGACCGACCGCCTGCCCTTCTCAGCAAAGGCTTGACCAGTGGTTTGGTTAA CACCTGTGGGGACCGACCGCCTGCCCTTCGAGCAAAGACTTGACCAGTGGCTTGGTTAA *****	287 5340
clon28 pecanex	GCTCCTCTCCACCCTGACTCCTGTGTCAGGCTTTCATCCTCAA---GCTGAAATATTTT GCTCCTCTCCACCCTGACTCCTGTGCTGCTTTCATCCCAAATAAGCTGAAATATTTT *****	343 5400
clon28 pecanex	TT-AAGTTAGCTGCATGAAAGGCAGAA-CTGTGGGAGCCTCTGGATGGAAGGCTCTCCAT TTTAAGTTAGCTGCATGAAAGGCAGAACTCTGTGGAGCCTCTCGATGGAAGGCCTCTAT ** *****	401 5460
clon28 pecanex	GCATCCAT-CTTTAACCCACAGACTCTCGTCTCTAACTCTAAGCTCATATTTTCTAATT GCATTTATGCTTTAACCCATGACTCTGTCTCTAACTCTAAGCTCATATTTTCTAATT **** * *****	460 5520
clon28 pecanex	TCTTTGCCAAAACAGTTGCCATGGTTTTTGTGTGAGAAAATGAAATCCACTGACCATGA TCTTTGCCAAAACAGTTGCCATGGTTTTTGTGTGAGAAAGTAAATCCATGACCATGA *****	520 5580
clon28	TCTTTGCCAACAGACCCATGTGGAAACGTTGGGTTTCGACATGTAATAGTGTAAAG-TTTA	579

```

pecanex      TTTTTCGCAACAGACCTATGTGGAAGCATTTGGTTCGACATATAACAGTATAAAGATTTA 5640
* ****
clon28      ATGTACAGTGAGAAAGAGGATGGACAGACAGACGTTAGTTTATCTTAGTCCTTGAACACT 639
pecanex     ATGTACAGTGAGAAAGATGATGACTAGACA----TAGGTTTATCTTATTCCTTGAACACT 5696
* ****
clon28      AAAAACTTTAATGAAAAAACTGCACTAATTTTTTACAGCAATGCACTAAATCTGAGGTT 699
pecanex     AAAAACTTTAATGAAAAAACTGCACTAATTTTTTACAGTGATGCACTAAATCTGAGATT 5756
* ****
clon28      TCTCAGAACGTTTATTATATATAAAAATAAAAATACCATTTAAATTCGCCTTCAGGAC 759
pecanex     TCTCAGAACATTTATTATATATAAAAATAAAAATACCATTTAAATTCGCCTTCAGGAC 5816
* ****
clon28      AAGCCCTCCCTTTCCTGACGCA--GCCAGCAA--CCGCTGCTCCTTTCTGTTAGCGC 815
pecanex     TAGCCCTCCCTTTCCTGACACACAGGACAGCAGAACCCGTTGCTCCTAT-CCGTCAGTGC 5875
* ****
clon28      GCTGGGCGCTGGAGACACTGGCAGCTTCATCCCTCGCCTTTCCAGAGCAGGGGATCAGT 875
pecanex     GCTGGACTCCGG-GACAC----AGCTTCACCCCTCCCTTTCCAGGGCTGGTGACCAGC 5930
* ****
clon28      GCATCCACCTGGCGAGGGATCGC-----CCGTGTGCCACACAT 913
pecanex     AGGTATGCCTGGCGAAGGCCAGCACCAGCTGCCCTGTCACGGCTCCCGTGTGCCACGCTT 5990
* ****
clon28      GTCCAGT--GTGGCAGGTCCTGTGAGGGTTACTTCTGGAATATACTTTTGCTTTTTAAGA 971
pecanex     CTCCGCCCGGTGGCAGGTCCTGTGAGGGTTGCTTCTGGAACATGCTTTTGCTTTTCAAGA 6050
* ****
clon28      CAAAGACGAAGACCCAGGAATTGAAGAAAGGATCAGTTGCCCTTATTTAAAGAATTCCT 1031
pecanex     AGAATATGAAGGCCAGGAATTGAAGAAAGGATCATTGCCCTTATTTGAAGAGTTCCCT 6110
* ****
clon28      AGCTCTTGACATTACTCACATGAAGTTCAGTTTCACAAGTAAAATGTTTTCAACAAAAA 1091
pecanex     AGCTCTTGCCGTAACTCACATGAAGTTCAGTT-CACGAGTAAAGTTTTTCAACAAAAA 6169
* ****
clon28      AAAAAAAAAAAAAAAAAA 1107
pecanex     -----

```

Figura IV.14. ADNc del clon “pescado” con la banda 28 del DD y comparación de secuencias. A. Secuencia del clon y traducción conceptual de la misma. En negrita e itálica se indican el codón de terminación, la secuencia de poliadenilación y la secuencia complementaria al iniciador T₁₂MN empleado en la amplificación. El decámero de secuencia arbitraria AP9 no se encontró en este clon. La región de homología con el ADNc de *pecanex* de ratón está subrayada. El símbolo / señala el sitio de corte de la enzima *BstE* II, que corresponde al extremo 5' de la sonda empleada (el sitio de restricción *Xho* I, extremo 3' de la sonda, pertenece al sitio múltiple de clonado del vector). **B.** Comparación de la secuencia del clon 28 con el clon de ADNc *pecanex* de *Mus musculus*, alineados mediante el programa ClustalW. En negrita se señalan el codón de terminación y la secuencia de poliadenilación que, como puede observarse, son coincidentes entre nuestro clon y la región correspondiente de *pecanex* de ratón.

Empleando la banda 28 del DD como sonda, llevamos a cabo el rastreo de una genoteca de ADNc de rata, realizada a partir de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermatoцитos paquiténicos. Como resultado de dicho rastreo se aisló un clon de 1107 pb el que, una vez secuenciado, correspondió a la región C-terminal de un marco abierto de lectura, incluyendo un codón de terminación y un largo extremo 3' no codificante que contenía una secuencia de poliadenilación y cola de poliA (figura IV.14A). Los

resultados de la comparación de secuencias en las bases de datos Genbank/EMBL confirmaron la información obtenida previamente con la banda del DD: nuestro clon exhibió un altísimo nivel de identidad a nivel de secuencia nucleotídica con el clon de ratón de 6169 pb correspondiente a *pecanex*, a lo largo de 950 pb del extremo 3' (figura IV.14B, tabla IV.2). Los niveles de identidad fueron aún mayores cuando la comparación se hizo tomando en cuenta sólo la región codificante; ésta mostró, asimismo, niveles muy altos de identidad con un clon de ADNc humano, homólogo a *pecanex* de ratón (tabla IV.2). La búsqueda de homologías a nivel de secuencia proteica predicha en la base de datos SWALL, mostró que la región codificante de nuestro clon (50 aminoácidos), se correspondía con la secuencia proteica predicha para la proteína *pecanex* de ratón (tabla IV.2, figura IV.15), presentando también niveles significativos de similitud con la región C-terminal de la secuencia predicha para la proteína *pecanex* de *Drosophila* (tabla IV.2, figura IV.15).

Dado que, aunque habíamos seleccionado este clon como de expresión diferencial de meiosis, los resultados de las comparaciones en los bancos de datos nos indicaban similitud con un gen codificante para un probable producto con función neurogénica (al menos en *Drosophila*), decidimos analizar el patrón de expresión de este gen en distintos tejidos de la rata. Ensayos de Northern-blot realizados empleando un fragmento de restricción *BstE* II/*Xho* I de 890 pb de nuestro clon, como sonda (ver figura IV.14A) contra ARN extraído de poblaciones celulares enriquecidas en espermatocitos paquiténicos, por un lado, y espermátidas redondas, por el otro, confirmaron la expresión diferencial de meiosis de este gen. También se detectó una señal, aunque bastante más débil, en el ARN procedente de las células de estadios posmeióticos. Se identificó una única banda de un tamaño similar al del ARN ribosomal 28 S (que posee 6333 pb), que se correspondería con el tamaño de 6169 pb del ADNc de *pecanex* de ratón (figura IV.16A). La señal fue también detectable en el ARN extraído a partir de testículo total, aunque la intensidad de la misma fue notoriamente menor, indicando que se trataba de un transcripto específico de las células de la línea germinal, y no de las células somáticas presentes en el testículo. La hibridación contra ARN extraído a partir de otros nueve tejidos diferentes de la rata no mostró señal detectable en ningún otro tejido (figura IV.16A), ni siquiera con una sobreexposición de cuatro

días (figura IV.16B). Resulta especialmente llamativa la ausencia total de señal en el ARN procedente de cerebro.

Tabla IV.2. Resultados de comparación en los bancos de datos de la secuencia del clon “pescado” con la banda 28 del DD

Comparación a nivel de secuencia nucleotídica – Primeras correspondencias

Nº de acceso al Genbank	Nombre	Organismo	Porcentaje de identidad	Extensión de la identidad
AF096286	<i>Pecanex</i>	<i>Mus musculus</i>	85,158%	950 pb (en todo el clon)
AF096286	<i>Pecanex</i>	<i>Mus musculus</i>	95,364%	150 pb (región codificante)
AF233450	<i>Pecanex-like</i>	<i>Homo sapiens</i>	90,728%	150 pb (región codificante)

Comparación a nivel de secuencia proteica – Primeras correspondencias

Nº de acceso a SWALL	Nombre	Organismo	Porcentaje de identidad	Extensión de la identidad
Q9QYC1	<i>Pecanex</i>	<i>Mus musculus</i>	96%	47 aminoác. (de un total de 49)
Q9W506	<i>Pecanex</i>	<i>D. melanogaster</i>	49%	21 aminoác. (de un total de 43)

```

rat      EGHVVHRWVPCSRDPSTRSHIDNTVLLVQIDDKYVTIETGVLELGAEV 49
mouse   EGHVVHRWVPCSRDPSTRSHIDNTVLLVQIDDKYVTIETGVLELGAEV 49
Drosophila -GHVVEQWTPNHADIRFRSHVNRVYLVVEIGDHYVPEVEELGLRE----- 43
  
```

Figura IV.15. Alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha codificada por nuestro clon de ADNc con las regiones correspondientes de pecanex de *Mus musculus* y de *Drosophila*. Los aminoácidos idénticos se indican en negro y los similares en gris. La línea negra señala la secuencia del péptido sintético PX1. El alineamiento fue realizado mediante el programa ClustalW.

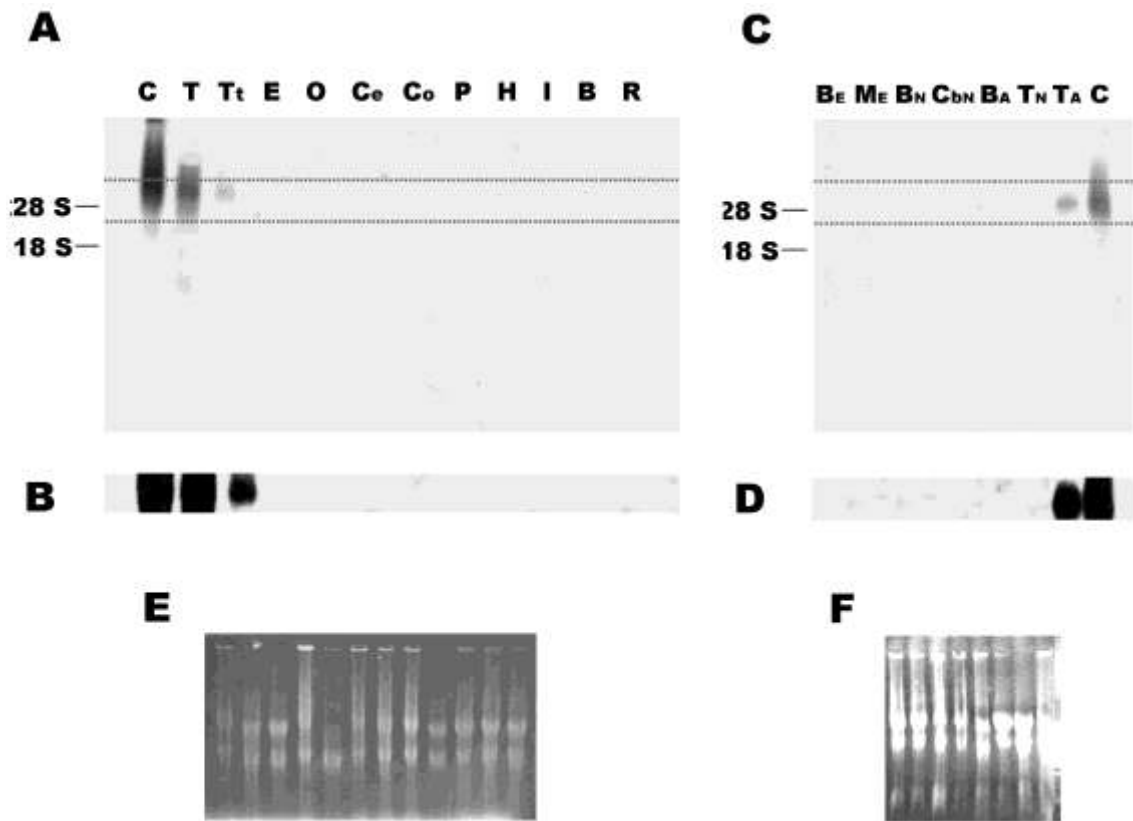


Figura IV.16. Patrón de expresión de *pecanex* en la rata, analizado mediante ensayos de Northern-blot. **A.** Un fragmento de restricción de 890 pb del ADNc de *pecanex* de rata fue empleado como sonda. Las membranas fueron expuestas toda la noche. Cada carril contiene, respectivamente, 40 μ g de ARN total de: espermatozoides paquiténicos (C), espermátidas redondas (T), testículo total (Tt), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (Ce), corazón (Co), pulmón (P), hígado (H), intestino (I), bazo (B) y riñón (R). **B.** Sección parcial del mismo Northern-blot que en A (entre líneas punteadas), pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia de expresión en otros tejidos que el testículo. **C.** Nuevo experimento de Northern-blot, con el mismo fragmento de restricción de *pecanex* empleado como sonda, y una exposición de toda la noche. Cada carril contiene, respectivamente, 40 μ g de ARN total de: cerebro de embriones de 15 días (B_E), mesencéfalo y telencéfalo de embriones de 15 días (M_E), cerebro de neonatos de un día (B_N), cerebelo de neonatos de un día (Cb_N), cerebro adulto (B_A), testículo de neonatos de un día (T_N), testículo adulto (T_A) y espermatozoides paquiténicos (C). **D.** Sección parcial del mismo Northern-blot que en C (entre líneas punteadas), pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia de expresión en otros estadios. Las figuras inferiores (**E**, **F**) muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio; como puede apreciarse, todos los carriles fueron cargados con cantidades equivalentes de ARN.

Ya que en *Drosophila pecanex* codificaría para una presunta proteína con función neurogénica, nos planteamos la posibilidad de que nuestro gen no se expresara en el cerebro adulto de la rata, pero sí lo hiciera durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto, nos abocamos a la extracción de ARN de cerebros de embriones de rata de 15 días, por un lado, y de mesencéfalos y telencéfalos de la misma edad por otro, así como también de cerebros y cerebelos de neonatos de un día. Ensayos de Northern-blot efectuados con la misma sonda que los anteriores no detectaron señal en el ARN correspondiente al tejido nervioso de embriones de 15 días ni de neonatos (figura IV.16C), aún en experimentos con cuatro días de sobreexposición (figura IV.16D). Tampoco se detectó señal en el ARN procedente de testículo de neonatos de un día (figuras IV.16C y IV.16D). Esto último resulta interesante, ya que nos indicaría la ausencia de expresión de *pecanex* en las espermatogonias (los neonatos carecen aún de células meióticas), al menos en los individuos que aún no han comenzado la primera onda espermática. Estos experimentos confirmaron, en cambio, la presencia de señal tanto en los espermátocitos paquiténicos como en el testículo entero (figuras IV.16C y IV.16D).

Experimentos de hibridación *in situ* nos permitieron confirmar la expresión específica de *pecanex* en los espermátocitos paquiténicos (figura IV.17). No se observó expresión en ningún otro tipo celular del testículo, incluidas las espermátidas redondas. Esto resulta razonable, dada la mayor sensibilidad del ensayo de Northern-blot, realizado empleando radiactividad, en relación con la de la hibridación *in situ*, que empleó un método colorimétrico de detección (recordemos que, si bien los ensayos de Northern-blot detectaron una señal en las células posmeióticas, ésta fue menor que en las células meióticas).

Dado el altísimo nivel de identidad de secuencia existente entre nuestro clon y la región 3' del clon *pecanex* de ratón, así como la correspondencia de tamaño entre este último y la banda detectada por nosotros en los ensayos de Northern-blot de rata, decidimos efectuar análisis de la secuencia proteica predicha a partir del clon de ratón.

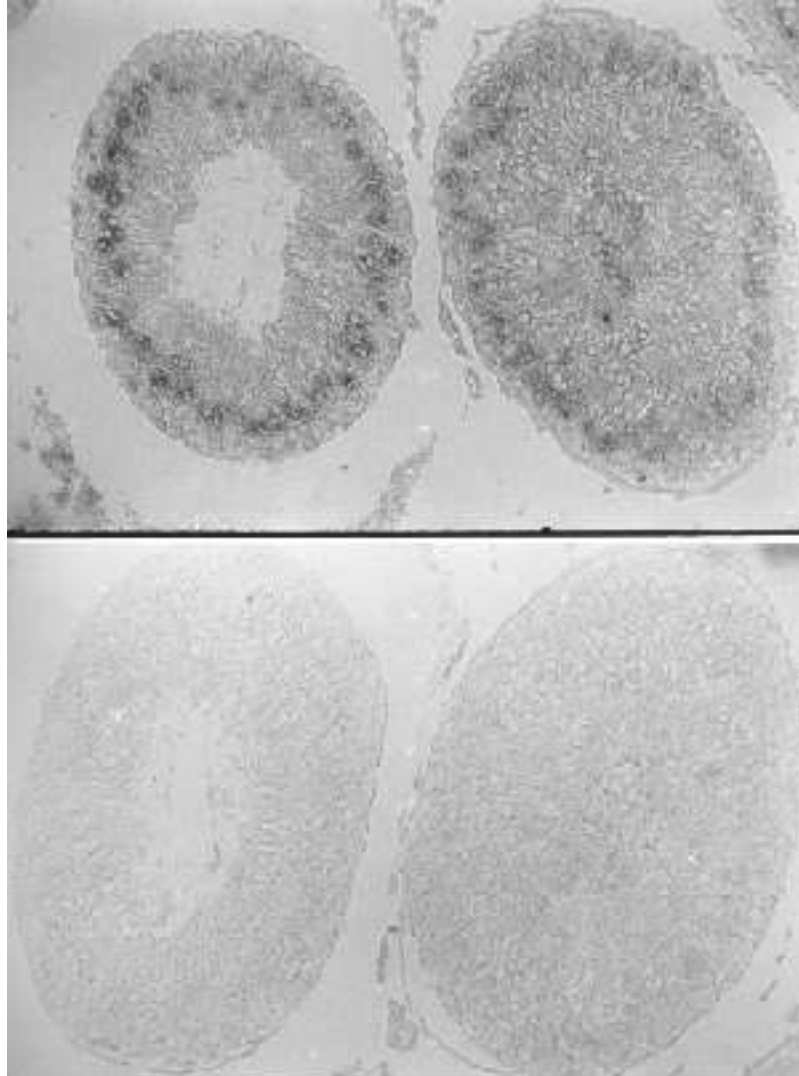


Figura IV.17. Hibridación *in-situ* con la sonda de *pecanex* en cortes de testículo adulto. En la parte superior se observa la hibridación con la sonda antisentido, que marca de manera específica los espermatoцитos primarios (células meióticas). En la parte inferior se aprecia la hibridización con la sonda "sentido (control negativo) que, como era de esperar, no da señal.

Análisis proteico

Pecanex codificaría en el ratón para una presunta proteína integral de membrana de 1446 aminoácidos (figura IV.18), con un peso molecular de 160 kD y un punto isoeléctrico de 6,42. Los programas de análisis por computadora (ver "Materiales y Métodos") nos indicaron la existencia de varias hélices hidrofóbicas de transmembrana; la mayor parte de ellos coincide en la existencia de siete u once de estos dominios (a modo de ejemplo, ver figura IV.19A); algunos predicen la existencia de siete hélices principales y cuatro posibles hélices secundarias. Las hélices de transmembrana se extenderían a lo largo de la mitad N-terminal de la proteína, confiriendo a *pecanex* una estructura de tipo serpiente (figura IV.19B). El programa para localización de proteínas PSORT (presente en el sitio Expasy) indica que *pecanex* posee un 80% de probabilidad de ser una proteína de membrana plasmática. Tal como se esperaría para una proteína integral de la membrana plasmática, la secuencia proteica predicha presenta varias señales potenciales de glicosilación de tipo Asn-X-Ser/Thr (Nelson y Cox, 2000); las asparraginas correspondientes se indican en letra destacada en la figura IV.18.

```
MSLVNFEPAARRASNICDTDSHVSSSTSVRFYPHDMIRLNRLLT  
IDTDLLEQQDIDLSPDLAATYGPTEEEAAQKVKHYYRFWVLPQLWIGINFDRLLTLLALF  
DRNREILENILAVVLAFLVAFILGSIILLIQGFFRDIWVVFQFCLVIASCQYSLLKSVQPD  
SSSPRHGHNRI IAYS RPVYFCLCCGLIWLDDYGSRNLTTSKFKLYGVTFTNPLVLLSA  
RDLVIVFTLFCPIVFFIGLLPQVNTFVMYLCEQLDIHIFGGNATTSLAALYSFLCSI  
VAVALLYGLCYGALRDSWDGQHVPLFSVFCGLLVAVSYHLSRQSNDPVLFSLMQSK  
IFPKADEKNPEDPLSEVKDPLPEKLSNSVSRERLQSDLVVVCVIIGVLYFAIHVSTVFTA  
LQPALKYVLYALVGVVGLVTHYVLPQVRKQLPWHCFSRPLLRTAEHSQYEVRNAATMM  
WFEKLVWLLFVEKNI IYPLIVLNELSSAETIASPKKLDTELGALMITIAGLKLRS  
SFSSPTYQYITVIFTVLFKFDYEAFFSETMLLDLFFMSILFSLWELLYKRQFVYTYV  
APWQITWGSFAHFAQPFVAVPHSAMLVQAIVSAFFSTPLNPFLGSAIFITSYVRPVK  
FWERDYNTKRVDSNTRLASQLDRNPGSDNNLNSIFYEHLTRSLQHS LCGDLLLGRW  
GNYSTGDCFILASDYLNALVHLIEIGNGLVTFQLRGLFRGTYCQOREVEAITEGVEE  
DEGFCCCEPGHVPHVLSFNAAFQQRWLAWEVVVTKYILEGYSITDNSAASMLQVFDLR  
RVLTTYVVKGIIYYVTTSSKLEEWLANETMQEGLRLCADRNYVDVDPTFNPNIDEDYD  
HRLAGISRESFCVIYLSWIEYCSSRRAKPLDVDKDSSLVTLCYGLCVLGRRALGTASH  
HMSSNLESFLYGLHALFKGDFRIS SVRDEWI FADMELLRKVVVPGIRMSIKLHQDHFT  
SPDEYDDPTVLYEAIVSHEKNLVIAHEGDPAWSAVLANSPSLLALRHVMDDGTYEYK  
IIMLNRRYLSFRVIKVNKECVRGLWAGQQQELVFLNRNPERGSIQNAKQALRNMIN  
SCDQPIGYPIFVSPPLTTSYSDSHDQLKEILGGPISLGNIRNFIVSTWHRLRKGGGAGC  
NSGGNIEDSDTGGGTSCPGNSAVTASDPHNNVSGSTGHGPGQAGSGLHPPTTSYPPT  
LGTSHSAHSVQSSLVLRQSPARASMASQSSYCYSSRHSSLRMSTTGFPVPCRRSSTSQIS  
LRNLPSSIQRSLSMVNQMEAAASQGGMGCVQHGLPSSSSSSQSI PACKHHTLVAF LGAE  
GGQGSATEAQPGNTSSPANI SHARKGEVIYRVQIVDLSQILEGINVSKRKELHWPDEG  
IRLKAGRNSWKDWSFQEGMEGHVVRWVPCSRDPSTRSHIDNTVLLVQIDDKYVTIE  
TGVLELGAEV
```

Figura IV.18. Secuencia aminoacídica predicha de la proteína *pecanex* de *Mus musculus*. En letra destacada se indican las asparraginas blanco de posible N-glicosilación. La secuencia correspondiente al péptido PX1, en la región C-terminal de la proteína, se encuentra subrayada.

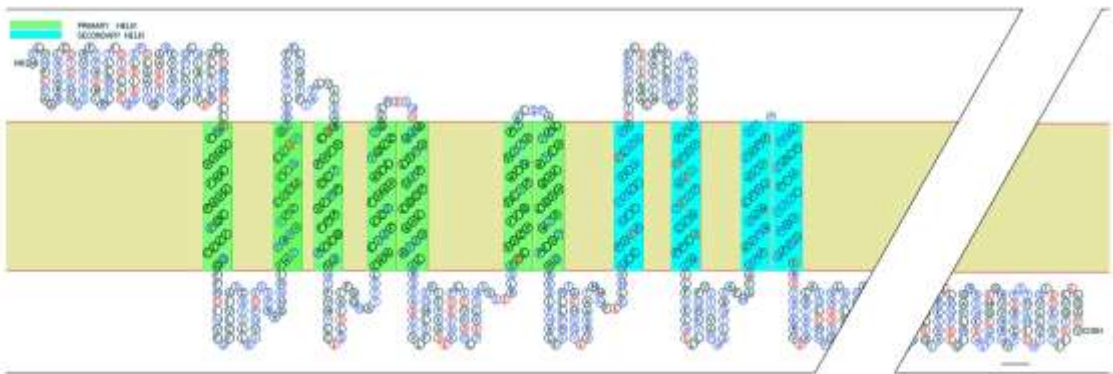
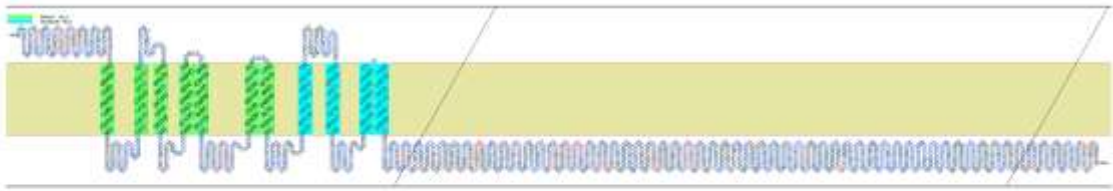
```

# Sequence Length: 1446
# Sequence Number of predicted TMHs: 7
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 233.731930000001
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 0.00018
# Sequence Total prob of N-in: 0.53157

Sequence      TMHMM2.0      inside      1      111
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    112    134
Sequence      TMHMM2.0      outside    135    171
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    172    194
Sequence      TMHMM2.0      inside    195    214
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    215    237
Sequence      TMHMM2.0      outside    238    264
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    265    287
Sequence      TMHMM2.0      inside    288    298
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    299    318
Sequence      TMHMM2.0      outside    319    370
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    371    393
Sequence      TMHMM2.0      inside    394    399
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    400    417
Sequence      TMHMM2.0      outside    418    1446

```

Figura IV.19. Pecanex sería una proteína de transmembrana. A. Identificación de probables hélices de transmembrana mediante el programa de análisis TMHMM (Expasy). Este programa prevé la existencia de siete hélices de transmembrana en la región N-terminal de la proteína. Los números correspondientes a los residuos aminoacídicos comprendidos en cada dominio están indicados. Se describe asimismo la orientación, según el análisis con este programa, de cada dominio hacia el interior ("inside") o exterior ("outside") de la célula. Es importante destacar, sin embargo, que si bien el número y posición de las hélices de transmembrana determinados mediante seis programas diferentes de análisis son prácticamente coincidentes, los diferentes programas discrepan en la orientación de los extremos hacia el interior o exterior de la célula. **B (en página siguiente).** Modelo bidimensional de la proteína pecanex realizado por el programa SOSUI (Expasy). Este programa prevé, además de las hélices primarias, la posible existencia de cuatro hélices secundarias de membrana. En verde se ven las hélices primarias y en celeste las posibles hélices secundarias. La superficie correspondiente a la membrana se representa en color beige, en tanto el interior y exterior celular se representan en blanco (No se identifican el interior y exterior celular, dado que aún no tenemos la certeza de cómo es la orientación de la proteína en la membrana). Los residuos hidrofóbicos aparecen en negro, los polares en azul, y los aminoácidos cargados en rojo. La figura inferior es una ampliación, en que la región contenida entre ambas líneas inclinadas de la figura superior ha sido eliminada, y representada como una interrupción en la figura. La línea negra en la figura inferior indica la región donde se localiza la secuencia del péptido PX1.



Con el objeto de identificar la proteína producto del gen *pecanex*, se sintetizó un péptido de 15 aminoácidos (PX1) correspondiente a una porción de la región C-terminal de la proteína predicha de rata (la secuencia y ubicación del péptido en la proteína se aprecian en las figuras IV.15, IV.18 y IV.19B). Este péptido fue utilizado para la producción de un suero policlonal anti-pecanex en conejos. En paralelo, se procedió a la construcción del vector recombinante pGEX-PX, conteniendo la región codificante de nuestro clon (correspondiente a 50 aminoácidos, a la que llamamos PX) subclonada en fase en un vector de expresión de *Escherichia coli*; esta construcción nos permitió expresar nuestro fragmento como proteína de fusión con GST, y emplearlo como control positivo para los ensayos a realizar con el anticuerpo. El anticuerpo anti-PX1 purificado (ver a continuación), así como el suero anti-PX1 sin purificar, reconocieron a su antígeno en forma específica en experimentos de Western-blot. Esto fue puesto en evidencia por su capacidad de unirse a la proteína de fusión GST-PX en un lisado de cultivo inducido a partir de un clon de *E. coli* que contenía un plásmido con el inserto en la dirección correcta (figuras IV.20 y IV.21). Por el contrario, ni el anticuerpo purificado ni el suero sin purificar reaccionaron de forma específica con un lisado de cultivo inducido a partir de un clon que dirigía la síntesis de una proteína de fusión conteniendo la región PX, pero clonada en la dirección opuesta (GST-PX'; figura IV.20).

Una vez comprobada la capacidad del anticuerpo de reconocer a su antígeno en un cultivo inducido de *E. coli*, el mismo se empleó para la localización del producto proteico en el testículo de la rata, tanto en ensayos de Western-blot como en inmunolocalizaciones. Para ambos tipos de experimento se utilizaron tanto el suero sin purificar como el anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad mediante una columna realizada con el péptido PX1 (figura IV.20; ver “Materiales y Métodos”). Dado que los resultados obtenidos en los ensayos de Western-blot fueron los mismos con el anticuerpo purificado por columna que con el suero sin purificar (ver figuras IV.21C y IV.21D), se empleó este último para la mayor parte de los experimentos.

Ensayos de Western-blot realizados contra extractos de proteínas de testículo total, y de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátocitos paquiténicos, por un lado, y espermátidas redondas, por otro, permitieron detectar una banda de

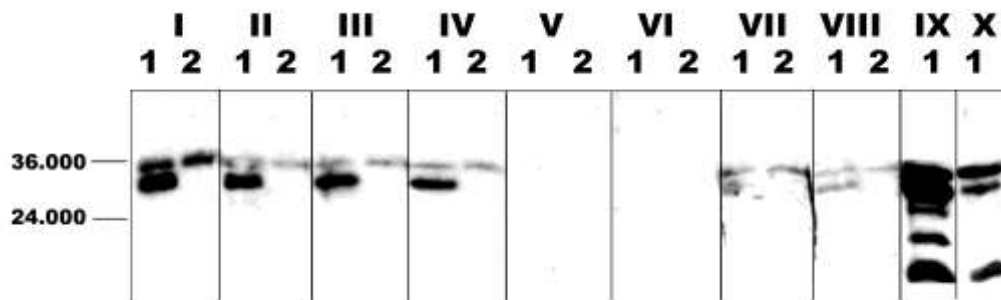


Figura IV.20. Ensayo de Western-blot para demostrar la purificación del anticuerpo anti-PX1 mediante inmunoafinidad. Se colectaron ocho fracciones (I a VIII). En los carriles designados con el número 1 se corrieron 2 μ l de un lisado proteico obtenido a partir de un cultivo inducido de *E. coli* conteniendo el vector pGEX-PX, y en el 2, igual volumen de lisado de un cultivo inducido conteniendo el vector pGEX-PX' (control negativo). Cada una de las tirillas I a VIII fue incubada con una dilución 1:1.000 de la respectiva fracción eluída de la columna. La tirilla IX fue incubada con una alícuota del suero anti-PX sin purificar, a una dilución 1:15.000 (control previo a la purificación), y la X con el eluyente de carga de columna a igual dilución (control de la capacidad de unión de la columna). Los experimentos de Western-blot se revelaron por la técnica de ECL. En las tirillas I a IV se detecta la presencia de la proteína de fusión GST-PX, de aproximadamente 30.000 kD, pero no la de la proteína GST-PX'. Por su parte, en la tirilla X se observa una notoria disminución de la banda en relación con la IX, lo que muestra la correcta unión a la columna. Las fracciones II a IV del anticuerpo purificado, por presentar la mejor relación de concentración y pureza, se reunieron y utilizaron en los experimentos posteriores. Los pesos moleculares indicados a la izquierda de la figura corresponden a bandas del marcador MW-SDS-70L (Sigma).

aproximadamente 150 kD, que se correspondería con el tamaño esperado para el producto del gen *pecanex* (figura IV.21A). Por lo tanto, si bien el ARNm de ese gen se encontraba presente principalmente en las células meióticas, el producto proteico resultó detectable tanto en la meiosis como durante la primera etapa de la espermiogénesis. Como era de esperar, la intensidad de la banda fue mayor en las fracciones celulares altamente enriquecidas en células de la línea germinal que en el testículo total, que contiene otros tipos celulares que, como vimos anteriormente, no expresaban el ARNm de *pecanex*. Experimentos realizados en paralelo, en los que se hizo competir el suero anti-PX1 con un exceso del péptido correspondiente previo a su incubación con las membranas no dieron señal alguna (figura IV.21A), demostrando que la reacción del suero con su antígeno era específica para el anticuerpo anti-PX1. La banda positiva no

se detectó en extractos proteicos procedentes de hígado ni de cerebro de rata (ver figura IV.21A), tejidos en los que tampoco se había detectado el transcripto del gen.

