

00591

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Efectos de la sobreexpresión de c-kit en el desarrollo
de la línea germinal de ratones transgénicos

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Presenta :

M en C. Denhí Schnabel Peraza

m. 341035

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Dennis Schnabel

Pexaza

FECHA: 15 de febrero 2005

FIRMA: [Firma manuscrita]

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología,
UNAM, bajo la supervisión de la Dra. Hilda Lomelí Buyoli.

El jurado compuesto por:

Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Dra. Carmen Beltrán Nuñez

Dra. Susana López Charretón

Dr. Mario Zurita Ortega

Dr. José Luis Montiel Hernández

Dr. Jesús Martínez Bartneche

El desarrollo del presente trabajo se realizó con el apoyo de las
becas otorgadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONACYT y complemento otorgado por la dirección general de
estudios de postgrado DGAPA.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, de la cual soy una orgullosa integrante, por permitirme desarrollarme tanto académicamente como personalmente
GRACIAS.

Al IBT donde he pasado de los mejores momentos y es un excelente sitio para trabajar.

A la Dra Hilda Lomelí por su guía ,criticas y apoyo que me ha brindado todo el tiempo que estuve en su laboratorio.

Al Dr. Alberto Darszon y la Dra Verónica Narváez por su interés y buenos consejos durante los tutoriales y fuera de ellos.

Al Dr. Federico Sánchez, la Dra. Carmen Beltrán, Dra. Susana López , Dr. Mario Zurita, Dr. Jose Luis Montiel y al Dr. Jesús Martínez por sus comentarios hechos al presente trabajo.

Al la Dra Yvonne Rosenstein y a su grupo por todo el apoyo y comentarios para del presente trabajo.

Al Dr. Alberto Darzson y su grupo por la ayuda para poder realizar las inmunos en los espermatozoides, y la separación de las células espermatogénicas.

A la M. en C. Laura Ramírez por la ayuda para realizar parte de este trabajo.

A Rubén Blancas y Sergio Gonzalez en el bioterio, por toda la ayuda que me dieron cuidando de mis ratones, a pesar de todo y el interés que mostraron por mi trabajo, muchas gracias.

A Shirley Ainsworth que siempre me ayudó a conseguir material bibliografico con mucho empeño e interés.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Laura Ramírez, Verónica Ramos, Jose Antonio Martinez, Diana Escalante, Angel Flores, Hector Rodriguez y Enrique Salas que siempre me ayudaron, animaron y estuvieron en las buenas y malas conmigo.

A mis muy queridos amigos con los que compartí muy buenos momentos que recordare por siempre, que me ayudaron y animaron siempre para que continuara echándole muchas ganas : María del Rayo, Mario Ernesto Cruz, Laura Ramírez, Takyua, Diana Escalante, Verónica Ramos, Tonathui, Rocio Rodríguez, Eddie, Ignacio López, Chris, Claudia, Gisela, Conchita, Herbert, Leda, Toño, Mariana Fregoso, Lucia Perezgazga.

Quiero dedicar esta tesis a

Al amor en mi vida, Enrique. Que a pesar de lo difícil que fue este trago lo hemos superado juntos.

A mi muy querida familia que sin ellos no hubiera podido realizarme, gracias por su apoyo y cariño que siempre esta presente en mi.

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Ratón como modelo en la biología del desarrollo	5
Origen y desarrollo de las células germinales primordiales	8
Ovogénesis	12
Espermatogénesis	14
Estructura de los gametos	20
El óvulo	20
El espermatozoide	21
Mutaciones <i>white spotting</i> y <i>steel</i>	26
Estructura y vías de traducción de c-Kit	28
Estructura y vías de traducción de tr-Kit	30
Antecedentes	32
Kit ^{D814Y}	32
El sistema <i>cre/loxP</i>	33
Justificación	37
Objetivos	38
Resultados	39
Líneas de ratones transgénicos	39
La línea de ratones transgénicos Kit ^{D814Y} - <i>loxP</i>	

se expresa en las células espermatogénicas	39
Obtención de ratones dobles transgénicos	40
La expresión de Kit ^{D814Y} en la línea germinal de ratones causa esterilidad y malformaciones en los espermatozoides	41
Los últimos estadios de la espermiogénesis están afectados en los ratones KDY	53
La activación de Kit ^{D814Y} incrementa la fosforilación de PLC γ -1 y disminuye la cantidad de SHP-1	56
La fosforilación de PLC γ -1 ocurre en las espermátidas elongantes <i>in vivo</i>	60
Discusión	65
Conclusiones	73
Material y Métodos	74
Generación de ratones transgénicos	74
Tinción para detectar la actividad de β -galactosidasa	75
Tinción de Hoescht para detectar núcleos en oocitos	75
Tinción de actina en espermatozoides	75
Inmunodetección en espermatozoides	76
Tinción de mitocondrias en espermatozoides	76
Tinción de núcleos en espermatozoides	76

Microscopia de luz y de transmisión electrónica	77
Inmunocitoquímica en cortes de parafina	77
Inmunodetección de proteínas.	77
Medios y soluciones	78
Bibliografía	82

