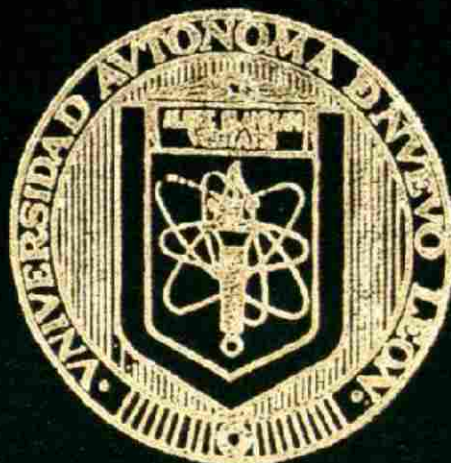


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**TIMOTESTIN, UN PARADIGMA BIOLÓGICO O UNA FISIOLÓGIA
PROGRAMADA: ESTUDIOS *IN VITRO*.**

Por el

M.C. ROBERTO RANGEL OROZCO

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología.

Julio, 2003



U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QP251
.R3
2003
c.1



1080124430



UANL

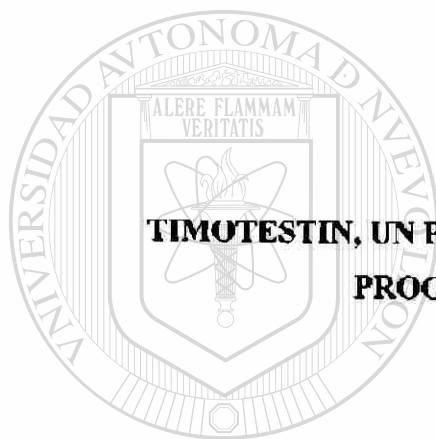
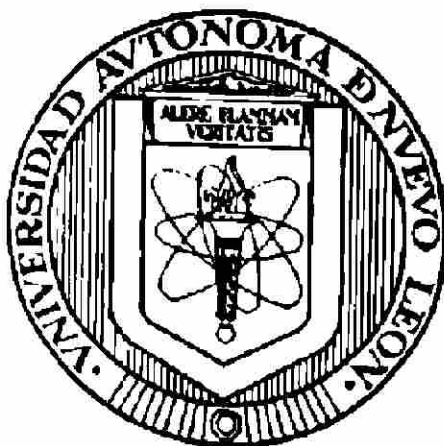
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**TIMOTESTIN, UN PARADIGMA BIOLÓGICO O UNA FISIOLÓGIA
PROGRAMADA: ESTUDIOS *IN VITRO*.**

Por el

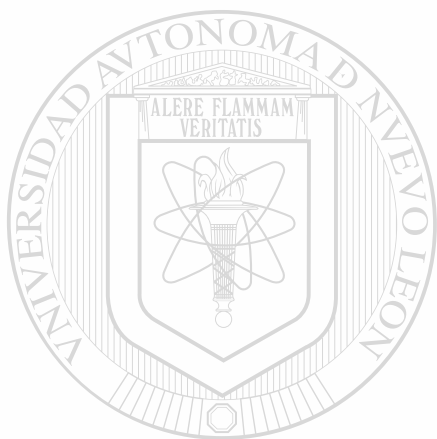
M.C. ROBERTO RANGEL OROZCO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología.

Julio, 2003

TD
QP251
R3
2003



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Directores de Tesis

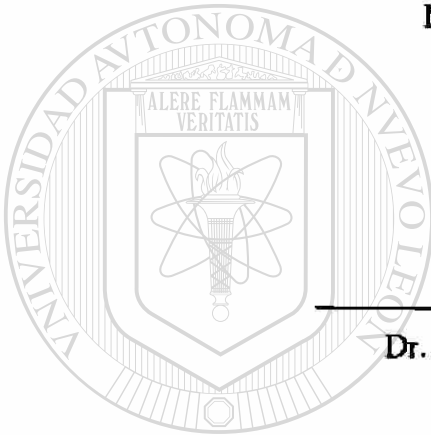


Dr. Héctor Martínez Valdez

Director Externo

Departamento de Inmunología

MD Anderson Cancer Center



Dr. Juan Manuel Alcocer González

Director Interno

Laboratorio de Inmunología y Virología

Facultad de Ciencias Biológicas

UANL

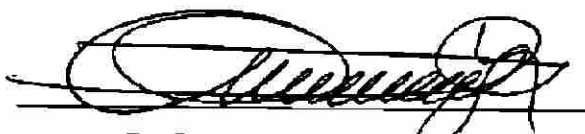


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

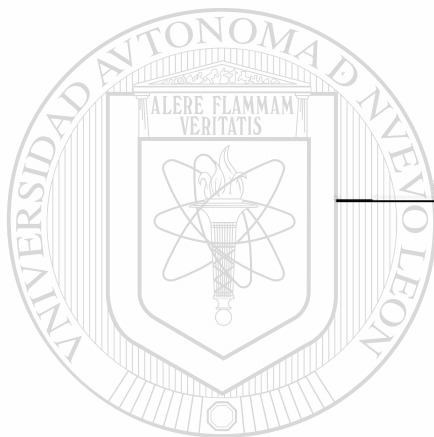
Comité de Examen de tesis:



Dr. Juan Manuel Alcocer González
Presidente



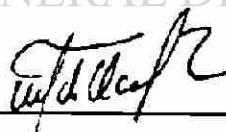
Dr. Hector Martínez Valdez
Secretario



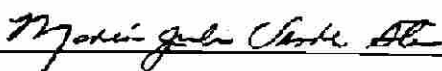
Dra. Diana Reséndez Pérez
Primer Vocal



Dr. Ricardo Gómez Flores
Segundo Vocal

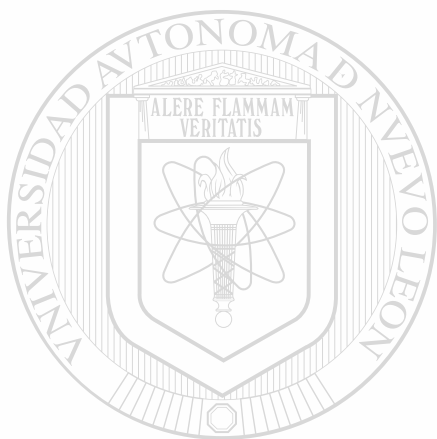


Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Tercer Vocal



Dra. Julia Verde Star
Directora de Postgrado

El presente proyecto de investigación se realizó en colaboración entre el Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y el Departamento de Inmunología de la Universidad de Texas-MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, E.U.A.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



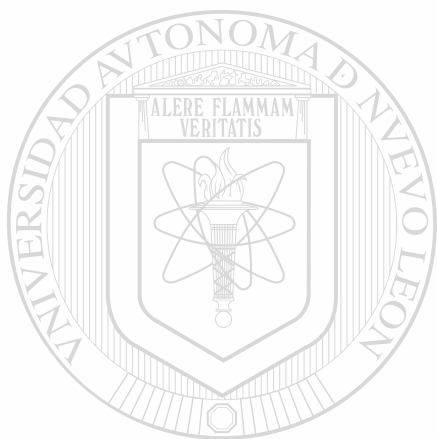
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A Dios

A mi esposa Lilitiana Guzman Rojas, por apoyarme en todo momento y darme la dicha de ser Papá.

A mi hijo Roberto Rangel Guzman, que esta presente en todo momento de mi vida. Los amo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco :

A mis familias Rangel Orozco y Guzman Rojas por apoyarme y entender mis deseos de superación. En todo momento estuvieron conmigo. Gracias.

Al Dr. Héctor Martínez Valdez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y quien contribuyó enormemente en mi carrera científica, gracias por su imagen, confianza, paciencia y afecto.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer Gonzalez, por brindarme la oportunidad de ser su alumno y su ayuda incondicional. Gracias.

Al la Dra. Diana Resendez Perez, al Dr. Ricardo Gomez Flores, y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por su apoyo, críticas y colaboración durante este tiempo. Gracias.

A los Drs. Miles F. Wilkinson, Michael R. Blackburn y Gary Gallick por sus críticas constructivas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los integrantes del laboratorio, a Liliana, Jenny, Connie, Kelly y Cristina, por su ayuda y amistad.

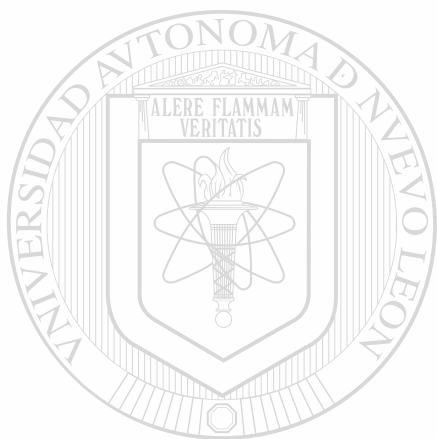
Al Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo brindado.

Al Departamento de Inmunología del la Universidad de Texas-MD Anderson Cancer Center por la facilidades brindadas para realizar este trabajo de investigación.

Al personal de la Sub-Dirección de estudios de Post-Grado de Ciencias Biológicas de la UANL por su amable disposición.

A la fundación Bob R. Smith por la beca doctoral que me otorgó durante la realización de este proyecto de investigación.

Al apoyo económico de la Sociedad de Leucemia y Linfoma (6147-99 ; 6161-03); y a la Sociedad Krause-Davidson por los fondos otorgados para la elaboración de esta tesis doctoral.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



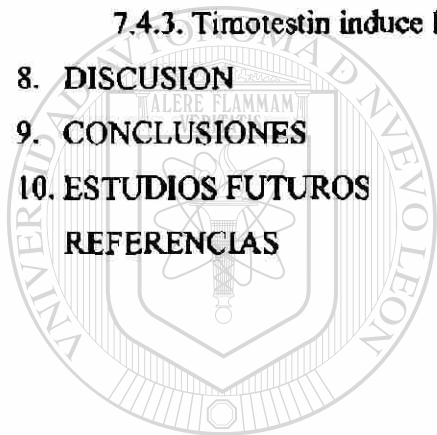
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	18
1.1. El timo	19
1.2. El tejido testicular	21
1.3. Embriogénesis del sistema inmune y reproductor	23
1.3.a. Sistema inmune	23
1.3.b. Organos reproductores	24
1.4. Proteínas tirosinas cinasas de la familia Src	24
1.4.a. Tirosina cinasa pp60 c-src	25
1.5. Un mecanismo molecular común	26
2. ANTECEDENTES	27
3. HIPOTESIS DEL TRABAJO	29
4. IMPORTANCIA, JUSTIFICACION Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO	30
5. OBJETIVOS	32
5.1. Objetivo general	32
5.2. Objetivos específicos	32
6. MATERIAL Y METODOS	35
6.1 Plásmidos	35
6.2 Reactivos moleculares	35
6.3 Líneas celulares	36
6.3.1. Transfecciones	36
6.4 Anticuerpos	37
6.5. Animales	38
6.5.1. Ratones hipofectomizados	38
6.5.2. Protocolo de inmunización y purificación celular	38
6.6. Aislamiento de ARN total de diferentes tejidos murinos	39
6.7. Purificación celular mediante citometría de flujo	41

6.8. Clonación, secuenciación y caracterización de las clonas	41
6.9. Northern blot y radiomarcaje de sondas	41
6.10. Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	43
6.11. Southern blot	44
6.12. Hibridación <i>in situ</i>	45
6.13. Transcripción/traducción <i>in vitro</i> y SDS-PAGE	48
6.14. Western blot	50
6.15. Programas analíticos	51
6.16. Citocentrifugación celular y microscopía de fluorescencia	52
6.17. Tamizaje de fosforilación (phosphospot)	52
6.18. Ensayo de inmunocomplejos cinasas.	54
6.19. Aislamiento de la fracción del citoesqueleto y citosol	55
7. RESULTADOS	56
7.1. Relevancia de timotestín durante los estadios embrionario, fetal, post-natal y adultos del sistema inmune y reproductor	56
7.1.1.a. Timotestín se expresa durante etapas embrionarias	56
7.1.1.b. Timotestín se expresa en tejidos hematopoyéticos y linfoides durante etapas fetales y adultas	58
7.1.2. Análisis de expresión de timotestín en el sistema inmune	60
7.1.2.a. Timotestín se expresa principalmente en timocitos maduros localizados en la médula del timo	60
7.1.2.b. La expresión de timotestín es antígeno-independiente y exclusiva de la maduración intratímica	64
7.1.3. Análisis de expresión de timotestín en tejido reproductor	67
7.1.3.a. Timotestín se expresa selectivamente en tejido testicular	67
7.1.3.b. Timotestín se expresa en células germinales	68
7.1.3.c. Timotestín se expresa en estadios críticos de la espermatogénesis	69
7.1.3.d. Regulación hormonal sobre la expresión de timotestín	71

7.2. Propiedades estructurales de la proteína timotestín	74
7.2.1. Identificación de los motivos que deducen la localización subcelular y sugieren su relevancia funcional	74
7.2.2. Timotestín es una proteína con una masa molecular de 102 kilo Daltons (kda)	78
7.3. Confirmación de que timotestín se localiza en la membrana celular	80
7.4. Función de timotestín	81
7.4.1 Timotestín activa la proteína tirosina cinasa pp60 c-src	82
7.4.2. Timotestín se co-localiza e interacciona con la proteína tirosina cinasa pp60 c-src en la superficie de linfocitos T	86
7.4.3. Timotestín induce la translocación de pp60 c-src hacia el citoesqueleto	89
8. DISCUSION	92
9. CONCLUSIONES	103
10. ESTUDIOS FUTUROS	104
REFERENCIAS	105



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Timotestín se expresa durante la embriogénesis	57
2	Distribución tisular de timotestín en tejidos embrionarios y adultos	59
3	Timotestín se expresa en linfocitos CD3 ⁺ de timo	62
4	Expresión de timotestín por distintas subpoblaciones de timocitos maduros	63
5	Timotestín se expresa en timocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺	64
6	La expresión de timotestín es antígeno-independiente	66
7	Expresión selectiva de timotestín por el tejido testicular	67
8	Timotestín se expresa selectivamente en espermatozoides	69
9	La expresión de timotestín con la espermatogénesis del ratón	71
10	La hormona luteinizante favorece la expresión de timotestín en testículo	73
11	Secuencia de aminoácidos de la proteína timotestín	77
12	La proteína timotestín tiene una masa molecular de 102 kDa	79
13	Timotestín se localiza en la membrana de células K562	81
14	Análisis de expresión de la proteína GFP en células K562	81
15	Timotestín activa la caseína cinasa II y la proteína tirosina cinasa c-src	83
16	Análisis de expresión y fosforilación de la proteína tirosina pp60 c-src	86
17	Timotestín y la proteína tirosina cinasa pp60 c-src, interaccionan físicamente	88
18	Timotestín y la proteína pp60 c-src se localizan en forma polar en la membrana de la línea celular Jurkat que expresa la proteína recombinante	89
19	Timotestín transloca la proteína cinasa c-src hacia el citoesqueleto	91

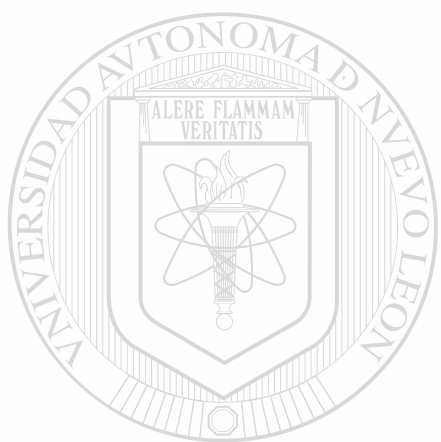
LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Página
1 Organización celular del timo	60
2 Protocolo de inmunización	65
3 Cronología de la maduración de células germinales masculinas murinas	70
4 Control de la espermatogénesis por hormonas del eje hipofisario-testicular	72
5 Modelo hipotético de la proteína timotestin en timocitos y células germinales	78
6 Tamizaje comercial para proteínas cinasas	82
7 Representación gráfica de la proteína tirosina cinasa pp60 c-src y sus principales características fisicoquímicas y biológicas	84
8 Modelo hipotético de interacción entre la proteína timotestin y la tirosina cinasa pp60 c-src	87
9 Timotestin representa un vínculo de unión entre dos fisiologías distintas mediante un mecanismo común: migración asociada a maduración celular	93
10 Representación gráfica de los eventos de migración y maduración de los órganos linfoides y reproductores durante la embriogénesis	99
11 Mecanismo de acción hipotético de la proteína timotestin en los eventos de migración celular	102 [®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Aminoácidos de la proteína timotestin con una alta probabilidad de fosforilación	76



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

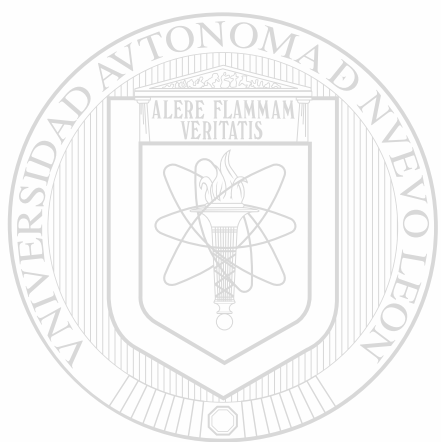


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
CD	Grupo de diferenciación
cm	Centímetro
Ci	Curie
c-src	Contraparte del virus del sarcoma de Rous
gr	Gramos
G418	Gentamicina
Kb	kilo base
KDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molaridad
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional de Información y Biotecnología
nt	Nucleotidos
ORF	Marco de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
pI	Punto isoeléctrico
pp60	Proteína de 60 Kda
P.M.	Peso molecular

RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundo
TEMED	N',N',N',N', Tetrametiletilendiamino
Tm	Temperatura de apareamiento
V	Volts
W	Watts



UANL

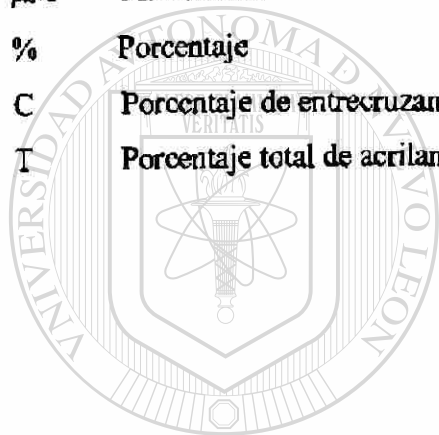
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE SIGNOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
μ	Micra
μgr	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentaje
C	Porcentaje de entrecruzamiento de la acrilamida
T	Porcentaje total de acrilamida



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Roberto Rangel Orozco

Fecha de Graduación: Julio 2003

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: TIMOTESTIN, UN PARADIGMA BIOLÓGICO O UNA FISIOLÓGIA PROGRAMADA, ESTUDIOS *IN VITRO*.

Número de páginas: Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Microbiología

Area de Estudio: Inmunología

Propósito y Método del estudio: La migración celular es un proceso altamente regulado que se presenta tanto en etapas embrionarias como en estadios adultos. Nuestros estudios se enfocan sobre los mecanismos moleculares implicados en la migración celular asociada a la maduración y diferenciación. Los modelos biológicos donde estos mecanismos operan están representados principalmente por el sistema inmune y el reproductor. En este contexto, el descubrimiento de la molécula timotestin por nuestro laboratorio y la observación de que su expresión es casi exclusiva de los timocitos y de las células germinales, proporciona un modelo de estudio idóneo. En el presente trabajo, hemos determinado los dominios funcionales de timotestin, determinando su localización subcelular y confirmando su asociación fisicoquímica con moléculas relevantes en la actividad del citoesqueleto y analizado su función.

Contribuciones y Conclusiones: Nuestro modelo de estudio establece que la proteína timotestin representa un mecanismo común de maduración y diferenciación que opera tanto en el sistema inmune como en el aparato reproductor. Timotestin es una proteína de membrana que activa en forma polar la proteína tirosina cinasa pp60 c-src e induce su translocación hacia el citoesqueleto para activar los mecanismo de polimerización de actina y favorece la migración celular mediante la formación de filopodia y lamelopodia. En resumen, timotestin representa un nuevo vínculo entre el sistema inmune y reproductor mediante un mecanismo común: "migración asociada a maduración celular".


Dr. Hector Martínez-Valdez

Director externo

Dr. Juan Manuel Alcocer González

Director interno

1. INTRODUCCION

El sistema inmune y el reproductor comparten propiedades que incluyen parámetros histológicos y funcionales. Por ejemplo, la organización histológica del timo y el microambiente testicular exhibe estructuras que son análogas a ambos sistemas, en los que se pueden identificar una corteza y una médula, donde las células inmuno-competentes y germinales migran y maduran respectivamente. Mientras que en el timo existen células epiteliales especializadas y células dendríticas que nutren y mantienen la maduración, diferenciación y selección del repertorio de timocitos funcionales, de manera análoga, el tejido testicular cuenta con las células de Leydig y sertolli. Ambos sistemas dependen y responden a factores extracelulares de crecimiento y diferenciación celular en la forma de citocinas y hormonas. Mas aún, la diferenciación intra-tímica y testicular, así como la exportación del repertorio funcional, depende de la motilidad, polarización, y migración celular (Dynn, 1994; Prockop S., et al., 2000). Estas funciones dependen de señales extracelulares quimiotácticas que son transducidas vía ligando-receptor y ejecutadas por proteínas del citoesqueleto.

El estudio de estas funciones representa un paso importante para entender los mecanismos moleculares que regulan la migración celular durante la maduración intratímica y testicular. Con este fin es necesario analizar con detalle los factores que determinan la motilidad, la exportación y la fisiología de cada sistema por separado.

1.1. El timo.

El timo tiene como función generar linfocitos T maduros e inmunocompetentes mediante un proceso dependiente de la motilidad, polarización y migración celular. Además de los timocitos que se pueden identificar en varios estadios de diferenciación, el timo está constituido por distintos linajes celulares que incluyen fibroblastos, células epiteliales tímicas (TECs), células dendríticas, y macrófagos. La migración de los timocitos depende del estadio de diferenciación, y consecuentemente determina su distribución intra-tímica. Por ejemplo, en la región subcapsular se concentran las células progenitoras de los timocitos (pro-T: $CD4^-$, $CD8^-$, $CD3^-$) que provienen de médula ósea. Las células pro-T migrarán a la corteza del timo, donde maduran y se convierten en precursores doble positivos (Pre-T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$). Las células pre-T posteriormente se diferencian y se convierten en linfocitos T cooperadores ($CD4^+$, $CD8^-$) o citotóxicos ($CD4^-$, $CD8^+$). Finalmente el repertorio inmunocompetente $CD4^+$ y $CD8^+$ es seleccionado en función de su afinidad y avidéz por el antígeno asociado al complejo de histocompatibilidad clase II y I respectivamente, y subsecuentemente los timocitos son exportados a la periferia (Janeway C.A. et al., 1997, William P.E. 1999).

Dentro del microambiente histológico del timo existen gradientes de fibronectina y de quimiocinas que favorecen la migración de los linfocitos hacia los diferentes áreas y estadios de maduración (Anderson G., et al., 2000, Crisa L. et al., 1996), por lo que la motilidad celular dentro del timo, requiere de un control específico sobre la expresión y distribución de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas. Tal distribución está mediada por la polarización de los timocitos, que presentan una morfología con dos compartimientos celulares, la zona frontal y el uropodio. Esta estructura es resultado de la organización de los

filamentos de actina y de la activación de integrinas, que ocurre como consecuencia de la fosforilación dependiente de cinasas de adhesión focal (FAK). En la zona frontal, se concentran receptores responsables de la detección de gradientes de factores quimiotácticos presentes en el microambiente. El uropodio, es la zona en donde se acumulan las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) ICAM-1, -2, y -3, CD43, CD44, tubulina, miosina II, y las proteínas de unión a actina, que incluyen a la familia de la ezrina-radixina-moesina (ERM). Esta reorganización del citoesqueleto facilita la migración de los linfocitos a través de los órganos linfoides primarios y secundarios (Serrador J.M. et al., 1999, Arpin M., et al. 1994, Tsukita S., et al 1997, Del Pozo M.A. et al., 1999).

La compartimentalización de CD43, CD44, e ICAMs esta mediada por las proteínas ERM, las cuales poseen dos dominios funcionales: (a) La región amino-terminal que interacciona con motivos intracitoplasmáticos de receptores membranales y (b) El dominio carboxil-terminal que tiene estructuras hélices alfa espiral-espiral que favorecen la interacción con proteínas del citoesqueleto, y forma un puente de unión con los receptores membranales. Estas propiedades definen a la familia ERM como proteínas adaptadoras y acarreadoras que reorganizan la estructura celular. Estas moléculas se localizan en la membrana celular en un estado inactivo, pero al ser fosforiladas la conformación estructural de las hélices alfa espiral-espiral son expuestas y pueden unirse a proteínas del citoesqueleto o dimerizarse. Por tal razón, la regulación de estas proteínas a nivel de transcripcional, traduccional y post-traduccional es clave, ya que ello determina la efectividad de la migración de linfocitos a través de diferentes regiones histológicas en los órganos linfoides.

1.2. El tejido testicular.

En forma análoga a la diferenciación intra-tímica, la motilidad, polarización y migración celular juegan un papel clave en fisiología testicular. La maduración intra-testicular comparte con la función intra-tímica mecanismos moleculares que traen como consecuencia la generación de células germinales funcionales. La maduración y diferenciación de las células progenitoras y precursoras de espermatozoides se llevan a cabo en los túbulos seminíferos, los cuales están formados por una membrana basal (análoga a la corteza del timo) que se encuentra tapizada, por células germinales (progenitoras) totipotenciales llamadas espermatogonias que dan origen a los precursores de los espermatozoides o espermatocitos y finalmente a los espermatozoides, los cuales migran hacia el lumen (también un reflejo de la médula en el timo) del túbulo. La motilidad y migración celular asociada a la maduración intra-testicular está mediada por señales extracelulares provenientes de factores solubles secretados por las células de Sertoli, que funcionan como células nodrizas responsables de mantener la maduración y diferenciación de progenitores y precursores de células germinales. En el espacio intersticial de los túbulos se encuentran las células de Leyding, que son las encargadas de producir las hormonas[®] necesarias para la maduración intra-testicular (Parker K.L., et al., 1999, Verhoeven G., 1999).

El espermatozoide es una célula haploide que posee proteínas compartimentalizadas en regiones como es la cabeza, zona intermedia y la cola. La cabeza del espermatozoide está constituida por el núcleo, que contiene la información genética, y el caliz que contiene enzimas acrosomales y proteínas del citoesqueleto como CLIP50 y calinina, que tienen la propiedad de unirse a actina-F para favorecer su estructura (Tarsounas M., et al., 2001,

Lecuyer C., et al., 2000). La cola del espermatozoide está constituida por estructuras de tubulina, y por una compleja red de proteínas del citoesqueleto formando el axonema, que esta constituido por fibras densas externas y por una capa fibrosa, que constituyen principalmente el motor del flagelo. Durante la espermatogénesis el ensamblaje del flagelo es un proceso complejo, que requiere la expresión secuencial de genes que codifiquen para proteínas del citoesqueleto, cuya expresión regulada induce al espermatozoide a migrar hacia el lumen del túbulo seminífero. Dentro de estas moléculas se encuentran los filamentos intermediarios como FS39, que tienen propiedades que favorecen las interacciones proteína-proteína, mediante sus dominios espiral-espiral y fungen como sitios de dimerización para formar estructuras sólidas en las capas fibrosas (Catalano R.D., et al., 2001). Estos mecanismos están regulados por procesos de fosforilación dependientes de proteínas cinasas, como la cinasa AKAP82 que tiene dominios zipper de leucina, y señales de anclaje a capas fibrosas (Johnson L.R. et al., 1997). Los dominios zipper de leucina, también se presentan en proteínas como Stap, Spag4 y Spag5, que se expresan selectivamente en la cola del espermatozoide y favorecen la rigidez de las fibras densas externas (Ohuchi J., et al. 2001, Shao X., et al 2001). Consistente con la fisiología del timo estas moléculas también están involucradas en la función mecánica de la motilidad y migración celular asociada a la maduración y diferenciación intra-testicular, que ocurre como respuesta a señales extracelulares del microambiente. Además en ambos sistemas de maduración, los timocitos y las células germinales están sujetas a adhesión, polarización y migración y tales mecanismos están regulados por la fosforilación de proteínas cinasas y proteínas del citoesqueleto.

1.3. Embriogénesis del sistema inmune y reproductor.

La migración celular es un proceso biológico altamente regulado que se presenta desde etapas embrionarias y perdura toda la vida. Durante la embriogénesis existe un alto grado de proliferación y migración celular asociado a la maduración, que permite a las células progenitoras transitar dentro de las diferentes estructuras anatómicas para establecerse y secretar factores que influyen en la formación del órgano. Durante estas etapas de la vida se lleva a cabo la formación del timo fetal, las gónadas y otros órganos en donde la migración de células hematopoyéticas y células germinales primordiales respectivamente, juega un papel importante en la formación y maduración de estos órganos.

