

#### 4.26 Screening de la llibreria de cDNA de testicle de rata.

Amb l'objectiu d'aïllar el cDNA complert, el clon del cDNA A9 es va marcar per *random priming* amb  $^{32}\text{P}$ -dCTP i utilitzat per a realitzar el *screening* d'una llibreria de cDNA de testicle de rata. En el screening de  $1 \times 10^6$  fags recombinants, es van detectar 78 clapes positives; 15 d'aquestes van ser aïllades, 4 clons A9-1, A9-18, A9-45 i A9-78 van ser purificats i seqüenciats. El clon A9-1 va ser el que va donar la seqüència mes llarga (aprox. 1,4 kb). La seqüència complerta de nucleotids del cDNA i la seqüència d'aminoàcids deduïda es mostra a la figura 46.

```

1   GAGGCGAGCGGGTCCACAGGCCGCGAGCCATGGGTAGCCGCGTGTCCCGAGAGGAGTTCGAATGGGTCTA
1   M G S R V S R E E F E W V Y
71  CACGGACCAGCCCCACGCCGCCCGCGCAAGGAGATCTTAGCAAAGTATCCAGAGATCAAGTCCTTGATG
15  T D Q P H A A R R K E I L A K Y P E I K S L M
141 AAACCTGACCACAATCTGATCTGGATTGTAGCCATGATGCTTCTCGTCCAGCTGGCTTCATTTACTTAG
38  K P D H N L I W I V A M M L L V Q L A S F Y L V
211 TCAAAGATTTGGACTGGAAATGGGTCAATTTTTGGTCTATGTCTTTGGCAGCTGCCTTAACCACTCCAT
62  K D L D W K W V I F W S Y V F G S C L N H S M
281 GACTCTGGCTATCCATGAGATTTCCACAATTTCCCTTTGGCCACCACAAGGCCCTGTGAACCGCTGG
85  T L A I H E I S H N F P F G H H K A L W N R W
351 TTTGGAATGTTTGCTAACCTCTCTCGGAGTGCCATACTCGATTTCCCTTTAAGAGATACCACATGGATC
108 F G M F A N L S L G V P Y S I S F K R Y H M D H
421 ATCACCGGTACCTCGGGGCGGACGGCATCGATGTGGATATCCCTACTGATTTGAGGGCTGGTTCTTCTG
132 H R Y L G A D G I D V D I P T D F E G W F F C
491 CACCACTCTCAGGAAGCTTGTCTGGTTATCCTTCAGCTCTCTTCTATGCGTTTAGACCCCTGTTTCATC
155 T T L R K L V W V I L Q P L F Y A F R P L F I
561 AACCCCAAGCCAATTACCCATCTGGAAGTCATCAACGCTGTGATCCAGGTCACTTTTGACGTCCTCGTCT
178 N P K P I T H L E V I N A V I Q V T F D V L V Y
631 ACTATGTTTTTGGAGTGAAGTCTCTAGTGACATGTTGGCAGCCTCCCTGCTCGGCCTGGGCTTGACCC
202 Y V F G V K S L V Y M L A A S L L G L G L H P
701 AATTTGGGGCATTTCATAGCCGAACATTACATGTTCCATAAGGGACACGAAACATACTCCTACTATGGC
225 I S G H F I A E H Y M F L K G H E T Y S Y Y G
771 CCTCTGAACTTACTCACCTTCAATGTGGGCTATCACAAACGAACACCACGACTTCCCCAATGTTCTGGGA
248 P L N L L T F N V G Y H N E H H D F P N V P G K
841 AAAACCTGCCCTGGTGAGAAAAATCGCAAGTGAGTACTATGATAACCTCCACACTACAACCTCCTGGAT
272 N L P L V R K I A S E Y Y D N L P H Y N S W I
911 CCGAGTGTGTATGACTTTGTGATGGACGACACAATAAGTCCCTACTCACGGATGAAGAGGCCCCCGAAA
295 R V L Y D F V M D D T I S P Y S R M K R P P K
981 GGAATGAGATTCAGGAGTAAATGCCATCACAGCCAAAGGAATTCCTGTCCACACTTCAGAATAGGAGAT
318 G N E I Q E *
1051 AAAGTGGAGCTTTCTCTCGTTAAGGTCAGTGATGCTCAGAAGCCGCGCTGACGTAATTTTC
1121 CGGCTCGCTGACGTAATTTCCGGCTCGCTGACGTAATTTCCGGCTAGGATCTCGGTGTCAT
1191 CAGAAGCTCCTCGGCCTTCAGACAGCCAGAACTCACACTTGCTCGCAGCCGACGCCTGCT
1261 CACCGTACTCACGCAACGTATGACTGTTACTGAGGCGTCTCACTCATGTCTGTCTGCTGC
1321 AAGCAAATCATAAAAGCTTATGTTATTTTTCACTGTAAGGTTTTACTTTATTTAAAGCCCTC
1391 AATAAACTGAACTGTTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 46. Seqüència del cDNA de Rdes

#### 4.27 Caracterització del clon A9.

El clon A9 va mostrar un *open reading frame(ORF)* de 323 aminoàcids que codificava per una proteïna d'un pes molecular teòric de uns 37 kd. Tant la seqüència de cDNA com la d'aminoàcids van ser comparades amb el banc de dades del Genbank utilitzant el programa BLAST. Ambdues seqüències van presentar una homologia molt elevada amb una família de desaturases descrita en altres espècies (95% amb l'homòleg de ratolí, *degenerative spermatocyte homolog (Drosophila) Mus Musculus* (gi 6681175); 85% amb l'humà, *degenerative spermatocyte membrane fatty acid desaturase Homo sapiens* (gi 4505193); 58% amb el de *Drosophila*, *Des-1 Drosophila melanogaster* (gi 1667359).

A més, l'anàlisi estructural teòric de la seqüència d'aminoàcids que codificava per aquesta proteïna utilitzant diferents programes d'anàlisi proteic, ens va portar a considerar que el clon A9 era l'homòleg en rata d'aquesta família de desaturases, i el vam batejar amb el nom de Rdes.

La proteïna Rdes, a l'igual que les seves homòlogues, presentava les característiques pròpies d'una desaturasa. Utilitzant el programa *ScanProsite d'ExPASy* es va deduir que molt probablement Rdes contingués a la seva seqüència el següent:

1. Dos llocs de N-glicosilació a les posicions 81-84 NHSM i 113-116 NLSL.
2. Dos llocs de fosforilació per la proteïna kinasa C (PKC) a les posicions 123-125 SFK i 156-158 TLR.
3. Tres llocs de fosforilació per la caseïna kinasa II (CK2) a les posicions 6-9 SREE, 146-149 TDFE I 183-186 THLE.
4. Tres llocs de fosforilació per la tirosina kinasa (TYR) a les posicions 7-14 REEFWVY, 126-134 RYHMDHRY i 238-245 KGHETYSY.
