



ABRIR RESULTADOS

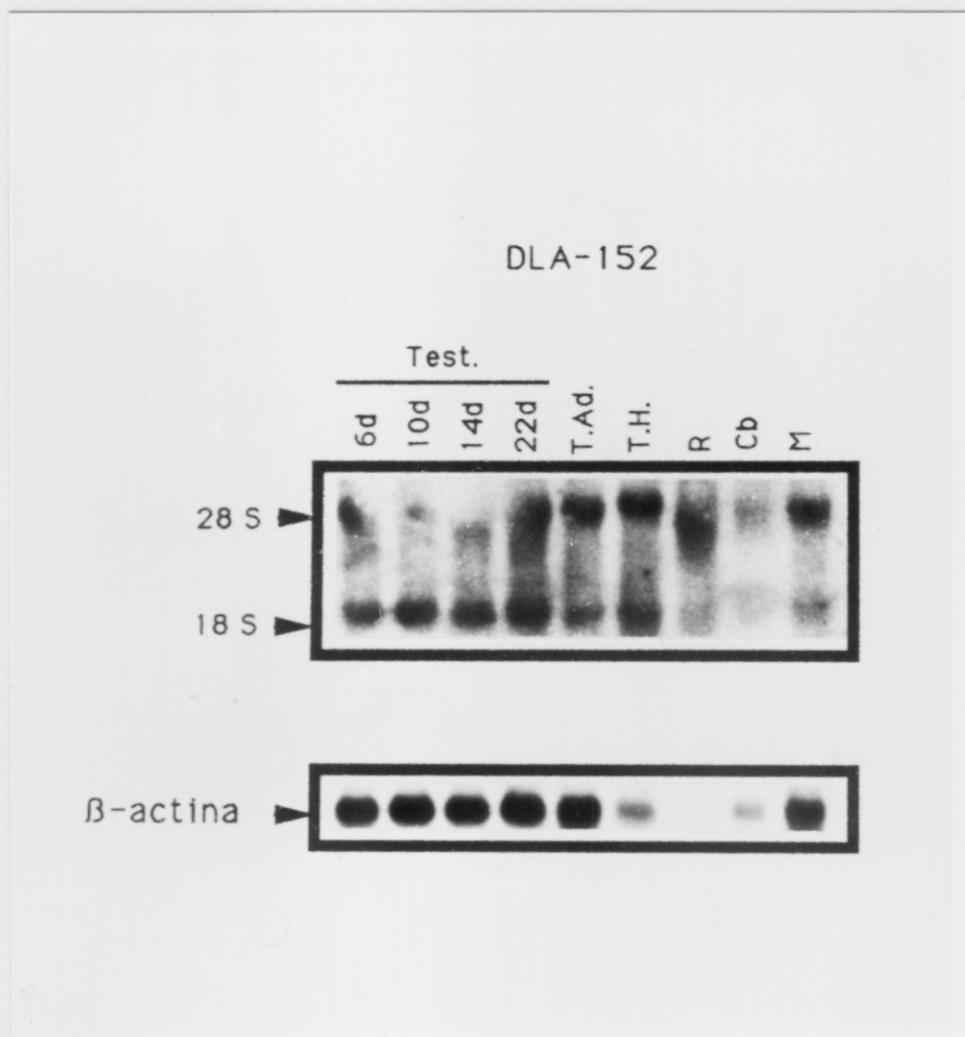


Figura 26: Northern Blot de 15 μ g de RNA total procedente de: carril 1: testículo de ratón de 6 d p.n.; carril 2: testículo de ratón de 10 d p.n.; carril 3: testículo de ratón de 14 d p.n.; carril 4: testículo de ratón de 22 d p.n.; carril 5: testículo de ratón adulto; carril 6: testículo humano; carril 7: riñón fetal de ratón de 16 d; carril 8: cerebro fetal de ratón de 16 d; carril 9: músculo fetal de ratón de 16 d. El filtro se hibridó con la sonda de cDNA del clon DLA-152 y como control se realizó la hibridación con una sonda de β -actina que reconoce un transcrito de 2000 bases.

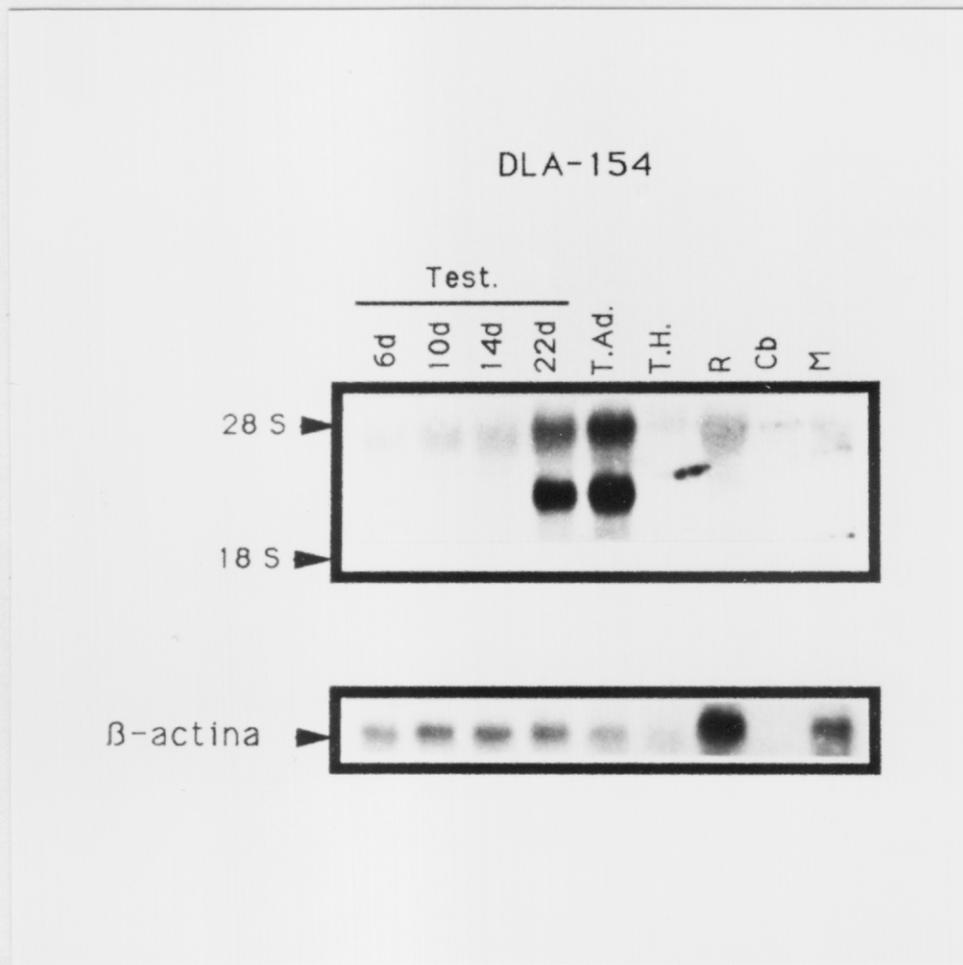


Figura 27: Northern Blot de 15 μ g de RNA total procedente de: carril 1: testículo de ratón de 6 d p.n.; carril 2: testículo de ratón de 10 d p.n.; carril 3: testículo de ratón de 14 d p.n.; carril 4: testículo de ratón de 22 d p.n.; carril 5: testículo de ratón adulto; carril 6: testículo humano; carril 7: riñón fetal de ratón de 16 d; carril 8: cerebro fetal de ratón de 16 d; carril 9: músculo fetal de ratón de 16 d. El filtro se hibridó con la sonda de cDNA del clon DLA-154 y como control se realizó la hibridación con una sonda de β -actina que reconoce un transcrito de 2000 bases.

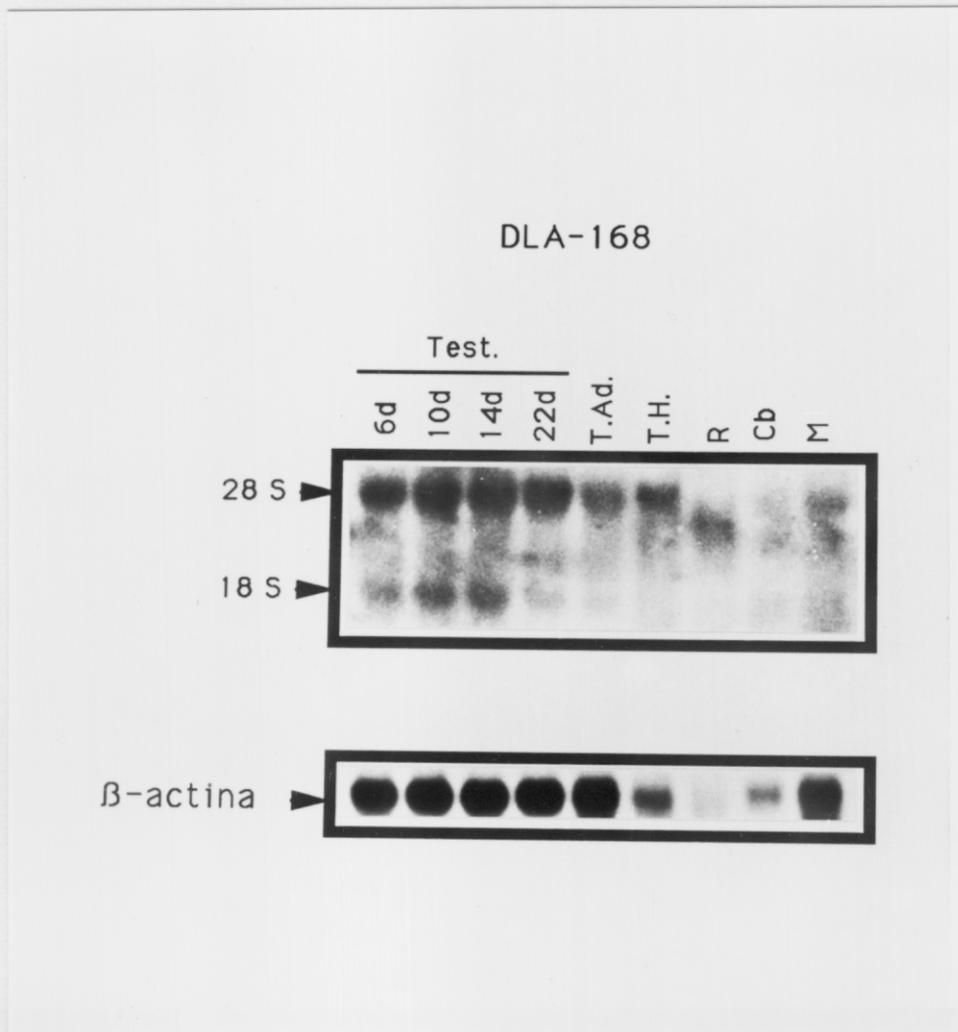


Figura 28: Northern Blot de 15 μ g de RNA total procedente de: carril 1: testículo de ratón de 6 d p.n.; carril 2: testículo de ratón de 10 d p.n.; carril 3: testículo de ratón de 14 d p.n.; carril 4: testículo de ratón de 22 d p.n.; carril 5: testículo de ratón adulto; carril 6: testículo humano; carril 7: riñón fetal de ratón de 16 d; carril 8: cerebro fetal de ratón de 16 d; carril 9: músculo fetal de ratón de 16 d. El filtro se hibridó con la sonda de cDNA del clon DLA-168 y como control se realizó la hibridación con una sonda de β -actina que reconoce un transcrito de 2000 bases.

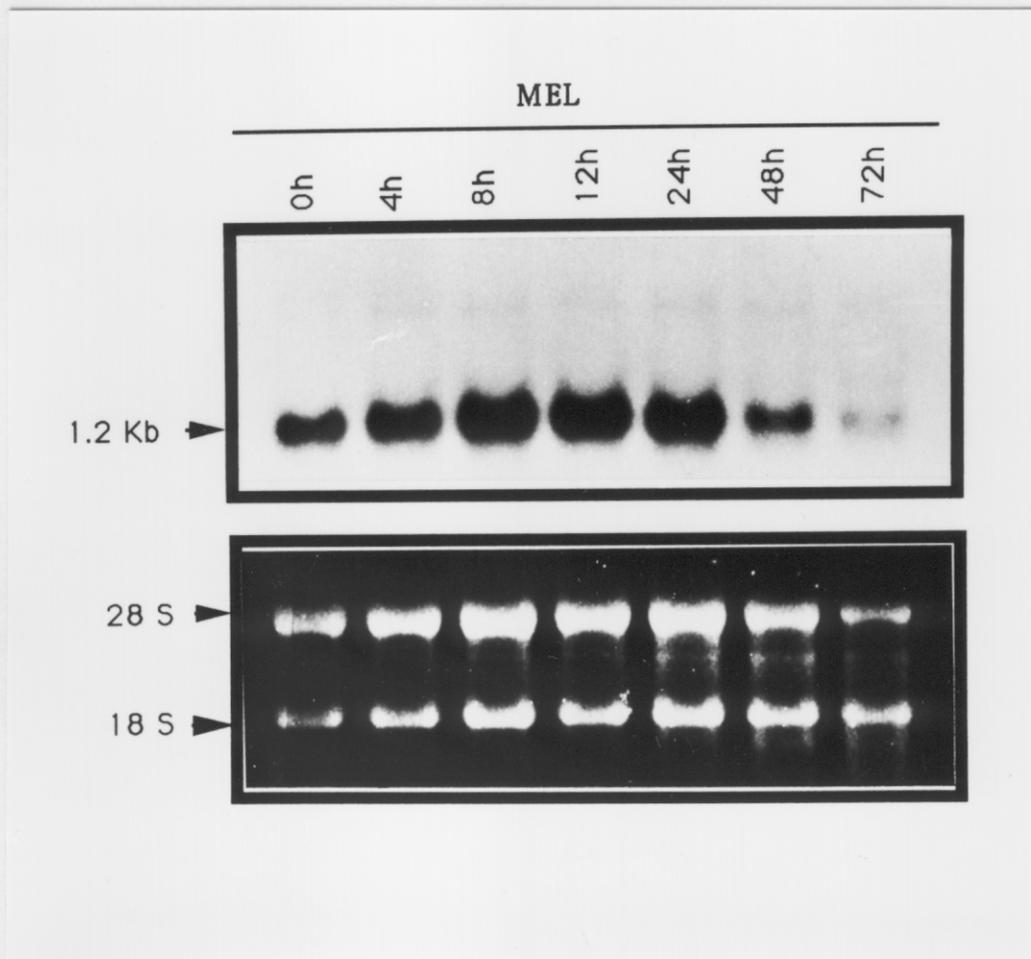


Figura 29: Northern Blot de 15 μ g de RNA total procedente de células MEL estimuladas con HMBA tras: carril 1: 0 h; carril 2: 4 h; carril 3: 8 h; carril 4: 12 h; carril 5: 24 h; carril 6: 48 h; carril 7: 72 h. El filtro se hibridó con la sonda de cDNA del fragmento de 400 pb del extremo 3' del clon DLA-92 y como control se muestra la posición de los rRNAs tras teñir el gel con bromuro de etidio.

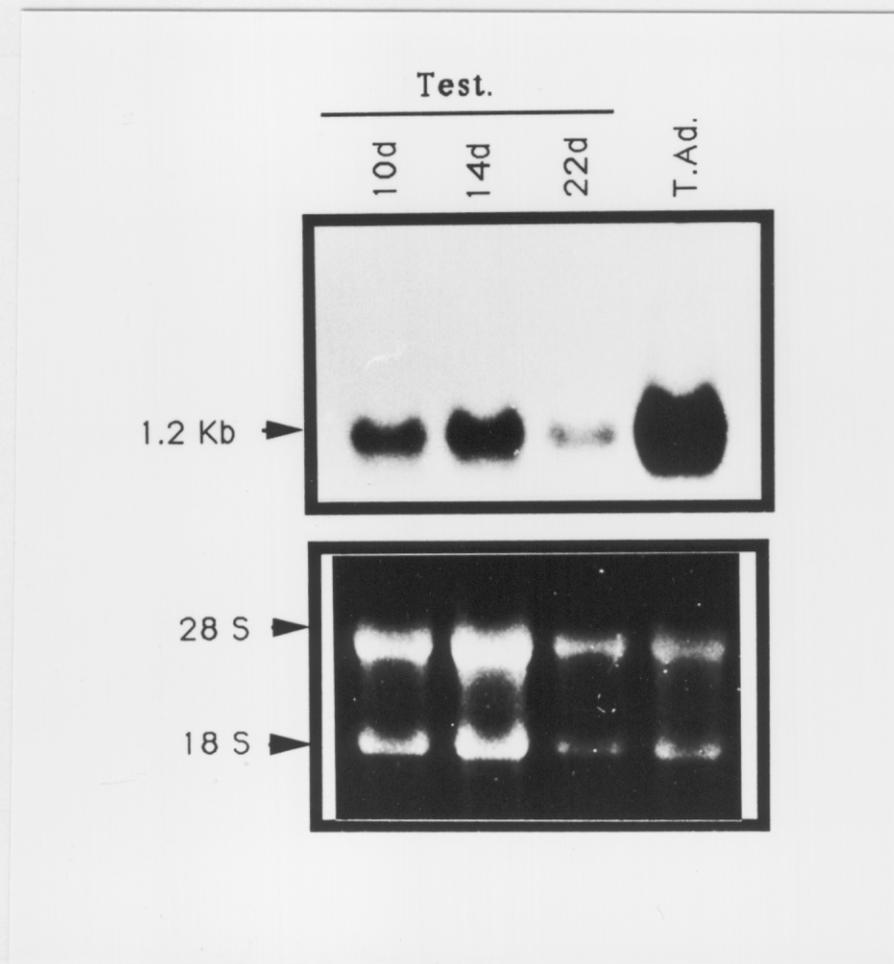


Figura 30: Northern Blot de 15 μ g de RNA total procedente de: carril 1: testículo de ratón de 10 d p.n.; carril 2: testículo de ratón de 14 d p.n.; carril 3: testículo de ratón de 22 d p.n.; carril 4: testículo de ratón adulto. El filtro se hibridó con la sonda de cDNA del fragmento de 400 pb del extremo 3' del clon DLA-92 y como control se muestra la posición de los rRNAs tras teñir el gel con bromuro de etidio.