Habiéndose detectado en los ensayos de Western-blot una banda correspondiente al tamaño esperado para la proteína pecanex, se procedió a realizar fraccionamientos a partir de las poblaciones celulares enriquecidas en espermátocitos paquiténicos y espermátidas redondas, de modo de separar las proteínas de membrana. Se llevaron a cabo fraccionamientos celulares por dos técnicas diferentes, una mediante el uso de Tritón X-100, y la otra con urea. A continuación analizamos, mediante nuevos experimentos de Western-blot, si la banda correspondiente a la proteína pecanex era detectada, como esperaríamos a partir de la información teórica, en la fracción correspondiente a las proteínas de membrana. Los ensayos de Western-blot realizados con las fracciones obtenidas a partir de los dos métodos de fraccionamiento diferentes nos permitieron detectar, tanto en los espermátocitos paquiténicos como en las espermátidas redondas, una banda notoriamente más intensa en las fracciones correspondientes a proteínas de membrana (sobrenadantes del fraccionamiento con Tritón y precipitado del fraccionamiento con urea), confirmando que el anticuerpo reconocía una proteína integral de membrana. Curiosamente, la banda detectada no se correspondió con el tamaño esperado de pecanex, sino que resultó ser bastante menor (algo menor a 60 kD). Sin embargo, una banda de idéntico tamaño fue detectada cuando los experimentos se llevaron a cabo con el anticuerpo purificado (figura 21C) y con el suero sin purificar (figura 21D), y en experimentos realizados por triplicado. Además, esta banda resultó específica para el anticuerpo, ya que disminuyó de manera notoria en los experimentos en que el suero se compitió con el péptido PX1 (figura 21E). Estas evidencias, sumadas al hecho de que la banda positiva aparecía en las fracciones de membrana, tal como esperaríamos, nos permitieron sospechar que estábamos detectando un fragmento C-terminal de pecanex, y que, tal vez, la proteína de 150 kD se fracturaría durante los agresivos tratamientos empleados en los fraccionamientos.

Con el objeto de determinar si la banda de menor tamaño correspondía a un fragmento de la proteína pecanex, ésta fue eluída a partir de geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata, en los que se corrieron los sobrenadantes de la lisis con Tritón X-

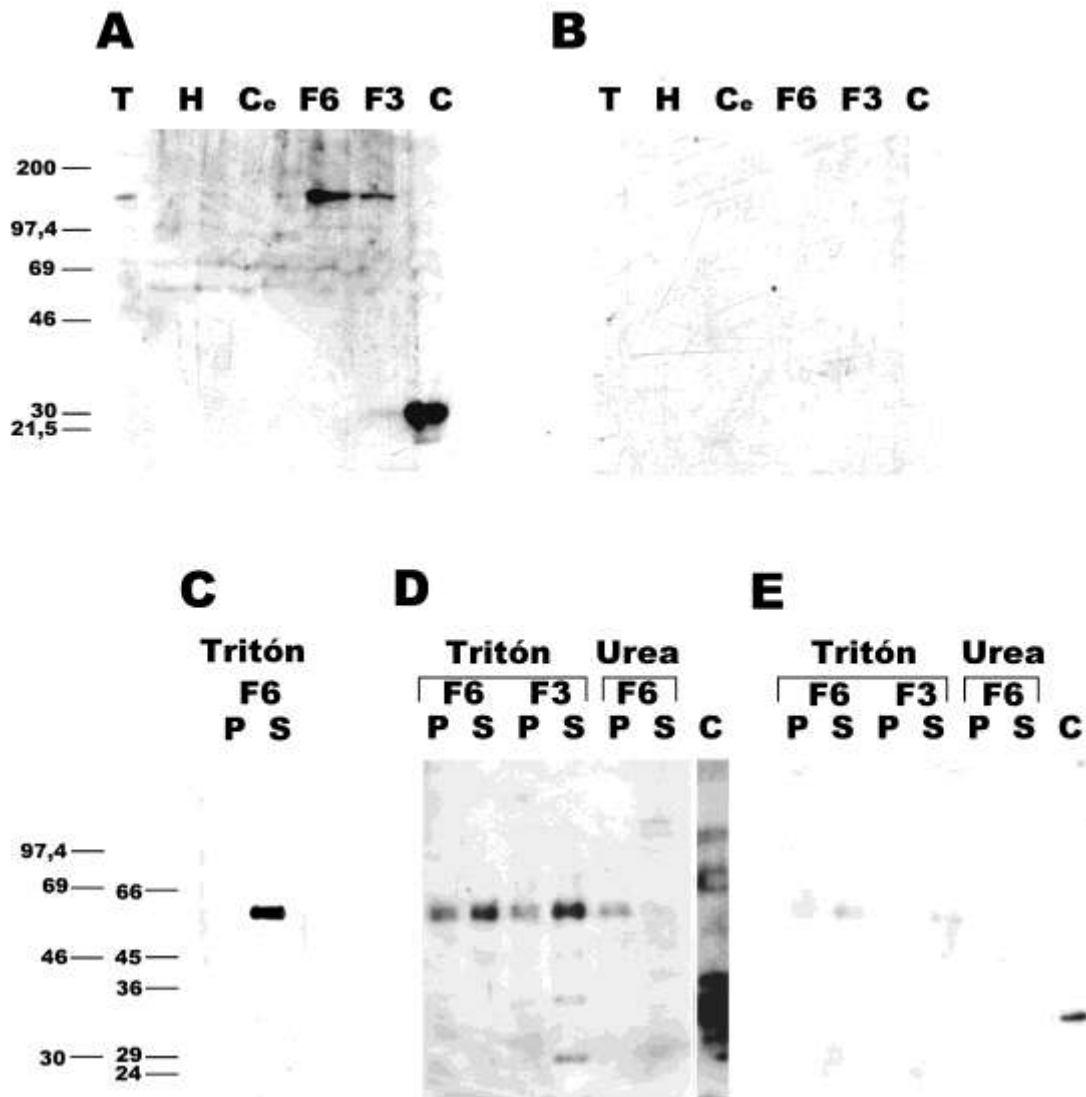


Figura IV.21. Detección de la proteína pecanex mediante ensayos de Western-blot. **A.** Experimento realizado con el suero anti-PX1 contra un lisado proteico de: testículo (T), hígado (H), cerebro (Ce), espermatozoides paquiténicos (fracción 6 de elutriación, F6), espermátidas redondas (fracción 3 de elutriación, F3) y cultivo inducido de *E. coli* con el plásmido pGEX-PX, como control (C). Se cargaron las proteínas de 1×10^5 células por carril para tejidos enteros y para la fracción F6, y 2×10^5 para la fracción F3. **B.** Experimento idéntico al mostrado en A, pero con el suero competido con el péptido PX1 previo a su incubación con la membrana. Como marcador de peso molecular en las figuras A y B se utilizó el "Rainbow coloured protein molecular weight marker" (Amersham). **C.** Detección de pecanex en proteínas procedentes de espermatozoides paquiténicos (F6), fraccionados por la técnica de lisis con Tritón. El anticuerpo anti-PX1 purificado por columna fue usado para la inmunodetección. Tanto para los fraccionamientos con Tritón como para los fraccionamientos con urea (ver figuras D y E), se compararon los precipitados de lisis (P) y los sobrenadantes respectivos (S). **D.** Detección de pecanex en proteínas obtenidas a partir de espermatozoides paquiténicos (F6) y espermátidas redondas (F3), fraccionados por las técnicas de Tritón, por un lado, y urea, por el otro, según se indica en la figura. El suero anti-PX1 fue empleado para la inmunodetección. **E.** Experimento idéntico al mostrado en D, pero con el suero competido con el péptido PX1 previo a su incubación con la membrana. El control (C) en las figuras D y E es el mismo que en A y B. El marcador de peso molecular de mayor tamaño en las figuras inferiores es el mismo que en A y B, y el de menor tamaño (a la derecha del anterior) es el de la figura IV.20.

100; la identidad de la banda fue confirmada mediante experimentos de Western-blot realizados en paralelo (figura IV.22A). La banda eluída fue digerida con tripsina y analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, obteniéndose el espectro observado en la figura IV.22B. A pesar de que la tenue intensidad de la banda denota que la cantidad de proteína presente en las mencionadas fracciones era escasa, el análisis espectrométrico permitió detectar siete péptidos cuyas masas se correspondieron con las masas peptídicas teóricas, resultantes de la digestión virtual con tripsina de la secuencia predicha para pecanex de ratón (figura IV.22C). El análisis de la secuencia primaria de uno de estos péptidos permitió confirmar algunos de los aminoácidos. Estos datos constituyen una fuerte evidencia en apoyo de que la banda de menor tamaño, detectada en las fracciones correspondientes a proteínas de membrana, correspondería a la porción C-terminal de pecanex. La figura IV.22D muestra la localización de los siete péptidos en la secuencia predicha de pecanex.

Desafortunadamente, no logramos detectar la proteína pecanex en experimentos de inmunolocalización, con el suero anti-PX1 ni con el anticuerpo purificado. Ello podría obedecer al hecho de que se trata de un anticuerpo dirigido contra secuencia primaria, y por lo tanto podría fallar en el reconocimiento de su antígeno si el epítipo (u epítopos) reconocido se hallara enmascarado, por ejemplo, debido a algún tipo de plegamiento adoptado por esa región de la proteína. Por otro lado, la región podría encontrarse involucrada en interacciones con otras moléculas, lo que también haría difícil el reconocimiento por parte del anticuerpo.

Discusión

Varias líneas de evidencia señalan a *pecanex* como un gen cuyo producto desempeñaría una función específica en el Sistema Nervioso:

- Este gen, identificado originalmente en *Drosophila melanogaster*, posee en dicho organismo una función neurogénica, lo que ha sido comprobado mediante estudios efectuados con mutantes (ver más arriba).

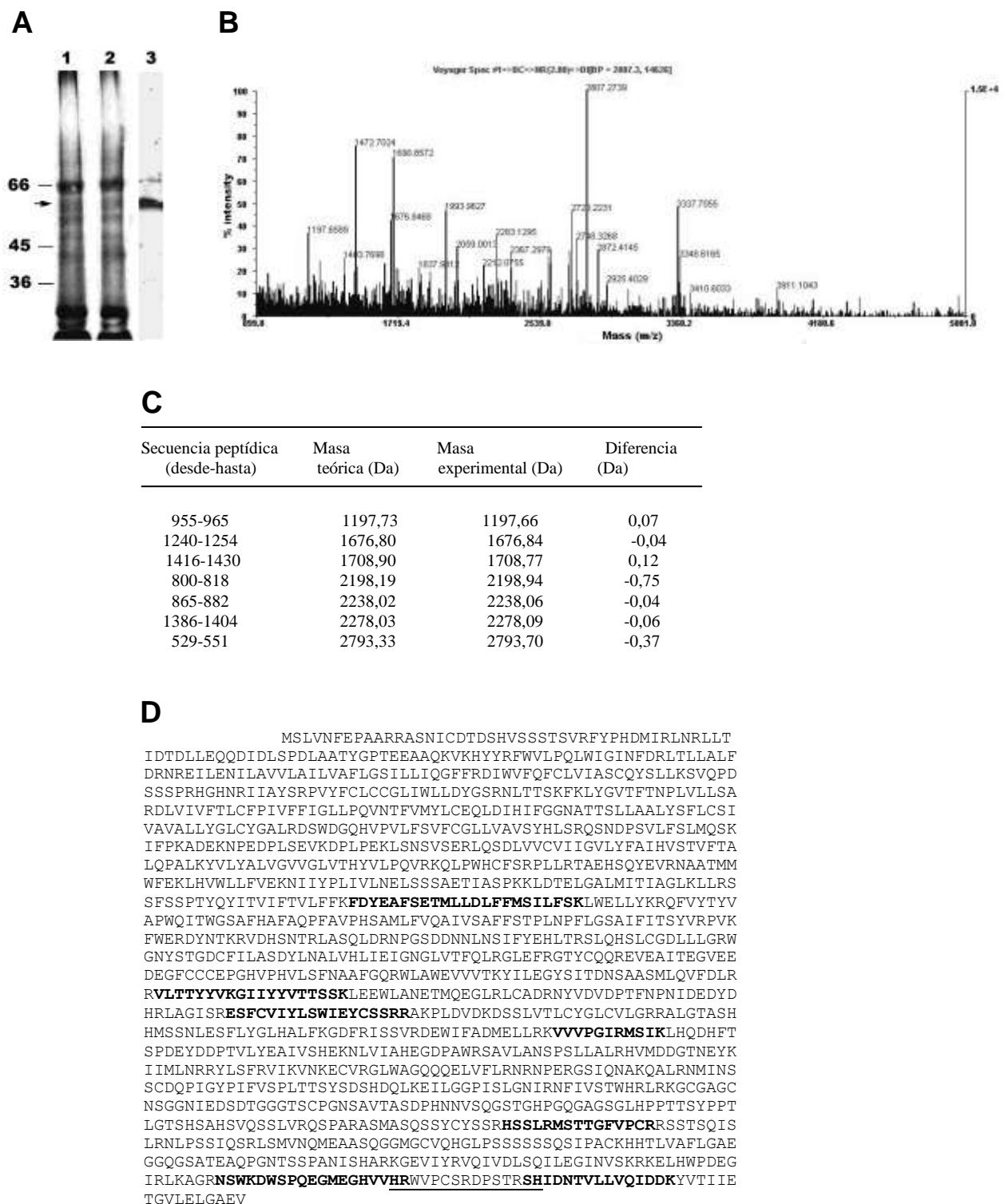


Figura IV.22. Estudio de la banda de 60 kD por espectrometría de masas. A. Análisis por SDS-PAGE del sobrenadante de lisis de Tritón de la fracción espermáticas (carriles 1 y 2). El gel fue teñido con nitrato de plata. Se observa asimismo un experimento de Western-blot de un carril equivalente, con el suero anti-PX1 (carril 3). La banda señalada con una flecha fue cortada de los carriles 1 y 2 y analizada por espectrometría de masas. El marcador de peso molecular empleado es el de la figura IV.20. **B.** Espectro obtenido por espectrometría de masas MALDI-TOF de la banda indicada en A, digerida con tripsina.

C. Comparación de las masas experimentales obtenidas a partir del espectro mostrado en la figura B con las masas teóricas obtenidas por digestión trípica virtual de la secuencia predicha de *pecanex* de ratón.

D. Secuencia aminoacídica predicha de *pecanex* de ratón. En negrita se indican los péptidos identificados en la rata por espectrometría de masas MALDI-TOF. La región subrayada corresponde a la secuencia del péptido PX1.

- Un grupo de investigadores comunicó el aislamiento, a partir de una genoteca de ADNc de cerebelo de rata, de un clon de 2,5 kb conteniendo una región de 650 pb cuya secuencia aminoacídica predicha (correspondiente a un marco de lectura parcial) exhibía un porcentaje de similitud del 83% a lo largo de 189 aminoácidos, con la secuencia proteica predicha de *pecanex* de *Drosophila*. Esto llevó a los autores a postular la identificación de un gen homólogo de *pecanex* en mamíferos (Gilbert *et al.*, 1992). Sin embargo, el nivel de identidad de este ADNc de rata con el clon "*pecanex*" de ratón es muy bajo, tanto al nivel de secuencia nucleotídica (74% a lo largo de 386 pb) como de secuencia proteica (69% a lo largo de 130 aminoácidos). Por lo tanto, creemos que el clon identificado por Gilbert y colaboradores no se correspondería con el ADNc que figura en el Genbank como "mouse *pecanex*", y los productos de ambos podrían sólo poseer algún dominio en común.

- La búsqueda de homologías de secuencia para nuestro clon de rata en el Genbank mediante el programa BLAST indica que nuestro clon, además de la homología ya descrita con el clon de ADNc de *pecanex* de ratón, exhibe un 89% de identidad a lo largo de 784 nucleótidos con un clon de ADNc de *Mus musculus* (número de acceso al Genbank AK01438), obtenido a partir de una genoteca de sustracción/normalización de cerebro (Carninci *et al.*, 2000). Las genotecas normalizadas permiten el aislamiento de genes expresados a muy bajo nivel. Sin embargo, dado que el proceso de normalización produce un notorio enriquecimiento en ARNm "raros" (Bonaldi *et al.*, 1996), puede también conducir, en nuestra opinión, a la identificación, como específicos de un cierto tejido, de mensajes que correspondan, en realidad, a expresión basal de un gen en ese tejido. Por lo tanto, la identificación de un clon homólogo al nuestro a partir de la genoteca de sustracción/normalización de cerebro no nos parece de relevancia.

El nuestro es el primer estudio de análisis de la expresión génica de *pecanex* en distintos tejidos de mamífero. Ensayos de Northern-blot e hibridación *in situ* nos permiten afirmar que *pecanex* es un gen expresado en las células de la línea germinal del testículo adulto de la rata, y más intensamente en la profase meiótica. Los ensayos de Northern-blot no nos permitieron, en cambio, detectar expresión del gen en ninguno de los otros tejidos analizados, incluyendo el cerebro. Tampoco pudimos detectar la presencia de transcripto en el tejido nervioso de embriones y neonatos, ni en el testículo de neonatos, que contiene únicamente células premeióticas. Lo antedicho nos permite afirmar que nuestro clon, que es el homólogo del ADNc presente en el Genbank como *pecanex* de ratón, corresponde a un transcripto específico de la línea germinal del testículo, diferencialmente expresado durante la meiosis.

Sin embargo, no podemos asegurar que no existe expresión de *pecanex* en el tejido nervioso. En primer lugar, el gen podría ser expresado a niveles muy bajos, o sólo por un pequeño grupo de células, de modo que escapase a nuestra capacidad de detección mediante la técnica de Northern-blot. En cambio, técnicas que producen un enorme enriquecimiento en secuencias expresadas a muy bajo nivel como la normalización, permitirían su identificación. Si este fuera el caso, los niveles de expresión del gen en los otros tejidos, incluido el cerebro serían, de todos modos, muy ínfimos en comparación con los observados para las células meióticas, en que fue posible detectar una banda de intensidad considerable en los ensayos de Northern-blot, incluso con sólo cuatro horas de exposición (datos no mostrados).

Por otra parte, no podemos excluir la posibilidad de que existan variantes de procesamiento para este gen; el procesamiento alternativo es un mecanismo de control de la expresión génica muy difundido en todos los tejidos (Venables, 2002), incluido el testículo (ver “Introducción”). Como hemos mencionado anteriormente, análisis de la expresión de *pecanex* en *Drosophila* pusieron de manifiesto la existencia de tres transcriptos, el mayoritario de 9 kb y los otros dos de 3,7 y 2,3 kb. Aunque los tres transcriptos fueron detectados en todos los estadios del desarrollo embrionario estudiados, el de 9 kb exhibió diferencias en su nivel de expresión (LaBonne *et al.*, 1989). En nuestro caso, hemos detectado una única banda de ARNm de *pecanex* en el testículo de la rata. No obstante, dado que la sonda empleada correspondía a la región 3’

del gen, debemos considerar la posibilidad de que existan, tanto en el testículo como en otros tejidos (¿tal vez cerebro?) variantes de procesamiento que carezcan de la región 3' codificante y del UTR 3'. Con el objeto de determinar si *pecanex* es un gen de expresión diferencial de la línea germinal del testículo, o una variante de procesamiento testículo-específica, hemos sintetizado iniciadores a partir de la región 5' del ADNc de ratón. Estos iniciadores nos permitirán amplificar, por RT-PCR, la región correspondiente del ARNm de rata, para su utilización como sonda en nuevos ensayos de Northern-blot contra los diferentes tejidos. Mediante esta nueva serie de experimentos esperamos determinar si una sonda basada en la región 5' del gen detecta el único transcrito, diferencial de testículo, ya identificado, o si, por el contrario, permite la identificación de otros transcritos adicionales, en el testículo y/o en otros tejidos.

Anticuerpos dirigidos contra un péptido correspondiente a una porción de la región C-terminal de *pecanex* nos permitieron asimismo demostrar, mediante experimentos de Western-blot, que el ARNm se traduce en el testículo, produciendo una proteína del tamaño esperado, y que la proteína es detectable tanto en las células meióticas como durante la primera etapa de la espermiogénesis (espermátidas redondas). Esta es la primera demostración de la existencia de un producto proteico del gen *pecanex*, dado que la existencia de la proteína no había sido puesta de manifiesto anteriormente, ni siquiera en *Drosophila* (podía inferirse indirectamente, a partir de la existencia de un fenotipo mutante). El mencionado anticuerpo no permitió, en cambio, la detección de una proteína en el cerebro ni en el hígado de la rata, confirmando la ausencia de la región C-terminal de *pecanex* en dichos tejidos, al menos a niveles detectables. Mediante ensayos de Western-blot pudimos también determinar que el anticuerpo reconocía una banda en una fracción correspondiente a las proteínas de membrana, como era esperable a partir del análisis teórico de la secuencia proteica. Curiosamente, sin embargo, en este caso el tamaño de la banda identificada no se correspondió con el tamaño determinado para la proteína, sino que resultó notoriamente menor que la banda observada en los experimentos realizados con las células sin fraccionar. Dado que la reacción antígeno-anticuerpo demostró ser altamente específica, y que la banda de menor tamaño fue observada tanto en experimentos efectuados con el suero sin purificar (como lo demuestran los ensayos de competición) como con el anticuerpo puro, y en extractos proteicos de poblaciones celulares fraccionadas mediante dos métodos

diferentes, pensamos que esa banda de menor tamaño, detectada en la fracción membrana, efectivamente correspondía a la porción C-terminal de la proteína pecanex. Una posible explicación para nuestro resultado es que la proteína podría poseer algún punto frágil, propenso a la fractura con los agresivos tratamientos empleados durante los fraccionamientos (podría tratarse también de un producto de degradación enzimática aunque, si ese fuera el caso, resulta llamativa su visualización como una única banda). Con el objeto de demostrar la identidad de la banda de menor tamaño, la misma fue escindida de geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata, sometida a digestión parcial con tripsina y analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados del análisis de masas de los péptidos obtenidos constituyen una fuerte evidencia de que esa banda de menor tamaño corresponde a la porción C-terminal de pecanex. Llama sin embargo la atención la discrepancia entre el tamaño que esta banda poseería, a juzgar por los péptidos que contiene (al menos 918 aminoácidos, ver figura IV.22D), y su peso molecular relativo estimado a partir de la migración en los geles SDS-PAGE, cercano a los 60 kD. No poseemos aún una explicación para dicha discrepancia.

Pecanex sería una proteína integral de membrana, probablemente de la membrana plasmática, según indican los análisis de hidrofobicidad llevados a cabo por medio de distintos programas de computación. De acuerdo con esto, la secuencia proteica predicha presenta varias señales potenciales de glicosilación de tipo Asn-X-Ser/Thr (ver figura IV.18). Los distintos programas para análisis de dominios de transmembrana sugieren la presencia de siete de estos dominios, u once, donde los últimos cuatro serían hélices secundarias. En base a ello, nos surge la interrogante acerca de si pecanex podría pertenecer a la gran familia de receptores 7-TM, receptores que poseen siete dominios de transmembrana (pecanex de *Drosophila*, en cambio, no pertenecería a esta familia ya que los programas de análisis indican que poseería únicamente tres dominios de transmembrana). Este grupo comprende la mayor familia de proteínas de nuestro organismo, con más de mil integrantes, englobando a receptores para muchas hormonas, neurotransmisores, quimioquinas, receptores sensoriales para olores y gustos, e incluso para la luz (ver revisiones por Gether, 2000 y Pierce *et al.*, 2002). Suelen desempeñar funciones fundamentales en la transmisión de señales. Habitualmente se les conoce

como receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), debido a que la mayor parte de ellos actúa por medio de la activación de proteínas G heterotriméricas, aunque investigaciones recientes indican un número creciente de vías alternativas de señalización para estos receptores. Las proteínas de tipo 7-TM no comparten ninguna homología general de secuencias, sino que su único rasgo estructural común es la presencia de las siete α -hélices de transmembrana, conectadas por bucles intra y extracelulares alternados. Existe, sin embargo, homología significativa dentro de algunas subfamilias, aunque aún en estos casos esas homologías se reducen a unos pocos residuos clave conservados. La comparación de secuencias demostró que pecanex de ratón exhibe un 37% de similitud a nivel de su región N-terminal con el receptor olfatorio 5.3 del pez cebra *Danio rerio* (número de acceso AAF27260.1), que es un receptor del tipo mencionado. Sin embargo, se necesitan más estudios para saber si pecanex pertenece o no a esta gran familia de receptores. Será necesario establecer ensayos de unión de proteínas y, si éstos dieran positivos, proceder a la caracterización de sus ligandos. Los receptores de tipo 7-TM son los blancos de aproximadamente un 60% de las drogas comercializadas en el mundo entero (Muller, 2000). Inclusive el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) utiliza receptores de este tipo como cofactores para su ingreso a las células (Gether, 2000). Por lo tanto, si pecanex resultara pertenecer a la familia de receptores 7-TM cobraría un interés adicional ya que podría, tal vez, hallarse involucrado en patologías vinculadas con la espermatogénesis.

d. Estudios vinculados con la regulación de la expresión génica durante la espermatogénesis

Aislamiento y análisis de clones conteniendo un elemento repetido ID

El producto de clonado de la banda número 2 del DD, de 264 pb, fue empleado como sonda para el rastreo de una genoteca de ADNc específica de espermátidas. Se obtuvo un gran número de playas de lisis positivas, de las cuales doce fueron secuenciadas, junto con dos clones más, obtenidos a partir de la genoteca de ADNc de espermátocitos (ver tabla IV.3). Curiosamente, al analizar la secuencia de estos clones se encontró que todos ellos compartían una misma secuencia de 75 a 109 pb, difiriendo por completo en el resto de su secuencia (esa corta secuencia también se hallaba presente en la sonda, mientras que el resto de la sonda no mostraba similitud con ninguno de los clones "pescados"). El análisis de esta corta secuencia en los bancos de datos indicó que se trataba de un elemento medianamente repetido de tipo ID ("identifier", ver "Introducción"), más específicamente, el ID t-BC2 (figura IV.23A), que pertenece a la subfamilia de estos elementos expresada en forma específica en el testículo (Kim *et al.*, 1995).

Los elementos ID constituyen una familia de secuencias cortas, medianamente repetidas (SINEs), presentes en el genoma de los roedores. Se caracterizan por poseer una región central de 75 pb conteniendo un promotor para la ARN polimerasa III, y una cola de oligo-dA 3' de 10 a 40 pb de longitud, y están flanqueadas por repetidos directos. La región central es derivada de un ARNt, probablemente el ARNt^{ala} (Kim *et al.*, 1995). El número de elementos ID varía en por lo menos dos o tres órdenes de magnitud entre las diferentes especies de roedores; el genoma de la rata es el que posee el mayor número de IDs, 150.000, en tanto el ratón sólo posee 4.000, lo que indica muy diferentes

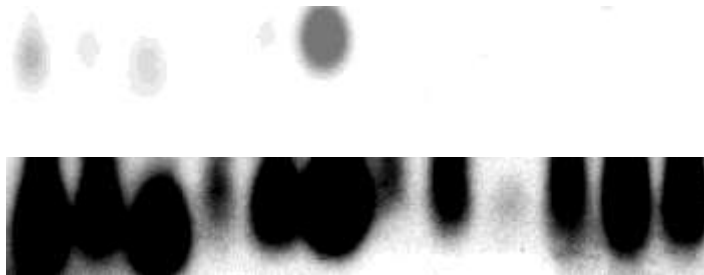
velocidades de amplificación (Kass *et al.*, 1996). Como hemos mencionado, estas secuencias medianamente repetidas de ADN son transcritas por la ARN polimerasa III de forma tejido-específica en varios tejidos de la rata, entre ellos el cerebro y el testículo (Kim *et al.*, 1995). La presencia de las regiones flanqueantes parece ser

A

```
GGGGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAGCGCTTGCCTAGCAAGCGCAAGGCCCTGGGTTCCGGTCC
CCAGCTCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAA
```

B

18S- C T Tt E O Ce Co P H I B R



C



D

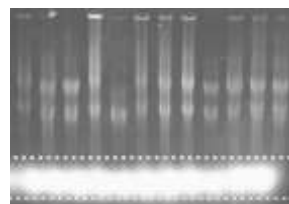


Figura IV.23. Patrón de expresión del elemento repetido ID, analizado mediante ensayos de Northern-blot. **A.** Secuencia del repetido ID t-BC2, identificado dentro de la banda 2 del DD. **B.** Hibridación empleando la región de la banda 2 correspondiente al ID como sonda. Cada carril contiene, respectivamente, 40 µg de ARN total de: espermatozoides paquiténicos (C), espermátidas redondas (T), testículo total (Tt), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (Ce), corazón (Co), pulmón (P), hígado (H), intestino (I), bazo (B) y riñón (R). Se observa la posición de la banda de ARNr 18 S como marcador de peso molecular. La membrana se expuso durante toda la noche. **C.** Mismo experimento que en B, pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia casi total de expresión en algunos tejidos. Las figuras B y C corresponden a una sección del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mostrado en la figura D (indicada entre líneas punteadas blancas). El gel de la figura D muestra que todos los carriles fueron cargados con cantidades equivalentes de ARN.

necesaria para la acumulación tejido-específica de estos transcritos (Vidal *et al.*, 1993). Su amplificación, al igual que en los SINEs en general, sería por retrotransposición, de modo que copias de estos elementos podrían quedar insertas en las regiones no codificantes de genes para la ARN polimerasa II; es más, si estos elementos, al insertarse en la proximidad de genes (5' y 3' UTRs e intrones) perdieran parte de su secuencia, podrían perder también su capacidad de retrotransponer y parte de su promotor para la ARN pol III, y pasarían a ser transcritos únicamente por la polimerasa II, conjuntamente con el ARNm correspondiente. De ese modo, copias de elementos ID pueden ser halladas en las regiones no codificantes de mensajeros de una variedad de tejidos de la rata, aunque se ha visto que las proporciones varían enormemente entre los diferentes tejidos, siendo mucho más frecuentes en el cerebro (McKinnon *et al.*, 1986).

A efectos de determinar si existía alguna relación posible entre la inserción del elemento ID y la regulación de la expresión génica tejido-específica en el testículo, nos dedicamos a estudiar cuáles eran las secuencias de ADNc en las que éste se hallaba inserto. Con ese fin, las secuencias de los clones aislados de la genoteca de ADNc fueron comparadas en el Genbank mediante los programas BLAST y FASTA (previamente se les eliminó la secuencia del ID). Los resultados de dicha comparación, que se observan en la tabla IV.3, muestran que, de catorce ADNc secuenciados, once correspondieron a genes o ESTs de expresión específica o diferencial del testículo. Dos de ellos no resultaron informativos, ya que uno procedía de una mezcla total de tejidos de rata y el otro no encontró secuencias homólogas en el Genbank, y sólo uno se correspondió con un EST de expresión diferencial de vejiga urinaria y glándula mamaria. Ninguno de los ID fue hallado inserto en la región no codificante de un gen de uso doméstico.

Con el objeto de efectuar este análisis de un modo más exhaustivo, realizamos una búsqueda en el Genbank de secuencias de genes de roedores que contuvieran el elemento ID en su interior. Naturalmente, la mayor parte de las correspondencias pertenecieron a genes de rata. De un total de 159 genes conteniendo el elemento ID resultantes de la búsqueda, 48 lo contenían en su región 5' UTR, 50 en su región 3' UTR, 43 en un intrón, 17 en promotores, y sólo uno presentó el elemento en un exón.

Tabla IV.3. Resultado de comparación de secuencias de clones portadores del ID, aislados de las genotecas de ADNc de espermatidas y espermatocitos de rata (primeras correspondencias)

Clon	ADNc homólogo	Descripción	Organismo	Porcentaje de similitud
1	<i>TSEC-1</i>	Gen de expresión testículo-específica	<i>Mus musculus</i>	91,15%
2	<i>TSEC-1</i>	Gen de expresión testículo-específica	<i>Mus musculus</i>	91,15%
3	<i>RPGRIP</i>	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-interacting Protein (variante testículo-específica)	<i>Mus musculus</i>	92,7%
	BF319517	ADNc de espermatidas redondas	<i>Mus musculus</i>	93%
4	<i>rMTM</i>	Miotubularina testicular	<i>Mus musculus</i>	88,4%
5	BE113531	EST de genoteca de sustracción de testículo y tejido nervioso	<i>Rattus norvegicus</i>	99,74%
6	BE119362	EST de genoteca de sustracción de testículo y tejido nervioso	<i>Rattus norvegicus</i>	90%
7	AV272430	EST de genoteca de sustracción de testículo	<i>Mus musculus</i>	89%
8	<i>LIM-K</i>	Kinasas expresadas en cerebro y otros tejidos; variante testículo-específica	<i>Mus musculus</i>	80,5%
9	BF284688	EST de rata normalizada (mezcla de tejidos)	<i>Rattus norvegicus</i>	99,8%
10	<i>CEACAM</i>	Moléculas de adhesión intercelular; variante testículo- específica	<i>Mus musculus</i>	69%
11		No dio niveles significativos de similaridad con ningún EST		
12	AI020721	EST de glándula mamaria (macho)	<i>Mus musculus</i>	87%
	BB123373	EST de vesícula urinaria (macho)	<i>Mus musculus</i>	85%
13	BG100992	EST diferencial de espermatocitos	<i>Mus musculus</i>	75,3%
14	<i>Srsp1</i>	Gen de expresión diferencial de espermatocitos	<i>Rattus norvegicus</i>	*

* La secuencia del gen *Srsp1* fue identificada por nosotros (figura IV.10). En este caso, el elemento ID no correspondería a un ADNc sino que se ubica en la región promotora.

De la totalidad de las secuencias, únicamente siete (menos del 5%) correspondieron a genes codificantes para productos de uso doméstico (entre éstos incluimos a aquellos genes que, por desconocimiento preciso de su función, no pudimos descartar que fueran de uso doméstico), en tanto la gran mayoría (más del 95%) correspondió a genes de expresión tejido-específica, o a variantes de procesamiento específicas de diferentes tejidos. De ellas, un 32% correspondió a genes que codifican para productos diferencialmente expresados en el cerebro o en el testículo, en tanto aproximadamente un 10% fueron oncogenes.

Patrón de expresión del repetido ID

Con el propósito de estudiar la expresión de los elementos ID en los distintos tejidos, y compararla con su expresión en el testículo, se efectuaron ensayos de Northern-blot empleando el ID (figura IV.23A) como sonda contra ARN total de diez tejidos diferentes. La hibridación produjo un “chorreado” a lo largo del carril en varios tejidos correspondiendo, seguramente, a elementos ID insertos en transcritos de la ARN polimerasa II; dicho "chorreado" tuvo una intensidad notoriamente menor en algunos tejidos, como el hígado (datos no mostrados). La señal observada en la parte inferior de cada carril nos permitió analizar el patrón de expresión del ID, transcrito por la ARN polimerasa III. Como era de esperar, se detectó una señal muy intensa en el ARN de cerebro; le siguió en intensidad la señal observada en el testículo, y luego en el ovario (figura IV.23B). Sobreexposiciones de varios días nos permitieron detectar una señal en casi todos los tejidos analizados, aunque en algunos de ellos ésta fue sumamente débil (figura IV.23C). Con respecto a la expresión del ID en el testículo, la misma se detectó tanto en el ARN correspondiente a testículo total, como en el de los espermatozoides y espermátidas, aunque la señal fue algo más intensa en los dos primeros.