5. Quatre llocs de misristoilació a les posicions 2-7 GSRVSR, 77-82 GSCLNH, 109-114 GMFANL i 117-122 GVPYSI.

6. Una regió d'unió a zenc a la posició 86-95 LAIHEISHNF.

Coincidint amb altres membres de la família i utilitzant el programa *Tmpred d'Embnet* es van predir fins a 5 possibles hèlix transmembrana (Fig. 47) situades a les posicions següents: entre els AA 43-61, 68-86, 103-124, 160-177 i 208-231 ( en blau a la Fig. 48).

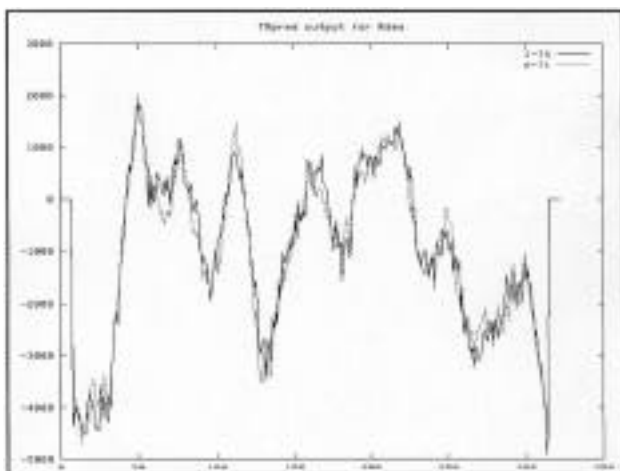


Fig. 47. Diagrama de predicció de possibles dominis transmembrana.

### Proteïna Rdes

MGSRVSREEFEWVYTDQPHAARRKEILAKYPEIKSLMKPDHNL**IWIVAMMLLVQLASFYLVKDL**DW  
**KWVIFWSYVFGSCLNHSMT**LAIHEISHNF**PF**GHHK**ALWNRWFGMFANLSL**GVPY**SISF**KRYHMDHH  
 RYL**GADGIDVDI**PTDFEGWFFCTTLR**KLWVILQPLFYAFRPLF**INPKPITHLEVINAVIQVTFDV  
 LVYYVFGVK**SLVYMLAASLLGLGLHPISGHFIA**EHYMF**LKGHETYSY**GPLNLLTFNVGYHNEHHD  
 FPNVPGKNLPLVRK**IASEYYDNL**PHYNSWIRVLYDFV**DDTISPYSRMKRPPKGNEIQE**

Fig. 48. Seqüència d'aminoàcids de la proteïna Rdes.

Rdes es va introduir en el banc de dades Genbank amb el nº d'accés gi 14571550 (Fig. 49).

The image shows the NCBI Nucleotide database interface. At the top, there's a search bar with 'Nucleotide' selected and a search button. Below the search bar are options for 'Limits', 'Index', 'History', and 'Clipboard'. There are also buttons for 'Display', 'Default View', 'as HTML', 'Save', and 'Add to Clipboard'. The main content area shows the accession number 'AY036902' and the title 'Rattus norvegicus degenerative spermatocyte-like protein RDES mRNA, complete cds'. It includes fields for 'LOCUS', 'DEFINITION', 'ACCESSION', 'VERSION', 'KEYWORDS', 'SOURCE', 'ORGANISM', 'REFERENCE', 'FEATURES', and 'ORIGIN'. The 'ORIGIN' section contains the full nucleotide sequence in a standard format with line numbers and a 'BASE COUNT' summary at the bottom.

Fig. 49. Pàgina d'accés al NCBI de Rdes.



A la figura 50 s'il·lustra el grau d'homologia entre els diferents membres de la família (ratolí Mdes; humà Human MLD; humà Hdes; drosòfila Dmdes; Arabidopsis Tathliana ATdes).

Rdes	1	-----MGRSRSREDFEWYTDQPRARRREILAYPEIKSLENKPDHNLWI
Mdes	1	-----MGRSRSREDFEWYTDQPRARRREILAYPEIKSLENKPDHNLWI
HsMLD	1	-----MGRSRSREDFEWYTDQPRARRREILAYPEIKSLENKPDHNLWI
Hdes	1	-----MGRSRSREDFEWYTDQPRARRREILAYPEIKSLENKPDHNLWI
DmDes	1	-----MGQRSSRTDFEWYTDQPRASRRRIILERYPCIKILFGHDQPFKWF
ATDes	1	MGKGGREKISSNEEREQGNATDFWSTYDEPHASRRRQILSCYPOIEQLFGDQWAFK
consensus	1	V dF W YrdePHASRRRtqILS YPqir L pdp
Rdes	47	VANNLLVQLASFYLVEDLDKQWVIFWSYVFGSCLNHSNTLAIHESHNFPFGHKKALNMR
Mdes	47	VANNLLVQLASFYLVEDLDKQWVIFWSYVFGSCLNHSNTLAIHESHNFPFGHKKALNMR
HsMLD	47	RINRDLTQLGAFYVVEEDLQKQWVIFGAYVFGSCDHSNTLAIRIARNAAPGNCKANMR
Hdes	47	RINRDLTQLGAFYVVEEDLQKQWVIFGAYVFGSCDHSNTLAIRIARNAAPGNCKANMR
DmDes	47	AGARVLTQILALFVVEEDLQSWLIVAAVQGGIDNRSLMLAHEHSHNLAPQHSRPNMR
ATDes	61	ITLVVILQLSTAAHLRNSQWLIKILSIAVFGSGLNHNLF LAIHESHNLAFS--TFVNR
consensus	61	i lvvilqlst ilhn W il ay FGs IHH I LAIHESHN aF vyNR