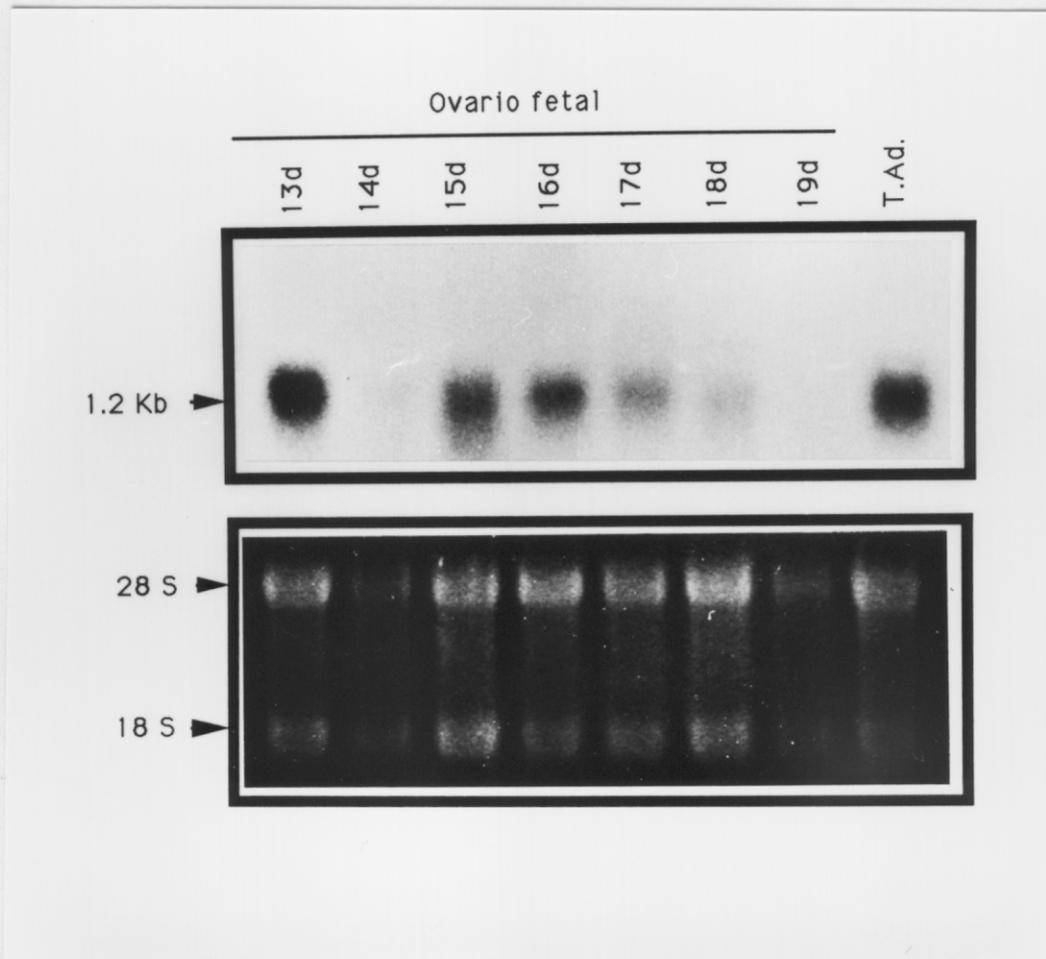


Figura 31: Northern Blot de 15 μ g de RNA total procedente de: carril 1: ovario fetal de 13 d; carril 2: ovario fetal de 14 d; carril 3: ovario fetal de 15 d; carril 4: ovario fetal de 16 d; carril 5: ovario fetal de 17 d; carril 6: ovario fetal de 18 d; carril 7: ovario fetal de 19 d; carril 8: testículo adulto. El filtro se hibridó con la sonda de cDNA del fragmento de 400 pb del extremo 3' del clon DLA-92 y como control se muestra la posición de los rRNAs tras teñir el gel con bromuro de etidio.

meiótico en testículo de ratón, alcanzando el máximo en el día 14 y luego disminuyendo hasta alcanzar niveles muy bajos en testículo adulto. Cabe destacar el elevado nivel de expresión de este clon en cerebro fetal, dando lugar a un solo transcrito de 5300 b.

DLA-108: (Fig. 22): Se aprecia la expresión abundante de un solo transcrito de unas 7 Kb en testículo de ratón adulto y menor en ovario fetal de 16 d. Este clon constituye un caso de expresión específica gonadal en ratón.

DLA-121: (Fig. 23): Aparecen 2 transcritos (4800, 2400 b) siendo mayoritario el superior. Al igual que en otros casos, la expresión durante los días prepuberales (del 6 al 22) de ratón es mayor que en testículo adulto. También se detecta una elevada expresión en riñón fetal, comparándolo con los niveles de actina en ese carril que casi no se aprecian.

DLA-123: (Fig. 24): Los transcritos mayoritarios que hibridan con este clon corresponden a un tamaño de 5000 y 1900 b. aproximadamente. La expresión del transcrito superior es casi homogénea en todos los tejidos, incluidos los somáticos. El transcrito inferior se expresa mayoritariamente en las muestras de RNA de testículo, alcanzando su punto máximo a los 14 d. Cabe señalar la aparición de un transcrito de 1200 b en testículo adulto, que no se observa en ningún otro día ni tejido.

DLA-136: (Fig. 25): Este clon podría ser un claro ejemplo de genes de expresión ubicua ya que origina dos transcritos (4800 y 1800 b) de expresión muy elevada en todos los días y tejidos. Si

comparamos los niveles de expresión del clon DLA-136 respecto a los de actina, se puede observar el elevado nivel de expresión en riñón fetal. En testículo humano se detecta un transcrito intermedio de aproximadamente 3800 b.

DLA-152: (Fig. 26): De los dos transcritos que se detectan (6000 y 2400 b) es predominante el superior en tejidos somáticos, mientras que en testículo la expresión mayoritaria la origina el inferior.

DLA-154: (Fig. 27): Es un clon muy interesante ya que origina dos transcritos de 4200 y 3000 b. El superior se expresa muy débilmente en todos los casos excepto en testículo de ratón de 22 d y adulto. Sin embargo, la expresión fundamental y mayoritaria la origina el transcrito inferior, en los días 22 y adulto, no apreciándose señal ninguna en el resto de los tejidos. Este clon constituye un ejemplo muy claro de especificidad absoluta de la gametogénesis, ya que se expresa en ovario fetal (16 d p.c.) y en testículo a partir del día 22.

DLA-168: (Fig. 28): Se observan dos transcritos (5400, 2000 b). El transcrito superior se expresa de forma abundante en testículo de ratón, desde el día 6 al 22 postnatal y disminuye en testículo adulto. Cabe destacar que el transcrito inferior sólo se expresa en testículo prepuberal, alcanzando su máximo a los 14 d y desapareciendo en testículo adulto.

Con todos estos resultados podemos agrupar los clones noveles DLA de acuerdo con su patrón de expresión en:

- 1- Genes de expresión ubicua y homogénea en todos los tejidos:
DLA-65, -121, -91, -152, -136.
- 2- Genes que expresan alternativamente un transcrito adicional en testículo: DLA-97, -68, -168, -123, -60, -93.
- 3- Genes de expresión específica gonadal: DLA-154, -108.

Con el fin de investigar el papel funcional que los genes de secuencia conocida pudieran tener en el desarrollo de la gametogénesis, hemos comenzado a analizar el patrón de expresión de la histona H3.3. En ratón hay dos tipos de genes H3.3: H3.3A y H3.3B. Ambos codifican para la misma proteína pero difieren en las regiones no codificantes 5' y 3' (Hraba-Renevey y Kress, 1989), (Wellman y col., 1987).

El interés de iniciar este estudio con dicho clon se basa en:

- La aparición de dos clones, mediante nuestra selección, con elevada homología con la histona H3.3.
- La región 3' de nuestros clones presentaba homología con la correspondiente al pseudogen H3.3A de ratón y a los genes H3.3A de pollo y conejo, como se describirá posteriormente en el capítulo de Discusión.
- Hasta hoy no se había encontrado el gen funcional de la histona H3.3A de ratón.

Las líneas celulares de eritroleucemia de ratón (MEL) representan un buen modelo para el estudio de la transición de su estado tumoral al de diferenciación terminal. Las células MEL son precursores eritroides transformadas que están detenidas en el estadio de proeritroblasto de la maduración eritroide (Friend y col., 1971). Un amplio número de compuestos químicos, incluida la hexametilénbisacetamida (HMBA) pueden inducir estas células para

reiniciar el programa de diferenciación eritroide (Marks y Rifkind, 1978). Se necesita un periodo de 12-24 h hasta que las células entran de forma irreversible en el proceso de diferenciación terminal (Gusella y col., 1976).

Krimer y cols. (enviado para su publicación, 1993) demostraron la expresión elevada de un pseudogen de la histona H3.3A en células MEL tras ser inducidas por HMBA al cabo de 4h, originando un transcrito de 1.2 Kb.

Con el fin de comprobar si el clon DLA-92 producía el mismo efecto y si efectivamente correspondía a la H3.3A se realizó un Northern Blot partiendo de 15 µg de RNA total procedente de células MEL inducidas por HMBA al cabo de distintas horas (Fig. 29), que fue proporcionado por la Dra. D.B. Krimer (C.I.B., C.S.I.C.). Se usó como sonda un fragmento de 400 pb del extremo 3' que resultó de la digestión con KpnI del clon DLA-92 y la posterior elución con GeneClean tras electroforesis en gel de agarosa-TAE. Se marcó solo el extremo 3' para evitar que diese reacción de hibridación cruzada con cualquier otra histona H3.3, ya que presentan un alto grado de homología en sus regiones codificantes.

Como puede observarse, se detecta un transcrito de 1.2 Kb que comienza a aumentar su expresión a las 4 h hasta las 24 h y luego comienza a disminuir, tal y como ya se había previsto.

Además se estudió el patrón de expresión de esta histona durante la gametogénesis, por lo que se relizaron Northern-blots con RNA procedente de:

- Ovario fetal de 13 d
- Ovario fetal de 14 d
- Ovario fetal de 15 d

- Ovario fetal de 16 d
- Ovario fetal de 17 d
- Ovario fetal de 18 d
- Ovario fetal de 19 d
- Testículo prepuberal de 10 d
- Testículo prepuberal de 14 d
- Testículo prepuberal de 22 d
- Testículo adulto

Aparece un transcrito de 1200 b. Como puede observarse en las figuras 30 y 31, existe una elevada expresión en testículo adulto, equivalente a la expresión en ovario fetal de 13 d. Además, esta expresión es del orden de 10 veces mayor que la que se alcanza tras inducir las células MEL con HMBA. A lo largo del desarrollo de la oogénesis, se aprecia una disminución de la expresión, hasta hacerse indetectable en el día 19.

DISCUSSION

DISCUSION

El análisis molecular de la expresión diferencial de genes durante la gametogénesis, mientras transcurre la profase meiótica en los estadios tempranos de la oogénesis en ratón, requiere la construcción de genotecas de cDNA para esas etapas de desarrollo del ovario fetal. En este trabajo se describe la construcción y caracterización inicial de distintas genotecas de cDNA a partir de RNA procedente de ovario fetal de 16 d, 17 d y de testículo adulto.

Muchas proteínas reguladoras, incluida *Hox 1.4* (Wolgemuth y col., 1987), *Zfp-35* (Cunliffe y col., 1990), *D1Pas1* (Leroy y col., 1989), *c-mos* (Goldman y col., 1987) y *N-ras* (Wolfes y col., 1989) se ha visto que se activan en el estadio de paquitena, lo que parece sugerir que éste es el punto en el que los sistemas reguladores comienzan a actuar para los acontecimientos de diferenciación y desarrollo que ocurren durante la meiosis.

Tras analizar el contenido en tipos celulares de los ovarios fetales de 16 días y comprobar que en este día existe un elevado porcentaje de oocitos en paquitena, se realizó un análisis diferencial de la genoteca de ovario fetal de 16 días usando como sondas sscDNA de testículo adulto, ya que en él se encuentran todos los tipos celulares posibles que se pueden originar en el proceso meiótico, frente a una sonda de sscDNA de una mezcla de tejidos somáticos fetales del mismo día del desarrollo (16 d).

De este modo se seleccionaron 33 clones de cDNA según el esquema de la figura 32, que mostraron expresarse si no diferencialmente, mayoritariamente en testículo adulto frente a los tejidos somáticos.

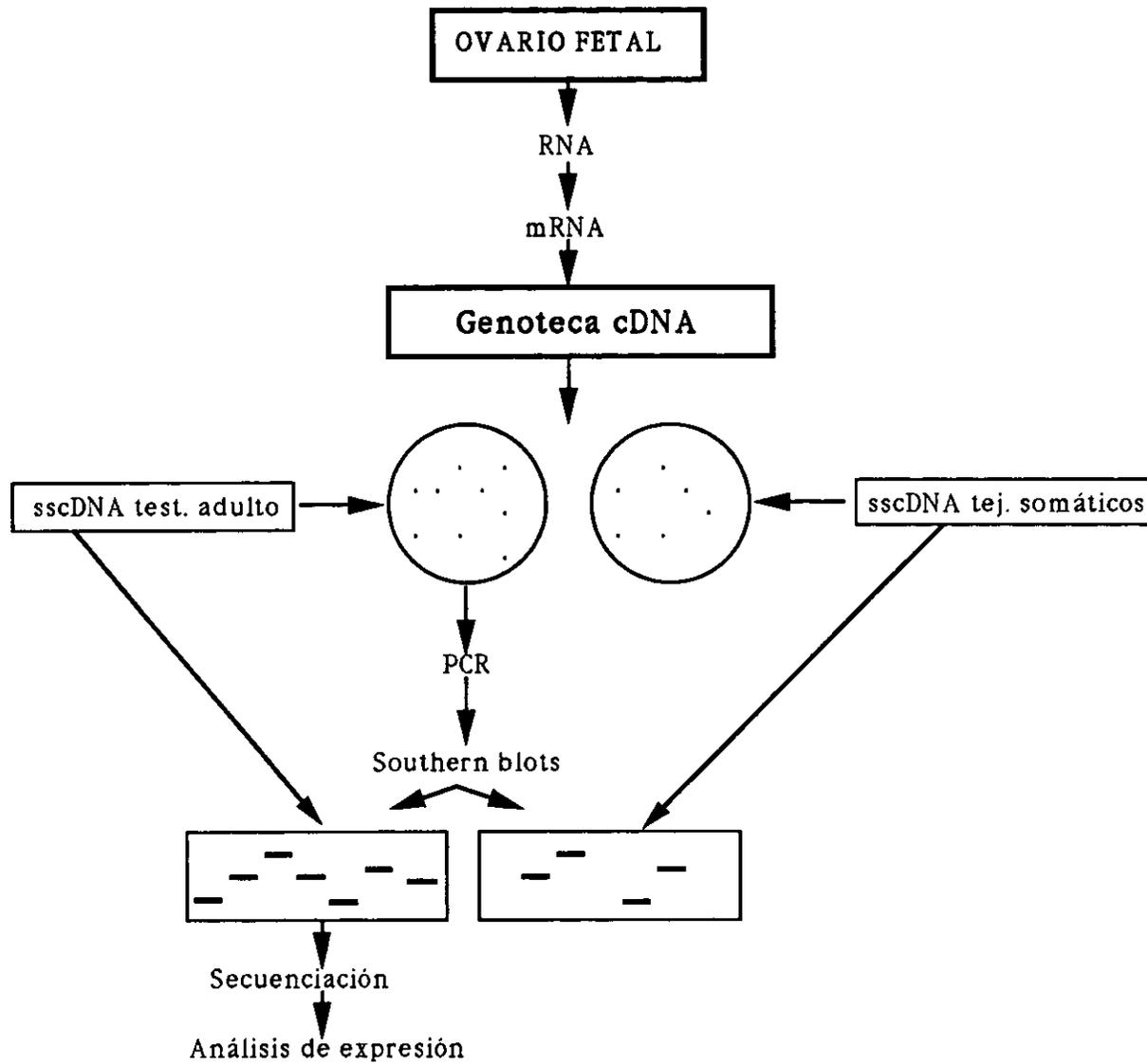


Figura 32: Esquema general del análisis diferencial de una genoteca

El análisis de la secuencia nucleotídica de cada uno de los clones DLA y la comparación en el banco de secuencias EMBL ha permitido identificar a 17 de los 33 clones. Entre éstos se encuentran algunos de expresión ubícua (p.ej.: *surf-3*, ubiquitina, Na,K-ATPasa); otros para los que es bien conocida su implicación en procesos de diferenciación (p.ej.: IGF-II, colágeno VI, piruvato quinasa) y otros que han mostrado una elevada expresión durante la gametogénesis (p.ej.: *c-jun*, laminina B2), según se describe a continuación.

Los otros 16 clones noveles podrán permitir la caracterización de nuevos factores implicados en la diferenciación celular y el desarrollo de la gametogénesis.

Genes de secuencia conocida:

Ubiquitina:

La ubiquitina es una pequeña proteína presente en casi todas las células eucariotas (Goldstein y col., 1975). Consiste en una cadena polipeptídica de 76 aminoácidos y 8.5 KDa de peso molecular y parece ser una de las proteínas más conservadas durante la evolución lo que sugiere la implicación de la ubiquitina en funciones celulares básicas (Gavilanes y col., 1982).

La ubiquitina ha sido aislada y secuenciada a partir de una gran variedad de fuentes (Finley y Varshavsky, 1985). Son todas idénticas; las únicas variantes identificadas son las obtenidas de levadura (Wilkinson y col., 1986) y avena (Vierstra y col., 1986). La secuencia de aminoácidos de éstos difiere en tres residuos de la de animales y sólo dos residuos entre ellas.

La ubiquitina ha sido identificada en el núcleo, en el citoplasma y en la superficie de la membrana celular y parece ser que su función primordial es la degradación intracelular de proteínas, de forma dependiente de ATP (Finley y Varshavsky, 1985). La degradación proteica por esta vía requiere la formación de conjugados covalentes en los que el extremo carboxilo de la ubiquitina se une a la proteína diana por un enlace amida a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de Lys o del extremo amino. La ubiquitina se conjuga también con proteínas específicas en el núcleo (Busch y Goldknopf, 1981) y en la superficie celular (Siegelman y col., 1986, Yarden y col., 1986) pero su función en estas zonas no está todavía muy clara.

Cuando la ubiquitina se une a otra proteína para formar un conjugado, en muchos casos la proteína es degradada rápidamente, mientras que otros conjugados son relativamente estables (Hershko y Ciechanover, 1986). Los conjugados estables incluyen los de histonas H2A y H2B (Goldknopf y Busch, 1977), proteínas de la superficie celular implicadas en las interacciones célula-célula (Siegelman y col., 1986) y en transducción de señal (Yarden y col., 1986) y proteínas asociadas con estructuras del citoesqueleto (Murti y col., 1988).