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirebonucléico
ARN	ácido ribonucléico
ARNm	ácido ribonucléico mensajero
CGP	células germinales primordiales
ddn	días después del nacimiento
d pc	días <i>post coito</i>
ES	células troncales
FATN	fosfatasa alcalina tejido no específica
β -gal	beta galctosidasa
KDY	ratón doble transgenico estéril
Kit ^{D814Y}	sustitución del aspártico 814 por tirosina en Kit.
MAPK	cinasas activadas por mitogenos
PBS	buffer de fosfatos salino
PDGFR	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PCR	reacción de polimerasa en cadena
PI3K	fosfatidilinositol 3 cinasa
PKC	proteína cinasa C
PLC γ -1	fosfolipasa C gamma-1
Tr-kit	kit truncado
SHIP	inositol fosfatasa con domino SH-2
SHP-1	tirosin fosfatasa con domino SH-2
Sl	<i>Steel</i>
W	<i>White spotting</i>
Wt	silvestre

RESUMEN

c-Kit, es un receptor con actividad de tirosin cinasa importante durante el desarrollo de la línea germinal. Existe una versión truncada denominada tr-kit que se expresa en las espermatidas haploides y el espermatozoide maduro que es capaz de inducir la activación de los óvulos mediante la vía de PLC γ -1. En el presente trabajo inducimos la expresión ectópica de la versión mutada de Kit, Kit^{D814Y}, durante el desarrollo de la línea germinal. La expresión *in vivo* de esta mutante en las espermatidas produjo la malformaciones en el espermatozoide, causando en los casos mas severos la esterilidad. Análisis ultraestructurales en las espermatidas condensantes de ratones transgénicos presentaron la deslocalización del *manchette*, estructura esencial durante los estadios de elongación de la espermiogénesis. Además observamos un incremento en la fosforilación de PLC γ -1 en las células espermatogénicas. Observamos también que la activación de PLC γ -1 en el ratón silvestre se observa en las espermatidas condensantes, en los estadios de la espermiogénesis donde se expresa tr-kit. Nosotros proponemos que las alteraciones provocadas por la expresión ectópica de Kit^{D814Y} en la actividad de PLC γ -1 están relacionadas con las malformaciones que observamos durante la espermiogénesis. Nuestras observaciones sugieren que la actividad de PLC γ -1 esta involucrada en la formación del espermatozoide.

ABSTRACT

Kit is a receptor tyrosine kinase that plays a fundamental role during the development of germ cells. Additionally, a truncated product, tr-kit, expressed in haploid spermatids and mature spermatozoa can induce parthenogenetic activation when microinjected into mouse eggs, though the activation of PLC γ -1. In this work, we induced ectopic expression of a mutated Kit protein, Kit^{D814Y} during germ cell development. The in vivo expression of this mutant in spermatids produced malformations in mature spermatozoa, and in the most severe cases, sterility. Ultrastructural analysis indicated that condensing spermatids in the transgenic mouse presented a mislocalization of the manchette; a structure that has a crucial role during the elongation steps of spermiogenesis. This morphogenetic phenotype was accompanied by an increased phosphorylation of PLC γ -1 in spermatogenic cells. Interestingly, we also found that, in wild type testis, PLC γ -1 is specifically phosphorylated in condensing spermatids, coincident with the timing of expression of tr-kit in spermiogenesis. We propose that alterations of PLC γ -1 activity artificially promoted by ectopic Kit^{D814Y} expression are related to the abnormalities of spermiogenesis. Our observations suggest that PLC γ -1 activity could be involved in the shaping of spermatozoa.

INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares se generan a través de procesos lentos que se denominan desarrollo. El desarrollo de organismos multicelulares comienza a partir de una sola célula, el oocito fecundado o cigoto, el cual se divide mitóticamente para producir todas las células del cuerpo. El estudio del desarrollo se ha denominado tradicionalmente embriología, sin embargo esto solo se refiere al desarrollo del embrión, que es el organismo que se desarrolla después de la fertilización hasta el nacimiento, pero el desarrollo no para en el momento del nacimiento, o en el estado adulto ya que la mayoría de los organismos se siguen desarrollando y nunca paran de cambiar. Por lo tanto se ha denominado Biología del Desarrollo a la rama de la Biología que estudia la embriología y demás procesos del desarrollo.

La vida de un organismo comienza al fusionarse el material genético del espermatozoide y el huevo. A esta fusión se denomina fertilización y estimula que el cigoto se desarrolle. De manera inmediata después de la fertilización la división celular comienza, generando células más pequeñas que se denominan blastómeros. Posteriormente estos blastómeros sufren cambios dramáticos haciendo que cambie la posición relativa de unos con respecto a otros, a este arreglo se le denomina gastrulación. Como resultado del proceso de gastrulación se generan las capas germinales que son: el ectodermo, mesodermo y endodermo (Gilbert, 2003). Una vez establecidas las capas germinales, las células interaccionan unas con otras para producir tejidos y órganos, a este proceso se le denomina organogénesis. La separación de las

células somáticas de las células germinales es en muchos organismos el primer proceso de diferenciación que ocurre en el desarrollo. Las células germinales migran hacia las gónadas en desarrollo donde se diferencian a gametos. A este proceso se denomina gametogénesis que no se completa hasta que el organismo es maduro físicamente. En la madurez, los gametos pueden ser liberados y participar en el proceso de fertilización para la generación de un nuevo individuo (Gilbert, 2003).