Discusión

A partir del rastreo de una genoteca de ADNc de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátidas redondas empleando la banda número 2 del DD, de 264

pb, como sonda, se aislaron varios clones que compartían con la mencionada sonda, entre 75 y 109 pb correspondientes al repetido ID. Dado que ese resultado no se corresponde con el observado en el experimento de Northern-blot de la figura IV.4 (empleando la banda 2 entera como sonda), podemos suponer que, en ese caso, merced a la rigurosidad de los lavados, se habría detectado el ARNm diferencial de las espermatidas, complementario a la banda 2, en tanto en el rastreo de la genoteca, la región de complementariedad con el ID habría sido suficiente para la obtención de bandas de lisis positivas.

La especificidad neuronal de la transcripción de los elementos ID por parte de la ARN polimerasa III y la localización de estos elementos dentro de genes de expresión neuronal, hicieron que varios autores propusieran que los repetidos ID podrían actuar como reguladores positivos, o potenciadores, de la expresión génica en las neuronas; ese efecto podría ejercerse, tal vez, a través de la activación de genes específicos, por un mecanismo que involucraría a los transcritos de la polimerasa III. Mediante la utilización de un elemento ID adyacente a un gen reportero para la ARN polimerasa II, se demostró que el elemento ID colocado en *cis*, era capaz de estimular la expresión del gen reportero en líneas celulares neuronales que expresaran los ID transcritos por la ARN polimerasa III, pero no en células en que la expresión de esos transcritos cortos estuviera ausente. Más aún, se observó que el ID era capaz de funcionar en varias posiciones diferentes, y en ambas orientaciones, propiedad característica de los potenciadores (McKinnon *et al.*, 1986).

Dada la existencia de transcripción a partir de la ARN polimerasa III de IDs testículo-específicos, nos propusimos estudiar la inserción de estos elementos en transcritos de la ARN polimerasa II, como forma de averiguar si se podía establecer alguna relación entre la presencia de estos elementos y la regulación de la expresión génica tejido-específica en el testículo, de modo similar a lo propuesto para el cerebro. Resulta interesante que de catorce clones (doce de ADNc de espermatidas y dos clones de espermatocitos) conteniendo el elemento ID secuenciados, sólo uno parece no corresponder, en principio, a un transcripto específico de testículo (y dos resultaron no informativos). En ninguno de los casos analizados, el ID fue hallado inserto en un gen

de uso doméstico. El intento de realizar un estudio más exhaustivo, mediante análisis en los bancos de datos, de genes que contuvieran el elemento repetido ID, parece también indicar que estos elementos han sufrido una fuerte preferencia por su inserción en las regiones no codificantes adyacentes a genes de expresión diferencial de ciertos tejidos, entre ellos el testículo. Esto, si bien no nos permite sacar conclusiones, resulta sugerente en el sentido de que la presencia de estas secuencias en las regiones no codificantes de ARNs mensajeros pudiera estar, de algún modo, vinculada con la regulación tejido-específica de la expresión de esos genes.

Existen evidencias que sugieren que el ARN del elemento ID BC1, de 149 b de longitud, sería el precursor, a partir del cual se habrían originado los demás IDs por retrotransposición. BC1 presenta una región 5' homóloga al resto de los IDs, y una región 3' exclusiva. Muslimov *et al.* (2002), empleando la región de 60 nucleótidos 3' exclusiva de este repetido como sonda, han demostrado que BC1 se halla expresado en el testículo, particularmente en las espermatogonias, y con especial intensidad en los acúmulos de células sinciciales. La expresión decrece en los espermatocitos, aunque permanece detectable, siendo prácticamente indetectable en las espermátidas redondas y estadios posteriores de la espermiogénesis. Esto llevó a los autores a proponer que el ARN BC1 operaría en grupos de células germinales interconectadas, donde podría funcionar como mediador en el control traduccional, de forma algo análoga a la función propuesta para BC1 en el tejido nervioso [Se ha postulado que BC1 actuaría como modulador traduccional en microdominios neuronales post-sinápticos (Brosius y Tiedge, 2001)]. A diferencia de los autores mencionados, nosotros hemos efectuado ensayos de Northern-blot empleando una sonda de 78 pb correspondiente a la región 5' común entre BC1, BC2 y otros ID, lo que nos permitiría detectar expresión de IDs en general. Nuestros resultados indican que estos transcriptos cortos son detectables en el testículo total a niveles aproximadamente equivalentes a los observados en poblaciones enriquecidas en espermatocitos paquiténicos. La señal, aunque algo menor, fue también claramente detectable en las espermátidas redondas. A partir de esto podemos deducir que, si bien la expresión de BC1 disminuye y prácticamente desaparece, a lo largo de la espermatogénesis, otros ID (como BC2) poseerían un patrón de expresión diferente, hallándose presentes también durante la espermiogénesis. Esta diferencia entre nuestros

resultados y los del grupo de Muslimov podría sugerir que tal vez existan funciones específicas diferentes para los distintos tipos de ID.

Falta aún mucho por comprender acerca de la vinculación de estas secuencias repetidas cortas con la regulación de la expresión génica tejido-específica. Aparentemente, la inserción de estos elementos en sitios correspondientes a regiones no traducidas de ARNs mensajeros podría, en ciertos casos, conferir alguna propiedad extra a la funcionalidad de esos transcriptos. Ha sido demostrado que los elementos ID, así como otras secuencias repetidas cortas de la rata transcriptas por la ARN polimerasa III, e incluso las secuencias *Alu* humanas, son capaces de hibridar con ARNs mensajeros específicos (Konstantinova *et al.*, 1995); resulta por lo tanto tentador proponer algún tipo de regulación mediada por un reconocimiento por parte de ARNs anti-sentido, aunque esto resultaría prematuro, dada la ausencia de evidencias concretas. Se ha visto, además, que estos ARNs pequeños se encuentran en complejos con proteínas específicas, formando partículas ribonucleoproteicas (Konstantinova *et al.*, 1995). Otros pequeños ARNs (*lin-4*, *let-7*), sin relación aparente con los ID, han sido implicados, a través de modulación traduccional, en la regulación del desarrollo de *C. elegans*; varios de estos ARNs pequeños han encontrado homólogos en otras especies, incluso en mamíferos (Ruvkun, 2001).

Para complicar aún más el panorama, el gen *Srsp1*, identificado por nosotros como un gen de expresión específica durante la meiosis, exhibe también la presencia de un elemento ID, si bien en este caso éste se encuentra en la región promotora del gen. Estudios efectuados con el gen reportero anteriormente mencionado en neuronas, demostraron que el ID podía estimular la expresión de genes por parte de la Pol II, aún estando localizado fuera de unidades transcripcionales, en la región 5' de los promotores (McKinnon *et al.*, 1986). Por lo tanto, la participación de estas secuencias en la regulación de la expresión génica podría ejercerse no sólo a nivel postranscripcional, sino también a nivel transcripcional, como ha sido propuesto por algunos autores (Roy *et al.*, 2000). Además, se ha visto que microARNs de plantas actúan sobre la regulación de la transcripción así como de la estabilidad de ARNs mensajeros (Ruvkun, 2001).

Un número importante de secuencias cortas de ARN ha sido identificado a la fecha en diferentes organismos, y existe evidencia creciente acerca de roles de ARNs pequeños en la regulación de la expresión génica estadio o tejido-específica. Si estas secuencias son tan numerosas y diversas como parece, podrían ocupar una gran variedad de nichos regulatorios, ejerciendo sus efectos sobre la expresión génica a distintos niveles. Los elementos ID de los roedores probablemente serían un grupo de estas secuencias, ejerciendo sus efectos a nivel postranscripcional, y posiblemente transcripcional, en la regulación de la expresión de genes específicos en algunos tejidos como el cerebro y el testículo. El desafío consiste en determinar la función y el modo de acción de estos ID, ya que su comprensión podría arrojar algo de luz sobre uno de los más apasionantes enigmas de la biología molecular, la regulación diferencial de la expresión de genes en los distintos tejidos y etapas del desarrollo.

a. Identificación y caracterización de *Srsp1*, primer gen de expresión específica de la línea germinal que codifica para una proteína portadora de un tramo de homoserinas

Identificación del gen, patrón de expresión y análisis de secuencia

Los experimentos de Northern-blot efectuados empleando el producto de clonado de la banda número 14 como sonda detectaron una banda de aproximadamente 2,1 kb en el carril correspondiente a ARN de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermatoцитos paquiténicos (figura IV.9A). Se obtuvo asimismo una señal positiva en el carril correspondiente a ARN procedente de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermátidas redondas, si bien la señal en estas últimas resultó notoriamente más débil. Se detectó también una señal, aunque mucho más débil, en el ARN extraído de testículo total; esto indica que la banda corresponde a un ARNm que se expresa diferencialmente en la línea germinal, y no en las células somáticas presentes en el testículo. No se detectó señal alguna en el ARN procedente de hígado (control negativo).

Este fragmento, de 255 pb (ver figura IV.10), no exhibió niveles significativos de similitud con ninguna secuencia de ADN presente en las bases de datos. En consecuencia, la banda clonada se empleó como sonda para el rastreo de una genoteca de ADNc de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermatoцитos paquiténicos. Se aislaron y secuenciaron seis clones, el mayor de ellos de 1232 pb (ver figura IV.10), y el resto (con longitudes variables entre 600 y 1200 pb) conteniendo secuencias parciales del mismo ADNc. Todos los clones secuenciados contuvieron la secuencia correspondiente al fragmento empleado como sonda.

Ensayos de Northern-blot efectuados con el fragmento más largo obtenido a partir de la genoteca de ADNc como sonda confirmaron el patrón de expresión testicular (figura IV.9B), exhibiendo una señal mucho más intensa en las células meióticas que en las posmeióticas. Resulta interesante que la hibridación contra ARN extraído a partir de diez tejidos diferentes de rata no mostró señal detectable en ningún otro tejido, incluyendo ovario y epidídimo. Una sobreexposición de cuatro días permitió distinguir

una señal positiva en el ARN de testículo total, pero no en ninguno de los otros nueve tejidos analizados (figura IV.9C).

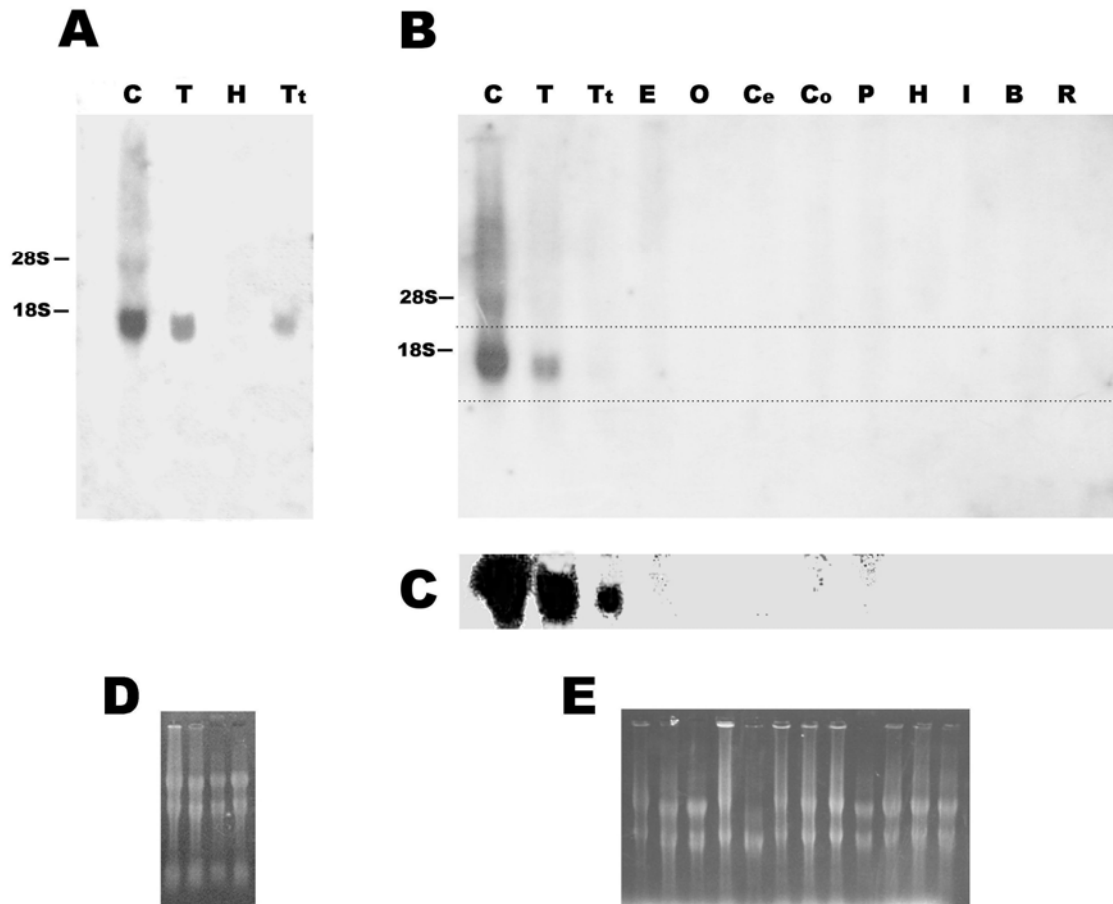


Figura IV.9. Patrón de expresión de *Srspl* analizado mediante ensayos de Northern-blot. **A.** La banda de ADNc del DD fue empleada como sonda. **B.** Las membranas fueron hibridadas con el clon completo de ADNc y expuestas toda la noche. **C.** Sección parcial del mismo Northern-blot que en B (entre líneas punteadas), pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia de expresión en otros tejidos que el testículo. Cada carril contiene, respectivamente, 40 μ g de ARN total de: espermatoцитos paquiténicos (C), espermátidas redondas (T), testículo total (Tt), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (Ce), corazón (Co), pulmón (P), hígado (H), intestino (I), bazo (B) y riñón (R). Las figuras inferiores (**D**, **E**) muestran los gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio; como puede apreciarse, todos los carriles fueron cargados con cantidades equivalentes de ARN.

1	Met	Glu	Ala	Ala	Arg	Asp	Ala	Gln	His	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Ser	15
112	AAA	GGT	TGC	TTG	GCC	AGT	AGG	ACG	TCC	TCT	CAT	CAA	AAC	AGA	AGG	156
16	Lys	Gly	Cys	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Ser	Ser	His	Gln	Asn	Arg	Arg	30
157	GCC	AGC	CTC	TCT	TCT	GAT	GGA	ACT	GGT	CTG	AGG	GTC	ACT	GAT	GCC	201
31	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Gly	Leu	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	45
202	CCA	GGC	CTC	CCC	AGG	GTG	ATG	ACT	CCC	TCT	GAC	ACT	GCT	TCG	GGG	246
46	Pro	Gly	Leu	Pro	Arg	Val	Met	Thr	Pro	Ser	Asp	Thr	Ala	Ser	Gly	60
247	CTG	GGT	CAG	AAG	ACC	TCC	TCC	ACT	TCA	TCC	TCC	TCC	TCT	TCA	TCC	291
61	Leu	Gly	Gln	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	75
292	TCC	TCC	TCC	TCT	CCC	TCC	TCC	TCC	TCC	TCT	GCC	CAG	GCT	AAT	CGG	336
76	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	Ala	Asn	Arg	90
337	TCC	TTG	AAA	GTC	TCA	CTG	CCT	GAA	ATC	CAG	AAG	GAA	AAA	TAT	CCC	381
91	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Ile	Gln	Lys	Glu	Lys	Tyr	Pro	105
382	GAG	GAA	TTC	AGC	CTG	CTC	AAG	TCA	CAG	ACA	ACA	GAT	GGG	CAG	CGT	426
106	Glu	Glu	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Gly	Gln	Arg	120
427	CCT	GAG	TGG	ACA	TTT	TAT	CCA	AGG	TTC	AGC	AGC	AAC	ATC	CAC	ACC	471
121	Pro	Glu	Trp	Thr	Phe	Tyr	Pro	Arg	Phe	Ser	Ser	Asn	Ile	His	Thr	135
472	TAC	CAT	GTT	GGA	AAG	CAG	TGT	TTC	TTC	AAT	GGG	GTC	TTC	CGG	GGC	516
136	Tyr	His	Val	Gly	Lys	Gln	Cys	Phe	Phe	Asn	Gly	Val	Phe	Arg	Gly	150
517	AAC	AGG	AAG	TCT	GTG	GCA	GAG	AGG	ACA	GTG	GAC	AAG	AGC	CTT	GGG	561
151	Asn	Arg	Lys	Ser	Val	Ala	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	165
562	AAG	AAG	AAA	TAC	GAT	ATT	GAT	CCC	AGA	AAT	GGA	ATC	CCC	AAA	TTG	606
166	Lys	Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Asp	Pro	Arg	Asn	Gly	Ile	Pro	Lys	Leu	180
607	ACA	CCA	GGA	GAT	AAT	CCA	TAC	ATG	TTC	CCA	GAA	CAG	AGT	AAA	GAG	651
181	Thr	Pro	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Met	Phe	Pro	Glu	Gln	Ser	Lys	Glu	195
652	TTC	TTC	AAA	GCT	GGG	GCA	ACT	CTG	CCG	CCA	GTG	AAC	TTC	TCA	CTG	696
196	Phe	Phe	Lys	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Asn	Phe	Ser	Leu	210
697	GGA	CCT	TAT	GAG	AAA	AAA	TTC	GAC	ACC	TTT	ATC	CCA	CTT	GAG	CCA	741
211	Gly	Pro	Tyr	Glu	Lys	Lys	Phe	Asp	Thr	Phe	Ile	Pro	Leu	Glu	Pro	225
742	CTT	CCA	CAA	ATT	CCC	AAT	CTG	CCT	TTC	TGG	GAG	AAG	GAA	AAA	GCC	786
226	Leu	Pro	Gln	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Phe	Trp	Glu	Lys	Glu	Lys	Ala	240
787	AAT	AAT	TTG	AAG	AAC	GAG	ATA	AAA	GAA	GTT	GAG	GAT	CTT	GAC	AAC	831
241	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Asn	255
832	TGG	CAG	GCG	CCG	ATG	CCC	TTC	CTC	CAC	GGT	TTT	CTC	TCC	ACT	GCT	876
256	Trp	Gln	Ala	Pro	Met	Pro	Phe	Leu	His	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	Ala	270
877	AAT	CGA	ACA	ATA	ACT	ACC	TGT	GAT	CAG	AAA	GTC	TAG	AAATCTAGTAGT			924
271	Asn	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Cys	Asp	Gln	Lys	Val	End				282
925	TGTTTCAGTCCCACAAGGCTGCATGTTTCATCTGGTCTTCAGTATATGCTGCAATCCAGAAGTGGGC															990
991	TCTAAAGTCAGAAGGAATGGATGTGCTAGCAAGGTGAAGGCAAACAAGAACAAGCTTCCTTCT															1056
1057	TCTTATATAGACGTCCAGCTGAAGGTGTGGCTCATATTAAGGTATGTTTTTCTGACTCAAGATT															1122
1123	TGGATCAAAGACTGTCTTCCACCTCAAGATTCAAATGAAAGGTCTGTCTTCCACCTCAAGATTCCG															1188
1189	<u>GATTAAGTTGTGTCTTCCTACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>															1232

Figura IV.10. ADNc del clon aislado con la sonda de la banda 14 y secuencia deducida de aminoácidos. La secuencia de la sonda del DD está subrayada, y los iniciadores entre los que se amplificó se muestran en letra destacada. Los codones de iniciación y terminación, así como la señal de poliadenilación se indican en negrita e itálica. La secuencia nucleotídica ha sido ingresada al Genbank con el número de acceso AY157978 (ver anexo II).

El ADNc aislado presenta un marco abierto de lectura de 281 aminoácidos y una cola de poliA, precedida de una señal de poliadenilación alterada (figura IV.10). Como hemos mencionado, esta última es una característica propia de los ARNm expresados en

la línea germinal, cuyas señales de poliadenilación suelen ser mucho más variables que las señales virtualmente invariables de los ARNm de las células somáticas (ver "Introducción"). Una búsqueda mediante el programa BLAST mostró que el clon poseía un 93% de identidad a lo largo de 547 nucleótidos comprendidos en la región del marco abierto de lectura, con un ADNc de función desconocida de testículo de ratón (número de acceso al Genbank AK005865). Asimismo, la secuencia proteica predicha presentó homología con la secuencia traducida conceptualmente de un clon de ADNc de testículo de ratón y humano, y con la traducción conceptual de un EST de testículo del cordado primitivo *Ciona intestinalis* (figura IV.11).

Srsp1	ASRTSSSHONRRASLSS-DGTGLRVTDAPGLPRVMTTPSDTASGLGQKTSSTSSSSSSSSSSSS	78
M. musculus	ANRTSSRONKRTSLSSSDGTGPRVTESLGLPRVITTPSDTAADVGGKTSSTSSSSSSSSSSSS	76
H. sapiens	ANTTFS--GKSVSSSSSVETGFSVSEPEGLPRVSAYVDTTADLDRKTSFS	108
C. intest.	-----	
Srsp1	SPSSSSSAQANRSLKVSLEPIQEKYPEEFSLKSTTDGORPEWTFYPRFSSNIHTYHV	138
M. musculus	-----AOSNRSSKVSLEPDDPEKYPEEFSLLSQTEGDRPEWTFYPRFSSNIHTYHV	129
H. sapiens	-----HSDHSSEMSLPEVQKDKYPEEFSLKLTQTKDGHREWTFYPRFSSNIHTYHV	160
C. intest.	-----NPXVTFHTSIMFHSGKEVYKFFYPHGIPIVYVYK	32
Srsp1	GKQCFENGVFRGNRRKSVARTVDKSLGKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEOSKEFFR	198
M. musculus	GKQCFENGVFRGNRRSVARTVDNSLGKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEOSKEFFR	189
H. sapiens	GKQCFENGVFLGNRRSLERTVDKCFGRKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEOSKEFFR	220
C. intest.	GKATTFENATHKASQISNTETISDTLRFSGHGLVTDPRNNITEVSPGDKPYQAAEYSVDFHR	92
Srsp1	AGATLPPVNFSLGPYEKKEDTFIPLPLELPQIPNLPFWEKEKANNLKNEIKEVEEDLDNWQA	258
M. musculus	AGATLPPVNFSLGPYEKKEDTFIPLPLELPKIPNLPFWEKEKANNLKNEIKEVEEDLDNWQV	249
H. sapiens	AGSLPPVNFSLVGPYEKKEDTFIPLPLELPQIPNLPFVWKEKANSLNKEIQEVEEDLDNWQF	280
C. intest.	FGSTRREVNFVFGGFLQLEQ-TFIPMSETTKTQTKYVHVKEEQRKKIAEVEVVIGLEDWRP	151
Srsp1	DMPFLHGFELSTANRTITTCDDQKV	281
M. musculus	DMPFLHGFELSTGASNFSRQ---	269
H. sapiens	AVPLMMLHLHLSGALDEPRQS---	300
C. intest.	ASPLIVPVXM-----	161

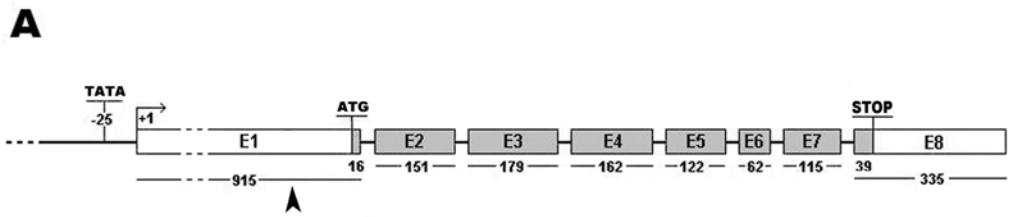
Figura IV.11. Alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha de Srsp1 (ver más adelante) y las primeras correspondencias de las bases de datos. La secuencia aminoacídica deducida mostró homología con las secuencias traducidas conceptualmente de un clon de ADNc de testículo de *Mus musculus* y uno de *Homo sapiens* (número de acceso BAB710701.1) en una búsqueda efectuada mediante el programa blastp, y con la traducción conceptual de un EST de testículo de *Ciona intestinalis* (número de acceso BP020754) en una búsqueda con el programa tblastx. Los aminoácidos idénticos están señalados en negro y los similares en gris. Las líneas punteadas indican un espacio introducido para mejorar el alineamiento. El alineamiento fue hecho mediante los programas ClustalW y Boxshade.

Las diferentes regiones de nuestro ADNc coincidieron con secuencias de ADN genómico presentes en diferentes "contigs" (contenidos en el clon de baculovirus CH230-28L18) del proyecto "Genoma de Rata" de NIH. De acuerdo con las complementariedades observadas, pudimos determinar que el gen correspondiente se localizaría en el cromosoma 9 (telocéntrico) de la rata (elemento de mapeo

NW_044162.1 del mapa de *Rattus norvegicus* de NCBI), y consta de ocho exones interrumpidos por siete intrones (figura IV.12A). De hecho, no podemos excluir la posibilidad de que exista un pequeño intrón en la región no codificante del primer exón, dado que nuestro ADNc no comprende la totalidad de la región 5' no traducida. Sin embargo, el tamaño predicho del ARNm, 2060 b (el sitio iniciador estaría localizado 907 pb “corriente arriba” del codón ATG) coincide perfectamente con el de la banda obtenida en los ensayos de Northern-blot. Mediante el software de análisis de secuencias nucleotídicas CGG hemos encontrado una potencial caja TATA, una posible secuencia iniciadora, cajas CAAT y sitios de unión para el factor Sp1 en la región promotora del gen (figura IV.12B). Asimismo, se identificó la presencia de un elemento repetido de tipo ID, el ID t-BC2-23, que pertenece a la subfamilia de estas secuencias expresada diferencialmente en el testículo (Kim *et al.*, 1995; nuestro laboratorio, resultados no publicados). Este elemento repetido situado en la región promotora del gen podría constituir una secuencia regulatoria, vinculada con la expresión génica tejido-específica del mismo (ver capítulo IV.2.d).

La proteína predicha por nuestro ADNc, a la que denominamos Srsp1 (ver más abajo), posee una probabilidad del 94,1% de ser de ubicación nuclear, según el método para la discriminación núcleo-citoplásmica de Reinhardt (Reinhardt y Hubbard, 1998). De acuerdo con esta predicción, la secuencia de Srsp1 presenta una probable señal de localización nuclear (NLS) de tipo bipartito (figura IV.13A). Sin embargo, el rasgo más llamativo es la presencia de un largo trecho de homoserinas (figuras IV.10 y IV.13A). Debido a ello hemos propuesto para esta proteína el nombre de Srsp1 (“serine-rich spermatogenic protein 1”). Se encuentran asimismo posibles señales de fosforilación para varias serín/treonín kinasas: la caseín kinasa 2 (CK2), proteín kinasa C (PKC), las proteín-kinasas dependientes de AMPc y GMPc y una kinasa dirigida por prolina.

Los análisis de computación predicen una proteína no globular de 31kD. La región comprendida entre los residuos 152 y 214 (que contiene la probable NLS bipartita) fue modelizada mediante el servidor Swiss-Model (Peitsch, 1995; 1996; Guex y Peitsch, 1997; figura IV.13B), tomándose como molde la estructura cristalográfica del dominio Sec7 del factor de intercambio de guanín-nucleótidos ARNO [ciclohedrina 2 humana



B

```

CGTGTAGTTCTGGCTGTCGTAGGACTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCTTTAAGCTCACAG -473
      Sp1
ACCCACCTGCCTTTGCCTCCAGAGTGTGCTGGCATTAAAAGTGAATGCTCCTGGGGTTGG -413
GGATTTAGCTCAGTGGTAGAACGCTTGCTTAGCAAGCACAAAGGCCCTGGGTTCACTCCC -353
AGCTCCGAAAGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACAAAAGTGAATGCTCCAGCTCTGG -293
      Sp1
CGTCTGTTTAAACCCAGTGGCTGTCTACTATTGGATAACTCCTCAGTAAGGGGCGTGGC -233
      CAAT box
CTGGGGAGCACCTCCTCTGTGCAATGTTTGGCTAGCTCAGTTTCGAGATCTTTACAGCCT -173
      CAAT box
TTCTGCTGTTTCTTTTACAATCAATGAAATTATTAACAAACAGAACCACTCTGCGAGAGGG -113
TTCAGTGGGTAAAGCGCTTGCTGCACAAGCTCGGGGACCTGAGTTCGAGCCCTGGAACCC - 53
      TATA box
ACTAAAAGTCACGTGATATGTTTATAAGCGGGTGGGGCAGAGATAGGTAGAATCCTGGG + 8
ACTCCTTGCCAGTGCAGCTGTAGCAGTGAACCTCCGTGTTTCATCGAGAACCCTTATTTCAA + 68
AGATAAGGCAGAGAGCAATGGAGGAAGACACCTGACATTGAATTCTGGCTGCCACAACC +128
TCACCTCCCAACACGTGTGCACGCACGTGCATACAGCACAAAATAAATATGAGTATTT +188
AAATTAATTAAGATCTGTATTTTTTTTTTCTACTTAACCATAGGAGAACTACATAACAT +248
AAATTTAGAGACTAAACTTCGGGGGGGGGAAGCTGGGGGGCGTTTCTATGCGCGATTTA +308
TTAGGGAGAGGTTAGAAAGATAAATTTCAATCTATACCATGGAAAGAATGCTAGCTTTGT +368
AAGGTGGAACCTGGGAGTGAATCCGTTCTCTGGATGACCTGAACGAGTCTTTGCTCCAA +428
GTCAGTTTTCTATTTGAAAAATGCAGCTGGCTGTTGAGGGAAGACAGCATCCAGCAGGG +488
CGCTGGCCCAGAAAAGGCGCTGTAAGTGGTGGGTGAGTCTGCCTCATCAGGATGCCA +548
ATTTACACCGATATCTGCAAGCTTTATAGAGGGTGCATCGCTCATGGCCACCCGAGGTT +608
TACAGAAGTAGCAACGACAGATGTTGGAAAAGAGACACGAACTGTAACAAAATCCTGAGG +668
CTCTGCAGCTCTTATGTCTGAGACCCCCATCCTCAACCCGGTTCAGAGCTCCCGATGCTG +728
GAAGATTGGTGCGTCTGAGTAGCGCGCCACCTCGCGGGAAGTGGCGCGTAGTCTTGACA +788
ACCCCTGGACGAGCCTTGCAAGCGGTAAGTAGCGGGCCTTGCTTTTCGCTTTGCCTCCGGG +848
ATTCAGCAAGTCCGCTGCCCGTTGGTGCATCATCTGGGCCGTATCCGCAATGGAAGCGG +908

```

Figura IV.12. Secuencia genómica de *Srsy1*. **A.** El gen está organizado en ocho exones (recuadros E1- E8), separados por siete intrones (líneas negras). La región codificante se muestra como recuadros grises. El número de nucleótidos que compone cada uno de los exones se indica debajo de cada recuadro. En los casos en que el número de nucleótidos codificantes no coincide con el número de nucleótidos del exón (E1 y E8), también se indica este número. Se muestran asimismo el inicio de la transcripción (+1), y los codones ATG y de terminación. La punta de flecha debajo del recuadro E1 representa el extremo 5' del clon de ADNc. **B.** Se señalan en la región promotora las secuencias correspondientes a la probable TATA box, iniciador de la transcripción (Inr), y sitios CAAT y Sp1. La secuencia correspondiente a un elemento repetido ID está subrayada. Los sitios ATG y +1 se muestran en letra destacada.

(Cherfils *et al.*, 1998)], con el que esa región de nuestra proteína predicha presentó un nivel significativo de similitud (28%, aunque el nivel de identidad con la región correspondiente de la ciclohedrina 3 de rata, para la que no existe modelo tridimensional, fue mayor, alcanzando el 32%).

Discusión

Hemos aislado un gen nuevo, expresado diferencialmente durante la espermatogénesis de la rata. Ensayos de Northern-blot demostraron que la expresión del mismo es específica de la línea germinal del testículo, alcanzando su nivel máximo de transcripción durante la profase meiótica. Comprobamos asimismo, que no existe expresión detectable en ningún otro de nueve tejidos analizados. Hemos además determinado el número de intrones del gen, y propuesto algunas secuencias regulatorias en la región promotora. Este gen codificaría para una proteína conteniendo un tramo de homoserinas. La secuencia proteica predicha contiene además una probable señal de localización nuclear de tipo bipartito, y varios posibles sitios de reconocimiento para distintas serín/treonín kinasas (Geisinger *et al.*, 2002).

Los tramos ricos en serinas se encuentran presentes en muy diversas proteínas, como la fosfoproteína nucleolar Nopp140 (Meier and Blobel, 1992), la proteína vegetal de respuesta a ácido abscísico Rab17 (Villardel *et al.*, 1990), antígenos de parásitos (por ejemplo Strong *et al.*, 2000), factores de transcripción (Kretzschmar *et al.*, 1994; Bayarsaihan y Ruddle, 2000) y la vitelogenina (Nardelli *et al.*, 1987), entre otras. Estas regiones serían fosforiladas por serín/treonín kinasas, como ha sido demostrado para algunas de las proteínas mencionadas (Berridge y Lane, 1976; Villardel *et al.*, 1990; Kretzschmar *et al.*, 1994). Estudios de la década del '70 ya habían detectado fosforilación en la región rica en serinas de la vitelogenina, sugiriendo un nivel de fosforilación de aproximadamente el 80% para esta región (Berridge y Lane, 1976). También en Nopp140 se vio que la totalidad de las serinas se fosforilaba, lo que llevó a que se postulara que dicha fosforilación podría ocurrir de un modo cooperativo (Meier y Blobel, 1992).