1.3.a. Sistema inmune.

En el embrión murino, el timo se deriva del mesodermo y células crestales neurales del tercer y cuarto arco faríngeo formándose el timo rudimentario. Posteriormente entre el día 11-11.5 de gestación (días post-coitum: dpc), el timo es invadido por precursores linfoides que provienen de órganos hematopoyéticos fetales y a éste fenómeno se denomina la primera onda de colonización. En el día 12.5 se inicia la organogénesis del timo y aproximadamente en el día 15 empiezan a producirse los primeros timocitos en el timo fetal. Finalmente en el día 17 empiezan los timocitos a localizarse en la corteza y médula del timo (Ritter M.A. et al., 1992 y Manley N. R. et al., 2000). Los órganos hematopoyéticos fetales mas importantes son el saco vitelino y el hígado fetal, que producen las células responsables de colonizar los órganos linfoides. También durante la vida fetal, la médula ósea se desarrolla y se convierte en la principal productora de células de origen hematopoyético en etapas post-natales y adultas.

1.3.b. Organos reproductores.

Al mismo tiempo que ocurre la organogénesis del timo en el ratón, también se lleva a cabo la formación de las gónadas fetales indiferenciadas, éstas se derivan de los conductos urogenitales del mesodermo intermediario. Durante los días 10 y 11 se lleva a cabo la primera onda de colonización en los conductos genitales, por células germinales primordiales que provienen del epitelio endodérmico del saco vitelino y migran hacia los cordones sexuales primarios. La determinación sexual se puede distinguir en el día 13.5, en donde las células germinales primordiales se convierten en espermatogonias y las células de Sertoli que se originan de los cordones sexuales, y subsecuentemente forman parte del lumen en el túbulo seminífero. En la etapa post-natal y adulto, las células primordiales germinales maduran en los túbulos seminíferos iniciándose la producción de células germinales competentes para la fecundación del óvulo (McLaren A. 2000 y Parker K.L., et al. 1999).

1.4. Proteínas tirosina cinasas de la familia Src.

La familia de las proteínas tirosina cinasas Src, está constituida por las enzimas Fyn,[®] Hck, Fgr, Lck, Lyn, Syc, Src, y Yes que se localizan asociadas a lípidos en la membrana celular. Algunas de estas cinasas se detectan desde la embriogénesis y se conservan en etapas adultas en células del sistema inmune y reproductor. La característica estructural conservada entre estos miembros son los dominios homólogos Src 2 (SH2) y 3 (SH3), estos dominios contienen residuos de tirosina que regulan la actividad biológica de la proteína. La fosforilación de la tirosina (527) en el dominio SH3, inactiva la función catalítica de la enzima, pero la defosforilación de este aminoácido (Y-527) y la fosforilación de la tirosina

(416) en el dominio SH2, induce un cambio conformacional en la proteína que favorece la actividad catalítica de la enzima para fosforilar los sustratos protéicos (Hubbard S.R. et al., 2000).

1.4.a. La Tirosina cinasa pp60 c-src.

En la familia cinasa src, uno de los miembros mas involucrados en los mecanismos de motilidad celular es la tirosina cinasa pp60 c-src. Esta cinasa se expresa desde la gastrulación y se conserva en etapas fetales y adultas. La función enzimática de la cinasa c-src esta regulada por fosforilación de tirosinas, inducida por la formación de complejos protéicos en la superficie celular (Zhu, D. et al.1998; Avizienyte E. et al., 2002; Sanjay A., et al., 2001; Brandt D., et al., 2002; Bernard O., et al., 2001; Mariner D.J. et al., 2001; Owens D.W. et al., 2000). La capacidad de esta cinasa para inducir el rearrreglo en la arquitectura celular, está regulada por su translocación hacia el citoesqueleto. En el citoesqueleto la pp60 c-src fosforila la proteína cortactina e induce la polimerización de filamentos de actina y facilita la formación de complejos proteicos conocidos como contactos focales de adhesión celular,[®] constituidos por proteínas como paxilina, proteína 130 Cas, talina y proteínas relacionadas a actina (ARP 2/3). La adhesión y la polimerización de actina favorecen la formación de filopodia y lamelopodia estructuras claves en etapas tempranas de la migración celular (Weernink P.A. et al., 1995; Weed S.A., et al. 1998; McNieven M.A. et al., 2000; Kralisz U. et al., 2000; Weed S.A. et al, 2000).

1.5. Un mecanismo molecular común.

La influencia, intercomunicación y dependencia recíproca entre las gónadas y el timo no es ni novedoso ni sorprendente (Glucksman A. et al 1968, Pearce P., et al. 1981, Grossman C., 1984, Greenstein B., et al. 1986 y Wise T., et al 1991). Tanto la influencia de los esteroides derivados de las gónadas sobre la maduración intra-tímica, como el efecto de péptidos bioactivos del timo sobre la función gonadal, están ampliamente documentados (Yee J. B., et al 1985, Gorospe W.C., et al 1988, Uzumcu M., et al. 1994, Pedernera E., et al. 1986, Aguilera G., et al 1989, Reyes-Esparza J.A. et al. 1989, Martin D., et al. 1992 y Watson M.E., et al. 1994). En este contexto, los datos hasta ahora acumulados proponen que la maduración y diferenciación de los timocitos y de las células germinales, no solamente tienen paralelos funcionales y complementarios, sino que además sugieren que las señales extra e intra-celulares que determinan la generación y selección de células funcionales en ambos sistemas, es controlado por mecanismos moleculares comunes.

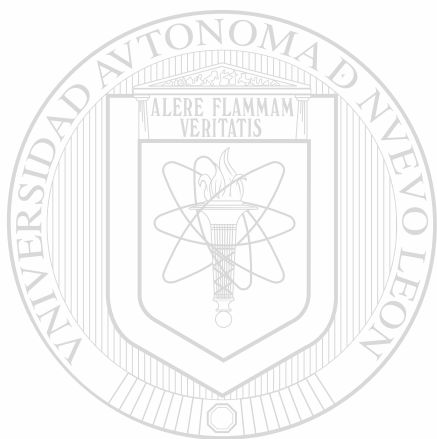
En completo acuerdo con ésta hipótesis, nuestro grupo identificó una nueva molécula, a la cual hemos designado el nombre de timotestin. Nuestra hipótesis de trabajo postula que timotestin representa el vínculo molecular común en los mecanismos responsables de motilidad, polarización, y migración celular asociados a la maduración, diferenciación y selección intra-tímica y testicular. El objetivo principal de la presente propuesta de tesis doctoral es determinar *in vitro* la relevancia fisiológica de timotestin.

2. ANTECEDENTES

Nuestro grupo estudia los mecanismos que regulan la migración celular asociada a la maduración y diferenciación de los linfocitos. Con este fin, diseñamos una estrategia experimental para detectar la expresión diferencial (differential display) de moléculas durante estadios distintos de la diferenciación de linfocitos. En forma resumida el método consiste en aislar por citometría fluorescente (FACS) multi-paramétrica (determinada por marcadores de fenotipo) de subpoblaciones celulares, de las cuales se extrae el ARNm que subsecuentemente se somete al análisis de expresión diferencial por RT-PCR, utilizando oligonucleótidos degenerados (primers) diseñados a partir de secuencias de genes, pertenecientes a familias de receptores/ligandos y factores de transcripción (gene family motif differential display). Esta estrategia experimental condujo al descubrimiento nuevos genes humanos (Guzman-Rojas L. et.al 2000, Siddiqa A. et.al 2001), cuya caracterización funcional se lleva a cabo en el momento actual.

La identificación de timotestín ocurrió como consecuencia natural de la aplicación de experimentos similares, llevados a cabo durante el tamizaje de bancos de ADNc murinos.® Timotestín se expresa selectivamente en timo, bazo, ganglios linfáticos y testículos (de donde se origina su nombre). El ADNc de timotestín presenta un marco de lectura (ORF) de 2724 pares de bases, que codifican para una proteína de 908 aminoácidos, con un peso molecular de 102 KDa. Análisis de su estructura mediante una búsqueda BLAST-P del banco de datos (National Center for Biotechnology Information [NCBI]), indican que timotestín posee en su región carboxil-terminal, identidad significativa con tropomiosina, filamentos intermediarios, miosina y con la familia Ezrin-Radixin-Moesin (ERM). A nivel de estructuras secundarias,

timotestín contiene dominios hélices alfa espiral-espiral, los cuales son comunes a moléculas involucradas en la motilidad y migración celular. Análisis adicionales indican que timotestín posee dos sitios transmembranales en la región amino terminal, lo que sugiere que es una proteína que se expresa en la superficie celular. Además se identificó un dominio zipper de leucina en la región carboxil-terminal, que conjuntamente con estructuras hélices-alfa espiral-espiral, indica que timotestín interacciona con otras proteínas.



UANL

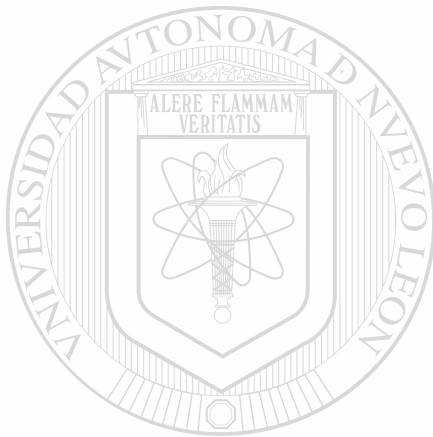
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.HIPOTESIS DE TRABAJO

En conjunto estos datos sugieren que timotestin, es una proteína asociada a la membrana celular, que potencialmente puede jugar el papel de receptor, ligando o transductor intermediario de señales intracelulares (segundos mensajeros) mediante la interacción con otras proteínas y cuya función puede ser clave para la motilidad, polarización y migración celular asociada a la maduración y diferenciación celular.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



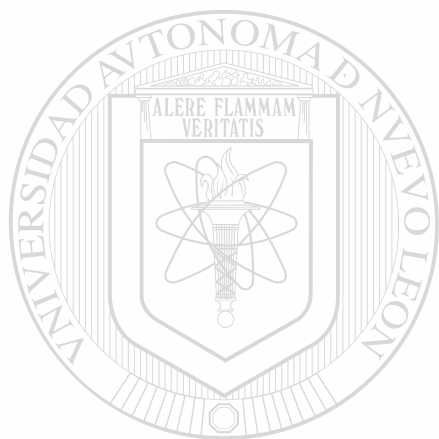
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4. IMPORTANCIA, ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

El descubrimiento de timotestín y su restringida distribución tisular, representa una confirmación experimental de los paralelos fisiológicos, que existen entre los programas de maduración del timo y el tejido testicular. La importancia y la relevancia biológica se derivará de los estudios enfocados en determinar su función, primeramente *in vitro* y subsecuentemente *in vivo*. Los estudios propuestos permitirán determinar, si los mecanismos moleculares que operan en maduración de células inmunocompetentes son comunes, a aquellos responsables de la generación de células germinales funcionales. El entendimiento de estos mecanismos representa un paso importante para evaluar los programas biológicos, que regulan la migración y maduración de células asociados a la función inmune por un lado, y la reproductora por el otro.

El descubrimiento de timotestín, *per se*, representa un fenómeno original, no solamente por que se trata de la identificación de una nueva molécula, sino porque su estudio y la determinación de su función ofrece una oportunidad biológica clave, que nos permitirá entender y establecer un vínculo molecular sobre la influencia, la dependencia y la intercomunicación que existe entre el timo y las gónadas. En apoyo a nuestra hipótesis de trabajo, los datos experimentales hasta ahora generados están en completo acuerdo con la literatura y sugieren que lejos de ser un paradigma biológico, timotestín representa un mecanismo común programado por la naturaleza para garantizar la efectividad de dos funciones críticas: inmunidad y reproducción.

Por tal motivo consideramos que existe el raciocinio y la justificación necesarios para caracterizar y determinar la función de timotestin, como se propone en el presente anteproyecto. Esta investigación tiene como objetivo ulterior, aportar nuevos conceptos dentro del contexto de la maduración, diferenciación y selección celular, los cuales pueden ser útiles para sentar la bases y estimular el estudio de moléculas, que se expresan en tejidos histológicamente distintos, pero cuya fisiología converge en mecanismos comunes.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL :

Determinar el mecanismo molecular y funcional de timotestín en el sistema inmune y reproductor

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

5.2.1. Establecer la relevancia de la expresión de timotestín dentro del sistema inmune y el reproductor.

5.2.1.1. Analizaremos el significado de la expresión de timotestín en el sistema inmune y reproductor, durante los estadios embrionario, fetal, post-natal y adulto.

5.2.1.2. Determinaremos cuales son las células responsables de la expresión de timotestín tanto en el tejido linfoide como el testicular, mediante el análisis de los niveles de ARN mensajero (mRNA) en subpoblaciones de células y/o preparaciones histológicas.

5.2.1.3. Compararemos la expresión de timotestín en el tejido reproductor femenino y masculino.

5.2.1.4. Determinaremos: (a) la influencia del antígeno en la expresión timotestín por linfocitos maduros dentro de los órganos linfoides secundarios; y (b) la influencia del eje hipotálamo-hipofisario-testicular en la expresión de timotestín por las células germinales.

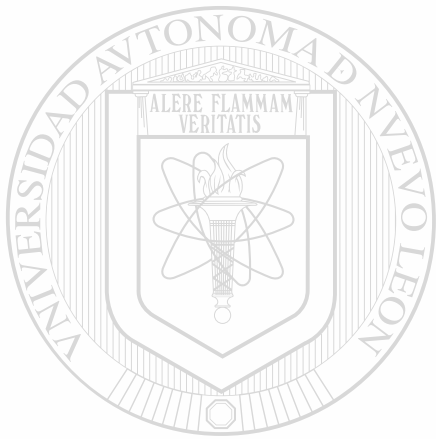
5.2.2. Estudiar las propiedades moleculares de la proteína timotestín y evaluar las secuencias críticas que pueden determinar su estructura, expresión sub-celular y función.

5.2.2.1 Analizaremos la estructura proteica de timotestín contra los modelos existentes en los bancos de datos, con el fin de identificar motivos claves de la secuencia de timotestín que potencialmente la asocien a grupos o familias de proteínas cuya función es conocida.

5.2.2.2 Fusionaremos a timotestín con marcadores moleculares como Flag y/o la proteína verde fluorescente (GFP), e investigaremos su expresión funcional y localización sub-celular en células transfectadas (transiente o estable), mediante inmunohistoquímica,[®] FACS, microscopía fluorescente y western blots.

5.2.3. Establecer *in vitro* la relevancia fisiológica de la expresión de timotestín.

5.2.3.1. Determinaremos la función de timotestín utilizando células transfectadas y mediante tamizajes de fosforilación, los resultados serán confirmados por análisis convencionales: western blots, inmunoprecipitación de complejos-cinasas, microscopía de fluorescencia y fraccionamiento subcelular.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados para subclonar el marco de lectura de timotestín fueron el pEGFP-N3 (Clontech, Palo Alto CA., USA), β -actin-CMV/Tag4a, pBK-CMV (Stratagene, La Jolla CA., USA), pCR-TOPOII, pcDNA3.1 Myc-HistA (Invitrogen, Carlsbad CA. USA), pCITE 2A (Novagen, Madison, WI., USA), y pME18S-Neo (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA). Cada uno de estos plásmidos fué transformado en bacterias competentes (TOP10, DH5 α) mediante choque térmico a 42°C. Posteriormente se realizaron preparaciones de plásmido a gran escala mediante el uso de columnas de afinidad comerciales (QIAGEN, Valencia CA., USA), y gradientes de cloruro de cesio (Sambrook, et.al. 1989).

6.2 Reactivos moleculares

Para llevar a cabo las técnicas de biología molecular y obtener los plásmidos recombinantes se utilizaron diversos reactivos moleculares. Las enzimas de restricción utilizadas fueron AseI, BamHI, ClaI, DraIII, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, MluI, NotI, SacI, SalI, SnaBI, XbaI, y XhoI (Roche Molecular Biochemicals, Indiana IN., USA). La enzima Gelasa se utilizó para la purificación de fragmentos de ADN (Epicentre Technologies, Madison WI., USA). La ligasa ADN T4, Transcriptasa reversa (Superscript II RnasaH-), Oligo dT₁₂₋₁₈, 0.1 M DTT, inhibidor de RNasa se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA., USA. Para la subclonación de productos de PCR, se utilizó el sistema PCR-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA). El sistema comercial para

radiomarcas fragmentos de ADN fue Multiprime (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ. USA). Northern blot comercial (MTN- Mouse embryo, número de catálogo 7763-1) de la casa comercial Clontech. Estuche de revelado de quimioluminiscencia (Supersignal) de la compañía PIERCE, Rockford Illinois, USA.

6.3 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para las transfecciones fueron las siguientes: K562 (Línea celular humana de origen eritroide CD43+, CD7+) se cultivó en medio Dulbecco's CRPMI con 10% de suero bovino fetal (GIBCO BRL-Invitrogen Inc.). La línea celular Jurkat (linfoma de células T Humana, CD3+) se mantuvo en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal a una densidad de 5×10^5 células por ml en su fase exponencial. Todas las líneas celulares se les cambió el medio de cultivo cada 2-3 días y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

6.3.1. Transfecciones

Las células fueron transfectadas mediante electroporación (Electroporador, BIO-RAD, Hercules CA., USA) y liposomas (DOTAP, Roche Molecular Biochemicals). Para la electroporación se utilizaron 5×10^6 células en un volumen de 0.8 ml de PBS pH 7.4 y se adicionaron 20 µg de plásmido linealizado, la mezcla se colocó en una cuveta de electroporación y se incubó por 10 minutos en hielo. El shock eléctrico fue de 0.250V, 0.950 µF (K562) y 0.350 V, 0.950µF (Jurkat). Las células se incubaron en hielo y después se cultivaron en una placa de 6 pozos con 5 ml de medio de cultivo, 48 horas después de la

transfección se inició la selección con G418. En el sistema de transfección liposomal (DOTAP) se mezclan los liposomas con 5 µg plásmido circular y se incuban por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente esta mezcla de liposomas-ADN se agrega a 5×10^6 células y se incuban a 37°C toda la noche. Al día siguiente las células son seleccionadas con neomicina (G418, GIBCO, BRL-Invitrogen Inc.) a una concentración de 1 hasta 4 mg/ml dependiendo de la línea celular, por un periodo de 12-24 días hasta obtener células resistentes a la droga.

6.4 Anticuerpos

Para los análisis de western blot se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Flag M2 (Stratagene, la Jolla CA., USA), anti-Flag conjugado a la peroxidasa de hidrogeno (SIGMA, St. Louis MO, USA), anti-IgG de conejo y ratón conjugado a la peroxidasa (Pharmlngen, San Diego, CA. USA). Para determinar la localización subcelular se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Flag M2cy3 (SIGMA, St. Louis MO.,USA). Anti-CD43 humano (BD Pharmlngen, San Diego CA., USA), anticuerpo anti-Src clona GD11 (Upstate, Lake Placid NY. USA), anticuerpo anti-IgG murino conjugado con Alexa Flour (488 y 588), anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Flour (488 y 588) (Molecular Probes, Eugene OR., USA). Para realizar la purificación de células mediante citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de rata: Anti-CD3 murino conjugado con ficoeritrina-R (R-PE), anti-CD8a murino conjugado con Cy-Chrome, anti-CD4 murino conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC: BD Pharmlngen San Diego, CA., USA).

6.5. Animales.

Se utilizaron ratones BALB/c y C57BL/6 adultos de ambos sexos, estos se mantuvieron en el bioterio del Smith Research Building, M.D. Anderson Cancer Center, de acuerdo a regulaciones de cuidado del departamento de salud y servicios humanos de los Estado Unidos Americanos.

6.5.1. Ratones hipofectomizados

Ratones BALB/c fueron hipofisectomizados mediante cirugía, y se mantuvieron bajo observación por una semana para su recuperación. Se determinó el nivel de cortiesteroides en sangre mediante radioinmunoensayo, que fué <20 ng/ml en suero. Las hormonas utilizadas para inducir la expresión de timotestin fueron: la hormona luteinizante de rata (LH), hormona folículo-estimulante ovina (FSH), y testosterona de rata (T). Estas se administraron vía subcutánea en la región dorsal del cuello del ratón. Se utilizaron 4 ratones por ensayo y el experimento fue repetido 3 veces. Los animales fueron sacrificados por intoxicación de CO₂, y los testículos fueron procesados para aislar el ARN total mediante el reactivo trizol.

6.5.2. Protocolo de Inmunización y purificación celular.

Ratones C57BL/6 libres de patógenos, fueron inmunizados con *Candida albicans* (10⁷ células/ tratadas con formalina) via intraperitoneal, a los 9 días fueron nuevamente inmunizados con antígeno de *Candida albicans*. Después de dos inmunizaciones los ratones inmunizados y los ratones control (C57BL/6) fueron sacrificados.

Para la purificación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) se aislaron timos y bazos de ratones inmunizados y no inmunizados C57BL/6. Los órganos fueron macerados hasta obtener una suspensión celular libre de debris. Las células mononucleares fueron aisladas mediante un gradiente de ficoll y se ajustó la concentración celular a 5 x 10⁷/ml, a esta suspensión se le agregó suero de rata a una concentración final del 5% y se incubó por 15 min. En seguida se adicionaron 10 µl de un pool de anticuerpos contra antígenos de células hematopoiéticas (CD11b, CD45R, Gr-1, TER 119) y fueron incubados a 4°C por 15 min. Las células fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 y agregando 100 µl de anticuerpo anti-biotina tetramétrico que se incubó por 15 min a 4°C. Finalmente se adicionó 60 µl de coloide magnético a la suspensión celular y se pasaron por una columna colocada dentro de un campo magnético. La columna se lavo 3 veces con PBS y las células recuperadas se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. Las células eluidas mostraron un 98% de pureza al ser analizadas mediante citometría de flujo. El estuche comercial para la purificación de los linfocitos T, se obtuvo de la compañía STEMCELL Technologies (Vancouver, British Columbia, Canada).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.6. Aislamiento de ARN total de diferentes tejidos murinos.

Para el aislamiento de túbulos seminíferos, los testículos fueron removidos y lavados con PBS, posteriormente se removieron las capas externas sin dañar la red de túbulos, estos se colocaron en un tubo de 50 ml y se añadió una solución de colagenasa en medio Dulbecco's modificado Eagle's Ham' F-12 (DMEM-F-12) e incubando a 37°C por 25 min en un tamiz de nylon (60 µM, Nytex, Spectrum, Inc.). Los túbulos retenidos se lavaron 3

veces con 10 ml de DMEM-F-12 (37°C) y se procedió a homogenizar los túbulos seminíferos para el aislamiento del ARN total.

Para la obtención de ovario, útero se sacrificaron ratones hembras adultas y el aislamiento de placenta se obtuvo de ratones hembras preñadas entre 9.5 – 15.5 dpc. Los órganos y embriones fueron procesados inmediatamente utilizando material libre de RNasas. Los embriones fueron extraídos a los 13.5 – 18.5 dpc para el aislamiento de saco vitelino, timo fetal, gónadas, hígado fetal; y posteriormente se procedió a la purificación del ARN total. También se obtuvieron órganos de ratones adultos como timo, bazo, ganglios linfáticos, hígado, riñón, estómago, intestino, pulmón, médula ósea, testículo, ovario, cerebro y músculo, para el aislamiento de RNA total.

Para el aislamiento del ARN total, se utilizaron los siguientes procedimientos:

Tejidos. Los tejidos fueron homogenizados (Polytron) e incubados con el trizol por 10 min a temperatura ambiente (Por cada 50 – 100 mg de tejido se adicionó 1 ml de trizol).

Suspensión celular. Por cada 5 - 10 millones de células se agregó 1 ml de trizol, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Por cada ml de trizol utilizado, se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se centrifugó a 12,000 g por 15 min., la fase acuosa fue recuperada y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol por 10 min en hielo y se centrifugó a 12,000g por 15 min. El ARN precipitado se lavó con etanol al 75% y se resuspendió con agua libre de RNasas.

6.7. Purificación celular mediante citometría de flujo.

Para la purificación de timocitos mediante citometría de flujo (FACS), se obtuvieron timos de ratones C57BL/6, los órganos fueron macerados y la suspensión celular se ajustó a una concentración de 20×10^6 células, y se incubaron con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 por un período de 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se resuspendieron con PBS pH 7.4 a un volumen final de 2 ml. Las subpoblaciones de linfocitos T ($CD4^+CD8^-$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) fueron recuperadas en 5 ml de medio RPMI. El número de células aisladas de cada subpoblación de células T ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ y $CD4^+CD8^+$), fue entre 10,000 y 30,000.

6.8. Clonación, secuenciación y caracterización de las clonas

El tamizaje de bibliotecas de ADNc, caracterización de clonas, subclonación de fragmentos de timotestin, reacciones de enzimas de restricción, ligación, transformación, purificación de fragmentos de ADNc y análisis de restricción se realizaron de acuerdo al manual de Sambrook, et.al. 1989. La secuenciación se realizó en el laboratorio de Secuenciación y Análisis de ADN del MD.Anderson Cancer Center, Houston Texas, USA. ®

6.9. Northern blot y Radiomarcaje de sondas

Para los northern blots se utilizaron entre 5 y 10 μ g de ARN precipitados con acetato de sodio 2M, glicógeno (10 mg/ml) y etanol absoluto a -20°C por 30 min, estos fueron recuperados por centrifugación a 14,000 rpm/ 15 min. Los ARN precipitados fueron lavados con etanol al 75% y se dejaron secar. El ARN total se resuspendió en 5 μ l de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), y se mezcló con 13.1 μ l de solución de carga (Formamida

50%, Formaldehído 0.66M y MOPS 1X), las muestras se calentaron a 55°C por 5 min y enseguida se colocaron en hielo. Las muestras fueron aplicadas en geles de agarosa al 1% con formaldehído y transferidas mediante capilaridad a una membrana de nylon (Sambrook et.al, 1989). Las membranas se lavan con una solución 2X SSC por 15 min y se pre-hibridan con una solución de hibridación comercial (ExpressHyb, Clontech, Palo Alto CA.) a 65° C por 4 horas.

Radiomarcaje. Para la reacción de radiomarcaje se utilizaron 30 ng de sonda de timotestin en un volumen final de 28 µl en agua, se desnaturizó mediante ebullición (100°C/5min) y enfriamiento brusco en hielo por 3 min. Enseguida se añadieron los siguientes reactivos:

Amortiguador de marcaje 5X	10 µl
Iniciadores	5 µl
Enzima Klenow	2 µl (1 U/µl)
dCTP (α - ³² P)	5 µl (50 µCi)

La reacción se incubó a 37°C por 40 min, y se prepararon columnas de filtración en gel (BIO-RAD, Hercules CA., USA) para purificar la sonda. La sonda marcada con ³²P se desnaturizó y se colocó dentro del saco de hibridación de la membrana, incubándose toda la noche a 65°C. Las membranas se lavaron con las siguientes soluciones: 2 lavados fríos (2X SSC, 0.1% SDS, 25mM Na₂HPO₄), 2 lavados a 65°C (0.2X SSC, 0.1% SDS, 25mM Na₂HPO₄) y 2 lavados a 68°C (0.1X SSC, 0.1% SDS, 25mM Na₂HPO₄). Las membranas se expusieron a films de rayos-X durante toda la noche a -70°C.