La ubiquitina puede unirse a otras proteínas por diferentes configuraciones, dependiendo del número de grupos de ubiquitina y de si forman uniones ubiquitina-ubiquitina. Las proteínas que se unen a una sola molécula son p. ej. el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Yarden y col., 1986) y el receptor de la hormona del crecimiento (Leung y col., 1987). Los conjugados ubiquitina-proteína más abundantes en eucariotas superiores son los de histonas H2A, H2B; estas proteínas se pueden unir a una o varias moléculas de ubiquitina (Nickel y Davie, 1989).

La importancia de la degradación proteica selectiva en la regulación celular ha sido bien reconocida (Goldberg y St. John, 1976). Las funciones de la proteólisis se pueden agrupar en cuatro clases. En primer lugar, muchas proteínas reguladoras tienen una velocidad de recambio muy alta y su degradación está controlada con una gran precisión como ocurre con las ciclinas, cuyos niveles oscilan en determinados estadios del ciclo celular y lo hacen de forma paralela a la progresión de dicho ciclo (Evans y col., 1983). En segundo lugar, ciertas enzimas son eliminadas en respuesta a señales específicas (Jabben y col., 1989). Una tercera función de degradación selectiva es la eliminación de proteínas defectivas que se han originado por mutaciones o errores en la transcripción o en la traducción, por daño químico o bien por desnaturalización inducida por calor. Estas proteínas anormales pueden ser tóxicas para la célula, por razones que no están muy claras, pero se sabe que tienden a precipitar y a formar cuerpos de inclusión intracelulares (Mitraki y King, 1989). Finalmente, las formas de proteína libres que normalmente se encuentran formando complejos de multisubunidades, están sometidos a un recambio muy rápido.

La vida media de las proteínas celulares oscila en más de tres órdenes de magnitud. Las proteínas de vida corta parecen ser degradadas predominantemente a través de la vía de su unión a ubiquitina, mientras que la mayoría de las proteínas citoplásmicas de vida larga son degradadas en los lisosomas (Rechsteiner, 1987).

Existen evidencias que hacen asignar múltiples funciones a la ubiquitina. Así, se ha visto estar implicada en procesos de reparación de DNA ya que su expresión aumenta considerablemente en respuesta a DNA dañado y durante la esporulación (Madura y col., 1990). Parece ser que la ubiquitina responde en estas situaciones,

formando los conjugados para localizar el sitio en el cromosoma donde se deben unir las enzimas de reparación. Un posible papel de la ubiquitina durante la esporulación es marcar a las histonas o a otras proteínas ribosomales cuándo se tienen que liberar del DNA. En eucariotas superiores, las histonas son generalmente despegadas del DNA en el curso de la espermatogénesis y son sustituidas por protaminas para dar lugar a una forma de cromatina muy condensada. Durante este proceso se han detectado elevados niveles de conjugados histona-ubiquitina (Agell y Mezquita, 1988, Nickel y col., 1987).

La expresión de transcritos correspondiente a ciertas proteínas es inducida cuando las células son sometidas a falta de nutrientes, aumento de la temperatura, exposición a agentes oxidantes y ciertos tratamientos antagonistas del crecimiento que se pueden agrupar con el nombre de condiciones de estrés. Una de estas proteínas inducidas como respuesta al estrés es la ubiquitina y se sabe que ejerce una función opuesta al factor de estrés y facilita la traslocación proteica a través de la membrana, aunque el mecanismo no está muy claro (Deshaies y col., 1988). Además, las condiciones de estrés y los choques térmicos, generan la desnaturalización de proteínas que podrían ser degradadas mediante su unión a ubiquitina (Parag y col., 1987).

Finalmente, la biosíntesis de ubiquitina ha sido detectada en espermatocitos premeióticos, meióticos y en espermátidas redondas durante la espermatogénesis en rata (Bucci y col., 1984). La ubiquitina, a través de la formación de los conjugados con proteínas de membrana podría estar implicada en el fenómeno de reconocimiento entre células espermatogénicas por diferentes vías: migración de células meióticas y postmeióticas a través de los túbulos

seminíferos, interacción con las células de Sertoli o el reconocimiento final de los oocitos por los espermatozoides (Agell y Mezquita, 1988).

La acumulación de transcritos de ubiquitina durante la ovogénesis, especialmente durante la fase fetal no había sido caracterizada hasta hoy. Si bien aún no hemos determinado su nivel de expresión durante el desarrollo del ovario fetal, éste debe ser relativamente alto dada la aparición de varios clones, correspondientes a ubiquitina, después del análisis diferencial con sondas de cDNAs somáticos o de testículo.

La ubiquitina parece jugar múltiples papeles en la diferenciación, en la reparación de DNA, en los mecanismos de transducción de señal y del reconocimiento de receptores por factores de crecimiento, como se ha señalado anteriormente. Todas estas funciones son decisivas en el desarrollo de la meiosis y de la gametogénesis ya que posibilitan la recombinación meiótica y la comunicación entre las células de la línea germinal y las células somáticas soporte (células de la granulosa en ovario y células de Sertoli en testículo). La ubiquitina podría tener en este caso funciones cruciales en su desarrollo y la diferenciación.

α 2-Colágeno VI:

La matriz extracelular juega un importante papel en las interacciones entre las células. No sólo está implicada en la organización estructural de las células dentro de los tejidos, sino que algunos componentes importantes como la fibronectina, la laminina y los colágenos ejercen gran influencia sobre la adhesión entre células y sobre su capacidad para diferenciarse y migrar. Debido a que estos acontecimientos ocurren en embriones tempranos, la matriz

extracelular juega un importante papel en la embriogénesis temprana.

El colágeno tipo VI es un heterotrímero compuesto de tres cadenas $\alpha 1(\text{VI})$, $\alpha 2(\text{VI})$ y $\alpha 3(\text{VI})$ sintetizadas como polipéptidos con pesos moleculares de 140, 140 y 260 KDa respectivamente (Bonaldo y Colombatti, 1989), (Colombatti y col., 1987), (Hessle y Engvall, 1984).

El análisis de la secuencia de aminoácidos en ratón revela la existencia de 5 regiones Arg-Gly-Asp (RGD); 4 de ellas son sitios conservados en pollo, ratón y humano (Ibrahimi y col., 1993). Aumailley y col. (1989) demostraron que el colágeno tipo VI establece uniones con las células a través de los dominios RGD y ésta es una característica específica de este tipo de colágeno, lo cual explica que sean dominios conservados interespecíficamente. Además, el colágeno tipo VI interacciona con los colágenos I y II y con el proteoglicano decorina (Bidanset y col., 1992). Estas observaciones sugieren que el colágeno VI juega un papel esencial en la regulación estructural de la matriz extracelular.

Se ha aislado y caracterizado la cadena $\alpha 2$ del colágeno VI a partir de pollo (Walchli y col., 1992), humano (Saitta y col., 1992) y ratón (Ibrahimi y col., 1993). Existe una elevada conservación del patrón de distribución de exones/intrones entre las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, sobre todo en su región codificante, lo que hace pensar que estos dos genes se originaron por duplicación génica. Esta conclusión está apoyada por el hecho de que los dos genes están localizados en el brazo largo del cromosoma 21 y muy próximos el uno del otro, en el genoma humano (Weil y col., 1988).

Aunque ya se conocen muchos datos estructurales del colágeno VI (Burgeson, 1988, Chu y col., 1988, Timpl y Engel, 1987) su función

es todavía un enigma. Otte y col. (1990) demostraron la presencia de antígenos contra anticuerpos de colágeno VI en estados embrionarios tempranos de *Xenopus laevis* y sugirieron que tiene un importante papel en los movimientos producidos durante la gastrulación.

Koller y col. (1991) caracterizaron el promotor de la cadena $\alpha 2$ del colágeno VI y vieron que difiere sustancialmente del promotor de los otros colágenos ya que no contiene la típica caja TATAA y, por ello, la transcripción comienza en múltiples sitios del DNA. Por otro lado, la región del promotor presenta un alto contenido de CG y forma una isla CpG. Estos hechos suelen darse en los promotores de los genes estructurales, que son expresados constitutivamente. Curiosamente, la presencia de múltiples sitios de inicio de transcripción y un elevado contenido en CG han sido encontrados en los promotores de algunos proto-oncogenes como *c-Ha-ras* (Ishii y col., 1985), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Johnson y col., 1988), y *c-yes* (Matsuzawa y col., 1991). Hechos similares se han encontrado en proteínas de la matriz extracelular como laminina (Ogawa y col., 1988) y elastina (Bashir y col., 1989).

Por ensayos de Northern-Blot en diferentes tejidos de ratón (Ibrahimi y col., 1993) se demostró que algunos tejidos como pulmón, glándula adrenal y fundamentalmente ovario expresan un alto contenido de $\alpha 2$ -colágeno VI, observándose un mRNA mayoritario de 3.7 Kb y otro minoritario de 6 Kb. También demostraron que se expresa con un alto nivel durante el desarrollo embrionario de ratón; su acumulación alcanza el nivel máximo en el día 16 de gestación y comienza a disminuir después del nacimiento hasta hacerse casi indetectable en el día 14 postnatal. A pesar de que ha sido demostrada la elevada expresión del colágeno VI ($\alpha 2$) en embriones de 16 días, es desconocida a qué tejidos específicos es debida.

Todos estos resultados indican que la expresión génica del $\alpha 2$ -colágeno VI podría ser un marcador específico de distintos programas de diferenciación.

Dado que en el trabajo aquí desarrollado se ha mostrado la expresión de la cadena $\alpha 2$ del colágeno VI en ovario fetal de 16 d (con el que se construyó la genoteca) y en testículo adulto, se podría pensar en una importante función para este gen durante el proceso de la gametogénesis, aunque no queda descartada su participación en la diferenciación a que están sometidos todos los tejidos embrionarios.

Laminina B2:

La laminina es una glicoproteína de gran tamaño, específica de la lámina basal (Timpl y col., 1979), (Timpl y col., 1983). Se caracteriza porque tiene dominios a través de los cuales puede unirse consigo misma, a colágeno tipo IV, a heparina, a receptores de superficie celular y tiene una gran variedad de actividades biológicas que incluyen el promover la adhesión y el crecimiento de células epiteliales y tumorales (Kleinman y col., 1984).

La proteína nativa (PM: 850 KDa) consiste en tres cadenas A (400 KDa), B1 (230 KDa) y B2 (220 KDa) unidas entre sí por puentes disulfuro. Mediante estudios de digestión enzimática y microscopía electrónica se ha demostrado que la laminina tiene forma de cruz, con tres brazos cortos y uno largo (Kleinman y col., 1984), (Engel y col., 1981). También se observó la presencia de dominios globulares en el medio y en los extremos de cada brazo corto y otro dominio globular en el extremo del brazo largo.

La laminina es la primera proteína de la matriz extracelular detectada durante la embriogénesis, ya que está presente en el estadio de 2 células en el embrión de ratón. En el desarrollo posterior y en tejidos maduros sirve como un componente ubicuo y mayoritario de la lámina basal.

La laminina fue primero aislada del tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón (Timpl y col., 1979) y de una línea celular de ratón derivada de un carcinoma embrionario (Chung y col., 1979); también se ha clonado la de humano (Olsen y col., 1989) y *Drosophila* (Chi y Hui, 1989).

La laminina tiene 74 posibles sitios de glicosilación y están localizados fundamentalmente en el brazo largo. La única función descrita de la glicosilación de la laminina es su implicación en la adhesión de células tumorales (Dennis y col., 1984), ya que no le confiere resistencia frente a las proteasas (Howe, 1984).

La laminina tiene una amplia variedad de actividades biológicas: promueve la unión celular, el crecimiento y la diferenciación y establece múltiples interacciones con otros componentes de la lámina basal (Timpl, 1989), (Martin y Timpl, 1987). Es un potente estimulador del crecimiento de neuritas (Edgar y col., 1984) y tiene un efecto mitogénico en células en cultivo (Kleinman y col., 1985) comparable al efecto del EGF (Panayotou y col., 1989).

El mRNA de la laminina B2 tiene un tamaño de 7.6 Kb, a diferencia del de la B1 que es de 6 Kb, y codifica para una proteína de 1607 aminoácidos. Existen muchas analogías entre la B1 y B2, en los dominios III, V y VI, lo que sugiere un origen ancestral común. El dominio III es rico en repeticiones con residuos de Cys y estas estructuras se han descrito también en el factor de crecimiento

tumoral (Derynck y col., 1984) y en el activador tisular del plasminógeno (Pennica y col., 1983).

Se han detectado variaciones en los niveles de mRNA de las cadenas de la laminina A, B1 y B2 en diferentes tejidos de la misma especie (Kleinman y col., 1987), lo que podría indicar la formación de isoformas específicas de tejido posiblemente con diferentes propiedades funcionales.

La laminina parece estar regulada en el desarrollo. Durante la embriogénesis de ratón, las cadenas B son detectadas en el estadio de 2-4 células, mientras que la cadena A no se detecta hasta en estadio de 16 células (Cooper y McQueen, 1983).

Wang y col. (1992), intentando identificar genes cruciales para el desarrollo de las células germinales masculinas de *Drosophila*, encontraron que esas células expresaban laminina. Observaron la presencia de laminina en núcleos de espermatozoides antes y después de la meiosis pero no se sabe cuál es la función de la laminina en esas células. A diferencia de lo que ocurre en ratón, los embriones de *Drosophila* expresan sincrónicamente las tres subunidades (Montell y Goodman, 1989).

El clon aislado a partir de la genoteca de ovario fetal de 16 d y que presenta una elevada homología con el cDNA de laminina B2 es característico por poseer un elemento citoplásmico de poliadenilación TTTTTTAT (Varnum y Wormington, 1990) que parece ser necesario para que el ovocito progrese con la maduración, ya que deleciones en otros genes, de esta región, han impedido que el ovocito madure (Sallés y col., 1992). Por tanto, este hecho es coherente con la expresión de la laminina B2 en ovarios fetales de ratón, donde se está llevando a cabo todo el proceso de la meiosis.

El hecho de que la laminina tenga una importante función en células germinales masculinas de *Drosophila* aunque todavía se desconozca y de que haya sido detectada, por nuestro trabajo, en tejidos que están llevando a cabo también el proceso meiótico como son el ovario fetal y el testículo adulto de ratón podría indicar que la laminina ejerce funciones cruciales en el desarrollo de los tejidos gonadales y concretamente en la meiosis que es un proceso conservado evolutivamente a lo largo de todas las especies.

Piruvato Quinasa-M:

La piruvato quinasa (ATP:piruvato 2-o-fosfotransferasa, EC 2.7.1.40) es una enzima glicolítica que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato, con generación de ATP y presenta 4 formas en mamíferos denominadas M1, M2, L y R (Tanaka y col., 1967), (Imamura y Tanaka, 1972), (Nakashima y col., 1974). Estas formas consisten en 4 subunidades idénticas de 60 kDa, pero que difieren en las propiedades enzimáticas y en la regulación de su expresión génica. La expresión de estas 4 isoenzimas es específica de tejido y está regulada en el desarrollo. La forma L está presente mayoritariamente en hígado, la M1 es mayoritaria en músculo; la clase M2 es la única forma detectada en tejidos fetales tempranos y está presente en la mayoría de los tejidos adultos como riñón, intestino, pulmón, testículo y tejido adiposo (Imamura y Tanaka, 1982); sin embargo, el tipo R sólo se expresa en células eritroides (Imamura y col., 1973).

Existen dos genes responsables de la producción de los tipos L, R y M1, M2 respectivamente (Noguchi y col., 1987), (Noguchi y col., 1986). Las isoenzimas L y R son originadas mediante el uso

alternativo de diferentes promotores del gen L, mientras que los tipos M1 y M2 se generan por "splicing" alternativo del mRNA del gen M. Estas últimas tienen un tamaño de 2220 nucleótidos y difieren en el exon 9 de los 11 de que dispone cada una. Las secuencias de aminoácidos difieren en 45 residuos de la región codificante y constituye una importante zona de contacto entre subunidades (Takenaka y col., 1989).

Las células tumorales expresan elevados niveles de la forma M2 de la piruvato quinasa (Eigenbrodt y col., 1992). Esta isoenzima está sometida a una compleja regulación por aminoácidos, por fructosa 1-6-bifosfato y por fosforilación dependiente de hormonas y oncogenes. La forma M2 es sustrato del oncogén codificado por la PP60v-src-tirosina quinasa. Al transformar una línea celular con el oncogén *src* se produjo una disminución drástica de la afinidad de la enzima por su sustrato (fosfoenolpiruvato) y esto (Eigenbrodt y col., 1992) lo explicaron como una consecuencia de la fosforilación de la piruvato quinasa en Ser y Tyr. Esta fosforilación induce la ruptura de la piruvato quinasa tetramérica en formas triméricas y diméricas con baja afinidad por el sustrato.

Por lo tanto, la forma M de la piruvato quinasa es considerada como un marcador tumoral y su expresión en tejidos fetales (p.ej. en ovarios fetales de 16 días) podría ser explicada debido al proceso de diferenciación y proliferación al que están sometidos dichos tejidos.

Na,K-ATPasa (α 1):

La Na,K-ATPasa (EC 3.6.1.37) es una proteína integral de membrana responsable del mantenimiento de las concentraciones de

Na⁺ y K⁺ intracelular contra el gradiente iónico, mediante la hidrólisis de ATP.

Está compuesta de dos subunidades denominadas α (112 KDa) y β (35 KDa) (Jorgensen, 1982). Todas las actividades catalíticas, el sitio de fosforilación y el sitio de unión de ATP residen en la subunidad α . (Kawakami y col., 1986) revelaron la existencia de, al menos, 6 segmentos transmembrana y el reparto asimétrico de la molécula α entre las fases citoplásmica y extracitoplásmica a través de la membrana.

El gradiente iónico producido por la enzima está acoplado frecuentemente a una única función fisiológica en cada tipo celular.

La Na,K-ATPasa juega un importante papel en una gran variedad de procesos fisiológicos: regulación del volumen celular (MacKnight y Leaf, 1977), diferenciación (Smith y col., 1982), proliferación celular (Rozengurt y Heppel, 1975), transporte de solutos e iones en el estómago e intestino (Allen y Navran, 1984), hígado (Blitzer y Boyer, 1978), riñón (Kyte, 1976) y hueso (Baron y col., 1986), propagación del potencial de acción de músculos y nervios (Thomas, 1972) y modulación de la acción sináptica (Phillis, 1977).

En todos los tejidos en los que se ha identificado ha mostrado consistir en dos subunidades α y β . La subunidad α contiene los sitios de unión a ATP y a ouabaína (inhibidor específico de ATPasa) y cuando es fosforilada es sometida a cambios conformacionales (Jorgensen, 1983). La subunidad β está glicosilada y su función bioquímica es desconocida, pero parece ser indispensable para la función enzimática (Sweadner y Goldin, 1980).