A

MEAARDAQHSDVLE SKGCLASRTS SHQNRRLASLS SDGTGLRVTDAPGLPRVMTPSDTASGLGQKTS SSSSTSSSSSSSSSSSPSSS
SSAQANRSLKVSLPEIQKEKYPEEFSLKKSQTTDGQRPWFYPRFSSNIHTYHVKGQCFNNGVFRGNRKSVAERTVDKSLGK
KKYD IDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFFKAGATLPPVNFSLGPYEKKFDTFIPLEPLPQIPNLPFWEKEKANNLKNEIKE
VEDLDNWQAPMPFLLHGFLSTANRTITTTCDQKV

- Serine stretch
- Putative NLS, bipartite
- CK2 recognition site
- PKC recognition site
- cAMP and cGMP-dependent kinase site
- Pro-directed kinase site

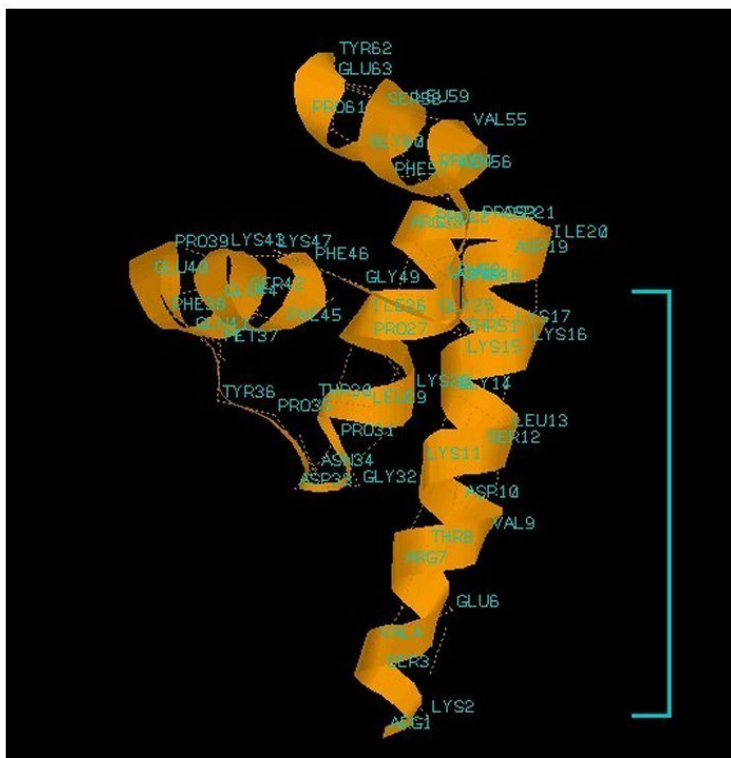
B

Figura IV.13. Proteína Srsp1. A. Secuencia aminoacídica predicha. El trecho de homoserinas y la NLS están coloreados. Las regiones posibles de fosforilación están subrayadas. **B.** Modelo para los residuos 152 a 214. La región correspondiente a la NLS se indica con un paréntesis recto.

La fosforilación de las regiones de homoserinas ha sido implicada en distintas funciones celulares. En el caso de Nopp140 y Rab17, ambas proteínas, al ser fosforiladas en los tramos ricos en serina por la CK2 (Li *et al.*, 1997b; Jensen *et al.*, 1998), son capaces de interactuar en forma específica con otras proteínas conteniendo NLSs (Meier y Blobel, 1992; Goday *et al.*, 1994). Además, las dos proteínas alternan su ubicación entre el núcleo y el citoplasma (Meier y Blobel, 1992; Goday *et al.*, 1994). Estas evidencias han hecho que se propusiera para las proteínas mencionadas una función en el transporte al núcleo (a modo de chaperonas), dependiente de la fosforilación de los trechos de serinas (Meier y Blobel, 1992; Goday *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Más aún, para el caso de Nopp140, que interactúa con pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs), se ha postulado que sus dominios ricos en serina, altamente fosforilados, podrían interactuar con el extremo C-terminal con alta carga positiva de al menos una de las snoRNPs a las que se une (NAP57), sugiriendo un posible mecanismo para esta interacción (Yang *et al.*, 2000). Por otra parte, existen evidencias de que las regiones de homoserinas de varios factores de transcripción virales y celulares y probablemente también de Nopp140, son requeridas para la activación transcripcional de promotores dependientes de la ARN polimerasa II, posiblemente a través de la interacción con la maquinaria de transcripción basal (Kretzschmar *et al.*, 1994; Miao *et al.*, 1997). Se ha visto que también en esta actividad, la fosforilación por parte de la CK2 se encuentra involucrada (Kretzschmar *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999).

Sin embargo, en tanto en las proteínas mencionadas los tramos de homoserinas están seguidos inmediatamente de aminoácidos ácidos, que representarían sitios de fosforilación para la CK2 (Jensen *et al.*, 1998), ese no es el caso para el trecho de serinas de Srsp1. No obstante, un posible sitio de reconocimiento para la CK2 se ubica unos pocos residuos a continuación de la región de homoserinas (ver figura IV.13A). Ignoramos si esta diferencia pueda poseer algún significado en relación con la función de nuestra proteína. Por otra parte, la presencia de una prolina como el único aminoácido que interrumpe el trecho de homoserinas de Srsp1, podría estar señalando un sitio de fosforilación para una kinasa dirigida por prolina; en ese sentido, la participación de las kinasas dirigidas por prolinas en diversos procesos celulares vinculados con la embriogénesis, proliferación celular y diferenciación es bien conocida (por ejemplo, véase Pearson *et al.*, 2001). Más aún, ha sido identificada una kinasa

dependiente de prolina que es específica del testículo, y especialmente abundante en el estadio de paquiteno tardío (Jinno *et al.*, 1993). Además, existen proteínas blanco de serín/treonín kinasas dirigidas por prolina, como por ejemplo las proteínas MARCKS de varias especies (Taniguchi *et al.*, 1994), que poseen un tramo de cinco serinas precediendo a una prolina en un sitio de reconocimiento para una enzima de este tipo. De todos modos, la existencia de secuencias consenso de fosforilación no es evidencia suficiente de que esas secuencias sean, efectivamente, blancos de fosforilación (Sedelnikova y Weiss, 2002). Por lo tanto, serán necesarios más estudios para determinar la función de la región de homoserinas de Srsp1, en relación con la espermatogénesis.

De la comparación de secuencias en los bancos de datos surge que la secuencia predicha de Srsp1 poseería homólogos en el testículo de ratón y humano. Asimismo, Srsp1 presentó similitud con la secuencia traducida conceptualmente de un EST de testículo del urocordado *Ciona intestinalis*. El genoma de este organismo, del cual existe una buena infraestructura genómica (colecciones de ESTs y ADNc, genotecas, etc.), es el más pequeño dentro de los cordados, proveyendo un buen sistema para explorar los orígenes evolutivos del linaje a partir del cual surgieron los vertebrados. El hallazgo de un homólogo de Srsp1 en el testículo del cordado más primitivo sugeriría la conservación de esta proteína a lo largo de la evolución de los vertebrados, lo que podría ser un indicio de la importancia de su función. Llamativamente, si bien la región de homoserinas se encuentra en la secuencia proteica predicha de la rata y en la del clon de ratón, en este último es más corta. La secuencia predicha de humano también presentaría una corta región de homoserinas, en la región N-terminal de la proteína (datos no mostrados).

La producción de anticuerpos dirigidos contra la proteína Srsp1 nos permitirá su localización, y el estudio de la relación entre la fosforilación de la región rica en serinas y el supuesto transporte al núcleo. En ese sentido, sería interesante analizar si esta proteína es capaz de unir otras proteínas portadoras de NLSs. Asimismo, planeamos realizar estudios de fosforilación mediante espectrometría de masas, de modo de determinar los sitios de fosforilación de Srsp1, así como la kinasa (o kinasas) responsable.

En suma, de nuestros resultados, así como del análisis en los bancos de datos, se desprende que *Srsp1* es el primer gen identificado de expresión específica de línea germinal, y diferencialmente expresado en meiosis, que codifica para una probable proteína con un tramo de homoserinas. La secuencia proteica predicha presenta también una NLS bipartita (lo que sugiere un destino nuclear) y sitios potenciales de fosforilación para varias serín/treonín kinasas. De la comparación con las bases de datos de proteínas surge que *Srsp1* no contendría otros dominios funcionales reconocibles actualmente.

c. Identificación y análisis de la expresión del gen "*pecanex*" durante la espermatogénesis

Identificación, caracterización del gen y análisis de expresión génica

Como hemos mencionado anteriormente, el análisis de la secuencia correspondiente a la banda número 28 del DD, dio un nivel de similitud con el extremo de la región 3' no codificante de un clon de *Mus musculus* presente en el Genbank bajo el nombre de *pecanex*.

Pecanex (*pcx*) ha sido descrito en *Drosophila melanogaster*, como un locus neurogénico de efecto materno. Se observó que en ausencia de expresión materna de este gen, los embriones desarrollaban una hiperneuralización severa, similar a la característica para los embriones mutantes *Notch*; de ese modo, la mayor parte de las células del neuroectodermo acababan diferenciándose en neuroblastos, a expensas de las estructuras epidérmicas ventrales (Perrimon *et al.*, 1984; LaBonne y Furst, 1989). Estudios de expresión de este gen demostraron la existencia de un transcripto mayoritario de 9 kb, así como de dos transcriptos minoritarios de 3,7 y 2,3 kb. La presencia de estos transcriptos fue detectable en machos y hembras adultas, y en todos los estadios del desarrollo embrionario examinados (LaBonne *et al.*, 1989). Si bien nunca se identificó un producto codificado por el gen *pecanex* de *Drosophila*, análisis mediante programas de computación indicaron que codificaría para una potencial glicoproteína integral de membrana de gran tamaño, con tres dominios de transmembrana y sin niveles significativos de identidad con ninguna proteína conocida hasta ese momento (LaBonne *et al.*, 1989).

Por otra parte, el ADNc que figura en el Genbank/EMBL como "mouse *pecanex*" (número de acceso al Genbank AF096286), fue clonado a partir del cromosoma 12 de *Mus musculus*, y designado de ese modo por homología con el gen *pecanex* de *Drosophila* (31,821% a nivel de la secuencia proteica predicha, a lo largo de toda la extensión de la proteína).

A

```

1          CCG          3
4  GAG GAA GGC CAT GTG GTT CAC CGA TGG GTG CCT TGC AGC AGA GAC 48
1  Glu Glu Gly His Val Val His Arg Trp Val Pro Cys Ser Arg Asp 15

49  CCA AGT ACA AGG TCC CAC ATC GAC AAG ACA GTG CTT CTT GTC CAG 93
16  Pro Ser Thr Arg Ser His Ile Asp Lys Thr Val Leu Leu Val Gln 30

94  ATC GAT GAT AAA TAC GTG ACT GTA ATT GAA ACC GGG GTT CTA GAG 138
31  Ile Asp Asp Lys Tyr Val Thr Val Ile Glu Thr Gly Val Leu Glu 45

139  CTG GGG GCA GAA GTG TGA GTGTGTGTGCACACCTGGGCTCCTCTCCTGGCTTC 192
46  Leu Gly Ala Glu Val End 50

193  TCAGCCCCGAGTGAGAAAAGCAAGGTTAC/CGAAGATCCACCTACGGGGACCGACCGCCTGC 252
253  CCTTCTCAGCAAAGGCTTGACCAGTGGTTFGGTTAAGCTCCTCTCCACCTGACTCCTGT 312
313  CACGGTCTTCATCCTCAAAGCTGAAATATTTTTTAAGTTAGCTGCATGAAAGGCAGAAT 372
373  GTGGGAGCCTCTGGATGGAAGGCTCTCCATGCATCCATCTTTAACCACAGACTCTCGTC 432
433  TCTAACTCTAAGCTCATATTTTTCTAATTTCTTTGCCAAAAACAGTTGCCATGGTTTTTG 492
493  TTGTAGAAAATGAAATCCACTGACCATGATCTTTGCAAAACAGACCCATGTGGAACGTTG 552
553  GGTTTCGACATGTAATAGTGTAAAGTTAATGTACAGTGAGAAAAGAGGATGGACAGACAGA 612
613  CGTAGGTTTATCTTAGTCCCTTGAACACTAAAAACTTTAATGAAAAAAACTGCACTAATTT 672
673  TTTACAGCAATGCACATAATCTGAGGTTTCTCAGAACGTTTATTTATATATAAAAAATAA 732
733  AATACCATTATTTAAATTCCTTTCAGGACAAGCCCCCTCCTTTTCTGACGCAGCCAGCAA 792
793  ACCGCTGCTCCTTTTCTGTTAGCGCGCTGGGCGCTGGAGACACTGGCAGCTTCATCCCTC 852
853  CCCTTTCCAGAGCAGGGGATCAGTGCATCCACCTGGCGAGGGATCGCCCGTGTGCCACA 912
913  CATGTCAGTGTGGCAGGTCCTGTCCAGGTTACTTCTGGAATATACTTTTGTTTTTAAG 972
973  ACAAAGACGAAGACCCAGGAATTGAAGAAAGGATCAGTTGCCTCTTATTTAAGAATTC 1032
1033  TAGCTCTTGACATTACTCACATGAAGTTCAGTTTCACAAGTAAAATGTTTTCAAACAAA 1092
1093  AAAAAAAAAAAAAAAAAA 1107

```

B

```

clon28      -----CCGAGGAAGGCCATGTGGTTCACCGATGGGTGCCTTGCAGCAGAGACC 48
pecanex     GTCCACAGGAGGGCATGGAAGGCCATGTGGTTCACCGATGGGTGCCTTGCAGCAGAGACC 5100
              * *****

clon28      CAAGTACAAGGTCCCACATCGACAAGACAGTGTCTTGTCCAGATCGATGATAAATACG 108
pecanex     CAAGTACAAGGTCCCACATCGACAATACAGTGTCTTCTCGTTTCAGATCGATGATAAATACG 5160
              *****

clon28      TGAAGTGAATTGAACCGGGGTTCTAGAGCTGGGGGCAGAAGTGTGAGTGTGTGCTGCAC 168
pecanex     TGACTATAATTGAACCGGGGTACTAGAACTGGGGCCGAAGTGTGAGCCTGCGCTGCAT 5220
              *****

clon28      ACCTGGGCTCCTCTC-CTGGCTTCTCAGCCCCGAGTGAGAAAAGCAAGGTTACCGAAGATC 227
pecanex     ACCTGGGTTCTCTTCTCTGGCTTCCAGCCCTCGGAGAGAAAAGCAAGTTGCAGAAAGAC 5280
              *****

clon28      CACCTACGGGGACCGACCGCTGCCCCTTCTCAGCAAAGGCTTGACCAGTGGTTTGGTTAA 287
pecanex     CACCTGTGGGGACCGACCGCTGCCCCTTCCGAGCAAAGACTTGACCAGTGGCTTGGTTAA 5340
              *****

clon28      GTCCTCTCCACCCTGACTCCTGTCCAGGCTTTCATCCTCAA---GCTGAAATATTTT 343
pecanex     GTCCTCTCCACCCTGACTCCTGTCCAGGCTTTCATCCTCAA---GCTGAAATATTTT 5400
              *****

clon28      TT-AAGTTAGCTGCATGAAAGGCAGAA-CTGTGGGAGCCTCTGGATGGAAGGCTCTCCAT 401
pecanex     TTTAAGTTAGCTGCATGAAAGGCAGAACTCTGTGGAGCCTCTCGATGGAAGGCGCTCTAT 5460
              ** *****

clon28      GCATCCAT-CTTTAACCCACAGACTCTCGTCTCTAACTCTAAGCTCATATTTTCTAATT 460
pecanex     GCATTTATGCTTTAACCCATGACTCTGTCTCTAACTCTAAGCTCATATTTTCTAATT 5520
              **** *

clon28      TCTTTGCCAAAAACAGTTGCCATGGTTFGGTTGTGAGAAAATGAAATCCACTGACCATGA 520
pecanex     TCTTTGCCAAAAACAGTTGCCATGGTTFGGTTGTGAGAAAATGAAATCCATTGACCATGA 5580
              *****

clon28      TCTTTGCAAACAGACCATGTGGAACGTTGGGTTTCGACATGTAATAGTGTAAAG-TTTA 579

```

```

pecanex      TTTTTGCAAACAGACCTATGTGGAAGCATTGGTTCGACATATAACAGTATAAAGATTTA 5640
* **** *
clon28      ATGTACAGTGAGAAAGAGGATGGACAGACAGACGTAGGTTTATCTTAGTCCTTGAACACT 639
pecanex     ATGTACAGTGAGAAAGATGATGACTAGACA---TAGGTTTATCTTATTCCTTGAACACT 5696
* **** *
clon28      AAAAACTTTAATGAAAAAACTGCACTAATTTTTTACAGCAATGCACTAAATCTGAGGTT 699
pecanex     AAAAACTTTAATGAAAAAACTGCACTAATTTTTTACAGTGATGCACTAAATCTGAGATT 5756
* **** *
clon28      TCTCAGAACGTTTATTATATATAAAATAAAATACCATTATTTAAATTGCCTTCAGGAC 759
pecanex     TCTCAGAACATTTATTATATATAAAATAAAATACCATTATTTAAATTGCCTTCAGGAC 5816
* **** *
clon28      AAGCCCTCCCTTTCCTGACGCA--GCCAGCAA--CCGCTGCTCCTTTCTGTTAGCGC 815
pecanex     TAGCCCTCCCTTTCCTGACACACAGGCAGCAGAACCCGTTGCTCCTAT-CCGTCAGTGC 5875
* **** *
clon28      GCTGGCGCTGGAGACTGGCAGCTTCATCCCTCGCCTTTCCAGAGCAGGGGATCAGT 875
pecanex     GCTGGACTCCGG-GACAC---AGCTTCACCCCTCCCTTTCCAGGGCTGGTGACCAGC 5930
* **** *
clon28      GCATCCACCTGGCGAGGGATCGC-----CCGTGTGCCACACAT 913
pecanex     AGGTATGCCTGGCGAAGGCCAGCACCAGCTGCCCTGTCACGGCTCCCGTGTGCCACGCTT
* **** *
clon28      GTCCAGT--GTGGCAGGTCCTGTGAGGGTTACTTCTGGAATATACTTTTGCTTTTAAAGA 971
pecanex     CTCCGCCCGTGGCAGGTCCTGTGAGGGTTGCTTCTGGAACATGCTTTTGCTTTTCAAGA 6050
* **** *
clon28      CAAAGACGAAGACCCAGGAATGAAGAAAGGATCAGTTGCCTCTTATTTAAAGAATTCCT 1031
pecanex     AGAATATGAAGGCCAGGAATTAAGAAAGGATCATTGCTTCTTATTTGAAGAGTTCTCT 6110
* **** *
clon28      AGCTCTTGACATTACTCACATGAAGTTCAGTTTACAAAGTAAATGTTTTCAAACAAAAA 1091
pecanex     AGCTCTTGCCGTAACACATGAAGTTCAGTT-CACGAGTAAAGTTTTTCAAACAAAAA 6169
* **** *
clon28      AAAAAAAAAAAAAAAAAA 1107
pecanex     -----

```

Figura IV.14. ADNc del clon “pescado” con la banda 28 del DD y comparación de secuencias. A. Secuencia del clon y traducción conceptual de la misma. En negrita e itálica se indican el codón de terminación, la secuencia de poliadenilación y la secuencia complementaria al iniciador T₁₂MN empleado en la amplificación. El decámero de secuencia arbitraria AP9 no se encontró en este clon. La región de homología con el ADNc de *pecanex* de ratón está subrayada. El símbolo / señala el sitio de corte de la enzima *BstE* II, que corresponde al extremo 5' de la sonda empleada (el sitio de restricción *Xho* I, extremo 3' de la sonda, pertenece al sitio múltiple de clonado del vector). **B.** Comparación de la secuencia del clon 28 con el clon de ADNc *pecanex* de *Mus musculus*, alineados mediante el programa ClustalW. En negrita se señalan el codón de terminación y la secuencia de poliadenilación que, como puede observarse, son coincidentes entre nuestro clon y la región correspondiente de *pecanex* de ratón.

Empleando la banda 28 del DD como sonda, llevamos a cabo el rastreo de una genoteca de ADNc de rata, realizada a partir de poblaciones celulares altamente enriquecidas en espermatoцитos paquiténicos. Como resultado de dicho rastreo se aisló un clon de 1107 pb el que, una vez secuenciado, correspondió a la región C-terminal de un marco abierto de lectura, incluyendo un codón de terminación y un largo extremo 3' no codificante que contenía una secuencia de poliadenilación y cola de poliA (figura IV.14A). Los

resultados de la comparación de secuencias en las bases de datos Genbank/EMBL confirmaron la información obtenida previamente con la banda del DD: nuestro clon exhibió un altísimo nivel de identidad a nivel de secuencia nucleotídica con el clon de ratón de 6169 pb correspondiente a *pecanex*, a lo largo de 950 pb del extremo 3' (figura IV.14B, tabla IV.2). Los niveles de identidad fueron aún mayores cuando la comparación se hizo tomando en cuenta sólo la región codificante; ésta mostró, asimismo, niveles muy altos de identidad con un clon de ADNc humano, homólogo a *pecanex* de ratón (tabla IV.2). La búsqueda de homologías a nivel de secuencia proteica predicha en la base de datos SWALL, mostró que la región codificante de nuestro clon (50 aminoácidos), se correspondía con la secuencia proteica predicha para la proteína *pecanex* de ratón (tabla IV.2, figura IV.15), presentando también niveles significativos de similitud con la región C-terminal de la secuencia predicha para la proteína *pecanex* de *Drosophila* (tabla IV.2, figura IV.15).

Dado que, aunque habíamos seleccionado este clon como de expresión diferencial de meiosis, los resultados de las comparaciones en los bancos de datos nos indicaban similitud con un gen codificante para un probable producto con función neurogénica (al menos en *Drosophila*), decidimos analizar el patrón de expresión de este gen en distintos tejidos de la rata. Ensayos de Northern-blot realizados empleando un fragmento de restricción *BstE* II/*Xho* I de 890 pb de nuestro clon, como sonda (ver figura IV.14A) contra ARN extraído de poblaciones celulares enriquecidas en espermátocitos paquiténicos, por un lado, y espermátidas redondas, por el otro, confirmaron la expresión diferencial de meiosis de este gen. También se detectó una señal, aunque bastante más débil, en el ARN procedente de las células de estadios posmeióticos. Se identificó una única banda de un tamaño similar al del ARN ribosomal 28 S (que posee 6333 pb), que se correspondería con el tamaño de 6169 pb del ADNc de *pecanex* de ratón (figura IV.16A). La señal fue también detectable en el ARN extraído a partir de testículo total, aunque la intensidad de la misma fue notoriamente menor, indicando que se trataba de un transcripto específico de las células de la línea germinal, y no de las células somáticas presentes en el testículo. La hibridación contra ARN extraído a partir de otros nueve tejidos diferentes de la rata no mostró señal detectable en ningún otro tejido (figura IV.16A), ni siquiera con una sobreexposición de

cuatro días (figura IV.16B). Resulta especialmente llamativa la ausencia total de señal en el ARN procedente de cerebro.

Tabla IV.2. Resultados de comparación en los bancos de datos de la secuencia del clon “pescado” con la banda 28 del DD

Comparación a nivel de secuencia nucleotídica – Primeras correspondencias

Nº de acceso al Genbank	Nombre	Organismo	Porcentaje de identidad	Extensión de la identidad
AF096286	<i>Pecanex</i>	<i>Mus musculus</i>	85,158%	950 pb (en todo el clon)
AF096286	<i>Pecanex</i>	<i>Mus musculus</i>	95,364%	150 pb (región codificante)
AF233450	<i>Pecanex-like</i>	<i>Homo sapiens</i>	90,728%	150 pb (región codificante)

Comparación a nivel de secuencia proteica – Primeras correspondencias

Nº de acceso a SWALL	Nombre	Organismo	Porcentaje de identidad	Extensión de la identidad
Q9QYC1	<i>Pecanex</i>	<i>Mus musculus</i>	96%	47 aminoác. (de un total de 49)
Q9W506	<i>Pecanex</i>	<i>D. melanogaster</i>	49%	21 aminoác. (de un total de 43)

```

rat      EGHVVHRWVPCSRDPSTRSHIDKTVLLVQIDDKYVTVIETGVLELGAEV 49
mouse   EGHVVHRWVPCSRDPSTRSHIDNTVLLVQIDDKYVTIIETGVLELGAEV 49
Drosophila -GHVVECWTPNHKDIRFRSHVNRVYLVLEIGDHYVPEEELGLRE----- 43

```

Figura IV.15. Alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha codificada por nuestro clon de ADNc con las regiones correspondientes de pecanex de *Mus musculus* y de *Drosophila*. Los aminoácidos idénticos se indican en negro y los similares en gris. La línea negra señala la secuencia del péptido sintético PX1. El alineamiento fue realizado mediante el programa ClustalW.

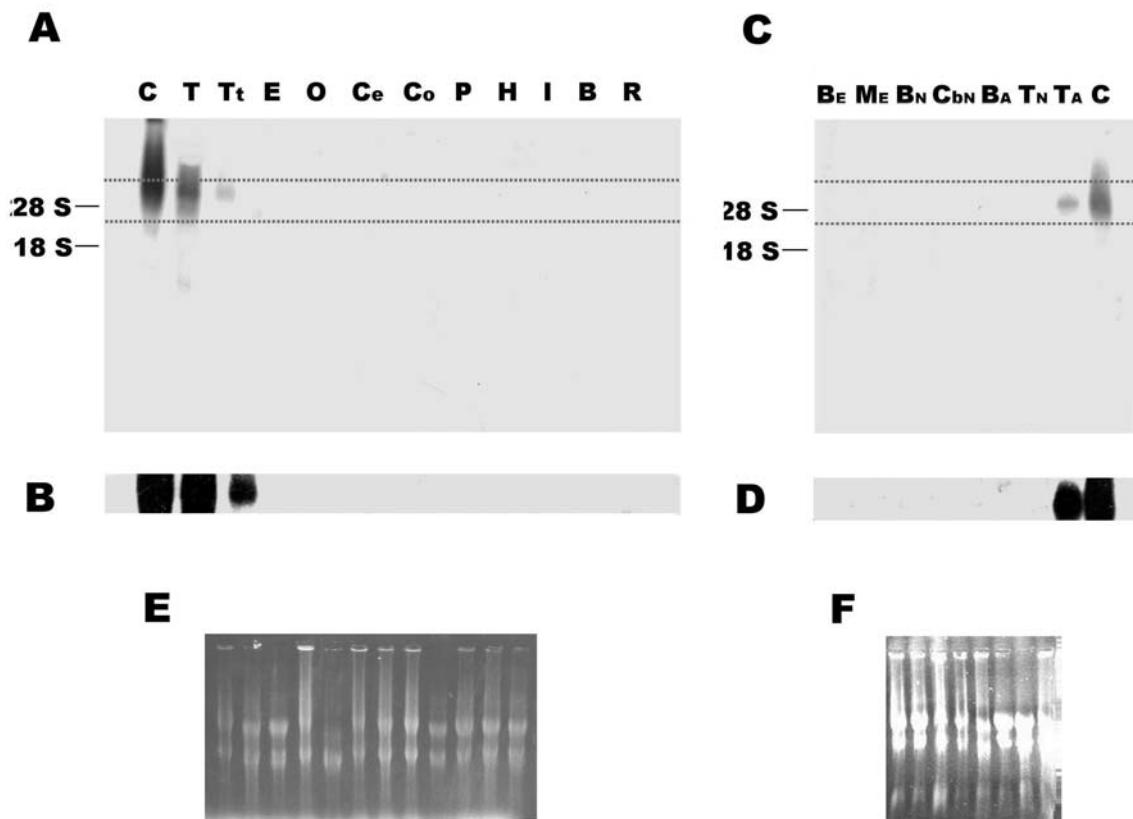


Figura IV.16. Patrón de expresión de *pecanex* en la rata, analizado mediante ensayos de Northern-blot. **A.** Un fragmento de restricción de 890 pb del ADNc de *pecanex* de rata fue empleado como sonda. Las membranas fueron expuestas toda la noche. Cada carril contiene, respectivamente, 40 μ g de ARN total de: espermatozoides paquiténicos (C), espermátidas redondas (T), testículo total (Tt), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (Ce), corazón (Co), pulmón (P), hígado (H), intestino (I), bazo (B) y riñón (R). **B.** Sección parcial del mismo Northern-blot que en A (entre líneas punteadas), pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia de expresión en otros tejidos que el testículo. **C.** Nuevo experimento de Northern-blot, con el mismo fragmento de restricción de *pecanex* empleado como sonda, y una exposición de toda la noche. Cada carril contiene, respectivamente, 40 μ g de ARN total de: cerebro de embriones de 15 días (B_E), mesencéfalo y telencéfalo de embriones de 15 días (M_E), cerebro de neonatos de un día (B_N), cerebelo de neonatos de un día (Cb_N), cerebro adulto (B_A), testículo de neonatos de un día (T_N), testículo adulto (T_A) y espermatozoides paquiténicos (C). **D.** Sección parcial del mismo Northern-blot que en C (entre líneas punteadas), pero con una sobreexposición de cuatro días para mostrar la ausencia de expresión en otros estadios. Las figuras inferiores (E, F) muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio; como puede apreciarse, todos los carriles fueron cargados con cantidades equivalentes de ARN.

Ya que en *Drosophila pecanex* codificaría para una presunta proteína con función neurogénica, nos planteamos la posibilidad de que nuestro gen no se expresara en el cerebro adulto de la rata, pero sí lo hiciera durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto, nos abocamos a la extracción de ARN de cerebros de embriones de rata de 15 días, por un lado, y de mesencéfalos y telencéfalos de la misma edad por otro, así como también de cerebros y cerebelos de neonatos de un día. Ensayos de Northern-blot efectuados con la misma sonda que los anteriores no detectaron señal en el ARN correspondiente al tejido nervioso de embriones de 15 días ni de neonatos (figura IV.16C), aún en experimentos con cuatro días de sobreexposición (figura IV.16D). Tampoco se detectó señal en el ARN procedente de testículo de neonatos de un día (figuras IV.16C y IV.16D). Esto último resulta interesante, ya que nos indicaría la ausencia de expresión de *pecanex* en las espermatogonias (los neonatos carecen aún de células meióticas), al menos en los individuos que aún no han comenzado la primera onda espermática. Estos experimentos confirmaron, en cambio, la presencia de señal tanto en los espermatoцитos paquiténicos como en el testículo entero (figuras IV.16C y IV.16D).

Experimentos de hibridación *in situ* nos permitieron confirmar la expresión específica de *pecanex* en los espermatoцитos paquiténicos (figura IV.17). No se observó expresión en ningún otro tipo celular del testículo, incluidas las espermátidas redondas. Esto resulta razonable, dada la mayor sensibilidad del ensayo de Northern-blot, realizado empleando radiactividad, en relación con la de la hibridación *in situ*, que empleó un método colorimétrico de detección (recordemos que, si bien los ensayos de Northern-blot detectaron una señal en las células posmeióticas, ésta fue menor que en las células meióticas).

Dado el altísimo nivel de identidad de secuencia existente entre nuestro clon y la región 3' del clon *pecanex* de ratón, así como la correspondencia de tamaño entre este último y la banda detectada por nosotros en los ensayos de Northern-blot de rata, decidimos efectuar análisis de la secuencia proteica predicha a partir del clon de ratón.

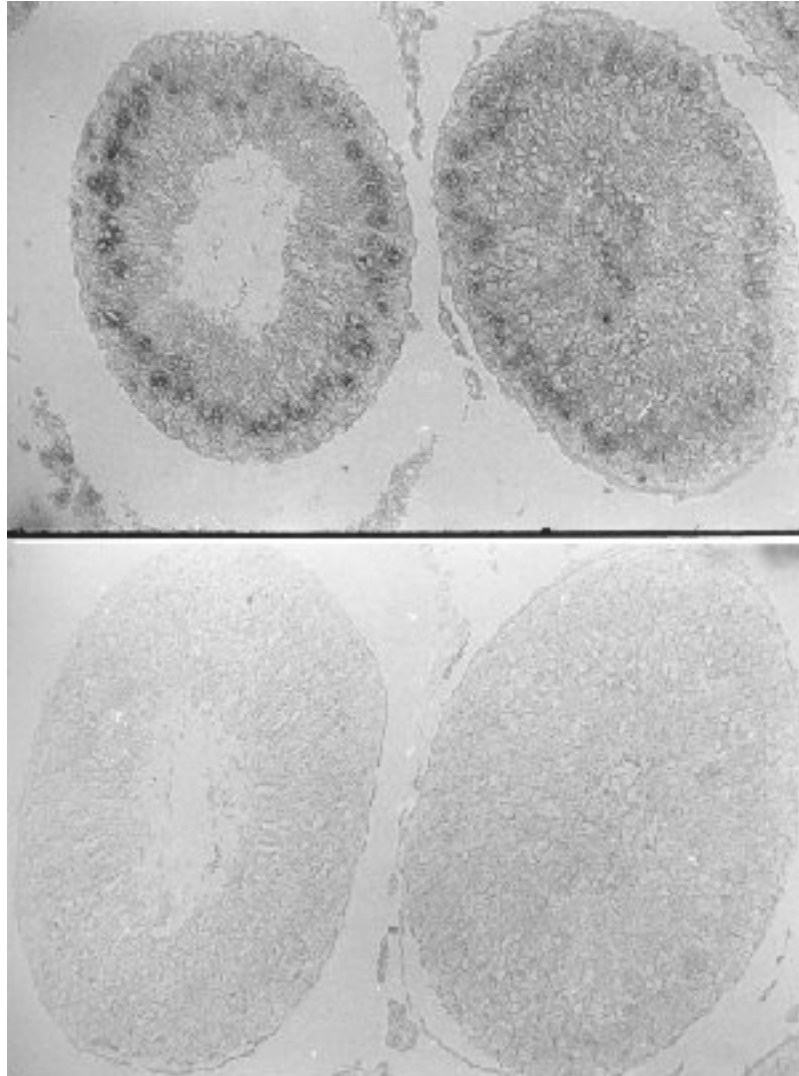


Figura IV.17. Hibridación *in-situ* con la sonda de *pecanex* en cortes de testículo adulto. En la parte superior se observa la hibridación con la sonda antisentido, que marca de manera específica los espermatocitos primarios (células meióticas). En la parte inferior se aprecia la hibridización con la sonda "sentido (control negativo) que, como era de esperar, no da señal.