Rdes	107	WFGMPANLSLQVFPYSISPKRYHMDHRRYLCAQIDVDIDPDPFGWFFCTTLRLVNVILQ
Mdes	107	WFGMPANLSLQVFPYSISPKRYHMDHRRYLCAQIDVDIDPDPFGWFFCTTLRFVNVILQ
HsMLD	107	WFGMPANLPICIPYSISPKRYHMDHRRYLCAQVDVDIDPDPFGWFFCTAFRFVNVILQ
Hdes	107	WFGMPANLPICIPYSISPKRYHMDHRRYLCAQVDVDIDPDPFGWFFCTAFRFVNVILQ
DmDes	107	ILGFICNLPICLPMYSISPKRYHLEHRRYQGDERTDIDPDTLLERLFDITFGGFFNVILQ
ATDes	119	CLGIPANLPICVFPYSVTFQYRLEHRRYQVGGIDVDVPTYTEHNLVTHIDARTLVVILQ
consensus	121	GifanLpiGVp SVTF KYRLEHRRf G dgidmDVPT Ea f k iNV LQ
Rdes	167	PLFYAPRPLFIDPKPITHELEWNAVIVTDFVLLVYVFGVRLVVMLAASLLGLGHPIS
Mdes	167	PLFYAPRPLFIDPKPITHELEWNAVIVTDFVLLVYVFGVRLVVMLAATLLGLGHPIS
HsMLD	167	PLFYAPRPLFIDPKPITHELEWNAVITDFVLLVYVFGVRLVVMLAASLLGLGHPIS
Hdes	167	PLFYAPRPLFIDPKPITHELEWNAVITDFVLLVYVFGVRLVVMLAASLLGLGHPIS
DmDes	167	PFYIAPRPLFIDPKPITHELEWNAVITDFVLLVYVFGVRLVVMLAASLLGLGHPIS
ATDes	179	LFFYALRFIFIDPKPITHELEWNAVITDFVLLVYVFGVRLVVMLAASLLGLGHPIS
consensus	181	FYa RPifI PKP y E IN liQI dv v ifg rs Yli st vg GHPma
Rdes	227	GRFIAERHMLKQRETYSYQPLNLLTFWQYRNERHDFPVPQKNDPLVRKIAEYNDN
Mdes	227	GRFIAERHMLKQRETYSYQPLNLLTFWQYRNERHDFPVPQKNDPLVRKIAEYNDN
HsMLD	227	GRFIAERHMLKQRETYSYQPLNLLTFWQYRNERHDFPVPQKNDPLVRKIAEYNDN
Hdes	227	GRFIAERHMLKQRETYSYQPLNLLTFWQYRNERHDFPVPQKNDPLVRKIAEYNDN
DmDes	227	GRFIAERHMLKQRETYSYQPLNLLTFWQYRNERHDFPVPQKNDPLVRKIAEYNDN
ATDes	239	GRFIAERYVFNPCRETYSYQPLNLLTFWQYRNERHDFPVPQKNDPLVRKIAEYNDN
consensus	241	GRFIAERYVF ETYSYQPLNlltw VQYRNERHDFP 1PG L lVk IAgEyE
Rdes	287	LPHNSWIKVLDQFVHEDTISPYSRNKRPPKGNHILE
Mdes	287	LPHNSWIKVLDQFVHEDTISPYSRNKRPPKGNHILE
HsMLD	287	LPHNSWIKVLDQFVHEDTISPYSRNKRPPKGNHILE
Hdes	287	LPHNSWIKVLDQFVHEDTISPYSRNKRPPKGNHILE
DmDes	287	HPQHTSNTRELDQFVHEDTISPYSRNKRPPKGNHILE
ATDes	299	DESIRNSQVIYMYIHTTVQPYSRNKRPPKGNHILE
consensus	301	I y SW ViY yind tv PYsrnKRk d

Fig. 50. Comparació de les seqüències proteiques d'aquesta desaturasa entre diferents espècies.

#### 4.28 Obtenció del ORF del clon C9.

L'estratègia utilitzada per aïllar el cDNA complet corresponent al clon C9 va ser el disseny de una parella d'encebadors, un complementari a la zona 3' continguda en el clon C9 i que presentava una homologia molt elevada (90%) amb l'*Hepatoma derived growth factor related protein 1- mouse*, i un altre dissenyat de manera que fos complementari a l'extrem 5' d'aquest mateix mRNA i que inclogués a la seva seqüència l'ORF complet (Taula 1). Utilitzant cDNA procedent de testicles de rates tractades amb MAA, es va realitzar una reacció de PCR producte de la qual es va obtenir una única banda d'una grandària de 1'3 kb aproximadament (Fig. 51).

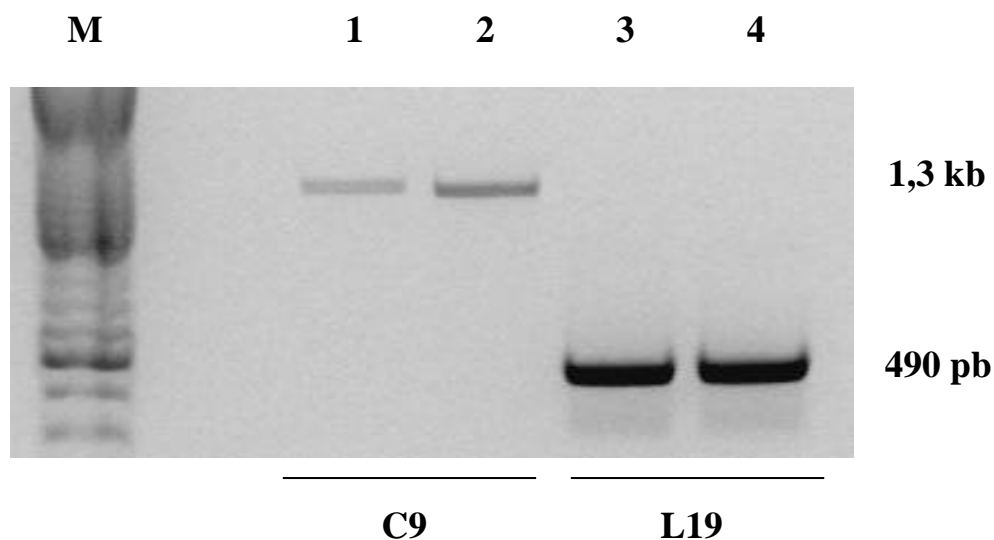


Fig. 51. Obtenció del cDNA complet d'HARP mitjançant RT-PCR.

Aquest producte de PCR va ser purificat, subclonat i seqüenciat, i aquesta seqüència va ser sotmesa a un anàlisi d'homologia en el banc de dades Genbank. Aquest anàlisi va confirmar l'obtenció d'un cDNA d'una grandària de 1,5 kb aproximadament (considerant el fragment obtingut mitjançant la tècnica de DD), amb un ORF de 296 aminoàcids (Fig. 52).