Ratón como modelo en la biología del desarrollo.

El desarrollo cumple con dos funciones principalmente: generar diversidad celular y orden en cada generación; y asegurar la continuidad de vida entre una generación y la siguiente. Por lo tanto existen principalmente dos preguntas fundamentales en Biología del Desarrollo: ¿Cómo el huevo fertilizado da origen a un organismo adulto, y como este a su vez es capaz de producir otro organismo? Cada especie ha desarrollado diferentes estrategias para llevar esto a cabo, sin embargo se observan algunas generalidades en donde diferentes procesos como son la diferenciación, que se refiere a la generación de la diversidad celular; la morfogénesis, que se refiere a la generación de orden dentro de las diferentes estructuras y el organismo; el crecimiento y la reproducción se dan de una manera ordenada y coordinada en cada organismo. Así se han seleccionado diferentes modelos para el estudio de la biología del desarrollo cada uno con diferentes ventajas que los hacen buenos modelos para responder diferentes preguntas de esta disciplina. Dentro de estos modelos se encuentra la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, al nemátodo *Caenorhabditis elegans*; modelos de

vertebrados son *Xenopus laevis*, el pollo, el pez cebra *Danio rerio* y al ratón (Gilbert, 2003). El progreso del análisis genético en el desarrollo del mamíferos no ha sido tan rápido como en *Drosophila* o *Caenorhabditis* debido al tamaño del genoma, el tiempo en que tardan en desarrollarse cada generación y debido a que los embriones del mamífero también se desarrollan mas lentamente. De manera adicional los embriones de ratón son mas difíciles de manipular experimentalmente al compararlos con embriones de *Xenopus*, el de pollo o del pez cebra, ya que se encuentran adaptados a crecer dentro de la madre. A pesar de estas desventajas experimentales, el uso del ratón como modelo del desarrollo es el único que nos permite estudiar el control del crecimiento y la diferenciación del embrión de mamíferos, ya que nos permite extrapolar de una manera mas directa el desarrollo del ser humano utilizando un modelo mas sencillo. Es un modelo que permite evaluar el como mutaciones y químicos pueden producir malformaciones, defectos congénitos, canceres infantiles y el estudio para animales de interés en la agricultura (Hogan y col., 1994)

El estudio del desarrollo de los mamíferos comenzó en el inicio de los años 1900's, desde entonces el ratón se ha utilizado como modelo experimental por lo cual se ha acumulado mayor información genética que en ningún otro vertebrado, incluyendo al humano. La secuenciación de todo el genoma se ha realizado desde 1999, los resultados de análisis comparativos han mostrado que existe una alta conservación entre el genoma del humano y del ratón. También se han localizado diferentes marcadores en los 20 cromosomas a una distancia cada uno de 0.35cM, y estos datos incrementan

rápidamente debido a los esfuerzos hechos por programas encargados de hacer mutagénesis de inserción a pequeña escala y los trabajos hechos de mapeo. Análisis realizados en regiones del genoma del ratón han dotado de diferentes mutaciones deleciones y arreglos cromosómicos. Mas aún se han generado diferentes bibliotecas que permiten el análisis de regiones amplias de ADN. Además de todas las estrategias genéticas disponibles se han desarrollado diferentes técnicas de biología molecular que se han adaptado al estudio del desarrollo del ratón como son la hibidización *in situ* y RT-PCR que permiten evaluar los patrones de expresión de manera espacial y temporal en los diferentes estadios del desarrollo. Con la finalidad de estudiar el destino celular se han identificado diferentes marcadores específicos de distintos linajes celulares. Además la razón mas importante para estudiar el desarrollo genético en ratón es sin lugar a dudas, la capacidad de manipular su genoma de diversas maneras, como por ejemplo la facilidad de inyectar ADN en el pro-núcleo del cigoto, o mediante la infección con retro-virus; o la generación de mutaciones a genes específicos mediante la recombinación homóloga en células embrionarias pluripotenciales (Hogan y col., 1994). Mas aún al haberse desarrollado metodologías que incluyen al sistema de la recombinasa de Cre, se puede escindir o invertir segmentos de ADN flanqueados por las secuencias *loxP* o crear recombinación intramolecular entre diferentes regiones de ADN. Al combinarse estas metodologías, se pueden crear cualquier modificación deseada en el genoma del ratón, desde introducir mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas sitio específicas. Además, utilizando la actividad de la recombinasa de Cre como un modulador de la

activación o inactivación de genes de interés generando transgénicos o knock-out condicionales lo que permite estudiar el efecto de cualquier gen en el espacio y tiempo deseado (Nagy, 2000).

Origen y desarrollo de las células germinales primordiales.