6.10. Reacción de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Para este ensayo se aisló y se normalizó la cantidad de ARN total, en base a 10,000 células de cada subpoblación de timocitos aisladas mediante FACS. También ésta técnica se utilizó para generar ADNc de timo, bazo, ganglios linfáticos y testículo. En la reacción de transcriptasa reversa se utilizó 1 µl de oligo dT₁₂₋₁₈ y agua libre de RNasas en un volumen 11.5 µl, las muestras se incubaron a 70°C por 10 min, y enseguida se sometió a enfriamiento en hielo. Después se agregaron los siguientes reactivos:

Inhibidor de RNasas (10U/µl)	0.5 µl
Buffer 5X	4.0 µl
Ditiotreitol 0.1 M	2.0 µl
dNTP's 10 µM	1.0 µl
Transcriptasa Reversa (200U/µl)	1.0 µl

La reacción se incubó 42°C por 50 min. La reacción fue neutralizada mediante calentamiento a 70°C por 10 min. Como control de la concentración de los niveles de ADNc, se analizó la amplificación de la gliceraldehido-3- fosfodeshidrogenasa (G3PDH), un gene de expresión constitutiva. Las condiciones del PCR fueron de acuerdo con el método de la casa comercial Clontech (No. Cat. 5408-3, Palo Alto CA. USA). La técnica de PCR también fue empleada para amplificar el marco de lectura de timotestin y para detectar la expresión en diferentes subpoblaciones celulares.

a) Para la detectar la expresión de timotestin en las diferentes subpoblaciones celulares se utilizaron los oligonucleótidos:

U-182 LT 5'- TTCTGGACAAAAGCTCACACGA-3' (22 nt), Tm: 55°C

L-1616 LT 5'-GGCTGCTGGATCAAGAAAACACTACT-3' (24nt), Tm: 55°C

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización 94°C/ 30 sec, apareamiento 60°C/ 1 min y extensión 68°C/ 3 min, por 35 ciclos. La enzima DNA polimerasa Taq utilizad  fue de alta fidelidad asi como su buffer (Roche Molecular Biochemicals, Indiana IN., USA).

b) Para amplificar y clonar el marco de lectura (ORF) de timotestin, se utilizó ADNc de timo, bazo, nódulos linfáticos y testículo. Los oligonucleótidos 5' y 3' de timotestin fueron sintetizados por la compa a SIGMA-GENOSYS (Woodlands Tx. USA):

U-LT 5'-GGATCCGAATTCGTCGGCATGGATTCCACCGCCTG-3'

L-LT 5'-CACAGTCGACTATACTAAGGTTTCACAGTTTCTGGGC-3'

El oligonucleótido iniciador U-LT (35 nt) contiene un sitio de restricción para la enzima Eco RI (Subrayado) y el codón de iniciación (ATG) del marco de lectura de timotestin. El iniciador L-LT (36 nt) contiene un sitio de restricción para la enzima Sal I y no contiene

codón de terminación, para poder fusinarlo con péptidos (Flag-Hist) o proteínas recombinantes (GFP). Las condiciones de PCR son semejantes a las anteriormente descritas.[®]

6.11. Southern Blot

Para el Southern blot se utilizaron geles de agarosa al 0.8 y 1.0 % para la resolución de los fragmentos de ADNc, al finalizar el corrimiento de la muestra, el gel se incubó con HCl 0.25 M por 8 minutos, después el gel se lavó con agua y se añadió la solución desnaturalizante (NaOH 0.5M; NaCl 1M) y finalmente la solución neutralizante (Tris-HCl 0.5M; NaCl 1.5M). Después se montó la transferencia de acuerdo a Sambrook et.al. 1989. Los

ácidos nucleicos transferidos en la membrana se fijaron mediante luz ultravioleta (UV Crosslinker). Las condiciones de hibridación y lavado se realizaron como se mencionó anteriormente.

6.12. Hibridación *in situ*

Para la hibridación *in situ*, primero se realizaron cortes histológicos de timo y testículo. Los tejidos se incubaron toda la noche a 4°C en una solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente los tejidos se lavaron con PBS pH 7.4 y deshidratados con un gradiente de concentración de alcoholes en PBS (30, 50, 70, 80, 95 y 100%), con cada solución se lavaron 2 veces por 30 min y los tejidos se almacenaron a 4°C.

Antes de realizar los cortes histológicos, los tejidos se lavaron 2 veces con las siguientes soluciones:

Etol al 100% por 30 min.

Etol:Histoclear 50:50 por 15 min.

Histoclear 100% por 10 min.

Los siguientes tratamientos se llevaron a 60°C

Histoclear/Parafina 50:50 por 20 min

Parafina 100% por 15min

Una vez solidificada la parafina, el molde se removió y se montó en un microtomo para realizar los cortes histológicos (6 microns), cada sección se fue colocando en una bañ de agua a 45°C y finalmente se montaron en portaobjetos cargados positivamente (Fisher, Cat. No. 12-550-15) dejandose secar toda la noche a 37°C. Todos los siguientes tratamientos se realizaron con reactivos libres de RNAsas.

- Histoclear por 10 min
- Etanol al 100% por 2 min
- Etanol al 95 y 85% (2 min), 70% (5 min), 50 y 30% (2 min)
- Cloruro de sodio 0.9% (5 min)
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Paraformaldehído al 4% (20 min)
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Incubación con proteinasa K (20µg/ml) por 7 min
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Paraformaldehído al 4% (20 min)
- Trietanolamina-HCl pH 8.0 por 10 min
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Cloruro de sodio al 0.9% (5 min)
- Deshidratación con etanol 30, 50, 70, 85 y 95% (5 min)
- Etanol 100% (2 min)

Las laminillas histológicas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Preparación de la sonda. Para generar las sondas sentido y antisentido se subclonó un fragmento de 400 pb del ADNc de timotestin, en los sitios de restricción EcoRV y XhoI del vector pBluescript KS II, este vector fue linearizado con la enzima de restricción XhoI para producir la sonda sentido, y EcoRV para la sonda antisentido, después de la digestión enzimática, cada plásmido linearizado se purificó mediante extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. Para producir la ribosonda se utilizaron los siguientes reactivos:

1 µg de plásmido linearizado (1 µl)

5.5 µl de Agua DEPC

6 µl de buffer de transcripción 5X (Promega)

1 µl de rATP, rCTP, rGTP (10 mM)

1.5 µl de Ditioneitol 0.1 M

1 µl de Inhibidor de RNasas (10 U/µl)

10 µl de ³⁵S tio-rUTP (Perkin-Elmer, NEN)

1 µl de ARN polimerasa (T3 o T7) (Promega Co. Madison WI., USA.)

La reacción se incubó a 37°C por 3 horas. La reacción se neutralizó adicionando 2 µl de DNasa I e incubando por 15 min a 37°C. Posteriormente se procedió a precipitar la sonda con 200 µl de ARNt (0.5 mg/ml), 250 µl de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol al 100% por 5 min en hielo, la cual se recuperó por centrifugación a 14000 rpm/7 min. La sonda se resuspendió en agua DEPC y se volvió a precipitar como se mencionó previamente. Para la hibridación se utilizaron 4 millones de cuentas or minuto (cpm), en un volumen de 100 µl por cada laminilla y se incubaron a 65°C en una cámara húmeda durante 18 horas. Para eliminar el exceso de sonda los cortes histológicos fueron lavados con las siguientes soluciones:

- Solución removedora de portaobjetos (SSC 5X, 2-mercaptoetanol 15 mM) a 60°C por 1 hora.
- Solución I (Formamida 50%, SSC 2X, 2ME 40 mM) a 65°C por 30 min.
- Solución NTE 1X (Cloruro de sodio 0.5M, Tris-HCl 0.25M pH8.0 y EDTA 0.1M) a 37°C por 1º min (3 veces)
- Solución I a 65°C por 1 hora.

- SSC 2X y SSC 1X a temperatura ambiente por 15 min cada uno.

Las laminillas se deshidrataron con diferentes soluciones de etanol al 30, 60, 80, 95% que contenían acetato de amonio al 0.3 M, y un último lavado con etanol al 100%. La intensidad de la señal radioactiva en los tejidos hibridados se detectó mediante la exposición con un film de rayos-X. Con base en los resultados anteriores, los cortes histológicos fueron sujetos a una emulsión fotográfica Kodak NTB-2 a 45 °C, y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los cortes histológicos se colocaron en una caja a prueba de luz y se expusieron por 5 días. Las laminillas se revelaron en el cuarto oscuro utilizando la solución reveladora KODAK D-19 por 2 min y se lavaron con agua destilada. Después se realizó una tinción nuclear utilizando una solución Hoechst (2 µg/ml) por 2 min. Subsecuentemente las laminillas fueron cubiertas con una solución de balsamo canadiense y se dejaron secar por 7 días (Albrecht U., et.al. 1997). El análisis de la expresión *in situ* de timotestin se realizó mediante un microscopio Olympus BX60, equipado con una cámara digital SPOT (Diagnostics instruments, Sterling Heights, MI. USA).

6.13. Transcripción/traducción *in vitro* y SDS-PAGE

Para realizar la transcripción y traducción en un sistema de reticulocitos de conejo, se subclonó direccionalmente el marco de lectura (ADNc) que codifica para la proteína timotestin mediante condiciones previamente mencionadas. El vector pCITE 2A (Novagen Madison WI., USA) contiene el promotor para la polimerasa T7 y además provee una señal CAP durante la transcripción del ARNm de timotestin. Para la transcripción se utilizaron 0.5 µg del vector y se incubó con una mezcla de transcripción a 30°C por 15 min. Posteriormente

se añadieron 30 μ l de una mezcla de reticulocitos de conejo (Novagen Madison WI., USA), 4 μ l de 35 S-metionina (40 μ Ci) (Perkin-Elmer NEN,) por un período de 1 hora a 30°C. Para neutralizar la reacción se añade Rnasa A y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.

Para analizar la producción de la proteína timotestin *in vitro*, se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para este fin se prepararon SDS-PAGE al 7.5% T con pH 8.8, y con un gel de empaquetamiento al 4% T; 2.66 C, a pH 6.8 . Las cantidades empleadas para elaborar los geles fueron las siguientes: Gel separador al 7.5 % T, pH 8.8 (geles de 16 x 14 cm x 1.5 mm).

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Solución patrón de acrilamida 40 %T,	9.1 ml
Solución patrón de bis-acrilamida 2% C.	5.0 ml
Amortiguador Tris-HCl, 3.02 M, pH 8.8	6.25 ml
Agua bidestilada	29.14 ml
Dodecil sulfato de sodio al 20%	0.25 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.25 ml
TEMED	0.025 ml

Gel de Empaquetamiento al 4% T, pH 6.8

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Solución patrón de acrilamida 40% T	2.4 ml

Solución patrón de bis-acrilamida 2%C	1.3 ml
Amortiguador Tris-HCl, 1.25 M, pH 6.8	6.4 ml
Agua bidestilada	14.5 ml
Dodecil sulfato de sodio al 10%	0.125 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.125 ml
TEMED	0.025 ml

Para el corrimiento electroforético se utilizó un amortiguador trizma base 50 mM, glicina 384 mM, SDS 0.01% con un pH de 8.3. Para la preparación de la muestra se añadió amortiguador Laemli y 2-mercaptoetanol (BIO-RAD, Hercules CA.,USA) y se sometió a ebullición por 5 minutos. También se utilizaron marcadores de peso molecular con un rango de 14.3 hasta 250 Kda (Rango completo rainbow, Amersham Life Science Piscataway, NJ, USA). El gel radioactivo fue secado al vacío y a una temperatura de 65°C por 1 hora. El gel se expuso con un film de rayos-X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech Piscataway, NJ, USA) por un periodo de 18 hrs a temperatura ambiente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

6.14. Western blot

®

Para analizar proteínas mediante western blot, se utilizaron geles SDS-PAGE al 7.5 %T. Las muestras se obtuvieron de lisados celulares mediante sonicación y añadiendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Aprotonina, Leupeptina, y Pepstatina; Roche Molecular Biochemicals Indianapolis IN., USA). El tratamiento térmico y los agentes reductores utilizados fueron semejantes al los previamente descritos. Una vez separadas las proteínas electroforéticamente por SDS-PAGE, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con una solución bloqueadora (leche descremada

al 5 % en solución salina de fosfatos [PBS]), durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el primer anticuerpo a una dilución de 1:2000 o 1:5000 en la solución bloqueadora y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron y se adicionó el segundo anticuerpo policlonal anti-gammaglobulina conjugados con peroxidasa (Dilución 1:5000), y se dejaron reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló mediante la solución substrato-cromógeno de quimioluminiscencia (Super signal west pico, PIERCE Co., Rockford IL., USA), inmediatamente se procedió a exponer la membrana con un film de rayos-X, por un periodo de 5 minutos hasta 1 hora.

6.15. Programas Analíticos.

Para el análisis del ADNc de timotestin, se utilizaron los siguientes programas de computación: DNASTar (Lasergene file, Madison WI.,USA) que contiene los programas editseq, seqman, primer select, align, protean, y mapdraw. Para determinar la estructura protéica de timotestin se utilizaron los programas Blast-P, DART, CD-search (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para determinar los dominios espiral-espiral se utilizó el programa MacStripe 2.0 (www.york.ac.uk). Para analizar la localización subcelular se empleo el programa PSORT (www.psort.nihb.ac.jp) mientras que BLOCKS (www.blocks.fhcrc.org), ProDom (www.prodes.toulouse.inra.fr), MOTIF (www.motif.genome.ad.jp) fueron utilizados para identificar familias de proteínas. Finalmente, los programas del centro de análisis de secuencias biológicas (CBS, www.cbs.dtu.dk), fueron utilizados para analizar péptido señal, sitios de fosforilación y dominios transmembranales.

7.16. Citocentrifugación celular y Microscopía de fluorescencia.

Para analizar la localización subcelular de proteínas se utilizaron las células K562, y Jurkat. Las células fueron incubadas con el fluorocromo específico para ADN (Hoechst 33342 (10 µg/ml) a 37°C por 30 min, para identificar el núcleo. Las células se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 y se colocaron diferentes concentraciones de células (50,000, 100,000 y 250,000), mediante un cito-embudo (Cytofunnel, Thermoshadon Inc.) ajustado a un portaobjetos y centrifugando a 1000 rpm/ 5 min. Posteriormente se adicionó:

- Formaldehído al 2% por 10 minutos o acetona (-20°C)
- 3 lavados con la solución Tween 20 al 0.1% en PBS pH 7.4
- Solución bloqueadora universal (Novagen, Madison WI., USA) por 30 minutos
- Primer anticuerpo diluido 1:1000 (PBS, Suero fetal bovino al 1%) , toda la noche a 4°C.
- 3 lavados con la solución Tween 20 al 0.1% en PBS pH 7.4
- Segundo anticuerpo, diluido a 1:2500.
- 3 lavados con PBS pH 7.4
- Solución de montaje (Research Genetics, Huntsville, AL., USA) y se dejan secar toda la noche a temperatura ambiente.

Para analizar la reactividad del anticuepo se utilizó el microscopio de fluorescencia Olympus LX70. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa Adobe-Photoshop versión 5.5.

6.17. Tamizaje de fosforilación (phosphopot).

Este ensayo consiste en determinar el estado de fosforilación de proteínas cinasas en extractos protéicos. El sistema Phosphopot (JERINI, No. Cat. JE-258-1, Berlin, Alemania),

consiste en una transferencia de fósforo radioactivo hacia un sustrato enzimático específico fijado en una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa Phosphospot contienen 20 sustratos específicos para 16 proteínas cinasas, solamente las enzimas en estado activo son capaces de transferir γ ^{32}P hacia el sustrato y su detección se realiza mediante autoradiografía de rayos X. A continuación se presenta el protocolo recomendado por la casa comercial.

Las membranas se incuban en etanol por 5 min y se lavan 3 veces con el buffer de fosforilación (MOPS 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, MgCl_2 30 mM, DTT 4 mM, β -glicerofosfato 12.5 mM, EGTA 2 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, ácido okadaico y [γ - ^{32}P] ATP 100 μM), 10 minutos cada lavado. Para este ensayo se utilizó un buffer de lisis que se prepara adicionando al buffer de fosforilación, triton X-100 (1%) y leupeptin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por cada 2×10^6 células se utilizó 1 ml de buffer de lisis y se incubó por 10 min en hielo, posteriormente el extracto proteico se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, y el sobrenadante se incubó con las membranas previamente equilibradas con etanol. La reacción de fosforilación se llevó a cabo por 30 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con las siguientes soluciones:

- 1) NaCl 1M
- 2) TBS 50 mM, pH 7.2 (Tween 20 1%, SDS 1%)
- 3) Agua
- 4) Etanol

Las membranas se dejan húmedas y se exponen a un film de rayos X, por 18 horas. La autoradiografía se analiza utilizando una plantilla que orienta la posición de cada sustrato fijado en la membrana de nitrocelulosa.

6.18. Ensayo de inmunocomplejos cinasas.

Este ensayo se basa en el mismo principio que en el phosphospot, la diferencia es que la proteína cinasa se inmunoprecipita y se hace reaccionar con el sustrato (enolasa) en un buffer de fosforilación y la reacción se analiza mediante SDS-PAGE. Para este estudio se utilizaron 1.5 mg de extracto proteico de las líneas celulares Jurkat-Flag y Jurkat-timotestín, las células se incubaron con buffer de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Triton X-100 1%) y se incubaron en hielo por 15 minutos. El extracto proteico se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorff en donde se agregaron 6 µg de anticuerpo anti-src, la inmunoprecipitación se llevo a cabo toda la noche a 4° C. Posteriormente se añadió 6 µg de anti-inmunoglobulina de conejo Ig G y se incubó por 1 hora a 4°C en agitación, enseguida se añadió proteína A (30 min) y se incubó bajo las mismas condiciones y se lavó 3 veces con buffer de lisis (10 min cada uno). Al final el precipitado se resuspendió con 10 µl de enolasa (la enolasa se inactiva con ácido acético 46 mM a 37°C por 10 minutos) y se agrega el fósforo-γ radioactivo en un buffer de Hepes-vanadato, después de 10 min se agregó un buffer de carga 3X y las muestras se sujetaron a ebullición por 5 minutos. El inmunocomplejo cinasa se analiza mediante 7.5 % SDS-PAGE. El gel de poliacrilamida se incuba en una solución de agua:metanol:ácido acético 5:5:1 por 1 hora, posteriormente el gel se somete a ebullición por 1 hora en una solución de KOH 1M. Nuevamente el gel es colocado en la

solución fijadora por 45 min y se seca al vacío a 65°C. La señal radioactiva de la transferencia de fósforo gamma se detecta mediante autoradiografía de rayos X.

6.19 Aislamiento de la fracción del citoesqueleto y citosol.

Para aislar la diferentes fracciones celulares principalmente citosol y citoesqueleto, utilizamos las siguientes soluciones:

Solución de lisis 1: NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 0.5%, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Leupeptin 10 µg/ml.

Solución de extracción 2: NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 6.8; Triton X-100 1%, SDS 1%, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Leupeptin 10 µg/ml.

Para el fraccionamiento celular se utilizaron 20×10^6 células provenientes de la línea celular Jurkat-vector y Jurkat Timotestin, las células se lavaron con PBS, y la pastilla celular se resuspendió con 500 µl de solución de lisis 1. El lisado celular se incubó por 30 min en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se denominó fracción proteica citosólica y el precipitado contiene la fracción de citoesqueleto, a la cual se le adicionó 200 µl de solución de extracción 2. El extracto se mezcló mediante pipeteo, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó como anteriormente se mencionó para obtener la fracción proteica del citoesqueleto. La concentración de proteínas se determinó mediante el método BCA (Pierce, Rockford, IL. USA).

7. RESULTADOS

7.1. RELEVANCIA DE TIMOTESTIN DURANTE LOS ESTADIOS EMBRIONARIO, FETAL, POST-NATAL Y ADULTOS DEL SISTEMA INMUNE Y REPRODUCTOR.

7.1.1.a. Timotestín se expresa durante etapas embrionarias

La migración celular es un proceso altamente regulado que es importante durante las primeras etapas embrionarias. Por lo tanto, la expresión de moléculas involucradas en los mecanismos de motilidad celular deben expresarse en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Congruente con esta predicción, análisis de northern blot, revelaron que timotestín se expresa en células embrionarias totipotenciales (Fig. 1A), las cuales se localizan dentro de la red celular que forman los blastocistos y sugiere que la expresión de timotestín es importante durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario. Para determinar la relevancia de timotestín en diferentes etapas embrionarias, realizamos una cinética de expresión de timotestín mediante northern blot. El análisis reveló que timotestín se expresa desde el día 7 hasta el 17 dpc (Fig 1B), aunque se observó un incremento de expresión de timotestín durante la etapa de organogénesis (11-15 dpc). También identificamos la expresión de dos ARN mensajeros de timotestín con un peso molecular de 3.6 y 4.4 Kb.

L.L.L. Timotestin se expresa en tejidos hematopoyéticos y linfoides durante la embriogénesis.

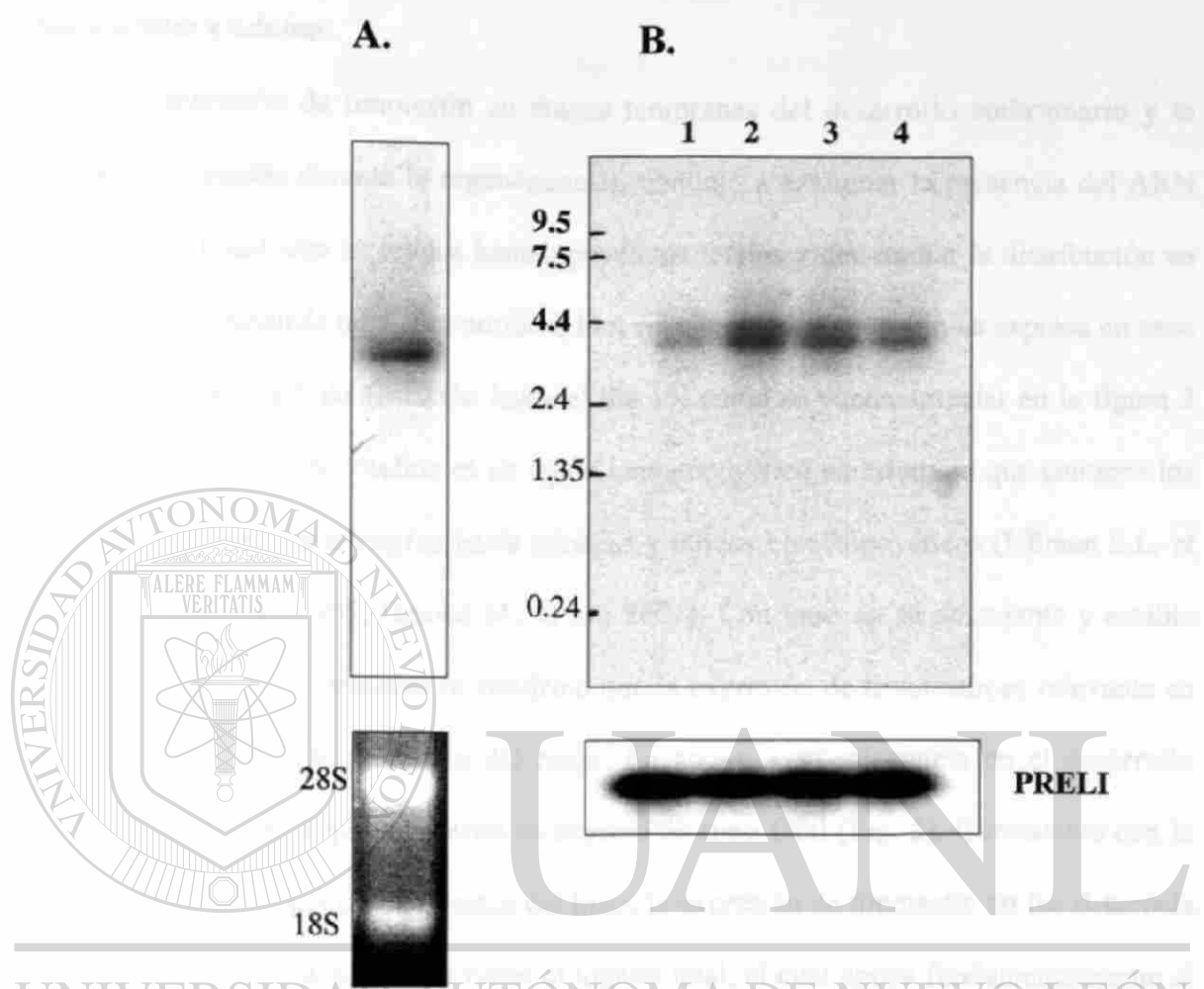


Figura 1. Timotestin se expresa durante la embriogénesis. Northern blots. **A.** ARN total de células totipotenciales embrionarias. **B.** ARN mensajero de embriones. 1) 7 dpc. 2) 11 dpc. 3) 15 dpc. y 4) 17 dpc. Los números que se muestran en el lado izquierdo del northern blot, indican el peso molecular en kilobases (kb). La membrana se expuso con un film de rayos-X por 72 horas. Como controles de carga de la muestra, se utilizaron los ARN ribosomales (28 y 18S) visualizados en el gel de agarosa por tinción con bromuro de etidio (A) y la expresión de PRELI, un gene que se expresa constitutivamente en todas las etapas embrionarias.

7.1.1.b. Timotestín se expresa en tejidos hematopoyéticos y linfoides durante etapas fetales y adultas.

La detección de timotestín en etapas tempranas del desarrollo embrionario y la abundante expresión durante la organogénesis, condujo a examinar la presencia del ARN mensajero de timotestín en tejidos hematopoyéticos fetales y determinar la distribución en tejidos adultos. Análisis mediante northern blot revelaron que timotestín se expresa en saco vitelino desde el día 6 de gestación hasta el día 15, como se puede apreciar en la figura 2 (carriles 2, 4, 6). El saco vitelino es un tejido hematopoyético embrionario que contiene los precursores celulares que migran hacia gónadas y tejidos hematopoyéticos (Ullman S.L. et al., 1997; Rich I.N., 1995; Ogawa M., et al., 2001). Con base en su abundante y estable expresión en diferentes estadios se confirmó que la expresión de timotestín es relevante en las diferentes etapas de gestación del ratón. En apoyo a su relevancia en el desarrollo intratímico detectamos que timotestín se expresa en timo fetal (Fig. 2). Consistente con la selectiva compartimentalización dentro del timo, la expresión de timotestín no fue detectada en otros órganos hematopoyéticos como el hígado fetal, el cual apoya fundamentalmente el desarrollo de linfocitos B, de precursores mieloides y eritroides (Wolber F. et al., 2002; Traver D., et al., 2001).

En etapas adultas la distribución tisular del ARNm de timotestín es también predominante en órganos linfoides primarios como médula ósea y timo, además en tejido testicular (Fig 2). Estos resultados en conjunto indican que la expresión de timotestín es importante durante el desarrollo y maduración de los timocitos y en células germinales tanto en etapas embrionarias como en adultas.

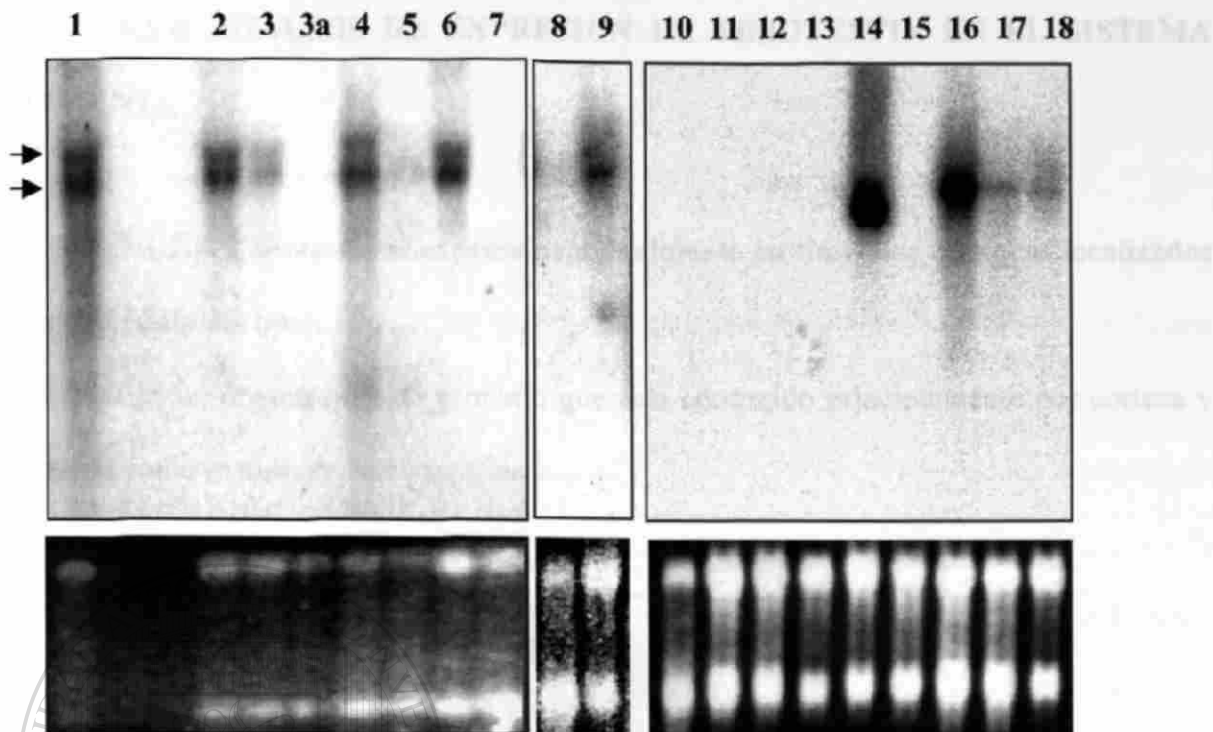


Figura 2. Distribución tisular de timotestin en tejidos embrionarios y adultos.