Análisis proteico

Pecanex codificaría en el ratón para una presunta proteína integral de membrana de 1446 aminoácidos (figura IV.18), con un peso molecular de 160 kD y un punto isoeléctrico de 6,42. Los programas de análisis por computadora (ver "Materiales y Métodos") nos indicaron la existencia de varias hélices hidrofóbicas de transmembrana; la mayor parte de ellos coincide en la existencia de siete u once de estos dominios (a modo de ejemplo, ver figura IV.19A); algunos predicen la existencia de siete hélices principales y cuatro posibles hélices secundarias. Las hélices de transmembrana se extenderían a lo largo de la mitad N-terminal de la proteína, confiriendo a *pecanex* una estructura de tipo serpiente (figura IV.19B). El programa para localización de proteínas PSORT (presente en el sitio Expasy) indica que *pecanex* posee un 80% de probabilidad de ser una proteína de membrana plasmática. Tal como se esperaría para una proteína integral de la membrana plasmática, la secuencia proteica predicha presenta varias señales potenciales de glicosilación de tipo Asn-X-Ser/Thr (Nelson y Cox, 2000); las asparraginas correspondientes se indican en letra destacada en la figura IV.18.

```
MSLVNFEPAARRASNICDTSVSSSTSVRFYPHDMIRLNRLLT
IDTDLLEQQDIDLSPDLAATYGPTEEAQKVKHYRWFVLPQLWIGINFDRLLTLLALF
DRNREILENILAVVLAAILVAFLGSILLIQGFFRDIWVFQFCLVIASCQYSLLKSVQPD
SSSPRHGHNRITAYSRPVYFCLCCGLIWLDDYGSRNLTTSKFKLYGVTFNPLVLLSA
RDLVIVFTLCLFPIVFFIGLLPQVNTFVMYLCEQLDIHIFGGNATTSLLAALYSFLCSI
VAVALLYGLCYGALRDSWDGQHVPVLFVFCGLLVAVSYHLRSQSNDPVLFSLMQSK
IFPKADEKNPEDPLSEVKDPLPEKLSNSVSRERLQSDLVVVCVIGVLYFAIHVSTVFTA
LQPALKYVLYALVGVVGLVTHYVLPQVRKQLPWHCFSRPLLRTAEHSQYEVRNAATMM
WFEKLVVLLFVVEKNIYIPLIVLNELSSAETIASPKKLDTELGALMITIAGLKLRS
SFSPTYQYITVIFTVLFKFDYEAFFSETMLLDLFFMSILFSLWELLYKRQFVYTYV
APWQITWGSFAHFAQPFVAVPHSAMLVQAIIVSAFFSTPLNPFLGSAIFITSYVRPVK
FWERDYNTKRVDHSNTRLASQLDRNPGSDDNNLNSIFYEHLTRSLQHSLCGDLLLGRW
GNYSTGDCFILASDYLNALVHLIEIGNGLVTFQLRGLFRGTYCQREVEAITEGVEE
DEGFCCCEPGHVPVLSFNAAFQQRWLAWEVVVTKYILEGYSITDNSAASMLQVFDLR
RVLTTYVVKGIYVYVTTSSKLEEWLANETMQEGLRLCADRNVDVDPFTFNPINIDEDYD
HRLAGISRESFCVIYLSWIEYCSSRRRAKPLDVKDSSLVTLCTYGLCVLGRRALGTASH
HMSSNLESFLYGLHALFKGDFRISVVRDEWIFADMELLRKVVVPGIRMSIKLHQDHFT
SPDEYDDPTVLYEAIVSHEKNLVIAHEGDPAWRSVLANSPSLLALRHVMDDGTNEYK
IIMLNRRYLSFRVIKVNKECVRGLWAGQQQELVFLRNRNPERGSIQNAKQALRNMIN
SCDQPIGYPIFVSPLTTSYSDSHDQLKEILGGPISLGNIRNFIVSTWHRLRKGCAGC
NSGGNIEDSDTGGGTSCPGNSAVTASDPHNNVSQGSTGHPGQAGSGLHPPTTSYPPT
LGTSHSAHSVQSSLVRQSPARASMASQSSYCYSSRHSRLMSTTGFPVPCRRSSTSQIS
LRNLPSSIQRSLSMVNQMEAAASQGMGCVQHGLPSSSSSSQSIQPACKHHTLVAFGLAE
GGQGSATEAQPGNTSSPANISHARKGEVIYRVQIVDLSQILEGINVSKRKELHWPDEG
IRLKAGRNSWKDWSPQEGMEGHVHRVWPCSRDPSTRSHIDNTVLLVQIDDKYVTIIE
TGVLELGAEV
```

Figura IV.18. Secuencia aminoacídica predicha de la proteína *pecanex* de *Mus musculus*. En letra destacada se indican las asparraginas blanco de posible N-glicosilación. La secuencia correspondiente al péptido PX1, en la región C-terminal de la proteína, se encuentra subrayada.

```

# Sequence Length: 1446
# Sequence Number of predicted TMHs: 7
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 233.731930000001
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 0.00018
# Sequence Total prob of N-in: 0.53157

Sequence      TMHMM2.0      inside      1      111
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    112    134
Sequence      TMHMM2.0      outside    135    171
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    172    194
Sequence      TMHMM2.0      inside    195    214
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    215    237
Sequence      TMHMM2.0      outside    238    264
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    265    287
Sequence      TMHMM2.0      inside    288    298
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    299    318
Sequence      TMHMM2.0      outside    319    370
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    371    393
Sequence      TMHMM2.0      inside    394    399
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix    400    417
Sequence      TMHMM2.0      outside    418    1446

```

Figura IV.19. Pecanex sería una proteína de transmembrana. A. Identificación de probables hélices de transmembrana mediante el programa de análisis TMHMM (Expasy). Este programa prevé la existencia de siete hélices de transmembrana en la región N-terminal de la proteína. Los números correspondientes a los residuos aminoacídicos comprendidos en cada dominio están indicados. Se describe asimismo la orientación, según el análisis con este programa, de cada dominio hacia el interior ("inside") o exterior ("outside") de la célula. Es importante destacar, sin embargo, que si bien el número y posición de las hélices de transmembrana determinados mediante seis programas diferentes de análisis son prácticamente coincidentes, los diferentes programas discrepan en la orientación de los extremos hacia el interior o exterior de la célula. **B (en página siguiente).** Modelo bidimensional de la proteína pecanex realizado por el programa SOSUI (Expasy). Este programa prevé, además de las hélices primarias, la posible existencia de cuatro hélices secundarias de membrana. En verde se ven las hélices primarias y en celeste las posibles hélices secundarias. La superficie correspondiente a la membrana se representa en color beige, en tanto el interior y exterior celular se representan en blanco (No se identifican el interior y exterior celular, dado que aún no tenemos la certeza de cómo es la orientación de la proteína en la membrana). Los residuos hidrofóbicos aparecen en negro, los polares en azul, y los aminoácidos cargados en rojo. La figura inferior es una ampliación, en que la región contenida entre ambas líneas inclinadas de la figura superior ha sido eliminada, y representada como una interrupción en la figura. La línea negra en la figura inferior indica la región donde se localiza la secuencia del péptido PX1.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Nuestros resultados son confirmatorios de que existe un elevado número de genes que son transcriptos durante las primeras etapas de la espermiogénesis de los mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en otros organismos, como *Drosophila*. Mediante la técnica del DD hemos podido determinar la presencia de un alto número de ARNs mensajeros expresados diferencialmente por las espermátidas redondas, y un número menor de transcriptos diferenciales correspondientes a los espermatoцитos paquiténicos.

- El DD nos permitió además la caracterización de los patrones de expresión de algunos genes durante la espermatogénesis. Hemos identificado los homólogos de rata de los genes *Tlk* y *PMS2*, cuyos productos habían sido vinculados con la espermatogénesis en otras especies, lo que nos permitió demostrar la validez de la técnica para nuestro trabajo. En el caso de *Tlk*, que codifica para una serín/treonín kinasa vinculada con la espermatogénesis, hemos observado, mediante experimentos de Northern-blot, que el gen posee en la rata el mismo patrón de expresión que el observado previamente por hibridación *in situ* en el ratón (máximo nivel de expresión durante la profase meiótica). Asimismo, observamos la ausencia de expresión detectable en el hígado. En el caso de *PMS2*, que codifica para una proteína vinculada con la reparación de errores de apareamiento, hemos demostrado por primera vez que el ARNm se encuentra presente tanto en la profase meiótica como en posmeiosis, aunque la expresión del mismo es algo mayor en las células meióticas, no hallándose expresión en el hígado.

- Identificamos un gen de rata no descrito previamente, al que hemos denominado *Srsp1*. La expresión de este gen es específica del testículo, no habiéndose detectado su expresión en ningún otro tejido estudiado. El gen se expresaría exclusivamente en las células de la línea germinal, y diferencialmente durante la profase meiótica. Se identificó la secuencia codificante completa. Fueron efectuados también estudios de la secuencia genómica, determinándose el número de intrones y exones, y proponiendo algunas secuencias regulatorias en la región promotora. *Srsp1* codificaría para una probable proteína de localización nuclear, con un tramo de homoserinas y varias regiones posibles de fosforilación por parte de distintas serín/treonín kinasas. Se trata del primer gen de expresión específica de la línea germinal (y diferencial de la meiosis) que codificaría para una proteína portadora de un tramo de homoserinas. Estudios de fosforilación de esta proteína, así como de localización de la misma y capacidad de

unión de otras proteínas en relación con la fosforilación, habrán de brindarnos información acerca de la posible función de Srsp1 durante la espermatogénesis.

- Hemos asimismo identificado expresión testicular del gen *pecanex*. Este gen había sido descrito previamente en *Drosophila* como codificante para un probable producto con función neurogénica. Sin embargo, el homólogo identificado por nosotros se expresa específicamente en el testículo de la rata, no siendo detectable su expresión en ningún otro de los tejidos analizados, incluidos el cerebro adulto y embrionario. La expresión testicular del gen es específica de la línea germinal; *pecanex* se expresa diferencialmente en los espermatoцитos paquiténicos y estadios posmeióticos, siendo la expresión de este gen mucho mayor en los espermatoцитos; tampoco se detectó expresión en estadios pre-meióticos. Anticuerpos dirigidos contra la región C-terminal de la secuencia proteica predicha nos permitieron detectar, por primera vez, un producto proteico del gen *pecanex* (ya que la proteína no había sido identificada ni siquiera en *Drosophila*). La presencia de la proteína *pecanex* se detectó tanto en las células en profase meiótica como durante la primera etapa de la espermiogénesis. De acuerdo con las predicciones teóricas, *pecanex* fue localizada en la fracción correspondiente a proteínas de membrana. Se trataría de una proteína de transmembrana, con altísima probabilidad de hallarse ubicada en la membrana plasmática, y con varios dominios (probablemente siete) de transmembrana. Nuestros experimentos futuros estarán dirigidos a analizar si *pecanex* es un receptor de membrana. Para ello nos proponemos el análisis detallado de la orientación de esta proteína en la membrana, así como la identificación de ligandos .

- Hemos identificado la presencia de un elemento medianamente repetido de tipo ID en las regiones no codificantes de varios genes de expresión testículo-específica. Los estudios efectuados hasta el presente (y que deberán ser apoyados por un mayor número de evidencias experimentales en el futuro) sugieren que la presencia de esta secuencia se encuentra vinculada en la rata con algún nivel de la regulación de la expresión génica tejido-específica en el testículo, así como también en algunos otros tejidos. La continuación de esta línea de trabajo podría brindar información acerca de un tema tan apasionante como la regulación diferencial de la expresión de los genes en los distintos tejidos.

- A consecuencia de este trabajo, disponemos actualmente de un importante número de bandas de ADNc correspondientes a ARNs mensajeros de expresión presuntamente diferencial durante la espermatogénesis de la rata, cuyo análisis nos proponemos emprender. La mayor parte de ellas resultó específica de la espermiogénesis, y un número menor, de las células meióticas. Un representante de estas últimas es la banda número 25, que demostró ser diferencial de los espermatoцитos, y que será caracterizada en un futuro.

- Finalmente, durante el desarrollo de esta tesis hemos puesto a punto una técnica para la separación de las subpoblaciones de clones resultantes del clonado de bandas del DD, de acuerdo a su contenido en A+T. Esta técnica ha resultado exitosa, por ser más sencilla y económica que las alternativas existentes, propuestas por otros autores, lo que ha motivado su adopción por parte de numerosos laboratorios.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, S. and Roeder, G.S. (2000). Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* 102: 245-255.
- Alani, D., Padmore, R. and Kleckner, N. (1990). Analysis of wild-type and *rad50* mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* 61: 419-436.
- Albanesi, C., Geremia, R., Giorgio, M., Dolci, S., Sette, C. and Rossi, P. (1996). A cell-and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated c-kit protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122: 1291-1302.
- Ali, M., Markham, A.F. and Isaacs, J.D. (2001). Application of differential display to immunological research. *J. Immunol. Methods* 250: 29-43.
- Alsheimer, M. and Benavente, R. (1996). Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp. Cell Res.* 228: 181-188.
- Alsheimer, M., Imamichi, Y., Heid, H. and Benavente, R. (1997). Molecular characterization and expression pattern of XY body-associated protein XY40 of the rat. *Chromosoma* 106: 308-314.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. and 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.
- An, G., Luo, G., Veltri, R.W. and O'Hara, S.M. (1996). Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. *Biotechniques* 20: 342-344.
- Anderson, L.K., Offenberg, H.H., Verkujlen, W.M.H.C. and Heyting, C. (1997). RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6868-6873.
- Anderson, L.K., Reeves, A., Webb, L.M. and Ashley, T. (1999). Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151: 1569-1579.
- Arnheim, N. and Shibata, D. (1997). DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 364-370.
- Atheson, C.L., DiDomenico, B., Frackman, S., Easton Esposito, R. and Elder, R.T. (1987). Isolation, DNA sequence, and regulation of a meiosis-specific eukaryotic recombination gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8035-8039.
- Averboukh, L., Douglas, S.A., Zhao, S., Lowe, K., Maher, J. and Pardee, A.B. (1996). Better gel resolution and longer cDNAs increase the precision of differential display. *Biotechniques* 20: 918-921.
- Bailis J.M. and Roeder G.S. (1998) Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein. *Genes Dev.* 12: 3551-3563.

- Bailis, J.M. and Roeder, G.S. (2000). Pachytene exit controlled by reversal of Mek1-dependent phosphorylation. *Cell* 101: 211-221.
- Baker, S.M., Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliot, E.A., Yu, J., Ashley, Y., Arnheim, N., Flavell, R.A. and Liskay, R.M. (1995). Male mice defective in the mismatch repair gene *PMS2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82: 309-319.
- Bass, H.W., Riera-Lizarazu, O., Ananiev, E.V., Bordoli, S.J., Rines, H.W., Phillips, R.L., Sedat, J.W., Agard, D.A. and Cande, W.Z. (2000). Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J. Cell Sci.* 113: 1033-1042.
- Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H.K, Ahrenkiel, V., Warthoe, P. and Strauss, M. (1993). Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21: 4272-4280.
- Bayarsaihan, D. and Ruddle, F.H. (2000). Isolation and characterization of BEN, a member of the TFII-I family of DNA-binding proteins containing distinct helix-loop-helix domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7342-7347.
- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M. and Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* 74: 68-85.
- Berridge, M.V. and Lane, C.D. (1976). Translation of *Xenopus* liver messenger RNA in *Xenopus* oocytes: vitellogenin synthesis and conversion to yolk platelet proteins. *Cell* 8: 283-297.
- Bertioli, D.J., Schlichter, U.H.A., Adams, M.J., Burrows, P.R., Steinbiss, H-H. and Antoniwi, J.F. (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 23: 4520-4523.
- Bhargava, J., Engebrecht, J. and Roeder, G.S. (1992). The *rec102* mutant of yeast is defective in meiotic recombination and chromosome synapsis. *Genetics* 130: 59-69.
- Bishop, D.K. (1994). RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* 79: 1081-1092.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N. (1992). *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69: 439-456.
- Bonaldo, M.F., Lennon, G. and Soares, M.B. (1996). Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* 6: 791-806.
- Bosch, I., Melichar, H. and Pardee, A. (2000). Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA. *Nucleic Acids Res.* 28: e27.

- Brosius, J. and Tiedge, H. (2001). Dendritic BC1 RNA: intracellular transport and activity dependent expression. In: *Cell Polarity and Subcellular RNA Localization* (D. Richter, ed.), pp. 129-138. Berlin: Springer.
- Buess, M., Moroni, C. and Hirsh, H.H. (1997). Direct identification of differentially expressed genes by cycle sequencing and cycle labelling using the differential display PCR primers. *Nucleic Acids Res.* 25: 2233-2235.
- Bunch, D.O., Welch, J.E., Magyar, P.L., Eddy, E.M. and O'Brien, D.A. (1998). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 58: 834-841.
- Callard, D., Lescure, B. and Mazzolini, L. (1994). A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques* 16: 1096-1097, 1100-1103.
- Carninci, P., Shibata, Y., Hayatsu, N., Sugahara, Y., Shibata, K., Masayoshi, I., Konno, H., Okazaki, Y., Muramatsu, M. and Hayashizaki, Y. (2000). Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res.* 10: 1617-1630.
- Cascalho, M., Wong, J., Steinberg, C. and Wabl, M. (1998). Mismatch repair co-opted by hypermutation. *Science* 279: 1207-1210.
- Cataldo, L., Mastrangelo, M.A. and Kleene, K.C. (1999). A quantitative sucrose gradient analysis of the translational activity of 18 mRNA species in testes from adult mice. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 206-213.
- Cervantes, M.D., Farah, J.A. and Smith, G.R. (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol. Cell* 5: 883-888.
- Chamankhah, M. and Xiao, W. (1999). Formation of the yeast Mre11-Rad50-Xrs2 complex is correlated with DNA repair and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res.* 27: 2072-2079.
- Chen, H.K., Pai, C.Y., Huan, J.Y. and Yeh, N.H. (1999). Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8536-8546.
- Chen, J.J.W. and Peck, K. (1996). Non-radioisotopic differential display method to directly visualize and amplify differential display on nylon membrane. *Nucleic Acids Res.* 24: 793-794.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antonny, B. and Chardin, P. (1998). Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* 392: 101-105.
- Cho, Y.J., Meade, J.D., Walden, J.C., Chen, X., Guo, Z. and Liang, P. (2001). Multicolor fluorescent differential display. *Biotechniques* 30: 562-568.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Herskowitz, I. (1998). The

- transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282: 699-705.
- Chua, P.R. and Roeder, G.S. (1998). Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell* 93: 349-359.
- Clermont, Y. and Leblond, C.P. (1955). Spermiogenesis of man, monkey and other animals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique. *Am. J. Anat.* 96: 229-253.
- Cochran, B.H., Zumstein, P., Zullo, J., Rollins, B., Mercola, M. and Stiles, C.D. (1987). Differential colony hybridization: molecular cloning from a zero database. *Methods Enzymol.* 147: 64-85.
- Cool, M. and Malone, R.E. (1992). Molecular and genetic analysis of the yeast early meiotic recombination genes *REC102* and *REC107/MER2*. *Mol. Cell Biol.* 12: 1248-1256.
- Cooper, J.P. (2000). Telomere transitions in yeast: the end of the chromosome as we know it. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 169-177.
- Davis, L. and Smith, G.R. (2001). Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8395-8402.
- Deutscher, M.P. (1990). Guide to Protein Purification. *Methods Enzymol.*, vol. 182, pp. 894. San Diego: Academic Press.
- Diachenko, L.B., Ledesma, J., Chenchik, A.A. and Siebert, P.D. (1996). Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 824-828.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030.
- Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B. and Moens, P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J. Cell Sci.* 107: 2749-2760.
- Donovan, P.J., De Miguel, M.P., Hirano, M.P., Parsons, M.S. and Lincoln, A.J. (2001). Germ cell biology - from generation to generation. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 523-531.
- Duguid, J.R., Rohwer, R.G. and Seed, B. (1988). Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5738-5742.
- Dym, M. (1977). The male reproductive system. In *Histology* (L. Weiss and R.O. Greep, eds.), 4th Ed., pp. 979-1038. New York: McGraw-Hill.
- Eddy, E.M. (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev. Reprod.* 4: 23-30.
- Engebrecht, J. and Roeder, S. (1990). *MER1*, a yeast gene required for chromosome pairing and genetic recombination, is induced in meiosis. *Mol. Cell Biol.* 10: 2379-2389.

- Engbrecht, J., Hirsch, J. and Roeder, G.S. (1990). Meiotic gene conversion and crossing over: their relationship to each other and to chromosome synapsis and segregation. *Cell* 62: 927-937.
- Erickson, R.P. (1990). Post-meiotic gene expression. *Trends Genet.* 6: 264-268.
- Fuchs, B., Zhang, K., Bolander, M.E. and Sarkar, G. (2000). Identification of differentially expressed genes by mutually subtracted RNA fingerprinting. *Anal. Biochem.* 286: 91-98.
- Fukushima, K., Tanaka, Y., Nabeshima, K., Yoneki, Y., Tougan, T., Tanaka, S. and Nojima, H. (2000). Dmc1 of *Schizosaccharomyces pombe* plays a role in meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* 28: 2709-2716.
- Furukawa, K. and Hotta, Y. (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* 12: 97-106.
- Garrity, P.A. and Wold, B.J. (1990). Tissue-specific expression from a compound TATA-dependent and TATA-independent promoter. *Mol. Cell Biol.* 10: 5646-5654.
- Gasior, S.L., Olivares, H., Ear, U., Hari, D.M., Weichselbaum, R. and Bishop, D.K. (2001). Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8411-8418.
- Geisinger, A., Dos Santos, A., Benavente, R. and Wettstein, R. (2002). Identification and characterization of *Srspl*, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch-containing protein. *Cytogenet. Genome Res.* 98: 249-254.
- Geisinger, A., Rodríguez, R., Romero, V. and Wettstein, R. (1997). A simple method for screening cDNAs arising from the cloning of RNA differential display bands. *Technical Tips Online* 1: 19: T01110 (Elsevier *Trends Genet.*).
- Geisinger, A., Wettstein, R. and Benavente, R. (1996). Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 385-388.
- Geremia, R., Boitani, C., Conti, M. and Monesi, V. (1977). RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differ.* 5: 343-355.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21: 90-113.
- Gilbert, S.F. (1991). *Developmental Biology*, 3rd Ed. 891 p. Sutherland, MA: Sinauer Associates.
- Gilbert, T.L., Haldeman, B.A., Mulvihill, E. and O'Hara, P.J. (1992). A mammalian homologue of a transcript from the *Drosophila pecanex* locus. *J. Neurogenet.* 8: 181-187.

- Goday, A., Jensen, A.B., Cullianez-Macia, F.A., Mar Alba, M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M. and Pages, M. (1994). The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6: 351-360.
- Gottlieb, S., Wagstaff, J. and Easton Esposito, R. (1989). Evidence for two pathways of meiotic intrachromosomal recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7072-7076.
- Goyon, C. and Lichten, M. (1993). Timing of molecular events in meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: stable heteroduplex DNA is formed late in meiotic prophase. *Mol. Cell Biol.* 13: 373-382.
- Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 411-416.
- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Guimaraes, M.J., Lee, F., Zlotnik, A. and McClanahan, T. (1995). Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res.* 23: 1832-1833.
- Gupta, R.C., Golub, E., Bi, B. and Radding, C. (2001). The synaptic activity of HsDmc1, a human recombination protein specific to meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8433-8439.
- Haber, J.E. (2000). Recombination: a frank view of exchanges and viceversa. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 286-292.
- Hamoir, G. (1992). The discovery of meiosis by E. Van Beneden, a breakthrough in the morphological phase of heredity. *Int. J. Dev. Biol.* 36: 9-15.
- Harris, A.J., Lisenbey, J., Shaddock, J.G., Manjanatha, M.G. and Cassiano, D.A. (1996). Comparison of DD-PCR, RDA and SSH for identification of differentially expressed genes in aflatoxin B₁ exposed rat hepatocytes. In: *Differential Display and Related Techniques for Gene Discovery* (P. Liang and H. Robertson, eds.), pp. 82. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hartung, F. and Puchta, H. (2000). Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 28: 1548-1554.
- Hecht, N.B. (1993). Gene expression during male germ cell development. In: *Cell and Molecular Biology of the Testis* (C. Desjardins and L.E. Ewing, eds.), pp. 400-432. Oxford: Oxford University Press.
- Hellman, U. (2000). Sample preparation by SDS-PAGE and in-gel digestion. In: *Proteomics in functional genomics. Protein structure analysis.* (P. Jollès and H. Jörnvall, eds.), pp. 43-54. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Hollingsworth, N.M. and Johnson, A.D. (1993). A conditional allele of the *Saccharomyces cerevisiae* *HOP1* gene is suppressed by overexpression of two other meiosis-specific genes: *RED1* and *REC104*. *Genetics* 133: 785-797.
- Hollingsworth, N.M., Goetsch, L. and Byers, B. (1990). The *HOP1* gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* 61: 73-84.

- Honigberg, S.M., Conicella, C. and Easton Esposito, R. (1992). Commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the *SPO14* gene. *Genetics* 130: 703-716.
- Höög, C. (1991). Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* 19: 6123-6127.
- Hotta, Y. and Stern, H. (1974). DNA scission and repair during pachytene in *Lilium*. *Chromosoma* 46: 279-296.
- Hotta, Y. and Stern, H. (1981). Small nuclear RNA molecules that regulate nuclease accessibility in specific chromatin regions of meiotic cells. *Cell* 27: 309-319.
- Hotta, Y. and Stern, H. (1984). The organization of DNA segments undergoing repair synthesis during pachytene. *Chromosoma* 89: 127-137.
- Hotta, Y., Tabata, S., Stubbs, L. and Stern, H. (1985). Meiosis-specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: homology across the phylogenetic spectrum. *Cell* 40: 785-793.
- Hubank, M. and Schatz, D.G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22: 5640-5648.
- Jensen, A.B., Goday, A., Figueras, M., Jessop, A.C. and Pages, M. (1998). Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant J.* 13: 691-697.
- Jinno, A., Tanaka, K., Matsushime, H., Haneji, T. and Shibuya, M. (1993). Testis-specific mak protein kinase is expressed specifically in the meiotic prophase in spermatogenesis and is associated with a 210-kilodalton cellular phosphoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 13: 146-156.
- Jones, S.W., Cai, D., Weislow, O.S., Esmali-Azad, B. (1997). Generation of multiple mRNA fingerprints using fluorescence-based differential display and an automated DNA sequencer. *Biotechniques* 22: 536-540.
- Karpen, G.H., Le, M.H. and Le, H. (1996). Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmatic disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science* 273: 118-122.
- Kass, D.H., Kim, J. and Deininger, P.L. (1996). Sporadic amplification of ID elements in rodents. *J. Mol. Evol.* 42: 7-14.
- Keeney, S., Baudat, F., Angeles, M., Zhou, Z.H, Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Manova, K. and Jasin, M. (1999). A mouse homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* meiotic recombination DNA transesterase Spo11p. *Genomics* 61: 170-182.
- Keeney, S., Giroux, C.N. and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-384.
- Kierszenbaum, A.L. and Tres, L.L. (1974). Transcription sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *J. Cell Biol.* 63: 923-925.

- Kim, J., Kass, D.H. and Deininger, P.L. (1995). Transcription and processing of the rodent ID repeat family in germline and somatic cells. *Nucleic Acids Res.* 23: 2245-2251.
- Kleckner, N. (1996). Meiosis: how could it work? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8167-8174.
- Kleene, K.C. (1996). Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 268-281.
- Kleene, K.C. (2001). A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech. Dev.* 106: 3-23.
- Konstantinova, I.M., Petukhova, O.A., Kulichkova, V.A., Turoverova, L.V., Volkova, I.V., Il'kaeva, O.R., Kozhukharova, I.V. and Ermolaeva, I.B. (1995). A new class of RNP particles containing small RNA homologous to short dispersed DNA repetitive sequences. *Mol. Biol. Mosk.* 29: 761-771.
- Kovalenko, O.V., Plug, A.W., Haaf, T., Gonda, D.K., Ashley, T., Ward, D.C., Radding, C.M. and Golub, E. (1996). Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2958-2963.
- Kralewski, M. and Benavente, R. (1997). XY body formation during rat spermatogenesis: an immunocytochemical study using antibodies against XY-body associated proteins. *Chromosoma* 106: 304-307.
- Kralewski, M., Novello, A. and Benavente, R. (1997). A novel Mr 77,000 protein of the XY body of mammalian spermatocytes: its localization in normal animals and in Searle's translocation carriers. *Chromosoma* 106: 160-167.
- Kretzschmar, M., Kaiser, K., Lottspeich, F. and Meisterernst, M. (1994). A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78: 525-534.
- LaBonne, S.G. and Furst, A. (1989). Differentiation in vitro of neural precursor cells from normal and *pecanex* mutant *Drosophila* embryos. *J. Neurogenet.* 5: 99-104.
- LaBonne, S.G., Sunitha, I. and Mahowald, A.P. (1989). Molecular genetics of *pecanex*, a maternal-effect neurogenic locus of *Drosophila melanogaster* that potentially encodes a large transmembrane protein. *Dev. Biol.* 136: 1-16.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam, D.M.K., Furrer, R. and Bruce, W.R. (1970). The separation, physical characterization, and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65: 192-199.
- Lammers, J.H.M., Offenbergh, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C.G., Dietrich, A.J.J. and Heyting, C. (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal

- complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell Biol.* 14: 1137-1146.
- Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. New York Acad. Sc.* 55: 549.
- Lee, S.H., Shiao, Y.H. and Kasprzak, K.S. (1999). Nonradioactive mRNA differential display in polyacrylamide mini-gels. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 106: 108-114.
- Leu, J-Y., Chua, P.R. and Roeder, G.S. (1998). The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* 94: 375-386.
- Li, D., Meier, U.T., Dobrowolska, G. and Krebs, E.G. (1997b). Specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140. *J. Biol. Chem.* 272: 3773-3779.
- Li, F., Barnathan, E.S. and Karikó, K. (1994). Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential mRNA display: application of Northern blot for affinity capturing of cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 22: 1764-1765.
- Li, X. and Nicklas, R.B. (1995) Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 373: 630-632.
- Li, Y., DeFatta, R., Anthony, C., Sunavala, G. and De Benedetti, A. (2001). A translationally regulated *Tousled* kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed. *Oncogene* 20: 726-738.
- Li, Z., Golub, E.I., Gupta, R. and Radding, C.M. (1997a). Recombination activities of HsDmc1 protein, the meiotic human homolog of RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11221-11226.
- Liang, P. and 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. and Pardee, A.B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275.
- Liang, P., Averboukh, L. and Pardee, A.B. (1994a). Method of differential display. *Methods Mol. Genet.* 5: 3-16.
- Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R. and Pardee, A.B. (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 52: 6966-6968.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, P.O., Averboukh, L., Wang, F. and Pardee, A.B. (1994b). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* 22: 5763-5764.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. and Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mitmann, M., Wang, C., Kobayashi, M.K, Horton, H. and Brown, E.L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.* 14: 1675-1680.

- Loidl J., Klein F. and Scherthan H. (1994). Homologous pairing is reduced but not abolished in asynaptic mutants of yeast. *J. Cell Biol.* 125: 1191–1200.
- Loidl, J. (2001). Conservation and variability of meiotic processes - Lessons from the unconventional meiosis of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res.* 9 (Suppl. 1): 12.
- Lynn, A. , Koehler, K.E., Judis, L.A., Chan, E.R., Cherry, J.P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P.A. and Hassold, T.J. (2002). Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296: 2222-2225.
- Mahadevaia, S.K., Turner, J.M.A., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M. and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27: 271-276.
- Malhotra, K., Foltz, L., Mahoney, W.C. and Schueler, P.A. (1998). Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 26: 854-856.
- Malone, R.E. (1990). Dual regulation of meiosis in yeast. *Cell* 61: 375-378.
- Marshal, A. and Hodgson, J. (1998). DNA chips: an array of possibilities. *Nature Biotechnol.* 16: 27-31.
- Masson, J.Y., Davies, A.A., Hajibagheri, N., Van Dyck, E., Benson, F.E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A. and West, S.C. (1999). The meiosis-specific recombinase hDmc1 forms ring structures and interacts with hRad51. *EMBO J.* 18: 6552-6560.
- Mathieu-Daudé, F., Cheng, R., Welsh, J. and McClelland, M. (1996). Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res.* 24: 1504-1507.
- Matsudaira, P.T. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.
- Matz, M.V. and Lukyanov, S.A. (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.* 26: 5537-5543.
- McCarrey, J.R. (1998). Spermatogenesis as a model system for developmental analysis of regulatory mechanisms associated with tissue-specific gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 379-391.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F. and Welsh, J. (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet.* 11: 242-246.
- McKee, B.D. and Karpen, G.H. (1990). *Drosophila* ribosomal RNA genes function as an X-Y pairing site during male meiosis. *Cell* 61: 61–72.
- McKim, K.S., Green-Marroquin, B.L., Sekelsky, J.J., Chin, G., Steinberg, C., Khodosh, R. and Hawley, R.S. (1998). Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279: 876–878.
- McKinnon, R.D., Shinnick, T.M. and Sutcliffe, J.G. (1986). The neuronal identifier element is a *cis*-acting positive regulator of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3751-3755.

- Meier, U.T. and Blobel, G. (1992). Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70: 127-138.
- Meistrich, M.L., Bruce, W.R. and Clermont, Y. (1973). Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Exp. Cell Res.* 79: 213-227.
- Meistrich, M.L. (1977). Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol.* 15: 15-54.
- Meistrich, M.L. (1989). Histone and basic nuclear transitions in mammalian spermatogenesis. In: *Histones and Other Basic Nuclear Proteins* (L.S. Hnilica, G.S. Stein, eds.), pp. 165-182. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Meistrich, M.L., Brock, W.A., Grimes Jr., S.R., Platz, R.D. and Hnilica, L.S. (1978). Control of synthesis of specific gene products during spermatogenesis. In: *Cell Differentiation and Neoplasia* (G.F. Saunders, ed.), pp. 403-412. New York: Raven Press.
- Meistrich, M.L., Longtin, J., Brock, W.A., Grimes, S.R. and Mace, M.L. (1981). Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol. Reprod.* 25: 1065-1077.
- Melichar, H., Bosch, I., Molnar, G.M., Huang, L. and Pardee, A.B. (2000). Detection of eukaryotic cDNA in differential display is enhanced by the addition of *E. coli* RNA. *Biotechniques* 28: 76-82.
- Menees, T.M., Ross-MacDonald, P.B. and Roeder, G.S. (1992). *MEI4*, a meiosis-specific yeast gene required for chromosome synapsis. *Mol. Cell Biol.* 12: 1340-1351.
- Merino, S.T., Cummings, W.J., Acharya, S.N. and Zolan, M.E. (2000). Replication-dependent early meiotic requirement for Spo11 and Rad50. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10477-10482.
- Meuwissen, R.L.J., Offenbergh, H.H., Dietrich, A.J.J., Riesewijk, A., van Iersel, M. and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11: 5091-5100.
- Mezard, C., Baudat, F., Debrauwere, H., de Massy, B., Smith, K., Soustelle, O., Varoutas, P.C., Vedel, M. and Nicolas, A. (1999). Mechanisms and control of meiotic recombination in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Soc. Biol.* 193: 23-27.
- Miau, L.H., Chang, C.J., Tsai, W.H. and Lee, S.C. (1997). Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcriptional factor. *Mol. Cell Biol.* 17: 230-239.
- Milne, G.T. and Weaver, D.T. (1993). Dominant negative alleles of *RAD52* reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev.* 7: 1755-1765.
- Mitchell, A.P. and Bowdish, K.S. (1992). Selection of early meiotic mutants in yeast. *Genetics* 131: 65-72.

- Moens, P.B., Chen, D.J., Shen, Z., Kolas, N., Tarsounas, M., Heng, H.H.Q. and Spyropoulos, B. (1997). Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* 106: 207-215.
- Moens, P.B., Kolas, N.K., Tarsounas, M., Cohen, P. and Spyropoulos, B. (2001). The patterns of expression and localization of recombination related proteins at meiosis in the mouse suggest specialized adaptations for chromosome synapsis and recombination in large-genome organisms. *Chromosome Res.* 9 (Suppl. 1): 129-130.
- Moens, P.B., Kolas, N.K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P.E. and Spyropoulos, B. (2002). The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J. Cell Sci.* 115: 1611-1622.
- Muller, G. (2000). Towards 3D structures of G-protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach. *Curr. Med. Chem.* 7: 861-888.
- Muslimov, I.A., Lin, Y., Heller, M., Brosius, J., Zakeri, Z. and Tiedge, H. (2002). A small RNA in testis and brain: implications for male germ cell development. *J. Cell Sci.* 115: 1243-1250.
- Myers, R.M. (1993). The pluses of subtraction. *Science* 259: 942-943.
- Narayanan, L., Fritzell, J.A., Baker, S.M., Liskay, R.M. and Glazer, P.M. (1997). Elevated levels of mutation in multiple tissues of mice deficient in the DNA mismatch repair gene *Pms2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3122-3127.
- Nardelli, D., van het Schip, F.D., Gerber-Huber, S., Haefliger, J.A., Grunber, M.G. and Wahli, W. (1987). Comparison of the organization and fine structure of a chicken and a *Xenopus laevis* vitellogenin gene. *J. Biol. Chem.* 262: 15377-15385.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2000). Lehninger Principles of Biochemistry (D.L. Nelson and M. Cox, eds.), 3rd Ed. 1152 p. New York: Worth.
- Nicolas, A. (1998). Relationship between transcription and initiation of meiotic recombination: toward chromatin accessibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 87-89.
- Offenberg, H.H., Dietrich, A.J.J. and Heyting, C. (1991). Tissue distribution of two major components of synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 101: 83-91.
- Offenberg, H.H., Schalk, J.A.C., Meuwissen, R.L.J., van Aalderen, M., Kester, H.A., Dietrich, A.J.J. and Heyting, C. (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* 26: 2572-2579.
- Ohno, M. (1999). MeiRNA hits the spot. *Curr. Biol.* 9: 66-69.
- Otani, H., Tanaka, O., Kasai, K. and Yoshioka, T. (1988). Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes. *Anat. Rec.* 222: 26-33.