Las células germinales primordiales (CGP) se observan por primera vez como una población distintiva en el ratón a los 7 días *post coitum* (d pc) y se localizan en el mesodermo extraembrionario (Ginsburg y col 1990). En este momento aproximadamente se pueden encontrar aproximadamente 50 células germinales que son positivas para la tinción con fosfatasa alcalina. Si esta área es removida, el embrión en desarrollo no tiene células germinales, mientras que la región removida es capaz de originar un gran número de células germinales primordiales. Los precursores de las células germinales en el mesodermo extraembrionario migran hacia el embrión, primero hacia el mesodermo del surco primitivo y después hacia el endodermo a través del alantoides. Después de agruparse en el alantoides en el día 7.5 las CGP migran al saco vitelino. En este momento ya se dividen en dos poblaciones que migrarán ya sea a la cresta genital derecha o a la izquierda. Las CGP se mueven de manera caudal del saco vitelino al recientemente formado epitelio del intestino (Ginsburg y col. 1990). Posteriormente, las CGP dejan el intestino y atraviesan el mesenterio dorsal para llegar a las crestas genitales. El movimiento de las CGP del intestino hacia las gónadas es activo, probablemente debido a la asociación de las CGP a diferentes componentes del substrato o a señales quimio-atrayentes lo que asegura que la mayoría de

las células lleguen a las crestas genitales. A los 11d pc las primeras células germinales colonizan las crestas genitales (Figura 1). Durante este proceso migratorio las células proliferan activamente de una población inicial de aproximadamente 50 células para formar una población de entre 2500 a 5000 células presentes en una gónada para el día 12 (De Felici, 2000).

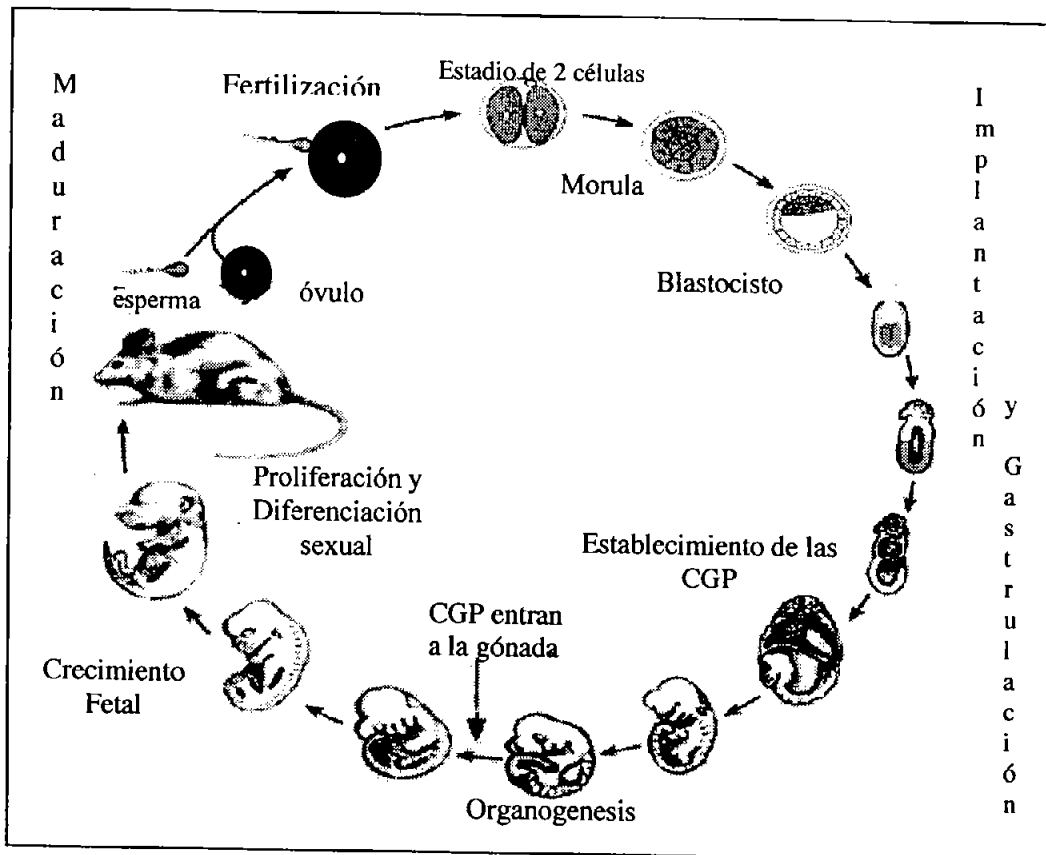


Figura 1 Desarrollo de las células germinales en ratón

Meiosis

Una vez en las gónadas las células germinales continúan dividiéndose mitóticamente, produciendo millones de gametos. Posteriormente las CGP reducen su número de cromosomas mediante la meiosis. Después de la última división mitótica, un periodo de síntesis de ADN ocurre, por lo cual las células que comienzan la meiosis tienen el doble de la cantidad normal de ADN. En

este estadio, cada cromosoma está constituido por dos cromátidas hermanas unidas a un centrómero. La meiosis consta de dos divisiones celulares, en la primera división, los cromosomas homólogos se unen y posteriormente se separan en células diferentes. Por lo cual en la primera división meiótica se separan cromosomas homólogos en dos células hijas cada una con una copia de cada cromosoma. Pero cada cromosoma ya se encuentra duplicado. En la segunda división meiótica se separan las dos cromátidas hermanas, por lo que al final de la meiosis las cuatro células haploides tienen una copia de cada cromosoma (Gilbert2003).