```

1   AGAGCACACGCTATGTCTTGCTTCAGCCGCCAAAATACAAGACCGGGGACCTGGTGT
1   M S C F S R P K Y K T G D L V F
59  TTGCCAAATTAAGGGCTATGCCATTGGCCAGCGAGGATTGAACATGTCACTGAACC
17  A K L K G Y A H W P A R I E H V T E P
117 CAACCGCTACCAGGTGTTCTTCTTCGGGACCCATGAGACCGCCCTGCTGGGCCCAAG
36  N R Y Q V F F F G T H E T A L L G P K
175 CACCTTTTTCTTATGAGGAGTCCAAGGAGAGGTTTCGGCAAGCCTAACAAGAGGCGCG
55  H L F P Y E E S K E R F G K P N K R R G
233 GCTTCAGTGAGGGCTGTGGGAGATCGAGCACGACCCTATGGTTGAGGCCTCCCTTG
75  F S E G L W E I E H D P M V E A S P C
291 CCTGTGCCCAGATGAGGAGCAGCTTTGTGCCGAGGAGCCAGGGCCAGGAGAGGCCA
94  L C P D E E Q L C A E E P G P G E E P
349 GAGCCGGGGCAGGAGCTGGAGCCGAATCCAGGCCTGAGCTGGAATCCATGCCTGAGC
113 E P G Q E L E P E S R P E L E S M P E L
407 TGGAGGCAGAACCAGGCCTGAGAAAGAGTGTGAGCAGGAGCCGGAGCAGGAGCCGGA
133 E A E P R P E K E C E Q E E P E
465 GCAGGAGCCGGAGCAGGAGCTGGAGCAGGAGCCGGAGCTGGAGCCGGAGCCGGAGCCG
152 Q E P E Q E L E Q E P E L E P E P E P
523 GAGCCGGAGCCCGAGCCGGAGCCGGAGCCAGCCTGCCTATGACCTACTGGATGCCTG
171 E P E P E P E P E P S L P M T Y W M P G
581 GCCTCATTGAGCCGAGCCAGGAGATCAGCAAGCCGAGCAAGTGGAGAGCAGCACCG
191 L I E A E P G D Q Q A E Q V R E Q H A
639 TGAAGCTGAGGTCATGGCTGTAGTGGAGGAGCCGGAGAGTCTGAAGAGGAGCGCGGAG
210 E A E V M A V V E E P E S L K R S A E
697 GATGAACAGCCTCACAGTCTCCCAAACGGCCAGGGAGGCGGCGCTGGCGCGCTGG
229 D E Q P H S P P K R P R E A A P G A L E
755 AGATGGAGCCGCTGGAGAGCGGAGGCAGAGGCTGCCCTTCGTGGAGGAGCCTGA
249 M E P A G E R E A E A C P F V E E P D
813 CCAAGCCCAGGAACAGCAGACTCCGTTGGAAGAAGAGGCCACAGAGGAGGCAGTCCAG
268 Q A Q E Q Q T P L E E E A T E E A V Q
871 GGCTGATGGTTGGAGAAATCGAAGGCCTGTAGTCACGGTGTCTGTAAAAGAGCCCTC
287 G L M V G E I E G L *
929 TCTACCCGTTCTGGTGCCACCTGGCTGTGGCTTGGGAAACCCGCTAGGGCCAGTCT
987 CAACCCAGTCCACCTTTCTTTATTCACTCACCTTCTCCAAGCCAAATTCCTGGCAT
1045 GATGGGACAGGCCAGTTAACATCAACTTTGTGGCTTAAATTGAGGCCACCCTTCCCAC
1103 CCTAAACACCGCATTCTGGACCTCTGCCTAAAAACCACGAGTGAATGGGGTGGGAGA
1161 TAAAGAGCAGGACAACATTCAAGGGTCTGGGAGGGGCAGTCTGTAAACTATGGCTTT
1219 GCTAGTCTACCCACACCTACCTTGAGTGCCTGTCTCGTCTTCCATAATTTCTTTCCC
1277 AGTTTTATACGTTTGGGGTTTGATGACCTGCCTGTTGTTAAGGCTTTGTTTTCTTAA
1335 GGTGCTATTTCTATCTGCATGTCAGCACCTGGGCCCTCAGTGTGTACCTACTGCA
1393 AAATGTACTGAGAAGTTGAGTGTCCCTTCCCAGCCTCTTCTGTCTCTATGTACCTTTG
1451 TACCTGTAACCCCTTGGCCTGCCTTTCCCGTTGGGCTCTGATGAAAAAAAAAAAAA
1509 AAAA

```

Fig. 52. Seqüència de cDNA d'HARP.

#### 4.29 Caracterització del clon C9.

El clon C9 va mostrar un *open reading frame (ORF)* de 296 aminoàcids que codificava per una proteïna d'un pes molecular teòric de uns 33 kd. Tant la seqüència de cDNA com la d'aminoàcids van ser comparades amb el banc de dades del Genbank utilitzant el programa BLAST. Ambdues seqüències van presentar una homologia molt elevada amb una família de factors de creixement derivats d'una línia cel·lular d'hepatoma (*Hepatitis derived growth factor*).

Els primers 93 aminoàcids van presentar una homologia del 100% amb tots els membres d'aquesta família en diferents espècies, coincidint amb un domini conservat en aquesta família denominat *hath* [pels autors que les van clonar, però que posteriorment ha estat denominat, *PWWP domain* (en vermell i subratllat a la Fig. 53)]. També va mostrar molta homologia amb un pèptid senyal nuclear NLS conservat en aquesta família (en groc i subratllat a la Fig. 53). Així mateix es va observar un domini ric en tàndems Pro-Glu (en groc i subratllat a la fig. 53), però que en aquest cas no apareixia en cap dels altres membres de la família (Fig. 54).

Això confirmava que el clon C9 era un nou membre d'aquesta família, i com que va ser aïllat mostres procedents de tractaments inductors d'apoptosi el vam anomenar HARP (Hepatoma derived growth factor Apoptosis Related Protein).

#### Proteïna HARP

MSCFSRPKYKTGDLVFAKLLKGYAHWPARI EHVTEPNRYQVFFFGTHETALLGPKHLFPYEESKERF  
GKPNKRRGFSEGLWEI EHDPMVEASPCLCPDEEQ LCAEFPGPGEPEPGQELEPESRPELESMPPEL  
EAEP RPEKECEQEPEQEPEQEPEQELEQEPELEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPESLPMTYWMPGLIEAEPGD  
QQAEQVREQHAEEVMAVVEEPESELKRSAEDEQPHSPPKRPREEAAPGALEM EPAGEREA EACP FVE  
EPDQAQEQQTPLEEEATEEEAVQGLMVGEIEGL\*

Fig. 53. Seqüència d'aminoàcids de la proteïna HARP.

Utilitzant el programa *ScanProsites d'ExPASy* vam deduir que molt probablement HARP contingués a la seva seqüència el següent:

1. Un lloc de fosforilació per la proteïna kinasa C (PKC) a la posició 222-224 SLK.
2. Quatre llocs de fosforilació per la caseïna kinasa II (CK2) a les posicions 122-125 SRPE, 128-131 SMPE, 226-229 SAED i 274-277 TPLE.
3. Tres llocs de miristoilació a les posicions 44-49 GTHETA, 190-195 GLIEAE i 287-292 GLMVGE.



A la figura 54 s'observa amb més detall l'homologia entre els diferents membres d'aquesta família i HARP.