Recientes estudios han demostrado que existen múltiples isoformas de las subunidades α y β y que se expresan de modo específico de tejido y del desarrollo. Se conocen 3 subunidades α

(Shull y col., 1986) y 2 subunidades β (Vasallo y col., 1989), (Good y col., 1990).

El análisis de la expresión diferencial de las isoformas α ha demostrado que se expresan de modo dependiente de tejido y del estadio del desarrollo (Orlowski y Lingrel, 1988). El significado funcional de las múltiples isoformas α no se conoce. Es posible que cada una exhiba una actividad catalítica específica distinta de las otras y así, la función de la ATPasa sería una u otra dependiendo del tejido y del momento en el desarrollo. También es posible que las distintas isoformas α no tengan propiedades enzimáticas o funcionales distintas pero los genes se han podido triplicar para asegurar los niveles de ATPasa necesarios en cada tejido.

La distribución de cada una de las isoformas en los diferentes tejidos se puede resumir en (Jewell y col., 1992):

- $\alpha 1$: todos los tejidos probados.
- $\alpha 2$: músculo, cerebro, corazón adulto, adipocitos.
- $\alpha 3$: cerebro, corazón fetal.
- $\beta 1$: todos los tejidos.
- $\beta 2$: cerebro.

Estudios de la secuencia proteica de la Na,K-ATPasa procedente de distintas fuentes ha mostrado la conservación de un segmento del extremo N-terminal de la subunidad α , rico en Lys (Lingrel y col., 1990, Shull y col., 1985). Shull y col., (1985) sugirieron que esta región rica en Lys, situada hacia el lado citoplásmico de la membrana, actúa como una barrera específica de control para que el Na^+ y el K^+ accedan al sitio de unión de cationes. (Mutoh y col., 1992) demostraron que la ausencia del extremo N-terminal provocaba la disminución de la actividad ATPasa.

Aunque el gen de la subunidad $\alpha 1$ está clasificado como gen constitutivo ya que se expresa de forma ubicua en casi todos los tejidos, el nivel de expresión cambia. (Suzuki-Yagawa y col., 1992) comprobaron que estos cambios pueden ser debidos a la existencia de elementos en *cis* implicados en la expresión constitutiva y en la expresión diferencial en distintos tipos de células en rata. También comprobaron la existencia de factores de transcripción que se unen a estos elementos de regulación.

La Na,K-ATPasa podría estar implicada, en los tejidos gonadales, en múltiples funciones como la diferenciación, proliferación o el simple mantenimiento del estado iónico en esos tipos celulares. Por otro lado son ya conocidos algunos casos de expresión de isoenzimas específicas para tejidos gonadales, como ocurre con la lactato deshidrogenasa (LDH-C) (Thomas y col., 1990) y la fosfoglicerato quinasa (PGK-2) (Robinson y col., 1989). Por ello será necesario caracterizar si la subunidad $\alpha 1$ de la Na,K-ATPasa se expresa, cuantitativamente, de modo diferencial en tejidos gonadales y en qué tipos celulares se está expresando para poder interpretar así su funcionalidad.

surf-3:

El locus de ratón *surfeit* es poco usual ya que contiene una serie de genes agrupados muy próximos (*surf-1*, -2, -3, -4) que van alternando su dirección de transcripción (Williams y col., 1988). Son genes estructurales muy conservados evolutivamente y forman una familia multigénica (15-30 genes). La agrupación de los genes *surf* también se conserva en otras especies, lo que podría indicar que existe una interacción *cis* entre ellos (Williams y col., 1988).

Huxley y col. (1988) estudiaron la expresión de *surf-3* en ausencia de los otros miembros de la familia multigénica y observaron que el tamaño del mRNA es de 1 Kb y contiene un marco abierto de lectura de 266 aminoácidos que codifica para un polipéptido muy básico (23% Arg+Lys). Este hecho sugiere que la función de *surf-3* podría ser la interacción con ácidos nucleicos.

Excepto el gen *surf-3* que ha sido identificado por codificar a la proteína ribosomal L7a (Colombo y col., 1992), se conoce muy poco sobre la función de los otros genes *surfeit*. Estudios muy preliminares asignan al producto del gen *surf-4* propiedades de una proteína de membrana (Huxley y Fried, 1990).

El gen *surf-3* está muy conservado en otras especies, tiene las propiedades de un gen estructural y se traduce de forma abundante en todos los tipos celulares diferenciados (Williams y col., 1988). Los otros miembros de la familia son pseudogenes sin intrones. Esto está de acuerdo con la detección de una gran familia multigénica (de 15 a 30 genes) compuesta primordialmente por pseudogenes procesados.

En vertebrados, las agrupaciones de genes conservados son normalmente de dos tipos: uno de ellos lo constituyen los genes que se han originado por duplicación génica, como ocurre con los genes de la globina (Goodman y col., 1987) y los genes homeobox (Kessel y Gruss, 1990); el otro está representado por grupos de genes que también tienen relaciones en sus funciones pero que no muestran homología en la secuencia de nucleótidos o en la estructura proteica como los genes de histona (Albig y col., 1991). La transcripción divergentemente conservada de los genes H2a y H2b está presente en múltiples copias en el genoma. El locus *surfeit* parece corresponder al último grupo en el que no existen analogías de secuencia nucleotídica ni peptídica aunque, a diferencia con las

histonas, sólo existe una copia del locus *surfeit* en el genoma de cada especie de vertebrado analizado.

Por duplicación génica o por asociaciones fortuítas, los genes pueden permanecer en una agrupación por razones que impliquen interacciones cis en la misma región cromosómica. Por ejemplo, la regulación de la expresión de los genes en estas agrupaciones puede estar bajo el control de una zona determinada, como ocurre en el locus de la globina (Grosveld y col., 1987). Otro ejemplo de agrupaciones de genes que muestran regiones comunes de control es el caso de los promotores bidireccionales, que controlan pares divergentes de genes.

Alternativamente, el orden de los genes en estas agrupaciones puede tener un papel en su expresión secuencial como ocurre con los genes homeobox durante el desarrollo (Kessel y Gruss, 1990). En este caso existe una relación funcional entre todos los productos génicos.

El locus *surfeit* difiere de otras agrupaciones génicas en que existen distancias muy pequeñas en la secuencia de DNA, entre genes adyacentes. La transcripción de cada uno de los genes *surf* va alternando respecto a los de sus extremos. Además, la secuencia entre los genes *surf-1* y *surf-2* ha mostrado contener un promotor bidireccional (Lennard y Fried, 1991) lo que podría explicar sus posiciones tan próximas. Los genes *surf-3* y *surf-1*, *surf-2* y *surf-4*, tienen unidos sus extremos 3', hecho que podría sugerir la importancia de la regulación negativa (por control "antisense" o anulación del promotor). Este control negativo podría ocurrir en diferentes momentos del ciclo celular o en distintos estadios de diferenciación y tiene la ventaja de que se puede elevar la expresión de uno de los genes para disminuir la expresión del resto de sus vecinos.

Así, el locus *surfeit* puede representar una tercera clase de agrupaciones de genes en la que genes funcionalmente diferentes se agrupan de tal forma que permiten interacciones *cis* entre ellos que regulan la expresión génica de una forma positiva y negativa (Colombo y col., 1992).

El hecho de que la agrupación tan próxima de los genes *surf* y que sus islas CpG se hayan conservado unos 600 millones de años de evolución divergente que separa el ratón y el pollo (Benton, 1990, Goodman y col., 1987) sugiere firmemente que la organización del locus *surfeit* es muy importante para la regulación de la expresión génica.

Así pues, nos encontramos ante un gen cuya regulación de su expresión tiene un mecanismo muy sofisticado, lo que parece indicar que su función tiene mayor trascendencia que sólo producir una proteína estructural. La gametogénesis es un caso obvio de necesidad de este tipo de regulación debido al proceso de diferenciación en el que participa y, por tanto, el gen *surf-3* podría desempeñar un importante papel en estos tejidos.

α -Globina:

Los genes encargados de codificar para la α y β -globina parece ser que se generaron por duplicación génica, a partir de una secuencia ancestral común, hace unos 500 millones de años. (Nishioka y Leder, 1979) determinaron la secuencia nucleotídica completa del gen de la α -globina en ratón y compararon las homologías existentes con la β -globina. La secuencia completa contiene 1441 nucleótidos y el hecho más destacable es que la región codificante, que origina una proteína de 142 aminoácidos, está interrumpida por dos intrones

dando lugar a tres bloques codificantes. Esto también ocurre en la β -globina, y en todos los vertebrados analizados, lo que está de acuerdo con el origen ancestral común. Los tres exones tienen un elevado contenido de GC (55, 59, 59% respectivamente de 5' a 3').

La expresión de todas las globinas conocidas se da de forma paralela al desarrollo de la línea celular eritroide. Wilkinson y col. (1987) investigaron los cambios producidos en los niveles de mRNAs y proteínas entre los días 8 y 10 p.c. de ratón y observaron que los cambios más espectaculares ocurridos entre estos días fueron la aparición de los mRNAs de globinas y sus proteínas, hecho que coincidía perfectamente con el establecimiento de todo el sistema eritroide en esos días (agrandamiento del corazón y extensión del sistema circulatorio).

Al estudiar los factores reguladores nucleares que intervienen en la expresión génica específica y síntesis de la hemoglobina en el desarrollo del sistema eritroide, se encontró un factor de transcripción denominado GATA-1 presente en todas las especies de vertebrados analizados (Evans y col., 1988).

El factor de transcripción GATA-1 es un regulador fundamental de genes de la línea celular hematopoiética (Orkin, 1992) y pertenecen a una familia de factores que se unen a una secuencia consenso GATA (Tsai y col., 1991, Wall y col., 1988, Plump y col., 1989). El motivo GATA fue identificado originalmente en regiones reguladoras en *cis* de la globina y de otros genes específicos eritroides (Mignotte y col., 1989), pero el rango de genes controlados por factores GATA ha aumentado considerablemente (Redondo y col., 1991, Wilson y col., 1990).

Los miembros de la familia del factor de transcripción GATA muestran un dominio conservado que corresponde a un motivo "zinc-

finger" de unión a DNA, pero sin embargo, el patrón de expresión de cada uno es distinto (Yamamoto y col., 1990, Martin y col., 1990, Romeo y col., 1990).

Ito y col. (1993) demostraron que el mRNA del gen GATA-1 de ratón se transcribe de forma específica en testículo, desde el promotor localizado en el extremo 5' hasta el primer exón eritroide; los siguientes exones (que codifican para la proteína GATA-1) son usados en común por los transcritos eritroide y de testículo. Postularon que las formas de GATA-1 en testículo y en células eritroides podrían ser transcritos a partir de dos promotores distintos que generan dos primeros exones alternativos, pero como las únicas diferencias se dan en el extremo 5' demostraron que la proteína GATA-1 expresada en células eritroides es la misma que la encontrada en túbulos seminíferos de ratón.

Ito y col. (1993) examinaron la expresión del gen GATA-1 durante el desarrollo y encontraron que la expresión máxima se daba en testículo prepuberal (2 semanas) y más tarde disminuía, hasta tener una expresión muy baja en adulto, por lo que sugirieron que el gen GATA-1 regula la expresión génica durante estadios tempranos de la espermatogénesis.

Sin embargo, otros estudios preliminares de Ito y col. (1993) no han conseguido demostrar que el promotor alternativo sea usado en la línea germinal femenina de ratón.

Todos estos estudios sugieren que el gen GATA-1 actúa como un importante efector durante la gametogénesis. La modulación de GATA-1 regulada a lo largo del desarrollo testicular puede reflejar la gran importancia de esta proteína en la generación de las células germinales, de forma equivalente al papel que juega la misma proteína en la hematopoesis.

Hasta este reciente descubrimiento de Ito y col. (1993), GATA-1 era considerado como factor de transcripción regulador exclusivo de la globina y de genes eritroides. Sin embargo, la existencia de promotores y procesamiento alternativo en este gen que se expresa específicamente durante la espermatogénesis temprana abren la posibilidad de la expresión de un clon con una elevada homología con la α -globina y que hemos encontrado en la genoteca de cDNA de ovario fetal, que puede ser producto, a su vez, de:

- la presencia de un gen con elevada homología con la α -globina y que sea producto de los mecanismos de regulación de un factor similar a GATA-1.
- La expresión de GATA-1 también durante la ovogénesis temprana, lo que haría expresar α -globina en los dos sistemas (ovario fetal y testículo adulto).

Estas u otras explicaciones alternativas tendrán que ser comprobadas durante el desarrollo de la gametogénesis. La proporción relativa de unos transcritos respecto a otros dentro del mismo tejido pero en diferentes etapas del desarrollo, puede aportar nuevos conocimientos en los mecanismos de regulación del proceso.

IGF-II:

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) son péptidos de cadena sencilla, estructuralmente homólogos a la proinsulina (Clemmons, 1989), que tienen efectos pleiotrópicos en el crecimiento y metabolismo celulares (Froesch y col., 1985, Daughaday y Rotwein, 1989). Se han caracterizado dos IGFs. El IGF-I es un péptido básico de 70 aminoácidos que sirve de mediador de muchas de las acciones de la hormona del crecimiento (Rinderknecht y

Humbel, 1978, Schoenle y col., 1982). El IGF-II es un péptido de 67 aminoácidos y sus funciones no están del todo esclarecidas.

En mamíferos, el papel más importante del IGF-I se cree que se da en el crecimiento postnatal. El IGF-I es sintetizado en el hígado y otros tejidos (Beck y col., 1987, Han y col., 1987, de Pablo, 1989) y su producción está regulada por la hormona del crecimiento (Froesch y col., 1985). El IGF-II también es sintetizado por un amplio rango de tipos celulares, pero los transcritos de IGF-II son más abundantes en tejidos fetales y los niveles de expresión disminuyen después del nacimiento (Beck y col., 1987, Han y col., 1987). Este hecho parece indicar que el principal papel de IGF-II se da en el desarrollo embrionario (Heath y Smith, 1989).

En plasma y en fluidos extracelulares IGF-I y IGF-II se han encontrado predominantemente en asociación con proteínas específicas de unión que se cree que regulan su interacción con las células diana (Baxter y Martin, 1989). En mamíferos, tanto el IGF-I como el IGF-II pueden activar células diana por su unión al receptor de IGF-I de la superficie celular, que es estructuralmente homólogo al receptor de insulina. Sin embargo, también existe un receptor tipo II de IGF que sólo une de forma específica IGF-II (Clemmons, 1989).

Los genes para IGF-I y IGF-II de rata, ratón y humano han sido aislados y caracterizados (Sussenbach, 1989). También ha sido caracterizado el IGF-II en ratón (Rotwein y Hall, 1990) y en tejido fetal ovino (Delhanty y Han, 1993).

En roedores, IGF-II es sintetizado durante el periodo fetal y neonatal, por lo que se ha postulado que el IGF-II puede actuar como un factor de crecimiento fetal y como un factor de diferenciación (Moses y col., 1980, Beck y col., 1987, Adams y col., 1983, Stylianopoulou y col., 1988). Sin embargo, la producción de IGF-II en

humano es continúa durante toda la vida, con elevadas concentraciones del péptido en suero de adulto (Daughaday y Rotwein, 1989).

La unidad de transcripción de IGF-II es muy compleja, ya que contiene múltiples especies de mRNA generados por el uso alternativo de distintos promotores, "splicing" alternativo y sitios de poliadenilación alternativos (Sussenbach, 1989).

Rotwein y Hall (1990) demostraron que el IGF-II en ratón está compuesto por 6 exones funcionales que son transcritos y procesados a 3 mRNAs que difieren en sus extremos 5' pero que tienen en común la región codificante y el extremo 3' no codificante. Además, el gen contiene dos pseudo-exones que parece ser que evolutivamente provienen de un exón que sí es funcional en IGF-II de humano. En ratón, el patrón de expresión parece ser mucho más simple que en otros mamíferos, ya que sólo es utilizado un sitio de poliadenilación (Nevins, 1983). Por "Northern-Blot" se observa la expresión predominante de un transcrito de 4.4 Kb en hígado de ratón recién nacido. Tras secuenciar el mRNA de IGF-II, Rotwein y Hall (1990) demostraron que contiene una región no codificante en el extremo 3' de 3045 pb. Al igual que ocurre con sus homólogos de rata y humano, el gen de IGF-II de ratón está localizado en el extremo 3' de la insulina (en el cromosoma 7) y en la misma polaridad de transcripción (Bell y col., 1985).

En aves, están presentes los péptidos de IGF-I y IGF-II, pero en niveles muy bajos (Dawe y col., 1988). Aunque se han detectado abundantes transcritos de IGF-II (Engstrom y col., 1987) y péptidos IGF-II (Ralphs y col., 1990) en tejidos embrionarios de pollo, no parece existir el receptor tipo II para IGF-II (Bassas y col., 1988). Taylor y col. (1991) identificaron transcritos "antisense" del gen de

IGF-II en pollo, hecho que no se había detectado en otras especies. Además, dado el rango de transcritos detectados por Northern-Blot, parece ser que la transcripción del gen de IGF-II en pollo es tan compleja como en mamíferos, a lo que se añade otro grado de complejidad y es la presencia de transcritos "antisense".

Las funciones de los transcritos "antisense" son desconocidas. Se han identificado transcritos "antisense" en un gran número de genes eucariotas y en algunos casos se sabe que codifican para proteínas (Lazar y col., 1989, Kimelman y Kirschner, 1989). El hecho de que los niveles del péptido de IGF-II en tejidos fetales humanos no sean tan altos como cabría esperar por los elevados niveles de mRNA (Hill, 1990) sugiere que la síntesis de IGF-II podría estar regulada a nivel de su traducción, ya que los transcritos "antisense" del IGF-II podrían hibridar con el mRNA de IGF-II.

Yeh y col. (1991) mediante PCR detectaron la presencia de IGF-II en todos los estadios del desarrollo del ovario fetal humano. En ovario adulto, se ha postulado que el IGF-II tiene varias funciones en las células de la granulosa, ya que puede estar implicado en la replicación en las células de la granulosa, en la producción de estrógenos, de progesterona y en la biosíntesis de proteoglicanos (Adashi y col., 1985). Geithovet y col. (1989) identificaron la presencia de mRNA de IGF-II en folículos humanos preovulatorios obtenidos por fertilización *in vitro*. Postularon que el IGF-II es un importante factor de crecimiento para la función de las células foliculares en el estadio preovulatorio. Yeh y col. (1991) sugirieron que el IGF-II es un importante regulador en el crecimiento y desarrollo de las células de ovario adulto.