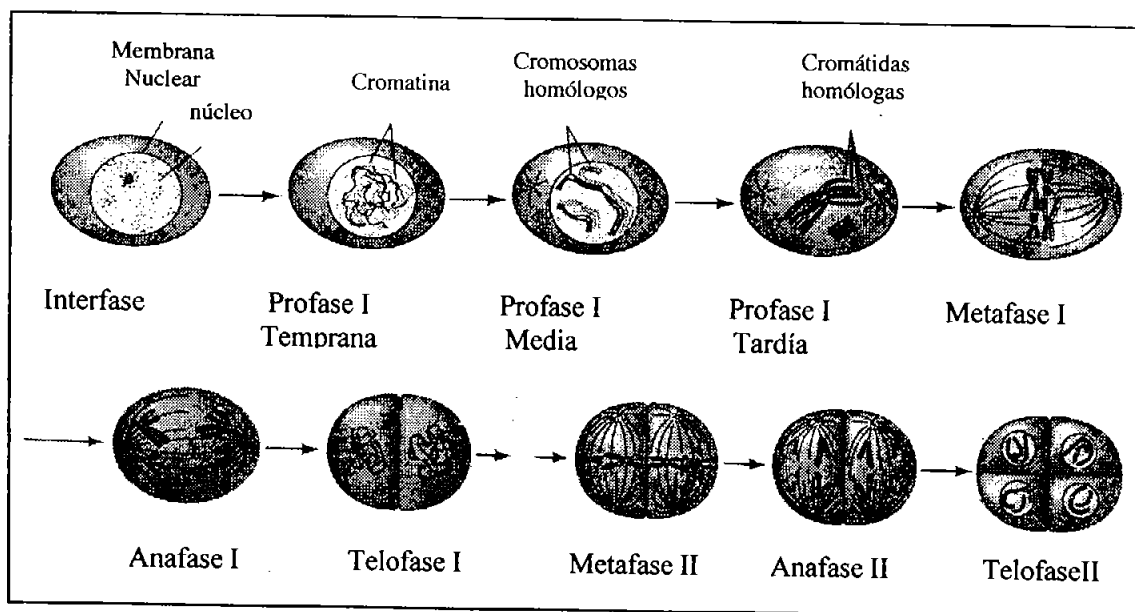


Figura 2 Fases de la meiosis

La primera división meiótica comienza con una profase alargada que se subdivide en cuatro partes. Durante el estadio de leptoteno las cromátidas se alargan. En la etapa de cigoteno los cromosomas homólogos se aparean durante un proceso denominado sinapsis, característico de la meiosis. Durante

el siguiente estadio de la profase meiotica las cromatidas se engrosan y acortan por lo cual este periodo se le denomina paquiteno. Las cromátidas individuales se pueden distinguir en este estadio fácilmente bajo el microscopio y el entrecruzamiento entre las cromatidas puede ocurrir en este momento representando el intercambio de material genético. Este entrecruzamiento continua durante la siguiente fase que se denomina diploteno, en este momento el complejo sinaptonémico se disocia y los cromosomas homólogos se separan. Sin embargo se mantienen unidos en los sitios donde esta ocurriendo el entrecruzamiento que se conoce como quiasmata. El estadio de diploteno se caracteriza por que la transcripción se encuentra muy activa. En el siguiente estadio o diacinesis los centrómeros se alejan entre si y los cromosomas se mantienen unidos únicamente en las puntas de las cromátidas (Figura 3). En este último estadio la profase de la meiosis concluye con el rompimiento de la membrana nuclear y la migración de los cromosomas a la placa de la metafase (Gilbert2003).