- Paques, F. and Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 349-404.
- Passy, S.I., Yu, X., Li, Z., Radding, C.M., Masson, J-Y, West, S.C. and Egelman, E.H. (1999). Human Dmc1 protein binds DNA as an octameric ring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10684-10688.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22: 153-183.
- Peitsch, M. C. (1995). Protein modelling by E-mail. *Biotechnology* 13: 658-660.
- Peitsch, M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 274-279.
- Perrimon, N., Engstrom, L. and Mahowald, A.P. (1984). Developmental genetics of the 2E-F region of the *Drosophila* X chromosome: a region rich in "developmentally important" genes. *Genetics* 108: 559-572.
- Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev.* 3: 639-649.
- Pigozzi, M.I. (2001). Distribution of MLH1 foci on the synaptonemal complexes of chicken oocytes. *Cytogenet. Cell Genet.* 95: 129-33.
- Plug, A.W., Clairmont, C.A., Sapi, E., Ashley, T. and Sweasy, J.B. (1997). Evidence for a role for DNA polymerase β in mammalian meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1327-1331.
- Plug, A.W., Xu, J., Reddy G., Golub, E.I. and Ashley, T. (1996). Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5920-5924.
- Poirier, G.M-C., Pyati, J., Wan, J.S. and Erlander, M.G. (1997). Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Res.* 25: 913-914.
- Prieto, I., Suja, J.A., Pezzi, N., Kremer, L., Martínez-A.C., Rufas, J.S. and Barbero, J.L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* 3: 761-766.
- Print, C.G. and Lakoski Loveland, K. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22: 423-430.
- Prolla, T.A., Baker, S.M., Harris, A.C., Tsao, J.L., Yao, X., Bronner, C.E., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Arnheim, N., Shibata, D., Bradley, A. and Liskay, R.M. (1998). Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in *Mlh1*, *Pms1* and *Pms2* DNA mismatch repair. *Nat. Genet.* 18: 276-279.
- Qin, X., Liu, L. and Gerson, S.L. (1999). Mice defective in the DNA mismatch gene *PMS2* are hypersensitive to MNU induced thymic lymphoma and are partially protected by transgenic expression of human MGMT. *Oncogene* 18: 4394-4400.
- Rasmussen, S.W. and Holm, P.B. (1980). Mechanics of meiosis. *Hereditas* 93: 187-216.

- Rassoulzadegan, M., Paquis-Flucklinger, V., Bertino, B., Sage, J., Jasin, M., Miyagawa, K., van Heyningen, V., Besmer, P. and Cuzin, F. (1993). Transmeiotic differentiation of male germ cells in culture. *Cell* 75: 997-1006.
- Rebrikov, D.V., Britanova, O.V., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Tarabykin, V.S. and Lukyanov, S.A. (2000). Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 28: e90.
- Reinhardt, A. and Hubbard, T. (1998). Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res.* 26: 2230-6.
- Rice, W.R. and Chippindale, A.K. (2001). Sexual recombination and the power of natural selection. *Science* 294: 555-559.
- Risinger, J.I., Umar, A., Barret, J.C. and Kunkel, T.A. (1995). A *hPMS2* mutant cell line is defective in strand-specific mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 270: 18183-18186.
- Roeder G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* 11: 2600-2621.
- Roeder, G.S. and Bailis, J.M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 16: 395-403.
- Romanienko, P.J. and Camerini-Otero, R.D. (1999). Cloning, characterization, and localization of mouse and human *SPO11*. *Genomics* 61: 156-169.
- Romrell, L.J., Bellvé, A.R. and Fawcett, D.W. (1976). Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. *Dev. Biol.* 19: 119-131.
- Ross, R., Kumpf, K. and Reske-Kunz, A.B. (1997). PCR-amplified cDNA probes for verification of differentially expressed genes. *Biotechniques* 22: 894-897.
- Roy, A.M., West, N.C., Rao, A., Adhikari, P., Aleman, C., Barnes, A.P. and Deininger, P.L. (2000). Upstream flanking sequences and transcription of SINES. *J. Mol. Biol.* 302: 17-25.
- Russell, L.D. and Steinberger, A. (1989). Sertoli cells in culture: views from the perspectives of an *in vivoist* and an *in vitroist*. *Biol. Reprod.* 41: 571-577.
- Russell, L.D., Ettlín, R.A., Hikim, A.P.S. and Clegg, E.D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. 286 p. Clearwater, FL: Cache River Press.
- Ruvkun, G. (2001). Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294: 797-799.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296: 2176-2178.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nature Rev.* 2: 621-627.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Härle, M. and Cremer, T. (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* 134: 1109-1125.

- Schmidt, E.E. and Schibler, U. (1997). Developmental testis-specific regulation of mRNA levels and mRNA translational efficiencies for TATA-binding protein mRNA isoforms. *Dev. Biol.* 184: 138-149.
- Sedelnikova, A. and Weiss, D. (2002). Phosphorylation of the recombinant rho1 GABA receptor. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20: 3-5.
- Sette, C., Bevilacqua, A., Bianchini, A., Mangia, F., Geremia, R. and Rossi, P. (1997). Parthenogenic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 124: 2267-2274.
- Shalom, S. and Don, J. (1999). *Tlk*, a novel evolutionarily conserved murine serine threonine kinase, encodes multiple testis transcripts. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 392-405.
- Shaw, P. and Moore, G. (1998). Meiosis: vive la difference! *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 458-462.
- Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457-470.
- Shinohara, M., Gasior, S.L., Bishop, D.K. and Shinohara, A. (2000). Tid1/Rdh54 promotes colocalization of rad51 and dmc1 during meiotic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10814-10819.
- Shoham, N.G., Arad, T., Rosin-Abersfeld, R., Mashiah, P., Gazit, A. and Yaniv, A. (1996). Differential display assay and analysis. *Biotechniques* 20: 182-184.
- Silljè, H.H., Takahashi, K., Tanaka, K., Van Houwe, G. and Nigg, E.A. (1999). Mammalian homologues of the plant *Tousled* gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. *EMBO J.* 18:5691-702.
- Smith A.V. and Roeder G.S. (1997) The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes. *J. Cell Biol.* 136: 957-967.
- Smith, A. and Benavente, R. (1992a). Meiosis-specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachytene spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6938-6942.
- Smith, A. and Benavente, R. (1992b). Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp. Cell Res.* 198: 291-297.
- Smith, A. and Benavente, R. (1992c). Identification of a short nuclear lamin protein selectively expressed during meiotic stages of rat spermatogenesis. *Differentiation* 52: 55-60.
- Smith, K.N. and Nicolas, A. (1998). Recombination at work for meiosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 200-211.
- Smith, N.R., Li, A., Aldersley, M., High, A.S., Markham, A.F. and Robinson, P.A. (1997). Rapid determination of the complexity of cDNA bands extracted from DDRT-PCR polyacrylamide gels. *Nucleic Acids Res.* 25: 3552-3554.
- Solari, A.J. (1974). The behavior of the XY pair in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 38: 273-317.

- Solari, A.J. (1980). Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81: 315-337.
- Sommerville, J. and Ladomery, M. (1996). Transcription and masking of mRNA in germ cells: involvement of Y-box proteins. *Chromosoma* 104: 469-478.
- Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T.C., Tenen, D.G., and Danna, K.J. (1995). Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res.* 23: 4738-4739.
- Sotelo, J.R. and Wettstein, R. (1966). Fine structure of meiotic chromosomes. Comparative study of nine species of insects. *Chromosoma* 20: 234-250.
- Stahl, S.K., Odeberg, J., Larsson, M., Rosok, O., Ree, A.H. and Lundeberg, J. (1999). Solid-phase differential display and bacterial expression systems in selection and functional analysis of cDNAs. *Methods Enzymol.* 303: 495-511.
- Stern, H. (1981). Chromosome organization and DNA metabolism in meiotic cells. *Chromosomes Today* 7: 94-104.
- Stern, H. and Hotta, Y. (1969). Biochemistry of meiosis. In: *Handbook of Molecular Cytology* (Lima de Faría, ed.), pp. 519-539. San Diego: North Holland.
- Stern, H. and Hotta, Y. (1985). Molecular biology of meiosis: synapsis-associated phenomena. In: *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms* (V. Dellarco, P.E. Voytek and A. Mollandes, eds.), pp. 305-316. New York: Plenum.
- Stern, H. and Hotta, Y. (1987). The Biochemistry of meiosis. In: *Meiosis* (P. Moens, ed.), pp. 303-331. New York: Academic Press.
- Storlazzi, A., Xu, L., Schwacha, A. and Kleckner, N. (1996). Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9043-9048.
- Strong, W.B., Gut, J. and Nelson, R.G. (2000). Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton z surface antigen products. *Infect. Immun.* 68: 4117-4134.
- Sun, H., Treco, D. and Szostak, J.W. (1991). Extensive 3'-overhanging, single stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the *ARG4* recombination initiation site. *Cell* 64: 1155-1161.
- Sun, Y., Hegamyer, G. and Colburn, N.H. (1994). Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res.* 54: 1139-1144.
- Sym, M. and Roeder, G.S. (1995). Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly. *J. Cell Biol.* 128: 455-466.
- Sym, M., Engebrecht, J. and Roeder, G.S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72: 365-378.

- Taniguchi, H., Manenti, S., Suzuki, M. and Titani, K. (1994). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major protein kinase C substrate, is an *in vivo* substrate of proline-directed protein kinase(s). A mass spectroscopic analysis of the post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* 269: 18299-18302.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R.E. and Moens, P.B. (1999). RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J. Cell Biol.* 147: 207-220.
- Thomas, K., Del Mazo, J., Eversole, P., Bellvé, A., Hiraoka, Y., Li, S.S. and Simon, M. (1990). Developmental regulation of expression of the lactate dehydrogenase (LDH) multigene family during mouse spermatogenesis. *Development* 109: 483-493.
- Thomas, K.H., Wilkie, T.M., Tomashefsky, P., Bellvé, A.R. and Simon, M.I. (1989). Differential gene expression during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 41: 729-739.
- Trelles-Sticken, E., Loidel, J. and Schertan, H. (1999). Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J. Cell Sci.* 112: 651-658.
- Trenkle, T.K., Welsh, J. and McClelland, M. (1999). Differential display probes for cDNA arrays. *Biotechniques* 27: 554-560.
- Trenkle, T.K., Welsh, J., Jung, B., Mathieu-Daude, F. and McClelland, M. (1998). Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays. *Nucleic Acids Res.* 26: 3883-3891.
- Trentmann, S.M., van der Knaap, E. and Kende, H. (1995). Alternatives to ³⁵S as a label for the differential display of eukaryotic messenger RNA. *Science* 267: 1186-1187.
- Tung, K.S., Hong, E.J.E. and Roeder, G.S. (2000). The pachytene checkpoint prevents accumulation and phosphorylation of the meiosis-specific transcription factor Ndt80. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12187-12192.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285: 1393-1396.
- Vedoy, C.G., Bengtson, M.H. and Sogayar, M.C. (1999). Hunting for differentially expressed genes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 877-884.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
- Venables, J.P. (2002). Alternative splicing in the testes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 615-619.
- Venables, J.P. and Eperon, I.C. (1999). The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 346-354.
- Vershon, A.K. and Pierce, M. (2000). Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 334-339.
- Vester, B., Smith, A., Krohne, G. and Benavente, R. (1993). Presence of a nuclear lamin in pachytene spermatocytes of the rat. *J. Cell Sci.* 104: 557-563.

- Vidal, F., Mougneau, E., Glaichenhaus, N., Vaigot, P., Darmon, M. and Cuzin, F. (1993). Coordinated posttranscriptional control of gene expression by modular elements including *Alu*-like repetitive sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 208-212.
- Villardell, J., Coll, M.D., Querol, E. and Egozcue, J. (1989). Histone electrophoretic pattern in the characterization of synaptonemal complexes. *Cell. Mol. Biol.* 35: 201-214.
- Villalva, C., Trempat, P., Zenou, R.C., Delsol, G. and Brousset, P. (2001). Gene expression profiling by suppression subtractive hybridisation (SSH): an example for its application to the study of lymphomas. *Bull. Cancer* 88: 315-319.
- Villardel, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martínez, M.C., Torne, J.M. and Pages, M. (1990). Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14: 423-432.
- Vögeli-Lange, R., Bürckert, N., Boller, T. and Wiemken, A. (1996). Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res.* 24: 1385-1386.
- von Glasenapp, E. and Benavente, R. (2000). Fate of meiotic lamin C2 in rat spermatocytes cultured in the presence of okadaic acid. *Chromosoma* 109: 117-122.
- von Wettstein, D., Rasmussen, S.W. and Holm, P.B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann. Rev. Genet.* 18: 31-413.
- Wallace, A.M., Dass, B., Ravnik, S.E., Tonk, V., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. and MacDonald, C.C. (1999). Two distinct forms of the 64,000 Mr protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6763-6768.
- Wan, J.S., Sharp, S.J., Poirier, G.M.C., Wagaman, P.C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.L., Galindo, J.E., Huvar, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R. and Erlander, M.G. (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnol.* 14: 1685-1691.
- Wang, X. and Feuerstein, G.Z. (2000). Suppression subtractive hybridisation: application in the discovery of novel pharmacological targets. *Pharmacogenomics* 1: 101-108.
- Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T.T., Yoneki, T., Kahihara, Y., Nabeshima, K., Kishi, Y.A., Shimoda, C. and Nojima, H. (2001). Comprehensive isolation of meiosis-specific genes identifies novel proteins and unusual non-coding transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 29: 2327-2337.
- Watanabe, Y. and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400: 461-464.
- Wawer, C., Rüggeberg, H., Meyer, G. and Muyzer, G. (1995). A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 23: 4928-4929.

- Weber, L. and Byers, B. (1992). A *RAD9*-dependent checkpoint blocks meiosis of *cdc13* yeast cells. *Genetics* 131: 55-63.
- Weiner, B.M. and Kleckner, N. (1994). Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* 77: 977-991.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 4965-4970.
- Wettstein, R. and Sotelo, J.R. (1965). Fine structure of meiotic chromosomes. The elementary component of metaphase chromosomes of *Grillus argentinus*. *J. Ultras. Res.* 13: 367-381.
- Wettstein, R. and Sotelo, J.R. (1967). Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte nuclei at pachytene. *J. Microscopie* 6: 557-576.
- Wettstein, R. and Sotelo, J.R. (1971). The molecular architecture of synaptonemal complexes. In *Advances in Cell and Molecular Biology*, vol. 1, pp. 109-152. New York: Academic Press.
- Willison, K. and Ashworth, A. (1987). Mammalian spermatogenic gene expression. *Trends Genet.* 3: 351-355.
- Wodicka, L., Dong, H., Mitmann, M., Ho, M. and Lockhart, D.J. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol.* 15: 1359-1367.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevallier, P. and Sautiere, P. (1998). Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80: 117-128.
- Wray, V.P. and Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118: 197-203.
- Wu, T.C. and Lichten, M. (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* 263: 515-517.
- Yang, Y., Isaac, C., Wang, C., Dragon, F., Pogacic, V. and Meier, U.T. (2000). Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Mol. Biol. Cell* 11: 567-577.
- Yuan, L., Liu, J.G., Hoja, M.R., Wilbertz, J., Nordqvist, K. and Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296: 1115-1118.
- Yuan, L., Liu, J.G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B. and Höög, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell* 5: 73-83.
- Yuan, L., Peltari, J., Brundell, E., Björkroth, B., Zhao, J., Liu, J.G., Brismar, H., Daneholt, B. and Höög, C. (1998). The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* 142: 331-339.

- Zenvirth, D., Richler, C., Bardhan, A., Baudat, F., Barzilai, A., Wahrman, J. and Simchen, G. (2003). Mammalian meiosis involves DNA double-strand breaks with 3' overhangs. *Chromosoma* 111: 359-368.
- Zhang, H., Zhang, R. and Liang, P. (1996). Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res.* 24: 2454-2455.
- Zhao, S., Molnar, G., Zhang, J., Zheng, L., Averboukh, L. and Pardee, A.B. (1998). 3'-end cDNA pool suitable for differential display from a small number of cells. *Biotechniques* 24: 842-850.
- Zickler, D. and Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of Meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32: 619-697.
- Zickler, D. and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33: 603-754.

ANEXO I

PUBLICACIONES

The mammalian gene *pecanex 1* is differentially expressed during spermatogenesis

Adriana Geisinger^{a,b,*}, Manfred Alsheimer^c, Andrea Baier^c, Ricardo Benavente^c, Rodolfo Wettstein^b

^aUnidad Asociada Biología Molecular (IIBCE), Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay

^bDepartamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

^cDepartment of Cell and Developmental Biology, Biocenter, University of Würzburg, D-97074 Würzburg, Germany

Received 1 November 2004; received in revised form 17 January 2005; accepted 19 January 2005

Abstract

Using mRNA differential display and cDNA library screening approaches we have identified differential gene expression of *pecanex 1* – a mammalian homologue of *pecanex* gene from *Drosophila* – in the testes of the rat. Northern blot analyses showed that the transcript is only present in the germ line and not in the somatic cells of the testis, reaching its peak at the pachytene stage of the meiotic prophase. Moreover, nonradioactive in situ hybridization did not detect the expression of the gene in any cell type of the testis other than pachytene spermatocytes. Northern blot assays did not allow the detection of the transcript in nine other tissues. Remarkably, although *pecanex* exerts a neurogenic role in *Drosophila*, the transcript was not detectable by Northern blotting in the nervous tissue of adult rats, nor in the brain of neonate and embryonal stages. The protein product of the *pecanex 1* gene was detected by immunoblotting in pachytene spermatocytes and round spermatids as well, but not in liver nor brain. From genomic analysis we conclude that, although only one *pecanex* gene exists in *Drosophila*, mammalian *pecanex 1* belongs to a gene family with three related genes in different chromosomes. We speculate that *pecanex 1* could play an important role in the testis, related to spermatogenesis.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Spermatogenesis; Meiosis; Gene expression; Differential display; *Pecanex*

1. Introduction

Mammalian spermatogenesis can be divided into three stages: mitotic proliferation of spermatogonia, meiosis and spermiogenesis. During meiosis, a program of gene expression that provides the spermatocyte I with the

molecular apparatus for chromosome pairing, recombination and segregation is executed. The genetic program that proceeds along spermiogenesis is responsible for the biochemical and structural changes that haploid spermatids undergo in order to become a mature sperm [1–3]. The whole process of spermatogenesis is under the complex regulation of different molecules, including hormones and growth factors [4].

Some of the genes that encode spermatogenic cell-specific proteins are not homologous to any genes expressed in somatic cells. Besides, a remarkable feature of mammalian spermatogenesis is the high number of genes that encode spermatogenesis cell-specific isoforms [3]. Spermatogenesis-specific isoforms can be generated by the usage of different transcription start sites, differential polyadenylation sites or alternative splicing [5]. Post-transcriptional

Abbreviations: DD, differential display; ORF, open reading frame; EST, expressed sequence tag; pex, *Drosophila's pecanex*; RT, reverse transcriptase; PCR, polymerase chain reaction; 7-TM, seven transmembrane receptors (refers to receptors with seven transmembrane domains); C-terminal, carboxy-terminal; N-terminal, amino-terminal; o.n., overnight; GST, glutathion-S-transferase

* Corresponding author. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 2 487 2605; fax: +598 2 487 5548.

E-mail address: geisinge@iibce.edu.uy (A. Geisinger).

regulation has a relevant importance in spermatogenic cells and has been proposed as a mechanism of selection for novel testis-specific functions [3].

The aim of our work was the identification and characterization of differentially expressed genes during mammalian spermatogenesis. For that purpose, mRNA differential display (DD) [6,7] was applied to compare RNA populations obtained from highly purified pachytene spermatocytes (meiotic prophase cells) and round spermatids (post-meiotic cells) of the rat. Using thirteen different combinations of primers [8; Geisinger, A., unpublished data], we have isolated a majority of differential cDNA fragments (74%) that appeared as specific for spermatids; the others (26%) were spermatocyte-specific (i.e. differential for meiotic prophase) [8]. Among the latest, some have been characterized and turned out to represent 3' ends of genes that code for products that are exclusively expressed during spermatogenesis [9]. Others corresponded to cDNAs that represent testis-specific isoforms of previously known genes (Geisinger, A., unpublished data).

The *pecanex* (*pcx*) locus has been described several years ago in *Drosophila* as containing a maternal-effect neurogenic gene. The product of this gene would be involved in the normal development of the nervous system of the fly, since it has been shown that in the absence of maternal expression the embryo develops severe hyperneuralization similar to that characteristic of *Notch* mutants [10,11]. Expression analyses of the *pcx* gene showed the existence of a main 9 kb transcript and two minor transcripts of 3.7 and 2.3 kb. The three transcripts were detectable in males as well as in females at all developmental stages examined [10]; however, the maximum levels of the 9 kb species accumulated between 5 and 10 h of development, corresponding to the period of neuroblast differentiation and division [12]. More recently, a partial homologue of *pcx* from rat brain has been reported [13]. Besides, sequences of some other cDNAs and ESTs with partial homology to *Drosophila*'s *pcx* isolated from different mammalian tissues as well as developmental stages have been submitted to the GenBank (see below).

In the present study we report that *pecanex 1*, a mammalian gene that shows high similarity to *Drosophila*'s *pcx*, is differentially expressed during spermatogenesis of the rat. We also provide evidence that *pecanex 1* is a member of a family composed of three different genes in mammals. We speculate that the product of *pecanex 1* may play a regulatory role during spermatogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Animals and tissues

Nine tissues (testis, epididymis, brain, heart, lung, liver, intestine, spleen and kidney) were harvested from 40 day old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*; Charles River

Wiga, Sulzfeld, Germany). Ovaries were collected from females of the same age. Neonates and embryos of the same strain were obtained from the Faculty of Medicine (Montevideo) and used for tissue collection. All tissues were washed in 0.8% NaCl, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for further processing, except for testes, which were processed for elutriation immediately after extraction.

2.2. Isolation of stage-enriched cell populations of rat testis

Cell suspensions were prepared from the testes of 40 day old rats and submitted to centrifugal elutriation in order to obtain highly enriched populations of spermatogenic cell types, essentially as already described [14]. Fractions with the highest concentration of pachytene spermatocytes and round spermatids were collected separately. The minimum purity percentages obtained were 86% and 81% for the pachytene spermatocytes and round spermatids fractions respectively.

2.3. RNA isolation and differential display

RNA was extracted from frozen tissues or elutriated cell populations with the RNA Isolation Kit from Stratagene (Heidelberg, Germany). Differential display was carried out with RNA from elutriated cell populations according to Liang et al. [7], using the RNA Map kit, oligo-dT primers and arbitrary decamers AP1-9 from GenHunter (Nashville, TN, USA). Differentially expressed fragments were eluted from the acrylamide gel and reamplified as already described [7,8].

2.4. cDNA library screening

A cDNA fragment derived from a differentially expressed RNA was reamplified and cloned into a pGEM-T vector II (Promega, Madison, WI, USA), labeled by random priming with the DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany), and used as a probe to screen a λ -ZAPII cDNA library made from a highly enriched population of pachytene spermatocytes [15]. Library screening and chemiluminescent detection with CSPD were performed following Boehringer's indications, as previously described [9].

2.5. Northern blot analysis

cDNA probes were labeled by random priming (Mega-prime DNA Labeling System, Amersham, Buckinghamshire, UK) with α [^{32}P]dATP (Amersham). Northern blot assays were carried out essentially according to Sambrook et al. [16]. Gels with 40 μg of total RNA per lane were transferred to positively charged nylon membranes, immobilized by baking 15 min at 120°C , prehybridized for 1 h and

hybridized o.n. at 42 °C in UltraHyb solution (Ambion, Austin, TX, USA). Washes were performed twice in $2\times$ SSC, 0.1% SDS for 5 min at the same temperature and twice in $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS for 20 min at 55 °C. Filters were exposed at -80 °C o.n. with intensifying screen.

2.6. *In situ* hybridization

Rat testes were fixed in methanol:acetic acid (3:1) for 3 h at room temperature and embedded in paraffin as previously described [15]. Antisense and sense (negative control) riboprobes were synthesized with the DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim). Treatment of the sections, hybridization and detection with anti-digoxigenin antibodies were conducted as already described [15].

2.7. Sequencing and sequence analysis

cDNAs were sequenced according to standard protocols using an ABI-Prism 377 sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were blasted against GenBank database entries. Nucleic acid and protein sequences were analyzed by means of the BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Genomic searches were performed against database sequences of the rat, mouse and human Genome Projects from NIH (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/>). For computational protein analysis we used programs available at the ExpASY Proteomics tools server (<http://us.expasy.org/tools/>).

2.8. Antibodies

A 15-mer peptide (HRWVPCSRDPSTRSH) corresponding to residues 1403–1417 of the predicted protein sequence of *pecanex 1* from *R. norvegicus* was synthesized and coupled to keyhole limpet hemocyanine according to standard procedures. Antibodies were raised in rabbit by Sequence Laboratories Göttingen (Germany).

2.9. SDS-PAGE and immunoblotting

Homogenized tissues or elutriated cell populations were solubilized in lysis buffer [17]. SDS-PAGE was carried out on 10% polyacrylamide gels according to Thomas and Kornberg [18]. Batches of 1×10^5 cells were loaded per lane, except for the round spermatid fraction, where 2×10^5 cells per lane were loaded. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes by liquid transfer using the Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (BioRad, CA, USA) following the instructions from the manufacturer. 50 mM CAPS (pH 10), 1 mM 3-mercaptopropionic acid, 10% methanol and 0.05% SDS were used as transfer buffer. The membranes were blocked for 2 h at room temperature with TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 10% milk

powder. After washing with TBST, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with the primary antibody diluted 1:15,000 in TBST. Subsequent washing was done twice in TBST and membranes were incubated 1 h with secondary antibody (anti-rabbit conjugated to peroxidase) diluted 1:10,000 in TBST/milk. After two washes in TBST, bound antibodies were detected with the enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham, Braunschweig, Germany) as recommended by the supplier. A competition experiment was conducted in each case, in which 145 μ g of the 15-mer peptide was pre-incubated with the primary antibody for 1 h previous to its incubation with the membrane.

3. Results

3.1. Isolation and sequencing of a cDNA clone from pachytene spermatocytes of *R. norvegicus* that shows homology to *Drosophila*'s *pcx*

By means of the DD [8] (see also above), we have isolated a number of differential cDNA fragments that appeared to be meiosis-specific (i.e. differentially expressed in pachytene spermatocytes). One of those fragments (of 247 bp) was confirmed by Northern blot assays to be expressed in spermatocytes (not shown). The fragment was then cloned, re-tested by Northern blots and sequenced. Homology searching showed significant similarity to the noncoding 3' end of a 6169 bp cDNA clone that was defined as *Mus musculus pecanex 1* mRNA in the GenBank [accession no. AF096286 (named because of its similarity with *Drosophila*'s *pcx*)]. Information on tissue specificity is not available for the mouse clone.

The 247 bp cDNA fragment was used as a probe to screen a cDNA library of highly enriched pachytene spermatocytes from rat. We isolated a partial clone of 1107 bp which corresponded to the 3' end of an ORF followed by a long 3' noncoding region with a polyadenylation signal and a polyA tail. The sequence of our clone exhibited identity to the 3' end of the mouse *pecanex 1* cDNA along 950 bp (Fig. 1). This is specially significant since the percentages of identity are usually lower in the noncoding regions, even between related species. The isolated cDNA also showed a significant similarity to a cDNA named as *pecanex*-like protein 1 mRNA from *Homo sapiens* (GenBank accession no. AF233450, not shown). The deduced amino acid sequence of our partial clone (the C-terminal 50 amino acids; see Fig. 1) showed significant similarity to the predicted protein sequence coded by cDNA clone AF096286 from *M. musculus*, AF233450 from *H. sapiens*, a homologous sequence from *Takifugu rubripes* (the Japanese puffer fish) and the predicted *pcx* sequence of *Drosophila melanogaster* (see Fig. 4A). From these experiments we conclude that we have isolated a partial cDNA coding for rat *pecanex 1*.

of *pecanex 1* expression in spermatogonia (the only germ line cells already present in the testes of neonates), at least in individuals that have not gone through the first round of spermatogenesis yet. Nonradioactive in situ hybridization experiments on sections of adult rat testes allowed us to confirm the high level of expression of the gene in pachytene spermatocytes (meiotic prophase). There was no detectable expression in any other of the spermatogenic nor in the somatic cell types present in the seminiferous tubules (Fig. 3). The absence of a signal in round spermatids may be explained by the difference in sensitivity between the nonradioactive in situ hybridization and the Northern blots. This interpretation is also consistent with the observation that in the Northern blots the *pecanex 1* band is clearly stronger in spermatocytes. Moreover, since 10 to 15% of the round spermatids-elutriated fraction is generally composed of contaminant spermatocytes [14], the weak signal in round spermatids in the Northern blots could be at least partly due to contaminant pachytene spermatocytes.

Taken together, an analysis of expression in animals of different ages by Northern blotting and in situ hybridization indicates that *pecanex 1* expression starts with the onset of meiosis of rat spermatogenesis.

Available data posed to a neurogenic role for the protein coded by *Drosophila's pxc* [10,11]. Therefore, we

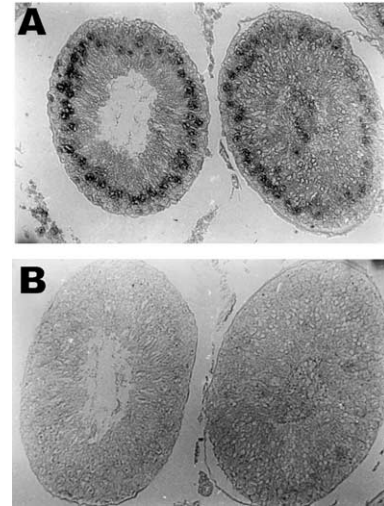


Fig. 3. Expression pattern of *pecanex 1* in sections of adult rat testis as determined by nonradioactive in situ hybridization. A. Hybridization with the sense probe, which labels specifically the primary spermatocytes. B. Hybridization with the antisense probe as a negative control.

decided to investigate *pecanex 1* expression in different tissues of the rat by Northern blotting. No signal could be detected in the RNA extracted from nine different tissues, including ovary and epididymis (Fig. 2A), even when the blots were overexposed for 4 days (Fig. 2B). The total

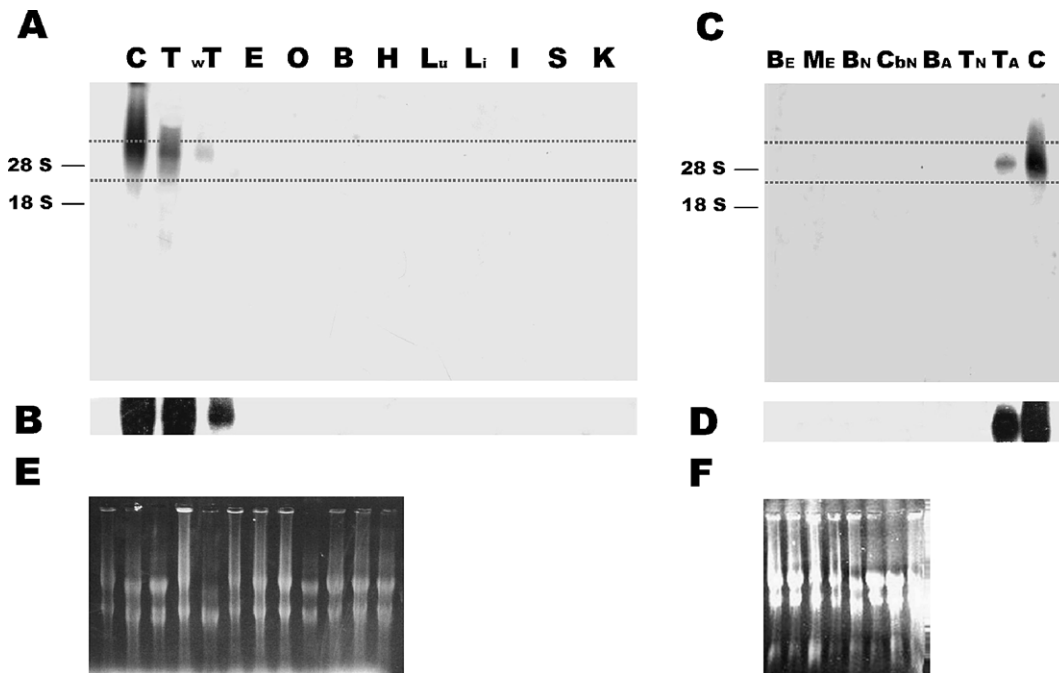


Fig. 2. Expression pattern of *pecanex 1* in the rat as determined by Northern blot assays. A. The membranes were exposed o.n. Each lane contains 40 µg of total RNA from pachytene spermatocytes (C), round spermatids (T), whole testis (wT), epididymis (E), ovary (O), brain (B), heart (H), lung (Lu), liver (Li), intestine (I), spleen (S) and kidney (K), respectively. The migration positions of 28 S and 18S rRNA are included as size reference. B. Partial section of the same blot as in Panel A (between dotted lines), but with 4-day exposure in order to show the absence of expression in tissues other than testis. C. Each lane contains 40 µg of total RNA from 15 day old embryos' brains (B_E), 15 day old embryos' mesencephalon and telencephalon (M_E), 1 day neonate brain (B_N), 1 day neonate cerebellum (Cb_N), adult brain (B_A), 1 day neonate testis (T_N), adult testis (T_A) and pachytene spermatocytes (C). The membranes were exposed o.n. D. Partial section of the same blot as in Panel C (between dotted lines), but with a 4-day exposure in order to show the absence of expression in tissues other than adult testis. Lower pictures (E, F) show the ethidium bromide stained gels to document that all the lanes were equally loaded.

absence of signal in RNA from the brain is specially remarkable; however, the absence of detectable signal in adult brain does not exclude the possibility that *pecanex 1* could code for a protein with a neurogenic role in the rat. In this case, the gene could be only expressed in the embryonal brain, when nervous system development is taking place, but not in adult brain. To test this hypothesis, RNA was extracted from the brains of 15 day old rat embryos on one hand, and from the mesencephalon and telencephalon of embryos of the same age on the other, and from the brain and cerebellum of 1 day neonates. Northern blot assays using the same probe as in Fig. 2A and B did not detect any signal in the nervous tissue of 15 day old embryos nor neonates (Fig. 2C), even after an exposition of 4 days (Fig. 2D).