La espermatogénesis en mamíferos está caracterizada por una intensa y continua actividad proliferativa con un complejo patrón de

divisiones mitóticas de los diferentes tipos de espermatogonias y finalmente una división meiótica de los espermatocitos primarios para dar lugar a las células haploides. La función testicular está controlada por las gonadotropinas de la pituitaria y la testosterona, pero estas hormonas sólo ejercen acciones indirectas en las células germinales y sus efectos parecen estar mediados por factores producidos localmente, con una función paracrina en el testículo.

Se han caracterizado ya varios factores de crecimiento cuyos péptidos se producen en diferentes tipos celulares y en distintas fases del desarrollo testicular (Bellvé y Zheng, 1989). Las funciones fisiológicas de muchos de estos factores de crecimiento en testículo son todavía desconocidas.

Los IGFs, que tienen un importante papel en el crecimiento fetal y postnatal durante el desarrollo, son sintetizados en múltiples tejidos, incluido el testículo (Lund y col., 1986, Casella y col., 1987, Voutilainen y Miller, 1988) donde se ha sugerido que tienen una función auto y paracrina (D'Ercole y col., 1984, Borland y col., 1984, Lin y col., 1986). Söder y col. (1992) demostraron que tanto IGF-I como IGF-II estimulan la síntesis de DNA espermatogonial y ejercen el efecto de mantener el DNA premeiótico in vitro.

Es posible que algunos factores de crecimiento descritos en testículo tengan funciones adicionales a su efecto en la proliferación de las células germinales. Estos podrían incluir la regulación de la proliferación de las células somáticas durante el desarrollo testicular. Tales efectos han sido descritos para los IGFs en las células de Sertoli (Borland y col., 1984, Lin y col., 1986). Sin embargo, también es posible que otras células produzcan factores de crecimiento testiculares, con una importancia directa en la proliferación de las

células germinales. De hecho, el IGF-I puede ser producido por las células de Leydig (Lin y col., 1992).

El análisis llevado a cabo en nuestro trabajo sugiere de forma indirecta la presencia de transcritos de IGF-II en testículo adulto, hecho que no se había demostrado hasta hoy, que son capaces de hibridar a través de su cDNA correspondiente con los fragmentos clonados de cDNA de IGF-II en la genoteca de ovario fetal de 16 d. El estudio de su función deberá desarrollarse tanto a nivel transcripcional, como a nivel traduccional, además del efecto regulador de la presencia del ligando y del receptor a lo largo del desarrollo de la gametogénesis.

Genoma Mitocondrial de Ratón:

El genoma mitocondrial de ratón es un DNA circular de doble cadena (16295 pb) que codifica para 2 RNAs ribosómicos (12 S y 16 S), 22 RNAs de transferencia y 13 polipéptidos (Bibb y col., 1981, Anderson y col., 1981, Chomyn y col., 1986).

Las células de mamíferos contienen varios miles de copias de genoma mitocondrial circular específico de cada especie, que es replicado de forma autónoma y transcrito dentro del orgánulo. La mitocondria mantiene un sistema completo de síntesis de proteínas que es físicamente y genéticamente distinto del sistema citoplásmico.

Varios componentes del sistema como son el rRNA, tRNA y mRNA son codificados por el DNA mitocondrial mientras que otros son productos génicos nucleares que son importados desde el citoplasma. (Anderson y col., 1981).

La mayoría de las proteínas presentes en la mitocondria son codificadas por genes nucleares, pero un pequeño número son

codificadas por el DNA mitocondrial y son traducidas en los ribosomas mitocondriales. Estos productos de traducción mitocondrial han sido identificados como componentes de los complejos enzimáticos del interior de la membrana mitocondrial, que funcionan en el transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa.

Se han encontrado genes que codifican para proteínas como la "citocromo C oxidasa" (subunidades I, II y III), "ATPasa" (subunidad 6 y 8), "citocromo b", algunas unidades de la NADH deshidrogenasa y 8 unidades de proteínas codificadas y de función desconocida (URFs, Anderson y col., 1982, Michael y col., 1984, Chomyn y col., 1986). Estas URFs han mostrado ser transcritos poliadenilados en ratón y en humano (Battey y Clayton, 1978, Ojala y col., 1980).

El DNA mitocondrial de ratón es comparable con el de humano en el tipo de genes que codifica y en su tamaño, ya que en humano es de 16569 pb (Anderson y col., 1981).

Se sabe bastante sobre la transcripción del genoma mitocondrial de células somáticas (Clayton, 1984) y sobre la expresión del genoma mitocondrial en embriones tempranos de ratón (Piko y Taylor, 1987), pero se conoce muy poco sobre la expresión del genoma mitocondrial en células germinales.

En testículo de mamíferos, la mitocondria cambia durante la espermatogénesis (DeMartino y col., 1979). Durante la fase inicial de la espermatogénesis existen espermatogonias tipo A, intermedias, tipo B y un grupo de células somáticas de soporte. La mitocondria de la célula germinal en este estado parece ser estructuralmente similar a la de los tejidos somáticos. Durante la meiosis, sin embargo, aparecen mitocondrias que contienen matrices vacuoladas; estas mitocondrias constituyen un 80% de las mitocondrias totales en testículo de individuos adultos (DeMartino y col., 1979).

Las mitocondrias espermáticas tienen propiedades únicas ya que contienen proteínas específicas, como la variante testicular del citocromo c (Goldberg y col., 1977). Sin embargo, estas mitocondrias han demostrado contener DNAs mitocondriales (Hecht y col., 1984) que son sintetizados en ratón durante la meiosis y la espermatogénesis (Hecht y Liem, 1984).

Se ha demostrado que el genoma mitocondrial es heredado exclusivamente por vía materna (Gyllensten y col., 1985).

Alcivar y col. (1989), para determinar si la pérdida del genoma mitocondrial paterno podría ser debido a la deficiencia de RNA en las mitocondrias espermáticas, estudiaron la expresión de genes mitocondriales a lo largo de la espermatogénesis de ratón y demostraron que los niveles de RNA no varían ni cualitativa ni cuantitativamente, pero sí disminuye gradualmente la presencia de los transcritos estudiados en poblaciones de paquitenas y de espermátidas redondas.

Al parecer, el fenómeno de la herencia materna depende de la razón mitocondrias paternas:maternas (1:1000) presentes en el huevo fertilizado (Hecht y col., 1984, Piko y Taylor, 1987) y a la incapacidad de las mitocondrias paternas de sobrevivir tras la fertilización, aunque la causa es todavía desconocida.

El hecho de existir mitocondrias diferenciales tanto morfológica como funcionalmente durante la espermatogénesis dan una primera idea de un posible papel específico del genoma mitocondrial durante la gametogénesis masculina. Sin embargo, no se tienen referencias de un papel similar durante la ovogénesis. La aparición, tras nuestra selección en la genoteca de ovario fetal de 16 d, de dos clones correspondientes a dos transcritos distintos del genoma mitocondrial, hacen presuponer inicialmente una participación activa de dicho

genoma en la diferenciación de la línea germinal femenina. La caracterización, mediante hibridación *in situ*, de los tipos celulares en los que se produce la máxima expresión, a qué productos génicos corresponden y cuáles son sus aspectos funcionales durante la gametogénesis son algunas de las cuestiones que se tratarán de resolver a partir de este punto.

***c-jun*:**

Cada día es más patente el interés que tiene el conocimiento de las funciones de los proto-oncogenes en los procesos normales de desarrollo y diferenciación.

Las proteínas codificadas por los proto-oncogenes tienen diversas funciones y pueden servir como factores de crecimiento, receptores de hormonas y de factores de crecimiento, proteínas que unen GTP y factores de transcripción (Propst y col., 1988, Vogt y Bos, 1989, Mitchell y Tjian, 1989).

Los oncogenes activados estimulan el crecimiento anormal de las células. Por otro lado, se ha sugerido que los proto-oncogenes tienen un papel funcional en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de células normales (Bishop, 1983, Hirai y col., 1989, Wolfes y col., 1989). Sin embargo, las funciones fisiológicas de la mayoría de los protooncogenes es aún desconocida.

El proto-oncogén *c-jun* se ha identificado como un factor de transcripción (Bohmann y col., 1987) cuya expresión se ha relacionado con la inducción de fenómenos cancerosos (Vogt y Bos, 1989). Es el homólogo celular del virus del sarcoma de aves (ASV17), un retrovirus defectivo de replicación aislado de un sarcoma

espontáneo de pollo (Maki y col., 1987). La oncogenicidad de ASV17 se cree que es debida a la presencia del gen *jun*.

c-jun codifica para un componente del factor de transcripción AP-1 (Bos y col., 1988). Los otros miembros de la familia, *jun B* y *jun D* muestran una gran homología de secuencia de aminoácidos con *c-jun* (Ryder y col., 1988, Ryder y col., 1989).

Se han aislado y secuenciado los cDNAs de los proto-oncogenes *c-jun* de pollo (Hattori y col., 1988) y humano (Nishimura y Vogt, 1988). En ratón se han aislado los cDNAs que codifican para *c-jun* (Ryder y Nathans, 1988), *jun B* (Ryder y col., 1988) y *jun D* (Nakabeppu y col., 1988, Ryder y col., 1989), a partir de una genoteca de cDNA de células NIH 3T3 estimuladas por suero.

Aunque se ha encontrado una gran homología entre *jun B*, *jun D* y *c-jun*, *jun B* y *c-jun* parecen estar reguladas de forma distinta a *jun D* (Ryder y col., 1989, Hirai y col., 1989, Chiu y col., 1989). Los mRNAs de *jun B* y *c-jun* son rápidamente inducidos tras la adición de factores de crecimiento, mientras que los niveles de *jun D* no aumentan de forma significativa (Ryseck y col., 1988, Hirai y col., 1989). Los tres *c-jun*, *jun B* y *jun D* son expresados de forma diferencial en tejidos de ratón y en líneas celulares (Ryder y col., 1989). La transcripción de *jun* ha mostrado estar estimulada por su propio producto *jun/AP-1* (Angel y col., 1988). Además, *jun B* tiene propiedades biológicas distintas a las de *c-jun* (Chiu y col., 1989) ya que *c-jun* es un eficiente activador del promotor de *c-jun* y *jun B* no, aunque *jun B* puede servir como un regulador negativo de *c-jun* (Chiu y col., 1989).

La gametogénesis, como proceso regulado de renovación celular, proliferación y diferenciación, es un sistema único para el análisis de la expresión génica debido al enriquecimiento de

poblaciones celulares germinales en división y en diferenciación terminal que pueden ser aisladas (Bellve y col., 1977). Se ha estudiado la expresión de algunos proto-oncogenes durante el desarrollo de las células germinales masculinas (Propst y col., 1988), (Ponzetto, 1989). Se ha observado la presencia de transcritos de mRNAs para *c-raf*, *c-ras H*, *c-ras N* y *c-ras K* (Wolfes y col., 1989). También se han detectado *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* (Wolfes y col., 1989) que se expresan fundamentalmente durante la fase premeiótica de la espermatogénesis. Más específicamente, se han detectado niveles muy elevados del transcrito *c-jun* en poblaciones de espermatogonias tipo B y niveles más bajos en los estadios anteriores y posteriores de la espermatogénesis (Wolfes y col., 1989). Otros protooncogenes como *pim-1* (Sorrentino y col., 1988), *c-mos* (Propst y col., 1987) e *int-1* (Shackleford y Varmus, 1987) son expresados primordialmente durante la fase posmeiótica de las células germinales.

Alcivar y col. (1990) observaron la existencia de mRNA de *c-jun* en células testiculares y vieron que, tanto *jun B* como *c-jun* están regulados en el desarrollo; la expresión máxima se vió en tejidos de 8 días p.n. y la minoritaria en 17 días p.n. y adultos. Además, separando los tipos celulares observaron que esa máxima expresión correspondía a las espermatogonias tipo B y los niveles más bajos se daban en espermatocitos en paquitena, espermátidas redondas y cuerpos residuales.

Por tanto, estos datos parecen indicar que *c-jun* podría tener un papel específico en la proliferación de las espermatogonias o en su mecanismo de diferenciación hacia el proceso meiótico, ya que se acumula preferentemente en espermatogonias tipo B. Este hecho contrasta con el estado de diferenciación de los ovocitos en el día 16

p.c. de los ovarios fetales con los que se construyó la genoteca y de la que se aisló el clon correspondiente.

Desconocemos, por el momento, si dicha expresión es mayoritaria en células somáticas de la granulosa o, por el contrario, en los ovocitos paquiténicos. En cualquier caso, la función de *c-jun*, como factor de transcripción en la gametogénesis masculina y femenina, parecen a priori diferentes.

Histona H3.3:

Las histonas son las principales proteínas estructurales de los cromosomas eucarióticos. Son pequeños polipéptidos de 100-200 aminoácidos que no contienen Trp y son ricos en Lys y Arg. Se pueden clasificar en cinco tipos de acuerdo a su movilidad electroforética y cromatográfica y a su secuencia de aminoácidos (Isenberg, 1979, Zweidler, 1984).

Dos polipéptidos de las clases H2A, H2B, H3 y H4 constituyen un octámero alrededor del cual el DNA de doble cadena se enrolla para formar el núcleo del nucleosoma, con un fragmento de DNA que conecta un nucleosoma con el siguiente, asociando, en cromatina inactiva, los nucleosomas mediante un polipéptido de la clase H1 (Hancock y Boulikas, 1982).

Cada tipo de histona es una familia de 2 o más polipéptidos relacionados estructuralmente denominados variantes o subtipos; difieren uno del otro en varios residuos de aminoácidos y son sintetizados en diferentes cantidades dependiendo del estado fisiológico de la célula. Por otro lado, se sabe que los genes de histona, incluidos los humanos, son repetitivos (Old y Woodland, 1984) ya que

diferentes genes de una misma clase de histona pueden expresar polipéptidos de secuencia de aminoácido diferente o idéntica.

Se puede hacer una clasificación de las histonas en mamíferos de acuerdo con la relación a la síntesis de DNA (Zweidler, 1984, Old y Woodland, 1984):

1- Variantes dependientes de replicación: su síntesis se induce al comienzo de la síntesis de DNA y se inhibe al final: H2A-1, H2B-2, H3-1, H3-2, H1.

2- Variantes parcialmente dependientes de replicación: se expresan al comienzo de la síntesis de DNA, pero no son totalmente reprimidas al final de la fase S: H2A-2, H2B-1.

3- Variantes independientes de replicación: su expresión no depende de la fase del ciclo celular: H2A-3, H3-3, H1°.

4- Histonas minoritarias: son independientes de replicación y están presentes en pequeñas cantidades en células somáticas: H2A-4.

La función primaria de las histonas es estructural, es decir, el empaquetamiento del DNA en estructuras compactas reversibles que no interfieran en la expresión y en la replicación del genoma (Isenberg, 1979). El descubrimiento de las variantes de histona y la hipótesis consiguiente de la heterogeneidad del nucleosoma en cromosomas de un sólo tipo de célula hizo pensar que las variantes de una misma clase de histona pueden tener diferentes funciones.

Algunos experimentos desarrollados en sistemas biológicos diferentes (Isenberg, 1979, Wu y col., 1985, Zweidler, 1984, Hancock and Boulikas, 1982, Stein y col., 1984) mostraron que:

- Las variantes de histona son sintetizadas a diferentes tiempos durante el desarrollo embrionario, diferenciación celular y fases del ciclo celular.

- Diferentes tejidos del mismo organismo difieren en las cantidades relativas de las variantes de la misma clase de histona de acuerdo a su estado hormonal.
- Hay variantes específicas de testículo (H1t, H2Bt) (Bucci y col., 1982).
- Existe una relación entre la composición de las variantes de histona en la cromatina y sus propiedades estructurales.

Todos estos datos apuntan a la existencia de asociaciones entre la composición de las variantes de histona y la proliferación celular, transcripción de DNA, síntesis de DNA y meiosis.

Un hecho claro es que la transición desde los transcritos maternos a los transcritos derivados del genoma del cigoto en el desarrollo temprano del embrión de ratón tiene lugar durante el estadio de dos células. Esta conclusión ha resultado de una serie de hechos: los productos génicos paternos derivados de una actividad transcripcional en el embrión se detectan en el estadio de 2 células (Sawicki y col., 1981); además, se produce una pérdida de los mRNAs y comienza una nueva síntesis (Levey y col., 1978, Clegg y Piko, 1982). Estudios en la síntesis de histonas en embriones tempranos de ratón han demostrado que, al menos, algunas clases de histonas son sintetizadas durante la embriogénesis (Sittman y col., 1983). Graves y col. (1985) describieron la presencia de H3, H2A y H2B en embriones de ratón. Confirmaron que se produce una degradación del mRNA materno durante el estadio de 2 células e indicaron que las tres histonas están reguladas de forma coordinada durante la transición del control materno al embrionario.

Se han clonado y secuenciado genes de histona de una amplia variedad de organismos. El estudio inicial de estos genes mostraba que poseían unas características comunes: carecían de intrones, no

presentaban señales de poliadenilación por lo que los mRNAs no estaban poliadenilados y contenían una estructura palíndrome de 14 pb cerca del extremo 3' del mRNA que ha demostrado ser esencial para el procesamiento correcto del extremo 3' (Birchmeier y col., 1984, Krieg y Melton, 1984). Sin embargo, en ovocitos de anfibios, los mRNAs de las histonas mayoritarias están poliadenilados aunque el extremo poli(A) es eliminado por completo durante la maduración del ovocito y en células en cultivo (Ballantine y Woodland, 1985).

Las histonas humanas H3 se clasificaron en 3 subtipos de acuerdo a su movilidad electroforética bidimensional, H3.1, H3.2, H3.3 que se diferencian entre sí en 1 ó 3 aminoácidos (Gabielli y col., 1985). En tejidos humanos, las tres variantes H3 se presentan en diferentes cantidades relativas dependiendo del estado replicativo de la célula; H3.1 y H3.2 son variantes dependientes de replicación mientras que en células no replicativas de tejidos adultos la más abundante es la H3.3.

Recientes hechos han demostrado que los genes H3.3 de vertebrados son peculiares ya que contienen intrones, están poliadenilados, contienen una señal de poliadenilación ATTAAA no consenso y no poseen el palíndrome en el extremo 3' (Engel y col., 1982, Old and Woodland, 1984, Wells y Kedes, 1985).

En vertebrados existen dos subclases distintas de genes de histona H3.3: H3.3A y H3.3B (Brush y col., 1985, Hraba-Renevey and Kress, 1989). Aunque las dos subclases codifican para dos proteínas idénticas, las regiones no codificantes no presentan homologías.