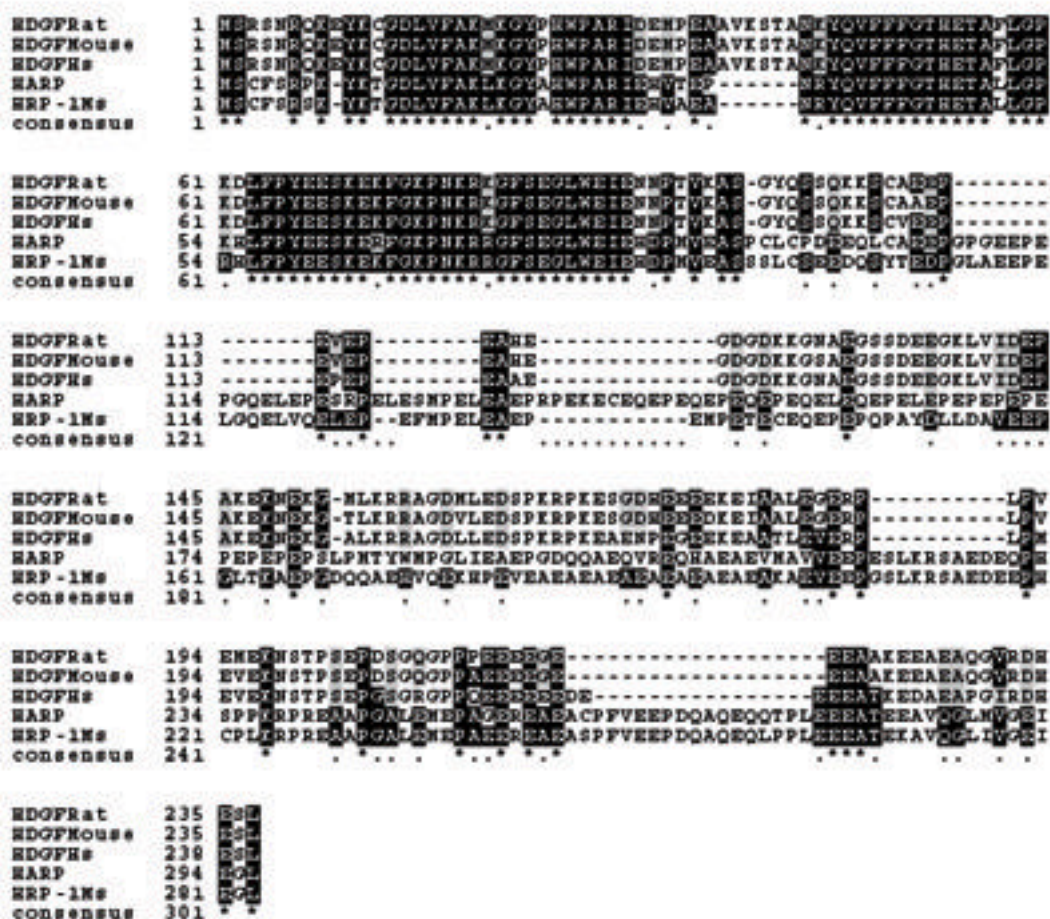


Fig. 54. Comparació de les seqüències proteiques d'aquestes proteïnes entre diferents espècies.

#### 4.30 Estudi de l'expressió del RNA de Rdes i HARP en diferents teixits per Northern blot.

Per mirar d'esbrinar quina era la distribució d'expressió d'aquests dos nous gens es van realitzar estudis de Northern blot en membranes comercials que contenen RNA procedent de diferents teixits de rata. Tant Rdes com HARP es van expressar en diferents teixits, però amb la particularitat que la màxima expressió apareixia en el testicle (Fig. 55).

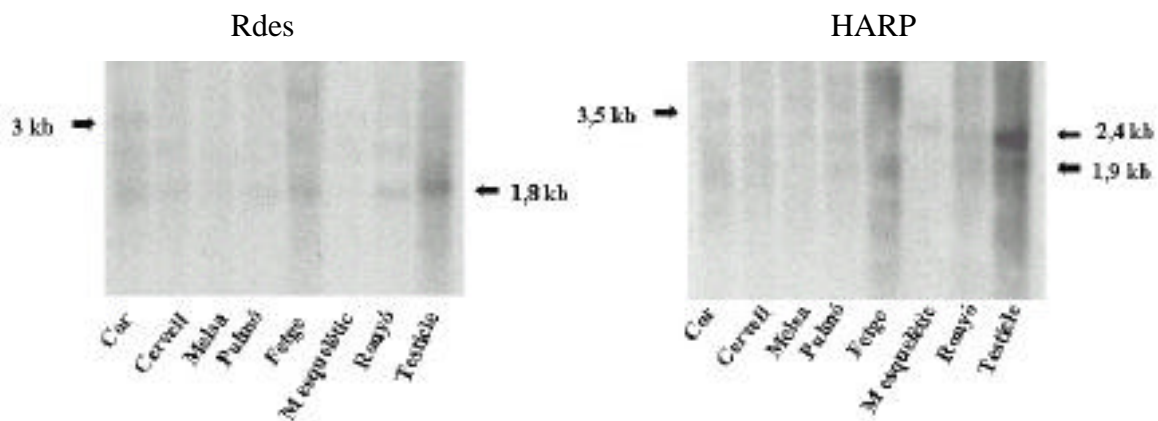


Fig. 55. Estudi de l'expressió del RNA de Rdes i HARP en diferents teixits.

En el *Northern blot* de Rdes, un transcrit d'una grandària d'uns 1,8 kb va ser observat en el testicle, mentre que un transcrit d'una grandària lleugerament inferior es va detectar en ronyó, fetge, pulmó, melsa, cervell i cor, però no a múscul esquelètic. Fins a dos transcrits més es van poder observar a cor i ronyó entre 2 i 3 kb de grandària. A fetge es va observar un altre transcrit superior a 3 kb.

En el *Northern blot* d'HARP, dos transcrits d'una grandària d'uns 2,4 kb i 1,9 kb respectivament es van observar a testicle, però també a ronyó i pulmó. Al fetge es van observar també dos transcrits però de 1,9 kb i 5 kb respectivament. A melsa i cervell es van observar dos transcrits de 2,4 kb i 3,5 kb; i a múscul esquelètic tan sols es va detectar un transcrit d'unes 3 kb.

#### 4.31 Localització dels canvis en l'expressió gènica de Rdes en les seccions de testicles de rates tractades amb MAA i EDS.

Amb la finalitat de corroborar els canvis d'expressió observats per *Northern blot* dels dos gens aïllats i de comprovar si hi havia una relació directe entre aquest augment d'expressió i canvis en la localització dels dos gens a les cèl·lules del testicle com a conseqüència de la inducció d'apoptòsi, es van realitzar estudis de localització del mRNA mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*.