Northern blot. Tejidos embrionarios (5 μ g) carriles 1 – 8 y tejidos adultos murinos (10 μ g) carriles 9 – 16. 1. Timo fetal, 2. Saco vitelino (6 dpc), 3-3a. Saco vitelino (8 dpc), 4. Saco vitelino (11 dpc), 5. Placenta (11 dpc), 6. Saco vitelino (15 dpc), 7. Placenta (16 dpc), 8.

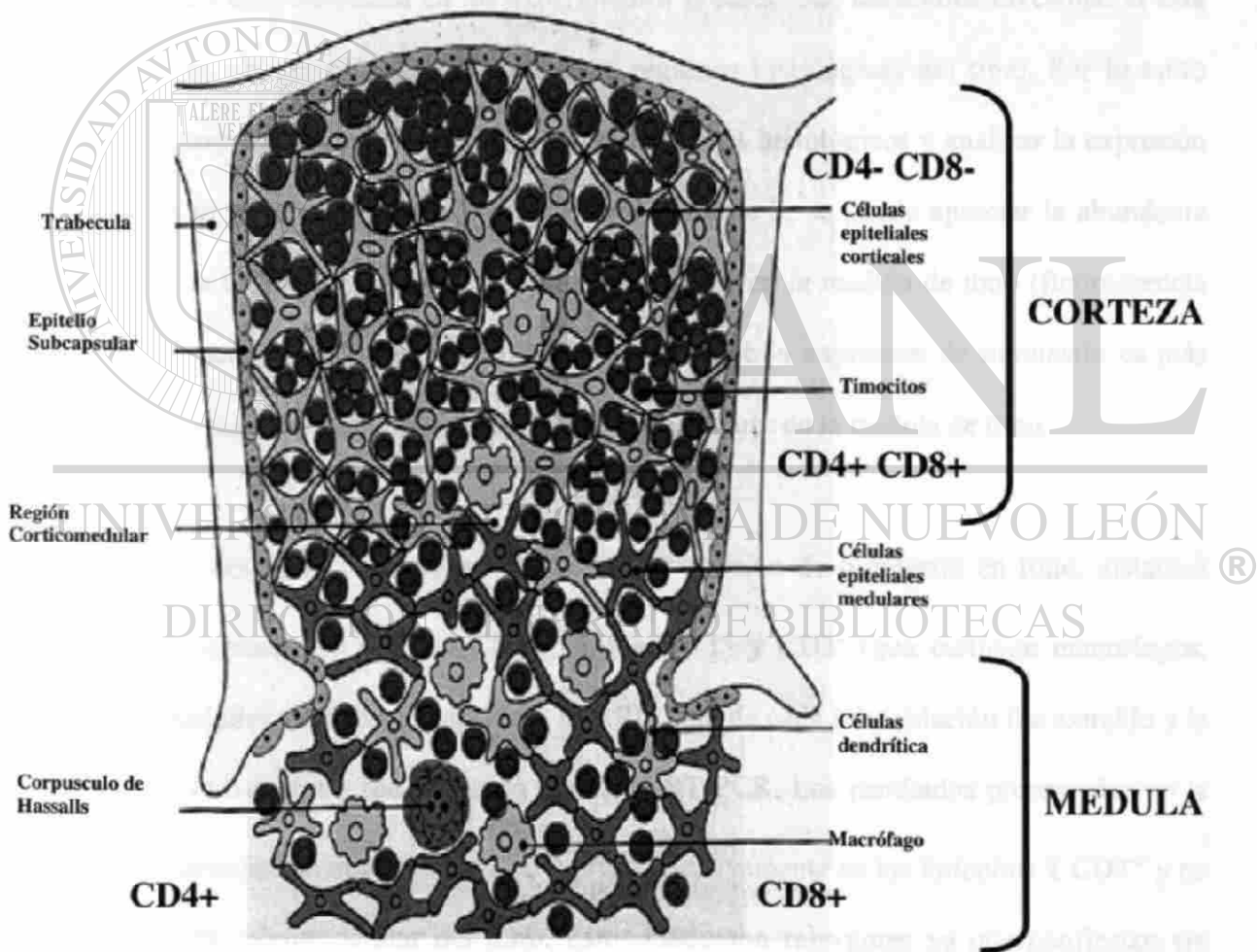
Hígado fetal (16 dpc), 9. Médula ósea, 10. Estómago, 11. Cerebro, 12. Músculo, 13. Corazón, 14. Testículos, 15. Hígado, 16. Timo, 17. Bazo, 18. Nódulos linfáticos. Exposición por 72 horas en film de rayos X. Sonda ADNc de timotestin radiomarcada con 32 P. Las flechas indican los transcritos de 3.8 y 4.4 kb de timotestin.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.1.2. ANALISIS DE EXPRESION DE TIMOTESTIN EN EL SISTEMA INMUNE.

7.1.2.a. Timotestin se expresa principalmente en timocitos maduros localizados en la médula del timo.

El timo es un órgano linfoide primario que esta contituido principalmente por corteza y médula como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Organización celular del timo.

La región subcapsular esta principalmente constituida por células epiteliales corticales y por timocitos (CD4-CD8-), mientras que los timocitos en la corteza maduran y expresan los receptores CD4+CD8+ (dobles positivos). En la región corticomedular se lleva a cabo la selección de timocitos a través de su afinidad por el antígeno presentado por células dendríticas (Sebzda E., et al., 1999). Las células seleccionadas positivamente pasan a formar los repertorios de timocitos CD4+ (cooperadores) y CD8+ (citotóxicos), los cuales se concentran en la médula del timo (Esquema 1). En acuerdo con la abundante expresión de timotestin en timo detectada en los experimentos precedentes, decidimos investigar si esta expresión es ubiqa en todas las diferentes regiones histológicas del timo. Por lo tanto aislamos timos de ratones C57BL/6 para realizar cortes histológicos y analizar la expresión de timotestin mediante hibridación *in situ*. En la figura 3, se puede apreciar la abundante expresión de timotestin en la región cortico-medular y en la medula de timo (fluorescencia roja, sonda antisentido). Estos resultados sugieren que la expresión de timotestin es más relevante en las subpoblaciones celulares que forman parte de la médula de timo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para determinar el origen celular de la expresión de timotestin en timo, aislamos células mononucleares de timo CD3⁺ (linfocitos T) y CD3⁻ (que incluyen macrófagos, células epiteliales y células dendríticas). El ARN total de cada subpoblación fue extraído y la expresión de timotestin fue analizada mediante RT-PCR. Los resultados presentados en la figura 3B demuestran que timotestin se expresa selectivamente en los linfocitos T CD3⁺ y no en el microambiente celular del timo. Estos datos son relevantes ya que confirman sin ambigüedad que timotestin se expresa exclusivamente en en timocitos. Las cantidades de

ADNc utilizadas en este análisis fueron equivalentes para cada PCR, lo cual se comprobó mediante la amplificación de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

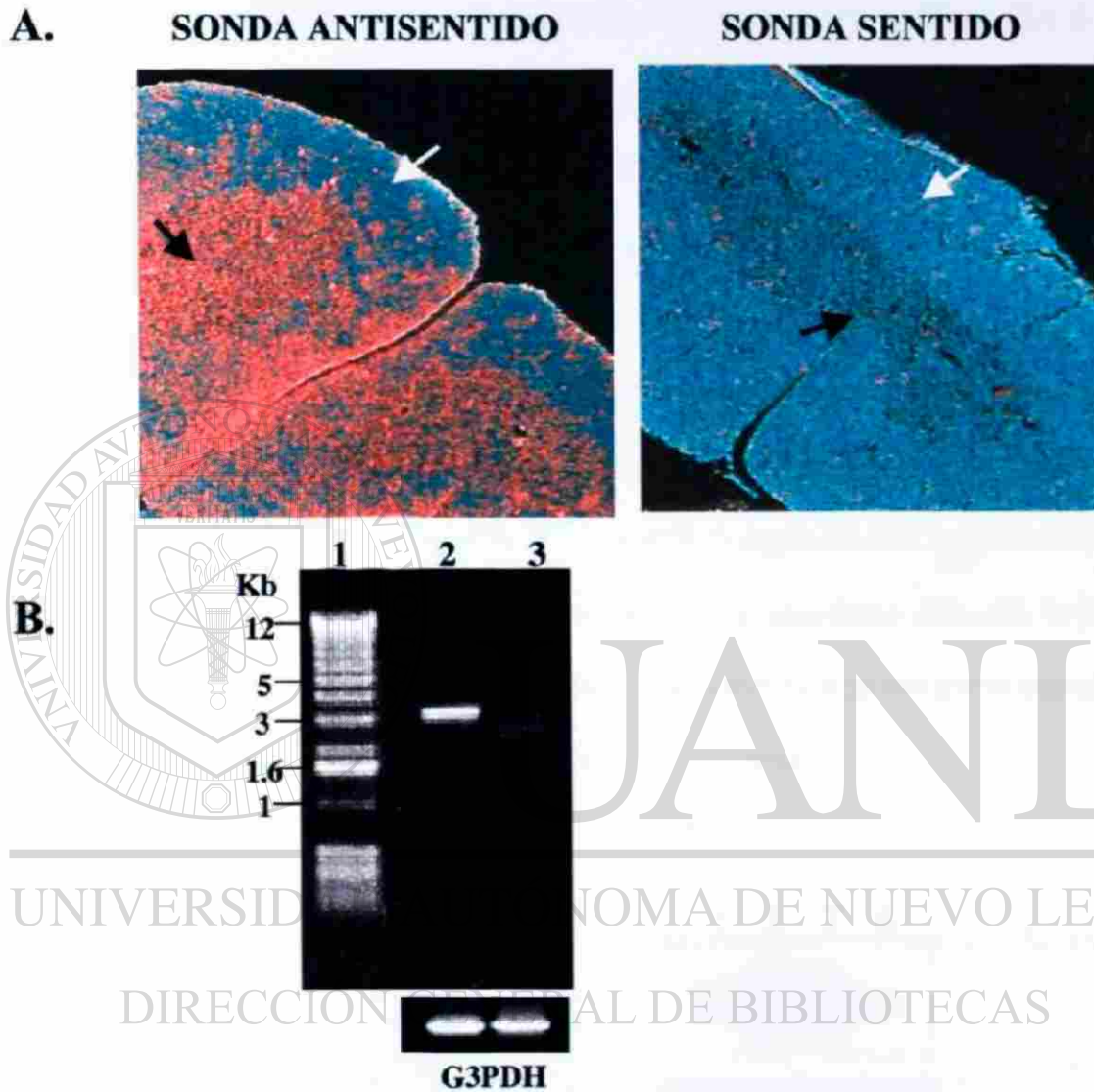


Figura 3. Timoestín se expresa en linfocitos CD3⁺ de timo. A. Análisis de hibridación *in situ* de timo: (A) La fluorescencia roja (sonda antisentido) indica la expresión de timoestín, y la fluorescencia azul (sonda control: sentido) donde predomina la tinción nuclear con Hoechst 33342. Flecha de color negro y balnca muestran la médula y la corteza del timo respectivamente. **B.** RT-PCR. Carril 1, marcadores de ADN. 2. RT-PCR de timocitos (CD3⁺) y 3. Células mononucleares (CD3⁻). El producto de amplificación de timoestín fue de 3.1 Kb y el control de carga G3PDH de 900 pb.

Con base en la selectiva expresión de timotestin en timocitos CD3⁺ y la abundante expresión de timotestin en médula de timo, nos hizo postular que la expresión de timotestin puede ser mayor relevancia en las subpoblaciones de timocitos CD4⁺ y CD8⁺. Con el fin de analizar esta hipótesis, analizamos la expresión de timotestin en las cuatro subpoblaciones diferentes de timocitos (CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁻CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁻CD8⁻). Como puede corroborarse en la figura 4, la citometría de flujo (FACS) permitió aislar las subpoblaciones de timocitos con una pureza del 98%. Después de extraer el ARN de cada una de las subpoblaciones, la expresión de timotestin se detectó mediante RT-PCR y Southern blots. Los análisis revelaron que aunque timotestin puede detectarse en las cuatro subpoblaciones de timocitos (Fig. 4B), su expresión es predominante las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺. Estos resultados son congruentes con la abundante detección *in situ* de timotestin en la médula de timo (Fig 3). Estos datos en conjunto, sugieren que la expresión de timotestin es relevante en la maduración y selección intratímica.

A.

B.

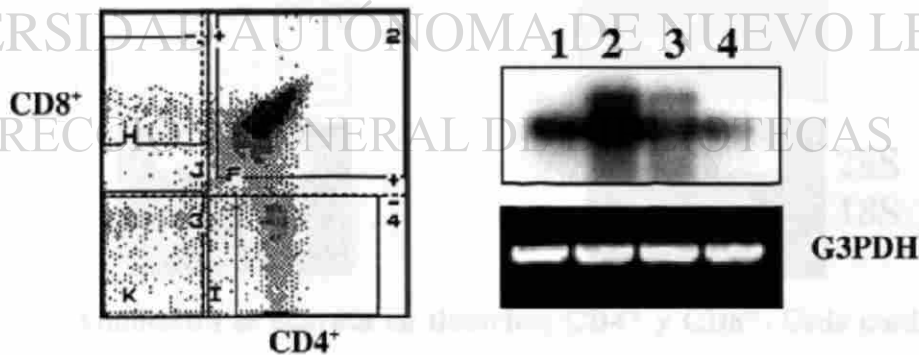


Figura 4. Expresión de timotestin por distintas subpoblaciones de timocitos maduros. A) Esquema del FACS para purificación celular. B) Análisis de expresión mediante RT-PCR y Southern blot. Timocitos CD3⁺: 1. CD4⁺CD8⁻, 2. CD4⁻CD8⁺, 3. CD4⁺CD8⁺, 4. CD4⁻CD8⁻. RT-PCR de la G3PDH se utilizó como control de carga.

El timo produce y exporta continuamente linfocitos T inmunocompetentes con un fenotipo CD4⁺ (cooperadores) y CD8⁺ (citotóxicos) a órganos linfoides secundarios (Anderson G., et al. 2001). Basados en estos hechos decidimos comparar las subpoblaciones responsables de la expresión de timotestin tanto en timo como en bazo. El northern blot reveló que timotestin no se expresa en linfocitos T periféricos del bazo, sino exclusivamente en las células CD4⁺ y CD8⁺ del timo (Fig. 4). Estos resultados indican que la expresión de timotestin juega un papel central y exclusivo en los procesos de diferenciación intratímica.

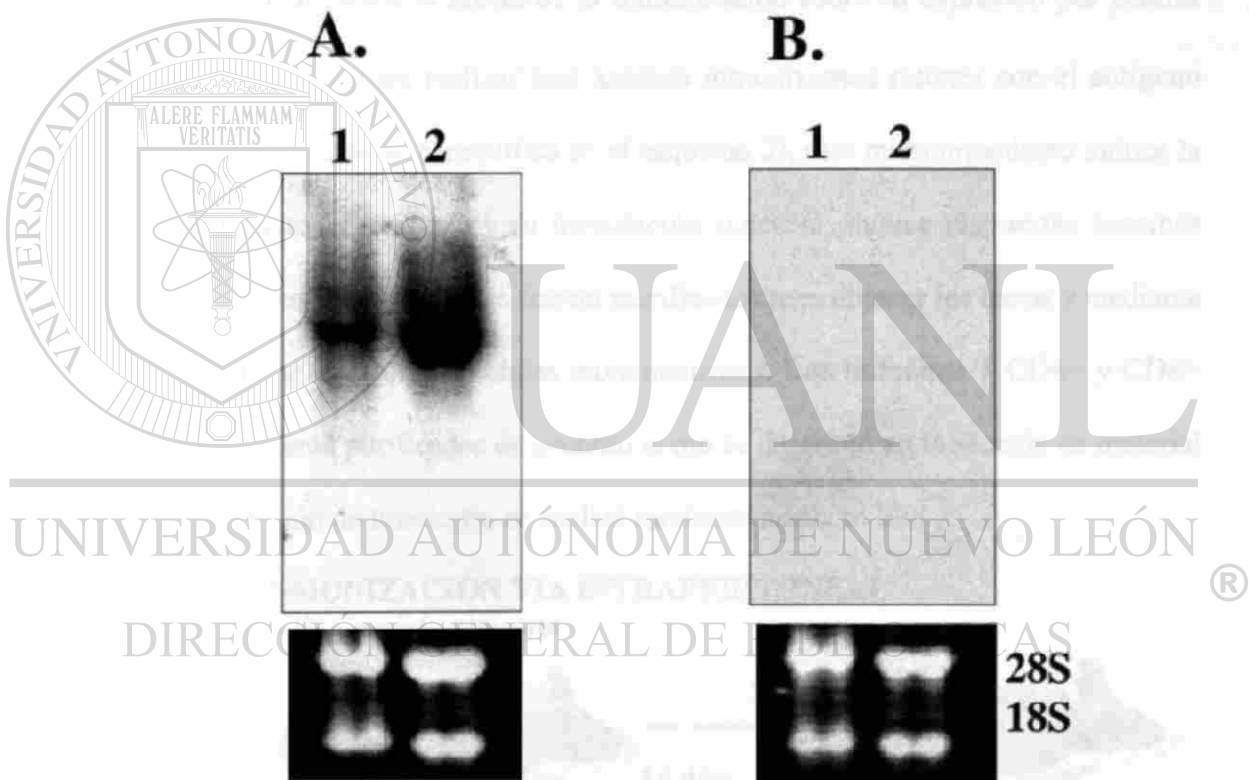
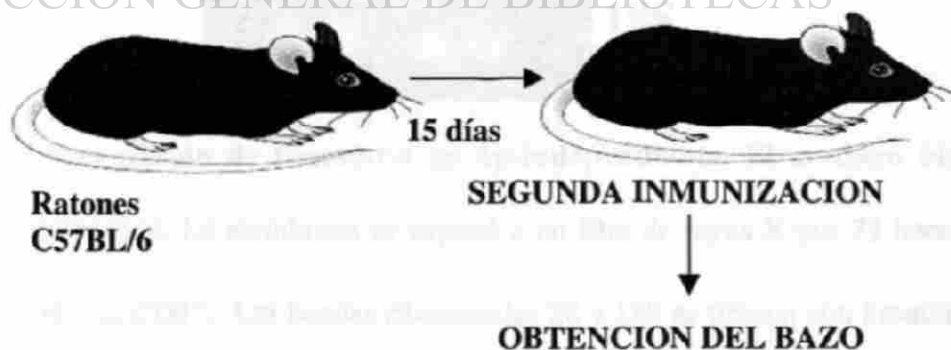


Figura 5. Timotestin se expresa en timocitos CD4⁺ y CD8⁺. Cada northern blot contiene 6 µg de ARN total de: A) Timocitos y B) Linfocitos T (bazo) con el siguiente fenotipo: Carril 1. CD4⁺ y carril 2. CD8⁺. Las bandas ribosomales 18 y 28S fueron teñidas con bromuro de etidio como control de carga.

7.1.2.b. La expresión de timotestin es antígeno (Ag) -independiente y exclusiva de la maduración intratímica.

Análisis precedentes demostraron que timotestin no se expresa en linfocitos T vírgenes del bazo (Fig.5). Sin embargo no sabemos si la migración hacia órganos linfoides secundarios como el bazo depende de la estimulación antigénica, y si la expresión de timotestin es por tanto Ag-dependiente. Con el fin de determinar si la expresión de timotestin es crítica para la localización de los linfocitos T en órganos linfoides secundarios durante la respuesta inmune, analizamos el efecto de la inmunización sobre su expresión por células CD4⁺ y CD8⁺ del bazo. Para realizar este análisis inmunizamos ratones con el antígeno *Candida albicans* (tal como se ejemplifica en el esquema 2), este microorganismo induce la activación de linfocitos T en bazo y su inoculación sucesiva, induce respuestas inmunes secundarias. Posteriormente los ratones fueron sacrificados para obtener los bazos y mediante gradientes de ficoll se aislaron las células mononucleares. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron subsecuentemente purificados de acuerdo como se describió en la sección de material y métodos. La expresión de timotestin se analizó mediante northern blot.

**INMUNIZACION VIA INTRAPERITONEAL
CON *Candida albicans***



Esquema 2. Protocolo de inmunización.

Tal como se puede comprobar en la figura 6, la expresión de timotestin es independiente del reto antigénico y ajena al microambiente del bazo. Estos resultados apoyan nuestra conclusión previa y confirman la relevancia de timotestin durante la diferenciación intratímica.

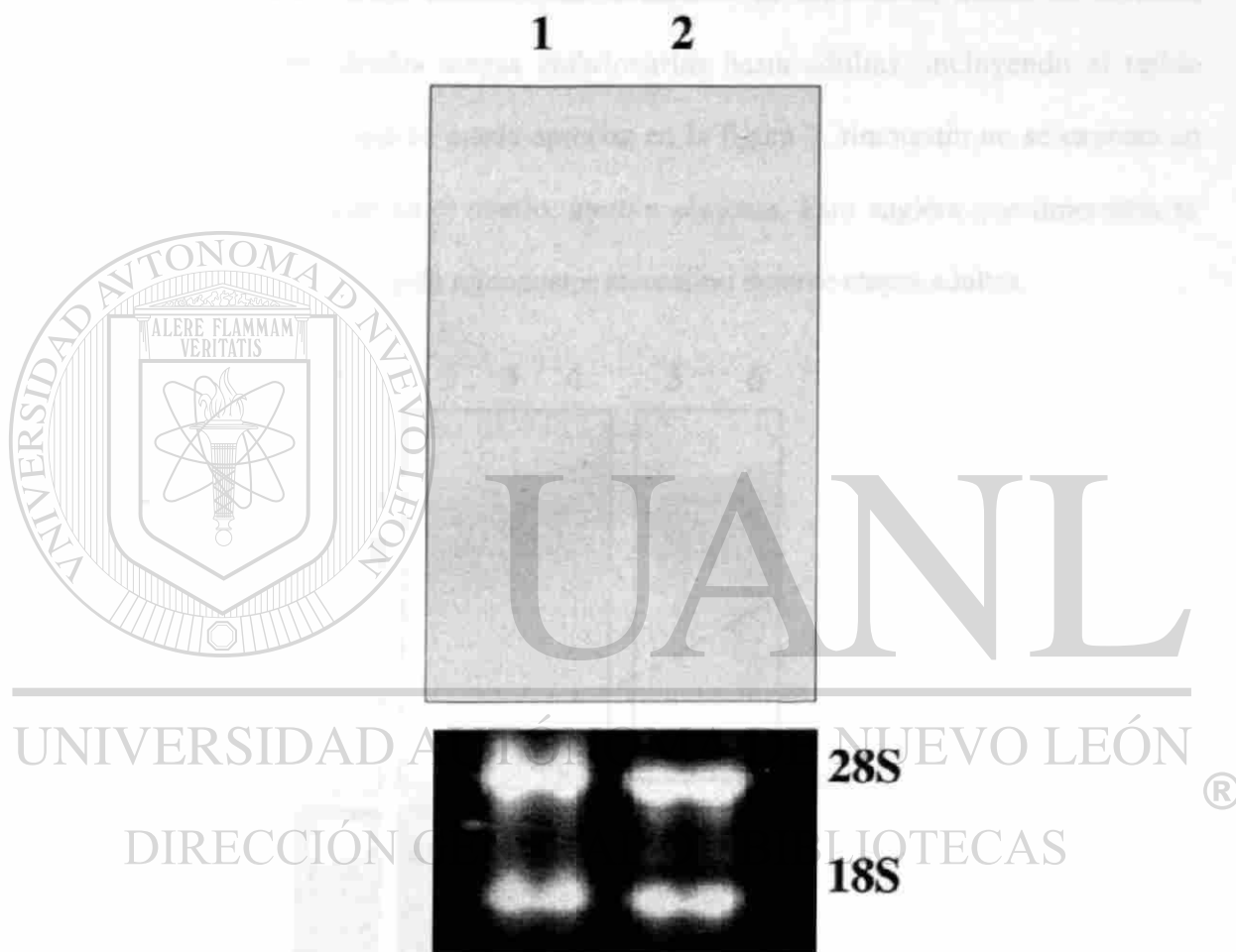


Figura 6. La expresión de timotestin es Ag-independiente. El northern blot contiene 10 μ g de ARN total. La membrana se expuso a un film de rayos X por 72 horas. ARN total de: 1. CD4⁺, 2. CD8⁺. Las bandas ribosomales 28 y 18S se tiñeron con bromuro de etidio como control de carga.

7.1.3. EXPRESION DE TIMOTESTIN EN TEJIDO REPRODUCTOR

7.1.3.a. Timotestin se expresa selectivamente en tejido testicular.

Análisis preliminares de distribución tisular indicaron que timotestin se expresa predominantemente en el timo y en el tejido testicular (fig 2). En virtud de estos importantes hallazgos, decidimos realizar estudios mas detallados de distribución tisular en diversos órganos reproductores desde etapas embrionarias hasta adultas, incluyendo el tejido reproductor femenino. Como se puede apreciar en la figura 7, timotestin no se expresa en gónadas fetales ni tampoco en el ovario, útero o placenta. Esto sugiere que timotestin se expresa predominante en el tejido reproductor masculino durante etapas adultas.

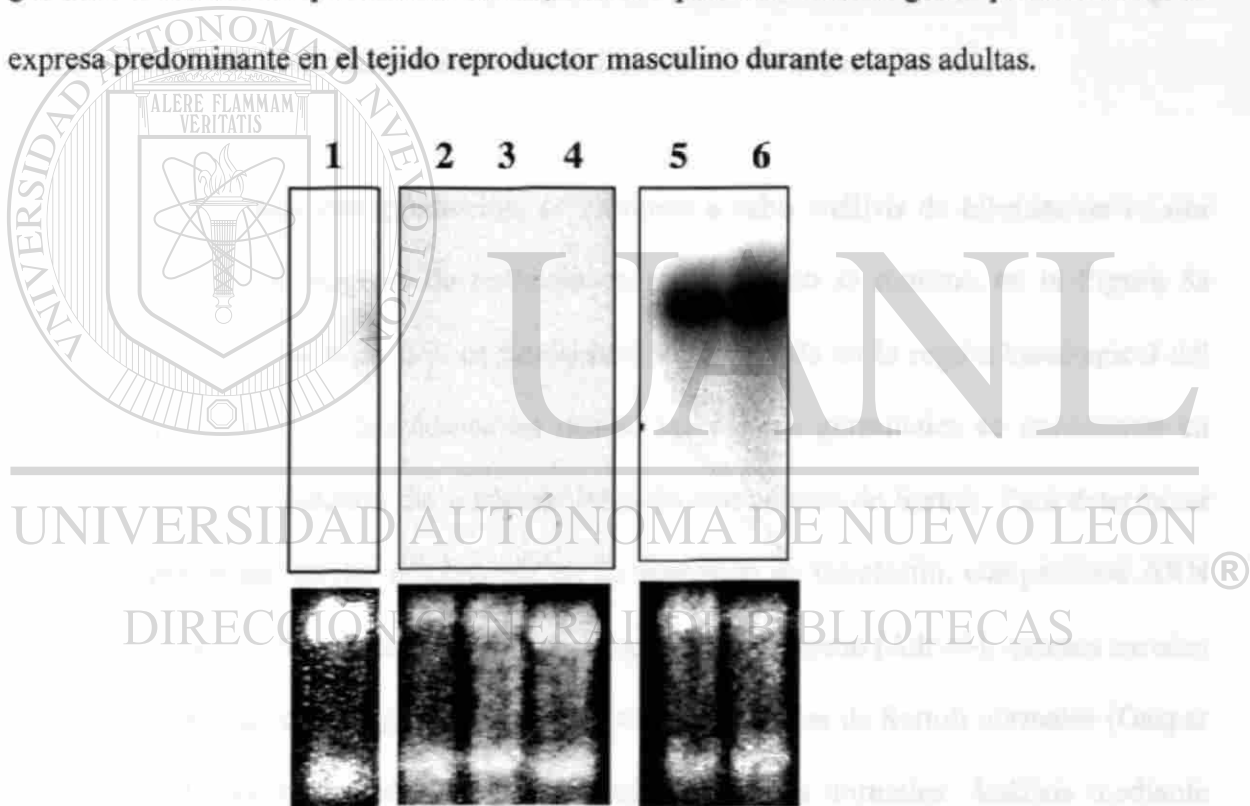


Figura 7. Expresión selectiva de timotestin por el tejido testicular. El northern blot contiene 10 μ g ARN total de cada tejido. 1.Gónadas fetales, 2.Ovario, 3. Utero, 4. Placenta, 5. Testículo, 6. Túbulos seminíferos. Las bandas ribosomales se emplearon como un control de carga.

7.1.3.b. Timotestin se expresa en células germinales.