Chalmers y Wells (1990) aislaron el clon codificante para la H3.3A en conejo y vieron que era similar a la H3.3A de humano (Wells y Kedes, 1985) y a la H3.3A de pollo (Brush y col., 1985). El alto grado de conservación de secuencia, sobre todo en el extremo 3'

no codificante, a lo largo de la evolución hace pensar en una función indispensable para esta región, pero que es todavía desconocida.

Wells y col. (1987) aislaron y secuenciaron el gen de humano H3.3 consistente en 8.8 Kb que contienen tres intrones. En su extremo 3' existe una región no codificante que presenta una señal no canónica de poliadenilación ATTTAA. Además, la región 3' es homóloga a la del gen de pollo H3.3A (Brush y col., 1985). Sin embargo, la H3.3B de pollo no muestra homología en la región no codificante con la H3.3A ni con la H3.3 de humano, por ello (Wells y col., 1987) postularon que debe existir un equivalente al H3.3B de pollo en humano que todavía no se ha identificado.

Dodgson y col. (1987) demostraron que las histonas H3.3A y H3.3B de pollo contienen la misma señal de poliadenilación (ATTTAA) y se ha conservado evolutivamente para todos los H3.3 descritos, lo que hace pensar que es un importante mecanismo de regulación.

Hraba-Renevey y Kress (1989) aislaron y secuenciaron el cDNA de ratón de la histona H3.3 que tiene un 95% de homología con el extremo 3' del H3.3B de pollo. La secuencia de aminoácidos es idéntica a la de pollo H3.3B (Brush y col., 1985) y a la H3.3 de humano (Wells y col., 1987). Por Northern-Blot origina transcritos de 1.8, 1.2 y 1.0 Kb. Al igual que postularon Wells y col. (1987) que un segundo gen de H3.3 humano altamente homólogo en la región 3' al gen de pollo H3.3B faltaba por descubrir, en ratón debe existir otro gen homólogo al H3.3A de pollo que todavía no se conoce.

Wellman y col. (1987) obtuvieron 3 clones de DNA genómico de ratón para la H3.3 que no presentaban homología con los obtenidos a partir de pollo, ya que no contenían intrones y que codifican para proteínas con algunos cambios de aminoácidos. Postularon la

posibilidad de que estos genes fueran "pseudogenes" procesados, originados por transcripción reversa del gen original y con grandes probabilidades de que sean expresados.

La histona H3.3 aislada en este trabajo presenta homología en los dos fragmentos secuenciados, con la clonada por (Wellman y col., 1987), aunque no se puede concluir que no tiene intrones ya que todavía no conocemos la secuencia completa. Por otro lado, el extremo 3' no codificante es idéntico al extremo 3' de la H3.3A de pollo (Brush y col., 1985) y de conejo (Chalmers y Wells, 1990). Además, después de confirmar los resultados obtenidos por la Dra. Krimer (1993) con las células MEL estimuladas por HMBA (Fig. 29) y comprobar que el transcrito que aparece es el de 1.2 Kb, lo que corresponde a la H3.3A, se podría pensar que nos encontramos ante el transcrito correspondiente al gen H3.3A de ratón.

Además, esta es la primera evidencia de la expresión de H3.3A en tejidos gonadales (testículo adulto y ovario fetal) (Fig. 30 y 31).

La secuenciación completa y su análisis comparativo con los pseudogenes descritos nos permitirán conocer si se trata de un pseudogen procesado y funcional como han sido descritos en otros casos como la isoenzima testicular de PGK-2 (McCarrey y Thomas, 1987), o por el contrario existen intrones en su secuencia.

El hecho de que se hayan encontrado, en la genoteca de ovario fetal de 16 d, dos clones de una elevada homología con la histona H3.3A ya descrita (DLA-89, -92) y de que su expresión sea tan elevada en testículo adulto y en ovario fetal de ratón (Fig. 30 y 31) podría sugerir una importante función para este gen durante el desarrollo de la gametogénesis. Durante el proceso meiótico ocurren modificaciones estructurales de la cromatina que dan lugar al recambio de histonas y a la aparición de nuevas formas de éstas, por

lo que se podría pensar que la elevada expresión de H3.3A en estas etapas es consecuencia de dicho recambio, aunque su función sea todavía una incógnita.

Poliadenilación de mRNAs:

La mayoría de los mRNAs de los organismos eucarióticos se caracterizan por poseer una cola de poli(A), de longitud variable, en su extremo 3'. En células animales, los únicos mRNAs conocidos que carecen del extremo 3'-poli(A) son los que codifican para la mayoría de las histonas (Adesnik y Darnell, 1972). También están presentes en plantas y levaduras (McLaughlin y col., 1973), así como en mitocondrias (Ojala y col., 1981). La enzima que sintetiza las colas de poli(A) se denomina Poli(A) polimerasa y fue descubierta en 1960 (Edmonds y Abrams, 1960).

En células animales está claramente establecido el mecanismo de formación del extremo 3' del mRNA y consiste en una digestión inicial por determinadas endonucleasas, de parte del extremo 3' y la posterior adición de la cola de poli(A). Además, existen evidencias de su papel en el control de la estabilización del mRNA y del control traduccional (Brawerman, 1981, Atwater y col., 1990, Jackson y Standart, 1990). La comparación de secuencias de mRNA en su extremo 3' reveló la presencia de un hexanucleótido AAUAAA en casi todas ellas (Proudfoot y Brownlee, 1976). Numerosos experimentos de mutagénesis han confirmado que esta secuencia, localizada entre 10-35 nucleótidos hacia 5' de la cola de poli(A), es esencial para la formación del extremo 3' del RNA poliadenilado y se denominó "señal consenso de poliadenilación" (Wickens y Stephenson, 1984, Higgs y

col., 1983, Wilusz y col., 1989, Sheets y col., 1990). Mutagénesis sistemáticas en todos los nucleótidos de la secuencia AAUAAA revelaron que la secuencia AUUAAA es también funcional (Sheets y col., 1990).

Algunos mRNAs no contienen elementos reconocibles AAUAAA (que no difieran en más de dos nucleótidos de la consenso) y la mayoría de los casos implican sistemas de poliadenilación alternativa. Por ejemplo, de los cuatro mRNAs derivados del gen de la Dihidrofolato-reductasa, uno de ellos carece de señal AAUAAA y otros dos tienen variantes poco usuales (Setzer y col., 1980, Hook y Kellems, 1988). Del mismo modo, uno de los dos transcritos de la Ciclina D de humano (Xiong y col., 1991) y el mRNA de *c-abl* específico de esperma de ratón (Meijer y col., 1987) carecen de elemento AAUAAA. El grupo más significativo lo componen los transcritos de los genes de Histona. En células somáticas estos genes son procesados a mRNAs desprovistos de la cola de poli(A). Sin embargo, en espermátidas, los transcritos específicos correspondientes a esos genes sí contienen cola de poli(A) en el extremo 3'. La mayoría de estos mRNAs tienen señales de poliadenilación que difieren de la consenso (Challoner y col., 1989). La vía de poliadenilación de los mRNAs que carecen de señales AAUAAA es todavía desconocida.

Además de las señales de poliadenilación, son requeridos otros elementos para la ruptura enzimática del extremo 3', situados en dicho extremo y de ellos no se conoce secuencia consenso, pero se sabe que son elementos ricos en GU o sólo en U, como ocurre en el sitio de poliadenilación del gen de la α -globina, que contiene ambos (Gil y Proudfoot, 1987).

Muchas unidades de transcripción contienen múltiples sitios de poliadenilación y la elección entre ellos puede determinar qué producto génico es sintetizado, aunque no se conocen cuáles son los elementos que controlan la elección de una u otra. Esto ocurre en el caso del gen de la β 1,4-galactosiltransferasa (Shaper y col., 1990) que codifica para dos mRNAs que difieren en 200 bases y se traducen a dos proteínas. La elección de uno u otro transcrito y su nivel de expresión está regulado durante la espermatogénesis.

Existe un hecho importante y es que en la mayoría de los animales estudiados, incluidos *Xenopus* y ratón, el control materno del desarrollo es ejercido, al menos en parte, por vía de la activación de la traducción de mRNAs acumulados en el citoplasma del ovocito. Estos mensajes se traducen cuando son requeridos para la maduración meiótica, fertilización o embriogénesis temprana (Davidson, 1976). La activación traduccional de estos mRNAs maternos almacenados es controlada fundamentalmente por la poliadenilación citoplásmica (Rosenthal y col., 1983, Wickens, 1990, Richter, 1991). Esta poliadenilación es variable en términos de su duración temporal, su extensión y su efecto en la estabilidad de mRNAs específicos. La activación de la traducción de los mRNAs parece estar regulada por una secuencia situada en el extremo 3', no traducida y denominada "elemento citoplásmico de poliadenilación" (CPE). Un CPE consenso en *Xenopus* es UUUUUAU y está situado hacia 5' de la señal canónica de poliadenilación AAUAAA. En este sistema, la poliadenilación citoplásmica bajo la maduración meiótica requiere de la presencia de las dos secuencias (Varnum y Wormington, 1990), (Fox y Wickens, 1990). Aunque la mayoría de los estudios se han dirigido al estudio de la maduración de ovocitos en *Xenopus* (Simon y col., 1992, Fox y col., 1992) recientemente se ha descrito la presencia

de estos mismos elementos UUUUUAU en ovocitos ratón (Sallés y col., 1992).

Para muchos de los clones obtenidos, el análisis de la secuencia ha permitido identificar señales de poliadenilación y es muy importante en tejidos gonadales la aparición de nuevos transcritos por poliadenilación alternativa.

Como ya se ha comentado en el capítulo de resultados, de todos los clones secuenciados después de su aislamiento a partir de la genoteca de ovario fetal de ratón de 16 d, la mayoría presentan la señal canónica de poliadenilación AATAAA (DLA-25, -61, -65, -68, -70, -90, -97, -102, -104, -108, -121, -123, -136, -139, -146, -147, -152, -154, -159, -164). En los clones DLA-72 y DLA-121 aparecen varias señales canónicas, lo que podría ser indicio de regulación por poliadenilación alternativa, hecho que ya se ha descrito en otros sistemas (Shaper y col., 1990). En otros de los clones (DLA-89 (histona H3.3), DLA-92 (histona H3.3), DLA-98 (surf-3), DLA-113, DLA-175), las señales de poliadenilación son ATTAAA (Sheets y col., 1990), secuencia que ha demostrado estar presente en los clones de histona H3.3 (DLA-89, -92) y cuya función es similar a la de la canónica. Por último, el clon DLA-72 (laminina B2) contiene una región correspondiente a un elemento citoplásmico de poliadenilación (CPE) TTTTTTAT situado hacia 5' de la señal canónica AATAAA. Estos elementos CPE ya se habían descrito en *Xenopus* (Varnum y Wormington, 1990) donde se había demostrado que tenían una importante función en la maduración del ovocito. Recientemente, los experimentos realizados por (Sallés y col., 1992) en ovocitos de ratón han demostrado que es necesaria la presencia de estos elementos, cuando están en su secuencia, para que se produzca la maduración de

los ovocitos y que mutaciones que eliminan este CPE impiden que el ovocito progrese con el proceso de la maduración.

La presencia de un CPE en un clon que está expresándose en ovario fetal de ratón y que parece tener una función en la línea germinal, como ya se comentó anteriormente (laminina B2), aporta un nuevo dato para confirmar la importancia de la expresión de este gen en los tejidos gonadales.

Clones DLA noveles:

Entre los clones de secuencia conocida que han sido aislados a partir de la genoteca de ovario fetal de 16 d, como ya se ha visto, se ha demostrado que muchos de ellos tienen una implicación funcional en procesos de diferenciación y proliferación; además se ha discutido la justificación de la expresión de dichos genes en un proceso como la gametogénesis del que se desconocen los elementos reguladores de muchas de sus etapas.

Respecto a los 16 clones noveles DLA, cabe esperar que sus funciones sean similares a los anteriores, en dos tejidos distintos (ovario fetal y testículo), pero en los que se está produciendo un proceso de proliferación y diferenciación celular similares, aunque podrían estar regulados de forma diferente.

El primer dato obtenido a partir de los cDNAs correspondientes a los clones DLA, fue su secuencia. Dado que no habían sido descritas hasta entonces y dado el interés del conocimiento de la existencia de una serie de cDNAs que se están expresando de forma paralela en ovario fetal de ratón y en testículo adulto predominantemente sobre tejidos somáticos, dichas secuencias fueron incorporadas al banco de datos EMBL como "marcadores de secuencias expresadas" (ESTs:

"expressed sequence tags") (Adams y col., 1991) y les fueron asignadas las claves de acceso desde X71637 hasta X71652 y todas las intermedias (tabla 5).

La caracterización y uso de ESTs en los proyectos de secuenciación y análisis de genomas está siendo cada día de mayor interés por varios aspectos: permiten el mapeo de secuencias expresadas, la localización de genes con funciones asociadas y la localización directa de genes de interés biomédico, conocidos sus productos génicos y el efecto patológico de su mutación o alteración.

Con el fin de llevar a cabo la caracterización de estos clones, el primer abordaje que se hizo consistió en estudiar el patrón de expresión, mediante Northern blot, de cada uno de ellos. Para este estudio se empleó RNA total procedente de testículo de ratón prepuberal (de los distintos días por los que transcurre la profase meiótica) y adulto. Esto se hizo con RNA de testículo en lugar de RNA de ovario fetal debido a la gran dificultad de obtener suficiente tejido para la realización de todos los Northens. Además, dado que la meiosis es un proceso evolutivamente conservado y que muchos de los genes descritos en ratón tienen una función similar en humano, se utilizó también RNA total procedente de testículo humano en el que previamente se había analizado la presencia de todos los tipos celulares. Para determinar la especificidad de la expresión en la línea germinal respecto a la somática, en los mismos Northern se incluyó RNA total procedente de tejidos somáticos de ratón de 16 d p.c.

Como ya se ha descrito en el capítulo de resultados, la expresión ha mostrado ser ubicua para algunos de ellos (DLA-65, DLA-121, DLA-191, DLA-152, DLA-136) en todos los tejidos analizados, aunque esto no indica el que no puedan tener funciones

específicas en los tejidos gonadales. Entre éstos cabe destacar la elevada expresión de DLA-121 y DLA-136 en riñón fetal.

Otros clones expresan un transcrito alternativo en testículo prepuberal o adulto (DLA-97, DLA-68, DLA-168, DLA-123) cuya máxima expresión se da en el día 14 p.n., lo que podría indicar la existencia de elementos reguladores que estén induciendo la expresión de estos genes en los tejidos gonadales por "splicing" alternativo, además del correspondiente al que se expresa también en tejidos somáticos. El clon DLA-97 muestra niveles elevados de expresión en cerebro fetal. Este hecho es coherente con la existencia de algunos otros genes ya descritos que se expresan de forma paralela en células meióticas y en neuronas, como *nekl* (Motro y col., 1992).

Finalmente, se ha visto la existencia de dos clones (DLA-154 y DLA-108) que se expresan de forma específica en tejido gonadal de ratón, en testículo y adulto, aunque en humano no se detecta su expresión. Estos clones abren muchas vías para el estudio de la regulación de genes específicos de la línea germinal y su papel en un proceso tan conservado en los dos sexos como es la meiosis.

Estos primeros resultados nos permitirán abordar en el futuro la caracterización de la función correspondiente a estos clones, los productos de sus transcritos, su localización celular y el mapeo genómico; es decir, todos aquellos elementos que indudablemente van a aportar nueva información en el desarrollo de la gametogénesis y probablemente, en la diferenciación y desarrollo de otros procesos básicos de los organismos eucarióticos.

El conocimiento de la implicación de todos estos genes en un sistema tan poco abordado como es el oocito fetal de ratón (oogénesis) y, en general en la gametogénesis, permitirá obtener más

información sobre el papel que desempeñan durante la embriogénesis temprana y el descubrimiento de posibles nuevos factores de crecimiento o de diferenciación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- Se ha construido por primera vez y comenzado la caracterización de genotecas de cDNA a partir de ovarios fetales de ratón.
- El análisis diferencial de la genoteca de ovario fetal de 16 d, mediante sondas de cDNA de testículo de ratón adulto frente a cDNA de tejidos somáticos embrionarios ha demostrado ser eficaz en el aislamiento de genes de expresión preferencial o específica durante la gametogénesis.
- El análisis diferencial de la genoteca de ovario fetal de 16 d ha permitido seleccionar, partiendo de 10^4 pfu, 33 clones que hibridan de forma preferencial con sondas de sscDNA de testículo de ratón adulto frente a la sonda de sscDNA de tejidos somáticos.
- De los 33 clones aislados, el 50% corresponden a genes de secuencia conocida (17) y el otro 50% a genes de secuencias no descritas hasta hoy (16).
- La expresión diferencial de genes durante la gametogénesis podría ser debida a poliadenilación alternativa. En el análisis de las secuencias de los clones seleccionados, hemos podido comprobar la existencia de variaciones en las secuencias de las señales de poliadenilación, que suponen:
 - presencia de más de una señal;

- señales de poliadenilación alternativas a la canónica;
 - elementos citoplásmicos de poliadenilación (CPE).
- El estudio de la expresión de los clones DLA noveles ha permitido clasificar dichos genes en tres grupos:
- genes de expresión ubicua;
 - genes que expresan transcritos alternativos durante la gametogénesis;
 - genes de expresión específica en la gametogénesis.
- Para muchos de los clones correspondientes a genes de secuencia conocida, que están presentes en la genoteca de ovario fetal, no se había descrito hasta hoy su expresión durante la vida fetal, especialmente en ovario. Así mismo, se puede inferir su expresión en testículo adulto, asociado a la espermatogénesis.
- Los clones DLA-89 y -92, con elevada homología con un pseudogen de la histona H3.3, contiene en su extremo 3' una región que reconoce el mismo extremo de la histona H3.3A de pollo. La expresión específica de la histona H3.3A había sido comprobada tras la inducción de células MEL por HMBA, pero no se había aislado el transcrito correspondiente, hasta hoy. Por tanto, se sugiere que estos clones corresponden a la histona H3.3A de ratón.
- La expresión del gen de la histona H3.3A en ovario fetal de 13 d y en testículo adulto es del orden de 10 veces superior a la máxima expresión encontrada en las células MEL tras su inducción por HMBA.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., al., e. (1991). *Science* 252: 1651-1656.

Adams, S.O., Nissley, S.P., Handwerger, S., Rechler, M.M. (1983). *Nature* 302: 150-153.

Adashi, E.Y., Resnick, C.E., D'Ercole, A.J., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J. (1985). *Endocr. Rev.* 6: 400-420.