These experiments show that *pecanex 1* is a gene whose expression is only detectable by Northern blot in the adult testis, but not in the other tested adult tissues, nor in the embryonal or neonate brain of the rat.

3.3. Sequence and expression pattern of protein *pecanex 1*

The predicted protein sequence of *pecanex 1* in *R. norvegicus* was deduced from the conceptual translation of the complete ORF from the mouse cDNA clone and its confrontation with the conceptual translation of the corresponding region from the rat genome (from the NIH Rat Genome Project). *Pecanex 1* would code in the rat for a long protein product of 1446 amino acids and a molecular mass of 160 kD, with significant similarity to the predicted protein sequences of *pecanex 1* from *M. musculus*, *H. sapiens* and *T. rubripes*, and to the predicted protein sequence of *pcx* from *D. melanogaster* (Fig. 4A). Computer analyses performed with programs from the ExPASy Proteomic tools indicated that this product would have a probability of 80% of being an integral plasma membrane protein. They also showed the presence of a number of transmembrane helices (most probably seven) in the N-terminal half of the rat's protein (Fig. 4B). No other functional domains were recognized in the protein.

In order to detect the product of the *pecanex 1* gene, a 15-mer peptide corresponding to residues from the C-terminal end of the predicted amino acid sequence of *pecanex 1* from rat was synthesized (see Fig. 4A). Antibodies were raised in rabbit, and the polyclonal serum was used for the detection of *pecanex 1* in immunoblot experiments against protein extracts from adult whole testis, as well as from highly enriched populations in pachytene spermatocytes and round spermatids respectively. A protein of about 150 kD was detected, which matched the expected size of *pecanex 1*. The protein was clearly detectable in pachytene spermatocytes and round spermatids (Fig. 5A). In agreement with the Northern blots, the protein band was more intense in the extracts from germ line cells than in that of the whole testis. No signal could be detected in protein extracts from adult liver

nor brain (see Fig. 5A), in which the transcript was not detectable by Northern blot either. As a control, we performed immunoblots in which antibodies were competed with an excess of the peptide used for immunization. Under these experimental conditions, no *pecanex 1* bands were detected (Fig. 5B).

3.4. In silico analysis of the *pecanex 1* gene

Although only one *pcx* gene, which is located on chromosome X, exists in *Drosophila*, a search against the NIH Genome Projects indicated that *pecanex 1* would belong to a gene family composed of three different genes in the mammalian genomes.

Pecanex 1 maps to position 6q24 in the rat; short partial sequences are also present on chromosomes 18 and X. According to the alignment of the cDNA with the genomic sequence, the coding region of *pecanex 1* would be composed of 28 exons and spans over nearly 50 kb (Fig. 6).

The homologue gene in the genome of *M. musculus* (gene name *Pcnx*) maps to position 12 C3, and short partial sequences are present on chromosomes 15 and 19. The equivalent gene in the human genome (gene name *PCNX*) maps to position 14q24.1; no short partial sequences are found in the human genome. Remarkably, most of the information segments are conserved between chromosomes 12 of *M. musculus*, 14 of *H. sapiens* [19] and 6 of *R. norvegicus* [20].

We have also performed a detailed searching of the data bases looking for further *pecanex 1*-related sequences. This investigation provided evidence that *pecanex 1* is a member of a gene family. A second gene of the family would map to location 19q12 in rat (GenBank accession no. XM_226571), and codes for a putative protein of 1034 amino acids with 51% identity to *pecanex 1* along 881 amino acids. The homologue of this gene maps to position 8 E2 in mouse and 1q42 in the genome of *H. sapiens*. Finally the third gene, whose sequence is referred in the GenBank as *pecanex-like 3*, maps to position 1q43 of *R. norvegicus*, 19 A of *M. musculus* (gene name *Pcnx13*) and 11q13.1 of *H. sapiens* (gene name *PCNXL3*) respectively. The *Pcnx13* mRNA from *M. musculus* (GenBank accession no. AF237953) would code for a putative protein of 1620 amino acids exhibiting 65% identity with *pecanex 1* along 1148 residues. Interestingly, according to our sequence analysis, the cDNA clone isolated from rat brain by Gilbert et al. (Genbank accession no. M90514) [13] would actually be encoded by *pecanex-like 3*, corresponding to a genomic sequence located on chromosome 1.

It is worth mentioning that the nucleotide sequence of the cDNA probe used for the hybridizations, as well as the sequence coding for the 15-mer peptide (see Fig. 4A), was only present in the *pecanex 1* gene (no homologies were present in *pecanex-like 3* nor in XM_226571). Therefore, the expression pattern investigated here corresponds to that of *pecanex 1*. Information about the expression patterns of

B

Sequence length: 1446
 Sequence Number of predicted TMHs: 7
 Sequence Exp number of AAs in TMHs: 223.3684
 Sequence Exp number, first 60 AAs: 0.00018
 Sequence Total prob of N-in: 0.50133

Sequence	TMHMM2.0		inside	1	111
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	112	134	
Sequence	TMHMM2.0	outside	135	171	
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	172	194	
Sequence	TMHMM2.0	inside	195	214	
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	215	237	
Sequence	TMHMM2.0	outside	238	264	
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	265	287	
Sequence	TMHMM2.0	inside	288	298	
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	299	318	
Sequence	TMHMM2.0	outside	319	370	
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	371	393	
Sequence	TMHMM2.0	inside	394	399	
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	400	417	
Sequence	TMHMM2.0	outside	418	1446	

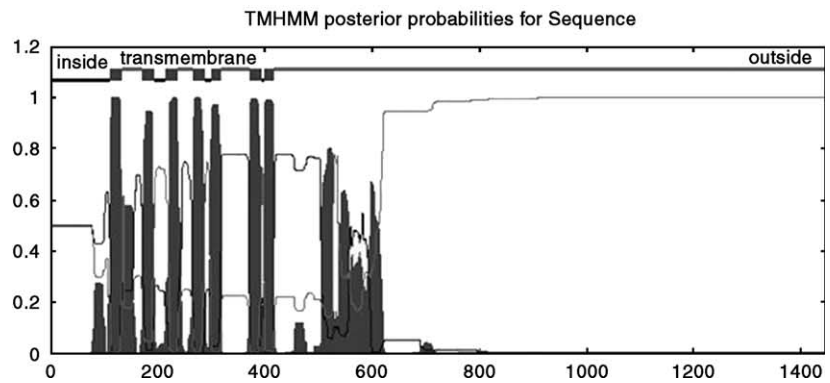


Fig. 4. Alignment of the predicted amino acid sequence of pecanex 1 from rat with the predicted sequences that represent the best matches from databases, and topology prediction for the pecanex 1 protein from rat. A. The predicted sequence of pecanex 1 from *R. norvegicus* was aligned with the predicted amino acid sequences of Pcnx from *M. musculus*, PCNX from *H. sapiens*, the homologous sequence from *T. rubripes* (Pcnx1) and *Drosophila*'s pcx. Identical amino acids are highlighted in black and similar amino acids in gray. Dashes indicate a space introduced to improve the alignment. The alignment was done with ClustalW and Bioedit. The sequence corresponding to the 15-mer peptide used to generate the antibody is indicated as a black line above the pecanex 1 sequence from rat (starting at residue 1403). B. Topology prediction for the pecanex 1 protein from rat. This prediction was made with different computer programs from the ExpASY Proteomics tools server. Here is shown the prediction done with the TMHMM program, as an example. The number and position for the residues in each transmembrane helix are indicated. Although the N-terminal end of the protein is predicted to be inside by this program, the orientation prediction is controversial, as varies with different computer programs.

the other members of the *pecanex* gene family is not available at present.

4. Discussion

We have investigated the expression of *pecanex 1* gene in the rat. To our knowledge, this is the first study on the expression of *pecanex* in mammals at the RNA and protein levels. Northern blot analysis and in situ hybridization showed that *pecanex 1* is expressed in the adult testis of the rat, specifically in the cells of the germinal line after the onset of meiosis, and more

intensely during the meiotic prophase than during spermiogenesis. As shown in Fig. 2, Northern blots did not allow the detection of the transcript in any of the tested tissues and stages, except for adult testis. Antibodies raised against a peptide from the C-terminal region of the putative protein product allowed us to show for the first time that the *pecanex 1* mRNA is translated in the testis, rendering a protein product of the expected size. The protein was detectable in meiotic prophase cells and during spermiogenesis (round spermatids). As far as we know this is the first time that the protein product of a *pecanex* gene is directly detected (even in *Drosophila*, the existence of the protein was

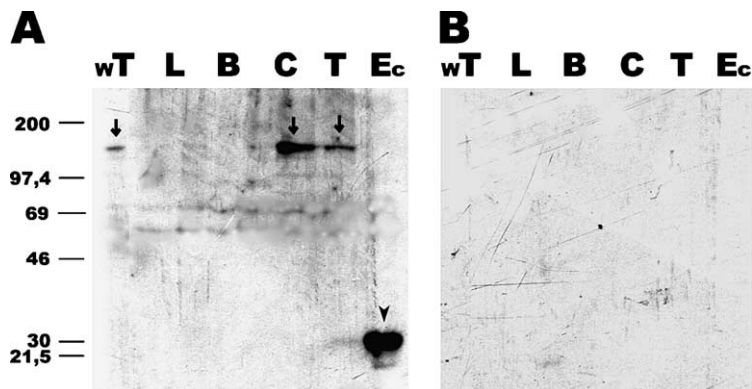


Fig. 5. Expression of pecanex 1 evidenced by immunoblotting. A. The membrane was incubated with the serum raised against the 15-mer peptide. The different lanes were loaded with a protein lysate of adult testis (wT), liver (L), brain (B), pachytene spermatocytes (C) and round spermatids (T). The fragment corresponding to the product of the *pecanex 1* gene is pointed out by arrows. A protein lysate of an induced culture from *Escherichia coli* expressing the coding region of the 1107 bp cDNA clone (shown in Fig. 1) as a GST-fusion protein (pointed out by an arrowhead) was used as a positive control (Ec). B. Experiment performed in parallel with the one in Panel A, with the only difference that the serum was competed with the 15-mer peptide previous to its incubation with the membrane. Rainbow coloured protein molecular weight marker (Amersham, Buckinghamshire, UK) was used as molecular weight standard.

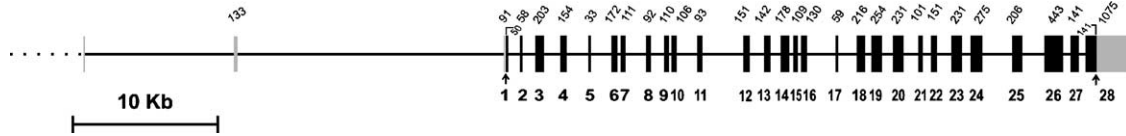


Fig. 6. Organization of the *pecanex 1* genomic sequence in rat. The coding sequence would be organized into 28 exons, separated by 27 introns. Boxes represent exons and horizontal lines represent introns. The coding exons are numbered and represented in black, and the noncoding exons are represented in gray. The sizes in nucleotides are indicated above each exon. Vertical arrows indicate ATG and stop codon positions respectively.

concluded through a mutant phenotype [10]). On the contrary, protein pecanex 1 was not detectable in the liver nor brain.

Notwithstanding, our results do not exclude the possibility that *pecanex 1* could be expressed at low levels (undetectable by Northern blot) in other tissues than adult testis. In fact, *pecanex 1* ESTs were also obtained from some somatic tissues. However, most of these ESTs have been obtained from normalization/subtraction libraries and might therefore represent rare transcripts (for a detailed description on normalization and subtraction see [21]).

The results of our search against the genome projects (see above) allowed us to conclude that, in addition to *pecanex 1*, two other members of the *pecanex* family exist in different chromosomes in the mammalian genomes, and would code for *pecanex 1*-related products. However, the expression pattern of the corresponding protein products has not been investigated yet.

According to computer analysis with programs from the ExPASy Proteomics tools, protein pecanex 1 would be an integral protein from the plasma membrane. In agreement with that, the sequence exhibits potential Asn-X-Ser/Thr glycosylation signals (not shown). Various transmembrane helices, possibly seven, would be located in the N-terminal half of the protein. This poses the question whether pecanex 1 might be a member of the seven-transmembrane (7-TM) receptor family. This family constitutes the largest, most ubiquitous and versatile family of membrane receptors, and the most common target of therapeutic drugs (for reviews see [22,23]). It is suggestive that part of the transmembrane region of pecanex 1 shows 37% similarity with the N-terminal end of the olfactory receptor protein 5.3 of zebrafish *Danio rerio*, which is a 7-TM receptor from the rhodopsin family (7-TM receptors do not share overall sequence homology; the only sequence identity they generally share is over 25% in the transmembrane core region) [23]. While more work is needed in order to find out whether pecanex 1 belongs to the 7-TM receptors, it is certain that *Drosophila*'s *pcx* would not, since according to computer predictions it has only three hydrophobic helices [10]. The other predicted pecanex proteins, although also carrying transmembrane helices, would have a different structure and, therefore, possibly a different role.

In summary, *pecanex* would be a complex gene family with three different members in the mammalian genomes; in particular, we report here that *pecanex 1* is expressed in the germinal line of the testis of the rat, after the onset of meiosis and mainly during the meiotic prophase. We have

also demonstrated for the first time that the *pecanex 1* gene codes for a protein product in mammals that is expressed during spermatogenesis. We speculate that this protein could be exerting a specific (regulatory?) role in the testis, related to spermatogenesis.

Acknowledgments

We thank Patricia Cassina and Mariana Pehar (Faculty of Medicine, Montevideo) for providing the embryos, and Mario Lalinde for helping with the graphic processing. This study is supported by PEDECIBA (Uruguay), a short term fellowship of the DAAD (Bonn, Germany), to A.G and a grant of the Graduate Program 1048 "Organogenesis" to R.B.

References

- [1] R.P. Erickson, Post-meiotic gene expression, *Trends Genet.* 6 (1990) 264–268.
- [2] D. Elliot, Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development, *Cytogenet. Genome Res.* 103 (2003) 210–216.
- [3] K.C. Kleene, Patterns, mechanisms and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells, *Cytogenet. Genome Res.* 103 (2003) 217–224.
- [4] E.M. Eddy, Male germ cell gene expression, *Recent Prog. Horm. Res.* 57 (2002) 103–128.
- [5] J.P. Venables, Alternative splicing in the testes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002) 615–619.
- [6] P. Liang, A.B. Pardee, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 257 (1992) 967–971.
- [7] P. Liang, L. Averboukh, A.B. Pardee, Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3269–3275.
- [8] A. Geisinger, R. Wettstein, R. Benavente, Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method, *Int. J. Dev. Biol.* 40 (1996) 385–388.
- [9] A. Geisinger, A. Dos Santos, R. Benavente, R. Wettstein, Identification and characterization of *Srsp1*, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch-containing protein, *Cytogenet. Genome Res.* 98 (2002) 249–254.
- [10] S.G. LaBonne, I. Sunitha, A.P. Mahowald, Molecular genetics of *pecanex*, a maternal-effect neurogenic locus of *Drosophila melanogaster* that potentially encodes a large transmembrane protein, *Dev. Biol.* 136 (1989) 1–16.
- [11] N. Perrimon, L. Engstrom, A.P. Mahowald, Developmental genetics of the 2E-F region of the *Drosophila* X chromosome: a region rich in "developmentally important" genes, *Genetics* 108 (1984) 559–572.

- [12] V. Hartenstein, J.A. Campos-Ortega, Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*, *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 193 (1984) 308–325.
- [13] T.L. Gilbert, B.A. Haldeman, E. Mulvihill, P.J. O'Hara, A mammalian homologue of a transcript from the *Drosophila pecanex* locus, *J. Neurogenet.* 8 (1992) 181–187.
- [14] M.L. Meistrich, Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes, *Methods Cell Biol.* 15 (1977) 15–44.
- [15] M. Alsheimer, R. Benavente, Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation, *Exp. Cell Res.* 228 (1996) 181–186.
- [16] J.M. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [17] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4, *Nature* 277 (1970) 680–685.
- [18] J.O. Thomas, R.D. Kornberg, An octamer of histones in chromatin and free in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 2626–2630.
- [19] International Human Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 (2001) 860–921.
- [20] Rat Genome Sequencing Project Consortium, Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution, *Nature* 428 (2004) 493–521.
- [21] M.F. Bonaldo, G. Lennon, M.B. Soares, Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery, *Genome Res.* 6 (1996) 791–806.
- [22] U. Gether, Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 90–113.
- [23] K.L. Pierce, R.T. Premont, R.J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptors, *Nat. Rev.* 3 (2002) 639–649.

Identification and characterization of *Srsp1*, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch-containing protein

A. Geisinger,^{a,b} A. Dos Santos,^b R. Benavente^c and R. Wettstein^b

^aUnidad Asociada Biología Molecular (IIBCE), Facultad de Ciencias;

^bDepartamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo (Uruguay);

^cDepartment of Cell and Developmental Biology, Biocenter, University of Würzburg, D-97074 Würzburg (Germany)

Abstract. By means of mRNA differential display and cDNA library screening we have characterized a novel gene of the rat that is differentially expressed during spermatogenesis. Northern blot analyses showed that its mRNA reaches the highest level during the first meiotic prophase. The transcript appears to be testis-specific as it was not detectable in any of the nine other tissues tested. The full length ORF encodes a putative phosphoprotein containing a serine stretch and a bipartite

nuclear localization signal, which we call *Srsp1* (“serin-rich spermatogenic protein 1”). Comparison of the cDNA from *Srsp1* with genomic sequences in databases allowed us to determine the number of introns; some putative regulatory sequences are proposed. This is the first report of a gene differentially expressed during spermatogenesis that codes for a protein containing a serine stretch.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

During the complex differentiation process that takes place in spermatogenesis at least two gene expression programs are executed. The first one provides the spermatocyte I with the molecular apparatus for chromosome pairing, recombination and segregation of meiotic chromosomes. The second program is responsible for the profound biochemical and structural changes that haploid spermatids undergo in order to produce mature sperm (see Erickson, 1990). Germ line cells at different developmental stages (spermatogonia, meiotic spermatocytes and postmeiotic spermatids) coexist in the seminiferous tubules of adult animals together with the somatic Sertoli cells. Therefore, a prerequisite for the analysis of differential gene expression during spermatogenesis is the availability of methods that allow rapid isolation of highly enriched populations of

a certain germ cell type. Among these methods, centrifugal elutriation is best suited (Meistrich, 1977).

In an attempt to identify genes differentially expressed during spermatogenesis, we have applied mRNA differential display (DD; Liang and Pardee, 1992; Liang et al., 1993). We compared RNA populations obtained from highly purified pachytene spermatocytes (meiotic cells) and round spermatids (post-meiotic cells) of the rat by using thirteen different combinations of primers (Geisinger et al., 1996; A. Geisinger, unpublished results). This way we were able to identify 94 differentially expressed cDNA bands most of which (74%) corresponded to spermatids; the others (26%) were spermatocyte-specific (Geisinger et al., 1996). In the present study, we report on the characterization of a novel gene of the rat that we have identified with the aid of differential display.

Supported by PEDECIBA (Uruguay) and a short-term fellowship of the DAAD (Bonn, Germany) to A.G.

Received 12 December 2002; manuscript accepted 22 January 2003.

Request reprints from Adriana Geisinger, Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Av. Italia 3318, 11600 Montevideo (Uruguay)
telephone: + 598 2 487 2605; fax: + 598 2 487 5548
e-mail: geisinge@iibce.edu.uy

Materials and methods

Obtaining stage-enriched cell populations of rat testis

Wistar rats (40 days old) were obtained from Charles River Wiga (Sulzfeld, Germany). Cell suspensions were prepared and submitted to centrifugal elutriation as already described (Meistrich, 1977). Fractions with the highest concentration of pachytene spermatocytes and round spermatids were collected separately.

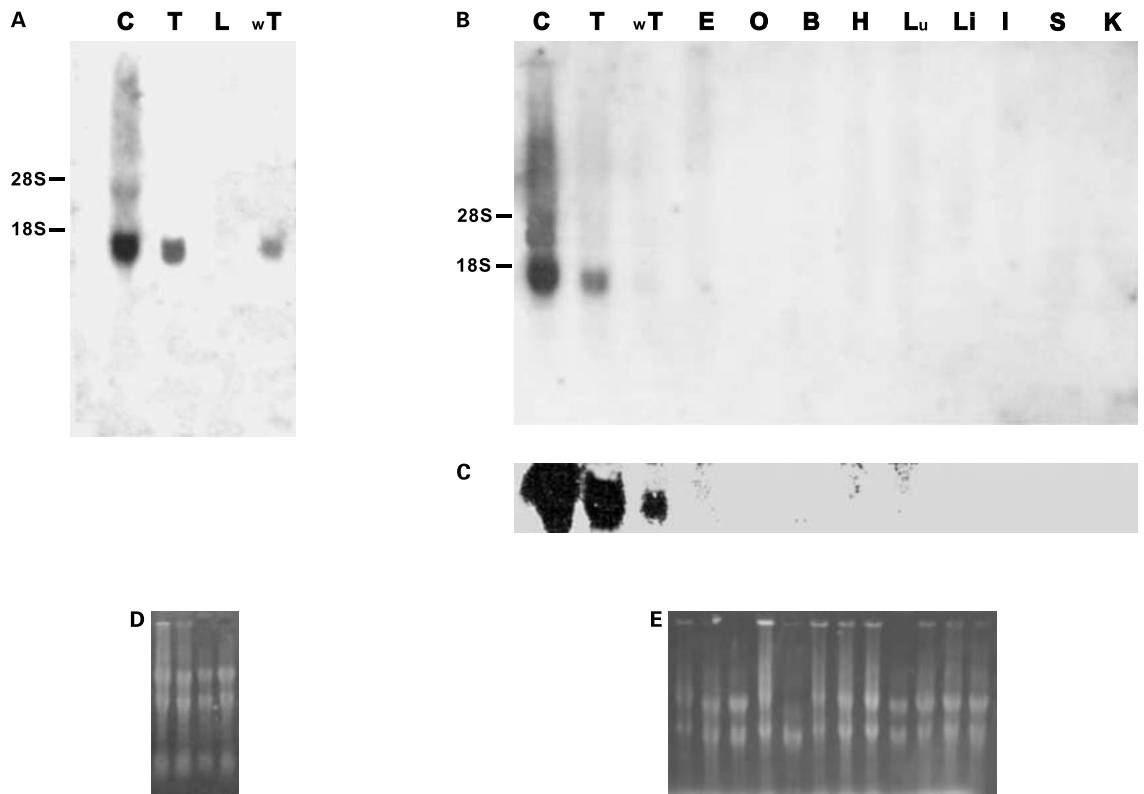


Fig. 1. Expression pattern of *Srspl* analyzed by Northern blot assays. **(A)** The cDNA band from DD was used as a probe. **(B)** Membranes were probed with the full-length cDNA clone and exposed overnight. **(C)** Partial section of the same blot as in **(B)** (between dotted lines), but with a four days-exposure in order to show the absence of expression in tissues other than testis. Each lane contains 40 μ g of total RNA from pachytene spermatocytes (C), round spermatids (T), whole testis (wT), epididymis (E), ovary (O), brain (B), heart (H), lung (Lu), liver (Li), intestine (I), spleen (S) and kidney (K), respectively. Lower pictures **(D, E)** show the ethidium bromide stained gels to document that all the lanes were equally loaded.

RNA isolation and differential display

For RNA isolation from whole tissues, rats were dissected and tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until extraction. RNA extractions were performed with the RNA Isolation Kit from Stratagene (Heidelberg, Germany). Differential display was carried out with RNA from elutriated cell populations essentially as instructed (Liang et al., 1993), using the RNA Map kit from GenHunter (Nashville, TN, USA); oligo-dT primers and arbitrary decamers AP1–9 from the same supplier were used. Differentially expressed bands were eluted from the acrylamide gel and reamplified as described (Liang et al., 1993; Geisinger et al., 1996).

cDNA library screening

The band reamplified in this work was cloned into a pGEM-T vector II (Promega, Madison, WI, USA), labeled by random priming with the DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany), and used as a probe to screen a λ -ZAP (Stratagene, La Jolla, CA, USA) cDNA library made from a highly enriched population of pachytene spermatocytes (Alsheimer and Benavente, 1996). Library screening was performed essentially as instructed (Stratagene ZAP-cDNA Synthesis Kit instruction manual), and chemiluminescent detection with CSPD was done following Boehringer's recommendations.

Northern blot analysis

cDNA probes were labeled by random priming (Megaprime DNA Labeling System, Amersham, Buckinghamshire, UK) with [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (Amersham). Northern blot assays were carried out essentially according to Sambrook et al. (1989). Gels with 40 μ g of total RNA per lane were transferred to positively charged nylon membranes, prehybridized for 1 h and hybridized

overnight at 42°C in UltraHyb solution (Ambion, Austin, TX, USA). Washes were performed twice in $2\times$ SSC, 0.1% SDS for 5 min at the same temperature and twice in $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS for 20 min at 55°C . Filters were exposed at -80°C overnight with an intensifying screen.

Sequencing and sequence analysis

DNAs of the clones from DD band cloning and of the positive clones from cDNA library screening were purified by a DNA extraction system (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) and sequenced by ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Foster City CA, USA) at the Faculty of Sciences (Uruguay). Sequences were blasted in GenBank. Nucleic acid sequences were analysed by means of the BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) and CGG Nucleotide Sequence Analysis Software (<http://genomic.sanger.ac.uk/gf/gf.html>). Genomic searches were performed against the Rat Genome Project from NIH (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/index.html>). Programs available at the ExPASy server were used for putative protein analysis.

Results and discussion

Identification, characterization and expression pattern of *Srspl*

By using differential display (Geisinger et al., 1996; see also above), we have isolated differential cDNA bands of spermatocytes that appeared to be meiosis-specific in duplicate experi-

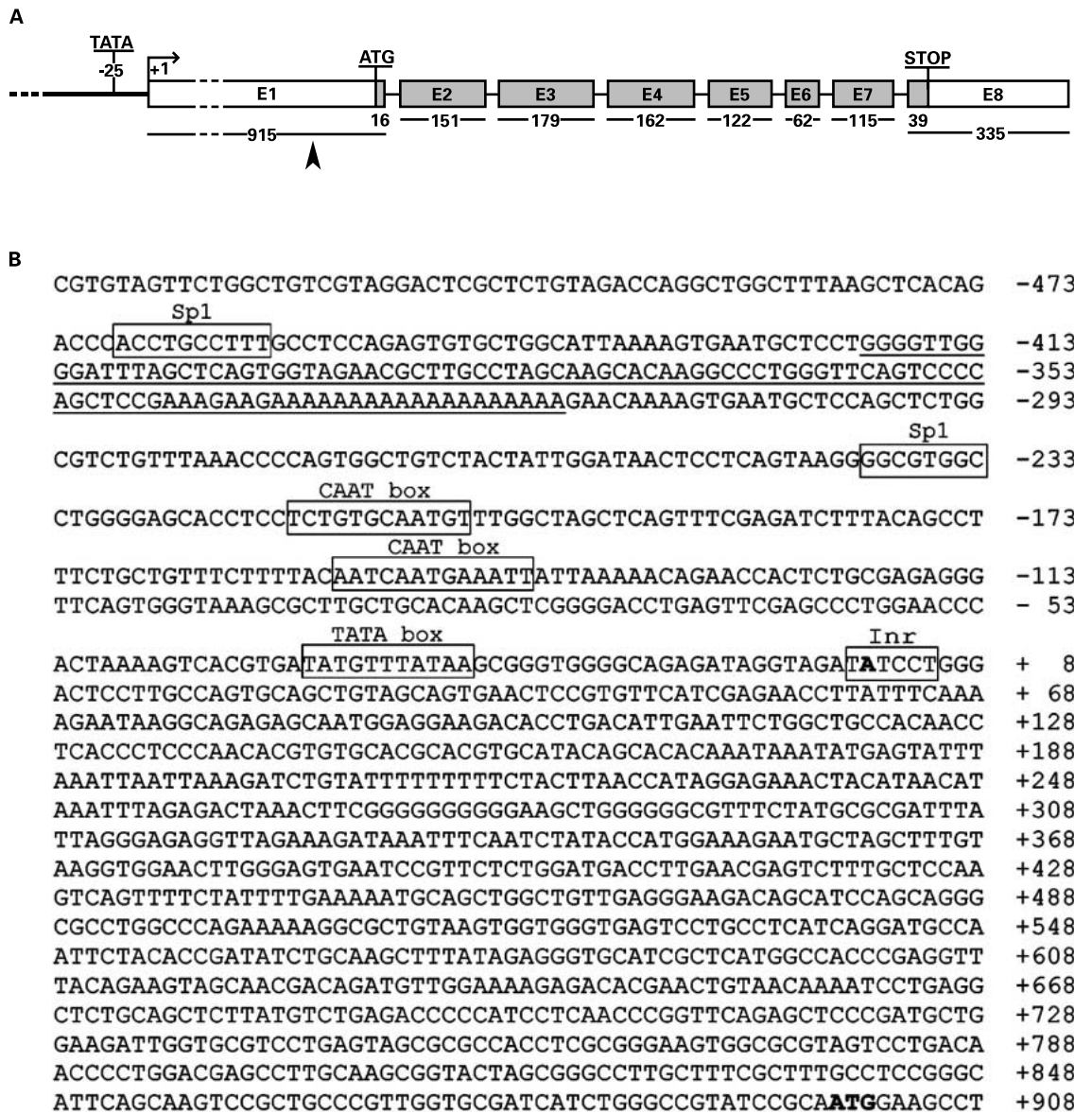


Fig. 3. Organization of the *Srspl* gene. **(A)** The gene is organized in eight exons (boxes E1–E8), separated by seven introns (black lines). The coding region is shown as gray boxes. The number of nucleotides composing each exon is indicated under each box. In those cases in which the number of coding nucleotides is not coincident with the number of nucleotides in the exon (E1 and E8), this number is also indicated. ATG and stop codons, and putative TATA box and transcription start (+1) are shown. The arrowhead under E1 represents the 5' end of the cDNA clone. **(B)** In the promoter region the putative TATA box, transcription initiator, CAAT and Sp1 sites are boxed. Sequence corresponding to an ID repetitive element is underlined. ATG and +1 nucleotide are in bold type.

```

MEARDAQHSDVLESKGLASRTSSHQNRRASLSSDGTGLRVTDAPGLPRVMTPSDTAAGLGQKTSSTSSSSSSSSSSSSPSS
SSAQANRSLKVLPEIQEKYPEEFSLKSQTTDGQRPEWTFYPRFSSNIHTYHVGKQCFNGVFRGNRKSVAERTVDKSLGK
KKYDIDPRNGIPKLTPGDNPFMQSKEFFKAGATLPPVNFSLGPYEKKFDTFIPLEPLPQIPNLPFWEKEKANNLKNEIKE
VEDLDNWQAMPFLHGFLSTANRTITTCDQKV

```

Fig. 4. Predicted amino acidic sequence of putative protein Srspl. Serine stretch is indicated as white letters in a black box. Putative nuclear localization signal is indicated as a grey box. Possible recognition sites for CK2 (continuous black lines), PKC (continuous grey line), cAMP and cGMP-dependent kinase (interrupted line) and a proline-dependent kinase (asterisks) are underlined.

SRSP-1	ASRTSSHONRRASLSS-DGTGLRVTDAPGLPRVMTFSDTASGLGOKTSSSSSSSSSSSS	78
M. musculus	ANRTSSRONKRTSLSSDGTGFRVTESLGLPRVLTFSDTAADVGOKTSSSSSSSSSS	76
H. sapiens	ANTTPS--GKSVSSSSSVETGPPVSEPPGLPRVSAYVDTTADLDRKTSFS	108
C. intest.	-----	
SRSP-1	SPSSSSSAQANRSLKVSLEPIQEKYPEEFSLLSKSTTDGORPEWTFYPRFSSNIHTYHV	138
M. musculus	-----AOSNRSSKVSLPEDDPKEKYPEEFSLLSKSTTDGORPEWTFYPRFSSNIHTYHV	129
H. sapiens	-----HSDHSSSEMSLPEVQKDKYPEEFSLLSKSTTDGHRPEWTFYPRFSSNIHTYHV	160
C. intest.	-----NPXVIFHTSISIMFHSKGEVYKFPYPHG-IPIVYVK	32
SRSP-1	GKQCFNNGVFRGNRKSVAERTVDKSLGKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFEK	198
M. musculus	GKQCFNNGVFRGNRRSVAERTVDNLSLGGKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFEK	189
H. sapiens	GKQCFNNGVFLGNKRSLSERTVDKCFGRKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFEK	220
C. intest.	GKATLENATHKASQISNTEISDTRLRFGSHGLVTDPRNNITEVSPGDKPYQAAEYSVDFEK	92
SRSP-1	AGATLPPVNFSLGPEYKKEDETFIPLEBLEQIPNLPFWEKKEKANLNKNEIKEVEELDNWQA	258
M. musculus	AGATLPPVNFSLGPEYKKEIDTFIPLEBLEKIPNLPFWEKKEKANLNKNEIKEVEELDNWQV	249
H. sapiens	AGSMLPPVNFSLVPEYKKEFDTFIPLEBLEQIPNLPFWEKKEKANLNKNEIKEVEELDNWQF	280
C. intest.	FGSTRPVPVNFSGGFQLQKEQ-TFIPMSETTKTQTKPEYHVKEEQRKKAIEVEVVTGLELDWRP	151
SRSP-1	PMPFLHGFLSTANRTITTCQDKV	281
M. musculus	PMPFLHGFFSTGASNFSRQ	269
H. sapiens	AVPLMHMLHLSGALDFPROS	300
C. intest.	ASPLIVPVXM	161

Fig. 5. Alignment of the predicted amino acids sequence of *Srsp1* and the first matches from databases. The deduced amino acid sequence showed homology to the conceptually translated sequences of a cDNA clone from the testis of *Mus musculus* (accession number BAB24285.1) and *Homo sapiens* (accession number BAB710701.1), as well as with the conceptual translation of an EST from the testis of *Ciona intestinalis* (accession number BP020754). Identical amino acids are highlighted in black and similar amino acids in gray. Dashes indicate a space introduced to improve the alignment. The alignment was performed with the ClustalW and Boxshade software programs.

Interestingly, serine stretches have been described in very diverse proteins, such as nucleolar phosphoprotein Nopp140 (Meier and Blobel, 1992), abscisic acid-responsive Rab17 from plants (Villardel et al., 1990), parasite antigens (i.e. Strong et al., 2000), transcriptional regulators (Kretzschmar et al., 1994) and vitellogenin (Nardelli et al., 1987), among others. Serine stretches would be phosphorylated by serin/threonin kinases, as has been observed for some of those proteins (Berridge and Lane, 1976, Villardel et al., 1990; Kretzschmar et al., 1994).