En etapas adultas, los espermatozoides maduran en la zona basal-apical de los túbulos seminíferos, y finalmente son exportados hacia el epidídimo. Durante esta etapa de maduración las células germinales sufren drásticas alteraciones morfológicas mediadas por proteínas del citoesqueleto que favorecen la formación del flagelo. Todos estos mecanismos se presentan en etapas adultas (Tsutsui K., 1991; Hitzeman J.W., 1971; Johnson I., 1995, Mandal A., et al., 1999, Tanii I., et al., 1999, Robaire B., et al., 2002). Consistente con esta noción, la expresión abundante de timotestin en el tejido testicular en el ratón adulto sugiere un papel relevante y específico durante la maduración de los espermatozoides.

Para confirmar esta predicción, se llevaron a cabo análisis de hibridación *in situ* utilizando cortes histológicos de testículo de ratón. Como se muestra en la Figura 8a (fluorescencia roja), la expresión de timotestin fue detectada en la región basal-apical del túbulo seminífero, zona histológica en donde las células germinales se encuentran en diferentes etapas de maduración e interaccionando con células de Sertoli. Para determinar cual es la población celular responsable en la expresión de timotestin, comparamos ARN[®] total de testículo de ratones deficientes del receptor de andrógeno (Adr^{-/-}), quienes carecen de la producción de células germinales pero contienen células de Sertoli normales (Gaspar M.L. et al., 1991), contra el ARN de testículo de ratones normales. Análisis mediante northern blot (Figura 8B) demostraron que el transcrito de timotestin se encuentra totalmente ausente en tejido testicular Adr^{-/-}, indicando que timotestin es expresado selectivamente por células germinales.

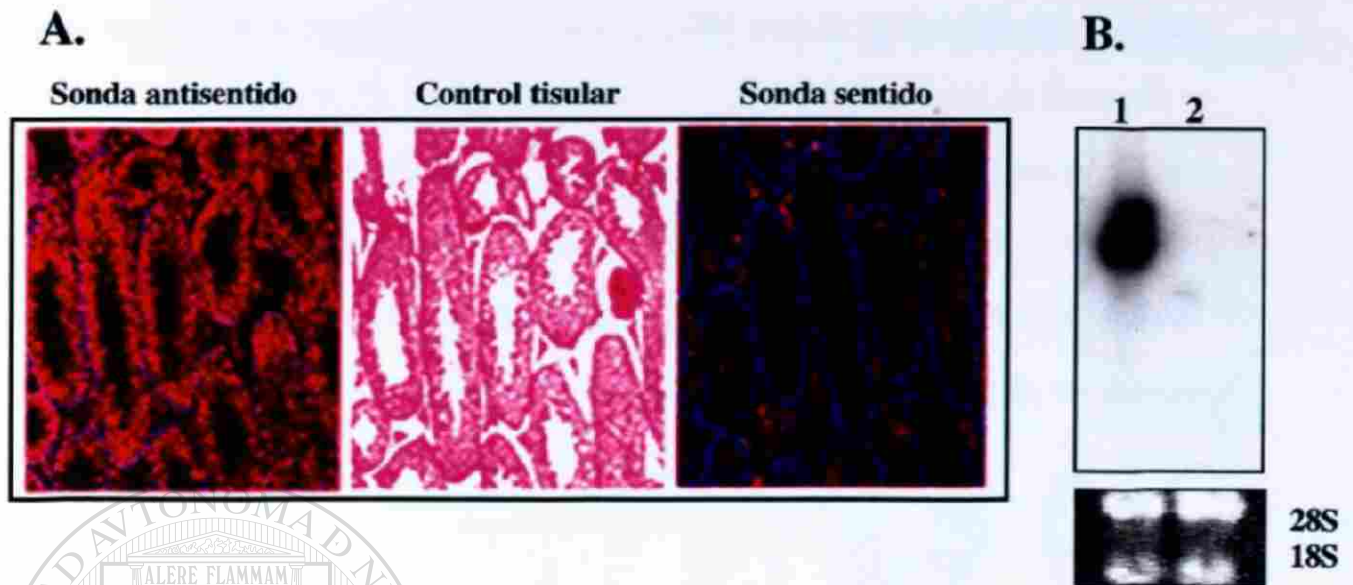
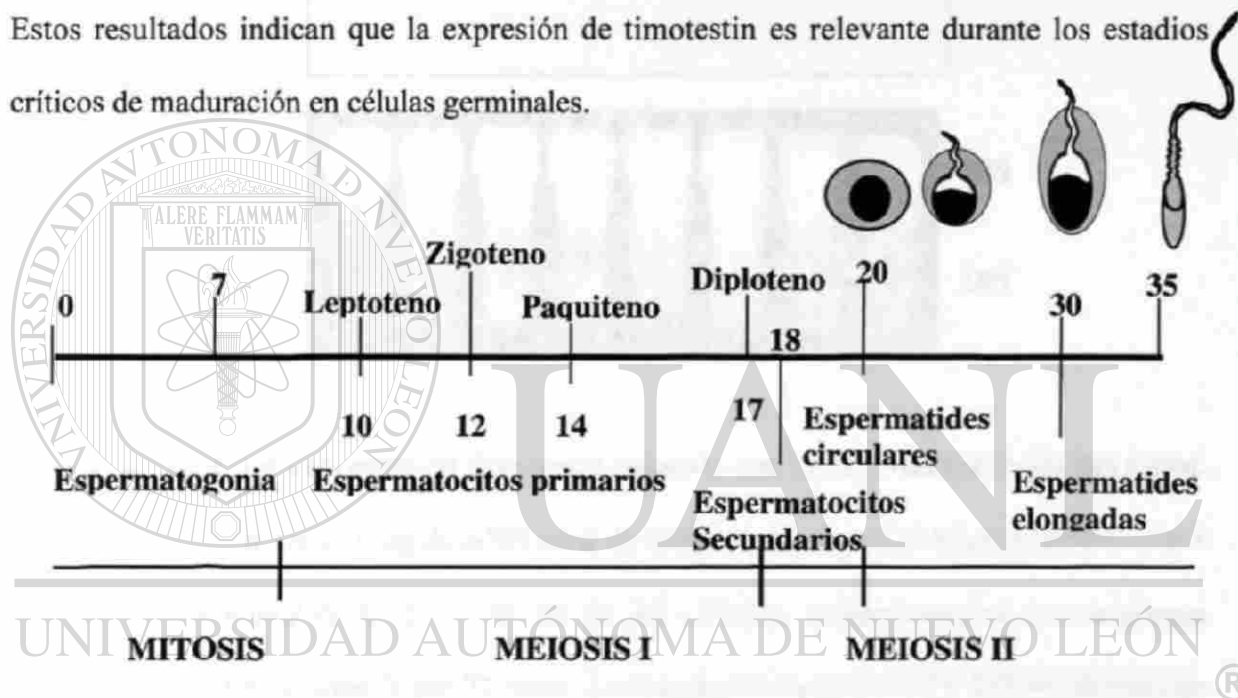


Figura 8. Timotestin se expresa selectivamente por espermatozoides. A. Corte sagital de túbulo seminífero de ratón adulto C57BL/6, hibridado con la sonda anti-sentido de timotestin (fluorescencia roja en el panel izquierdo), o la sonda control sentido (fluorescencia azul del cromógeno azul Hoechst 33342, en el panel derecho). La tinción eosina-hematoxilina del panel central (microscopía de luz visible) se utilizó como control de integridad tisular. B. Northern blot, con 10 µg de ARN total. 1. Ratón normal C57BL/6, 2. Ratón deficiente en el receptor del andrógeno (AR^{-/-}). Las bandas ribosomales 18 y 28S fueron teñidas con bromuro de etidio, como control de carga.

7.1.3.c. Timotestin se expresa en estadios críticos de la espermatogénesis.

La espermatogénesis en el ratón se inicia alrededor de los días 20-21 post-natales (Esquema 3). En esta etapa se detecta una gran expresión de proteínas involucradas en la

maduración de las células germinales (Deng W., 2002). Para determinar la relevancia de timotestin durante la espermatogénesis aislamos ARN total de tejido testicular de ratones C57BL/6 a edades de 9, 12, 17, 23, 30, 35, 45 y 54 días, y la expresión de timotestin se analizó mediante northern blot. El análisis reveló una expresión de timotestin relevante a partir del día 23 (Fig.9), etapa cuando se inicia la espermatogénesis en el ratón, y con un pico máximo de expresión en el día 35. Mas aún, tal expresión se mantiene estable hasta el día 54. Estos resultados indican que la expresión de timotestin es relevante durante los estadios críticos de maduración en células germinales.



Esquema 3. Cronología de la maduración de células germinales masculinas

murinas. La línea con los números indica la secuencia de eventos en los primeros 35 días post-parto (dpp). Los intervalos de la mitosis, meiosis I, meiosis II y espermatogénesis están descritos en la línea inferior. Las espermatogonias colonizan los túbulos seminíferos después del nacimiento, para madurar a espermatocitos, espermatides y espermatozoides, como se indica en el esquema (Russell L. et al., 1992). Los números indican los dpp.

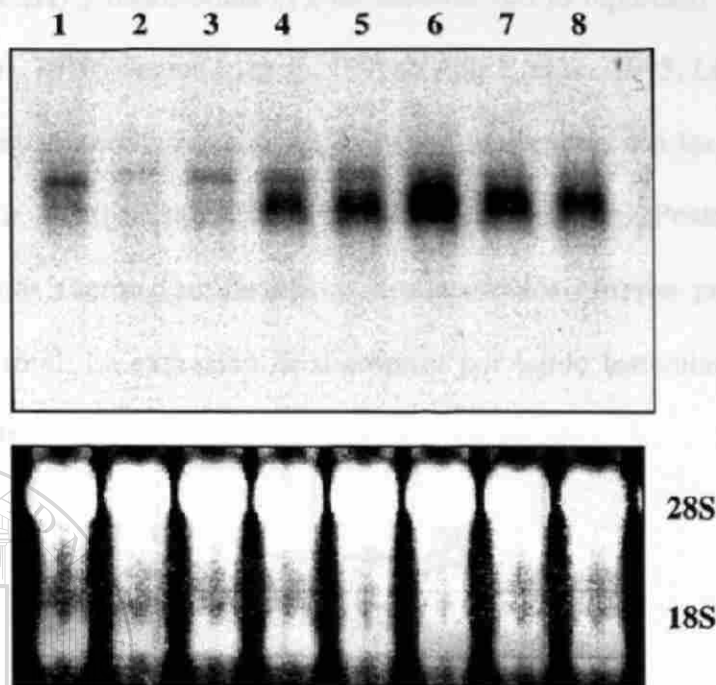


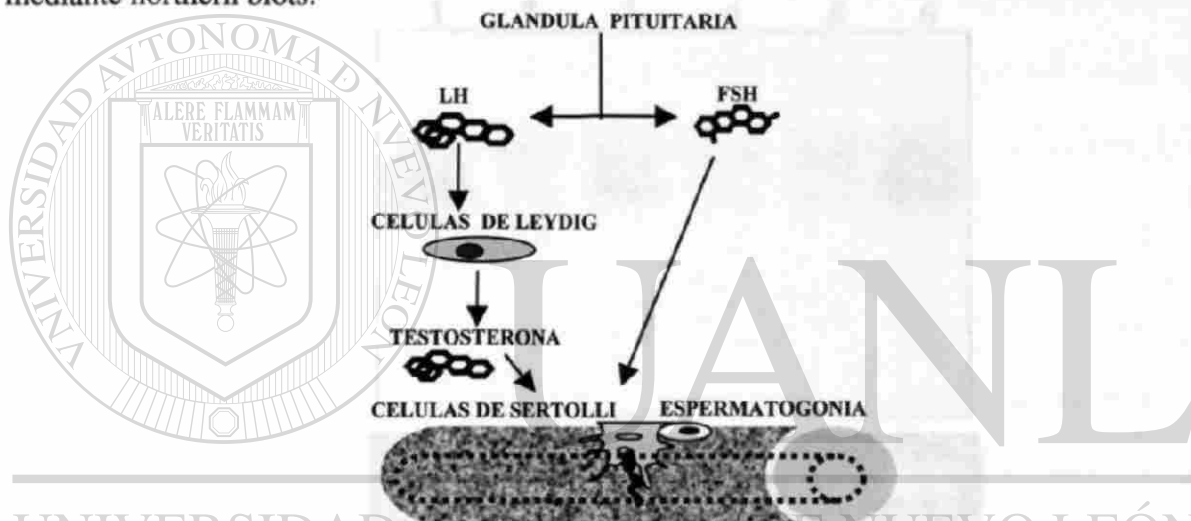
Figura 9. La expresión de timotestin coincide con la espermatogénesis del ratón.

El northern blot contiene 10 µg de ARN total de testículo de ratón C57BL/6. Carriles: 1 al 8 muestras de ARN total de 9, 12, 17, 23, 30, 35, 45 y 54 días respectivamente. La membrana se expuso a un film de rayos X por 72 horas. Las bandas ribosomales 18 y 28S se tiñeron con bromuro de etidio y se utilizaron como control de carga.

7.1.3.d. Regulación hormonal sobre la expresión de timotestin.

Timotestin es una molécula que se expresa abundantemente durante la espermatogénesis, lo cual sugiere que su expresión puede estar regulada por hormonas del eje hipofisario (Esquema 4). Para investigar esta posibilidad, utilizamos ratones hipofisectomizados (que carecen de la expresión de timotestin en testículo) y administramos

por vía subcutánea en la región dorsal del cuello del ratón, las hormonas luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH) y testosterona (T), en acuerdo con lo reportado en la literatura (Blackshaw A.W., et al. 1970; Neuma I., et al., 1991; Singh J., et al., 1995; Lidsey J.S., et al. 1996). Este experimento se realizó con el fin de determinar cuales son las hormonas que tienen una influencia positiva sobre la expresión de timotestin. Posteriormente al tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los testículos fueron procesados para aislamiento de ARN total. La expresión de timotestin por tejido testicular fue detectada mediante northern blots.



Esquema 4. Control de la espermatogénesis por hormonas del eje hipofisario-testicular. La glándula pituitaria secreta la LH, que actúa en las células de Leydig para promover la producción y secreción de testosterona (T). La T actúa en las células de Sertoli y favorece la maduración de los espermatozoides. La FSH es producida y secretada por la hipófisis y actúa directamente sobre células de Sertoli. Los ratones hipofisectomizados carecen de la producción de las hormonas folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y testosterona (T).

En la figura 10, se puede apreciar que las hormonas FSH y testosterona no tuvieron ningun efecto en la expresión de timotestin en ratones hipofisectomizados (carriles 2 y 4 respectivamente, sin embargo la hormona luteinizante (LH) fue la unica hormona que indujo parcialmente la expresión de timotestin en los testículos de ratones hipofectomizados, comparada con el ratón hipofisectomizado sin tratamiento (carril 5). Estos datos sugieren que ademas de la LH, se requieren otros factores (incluyendo citosinas) para iniciar la expresión de timotestin en testículo.



Figura 10. La hormona luteinizante favorece la expresión de timotestin en testículo. Northern blot con 10 μ g de ARN total de testículo. 1. Ratón C57BL/6 de 54 días (control normal). Las muestras de ARN de los siguientes carriles corresponden a ratones hipofisectomizados con administración de las siguientes hormonas: 2. Hormona foliculoestimulante, 3. Hormona luteinizante, 4. Testosterona; 5. Ratón hipofectomizado (control negativo) y 6. Ratón pseudo-hipofisectomizado (cirugía de cráneo sin remover la hipófisis). Bandas de ARN ribosomal utilizadas como control de carga.

7.2. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA TIMOTESTIN.

7.2.1. Identificación de motivos que deducen la localización subcelular y sugieren su relevancia funcional.

Timotestin es una nueva molécula descubierta por nuestro laboratorio y reportada bajo el número de acceso (Pendiente), en el banco de genes del NCBI. Análisis preliminares de búsqueda en el banco de genes del NCBI, demostraron que timotestin contiene un 57% de similitud con dominios de proteínas contráctiles de citoesqueleto de la familia ezrina-radixina-moesina (ERM). Para validar y confirmar estas predicciones utilizamos un número mayor de programas analíticos existentes, para localizar dominios estructurales que sean indicativos de una función determinada.

Para determinar estructuras secundarias de la proteína timotestin, utilizamos el programa CD-search, DART y MacStripe 2.0 (Altschul S.F. et al., 1997; Schaffer A.A., et al., 1999; Lupas A., et al., 1991; Lupas A., 1996; Parry D.A.D., 1982), mediante estos análisis detectamos dominios espiral-espiral que abarcan las posiciones de los aminoácidos 632 hasta 889, como se muestra en la figura 11 (aminoácidos subrayados). Estos dominios se presentan en un gran número de proteínas del citoesqueleto y en ocasiones su función esta regulada mediante mecanismos de fosforilación. Para determinar la existencia de aminoácidos con una alta probabilidad de fosforilación, utilizamos el programa Netphos (Blom N., et al., 1999). Mediante este programa analítico identificamos varios aminoácidos candidatos a fosforilación, como se muestra en la tabla 1. Estos aminoácidos presentaron un índice de probabilidad >0.700 , este rango indica una probabilidad aceptable de fosforilación. Durante este análisis detectamos dos regiones que tienen una alta probabilidad de

fosforilación y pueden sugerir motivos funcionales. (i) La secuencia TPPPSKDNA (Fig 11.) que es rica en prolinas, es indicativa de interacción con dominios SH3 presentes en proteínas tirosinas cinasas (Guappone A.C., et al., 1997; Hao S., et al., 2002; Susuki-Inoue K., et al., 2002), lo cual sugiere la activación potencial de la cinasa y fosforilación de la serina presente en timotestín. (ii) El otro sitio identificado en timotestín es una tirosina (IMDVYEMKL), que se localiza a cuatro aminoácidos antes de iniciarse los dominios espiral-espiral (Fig 12). Este sitio es clave durante la fosforilación porque puede inducir cambios conformacionales en estos dominios y activar la función de timotestín. Este tipo de sitios también se encuentran en las proteínas ERM, que en su estado inactivo se encuentran en forma de herradura, pero al fosforilar la tirosina cerca de los dominios espiral-espiral induce cambios estructurales que facilitan la unión a proteínas del citoesqueleto así como a colas intracitoplasmáticas de receptores membranales (Tsukita S., et al., 1999; Bretscher A., et al., 2000).

Continuando con el análisis estructural de timotestín identificamos 2 sitios transmembranales en la región amino terminal en los aminoácidos 68-84 (ISASLILSIISLLSQLA) y 202-219 (SSLTVVVFALSILSSLTL) (Fig.12) mediante el programa PSORT (Nakai K., et al., 1992). Estos mismos datos fueron confirmados por el programa de proteínas transmembranales TMHMM (Moller S., et al., 2001), situando la proteína timotestín en la membrana celular.

Posición	Secuencia consenso	Probabilidad	Aminoácido
432	CGDDSLKMH	0.928	Serina
470	KVADSELCK	0.916	Serina
590	TPPPSKDNA	0.839	Serina
622	DIRISDIMD	0.982	Serina
702	QQLESERAQ	0.830	Serina
732	ILTKSYMEL	0.932	Serina
794	KEVQSQLAD	0.853	Serina
812	KIAKSQEEK	0.992	Serina
839	RKELSRTEQ	0.978	Serina
849	RKELSIKAS	0.994	Serina
854	IKASSLEMH	0.995	Serina
252	DGTLTRKYS	0.700	Treonina
443	KILTTLKCT	0.714	Treonina
512	PRLITPLAF	0.710	Treonina
668	RCQRTQAET	0.727	Treonina
743	RNEATEKKN	0.825	Treonina
752	TDLQTTCES	0.710	Treonina
763	KHIETMKKL	0.715	Treonina
628	IMDVYEMKL	0.758	Tirosina

Tabla 1. Aminoácidos de la proteína timotestín con una alta probabilidad de fosforilación.

Con base en los dominios estructurales identificados, timotestín es una proteína de membrana celular, que puede asociarse o activar tirosinas cinasas (src, fyn, yes, hik, lck, lyn, etc) a través de sus dominios ricos en prolínas (Yu, H., et al., 1994), con la posible capacidad

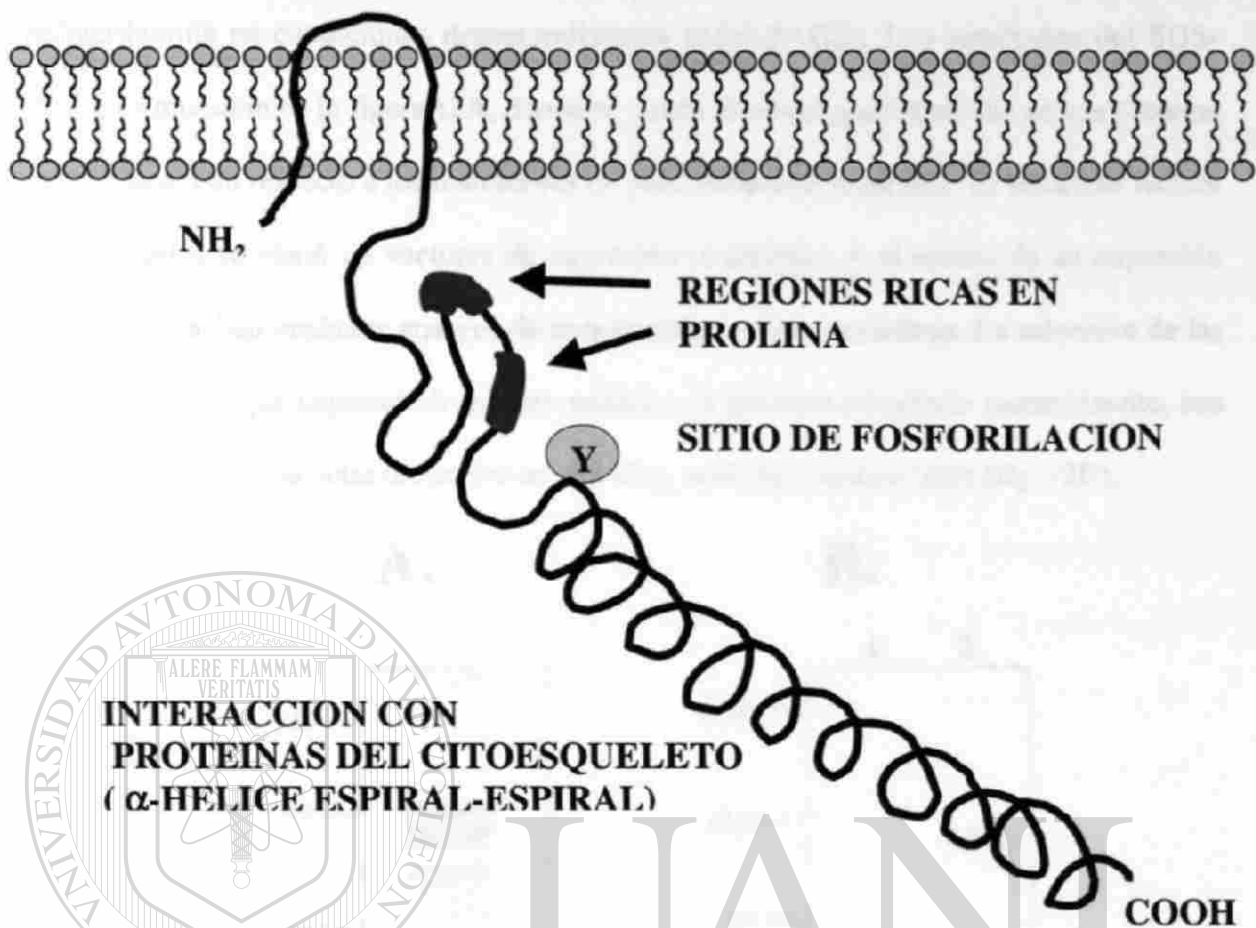
de iniciar transducción de señales, mediante su receptor o ligando, y así mismo interactuar con proteínas contráctiles del citoesqueleto a través de sus dominios α -hélices espiral-espiral (Ver esquema 5).

```

1  MDSTACLKELLSISQYKAVRSEANATQLLRHLEVVSQGKLRTRLFQTSHQI
51  LPSECLSCVLELLEDPNISASLILSIISLLSQLAIDNETRDCLQNIYNLN
101 SVLSGVVCRSSACHNDSVFLQCIQLLQRLTYNAKFFHSGAHIDDLITFLI
151 GHVQSSSEDELTPCLGGLANLCRHNLVSVQTQIKTLSNVKSPFYRTLISFLA
201 HSSSLTVVVFALSILSSLTENEEVGEKLPFARNIHQTFQLIFNILINGDGT
251 LTRKYSVDLLMDLLKNPKIADYLTRYENFSSCLSQVLGGLNAKDPDSSSK
301 VLELLLAFCAVTQLRHVLSQMMFEQSPSGNILGSRPKSLEPTAALLRWLS
351 QPLDGAENCSVLALELFPKEIFEDVIDTGNCSSTDFVTLLLPTILDQLQF
401 KEQNLDETLVRNKCERMVKAIEVLLTLCGDDSLRMHVVKILTTLKCTTLI
451 EQQPTYGKIDLGFGTKVADSELCRLAADVILRTLTLMNKLRQLVPGNEVS
501 FYKILQDPRLITFLAFALTSDNREQVQSGLGILLEASPLEDFPAFVLGES
551 IAANNVYRQQETEHLPRKMTFQPLNHGFSTSAKCLTPPPSKDNAPALNIE
601 DLIEKLQAGVMVKQQISDIRISDIMVYENKLSTLASKESRLQDLLEAKA
651 LALAQADRLIAQYRCQHTQAETEARTLAGMLREVERKNEELSVLLKSQQL
701 ESERAQNDIEHLFQHSKKLESVAAEHEILTKSYMELVORNEATEKKNTDL
751 QTTCESLNKHIETMKKLNEALKQQNERTIAQLIEREEQRKEVQSQLADRE
801 CKLSNLHKIAKSQEERLNVLQKEKEDRQETIDILRKELSRTEQIRKELSI
851 KASSLEMHKAQLEGRLEERESLLKLQQEELNKHSHMIAMIHSLSGGKISF
901 ETVNLSI.

```

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la proteína timotestín. Los aminoácidos que forman parte de los dominios transmembranales se localizan en el recuadro. Los aminoácidos que constituyen los dominios α -hélice espiral-espiral, están subrayados. Las regiones ricas en prolina están marcadas con una línea punteada.



INTERACCION CON
PROTEINAS DEL CITOESQUELETO
(α -HELICE ESPIRAL-ESPIRAL)

Esquema 5. Modelo hipotético de la proteína timotestin en timocitos y células

germinales.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

7.2.2. Timotestin es una proteína con una masa molecular de 102 kilo Daltons

(kDa).

La secuencia de aminoácidos de timotestin se dedujo a partir del análisis del marco de lectura mediante el uso del programa edit-seq del software dnastar. Con estos resultados se determinó que la proteína timotestin posee una masa molecular de 102 Kda. Para comprobar el peso molecular de timotestin obtenido mediante el software dnastar, utilizamos un sistema de producción de proteínas *in vitro* que fueron radiomarcadas y analizadas mediante geles de

poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los resultados del SDS-PAGE se muestran en la figura 12A, donde se puede observar que timotestin es una proteína de 102 Kda, con respecto a los marcadores de peso molecular conocido. El marco de lectura de timotestin se clonó en vectores de expresión eucariótica y el efecto de su expresión forzada se analizó mediante ensayos de transfección en líneas celulares. La selección de las líneas celulares que expresan de manera estable a la proteína timotestin recombinante, nos permitió confirmar la masa molecular de 102 kDa, mediante western blots (fig. 12B).