Adesnik, M., Darnell, J.E. (1972). *J. Mol. Biol.* 67: 397-406.

Agell, N., Mezquita, C. (1988). *Biochem. J.* 250: 883-889.

Albertini, D.F., Anderson, E. (1974). *J. Cell Biol.* 63: 234-250.

Albig, W., Kardalidou, E., Drabent, B., Zimmer, A., Doenecke, D. (1991). *Genomics* 10: 940-948.

Alcivar, A.A., Hake, L.E., Hardy, M.P., Hecht, N.B. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 20160-20165.

Alcivar, A.A., Hake, L.E., Millette, C.F., Trasler, J.M., Hecht, N.B. (1989). *Dev. Biol.* 135: 263-271.

Allen, J.C., Navran, S.S. (1984). *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 462-465.

Anderson, E., Albertini, D.F. (1976). *J. Cell Biol.* 71: 680-686.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.Y. (1981). *Nature* 290: 457-474.

Anderson, S., DeBruijin, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., Young, I.G. (1982). *J. Mol. Biol.* 156: 683-717.

Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., Karin, M. (1988). *Cell* 55: 875-885.

Atwater, J.A., Wisdom, R., Verma, I.M. (1990). *Ann. Rev. Genet.* 24: 519-541.

Aumailley, M., Mann, K., Von der Mark, H., Timpl, R. (1989). *Exp. Cell Res.* 181: 463-474.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Ed. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Greene Publishing Associates. Wiley-Interscience.

Ayer-LeLievre, C., Olson, L., Ebendal, T., Hallbook, F., Persson, H. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2628-2632.

Baker, T.G., Beaumont, H.M., Franchi, L.L. (1969). *J. Cell Sci.* 4: 655-675.

Baker, T.G., Franchi, L.L. (1967). *Chromosoma* 22: 258-377.

Bakken, A.H., McClanahan, M. (1978). *Chromosoma* 67: 21-40.

Ballantine, J.E.M., Woodland, H.R. (1985). *FEBS Lett.* 180: 224-228.

Barka, T., Gubits, R.M., van der Noen, H.M. (1986). *Mol. Cell. Biol.* 6: 2984-2989.

Baron, R., Neff, L., Roy, C., Boisvert, A., Caplan, M. (1986). *Cell* 46: 311-320.

Bashir, M.M., Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Rosenbloom, J.C., Abrams, W., Fazio, M., Uitto, J., Rosenbloom, J. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 8887-8891.

Bassas, L., Lesniak, M.A., Serrano, J., Roth, J., De Pablo, F. (1988). *Diabetes* 37: 637-644.

Battey, J., Clayton, D.A. (1978). *Cell* 14: 143-156.

Baxter, R.C., Martin, L.J. (1989). *Progress in Growth Factor Research* 1: 49-68.

Beck, F., Samani, N.J., Penschow, J.D., Thorley, B., Tregear, G.W., Coghlan, J.P. (1987). *Development* 101: 175-184.

Bell, G.I., Gerhard, D.S., Fong, N.M., Sanchez-Pescador, Rall, L.P. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6450-6454.

Bellve, A.R., Cavichia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dym, M. (1977). *J. Cell Biol.* 74: 68-85.

Bellvé, A.R., Zheng, W. (1989). *J. Reprod. Fertil.* 85: 780-793.

Benton, M.J. (1990). *J. Mol. Evol.* 30: 409-424.

Bibb, M.J., van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., Clayton, D.A. (1981). *Cell* 26: 167-180.

Bidanset, D.J., Guidry, C., Rosenberg, L.C., Choi, H.U., Timpl, R., Hook, M. (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 5250-5256.

Birchmeier, C., Schumperli, D., Sconzo, G., Birnstiel, M.L. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1057-1061.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bishop, J.M. (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52: 301-354.

- Blitzer, B.L., Boyer, J.L. (1978). *J. Clin. Invest.* 62: 1104-1108.
- Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, H., Nishimura, T., Vogt, P.K., Tjian, R. (1987). *Science* 238: 1386-1392.
- Boitani, C., Geremia, R., Rossi, R., Monesi, V. (1980). *Cell Differ.* 9: 41-49.
- Bonaldo, P., Colombatti, A. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 20235-20239.
- Borland, K., Mita, M., Oppenheimer, C.L., Blinderman, L.A., Massague, J., Hall, P.F., Czech, M.P. (1984). *Endocrinology* 114: 240-246.
- Borum, K. (1966). *Exp. Cell Res.* 45: 39-47.
- Bos, T.J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R., Vogt, P.K. (1988). *Cell* 52: 705-712.
- Brasiello, A.R. (1968). *Exp. Cell Res.* 53: 252-255.
- Brawerman, G. (1981). *Crit. Rev. Biochem.* 10: 1-38.
- Brush, D., Dodson, J., Choi, O., Stevens, P., Engel, J.D. (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5: 1307-1317.
- Bucci, L.R., Brock, W.A., Goldknopf, I.L., Meistrich, M.L. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 8840-8846.
- Bucci, L.R., Brock, W.A., Meistrich, L. (1982). *Exp. Cell Res.* 140: 111-118.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987). *Biotechniques* 5: 376-379.
- Bunick, D., Johnson, P.A., Johnson, T.R., Hecht, N.B. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 891-895.

- Burgeson, R.E. (1988).** *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 551-577.
- Busch, H., Goldknopf, I.L. (1981).** *Mol. Cell. Biochem.* 40: 173-180.
- Casella, S.J., Smith, E.P., Van Wyk, J.J., D'Ercole, A.J., Hynes, M.A., Hoyt, E.C., Lund, P.K. (1987).** *DNA* 6: 325-330.
- Clayton, D. (1984).** *Ann. Rev. Biochem.* 53: 573-594.
- Clegg, K.B., Piko, L. (1982).** *Nature* 295: 342-345.
- Clemmons, D.R. (1989).** *British Medical Bulletin* 45: 465-480.
- Colombatti, A., Bonaldo, P., Ainger, K., Bressan, G.M., Volpin, D. (1987).** *J. Biol. Chem.* 262: 14454-14460.
- Colombo, P., Yon, J., Garson, K., Fried, M. (1992).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6358-6362.
- Colonna, R., Cecconi, S., Tatone, C., Mangia, F., Buccione, R. (1989).** *Dev. Biol.* 133: 305-308.
- Cooper, A.R., McQueen, H.A. (1983).** *Dev. Biol.* 96: 467-471.
- Cooper, J.A. (1987).** *BioEssays* 4: 9-14.
- Cunliffe, V., Koopman, P., McLaren, A., Trowsdale, J. (1990).** *EMBO J.* 9: 197-205.
- Curran, T. (1988).** *The oncogene handbook.* Amsterdam, Elsevier.
- Curran, T., Morgan, J. (1985).** *Science* 229: 1265-1268.
- Czerwiec, F.S., Melner, M.H., Puett, D. (1989).** *Mol. Endocrinol.* 3: 105-109.

- Chalmers, M., Wells, D. (1990). *Nucleic Acids Res.* 18: 3075.
- Challoner, P.B., Moss, S.B., Groudine, M. (1989). *Mol. Cell. Biol.* 9: 902-913.
- Chi, H.C., Hui, C.F. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 1543-1550.
- Chiu, R., Angel, P., Karin, M. (1989). *Cell* 59: 979-986.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chomyn, A., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F., Attardi, G. (1986). *Science* 234: 614-618.
- Chu, M.L., Conway, D., Pan, T., Baldwin, C., Mann, K., Deutzmann, R., Timpl, R. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 18601-18606.
- Chung, A.E., Jaffe, R., Freeman, I.L., Vergnes, J.P., Braginski, J.E., Carlin, B. (1979). *Cell* 16: 277-287.
- D'Ercole, A.J., Stiles, D., Underwood, L.E. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 935-939.
- Das, N.K., Alfert, M. (1966). *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 23: 337-342.
- Das, N.K., Siegel, E.P., Alfert, M. (1965). *J. Cell Biol.* 25: 387-391.
- Daughaday, W.H., Rotwein, P. (1989). *Endocr. Rev.* 10: 68-90.
- Davidson, E.H. (1976). *Gene activity in early development*. New York, Academic Press.
- Dawe, S.R., Francis, G.L., McNamara, P.J., Wallace, J.C., Ballard, F.J. (1988). *J. Endocr.* 117: 173-181.

de Pablo, F. (1989). Growth factors in early development. Florida, CRC Press, Boca Raton.

Delhanty, P.J.D., Han, V.K.M. (1993). *Endocrinology* 132: 41-52.

Delidow, B.C., White, B.A., Peluso, J.J. (1990). *Endocrinology* 126: 2302-2306.

DeMartino, C., Floridi, A., Marcante, M.L., Malorni, W., Scorza Barcelona, P., Bellocchi, M., Siverstrini, B. (1979). *Cell Tissue Res.* 196: 1-22.

Dennis, J.W., Waller, C.A., Schirmacher, V. (1984). *J. Biol. Chem.* 99: 1416-1423.

Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y., Goeddel, D.V. (1984). *Cell* 38: 287-297.

Deshaies, R.J., Koch, B.D., Shekman, R. (1988). *Trends Biochem. Sci.* 13: 384-388.

Dodgson, J.B., Yamamoto, M., Engel, J.D. (1987). *Nucleic Acids Res.* 15: 6294.

Edgar, D., Timpl, R., Thoenen, H. (1984). *EMBO J.* 3: 1463-1468.

Edmonds, M., Abrams, R. (1960). *J. Biol. Chem.* 235: 1142-1149.

Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R. (1992). *Crit. Rev. Oncog.* 3: 91-115.

Engel, J., Gunning, P., Kedes, L. (1982). *Mol. Cell. Biol.* 2: 674-684.

Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rohde, H., Timpl, R. (1981). *J. Mol. Biol.* 150: 97-120.

- Engstrom, W., Bell, K.W., Schofield, P.N. (1987). *Cell Biol. Internat. Rep.* 11: 415-421.
- Evans, E.P. (1987). Karyotyping and sexing of gametes, embryos and fetuses and *in situ* hybridization to chromosomes. Oxford, IRL Press.
- Evans, R.M., Hollenberg, S.M. (1988). *Cell* 52: 1-3.
- Evans, T., Reitman, M., Felsenfeld, G. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5976-5980.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Young-blom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983). *Cell* 33: 389-396.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983). *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Finch, J.S., Bonham, K., Krieg, P., Bowden, G.T. (1990). *Nucleic Acids Res.* 18: 1907-1907.
- Finley, D., Varshavsky, A. (1985). *Trends Biochem. Sci.* 10: 343-347.
- Fox, C.A., Sheets, M.D., Wahle, E., Wickens, M. (1992). *EMBO J.* 11: 5021-5032.
- Fox, C.A., Wickens, M. (1990). *Genes Dev.* 4: 2287-2298.
- Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszum, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., Yamamoto, K.P. (1988). *Nature* 334: 543-546.
- Friend, C., Scher, W., Holland, J.G., Sato, T. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 378-382.
- Froesch, E.R., Schmid, C., Schwander, J., Zapf, J. (1985). *Ann. Rev. Physiol.* 47: 443-467.

Gabrielli, F., Aden, D.P., Carrel, S.C., von Bahr, C., Rane, A., Angeletti, C.A., Hancock, R. (1985). *Mol. Cell. Biochem.* **65**: 57-66.

Gait, M.J. (1989). *Oligonucleotide synthesis, a practical approach.* Oxford,

Gall, J.G., Callan, H.G. (1962). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**: 562-570.

Gavilanes, J.G., Gonzalez de Buitrago, G., Perez-Castells, R., Rodriguez, R. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**: 10267-10270.

Geisthovel, F., Moretti-Rojas, I., Asch, R.H., Rojas, F.J. (1989). *Hum. Reprod.* **4**: 899-902.

Gil, A., Proudfoot, N.J. (1987). *Cell* **49**: 399-406.

Gilula, N.B., Epstein, M.L., Beers, W.H. (1978). *J. Cell Biol.* **78**: 58-75.

Goldberg, A.L., St. John, A.C. (1976). *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 747-803.

Goldberg, E., Sberna, D., Wheat, T.E., Urbansky, G.J., Margoliash, E. (1977). *Science* **196**: 1010-1012.

Goldknopf, I.L., Busch, H. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 864-869.

Goldman, D.S., Kisseling, A.A., Millette, C.F., Cooper, G.M. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4509-4513.

Goldman, D.S., Kisseling, A.A., Millette, C.F., Cooper, G.M. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4509-4513.

Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, V., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H., Niall, H.D. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 11-.

Good, P.J., Richter, K., Dawid, I.B. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9088-9092.

Goodman, M., Czelusniak, J., Koop, B.F., Tagle, D.A., Slightom, J.L. (1987). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*

Graves, R.A., Marzluff, W.F., Giebelhaus, D.H., Schultz, G.A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5685-5689.

Grosveld, F., van Assendelft, G.B., Greaves, D.R., Kollias, G. (1987). *Cell* 51: 975-985.

Gusella, J., Geller, R., Clarke, B., Weeks, V., Housman, D. (1976). *Cell* 9: 221-229.

Gyllensten, U., Wharton, D., Wilson, A. (1985). *J. Hered.* 76: 321-324.

Hake, L.E., Alcivar, A.A., Hecht, N.B. (1990). *Development* 110: 249-257.

Hall, S.H., Berthelon, M.C., Avallet, O., Saez, J.M. (1991). *Endocrinology* 129: 1243-1249.

Hall, S.H., Joseph, D.R., French, F.S., Conti, M. (1988). *Mol. Endocrinol.* 2: 55-61.

Han, V.K.M., D'Ercole, A.J., Lund, P.K. (1987). *Science* 236: 193-197.

Hancock, R., Boulikas, T. (1982). *Int. Rev. Cytol.* 79: 165-172.

Handel, M.A. (1987). *Genetic control of spermatogenesis in mice.* Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag.

Hattori, K., Angel, P., Le Beau, M.M., Karin, M. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9148-9152.

Heath, J.K., Smith, A.G. (1989). *British Medical Bulletin* 45: 319-336.

Hecht, N.B. (1986). Regulation of gene expression during mammalian spermatogenesis. Cambridge, Cambridge University Press.

Hecht, N.B., Liem, H. (1984). *Exp. Cell Res.* 154: 293-297.

Hecht, N.B., Liem, H., Kleene, K.C., Distel, R.J., Ho, S.M. (1984). *Dev. Biol.* 102: 452-461.

Henderson, S.A. (1963). *Nature* 200: 1235-1237.

Henderson, S.A. (1964). *Chromosoma* 15: 345-349.

Hershko, A., Ciechanover, A. (1986). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 33: 19-56.

Hessle, H., Engvall, E. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 3955-3961.

Higgs, D.R., Goodbourn, S.E.Y., Lamb, J., Clegg, J.B., Weatherall, D.J., Proudfoot, N.J. (1983). *Nature* 306: 398-400.

Hill, D.J. (1990). *Early Human Dev.* 21: 49-58.

Hirai, S.I., Ryseck, R.P., Mechta, F., Bravo, R., Yaniv, M. (1989). *EMBO J.* 8: 1433-1439.

Hook, A.G., Kellems, R.E. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 2337-2343.

Howe, C.C. (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4: 1-7.

Hraba-Renevey, S., Kress, M. (1989). *Nucleic Acids Res.* **17**: 2449-2461.

Hunter, T. (1987). *Cell* **50**: 823-829.

Huxley, C., Fried, M. (1990). *Mol. Cell. Biol.* **10**: 605-614.

Huxley, C., Williams, T., Fried, M. (1988). *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3898-3905.

Hwang, I., Lim, K., Chae, C.B. (1990). *Mol. Cell. Biol.* **10**: 585-592.

Ibrahimi, A., Bertrand, B., Bardon, S., Amri, E., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Dani, C. (1993). *Biochem. J.* **289**: 141-147.

Imamura, K., Tanaka, T. (1972). *J. Biochem. (Tokyo)* **71**: 1043-1051.

Imamura, K., Tanaka, T. (1982). *Methods Enzymol.* **90**: 150-165.

Imamura, K., Tanaka, T., Nishina, T., Nakashima, K., Miwa, S. (1973). *J. Biochem. (Tokyo)* **74**: 1165-1175.

Isenberg, I. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 159-191.

Ishii, S., Merlino, G.T., Pastan, I. (1985). *Science* **230**: 1378-1381.

Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D., Yamamoto, M. (1993). *Nature* **362**: 466-468.

Iwaki, K., Sukhatme, V.P., Shubeita, H.E., Chien, R.R. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**: 13809-13817.

Jabben, M., Shanklin, J., Vierstra, R.D. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**: 4998-5005.

Jackson, R.J., Standart, N. (1990). *Cell* **62**: 15-24.

Jahn, C.L., Baran, M.M., Bachvarova, R. (1976). *J. Exp. Zool.* 197: 161-171.

Jewell, E.A., Shamraj, O.I., Lingrel, J.B. (1992). *Acta Physiol Scand* 146: 161-169.

Johnson, A.C., Shii, S., Jinno, Y., Pastan, I., Merlino, G.T. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 5693-5699.

Jorgensen, P.L. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 694: 27-68.

Jorgensen, P.L. (1983). *Curr. Top. Membr. Transp.* 19: 377-401.

Kawakami, K., Ohta, T., Nojima, H., Nagano, K. (1986). *J. Biochem.* 100: 389-397.

Kessel, M., Gruss, O. (1990). *Science* 249: 374-379.

Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L. (1974). *J. Cell Biol.* 60: 39-53.

Kimelman, D., Kirschner, M.W. (1989). *Cell* 59: 687-696.

Kleinman, H.K., Cannon, F.B., Laurie, G.W., Hassell, J.R., Aumailley, M., Terranova, U.P., Martin, G.R., Dubois-Dalcq, M. (1985). *J. Cell Biochem.* 27: 317-325.

Kleinman, H.K., Cannon, F.B., Laurie, G.W., Hassell, J.R., Aumailley, M., Terranova, V.P., Martin, G.R., DuBois-Dalcq, M. (1984). *The Role of Extracellular Matrix in Development.* New York, Alan R. Liss, Inc.

Kleinman, H.K., Eihara, I., Killen, P.D., Sasaki, M., Cannon, F.B., Yamada, Y., Martin, G.R. (1987). *Dev. Biol.* 122: 373-378.

Koller, E., Hayman, A.R., Trueb, B. (1991). *Nucleic Acids Res.* 19: 485-491.

Kretz, P.L., Reid, C.H., Greener, A., Short, J.M. (1989b). *Nucleic Acids Res.* 17: 5409.

Kretz, P.L., Short, J.M. (1989a). *Strategies* 2: 25-26.