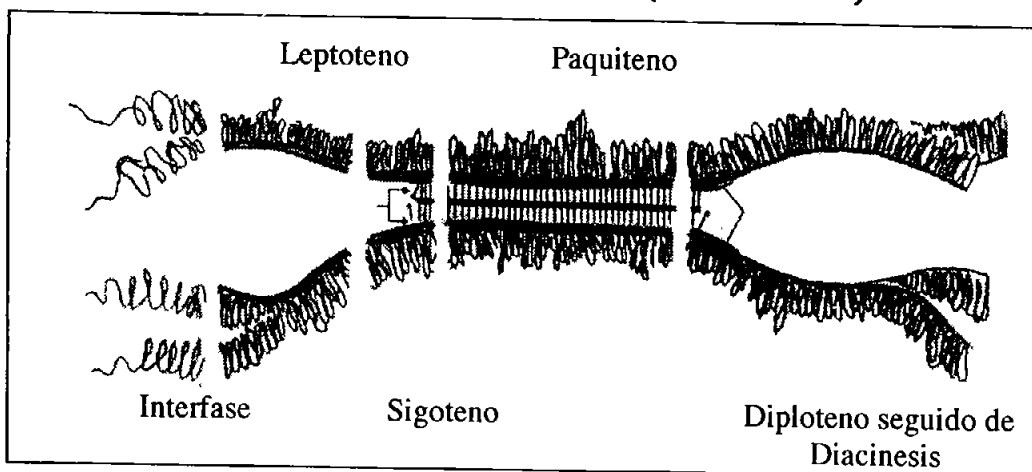


Figura 3 Fases de la profase en la division meiotica I

Durante la anafase-I, los cromosomas homólogos, se separan uno del otro, este estadio da origen a la telofase-I, generándose las dos células

hermanas cada una con una parte del cromosoma homólogo. Después de la intercinesis, una segunda división meiótica ocurre. Durante esta división, el centrómero de cada cromosoma se divide durante la anafase -II dando como resultado cuatro células haploides.

Ovogénesis

Al llegar las células germinales al ovario en desarrollo, dejan de proliferar, pierden su capacidad migratoria y entran a la meiosis, deteniéndose en la profase de la primera división meiótica. Cinco días después del nacimiento, los oocitos se encuentran detenidos en la profase de la primera división meiótica y cada oocito se encuentra rodeado de células foliculares formando un folículo. Seis semanas después del nacimiento, las hembras alcanzan la madurez sexual y en cada uno de los ovarios contienen aproximadamente 1×10^4 folículos en diferente estado de maduración. En un ciclo normal, solo algunos folículos responden a un aumento en las concentraciones de la hormona folículo estimulante. Así, las células foliculares estimuladas rompen contacto con el oocito y los folículos estimulados se mueven hacia la periferia del ovario. La ovulación ocurre en respuesta a los niveles de la hormona luteinizante (HL), causando que el núcleo del oocito madure perdiendo su membrana y los cromosomas se ensamblen en el huso mitótico moviéndose hacia la periferia de la célula, donde la primera división meiótica ocurre. Un grupo de cromosomas homólogos rodeados de citoplasma es expulsado como el primer cuerpo polar mientras que el otro grupo de cromosomas se mantiene en la segunda

metafase. Es en este estado de detención meiótica como se liberan los ovulos y la meiosis no se resume hasta que el ovulo es fecundado (Hogan, 1994).