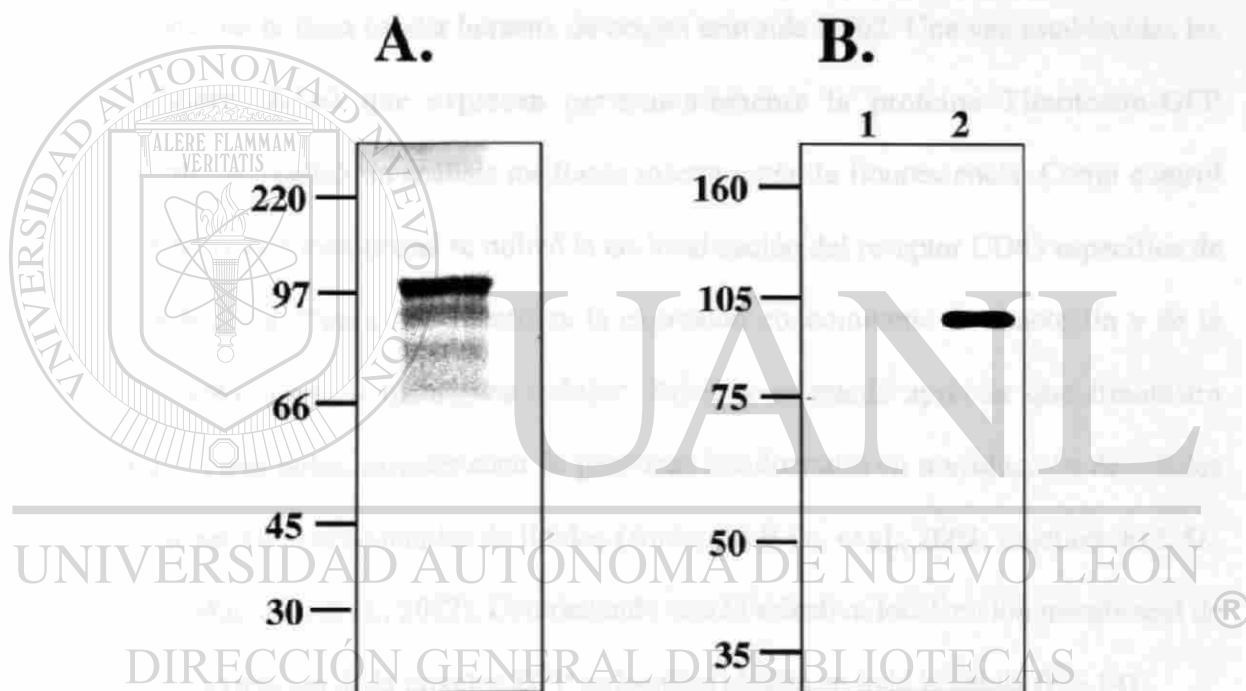


Figura 12. La proteína timotestin tiene una masa molecular de 102 kDa. A. Autoradiografía de un SDS-PAGE al 7.5%. Los Marcadores de peso molecular se encuentran a la izquierda del producto de la reacción de la transcripción- traducción *in vitro* de timotestin. La proteína fue detectada mediante la incorporación de metionina ^{33}S y expuesta a film de rayos-X por 14 horas. **B.** Análisis mediante western blot utilizando 30 μg de proteína total de las líneas celulares Jurkat, transfectadas con: 1. Vector-control, 2. Timotestin-flag. Para la detección de la proteína timotestin se utilizó un anticuerpo anti-Flag conjugado a la peroxidasa de hidrogeno.

7.3. CONFIRMACION DE QUE TIMOTESTIN SE LOCALIZA EN LA MEMBRANA CELULAR.

Análisis de predicción estructural revelaron que la proteína timotestín posee dos regiones de aminoácidos con alto índice hidrofóbico, característica de moléculas de membrana celular. Para corroborar esta predicción y determinar la localización subcelular *in situ*, fusionamos timotestín con la proteína verde fluorescente (GFP) y realizamos transfecciones en la línea celular humana de origen eritroide K562. Una vez establecidas las líneas celulares K562 que expresan permanentemente la proteína Timotestín-GFP recombinante, se realizó un análisis mediante microscopía de fluorescencia. Como control interno de expresión membranal se utilizó la co-localización del receptor CD43 específica de la célula K562. La figura 13C identifica la expresión concomitante de timotestín y de la molécula CD43 sobre la membrana celular. Además se puede apreciar que timotestín presenta un patrón polar, característico de proteínas involucradas en transducción de señales que se localizan en microdominios de lípidos (Anderson R.G., et al., 2002; Zajchowski L.D., et al., 2002; Matko J., et al., 2002). Contrastando con la selectiva localización membranal de timotestín, la expresión de la proteína GFP se localiza ubiqa en toda la célula (Fig.14).

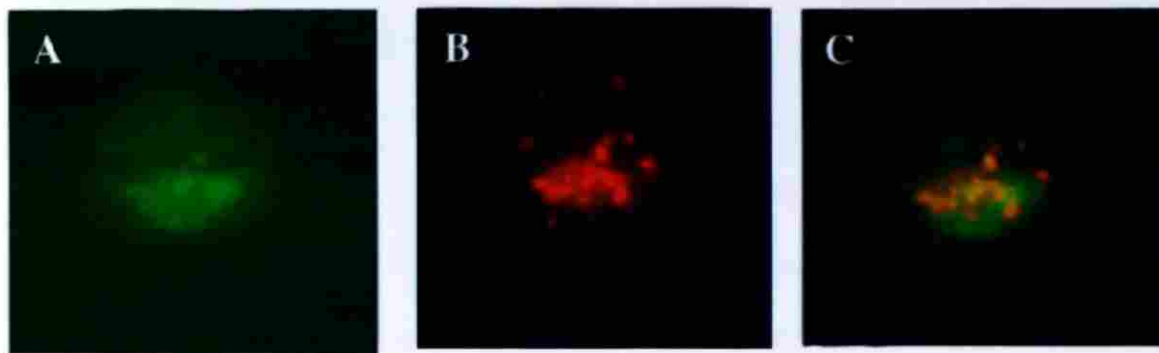


Figura 13. Timotestin se localiza en la membrana de las células K562. A. Análisis de localización subcelular de timotestin-GFP, mediante microscopía de flourescencia. B. Identificación del marcador de superficie CD43 mediante flourescencia roja-Alexa-flour 594. C. Sobrelapamiento de la imágenes A y B. Las imágenes fueron procesadas mediante el programa adobe photoshop 5.5.

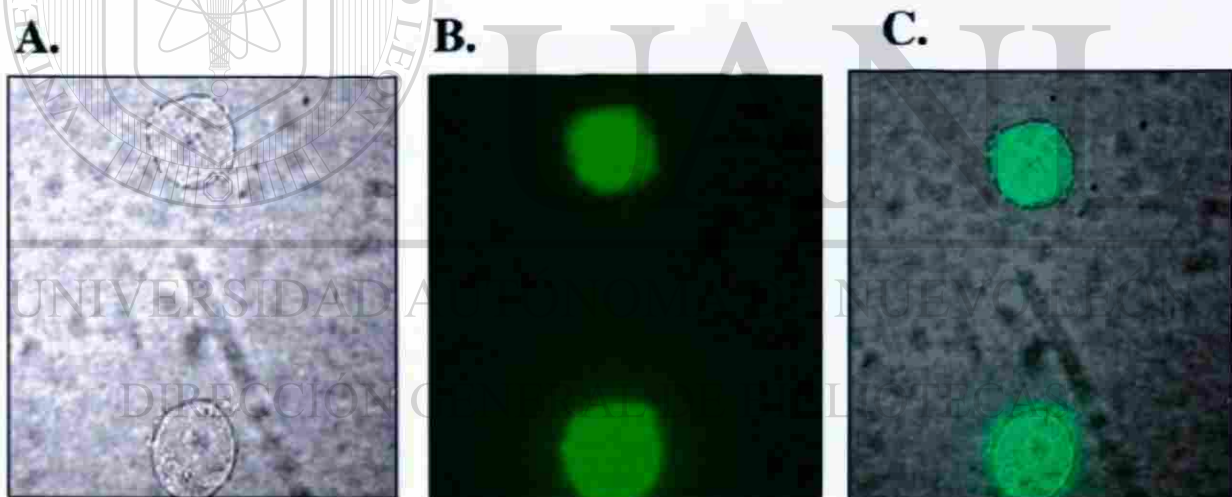
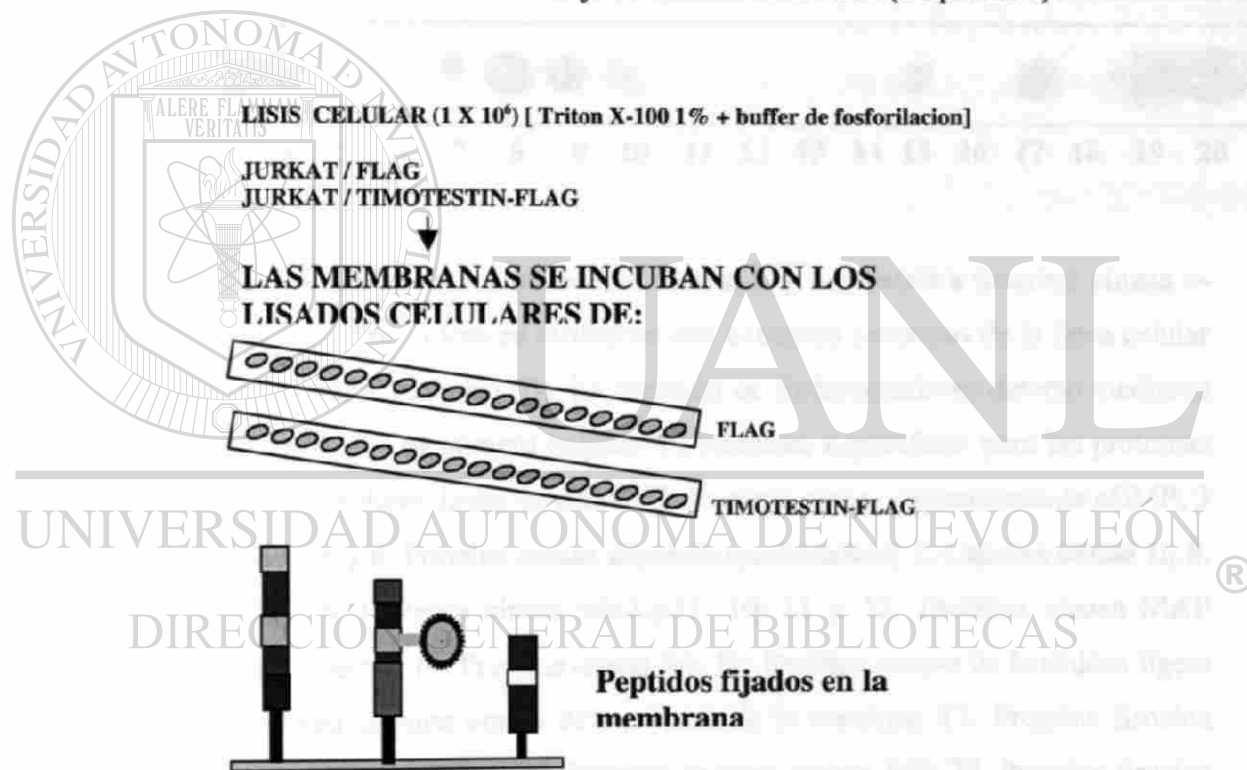


Figura 14. Análisis de expresión de la proteína GFP en células K562. A. Análisis celular mediante microscopía de contraste de fases B. Análisis de localización subcelular del vector-GFP, mediante microscopía de flourescencia. C. Sobrelapamiento de la imágenes A y B. Las imágenes fueron procesadas mediante el programa adobe photoshop 5.5.

7.4. LA FUNCION DE TIMOTESTIN

7.4.1 Timotestin activa la proteina tirosina cinasa pp60 c-src.

Con base en su localización subcelular y a las propiedades fisicoquímicas de la proteína timotestin, postulamos que timotestin podría interaccionar con proteínas cinasas. Para validar esta hipótesis, se estableció la línea celular (Jurkat [Humana]) que sobrexpresó la proteína recombinante timotestin fusionada con un péptido flag, con sus respectivos vectores control. Para determinar si timotestin tiene la capacidad de activar o inducir la fosforilación de cinasas utilizamos un tamizaje de cinasas comercial (Esquema 6).



Esquema 6. Tamizaje comercial para proteínas cinasas. Las membranas de nitrocelulosa Phosphospot contienen 20 sustratos específicos (fijados en la membrana de nitrocelulosa) para 16 proteínas cinasas, solamente las enzimas en estado activo son capaces de transferir γ ³²P hacia el sustrato y su detección se realiza mediante autoradiografía de rayos X.

Para el análisis de fosforilación se utilizaron lisados celulares de las líneas celulares Jurkat que sobrepresan el vector control (flag) y timotestin-Flag recombinante (Fig 12B) y se incubaron con el buffer de fosforilación de acuerdo al protocolo descrito en la sección de material y métodos. La figura 15 demuestra que timotesin tiene la capacidad de inducir exclusivamente la actividad catalítica de la caseína cinasa II y la tirosina cinasa pp60 c-src.

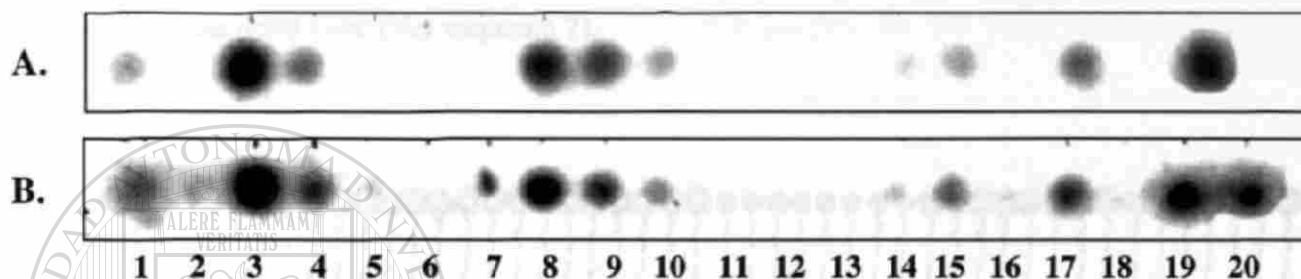
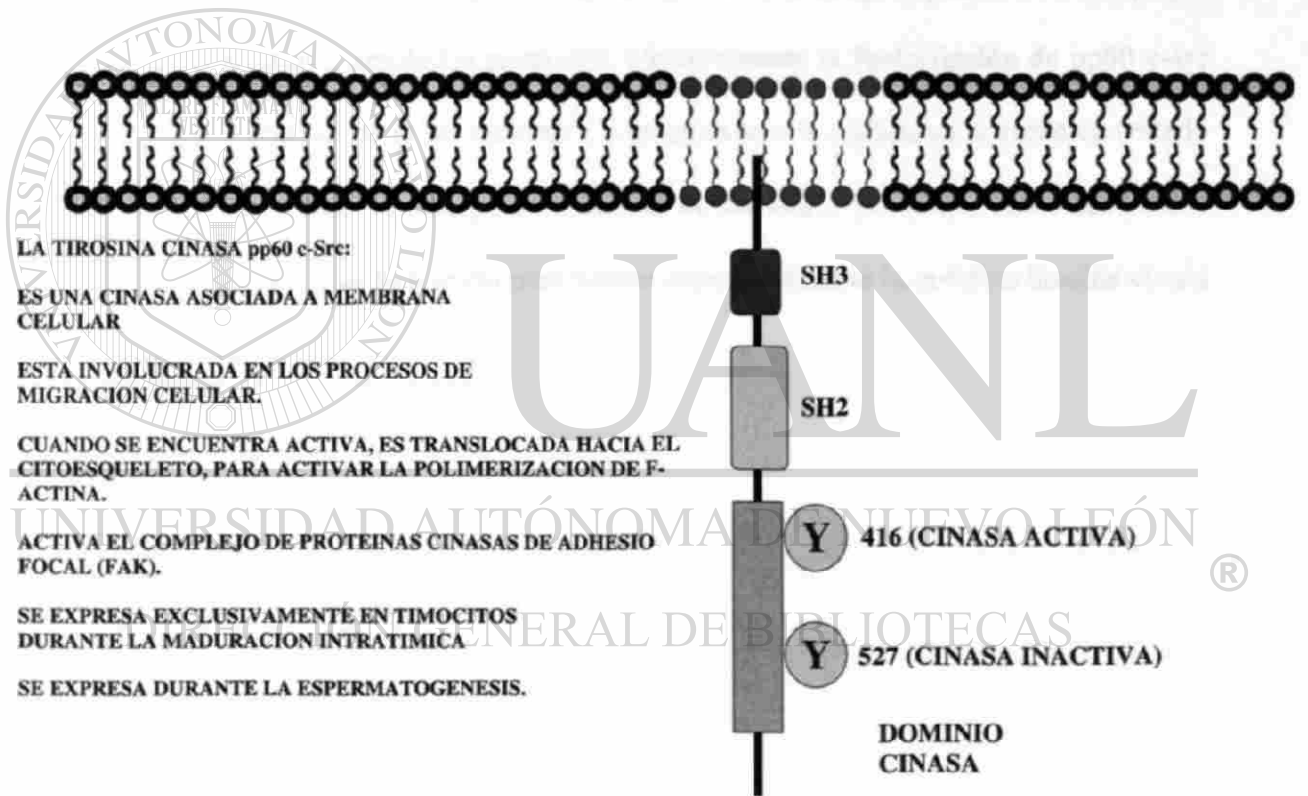


Figura 15. Timotestin activa la caseína cinasa II y la proteína tirosina cinasa c-Src. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con extractos proteicos de la línea celular Jurkat-vector (A) y Jurkat Timotestin (B). La reacción de fosforilación se detectó mediante autoradiografía de rayos X. Los número indican los sustratos específicos para las proteínas cinasas: 1. Proteína cinasa dependiente de cAMP; 2. Proteína cinasa dependiente de cGMP; 3 y 4. Proteína cinasa C; 5 y 6. Proteína cinasa dependiente de calcio; 7. Caseína cinasa II; 8. Proteína cinasa cdc2; 9. Proteína cinasa cdc2-p34; 10, 11 y 12. Proteína cinasa MAP p42/p44; 13. Caseína cinasa I; 14. Proteína cinasa S6; 15. Proteína cinasa de la cadena ligera de miosina; 16. Proteína tirosina cinasa del receptor de la insulina; 17. Proteína tirosina cinasa Csk; 18. Proteína cinasa Raf-1; 19. Proteína tirosina cinasa Abl; 20. Proteína tirosina cinasa pp60 c-src.

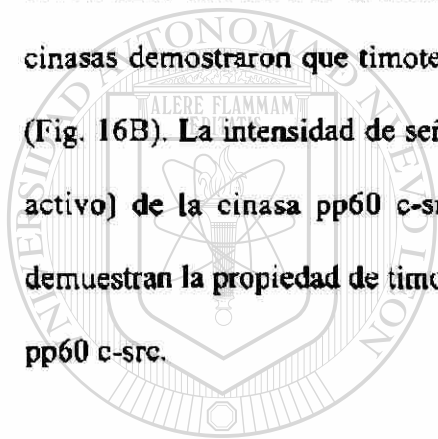
Los resultados del tamizaje de fosforilación indican que la proteína tirosina cinasa pp60 c-src es un candidato idóneo para interactuar con timotestin por varias razones: 1) pertenece a la familia de tirosinas cinasas Src, que son importantes en los procesos de

maduración tanto en el sistema inmune, como en el reproductor (Gares S.L., et al., 1999; Kornovski B.S., et al, 1994; Lacy H., et al., 2001), 2) se localiza en membrana celular (Rodgers W., 2002), 3) tiene la propiedad de activar proteínas contráctiles cuando se transloca al citoesqueleto (Sai X., et al., 1999), y 4) su activación esta implicada en la migración celular (Hall C.L., et al. 1996; Liu J., et al., 1999). Con base en estas características funcionales nuestros experimentos se enfocaron específicamente sobre la tirosina cinasa pp60 c-src (Ver esquema 7).



Esquema 7. Representación gráfica de la proteína tirosina cinasa pp60 c-src y sus principales características fisicoquímicas y biológicas. Los números colocados en la tirosina (Y), representan la posición de los aminoácidos. La fosforilación en la tirosina 527 y 416 indican un estado inactivo y activo respectivamente de la cinasa c-src.

Para validar los resultados del tamizaje de cinasas, analizamos la expresión de la tirosina cinasa c-src a nivel proteico en las clonas Jurkat. El análisis mediante western blot (Fig 16A), detectó a la proteína c-src con un peso molecular de 60 kDa, cuyos niveles de expresión son semejantes tanto en la línea Jurkat control como la que expresa establemente timotestin-flag. Durante el análisis de western blot utilizamos un anticuerpo que reconoce un epítipo entre los aminoácidos 89-169 de la proteína pp60 c-src, por lo que no se puede diferenciar la forma fosforilada de c-src localizadas en las tirosinas 416 y 527. Para analizar la actividad catalítica de la cinasa pp60 c-src, ensayos de inmunoprecipitación de complejos cinasas demostraron que timotestin promueve efectivamente la fosforilación de pp60 c-src (Fig. 16B). La intensidad de señal radiactiva corresponde a la capacidad enzimática (estado activo) de la cinasa pp60 c-src, para fosforilar el sustrato proteico. Estos resultados demuestran la propiedad de timotestin para activar específicamente la proteína tirosina cinasa pp60 c-src.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

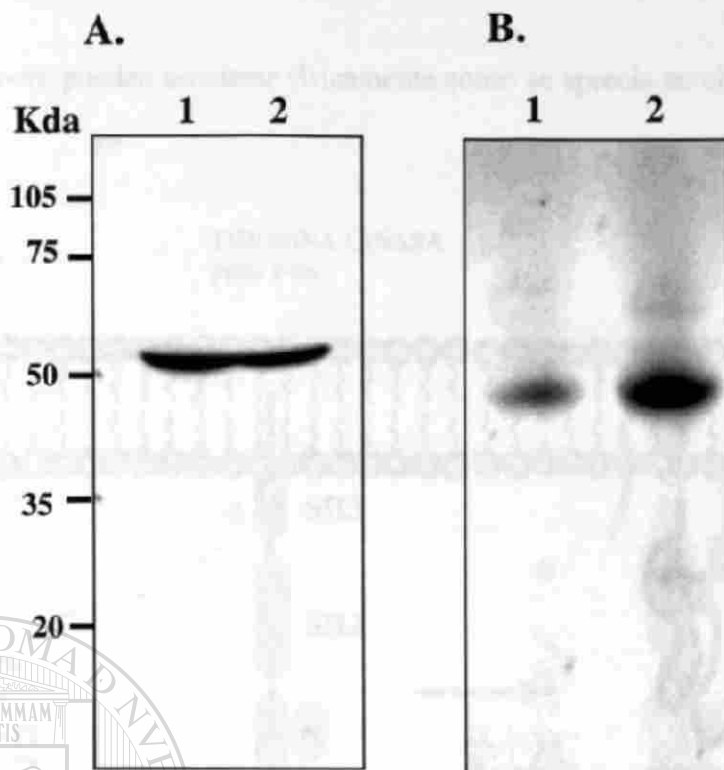


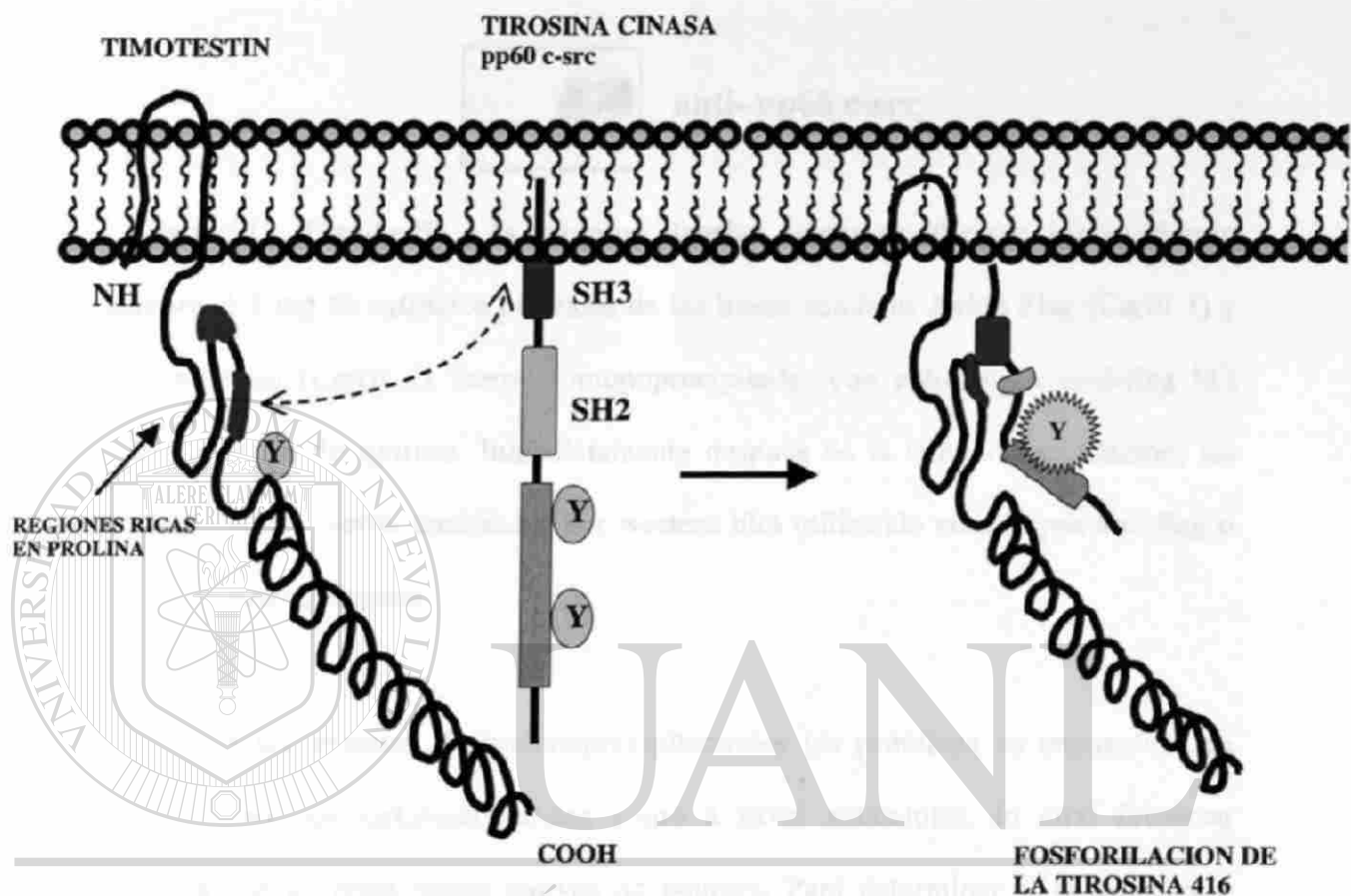
Figura 16. Análisis de expresión y fosforilación de la proteína tirosina pp60 c-Src. **A.** Análisis de western blot con 30 μ g de extractos proteicos. **B.** Ensayo de inmunoprecipitación de complejos cinasas, la reacción se detectó mediante autoradiografía de rayos X, con un tiempo de exposición de 18 horas. Para cada uno de los ensayos se utilizaron las clonas celulares Jurkat vector control y Timotestin-flag, que representan los carriles 1 y 2 respectivamente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

7.4.2. Timotestin se co-localiza e interacciona con la proteína tirosina cinasa pp60 c-src en la superficie de linfocitos T.

Timotestin es una proteína de membrana celular que tiene la función de activar directa o indirectamente la proteína cinasa c-src. Análisis de la secuencia de aminoácidos de timotestin demostraron la presencia de regiones ricas en prolina, los cuales favorecen las interacciones con las regiones SH3 de las tirosinas cinasas (Lau A.F., et.al. 1996). Esto indica

que timotestin y c-src pueden asociarse físicamente como se aprecia en el modelo hipotético del esquema 8.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Esquema 8. Modelo hipotético de interacción entre la proteína timotestin y la tirosina cinasa pp60 c-src.
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Con base en nuestra hipótesis realizamos ensayos de inmunoprecipitación para determinar el tipo de interacción entre timotestin y pp60 c-src. Estos análisis revelaron que la proteína cinasa c-src esta asociada al complejo inmune precipitado con el anticuerpo anti-Flag, como se observa en la figura 17 demostrando la asociación directa o indirectamente entre timotestin y la cinasa c-src.