Phosphorylation of serine stretches has been implicated in diverse cellular functions. In the case of Nopp140 and Rab17, a role for serine-rich regions in nuclear protein targeting has been proposed: when phosphorylated on the serine stretches, these proteins are able to interact with nuclear localization signal-containing proteins (Meier and Blobel, 1992; Goday et al., 1994, Jensen et al., 1998; Yang et al., 2000). Moreover, evidence exists that the serine-rich regions in a number of viral and cellular transcriptional regulators and probably in Nopp140 as well are required for transcriptional activation of RNA polymerase II-dependent promoters, possibly through interaction with general transcription factors (Kretzschmar et al., 1994, Miao et al., 1997). The serine repeats of these proteins are followed by acidic residues which would represent consensus sequences for CK2-dependent phosphorylation (Jensen et al., 1998). However, this is not the case for *Srsp1* in which a possible CK2 recognition site is located a few residues after the serine cluster (see Fig. 4). Presently we do not know the significance of this difference. On the other hand, the presence of a single proline interrupting the homoserine track of *Srsp1* would be indicative of a phosphorylation site for a proline-directed kinase. The involvement of proline-directed kinases in diverse cellular processes important for embryogenesis, cell proliferation and differentiation is well known (for review see Pearson et al., 2001). Further work is needed to determine the role of the serine stretch of *Srsp1* in relation to spermatogenesis.

The predicted sequence of *Srsp1* exhibited similarity with the conceptually translated sequence of cDNA clones from mouse and human testis (Fig. 5). Interestingly, the homoserine region in the predicted protein sequence of the mouse clone is shorter than in rat. A short homoserine region was also found in the N-terminal region of the putative human protein (data not shown). The predicted sequence of *Srsp1* also showed similarity with the conceptual translation of an EST from the testis of the primitive chordate *Ciona intestinalis* (Fig. 5). This organism, for which a good genomic infrastructure (EST and cDNA collections, BAC and cosmid libraries, etc.) exists, is the smallest of any experimentally manipulable chordate. Thus, it provides a good system for exploring the evolutionary origins of the chordate lineage, from which all vertebrates sprouted. The finding of a homolog for *Srsp1* in this organism is indicative of its conservation along the chordates, suggesting an important role for this protein.

Summarizing, the results presented in this paper represent the first report of a gene differentially expressed during spermatogenesis that codes for a protein containing a serine stretch. It would also contain a bipartite nuclear localization signal (suggesting a nuclear destination) and potential phosphorylation sites for serin/threonin kinases. No other functional domains were recognized by comparison with protein databases.

Acknowledgments

We thank Manfred Alsheimer (Würzburg) for providing us with the pachytene spermatocyte-cDNA library, Steve Scherer (Human Genome Sequencing Center, Houston, TX) for information on chromosome location of the BAC clones, Cristina Arruti (Montevideo) for valuable suggestions, Rosie Rudd for correcting the manuscript and Mario Lalinde for helping with the graphic processing.

References

- Alzheimer M, Benavente R: Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res* 228:181–186 (1996).
- Berridge MV, Lane, CD: Translation of *Xenopus* liver messenger RNA in *Xenopus* oocytes: vitellogenin synthesis and conversion to yolk platelet proteins. *Cell* 8:283–297 (1976).
- Erickson RP: Post-meiotic gene expression. *Trends Genet* 6:264–268 (1990).
- Geisinger A, Wettstein R, Benavente R: Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method. *Int J Dev Biol* 40:385–388 (1996).
- Goday A, Jensen AB, Cullanez-Macia FA, Mar Alba M, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pages M: The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6:351–360 (1994).
- Jensen AB, Goday A, Figueras M, Jessop AC, Pages M: Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant J* 13:691–697 (1998).
- Kim J, Kass DH, Deininger PL: Transcription and processing of the rodent ID repeat family in germline and somatic cells. *Nucl Acids Res* 23:2245–2251 (1995).
- Kleene KC: A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* 106:3–23 (2001).
- Kretzschmar M, Kaiser K, Lottspeich F, Meisterernst M: A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78:525–534 (1994).
- Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967–971 (1992).
- Liang P, Averboukh L, Pardee, AB: Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl Acids Res* 21:3269–3275 (1993).
- McKinnon RD, Shinnick TM, Sutcliffe JG: The neuronal identifier element is a cis-acting positive regulator of gene expression. *Proc natl Acad Sci, USA* 83:3751–3755 (1986).
- Meier UT, Blobel G: Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70:127–138 (1992).
- Meistrich ML: Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol* 15: 15–44 (1977).
- Miau LH; Chang CJ, Tsai WH, Lee SC: Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor. *Mol Cell Biol* 17:230–239 (1997).
- Nardelli D, van het Schip FD, Gerber-Huber S, Haefliger JA, Gruber MG, Wahli W: Comparison of the organization and fine structure of a chicken and a *Xenopus laevis* vitellogenin gene. *J Biol Chem* 262:15377–15385 (1987).
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153–183 (2001).
- Reinhardt A, Hubbard T: Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucl Acids Res* 26:2230–2236 (1998).
- Sambrook JM, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).
- Strong WB, Gut J, Nelson RG: Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton z surface antigen products. *Infect Immun* 68:4117–4134 (2000).
- Vilardel LJ, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martínez MC, Torne JM, Pages M: Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Mol Biol* 14:423–432 (1990).
- Wallace AM, Dass B, Ravnik SE, Tonk V, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, MacDonald CC: Two distinct forms of the 64,000 Mr protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells. *Proc natl Acad Sci, USA* 96:6763–6768 (1999).
- Yang Y, Isaac C, Wang C, Dragon F, Pogacic V, Meier, UT: Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Mol Biol Cell* 11:567–577 (2000).

A simple method for screening cDNAs arising from the cloning of RNA differential display bands

Adriana Geisinger, Rosana Rodríguez, Verónica Romero and Rodolfo Wettstein

División Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, I 1600 Montevideo, Uruguay

Keywords: Gene expression, Electrophoresis

▼The mRNA differential display method was developed to identify and characterize differentially expressed genes based on the reverse transcription of mRNAs and PCR, using oligo-dT primers and arbitrary decamers. This allows the amplification of 3'y termini of poly(A) RNAs, which are displayed on polyacrylamide gels (Ref. 1, 2). Although the technique exhibits many potential advantages over conventional methods for isolating genes which are specific to a tissue or cell type, it still has some limitations. One of its major drawbacks is that most of the PCR products obtained after purification from the sequencing gel and reamplification contain a significant proportion of co-migrating contaminating sequences, which have a similar size but different sequence. As a result, the cDNA bands need to be cloned and re-tested before clones can be selected that correspond to the genes that are differentially expressed. However, screening by northern blot of each clone is laborious and involves the use of large amounts of RNA (which are generally not available) and radioactive material. For that reason, different attempts have been made to simplify this screening step (Ref. 3, 4, 5). However, the majority of the proposed improvements, although easier than the northern blots, are still tedious and involve the use of radioactive material and, in some cases, significant amounts of mRNA (Ref. 3). In addition, some of them do not work well if the cDNA that is predominant in the band is not the differential product (Ref. 4). The use of single strand conformation polymorphism (SSCP) gels has been described as a way of enhancing the screening of the differentially amplified bands, by purifying the cDNA product of interest away from others of different sequence but of similar size (Ref. 6).

However, its use is complicated and the protocol conditions need to be optimized for each sample. Furthermore, each PCR product generally produces two SSCP bands (or three, one for each strand and one for the double strand), which can further complicate the interpretation of the results.

Differential display is used in our laboratory to analyze differential gene expression during rat spermatogenesis (Ref. 7). For re-testing the differential bands after cloning, we sought a solution that would allow us to save time and radioactive materials. We have been using a simple electrophoresis method based on agarose gels containing the DNA ligand bisbenzimidazole to which polyethylene glycol (PEG) 6000 is covalently coupled (Ref. 8). The dye bisbenzimidazole binds preferentially to A+T motifs and the PEG retards the migration of DNA sequences in the gel in relation to their A+T content. This technique, reported for the detection of sequence variation in bacteria, has shown to resolve differences in A+T content of less than 1% (Ref. 8). Consequently, differential display products are easily distinguished because, although the product of interest and the contaminating products are about the same length, they are completely different in sequence.

cDNA bands were cloned in a pGEM-T vector (Promega). Various clones for each band were minipreped and inserts were excised by digesting with *Pst*I and *Sac*II. Digested plasmids were electrophoresed directly, without previous purification of the bands. Electrophoresis was performed in parallel, in conventional agarose gels and bisbenzimidazole/PEG gels. In the latter ones, a horizontal tank was used but buffer reservoirs were filled only up to the upper edge of the gel, in order to avoid washing out of the dye during the run. Although we suspected that electrophoresis runs

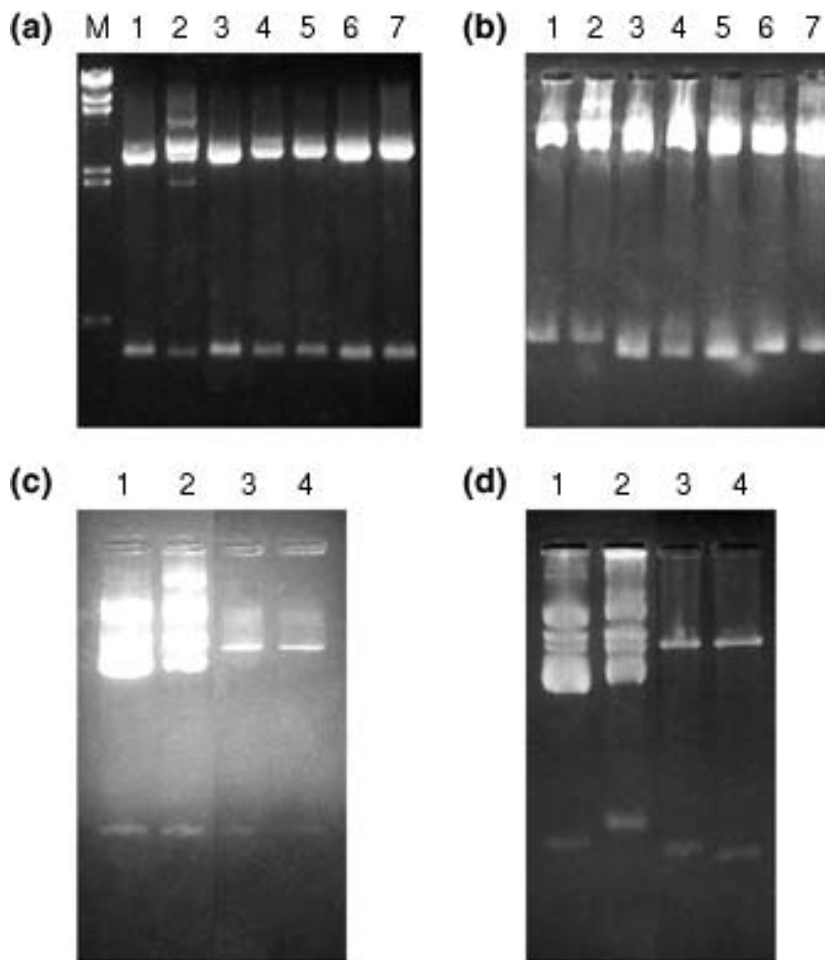


FIGURE 1. Plasmid minipreps containing the cloned bands from the RNA display were digested with *Pst*I and *Sac*II and run in agarose gels. Normal agarose gels and gels containing bisbenzimidazole/PEG were run in parallel. Panels (a) and (b) show results obtained with a 420 bp cloned band and (c) and (d) results using a different 355 bp cloned band. (a and c) Digested clones electrophoresed in conventional agarose gels containing 2% agarose (w/v) in TAE buffer. (b and d) The same clones, but run in agarose gels containing bisbenzimidazole/PEG (Hanse Analytik) at a concentration of 0.025 OD units/ml. The electrophoresis buffer was 25 mM EDTA, pH 5.9. The electrophoretic run was performed for 3 h and the running buffer was recirculated every 20 min. Gels were stained with ethidium bromide, as usual. Twice as much DNA was loaded per lane in (b) and (d) than in (a) and (c). The A+T content of the different bands in (c) and (d) is as follows: 1, 60.06%; 2, 64.93%; 3, 59.5%; 4, 48%. Sequencing revealed that band 3 had two bases less than the other three, which were all the same size.

performed without previous purification of the bands from the agarose could not result in a good separation because the digested plasmid on top would sequester the dye, our results show that the runs can be performed directly after digestion (Fig. 1). The results were confirmed by sequencing reactions (data not shown). The migration of the different bands in bisbenzimidazole/PEG gels is consistent with the expected behaviour according to their A+T content.

This simple method allows us to separate the obtained clones in subpopulations according to their sequence, thus reducing considerably the number of required reconfirmatory northern blot or reverse northern dot-blot reactions. Our approach is much simpler than SSCP. It uses agarose

minigels (unlike MDE gels used for SSCP) and so preparation, blotting and DNA extraction are easier to perform (elution and blotting are made as usual for agarose gels, Ref. 8). It utilizes much shorter running times, running conditions do not need to be optimized for each batch of samples, it does not involve the use of radioactivity (gels are stained with ethidium bromide), and each clone migrates as a unique band on the gel. Moreover, by extending the running times it is possible to separate longer PCR fragments [e.g. cDNA bands obtained using the GenomylxLR DNA Sequencing System (Beckman Instruments)], which cannot be resolved by SSCP (fragments up to 1500 bp have been separated by bisbenzimidazole/PEG, Ref. 8).

This technique can be also used to separate cDNA populations directly from the reamplification mixture. This allows classification of the reamplified bands into those that are pure enough to be cloned directly from the PCR reaction and those that need to be purified from the agarose gel before cloning.

Acknowledgements

We thank Ricardo Benavente for helpful comments. This work was supported by E.U. (CI1-CT92-0034) and C.S.I.C. (University of the Republic).

References

- 1 Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) *Science* 257, 967–971.
- 2 Liang, P., Averboukh, L. and Pardee, A.B. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 3269–3275.
- 3 Li, F., Barnathan, E.S. and Karikó, K. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1764–1765.
- 4 Callard, D., Lescure, B. and Mazzolini, L. (1994) *BioTechniques* 16, 1096–1103.
- 5 Zhang, H., Zhang, R. and Liang, P. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 2454–2455.
- 6 Mathieu-Daudé, F. *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 1504–1507.
- 7 Geisinger, A., Wettstein, R. and Benavente, R. (1996) *Int. J. Dev. Biol.* 40, 385–388.
- 8 Wawer, C. *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23, 4928–4929.

Products Used

pGEM-T vector system: pGEM-T vector system from Promega Corporation

GenomylxLR DNA Sequencing System: GenomylxLR DNA Sequencing System from Beckman Coulter Inc

Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method

ADRIANA GEISINGER^{1,2,#}, RODOLFO WETTSTEIN² and RICARDO BENAVENTE^{1*}

¹Department of Cell and Developmental Biology, Theodor-Boveri-Institute (Biocenter), University of Würzburg, Würzburg, Germany and ²Division of Molecular Biology, Clemente-Estabe-Institute for Biological Research, Montevideo, Uruguay

ABSTRACT Spermatogenesis is a complex differentiation process which requires the coordinate synthesis of diverse stage-specific proteins. In attempting a large-scale identification and characterization of those proteins, we have made use of the recently described mRNA differential display method (Liang and Pardee, *Science* 257: 967-971, 1992). This method is based on the reverse transcription of mRNAs obtained from two different cell populations (pachytene spermatocytes and spermatids in the present study) followed by a PCR reaction and comparison of the individual cDNA populations in a polyacrylamide gel system. Up to the present we have been able to identify 268 cDNA bands. Most of them (77%) are common to both cell stages. From the differentially expressed bands (23%) an ample majority was spermatid-specific (74%). According to our present results we conclude that the mRNA differential display is a promising approach for investigations on stage-specific gene expression during a differentiation process like spermatogenesis.

KEY WORDS: spermatogenesis, meiosis, spermiogenesis, gene expression, mRNA differential display

Introduction

Spermatogenesis is a terminal differentiation process that results in the mature sperm. This process can be described as the coordinate execution of at least two individual programs of gene expression. One of these programs provides the primary spermatocyte with the meiosis-specific apparatus needed for chromosome pairing, molecular recombination and chromosome segregation. The second program provides the spermatid with the proteins necessary for the profound nuclear and cytoplasmic changes that take place during spermiogenesis. However, distinction between these programs is made difficult by the fact that they temporarily overlap. In rodents, for example, transcription of some spermiogenesis-relevant genes starts already during meiotic stages, while others are transcribed only post-meiotically by the round spermatid before transcription ceases in the elongating spermatid. In other species like *Drosophila*, post-meiotic transcription seems not to occur at all; transcription of genes coding for proteins needed during spermiogenesis is restricted to the spermatocyte stage. The complexity and execution of these gene expression programs explain the long duration of both meiotic prophase (as compared to the mitotic one) and spermiogenesis (for reviews see Hackstein, 1987; Willison and Ashworth, 1987; Erickson, 1990; Hecht, 1993; Stern, 1993).

Differential gene expression has been successfully investigated in a variety of model systems by using subtractive

hybridization techniques (for an overview see Myers, 1993). More recently, however, an alternative strategy was described, called the mRNA differential display (Liang and Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993). The method is based on the reverse transcription of the mRNA of two different cell populations using oligo-dT primers anchored to the poly A⁺ tail, and followed by a polymerase chain reaction (PCR) in the presence of a decamer arbitrary in sequence as a second primer. The resulting cDNA subpopulations are then visualized and compared using a polyacrylamide gel system (Liang and Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993). According to these authors the mRNA differential display method reveals several advantages in comparison to subtractive hybridization techniques. It is quicker, easier to reproduce and requires a lesser amount of starting RNA. Furthermore, it allows the simultaneous analysis of both groups of differentially expressed genes. The mRNA differential display method proved useful when applied to relatively simple models, i.e. the comparison of a transformed cell line vs. the corresponding non-transformed one (Liang and Pardee, 1992). Therefore, we were interested in testing its applicability to more complex situations, as in the case of a cell differentiation process like spermatogenesis. A prerequisite for the analysis of differential gene expression during spermatogenesis is the availability of methods that allow rapid separation of germ cell populations in sufficient amount

Abbreviations used in this paper: PCR, polymerase chain reaction.

*Address for reprints: Department of Cell and Developmental Biology, Theodor-Boveri-Institute (Biocenter), University of Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany. FAX: 931-8884252.

#Permanent address: Division of Molecular Biology, Clemente-Estabe-Institute for Biological Research, Avda. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay.

and purity. Among these methods centrifugal elutriation is the best suited (Meistrich, 1977). Here we report on our data, obtained by comparing mRNA populations isolated from meiotic and post-meiotic cells of the rat.

Results and Discussion

In an attempt to define different patterns of gene expression along spermatogenesis, we have applied the mRNA differential display method to RNA populations obtained from highly purified pachytene spermatocytes and round spermatids of the rat. Up to the present we have assayed eight different primer combinations, which, according to Liang *et al.* (1993), would cover about 10% of the poly A⁺ RNAs expressed in a defined cell type. When the PCR products of these eight primer combinations were displayed on polyacrylamide gels we could clearly identify a total of

268 cDNA bands which appeared in duplicated experiments. The vast majority of them (77%) appeared to be common to spermatocytes and spermatids, while the remaining 62 bands (23%) were differentially expressed. Interestingly, from the differentially expressed bands 46 (74%) were specific for spermatids and 16 (26%) were found only in spermatocytes (Fig. 1 and Table 1). None of the 268 bands appeared in the negative controls without reverse transcriptase, which means that they corresponded to expressed RNAs and not to contaminant DNA.

Twenty-eight cDNA bands of the display, that were clearly stage-specific, were selected for reamplification. As shown by agarose gel electrophoresis (Fig. 2A), almost every band could be reamplified by the procedure. Remarkably, reamplified cDNA bands were in the same size range as the original bands of the display. In a subsequent phase, Northern-blot assays were performed in order to verify the stage-specificity of the amplified

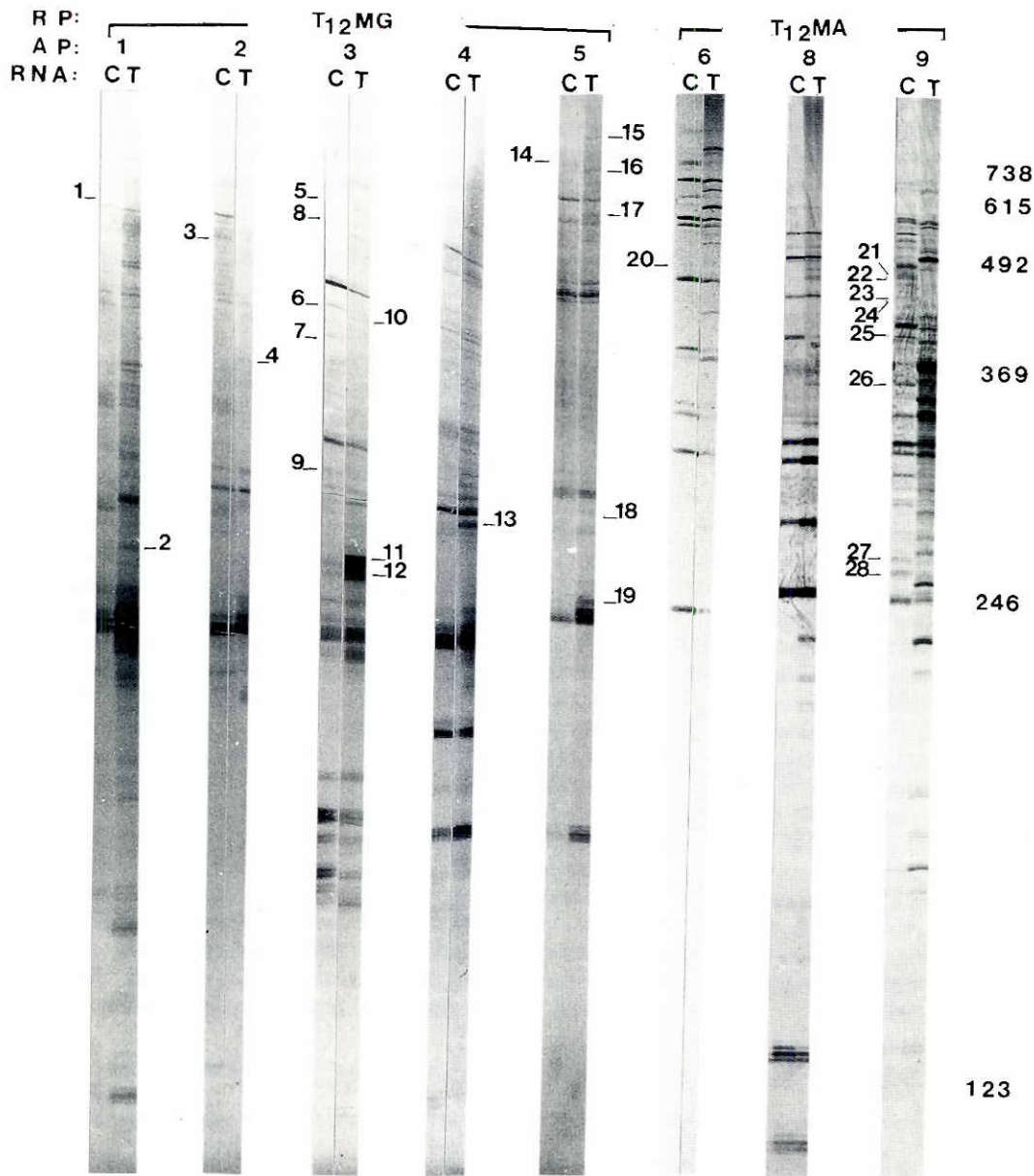


Fig. 1. Differential display of mRNAs from spermatocytes and spermatids using eight combinations of primer sets made of T12MG and T12MA and a group of eight arbitrary decamers. C: spermatocytes; T: spermatids; RP: right primers (i.e., primers for the poly A⁺ tail); AP: arbitrary primers. cDNA bands selected for reamplification are numbered from 1 to 28. A DNA marker (123 bp ladder) was used as molecular weight standard (BRL).

TABLE 1

COMMON AND DIFFERENTIALLY EXPRESSED cDNA BANDS OF SPERMATOCYTES AND SPERMATIDS

right primer	left primer	total number of bands*	differentially expressed bands	spermatocyte-specific bands	spermatid-specific bands
T ₁₂ MG	1	33	2	1	1
T ₁₂ MG	2	20	1	0	1
T ₁₂ MG	3	32	9	5	4
T ₁₂ MG	4	26	4	0	4
T ₁₂ MG	5	19	5	1	5
T ₁₂ MA	6	26	4	1	3
T ₁₂ MA	8	38	8	0	8
T ₁₂ MA	9	74	28	8	20
Totals		268	62	16	46
Percentage from total	100%		23%	6%	17%
Percentage from the differentially expressed bands				26%	74%

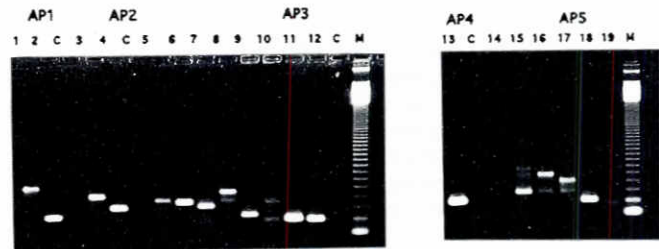
* Only bands clearly distinguishable from the background were considered

bands. Figure 2B shows three examples in which cDNA from spermatocyte-specific (filter a) and spermatid-specific bands (filter b; lanes 1 and 2) were used as a probe. In agreement with the display signals were restricted to the lanes respectively containing RNA isolated from pachytene spermatocytes or round spermatids.

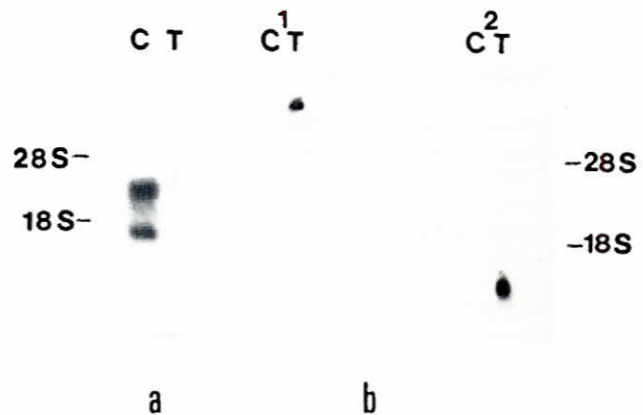
Considered together, the results presented here allow some preliminary conclusions. Our results indicate that the mRNA differential display method is a promising strategy in studies aiming at a large-scale characterization of genes expressed in a complex differentiation process. Interestingly, the number of cDNA bands obtained in the display was within the range as described by Liang and Pardee (1992). The application of this method to spermatogenesis allowed the isolation of several cDNA bands corresponding to mRNAs present in round spermatids but absent from spermatocytes. Thus, these cDNAs in all probability correspond to genes transcribed by the round spermatid (for discussions on the sensitivity of the method see Liang and Pardee, 1992). Concerning the cDNA bands differentially expressed in spermatocytes, more information is needed in order to definitively establish whether the corresponding genes are in fact transcribed by the spermatocyte, or earlier during spermatogenesis. The isolation of a high percentage of spermatid-specific bands as compared to spermatocyte-specific ones is not surprising, and agrees with previous large-scale attempts to isolate spermatogenic specific cDNAs using the differential screening of testis libraries as a strategy (e.g. Thomas *et al.*, 1989; Höög, 1991). Finally, our results lend further support to the notion that active transcription takes place during post-meiotic stages of mammalian spermatogenesis (for reviews see Erickson, 1990; Hecht, 1993). In experiments currently in progress, selected differentially expressed cDNA bands are being sequenced and used as probes in order to obtain full-length clones.

Experimental approaches like the mRNA differential display appear to be well suited for studies aiming at a large-scale identification and characterization of stage-specific spermatogenic proteins. This does not seem to be the case for other strategies,

such as those based on the comparison of the two-dimensional protein spot patterns obtained from two different cell populations. In fact, in previous attempts we had prepared protein fractions from highly purified pachytene spermatocytes and round spermatids, and compared them after separation in a two-dimensional gel system. Despite the fact that clear differences in protein composition were observed between these two spermatogenic stages, the outcome of these experiments was frustrating. For most of the interesting protein spots of the two-dimensional gels it was not feasible to obtain enough material for protein microsequencing or production of polyclonal antibodies. An important limiting factor here is the amount of spermatocytes



A



B

Fig. 2. Characterization of differentially expressed bands. (A) The cDNA bands indicated in the former figure were reamplified and run on three 1.5% agarose gels. The numbers on top of each lane correspond to those of Figure 1. Lanes named C are the negative controls without cDNA for each primer set. The molecular weight standard used (M) was the same as in Figure 1. **(B)** Reamplified cDNA bands #25 (filter a), #2 (filter b; lane 1) and #18 (filter b; lane 2) were labeled with α - 32 PdATP and used as probes in Northern blots. Each lane contains 30 μ g of total RNA from spermatocytes (C) or spermatids (T).

and spermatids that can be isolated from a rat (D. Treichel, M. Alsheimer and R. Benavente, unpublished observations).

Materials and Methods

Obtention of stage-enriched cell populations of rat testis

Wistar rats were obtained from Charles River Wiga (Sulzfeld, Germany). A cell suspension of testicular cells was prepared and submitted to centrifugal elutriation essentially as described (Meistrich, 1977; Meistrich et al., 1981; Heyting and Dietrich, 1991; Smith and Benavente, 1992). Fractions with the highest concentration of pachytene spermatocytes and round spermatids were collected separately. After a centrifugation at 450g for 10 min the cell pellets were washed three times in sterile PBS.

RNA isolation and removal of DNA contamination

Isolation of total RNA was performed with the RNA isolation kit from Stratagene (Heidelberg, Germany). 50 µg of total RNA from pachytene spermatocytes and 50 µg from round spermatids were respectively treated with 10 units of RNase-free DNase I (GenHunter, Brookline, MA, USA) as previously described (Liang et al., 1993), except that 20 units of RNase block I (Stratagene) were added to the incubation mix.

Differential display

The mRNA differential display was carried out in its essentials according to Liang et al. (1993). 0.2 µg of total RNA from pachytene spermatocytes and round spermatids were used for reverse transcription. The cycling parameters were as described, but a 2 min. initial denaturation cycle was included. The amplified cDNAs were displayed on a 6% DNA sequencing gel. All the reverse transcription and PCR reactions were performed in duplicate and the results were compared. In order to demonstrate that the display was independent from chromosomal DNA contamination RNAs were incubated in a reverse transcriptase reaction in the absence of reverse transcriptase followed by PCR reactions for each primer combination. AmpliTaq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). α - 35 S]dATP was obtained from Amersham (Braunschweig, Germany). Further reagents for the mRNA differential display including the oligo-dT primers and the arbitrary decamers 1 to 6, 8 and 9 (GenHunter's denomination) were obtained from GenHunter.

Recovery and reamplification of cDNA probes

The 6% sequencing gel with the displayed cDNA bands was blotted onto a piece of Whatman 3 mm paper, dried, and exposed for up to five days. cDNA bands that appeared to be specific to pachytene spermatocytes or spermatids in duplicate experiments were cut from the acrylamide gel and eluted as described (Liang et al., 1993). Briefly, 4 µl of an eluted cDNA probe were reamplified in a 40 µl reaction volume using the same primer set and PCR conditions as in the differential display, except that the dNTP were at 20 µM and no radioactive isotopes were added. 30 µl of reamplified samples were run in a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. Control reamplification experiments without cDNA were performed for each primer combination.

Northern blot analysis

Reamplified cDNA probes were purified from the agarose gel by means of the Qiaex kit from Qiagen (Chatsworth, CA, USA) and labeled

with α - 32 P]dATP (Amersham) using a Random-Prime DNA labeling kit from Gibco (Eggenstein, Germany). Labeling was performed essentially as instructed except that 1 µl of 10 µM corresponding T12MN primer was included in the reaction. Northern blot analysis was carried out according to Sambrook et al. (1989). Prehybridization and hybridization were done at 42°C in 50% formamide. Washes were carried out twice with 1x SSC containing 0.1% SDS at room temperature and 0.25x SSC containing 0.1% SDS at 55-60°C for 15-30 min. Filters were exposed overnight at -70°C with intensifying screen.

Acknowledgments

We thank Claudio Stern (Columbia University, New York) for suggesting the use of the mRNA differential display, Ulrich Scheer (University of Würzburg) for generous support, Avril Smith (University of Würzburg) for advice with elutriation technique, Cynthia Sevcec (Clemente-Estable-Institute, Montevideo) for technical support, and Klaus Scheller (University of Würzburg) and Lynn Leverenz (University of Wisconsin) for critical reading of the manuscript. The Division of Molecular Biology of the Clemente-Estable-Institute is an Associated Unit of the Faculty of Sciences (Montevideo). Supported by a grant of the EEC (C11-CT92-0034).

References

- ERICKSON, R.P. (1990). Post-meiotic gene expression *Trends Genet.* 6: 264-268.
- HACKSTEIN, J.H.P. (1987). Spermatogenesis in Drosophila. In *Spermatogenesis - Genetic Aspects. Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol. 15 (Ed. W. Hennig). Springer Verlag, Heidelberg, pp. 61-116.
- HECHT, N.B. (1993). Gene expression during male germ cell development. In *Cell and Molecular Biology of the Testis* (Eds. C. Desjardins and L.E. Ewing). Oxford University Press, Oxford, pp. 400-432.
- HEYTING, C. and DIETRICH, A.J.J. (1991). Meiotic chromosome preparation and protein labeling. *Methods Cell Biol.* 35: 177-202.
- HÖÖG, C. (1991). Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* 19: 6123-6127.
- LIANG, P. and 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. and PARDEE, A.B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275.
- MEISTRICH, M.L. (1977). Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol.* 15: 15-44.
- MEISTRICH, M.L., LONGTIN, J., BROCK, W.A., GRIMES, S.R. and MACE, M.L. (1981). Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol. Reprod.* 25: 1065-1077.
- MYERS, R.M. (1993). The pluses of subtraction. *Science* 259: 942-943.
- SAMBROCK, J.M., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- SMITH, A. and BENAVENTE, R. (1992). Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp. Cell Res.* 198: 291-297.
- STERN, H. (1993). The process of meiosis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis* (Eds. C. Desjardins and L.E. Ewing). Oxford University Press, Oxford, pp. 296-331.
- THOMAS, K.H., WILKIE, T.M., TOMASHEFSKY, P., BELLVÉ, A.R. and SIMON, M.I. (1989). Differential gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 41: 729-739.
- WILLISON, K. and ASHWORTH, A. (1987). Mammalian spermatogenic gene expression. *Trends Genet.* 3: 351-355.

ANEXO II

SECUENCIAS INGRESADAS AL GENBANK