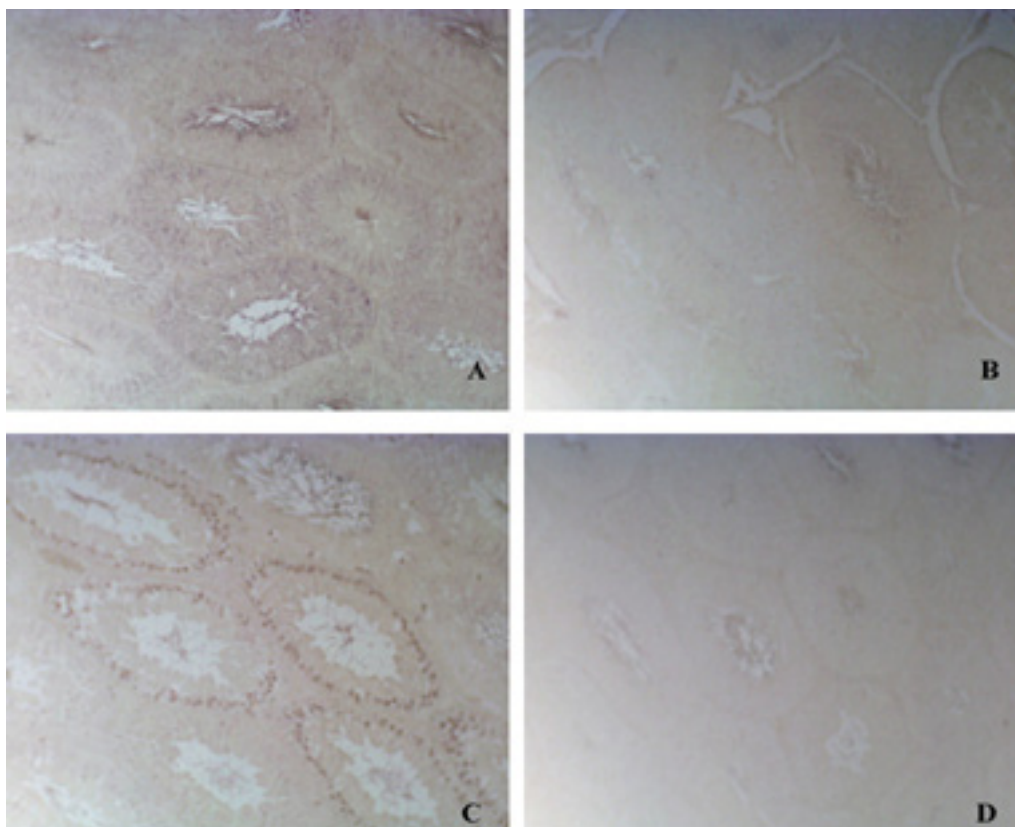


Fig. 56. Localització dels canvis en l'expressió gènica de Rdes en les seccions de testicles de rates tractades amb MAA.

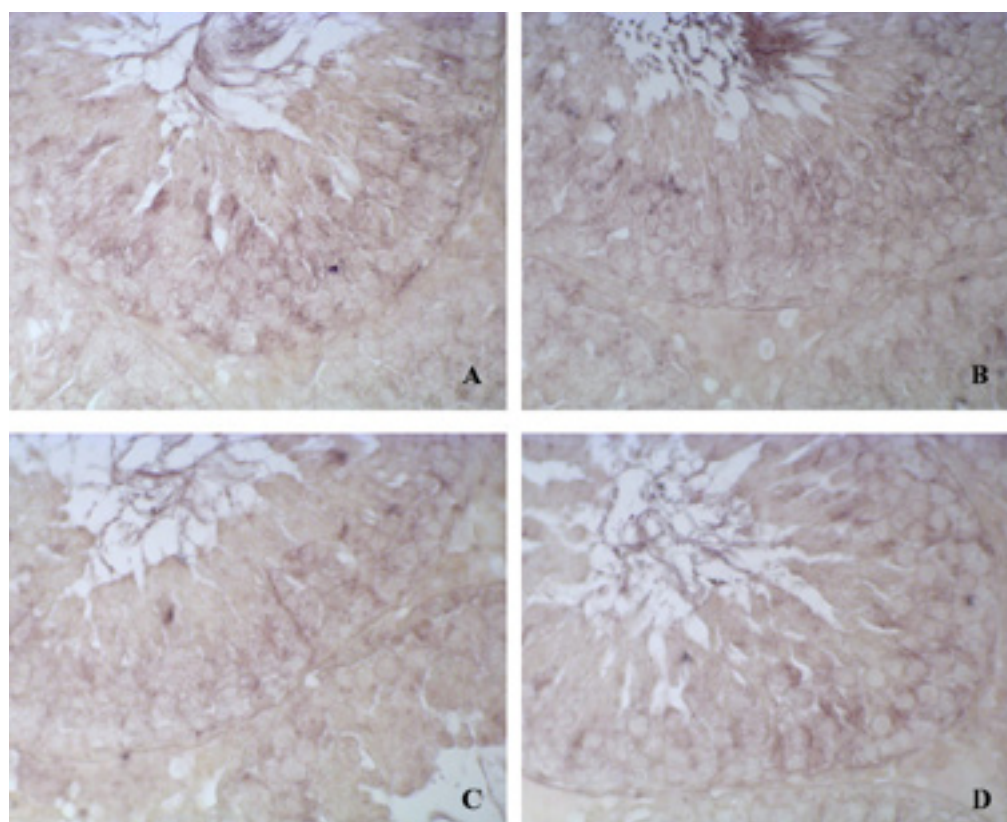


Fig. 57. Anàlisi amb més detall del mRNA a les seccions de les rates control en funció de l'estadi.



Les seccions en les quals es va fer servir una sonda sentit (Fig. 56 B i C) i que servien com a controls negatius de la tècnica no van mostrar senyal de fons, tant si procedien d'animals controls com de rates tractades amb MAA.

El teixit de les rates control (Fig. 56 A) va mostrar una distribució del mRNA de Rdes diferent de la que es va veure al teixit de les rates sacrificades 12 hores després de l'administració del tòxic (Fig. 56 C).

L'anàlisi amb més detall de les seccions de les rates control, va mostrar que l'expressió del mRNA de Rdes era estadi dependent. Als estadis primerencs del cicle espermatogènic, es va detectar expressió a les cèl·lules de Sertoli, espermàtides rodones i espermàtides allargades 16-17 (Fig. 57 A). Als estadis VII-VIII, l'expressió es va detectar sobretot en espermàtides rodones (Fig. 57 B), malgrat que encara que encara hi havia expressió a les cèl·lules de Sertoli, aquesta havia disminuït considerablement. L'expressió als estadis IX-X es va detectar també a les cèl·lules de Sertoli (Fig. 57 C) i de manera poc intensa en alguns espermàtòcits primaris en fase de paquitè. Als estadis XI-XIII, es va detectar una expressió menys intensa tant a les cèl·lules de Sertoli com en espermàtòcits primaris en fase de paquitè, i no a les espermàtides allargades.