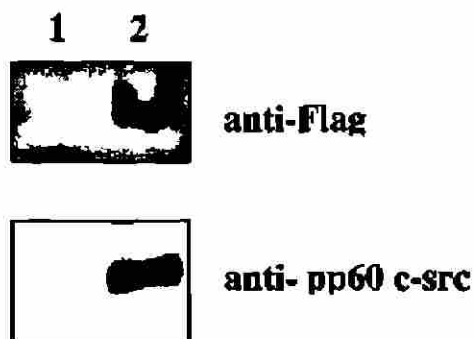
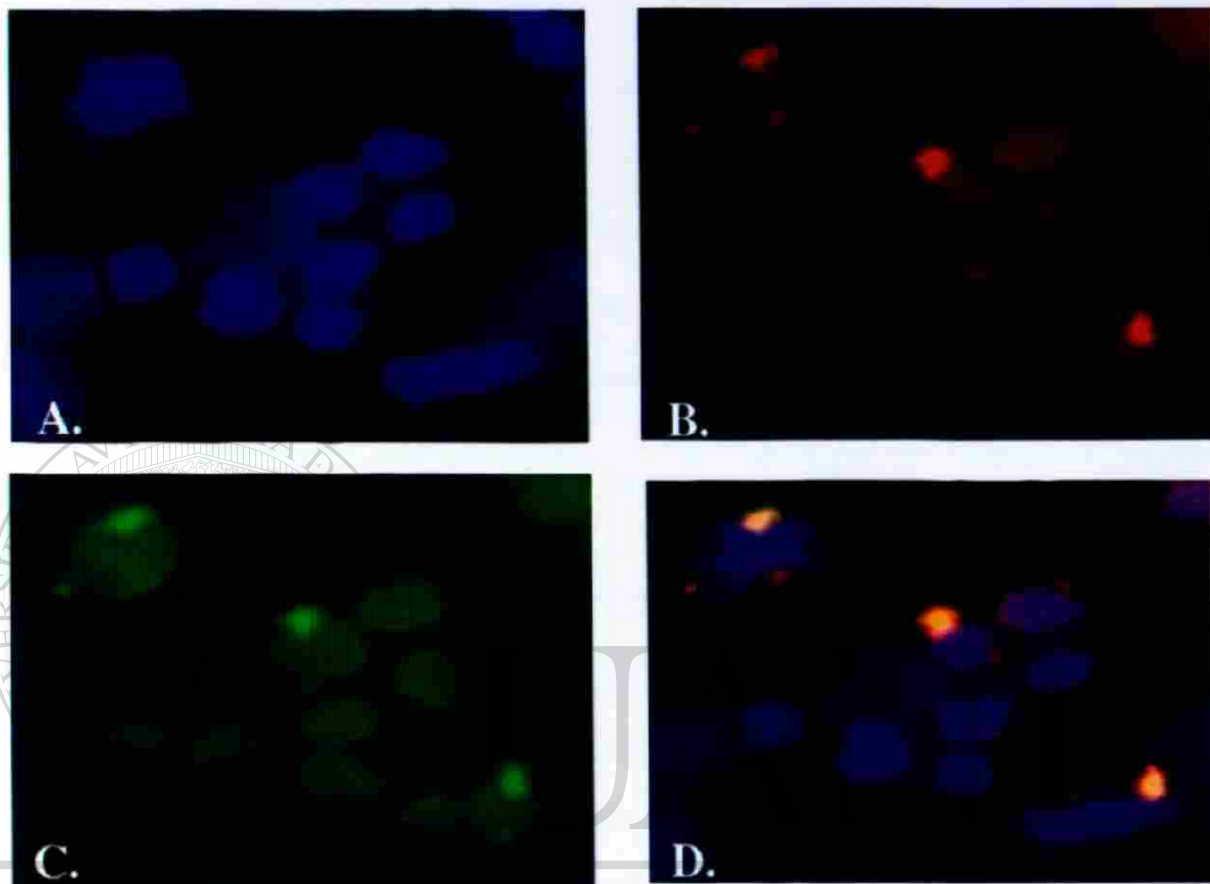


Figura 17. Timotestín y la proteína tirosina cinasa pp60 c-src, interaccionan físicamente. 1.5 mg de extractos proteicos de las líneas celulares Jurkat Flag (Carril 1) y Jurkat Timotestin (Carril 2) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-flag M2 conjugado a perlas de agarosa. Inmediatamente después de la inmunoprecipitación, los complejos proteicos fueron analizados por western blot utilizando anticuerpos anti-flag o anti-pp60 src respectivamente.

Durante los ensayos de inmunoprecipitaciones las proteínas se encuentran en suspensión y no compartimentalizadas como a nivel subcelular, lo cual favorece interacciones que en condiciones nativas no ocurren. Para determinar si la asociación subcelular de timotestín y pp60 c-src ocurre en células intactas, realizamos análisis de co-localización en la línea celular Jurkat que expresa timotestín-flag recombinante. Para este ensayo se utilizaron los anticuerpos anti-flag (fluorescencia roja) y anti-src (fluorescencia verde, Alexaflour 488). Como se puede apreciar en la fig 18b, se confirmó la distribución polar de la proteína timotestín recombinante en la superficie celular (fluorescencia roja). Así mismo se detectó y colocalizo la proteína pp60 c-src en forma polar con la proteína timotestín (fig. 18d). Estos resultados demuestran que la distribución polar de timotestín

facilita la interacción e induce una eficiente activación de la proteína tirosina cinasa de pp60 c-src, que pudiera facilitar la translocación hacia el citoesqueleto.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 18. Timotestin y la proteína pp60 c-src se localizan en forma polar en la membrana de la línea celular Jurkat que expresa de manera estable la proteína recombinante. Análisis de co-localización mediante microscopía de fluorescencia, con una amplificación 40X. **A.** Tinción nuclear con Hoechst 33342 (fluorescencia azul). **B.** Localización de timotestin-flag (fluorescencia roja), mediante el anticuerpo anti-flag M2 conjugado con el cromóforo Cy3, **C.** Identificación de la proteína c-src (fluorescencia verde), **D.** Las imágenes B y C superimpuestas donde la fluorescencia rosa demuestra la co-localización de timotestin con pp60 c-src en la membrana celular.

7.4.3. Timotestín induce la translocación de pp60 c-src hacia el citoesqueleto.

La migración celular está mediada por señales extracelulares, que activan proteínas de membrana (timotestín) e inducen la fosforilación de proteínas cinasas, entre estas la proteína pp60 c-src es activada y translocada hacia el citoesqueleto para activar la contractina e inducir la polimerización de filamentos de actina. Estos procesos moleculares en conjunto ocurren durante los procesos de migración celular (Arthur W.T., et al., 2000; Bourguignon L.Y.W., et al., 2001).

Con el fin de determinar si timotestín es capaz de activar y promover la translocación de la tirosina cinasa pp60 c-src hacia el citoesqueleto, aislamos las fracciones citosólicas y del citoesqueleto de las células transfectadas Jurkat. Como se puede corroborar en la fig. 19, análisis de western blot demostró que timotestín induce la translocación de la proteína c-src hacia el citoesqueleto. Estos resultados confirman que la proteína timotestín tiene las propiedades de interactuar, activar e inducir la translocación de la proteína tirosina cinasa[®] pp60 c-src en una forma que es congruente con las funciones contractiles involucradas en la migración celular.

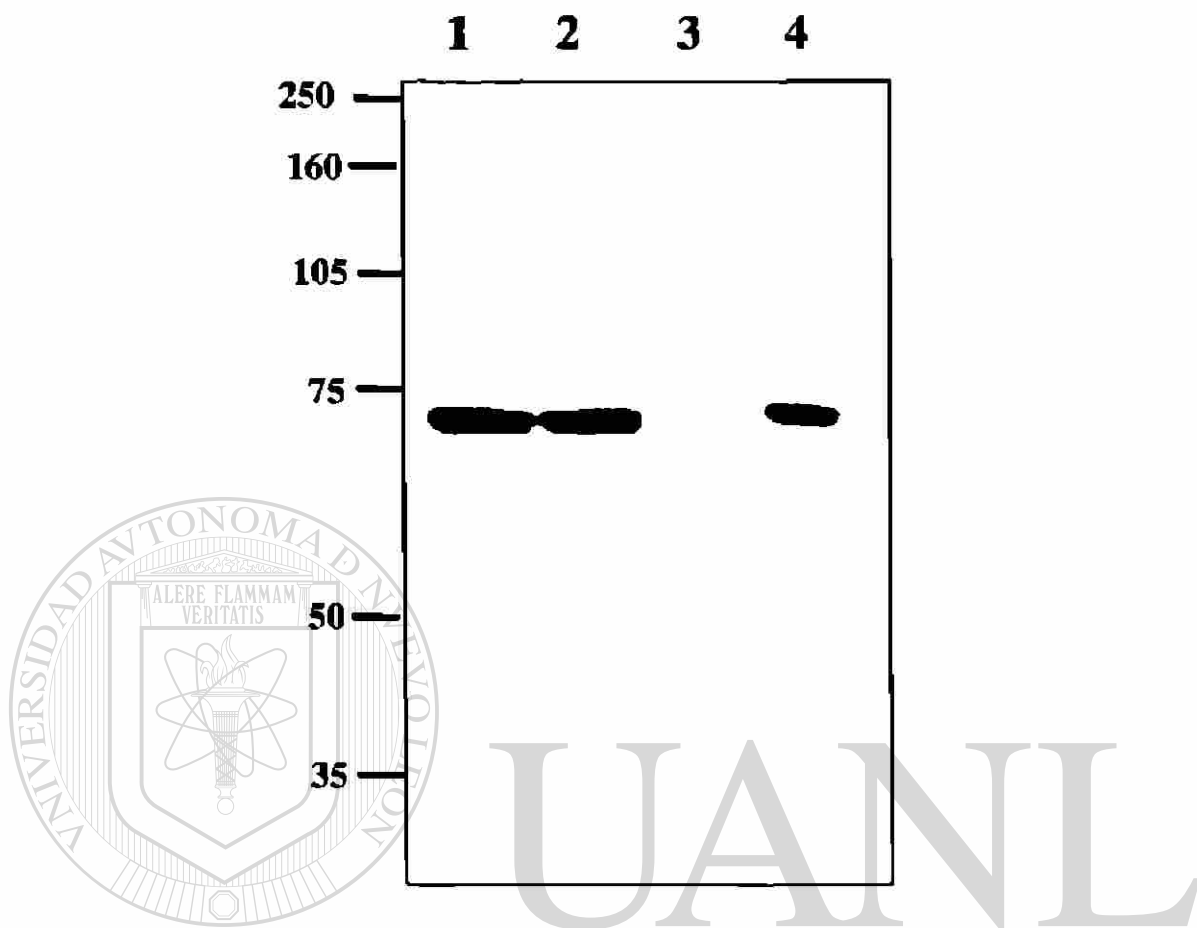


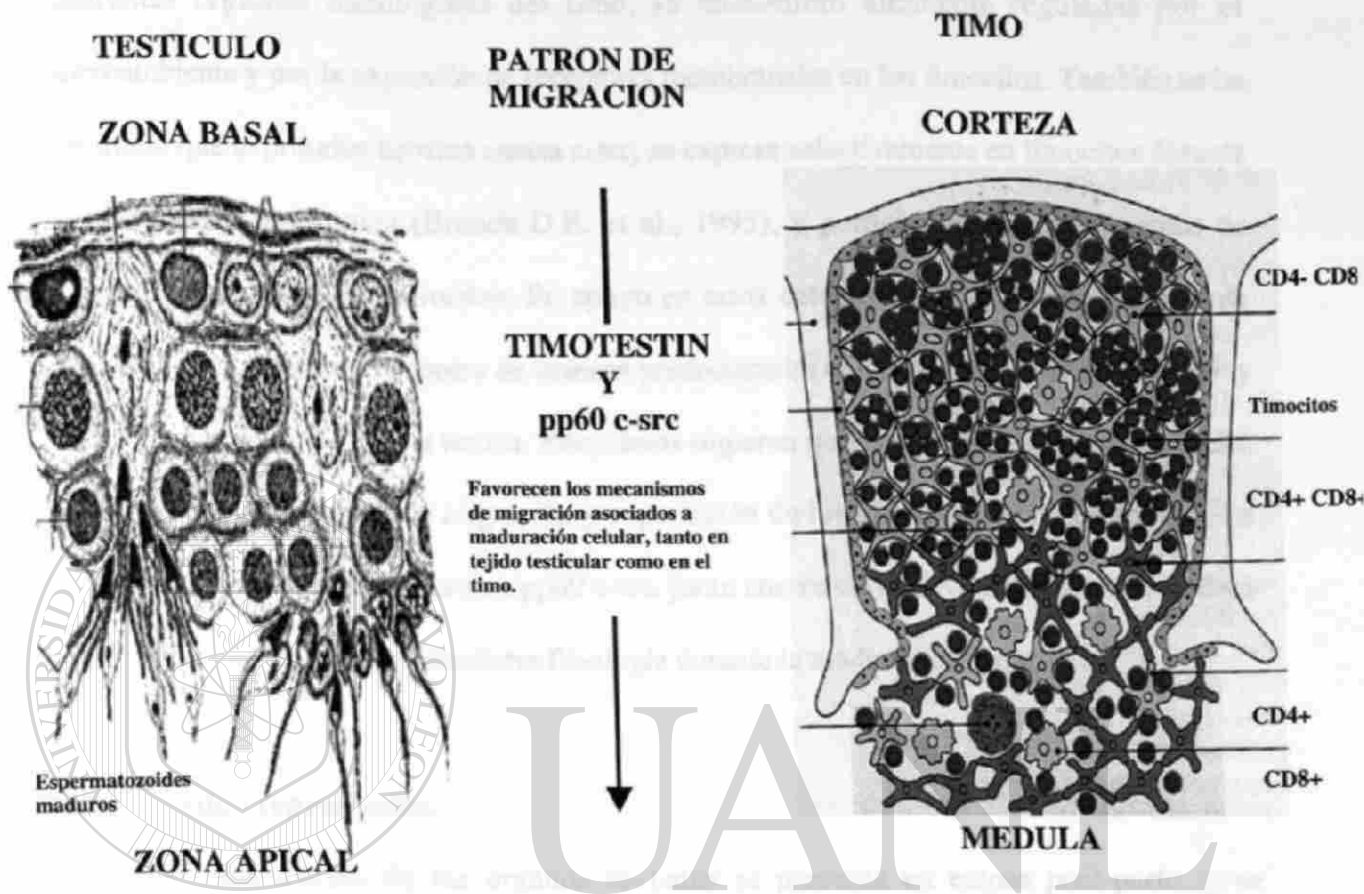
Figura 19. Timotestin induce la translocación de la proteína cinasa c-src hacia el citoesqueleto. Análisis mediante western blot de las fracciones proteicas del citosol (Carril 1 y 2) y citoesqueleto (Carril 3 y 4). Extractos proteicos de las líneas celulares Jurkat-Vector (Carril 1 y 3) y Jurkat-timotestin (Carril 2 y 4). Para la detección de la proteína pp60 c-src se utilizo el anticuerpo anti-src clona GD11 (Upstate, Lake Placid, N.Y., USA).

8. DISCUSION

Relevancia de la expresión de timotestín durante el desarrollo embrionario.

En la embriogénesis, la migración celular esta mediada por señales extracelulares, que a la vez regulan la actividad catalítica de las proteínas cinasas involucradas en la activación de citoesqueleto, necesaria para la migración de precursores celulares (Linask, K., et al., 1986; Imamoto, A., et al., 1993). En este mismo contexto, la detección de timotestín a los 1.5 dpc (morula segmentada de 8 células: EST con número de acceso AU018569) y 3.5 dpc en células totipotenciales localizadas en la red celular formada por los blastocistos, sugieren que la expresión de timotestín puede jugar un papel importante en la activación de proteínas cinasas involucradas en la morfología celular que favorecen la implantación del blastocisto en la matriz. Mutaciones en el gene de timotestín podría afectar la implantación, o producir defectos en la formación de las capas embrionarias (ectodermo-mesodermo-endodermo).

En el estadio embrionario 10.5 dpc, los precursores celulares del saco vitelino, migran hacia hígado, timo, aorta-gónada-mesonefros para iniciar la formación de los órganos hematopoyéticos, linfoides y reproductores (Migliaccio G. et al., 1986; Oostendorp R. A., et al., 2002). En completo acuerdo con su relevancia durante el desarrollo embrionario y maduración posterior al nacimiento, timotestín se expresa abundantemente en el saco vitelino (9-15 dpc), timo fetal (11 dpc) y en etapas adultas se expresa selectivamente en timocitos y en células germinales. Estos datos sugieren que timotestín se expresa en las células claves tanto para el desarrollo del sistema inmune como del reproductor, donde la migración celular es fundamental.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Esquema 9. Timotestin representa un vínculo de unión entre dos fisiologías distintas mediante un mecanismo común: migración asociada a maduración celular.

Timo.

En etapas post-parto, los pro-timocitos recirculan y proliferan en la región subcapsular de la corteza del timo, para posteriormente migrar hacia la región corti-medular como timocitos doble positivos (CD4+CD8+; esquema 9). Finalmente los timocitos seleccionados como CD4+ y CD8+ se concentran en la médula del timo, para ser exportados

a órganos linfoides secundarios. La movilización de estas subpoblaciones celulares, por diferentes regiones histológicas del timo, se encuentran altamente reguladas por el microambiente y por la expresión de receptores membranales en los timocitos. También se ha reportado que la proteína tirosina cinasa c-src, se expresa selectivamente en timocitos durante la maduración intratímica (Branch D.R. et al., 1995), y participa en los mecanismos de migración celular de los timocitos. En apoyo en estos datos, timotestin es una proteína de membrana celular que se expresa de manera predominante en células seleccionadas CD4+ y CD8+ en tránsito a la médula tímica. Estos datos sugieren que timotestin y pp60c-src, pueden intervenir en los procesos de migración y exportación de los timocitos hacia la periferia. La exclusiva expresión de timotestin y pp60 c-src, junto con su correlativa ausencia en linfocitos T de bazo, confirman su predominante fisiología durante la maduración intratímica.

Tejido reproductor.

La maduración de los órganos sexuales se presenta en etapas post-parto, y se encuentran reguladas por las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario (Achermann J.C., et al., 1999). En la maduración del tejido testicular murino, se puede observar un incremento en su masa tisular debido a la abundante y continua producción de espermatozoides (Esquema 9). En cambio los tejido reproductores de la hembra (murina), están bajo diferente maduración hormonal y el número de oocitos producidos en cada ciclo de ovulación es menor, comparado con la alta producción de espermatozoides en testículo (Erickson G.F., et al. 2000, y Eppig J.J., 2001). En este sentido, la correlación inversa en la expresión de timotestin entre tejidos reproductores masculinos y femeninos, pueden estar proporcionalmente asociados al número de células y a la restricción de los distintos ciclos

celulares (Timmos P.M., et al., 2002). Este argumento se sostiene, debido a que recientemente identificamos un cDNA con una homología del 95 % en una biblioteca de oocitos murinos. Análisis mediante RT-PCR tiempo real, hibridación *in situ*, inmunofluorescencia podrán determinar si existe una expresión relevante de timotestín en células germinales femeninas.

El uso de ratones con mutaciones de origen natural, específicamente en proteínas involucradas en la maduración del tejido reproductor, han sido de gran utilidad para entender los mecanismos de maduración en células germinales. Los ratones deficientes en el receptor del andrógeno (AR), poseen una mutación nucleotídica que provoca una alteración en el marco de lectura del receptor, trayendo como consecuencia la producción de una proteína prematura no funcional. Los ratones deficientes en el AR, carecen de la producción de espermatozoides pero contienen poblaciones normales de células de Sertoli en los túbulos seminíferos (Gaspar, M.L. et al., 1991; Kuroda H., et al. 1989). Mediante el uso de estos ratones y análisis de hibridación *in situ* hemos confirmado que timotestín se expresa exclusivamente en las células germinales del túbulo seminífero en testículo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis que se inicia en etapas post-parto alrededor de los días 21-23 y cuyo pico de maduración se detecta en el día 35. Durante esta etapa existe una alta proliferación y maduración celular en los túbulos seminíferos, que se encuentran bajo la regulación de señales extracelulares (hormonas, citosinas) que son transducidas por proteínas cinasas. La tirosina cinasa pp60 c-src, se expresa exclusivamente durante la espermatogénesis (Nishio H., et al. 1995; Chapin R. E., et

al. 2001), lo cual sugiere una función relevante en los mecanismos de maduración. El hallazgo de que timotestin se expresa en el pico de la espermatogénesis del ratón y la demostración de su capacidad de asociarse y de activar a la cinasa pp60 c-src, apoyan fuertemente la hipótesis de que timotestin está involucrado en la regulación de proteínas del citoesqueleto que favorecen los cambios morfológicos que conducen a la motilidad y migración del espermatozoide. En conjunto estos datos confirman que timotestin se expresa en las células claves involucradas tanto en la reproducción como en la inmunidad.

Procesamiento o estabilidad del ARNm.

La diferencia en el peso molecular de los transcritos de origen testicular (células haploides), comparada con células somáticas ha sido un enigma, sin embargo estudios indican que las células haploides expresan diferente maquinaria de poliadenilación comparada con células somáticas (Walker W.H. et al., 1999; Dass B., et al., 2001). También existen otros factores que pueden influir en la talla o estabilidad del ARNm, que se localizan predominantemente en la región no traducible 3' (3'UTR) del ARNm, como son los sitios alternativos de poliadenilación (AAUAAA) o las secuencias ricas en adenina y uracilo (AUUUA) respectivamente. Las secuencias AAUAAA y AU se detectan principalmente en ARNm que producen proteínas involucradas en la diferenciación y proliferación celular, que juegan un papel crítico durante las etapas de maduración (Chyi-Ying A. et al, 1995). Con base a estas observaciones, hemos identificado recientemente regiones ricas en AU y sitios alternativos de poliadenilación en la región 3'UTR del gene timotestin murino y humano. Estos datos apoyan la conclusión de que la diferencia del transcrito de timotestin que se expresa en los timocitos y las células germinales se localiza en la región 3'UTR. Cabe

mencionar que se aislaron clonaron y secuenciaron los transcritos presentes en testículo, timo, bazo y nodulos linfáticos, todos presentaron el mismo marco de lectura. Estos datos confirman nuestra previa conclusión.

Significado de la estructura y conformación molecular.

Timotestin es una nueva molécula que presenta dominos conservados de la familia ezrina-radixina-moesina (ERM), tal y como fue determinado por búsqueda del programa analítico BLAST-P (National Center of Biotechnology Information). Las proteínas ERM contienen un dominio denominado la banda 4.1, que tiene la propiedad de interactuar con colas intracitoplasmáticas de proteínas de superficie (CD43, CD44, ICAM-1,-2,-3), para distribuir receptores durante eventos de polarización celular (Lankes W.T. et al. 1991; Tsukita S.A., et al., 1994; Serrador J.M., et al., 1997; Legg J.W., et al., 1998; Yonemura S., et al. 1998). Consistente con este motivo funcional, timotestin presenta un 57% de similitud a nivel de la proteína que comprende una secuencia de 199 aminoácidos localizados en la región carboxilo terminal de la proteína timotestin. Esto indica que timotestin tiene la capacidad de interactuar con algunos receptores de membrana durante los mecanismos de adhesión-polarización celular. Para comprobar esta hipótesis, será necesario realizar ensayos de inmunoprecipitación y mediante análisis de western blot comprobar la interacción proteína-proteína.

Las estructuras secundarias α -hélice espiral-espiral, se presentan principalmente en proteínas del citoesqueleto (filamentos intermedarios, caldesmon, miosina, etc.), estos dominios favorecen la interacción proteína-proteína. Con base en estas características

moleculares, timotestin posee una similitud del 27% con estos dominios, lo cual sugiere que timotestin es una proteína que puede unirse a proteínas del citoesqueleto y formar un puente de unión con receptores membranales, durante los mecanismos de polarización celular.

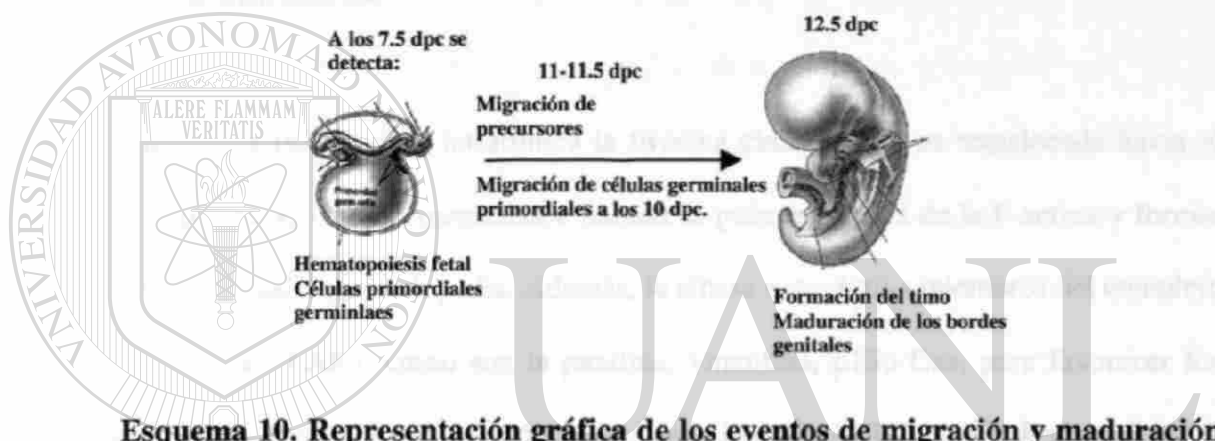
La proteína de superficie celular CD43, posee una región intracitoplasmática que interacciona con el dominio 4.1 de las proteínas ERM durante los mecanismos de polarización celular (Allenspach E.J., et al., 2001). La colocación polar de timotestin con CD43 y la correlativa similitud en los respectivos dominios, sugiere una colaboración molecular de estas proteínas en la adhesión y migración celular. Análisis de inmunoprecipitación podran confirmar estas predicciones. Estas observaciones también sugieren que timotestin puede activar mecanismos de polarización, mediante la formación de complejos proteicos en microdominios glicolipídicos (GEM) de la membrana celular y de esta forma regular señales intracelulares mediante la activación de cascadas de fosforilación en timocitos y células germinales.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Relevancia Funcional

El descubrimiento de timotestin y su capacidad de inducir adhesión-polarización-migración asociados a maduración celular, justifica su temprana detección durante etapas embrionarias. Congruente con estas observaciones, entre los días 11-11.5 dpc ocurre la primera onda de colonización del timo, que es invadido por precursores linfoides que provienen del saco vitelino y a los 15 dpc comienza la maduración de timocitos en timo fetal. Consistente con estos antecedentes el pico de expresión de timotestin coincide a los 11 dpc y se mantiene hasta el 17 dpc, esto indica que timotestin es una proteína involucrada en los

mecanismos de motilidad celular para los precursores tímicos y además puede estar involucrado en los procesos de maduración y formación del timo fetal. Por otro lado, en las gónadas fetales en estas mismas etapas las células germinales primordiales migran del saco vitelino y se establecen en los bordes genitales. Estos hechos indican que timotestin es una molécula vital para la movilización tanto de células progenitoras del sistema inmune como reproductor, durante etapas embrionarias así como en adultas (Esquema 10).



Esquema 10. Representación gráfica de los eventos de migración y maduración de los órganos linfoides y reproductores durante la embriogénesis. Las células primordiales germinales colonizan en el saco vitelino en etapas muy tempranas de la embriogénesis, para posteriormente migrar hacia los bordes germinales y favorecer la formación de las gónadas fetales. Así mismo los precursores hematopoyéticos que dan origen a los linfocitos T, se localizan en saco vitelino para después migrar e invadir el arco faríngeo para favorecer la formación del timo. Estos eventos de migración asociados a maduración tisular están regulados por activación de tirosinas cinasas.

En etapas adultas, los modelos más representativos con mecanismos de migración asociados a maduración celular son el timo y el tejido testicular. En el presente trabajo descubrimos una nueva molécula denominada timotestin, que es el vínculo de unión entre el

tejido reproductor y linfoide mediante un mecanismo común. Tanto en el timo como en el tejido testicular, los timocitos y células germinales reciben señales extracelulares (citoquinas, hormonas), para ser polarizados y migrar hacia la zona apical (testículo) o medular (timo). Además estas células maduran mediante interacción célula-célula que proveen señales de supervivencia (células nodrizas, dendríticas, de Sertolli) para resistir los mecanismos de apoptosis presentes en ambos tejidos. Durante estos procesos los timocitos y células germinales sufren alteraciones citoesqueléticas que se encuentran ambas altamente reguladas por eventos de fosforilación.

Durante la maduración intratímica la tirosina cinasa c-src, es translocada hacia el citoesqueleto para activar la contractina e inducir la polimerización de la F-actina y formar emisiones de filopodia y lamelopodia. Además, la cinasa c-src activa miembros del complejo de adhesión focal (FAK), como son la paxilina, vinculina, p130 Cas, para favorecer los mecanismos de adhesión y polarización de los timocitos (Guan J.L., 1997; Kanner S.B., et al., 1999; Schlaepfer D.D., et al., 1997 y 1999). En conjunto los mecanismos de fosforilación mediante tirosinas cinasas son requeridos para la maduración intratímica.