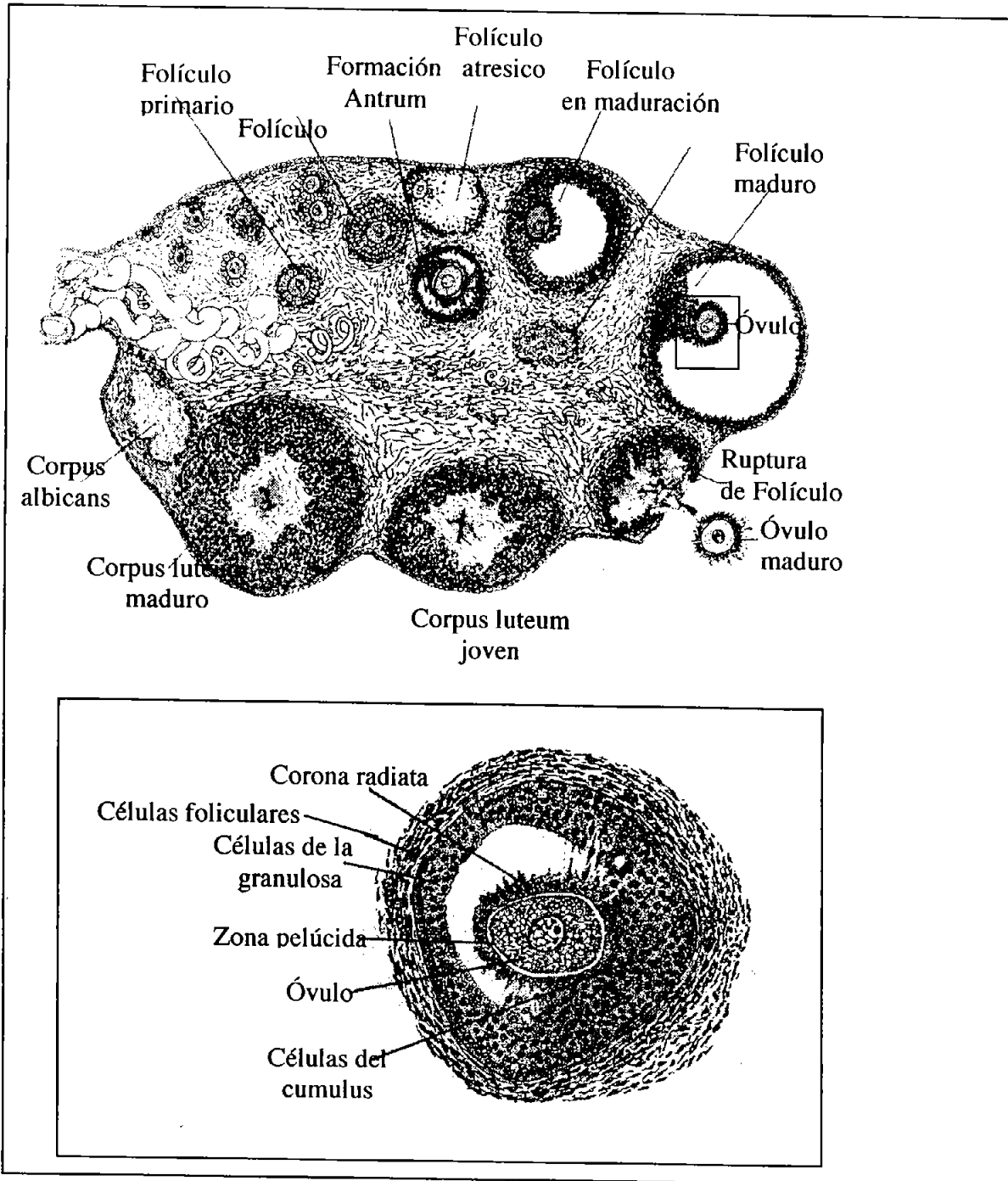


Figura 4 Ovogénesis

Espermatogénesis

Por otra parte cuando las células germinales llegan al testículo en desarrollo dejan de migrar incorporándose a los cordones sexuales, pero continúan proliferando hasta los 14 d pc deteniéndose en mitosis. Posteriormente, entre los 3 y 7 días después del nacimiento, los cordones sexuales se diferencian formando a los túbulos seminíferos y el epitelio de los cordones sexuales diferencia para dar origen a las células de Sertoli. Las células espermatogénicas se unen a las células de Sertoli mediante N-cadherinas y moléculas de galactosiltransferasas en las células germinales que se unen a su receptor en las células de Sertoli. Las células de Sertoli nutren y protegen a las células espermatogénicas durante el proceso de diferenciación de las espermatogonias hasta la formación del espermatozoide. Las CGP se dividen para dar origen a las espermatogonias A1, estas células son mas pequeñas que las CGP y se caracterizan por tener un núcleo ovoide que contiene la cromatina asociada a la membrana nuclear. Las espermatogonias A1 se localizan en la membrana basal que rodea a los cordones sexuales. En el animal maduro sexualmente cada espermatogonia A1 es capaz de dividirse para regenerarse y producir un nuevo tipo celular denominado espermatogonia A2. A su vez las espermatogonias A2 son precursoras de las espermatogonias A3 que a su vez son precursoras de las espermatogonias A4. Las espermatogonias A4 tienen diferentes destinos que son: formar nuevas espermatogonias A4; morir por el proceso de apoptosis; o diferenciarse para producir las primeras espermatogonias intermedias comprometidas a diferenciarse en espermatozoides. Las espermatogonias

intermedias se dividen una vez dando origen a las espermatogonias B. Las espermatogonias B son las últimas células capaces de dividirse mitóticamente y se encuentran localizadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos. Son una población de transición ya que pueden dividirse o diferenciarse a espermatoцитos primarios, comenzando la meiosis en este estadio. Durante la división mitótica la citocinesis no es completa manteniendo a las espermatogonias unidas por puentes citoplásmicos formando un sinsicio. Las siguientes divisiones producen clones de células que maduran de manera sincrónica. Los productos de la primera meiosis se denominan espermatoцитos secundarios y en la segunda división meiótica se producen las espermátidas unidas a su vez por puentes citoplásmicos. Las espermátidas conectadas de esta manera a pesar de ser haploides tienen la característica de ser funcionalmente diploides. Durante las divisiones a partir de las espermatogonias A1 hasta las espermátidas, las células se mueven alejándose de la membrana basal de los túbulos seminíferos y acercándose al lumen, por lo que cada tipo celular se puede localizar en una capa particular del túbulo. Así las espermátidas se encuentran localizadas en el borde del lumen donde pierden las conexiones citoplásmicas al diferenciarse a espermatozoides (Krestser 1994).