A les seccions de rates sacrificades 12 hores després de l'administració del tòxic, el fet més destacable va ser la detecció d'una expressió molt elevada en els espermàtòcits primaris en fase de paquitè als estadis més tardans del cicle espermatogènic (Fig. 58 A). La hibridació amb la sonda sentit no es va detectar cap expressió en els mateixos estadis (Fig. 57 8).

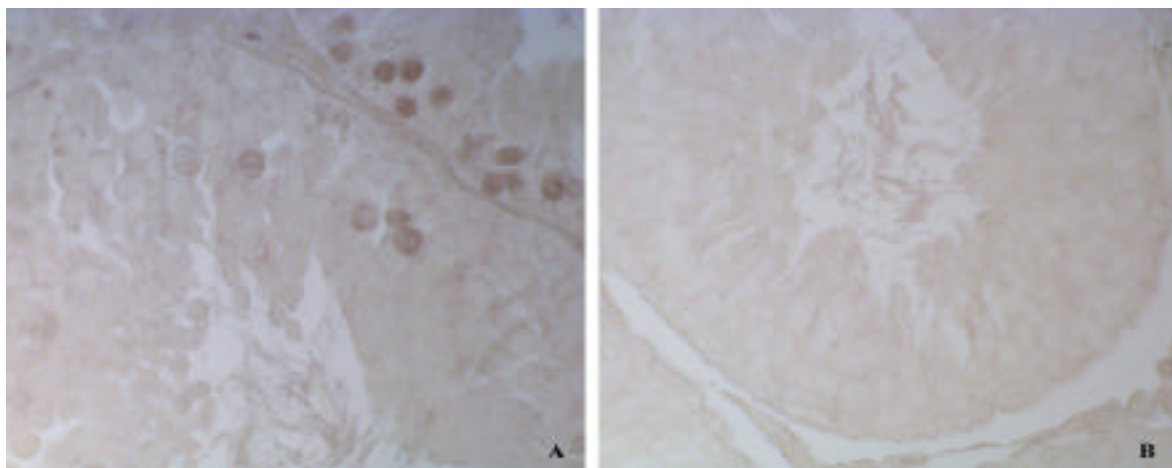


Fig. 58. Detecció de l'expressió del mRNA de Rdes en els espermàtòcits primaris en fase de paquitè.

No es van detectar canvis en l'expressió del mRNA de Rdes en les seccions de rates tractades amb EDS (dades no mostrades).

#### **4.32 Localització dels canvis en l'expressió gènica d'HARP en les seccions de testicles de rates tractades amb MAA i EDS.**

Les seccions en les quals es va fer servir una sonda sentit (Fig. 59B, D i F) i que servien com a controls negatius de la tècnica, no van mostrar senyal de fons.

L'expressió del mRNA d'HARP a les seccions control es va detectar de manera generalitzada en tots els estadis del cicle espermatogènic. L'expressió va ser discreta a nivell d'interstici i en alguns espermatòcits primaris i també es va observar expressió a nivell d'espermàtides rodones (Fig. 59 C).

En les seccions procedents de rates sacrificades 12 hores després de l'administració de MAA, l'expressió del mRNA es va detectar específicament i d'una manera molt elevada en espermatòcits primaris en fase de paquitè en els estadis X-XII del cicle espermatogènic (Fig. 59 E i H). De la mateixa manera, en els estadis III-IV del cicle espermatogènic l'expressió es va detectar a nivell de espermatòcits primaris en fase de preleptotè (Fig. 59 A).

En els estadis VI-VII, no es va detectar expressió del mRNA d'HARP a les cèl·lules germinals del túbul seminifer (Fig. 59 G).