Krieg, P.A., Melton, D.A. (1984). *Nature* 308: 203-206.

Kyte, J. (1976). *J. Cell Biol.* 68: 289-303.

Kyte, J. (1976). *J. Cell Biol.* 68: 304-318.

Lawrence, T.S., Beers, W.H., Gilula, N.B. (1978). *Nature* 272: 501-506.

Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S., Chin, W.W. (1989). *Mol. Cell. Biol.* 9: 1128-1136.

Lennard, A.C., Fried, M. (1991). *Mol. Cell. Biol.* 11: 1281-1294.

Leon, J., Guerreo, I., Pellicer, A. (1987). *Mol. Cell. Biol.* 7: 1535-1540.

Leroy, P., Alzari, P., Sasson, D., Wolgemuth, D.J., Fellous, M. (1989). *Cell* 57: 549-559.

Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collings, C., et al. (1987). *Nature* 330: 537-543.

Levey, I.L., Stull, G.B., Brinster, R.L. (1978). *Dev. Biol.* 64: 140-148.

Lin, T., Haskell, J., Vinson, N., Terracio, L. (1986). *Endocrinology* 119: 1641-1647.

Lin, T., Wang, D., Nagpal, M., Chang, W., Calkins, J.H. (1992). *Endocrinology* 130: 1217-1224.

- Lingrel, J.B., Orlowski, J., Shull, M.M., Price, E.M. (1990). *Prog. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.* 38: 37-89.
- Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Hynes, M.A., D'Ercole, A.J., Jansen, M., Van Wyk, J.J. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 14539-14544.
- MacKnight, A.D.C., Leaf, A. (1977). *Physiol. Rev.* 57: 510-573.
- Madura, K., Prakash, S., Prakash, L. (1990). *Nucleic Acids Res.* 18: 771-778.
- Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M., Vogt, P.K. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2848-2852.
- Marks, P.A., Rifkind, R.A. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 419-448.
- Martin, D.I.K., Zon, L.I., Mutter, G., Orkins, S.H. (1990). *Nature* 344: 444-447.
- Martin, G.R., Timpl, R. (1987). *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 57-85.
- Matsuzawa, Y., Semba, K., Kawamura-Tsuzuku, J., Sudo, T., Ishii, S., Toyoshima, K., Yamamoto, T. (1991). *Oncogene* 6: 1561-1568.
- McCarrey, J.R., Thomas, K. (1987). *Nature* 326: 501-505.
- McLaughlin, C.S., Warner, J.R., Edmonds, M., Nakazato, H., Vaughan, M.H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 1466-1471.
- McLeod, M. (1989). *BioEssays* 11: 9-14.
- Mehmet, H., Miller, J.B.A., Lehmann, W., Higgins, T., Rozengurt, E. (1988). *Oncogene Res.* 3: 281-286.

Meijer, D., Hermans, A., Von Lindern, M., Van Agthoven, T., De Klein, A., al., e. (1987). *EMBO J.* 6: 4041-4048.

Michael, N.L., Rothbard, J.B., Shiurba, R.A., Linke, H.K., Schoolnik, G.K., Clayton, D.A. (1984). *EMBO J.* 3: 3165-3175.

Mignotte, V., Eleouet, J.F., Raich, N., Romeo, P.H. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6548-6552.

Miller, O.L., Bakken, A.H. (1972). Morphological studies of transcription. *Acta Endocrinol.* 168: 155-177.

Millette, C.F., Moulding, C.T. (1981). *J. Cell. Sci.* 48: 367-382.

Mitchell, P.J., Tjian, R. (1989). *Science* 245: 371-378.

Mitraki, A., King, J. (1989). *Biotechnology* 7: 690-697.

Moens, P.B. (1987). Meiosis. Orlando. Florida., Academic Press, INC.

Monesi, V. (1965). *Exp. Cell Res.* 39: 197-202.

Montell, D.J., Goodman, C.S. (1989). *J. Cell Biol.* 109: 2441-2453.

Moses, A.C., Nissley, S.P., Short, P.A., Rechler, M.M., White, R.M., Knight, A.B., Higa, O.Z. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3649-3653.

Moss, S.B., Challoner, P.B., Groudine, M. (1989). *Devel. Biol.* 133: 83-92.

Motro, B., Letwin, K., Mizzen, L., Ben-David, Y., Pawson, T., Bernstein, A. (1992). nek1: a mammalian NimA homologue expressed in neurons and meiotic cells. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Murti, K.G., Smith, H.T., Fried, V.A. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3019-3025.

Mutoh, Y., Noguchi, S., Ohta, T., Higashi, K., Takasugi, M., Kuroiwa, A., Kawamura, M. (1992). *Biochem. Int.* 26: 775-785.

Mutter, G.L., Wolgemuth, D.J. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5301-5305.

Nakabeppu, Y., Ryder, K., Nathans, D. (1988). *Cell* 55: 907-915.

Nakashima, K., Miwa, S., Oda, S., Tanaka, T., Imamura, K., Nishina, T. (1974). *Blood* 43: 537-548.

Ness, J.M., B.G., K. (1992). *Mol. Cell. Endocrinol.* 90: 17-25.

Nevins, J.R. (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52: 441-466.

Nickel, B.E., Davie, J.R. (1989). *Biochemistry* 28: 964-968.

Nickel, B.E., Roth, S.Y., Cook, R.G., Allis, C.D., Davie, J.R. (1987). *Biochemistry* 26: 4417-4421.

Nishimura, T., Vogt, P.K. (1988). *Oncogene* 3: 659-663.

Nishioka, Y., Leder, P. (1979). *Cell* 18: 875-882.

Noguchi, T., Inoue, H., Tanaka, T. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 13807-13812.

Noguchi, T., Yamada, K., Inoue, H., Matsuda, T., Tanaka, T. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 14366-14371.

O'Connell, M.L., Canipari, R., Strickland, S. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 2339-2344.

Ogawa, K., Burbelo, P.D., Sasaki, M., Yamada, Y. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 8384-8389.

Ohlsson, M., Hsueh, A.J.W., Ny, T. (1988). *Mol. Endocrinol.* 2: 854-861.

Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R., Attardi, G. (1980). *Cell* 22: 393-403.

Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G. (1981). *Nature* 290: 470-474.

Old, R.W., Woodland, H.R. (1984). *Cell* 38: 624-626.

Olsen, D., Nagayoshi, T., Fazio, M., Peltonen, J., Jaakkola, S., Sanborn, D., Sasaki, T., Kuivaniemi, H., Chu, M.L., Deutzmann, R., Timpl, R., Uitto, J. (1989). *Lab. Invest.* 60: 772-782.

Oppi, C., Shore, S.K., Reddy, E.P. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8200-8204.

Orkin, S.H. (1992). *Blood* 80: 575-581.

Orlowski, J., Lingrel, J.B. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 10436-10442.

Otte, A.P., Roy, D., Siemerink, M., Koster, C.H., Hochstenbach, F., Timmermans, A., Durston, A.J. (1990). *J. Cell Biol.* 111: 271-278.

Panayotou, G., End, P., Aumailley, M., Timpl, R., Engel, J. (1989). *Cell* 56: 93-101.

Parag, H.A., Raboy, B., Kulka, R.G. (1987). *EMBO J.* 6: 55-61.

Pearson, W.R. (1990). *Methods Enzymol.* 183: 63-98.

Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, D.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V., Collen, D. (1983). *Nature* 301: 214-221.

Peschon, J.J., Behringer, R.R., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5316-5319.

Phillis, J.W. (1977). Physiological and pharmacological studies on central synaptic transmission. New York, Academic Press, Inc.

Piko, L., Taylor, K.D. (1987). *Dev. Biol.* **123**: 364-374.

Plump, M., Frampton, J., Wainwright, H., Walker, M., Macleod, K., Goodwin, G., Harrison, P. (1989). *Nucleic Acids Res.* **47**: 73-92.

Ponzetto, C. (1989). Proto-oncogene expression in the testis. New York, Raven Press.

Ponzetto, C., Wolgemuth, D.J. (1985). *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1791-1794.

Propst, F., Rosenberg, M.P., Iyer, A., Kaul, K., Vande Woude, G.F. (1987). *Moll. Cell Biol.* **7**: 1629-1637.

Propst, F., Rosenberg, M.P., Vande Woude, G.F. (1988). *Trends Genet.* **4**: 183-187.

Propst, G.L., Vande Woude, G.F. (1985). *Nature* **315**: 515-518.

Proudfoot, N.J., Brownlee, G.G. (1976). *Nature* **263**: 211-214.

Ralphs, J.R., Wylie, L., Hill, D.J. (1990). *Development* **109**: 51-58.

Ratoosh, S.L., Lifka, J., Hedin, L., Jahnsen, T., Richards, J.S. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**: 7306-7313.

Rauscher, F.J., Cohen, D.R., Curran, T., Bos, T.J., Voght, P.K., Bohmann, D., Tjian, T., Franza, B.R. (1988). *Science* **240**: 1010-1016.

- Rechsteiner, M. (1987).** *Ann. Rev. Cell Biol.* **3**: 1-30.
- Redondo, J.M., Pfohl, J.L., Krangel, M.S. (1991).** *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5671-5680.
- Reuse, S., Maenhaut, C., Dumont, J.E. (1990).** *Exp. Cell Res.* **189**: 33-40.
- Richards, J.S., Hedin, L. (1988).** *Ann. Rev. Physiol.* **50**: 441-463.
- Richter, J.D. (1991).** *BioEssays* **13**: 179-183.
- Rinderknecht, E., Humbel, R.E. (1978).** *J. Biol. Chem.* **253**: 2769-2776.
- Robinson, M.O., McCarrey, J.R., Simon, M.I. (1989).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8437-8441.
- Romeo, P.H., Prandini, M.H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G., Uzan, G. (1990).** *Nature* **344**: 447-449.
- Rosenthal, E.T., Tansey, T.R., Ruderman, J.V. (1983).** *J. Mol. Biol.* **166**: 309-327.
- Rotwein, P., Hall, L.J. (1990).** *DNA Cell Biol.* **9**: 725-735.
- Rozengurt, E., Heppel, L.A. (1975).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4492-4495.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E., Nathans, D. (1989).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1500-1503.
- Ryder, K., Lau, L.F., Nathans, D. (1988).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1487-1491.

- Ryder, K., Nathans, D. (1988).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8464-8467.
- Ryseck, R., Hirai, S., Yaniv, M., Bravo, R. (1988).** *Nature* **334**: 535-537.
- Saitta, B., Timpl, R., Chu, M.L. (1992).** *J. Biol. Chem.* **267**: 6188-6196.
- Sallés, F.J., Darrow, A.L., O'Connell, M.L., Strickland, S. (1992).** *Genes Dev.* **6**: 1202-1212.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning : A laboratory manual.*
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sasaki, M., Yamada, Y. (1987).** *J. Biol. Chem.* **262**: 17111-17117.
- Sawicki, J.A., Magnuson, T., Epstein, C.J. (1981).** *Nature* **294**: 450-451.
- Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R.E., Froesch, E.R. (1982).** *Nature* **296**: 252-253.
- Setzer, D.R., McGrogan, M., Nunberg, J.H., Schimke, R.T. (1980).** *Cell* **22**: 361-370.
- Shackleford, G.M., Varmus, H.E. (1987).** *Cell* **50**: 89-95.
- Shaper, N.L., Wright, W.W., Shaper, J.H. (1990).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 791-795.
- Sheets, M.D., Ogg, S.C., Wickens, M.P. (1990).** *Nucleic Acids Res.* **18**: 5799-5805.

- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988). *Nucleic Acids Res.* 16: 7583-7600.
- Shull, G.E., Greeb, J., Lingrel, J.B. (1986). *Biochemistry* 25: 8129-8132.
- Shull, G.E., Schwartz, A., Lingrel, J.B. (1985). *Nature* 316: 691-695.
- Siegelman, M., Bond, M.W., Gallatin, W.M., St. John, T., Smith, H.T., Fried, V.A., Weissman, I.L. (1986). *Science* 231: 823-829.
- Simon, R., Tassan, J.P., Richter, J.D. (1992). *Genes Dev.* 6: 2580-2591.
- Sittman, D.B., Graves, R.A., Marzluff, W.F. (1983). *Nucleic Acids Res.* 11: 6679-6697.
- Smith, R.L., Macara, I.G., Levenson, R., Housman, D., Cantley, L. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 773-780.
- Söder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvinen, M. (1992). *Endocrinology* 131: 2344-2350.
- Söderstrom, K.O., Parvinen, M. (1976). *Mol. Cell. Endocrinol.* 5: 181-199.
- Sorrentino, V., McKinney, D.M., Giorgi, M., Geremia, R., Fleissner, E. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2191-2195.
- Speed, R.M. (1982). *Chromosoma* 85: 427-437.
- Stein, G.S., Sierra, F., Plumb, M., Marashi, F., Baumbach, L., Stein, J., Carozzi, N., Prokopp, K. (1984). *Histone Genes: structure, organization and regulation*. New York, Wiley Interscience.

Stylianopoulou, A., Efstratiadis, A., Herbert, J., Pintar, J. (1988). *Development* **103**: 497-506.

Sussenbach, J.S. (1989). *Progress in Growth Factor Res.* **1**: 33-48.

Suzuki-Yagawa, Y., Kawakami, K., Nagano, K. (1992). *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4046-4055.

Sweadner, K.J., Goldin, S.M. (1980). *N. Eng. J. Med.* **302**: 777-783.

Takahashi, M., Inaguma, Y., Hiai, H., Hirose, H. (1988). *Mol. Cell. Biol.* **8**: 1853-1856.

Takenaka, M., Noguchi, T., Inoue, H., Yamada, K., Matsuda, T., Tanaka, T. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**: 2363-2367.

Tamir, A., Isakov, N. (1991). *Immunol. Lett.* **27**: 95-100.

Tanaka, T., Haranao, Y., Sue, F., Morimura, H. (1967). *J. Biochem. (Tokyo)* **62**: 71-91.

Taylor, E.R., Seleiro, E.A.P., Brickell, P.M. (1991). *J. Mol. Endocr.* **7**: 145-154.

Thomas, K., del Mazo, J., Eversole, P., Bellve', A., Hiraoka, Y., Li, S.S.-L., Simon, M. (1990). *Development* **109**: 483-493.

Thomas, R.C. (1972). *Physiol. Rev.* **52**: 563-594.

Timpl, R. (1989). *Eur. J. Biochem.* **180**: 487-502.

Timpl, R., Engel, J. (1987). Type VI collagen. New York, Academic Press.

Timpl, R., Engel, J., Martin, G.R. (1983). *Trends Biochem. Sci.* **8**: 207-209.

Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 9933-9937.

Tsai, S.F., Strauss, E., Orkin, S.H. (1991). *Genes Dev.* 5: 919-931.

Turner, I.M., Saunders, P.T.K., Shimasaki, S., Hillier, S.G. (1989). *Endocrinology* 125: 2790-2792.

Utakoji, T. (1966). *Exp. Cell Res.* 42: 585-590.

Varnum, S.M., Wormington, W.M. (1990). *Genes Dev.* 4: 2278-2286.

Vasallo, P.M., Dackowski, W., Emanuel, J.R., Levenson, R. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 4613-4618.

Vierstra, R.D., Langan, S.M., Schaller, G.E. (1986). *Biochemistry* 25: 3105-3111.

Virbasius, J.V., Scarpulla, R.C. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 6791-6796.

Vogt, P.K., Bos, T.J. (1989). *Trends Biochem.* 14: 172-175.

Voutilainen, R., Miller, W.L. (1988). *DNA* 7: 9-15.

Walchli, C., Koller, E., Trueb, J., Trueb, B. (1992). *Eur. J. Biochem.* 205: 583-589.

Wall, L., DeBoer, E., Grosveld, F. (1988). *Genes Dev.* 2: 1089-1100.

Wang, F., Hanske, M., Miedema, K., Klein, G., Ekblom, P., Hennig, W. (1992). *J. Cell Biol.* 119: 977-988.

Weil, D., Mattei, M.G., Passage, E., Van Cong, N., Pribula-Conway, D., Mann, K., Deutzmann, R., Timpl, R., Chu, M.L. (1988). *Am. J. Hum. Genet.* 42: 435-445.

- Wellman, S.E., Casano, P.J., Pilch, D.R., Marzluff, W.F., Sittman, D.B. (1987).** *Gene* **59**: 29-39.
- Wells, D., Hoffman, D., Kedes, L. (1987).** *Nucleic Acids Res.* **15**: 2871-2889.
- Wells, D., Kedes, L. (1985).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2834-2838.
- Wickens, M. (1990).** *Trends Biochem. Sci.* **15**: 320-324.
- Wickens, M., Stephenson, P. (1984).** *Science* **226**: 1045-1051.
- Wilkinson, D.G., Bailes, J.A., Champion, J.E., McMahon, A.P. (1987).** *Development* **99**: 493-500.
- Wilkinson, K.D., Cos, M.J., O'Connor, L.B., Shapira, R. (1986).** *Biochemistry* **25**: 4999-5004.
- Wilson, D.B., Dorfman, D.M., Orkin, S.H. (1990).** *Molec. Cell. Biol.* **10**: 4854-4862.
- Wilusz, J., Pettine, S.M., Shenk, T. (1989).** *Nucleic Acids Res.* **17**: 3899-3908.
- Williams, T., Yon, J., Huxley, C., Fried, M. (1988).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3527-3530.
- Wolfes, H., Kogawa, K., Millette, C.F., Cooper, G.M. (1989).** *Science* **245**: 740-743.
- Wolgemuth, D.J., Viviano, C., Ginzang-Ginsberg, E., Frohman, M.A., Joyner, A.L., Martin, G.R. (1987).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5813-5817.
- Wu, R.S., Panusz, H.T., Hatch, C.L., Bonner, W.M. (1985).** *CRC Crit. Rev. Biochem.* **20**: 201-.

Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B., Beach, D. (1991). *Cell* 65: 691-699.

Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., Beug, H., Orkin, S.H., Engel, J.D. (1990). *Genes Dev.* 4: 1650-1662.

Yarden, Y., Escobedo, J.A., Kuang, W.J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, V., Fried, V.A., Ullrich, A., Williams, L.T. (1986). *Nature* 323: 226-232.

Yarden, Y., Ullrich, A. (1988). *Biochemistry* 27: 3113-3119.

Yeh, J., Danehy, F.T., Osathanondh, R., Villa-Komaroff, L. (1991). *Mol. Cell. Endocr.* 80: 75-82.

Zacheri, Z.F., Ponzetto, C., Wolgemuth, D.J. (1988). *Dev. Biol.* 125: 417-422.

Zweidler, A. (1984). *Histone Genes: structure, organization and regulation*. New York, Wiley Interscience.