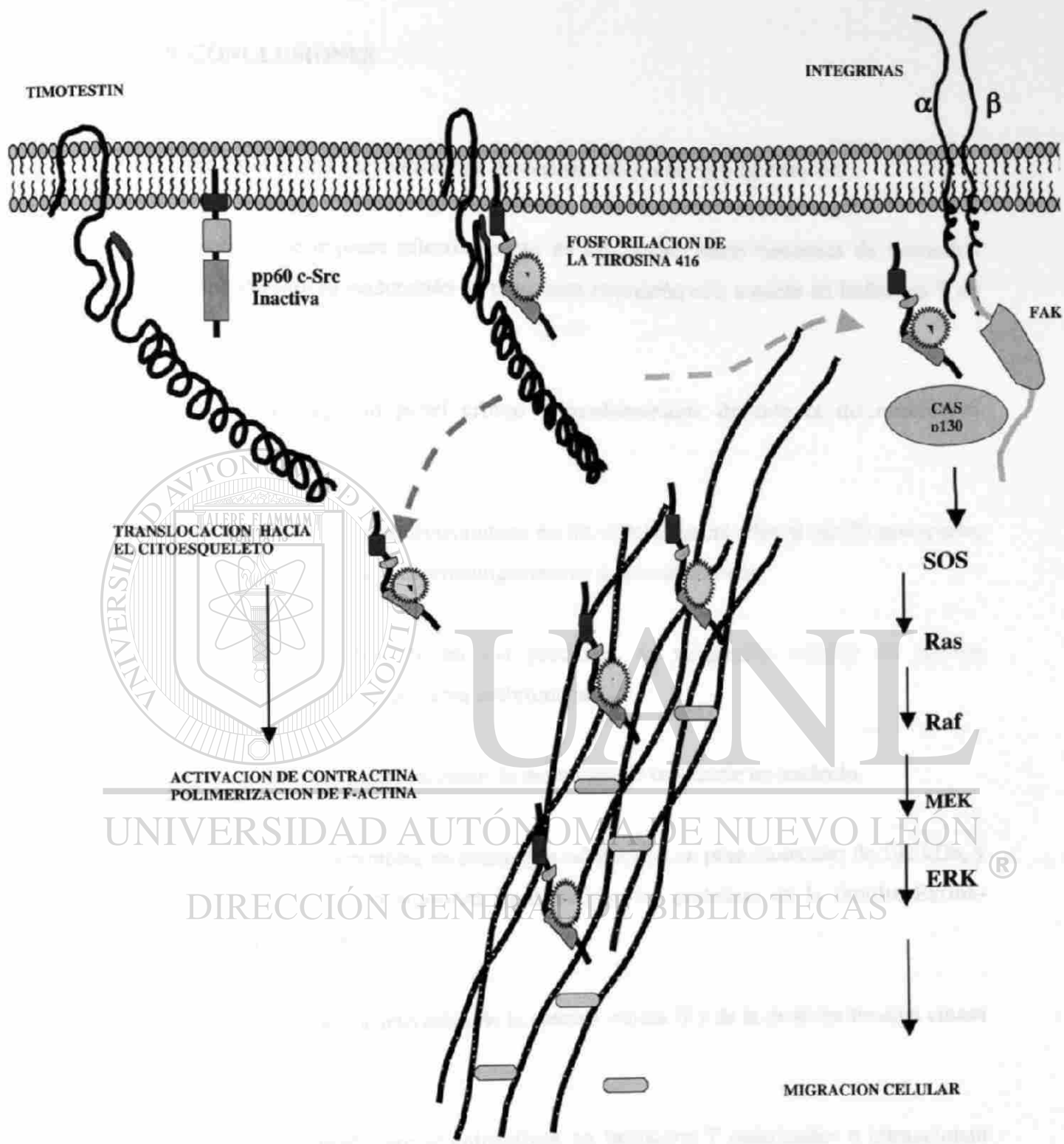
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el caso de los espermatozoides, existen otras proteínas del citoesqueleto que favorecen la motilidad de los espermatozoides, como son la FS39, Stap, Spag4 y Spag5 que proporcionan rigidez a los filamentos de tubulina que constituyen el flagelo. Estas proteínas están altamente reguladas por tirosinas cinasas al igual que las proteínas de los timocitos. La abundante expresión e interacción molecular entre la tirosina cinasa pp60 c-src y timotestín

durante la espermatogenesis, al igual que ocurre durante la maduración intratímica, indican que timotestín activa y regula proteínas del citoesqueleto en las células germinales.

Así mismo, tanto en los timocitos como en las células germinales, proponemos que timotestín activa en forma polar a la tirosina cinasa pp60 c-src e induce su translocación hacia el citoesqueleto para activar los mecanismos de polimerización de actina y tubulina, para favorecer los mecanismos de adhesión-polarización y migración celular, asociados a diferenciación y maduración celular. En este mismo contexto, proponemos que la cinasa c-src activada por timotestín puede activar miembros de la cinasa de adhesión focal (FAK) y formar complejos proteicos con p130 Cas, vinculina, talina y paxilina. En conjunto estas interacciones pueden activar la cascada de fosforilación MAPK/ERK, constituida por proteínas G, sos, Ras, Raf, MEK y ERKs (Timpson P., et al., 2001; Wehrle-Haller B., et al., 2002). Por lo tanto proponemos que la proteína timotestín es una molécula río arriba, que puede regular la vía MAPK/ERK, durante los mecanismos de migración asociados con la maduración intratímica y testicular (Esquema 11).

En resumen proponemos que la expresión de timotestín, favorece los mecanismos de exportación de los timocitos hacia a la periferia (bazo, nodulos linfáticos) para brindar inmunidad, y por otro lado facilita la movilización de las células germinales hacia el epidídimo para ser capacitadas y exportadas para la fecundación. Timotestín por lo tanto, representa un mecanismo común programado por la naturaleza para garantizar la efectividad de dos funciones críticas: inmunidad y reproducción



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 ALFREDO PLANIÁN
 TRANSLOCACION HACIA EL CITOESQUELETO
 ACTIVACION DE CONTRACTINA
 POLIMERIZACION DE F-ACTINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Esquema 11. Mecanismo de acción hipotético de la proteína timotestin en los eventos de migración celular.

9. CONCLUSIONES

1. **Timotestin es una nueva molécula descubierta en nuestro laboratorio.**
2. **Timotestin se expresa selectivamente en las cuatro subpoblaciones de timocitos (timo) durante su maduración en timo, esta expresión está ausente en linfocitos T de bazo.**
3. **Timotestin juega un papel crítico y predominante durante la diferenciación intratímica.**
4. **Timotestin se expresa selectivamente en las células germinales al día 23 post-parto, etapa cuando se inicia la espermatogénesis en testículo de ratón.**
5. **Timotestin es relevante en los procesos de migración celular en tejidos hematopoyéticos durante etapas embrionarias.**
6. **La hormona luteinizante favorece la expresión de timotestin en testículo.**
7. **Timotestin es una proteína de membrana celular con un peso molecular de 102 kDa, y además contiene una similitud significativa con proteínas de la familia Ezrina-Radixina-Moesina.**
8. **Timotestin induce la activación de la caseína cinasa II y de la proteína tirosina cinasa pp60 c-src.**
9. **Timotestin y pp60 c-src se colocan en linfocitos T polarizados e intraccionan físicamente a nivel celular.**
10. **Timotestin induce la translocación de pp60 c-src hacia el citoesqueleto.**

10. ESTUDIOS FUTUROS

1. Generar ratones deficientes en la expresión de timotestin, para validar los estudios *in vitro*.
2. Determinar los dominios funcionales de la proteína timotestin, mediante la generación de mutantes dominantes negativas.
3. Realizar ensayos de cinasas con otros miembros de la familia tirosina cinasas Src (*fyn, hek, yes, lck, src, lyn*) y tamizaje de intracción proteína-proteína.
4. Determinar la existencia de un ligando o receptor de la proteína timotestin
5. Analizar la asociación y efecto de timotestin en microdominios ricos en lípidos y glicoproteínas en Timocitos.
6. Realizar estudios de microscopía tiempo real en timocitos, activados o inmovilizados mediante el uso de anticuerpos contra la proteína timotestin.
7. Determinar el efecto de timotestin en el ciclo celular.
8. Caracterizar la región promotora del gene timotestin, para determinar los elementos-cis requeridos para la expresión de timotestin tanto en linfocitos como en espermatozoides.
9. Correlacionar el estado activo del oncogene v-src en cáncer, con la expresión de timotestin.
10. Determinar la relevancia fisiológica de la activación de la caseína cinasa II, mediada por timotestin en timocitos y espermatozoides.

REFERENCIAS

Achermann J.C., Jameson J.L. Fertility and Infertility: Genetic contributions from the Hypothalamic-Pituitary-Gonads Axis. *Molecular Endocrinology*. 13: 812-818. 1999.

Aguilera G. y Romano M. Influence of thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells in vitro. *Journal of Endocrinology*. 123: 367 - 373. 1989.

Albrecht U., Eichele G., Helms J.A., y Lu H.C. Visualization of gene expression patterns by in situ hybridization. *Molecular and Cellular methods in developmental toxicology*. Ed CRC. USA. pp23-48. 1997.

Allenspach E.J., Cullinan P., Tong J., Tesciuba A.G., Cannon J.L., Takahashi S.M., Morgan R., Burkhardt J.K. y Sperling A.I. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity*. 15: 739-750. 2001.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Miller W. Y Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402. 1997.

Anderson G., Harman B.C., Hara K.J., y Jenkinson E.J. Microenviromental regulation of T cell development in the thymus. *Seminar in Immunology*. 12:457-464. 2000 .

Anderson G. y Jenkinson E.J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Review of Immunology*. 1: 31-40. 2001.

Anderson R.G.W. y Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to Caveole, Rafts and other lipid domains. *Science*. 296: 1821-1825. 2002.

Arpin M., Algrain M., y Louvard D. Membrane-actin microfilament: an increasing diversity of players to band 4.1 *Current Opinion in Cell Biology*. 6(1):136-141. 1994 .

Arthur W.T., Petch L.A. y Burridge K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Current Biology*. 10: 719-722. 2000

Avizienyte E., Wyke A.W., Jones R.J., McLean G.W., Westhoff M.A., Brunton V.G. y Frame M.C. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signaling. *Nature Cell Biology*. 4: 632-638. 2002.

Bernard O., Naor Z. Y Seger R. Role of dynamin, Src, and ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 4554-4563. 2001.

Blackshaw A.W. y Elkington J.S. The effect of age and hypophysectomy on growth and the isoenzymes of lactate dehydrogenase in the mouse testis. *Biology of Rreproduction*. 2: 268-274. 1970.

Blom N., Gammeltoft S. y Brunak S. Sequence and structure based prediction of eukariotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*. 294: 1351-1362. 1999.

Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Shao L. y Chen Y.W. CD44 interaction with c-src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeletal function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:7327-7336. 2001.

Branch D.R. y Mills G.B. pp60 c-src expression is induced by activation of normal human T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 154: 3676-3685. 1995.

Brant D., Gimona M., Hillman M., Haller H. y Mischak H. Protein kinase C induces actin reorganization via a Src and Rho-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 20903-20910. 2002.

Bretscher A., Chambers D., Nguyen R. y Reczek D. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology*. 16: 113-143. 2000.

Catalano R.D., Hillhouse E.W., y Vlad M. Developmental expression and characterization of FS39, a testis complementary DNA encoding an intermediate filament-related protein of the sperm fibrous sheath. *Biology of Reproduction*. 65:277-287. 2001 .

Chapin R.E., Wine R.N., Harris M.W., Borchers C.H., y Haseman J.K. Structure and control of a cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *Journal of Andrology*. 22: 1030-1052. 2001.

Chyi-Ying A. C. y Ann-Bun Shyu. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemistry Science*. 20: 465-470. 1995.

Crisa L., Cirulli V., Ellisman M.H., Ishii J.K., Elices M.J., y Salomon D.R. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: The roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *Journal of Experimental of Medicine*. 184: 215-228. 1996.

Dass B., McMahon K.W., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G. y MacDonald C.C. The gene for the variant form of the polyadenylation protein CstF-64 is on chromosome 19 and is expressed in pachytene spermatocytes in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 8044-8050. 2001.

Del Pozo M.A., Vicente-Manzanares M., Tejedor R., Serrador J.M. y Sanchez-Madrid F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *European Journal of immunology*. 29: 3609-3620. 1999.

Deng W. y Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental Cell*. 2: 819-830. 2002.

Dynn, M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 91: 11287-11289. 1994.

Eppig J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122: 829-838. 2001.

Erickson G.F. y Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 11(5): 193-198. 2000.

Gares S.L. y Pilarsky L.M. Beta1-Integrins control spontaneous adhesion and motility of human progenitor thymocytes and regulate differentiation-dependent expression of the receptor for hyaluron-mediated motility. *Scandinavian Journal of immunology*. 50: 626-634. 1999.

Gaspar M.L., Meo T., Bourgarel P. Guenet J.L. y Tosi M. A single base deletion in the tfm androgen receptor gene creates a short lived messenger RNA that directs internal translation initiation. *Proceeding National Academy of Sciences*. 88: 8606-8610. 1991.

Glucksman A. y Cherry C.P. The effect of castration, oestrogens, testosterone and the oestrous cycle on the cortical epithelium of the thymus in male and female rats. *Journal of Anatomy*. 103: 113-133. 1968.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Gorospore W. C. y Kasson B.G. Lymphokine from concavalin-A-stimulated lymphocytes regulate rat granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Endocrinology*. 123: 2462-2471. 1988.

Greenstein B.D., Fitzpatrick F.T.A., Adcock I.M., Kendall M.D. y Wheeler M.J. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy inhibition of regeneration by testosterone. *Journal of Endocrinology*. 110: 417-422. 1986.

Grossman C.J. Regulation by the immune system by sex steroids. *Endocrinology reviews*. 5: 435-455. 1984.

Guan J.L. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29: 1085-1096. 1997.

Guappone A.C. y Flynn D.C. The integrity of the SH3 binding motif of AFAP-110 is required to facilitate tyrosine phosphorylation by, and stable complex formation with, Src. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 175:243-252. 1997.

Guzman-Rojas L., Sims J.C., Rangel R., Guret C., Sun Y., Alcocer-Gonzalez J.M., y Martínez-Valdez H. PRELI the human homologue of the avian px 19, is expressed by germinal center B lymphocytes. *International Immunology*. 12(5):607-612. 2000 .

Hall C.L., Lange L.A., Prober D.A., Zhang S. y Turley E.A. pp60 c-src is required for cell locomotion regulated by the hyaluronan receptor RHAMM. *Oncogene*. 13: 2213-2224. 1996.

Hao S. y August A. The proline rich region of the Tec homology of ITK regulates its activity. *FEBS Letters*. 525: 53-58. 2002.

Hitzeman J.W. Effects of gonadotropins and testosterone on the testis of prepubertal mice. *Journal of Experimental Zoology*. 178: 369-376. 1971.

Hubbard S.R. y Till J.H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry*. 69:373-398. 2000.

Imamoto A. y Soriano P. Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell*. 73: 1117-1124. 1993.

Janeway C.A. y Travers P. Immunobiology: T cell mediated immunity. Ed. Garland. pp. 7:23. USA. 1997.

Jonhson L. Efficiency of spermatogenesis. *Microscopy Research and Technique*. 32: 385-422. 1995.

Johnson L.R., Foster J.A., Haig-Ladewig L., VanScoy H., Rubin C.S., Moss S.B., y Gerton G.L. Assembly of AKAP82, a protein kinase a anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm. *Developmental Biology*. 192:340-350. 1997 .

Kanner S.B., Reynolds A.B., Wang H.C.R., Vines R.R. y Parsons J.T. The SH2 and SH3 domains of pp60 c-src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *EMBO Journal*. 10: 1689-1698. 1991.

Kornovski B.S., McCoshen J., Krendentser J. y Turley E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertility and Sterility*. 61: 935-940. 1994.

Kralisz U. y Cierniewski C.S. Activity of pp60 c-src and association of pp60 c-src, pp54/58lyn, pp60fyn, and pp72syk with the cytoskeleton in platelets activated by collagen. *IUBMB life*. 49: 33-42. 2000.

Kuroda H., Nakayama H., Namiki M., Matsumoto K., Nishimune Y. y Kitamura Y. Differentiation of germ cells in seminiferous tubules transplanted to testes of germ deficient mice of W/W^y and Sl/Sl^o genotypes. *Journal of Cellular Physiology*. 139: 329-334. 1989. ®

Lacy H.M. y Sanderson R.D. Sperm protein 17 is expressed on normal and malignant lymphocytes and promotes heparan sulfate-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 98: 2160-2165. 2001.

Lankes W.T. y Furthmayr H. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 8297-8301. 1991.

Lau A.F., Kurata W.E., Kanemitsu M.Y., Loo L.W., Warn-Cramer B.J., Eckhart W. y Lampe P.D. Regulation of connexin43 function by activated tyrosine protein kinases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 28: 359-368. 1996.

Lecuyer C., Dacheux J.L., Hermand E., Mazeman E., Rousseaux J., y Rousseaux-Prevost R. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biology of Reproduction*. 63:1801-1810. 2000.

Legg J.W. y Isacke C.M. Identification and functional analysis of the ezrin binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Current Biology*. 8: 705-708. 1998.

Linask K.K. y Lash J.W. Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interference during directional movement. *Developmental Biology*. 114: 87-101. 1986.

Lindsey J.S. y Wilkinson M.F. Pem: A testosterone- and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse Sertoli cells and epididymis. *Developmental Biology*. 179: 471-484. 1996.

Liu J., Huang C. y Zhan X. Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene*. 18: 6700-6706. 1999.

Lupas A. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods in Enzymology*. 266: 513-525. 1996.

Lupas A., Van-Dyke M. y Stock J. Predicting coiled-coils from protein sequences. *Science*. 252: 1162-1164. 1991.

Mandal A., Naaby-Hansen S., Wolkowicz M.J., Klotz K., Shetty J., Retief J.D., Coonrod S.A., Kinter M., Sherman N., Cesar F., Flickinger C.J. y Herr J.C. FSP95, a testis specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 61: 1184-1197. 1999.

Manley N.R. y Capecchi M.R. The role of *Hoxa-3* in the mouse thymus and thyroid development. *Development*. 121: 1989-2003. 1995.

Mariner D.J., Anastasiadis P., Keilhack H., Bohmer F.D., Wang J. y Reynolds A.B. Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120^{ctn}. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 28006-28013. 2001.

Martin D. y Romano M.C. Effect of thymic conditioned medium on testosterone secretion by rat testicular cells in vitro. *Steroid biochemistry*. 11: 81-88. 1992.

Matko J. y Szollosi J. Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated?. *Immunology Letters*. 82: 3-15. 2002.

Mclaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonads. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163: 3-9. 2000.

McNiven M.A., Kim L., Krueger E.W., Orth J.D., Cao H., y Wong T.W. Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *Journal of Cell Biology*. 151: 187-198. 2000.

Migliaccio G., Migliaccio A.R., Petti S., Mavilio F., Russo J., Lazzaro D., Testa U., Marinucci M. y Peschle C. Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition. *Journal of Clinical Investigation*. 78: 51-60. 1986.

Moeller S., Croning M.D.R. y Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*. 17: 646-653. 2001.

Nakai K. y Kanehisa M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*. 14: 897-911. 1992.

Neuman I., Solano A.R., Paz C., Mele P., Cornejo-Maciel F., Lemos J.R., Fernandez H.N. y Podesta E.J. The action of luteinizing hormone on the testis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 40: 441-451. 1991.

Nishio H., Tokuda M., Itano T., Matsui H., Takeuchi Y. y Hatase O. pp60 c-src expression in rat spermatogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 206: 502-510. 1995.

Ohuchi J., Arai T., Kon Y., Asano A., Yamuchi H., y Watanabe T. Characterization of a novel gene, sperm tail associate protein (Stap), in mouse post-meiotic testicular germ cells. *Molecular Reproduction and Development*. 59:350-358. 2001.

Ogawa M., Fraser S., Fujimoto T., Endoh M., Nishikawa S. y Nishikawa S.I. Origin of hematopoietic progenitors during embryogenesis. *International Review of Immunology*. 20: 21-44. 2001.

Oostendorp R.A., Harvey K.N., Kusadasi N., Bruijn M.F., Saris C., Ploemacher R.E., Medvinsky A.L. y Dzierzak E.A. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*. 99: 1183-1189. 2002.

Owens D.W., McLean G.W., Wyke A.W., Paraskeva C., Parkinson E.K., Frame M.C. y Brunton V.G. The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 51-64. 2000.

Parker K.L., Schedl A., y Schimmer B. Gene interactions in gonadal development. *Annual Review of Physiology*. 61:417-433. 1999.

Parry D.A.D. Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled coils in other proteins. *Bioscience reports*. 2: 1017-1024. 1982.

Pearce P., Khalid B.A.K. y Funder J.W. Androgens and the thymus. *Endocrinology*. 109: 1073-1077. 1981.

Pedernera E., Diaz Osuna J. y Calcagno M. A thymus factor influences the in-vitro testosterone secretion of Leyding cells in the rat. *Life Science*. 38: 779-787. 1986.

Prockop S., y Petri H.T. Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. *Seminars in Immunology*. 12:435-444. 2000.

Reyes-Esparza J.A. y Romano M. An age dependent thymic secretion modulates testicular function. *Journal of Steroid Biochemistry*, 34: 68-73. 1989.

Rich I.N. Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro. *Blood*. 86: 463-472. 1995.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Ritter M.A. y Boyd R.L. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunology Today*. 15:192-193.1994.

Robaire B. y Hinton B. *The Epididymis From Molecules to Clinical Practice: The Development of Epididymis*. Ed. Kluwer Academic/Plenum. pp: 251-267. USA. 2002.

Rodgers W. Making membranes green: Construction and characterization of GFP fusion proteins targeted to discrete plasma membrane domains. *Biotechniques*. 32: 1044-1051. 2002.

Russell L., Etlin R.A., Sinha-Hikim A.P. y Clegg E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis: Mammalian Spermatogenesis. Ed. Cache River. pp. 1- 38. USA.1989.

Sai X., Naruse K. y Sokabe M. Activation of pp60 c-src is critical for stretch-induced orienting response in fibroblast. *Journal of Cell Science*. 112: 1365-1373. 1999.

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. 1989.

Sanjay A., Houghton A., Neff L., DiDomenico E., Bardelay C., Antonie E., Levy J., Gailit J., Bowtell D., Horne W.C. y Baron R. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *Journal of Cell Biology*. 152: 181-195. 2001.

Schaffer A.A., Wolf Y.I., Ponting C.P., Koonin E.V., Aravid L. y Altschul S.F. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. *Bioinformatics*. 15: 1000-1011. 1999.

Schlaepfer D.D., Broome M.A. y Hunter T. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-src complex: Involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 17: 1702-1713. 1997.

Schlaepfer D.D., Hauck C. R. Y Sieg D.J. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 71: 435-478. 1999.

Sebzda E., Mariathasan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M.F. y Ohashi P.S. Selection of the T cell repertoire. *Annual Review of Immunology*. 17: 829-874. 1999.

Serrador J.M., Alonso-Lebrero J.L., Del pozo M.A., Furthmayr H., Schwartz-Albeiz R., Calvo J., Lozano F., y Sanchez-Madrid F. Moesin interacts with the cytoplasmic region of the intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *Journal of Cell Biology*. 138: 1409-1423. 1997.

Serrador J.M., Nieto M., y Sanchez-Madrid F. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends in Cell Biology*. 9:228-232. 1999 .

Shao X., Xue J., y Van der Hoorn F.A. Testicular protein Spag5 has similarity to mitotic spindle protein deepest and binds outer dense fiber protein Odf1. *Molecular Reproduction and Development*. 59:410-416. 2001.

Siddiqi A., Mourtada-Sims J., Guzman-Rojas L., Rangel R., Guret C., Madrid-Marina V., Sun Y., y Martinez-Valdez H. Regulation of CD40 and CD40L by the AT-hook transcription factor AKNA. *Nature*. 410(6826): 383-387. 2001.

Singh J., O'Neill C. y Handelsman D.J. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology*. 136: 5311-5321. 1995.

Susuki-Inoue K., Tulasne D., Shen Y., Bori-Sanz T., Inoue O., Jung S.M., Andrews R.K., Berndt M.C. y Watson S.P. Association of Fyn and Lyn to proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 21561-21566. 2002.

Tanii I., Yoshinaga K. y Toshimori K. Morphogenesis of the acrosome during the final steps of rat spermiogenesis with special reference to tubulobulbar complexes. *The Anatomical Record*. 256: 195-201. 1999.

Tarsounas M., Perlman R.E., y Moens P.B. CLIP-50 immunolocalization during mouse spermiogenesis suggest a role in shaping the sperm nucleus. *Developmental Biology*. 236: 400-410. 2001.

Timmos P.M., Rigby P.W. y Poirier F. The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development*. 129: 635-647. 2002.

Timpson P., Jones G.E., Frame M.C. y Brunton V. Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. *Current Biology*. 11: 1836-1846. 2001

Traver D., Miyamoto T., Christensen J., Iwasaki-Arai J., Akashi K. y Weissman I.L. Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood*. 98: 627-635. 2001.

Tsukita S.A., Oishi K., Sato N., Sagara J., Kawai A. y Tsukita S.H. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin based cytoskeletons. *Journal of Cell Biology*. 126: 391-401. 1994.

Tsukita S. y Yonemura S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family from cytoskeleton to signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*. 9(1): 53-58. 1997.

~~Tsukita S. y Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from the ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 34507-34510. 1999.~~

Tsuitsui K. Pituitary and gonadal hormone-dependent and independent induction of follicle-stimulating hormone receptors in the developing testis. *Endocrinology*. 128: 477-487. 1991.

Ullmann S.L., Shaw G., Alcorn G.T. y Renfree M.B. Migration of primordial germ cells to the developing gonadal ridges in the tamar wallaby *Macropus eugenii*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 110: 135-143. 1997.

Uzumcu M. y Lin Y.C. Characterization of the stimulatory actions of thymic factor(s) on basal and gonadotropin-induced steroidogenesis in culture rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 105: 209-216. 1994.

Verhoeven G. Spermatogenesis and spermatogenic control: a state of the art. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 61(3):417-432. 1999.

Walker W.H., Delfino F.J. y Habener J.F. RNA processing and the control of spermatogenesis. *Frontiers in Hormone Research.* 25: 34-58. 1999.

Watson M.E., Newman R.J., Payne A.M., Abdelrahim M. y Francis G.L. The effect of macrophage conditioned media on Leyding cell function. *Annals of Clinical laboratory Science.* 24: 84-95. 1994.

Weed S.A., Du Y. y Parsons J.T. Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *Journal of Cell Science.* 111: 2433-2443. 1998.

Weed S.A., Karginov A.V., Schafer D.A., Weaver A.M., Kinley A.W., Cooper J.A. y Parsons J.T. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interaction with the F-actin and the Arp2/3 complex. *Journal of Cell Biology.* 151: 29-40. 2000.

Weernick P.A. y Rijksen G. Activation and translocation of the c-Src to the cytoskeleton by both platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry.* 270: 2264-2267. 1995.

Wehrle-Haller B. y Imhof B.A. The inner lives of focal adhesions. *Trends in Cell Biology.* 12: 382-388. 2002.

William P.E. Fundamental Immunology: T lymphocyte differentiation and biology. Ed Lippincott-Rave. Pp 367. USA , 1999.

Wise T., Klindt J., Macdonald G.J. y Ford J.J. Effects of neonatal sexual differentiation, growth hormone and testosterone on thymic weights and thymosin- β 4 in hyposectomized rats. *Journal of Reproduction Immunology*. 19: 43-54. 1991.

Wolber F., Leonard E., Micahel S., Orschell-Traycoff C., Yoder M. y Srour E. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Experimental Hematology*. 30: 1010. 2002.

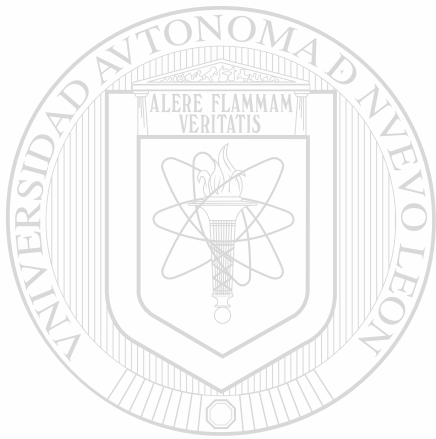
Yee J.B. y Hutson J.C. Effects of testicular macrophage conditioned medium on leydig cells in culture. *Endocrinology*. 116: 2682-2684. 1985.

Yomemura S., Hirao M., Doi Y., Takahashi N., Kondo T., Tsukita S.A. y Tsukita S.H. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positive charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *Journal of Cell Biology*. 140: 885-895. 1998.

Yu H., Chen J.K., Feng S., Dalgarno D.C., Brauer A.W. y Schreiber S.L. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*. 76: 933-945. 1994.

Zajchowski L.D. y Robbins S.M. Lipid rafts and little caves. *European Journal of Biochemistry*. 269: 737-752. 2002.

Zhu D., y Bourguignon L.Y. The ankyrin-binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumor cell transformation. *Cell Motility and Cytoskeleton*. 39: 209-222. 1998.



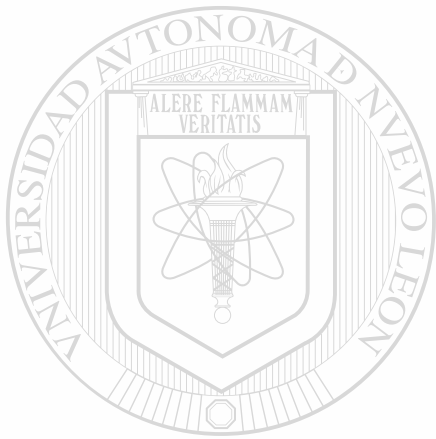
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