En les seccions procedents d'animals tractats amb EDS, a l'igual que el mRNA de Rdes, no es van detectar canvis en l'expressió del mRNA d'HARP (Fig. 60 B), excepte en el cas de les seccions dels animals sacrificats 24 hores després del tractament amb el tòxic, on es va detectar un augment considerable en l'expressió del mRNA d'HARP a nivell de les cèl·lules de Leydig que presentaven una clara morfologia apoptòtica (Fig. 60 A). La fletxa de la figura 60 senyala una cèl·lula de Leydig que mostra aquesta troballa.

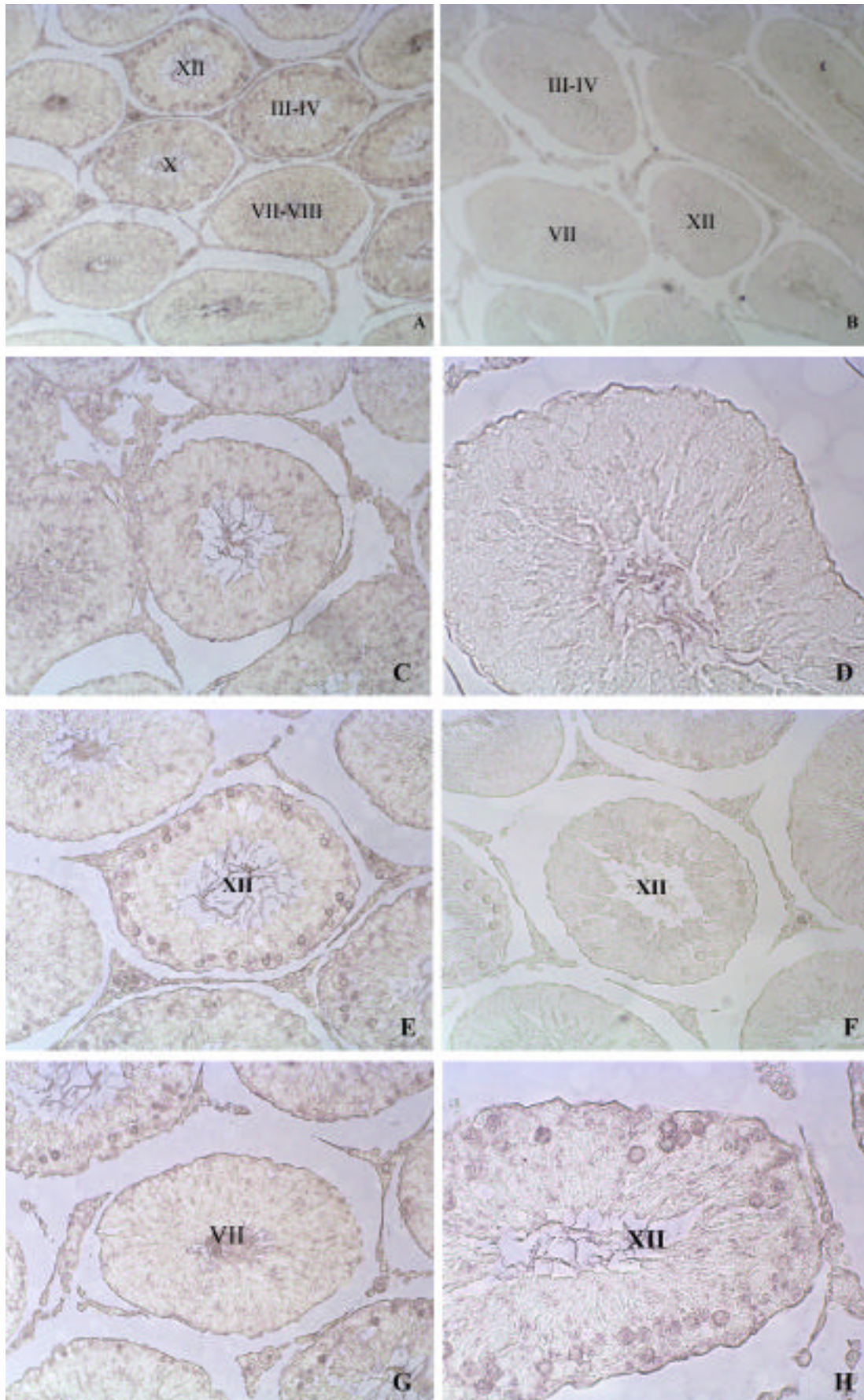


Fig. 59. Localització dels canvis en l'expressió gènica d'HARP en les seccions de testicles de rates tractades amb MAA



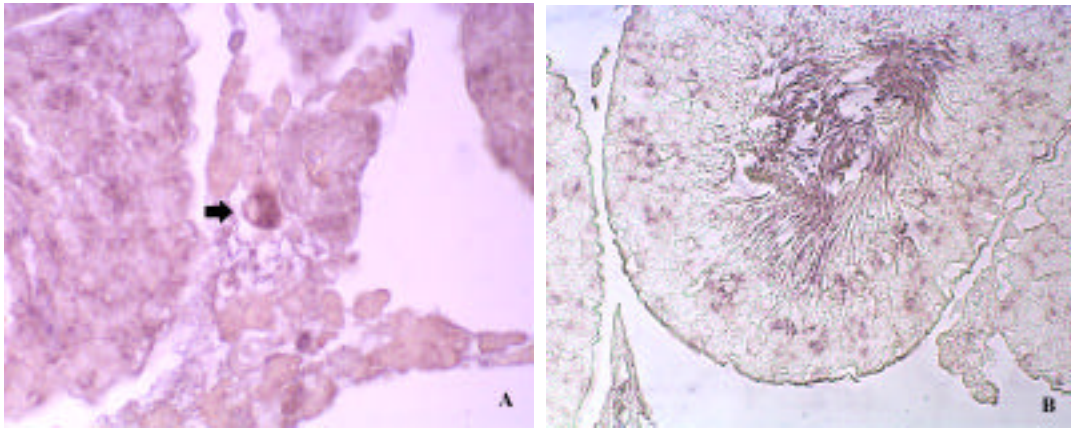


Fig. 60. Expressió d'HARP en les seccions de testicles de rates tractades amb EDS.

#### 4.33 Expressió diferencial de la proteïna de ratolí HRP-1 entre rates controls i rates sacrificades 12 hores després del tractament amb MAA.

L'expressió de la proteïna HRP-1, es va analitzar en seccions de testicles de rates control i en seccions de rates sacrificades 12 hores després del tractament amb MAA. La intenció d'aquest estudi va ser demostrar la participació d'HARP en el procés apoptòtic induït per aquest tractament.

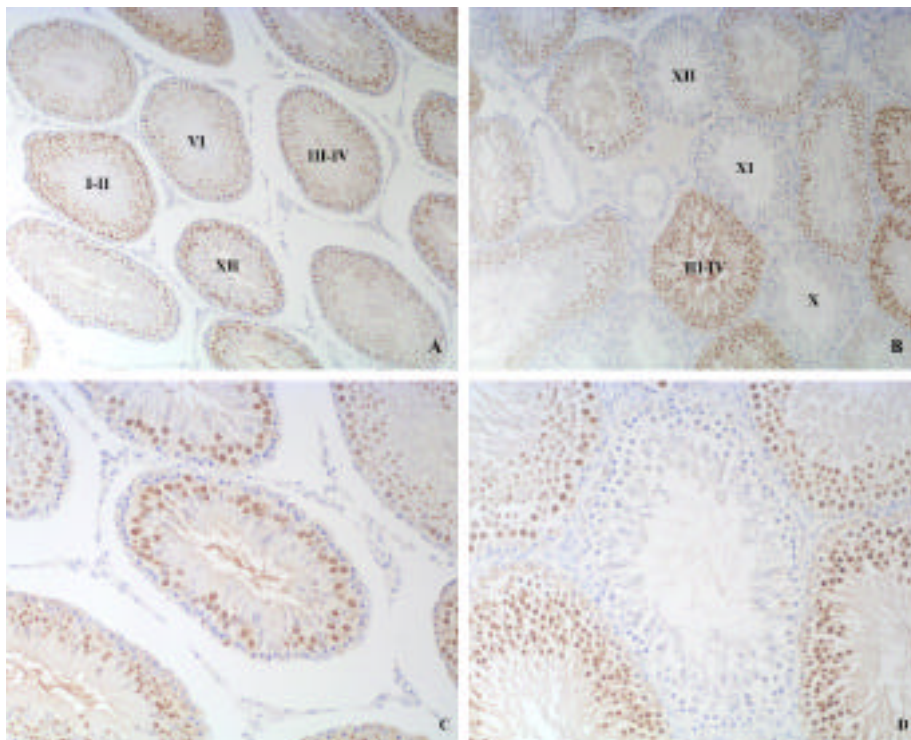


Fig. 61. Localització de la proteïna HRP-1 de ratolí en rates controls i rates tractades amb MAA.

En els testicles de les rates control, es va observar l'expressió de la proteïna HRP-1 en tots els estadis del cicle espermatogènic (Fig. 61 A), tant en espermatòcits primaris en els diferents estadis de maduració, com a nivell d'espermàtides rodones i allargades, però no en espermatogònies ni en cèl·lules somàtiques. En concret en els estadis X-XIII, estadis en els quals els espermatòcits primaris en fase de paquitè són els tipus cel·lulars més susceptibles de patir apoptosi, aquestes cèl·lules van mostrar una expressió elevada d'aquesta proteïna (Fig. 61 C).

En les seccions dels testicles de les rates sacrificades 12 hores després de l'administració del tòxic, l'expressió de la proteïna HRP-1 va desaparèixer en les cèl·lules germinals dels estadis X-XIII (Fig. 61 B i D).