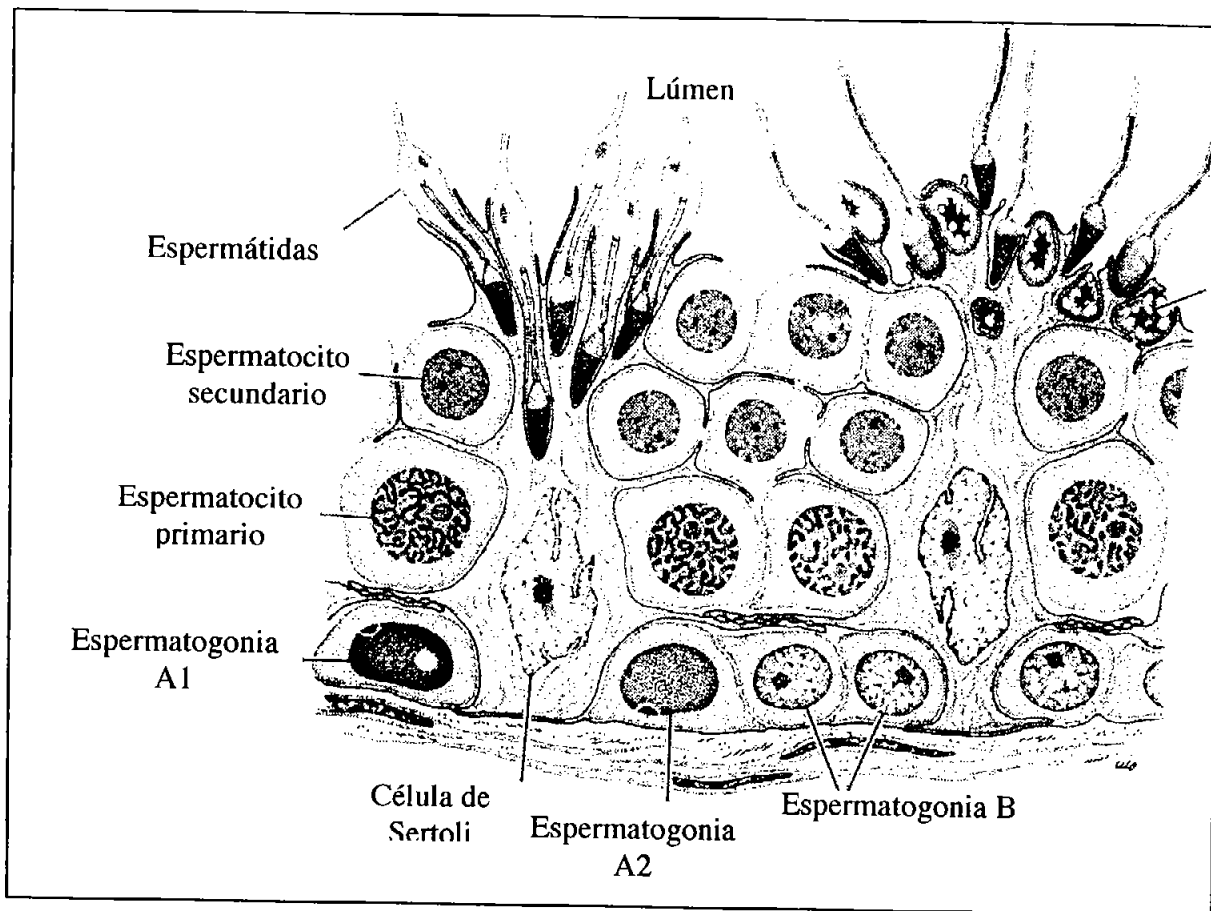


Figura 5 Espermatogénesis

Durante el desarrollo del testículo del ratón hay una diferencia en la proporción y constitución de los tipos celulares. Así a los 8 días después del nacimiento en el ratón, los túbulos se encuentran constituidos de un 73% de células de Sertoli y un 27% de espermatogonias A y B; posteriormente a los 10 días después del nacimiento comienza la meiosis y se observan los primeros espermatozoides en preleptoteno y leptoteno; para los 12 días se pueden observar espermatozoides en cigoteno y a los 14 días espermatozoides en paquiteno, a los 18 días se encuentran los primeros espermatozoides secundarios y comienza la espermiogénesis, mientras que para los 84 días

después del nacimiento la mayor proporción de células espermatogénicas (71%) son espermatidas en desarrollo (Bellvé y col., 1993).

Tipo Celular	Días después del nacimiento							
	8	10	12	14	16	18	20	84
Espermatogonia A	17	7	7	6	9	3	4	1
Espermatogonia B	10	11	8	6	8	7	6	3
Espermatocito preleptoteno	—	15	11	9	5	10	7	2
Espermatocito leptoteno	—	15	12	13	5	5	9	2
Espermatocito cigototeno	—	—	23	14	7	8	8	2
Espermatocito paquiteno	—	—	—	15	27	36	33	15
Espermatocito secundario	—	—	—	—	—	1	1	1
Espermatidas (1-8)	—	—	—	—	—	1	4	31
Espermatidas (12-16)	—	—	—	—	—	—	—	40
Células de Sertoli	73	52	39	37	39	29	28	3

Tabla 1 Porcentaje de células espermatogénicas en el testículo durante el desarrollo del ratón

Las espermatidas haploides son células redondas sin flagelo que no se parecen a un espermatozoide maduro. El siguiente proceso de diferenciación de las espermatidas a espermatozoide se denomina espermiogénesis. Este es un proceso continuo desde la formación de las espermatidas hasta la liberación del espermatozoide; sin embargo puede dividirse por las características morfológicas de las espermatidas en diferentes fases, de una manera general se dividen en espermatidas redondas y elongadas, refiriéndose a la apariencia general de las espermatidas; sin embargo Clermont y col (1993) hicieron una clasificación más detallada de la espermiogénesis en mamíferos en donde la espermiogénesis se divide en cuatro fases principales que son: la de Golgi, la de capuchón, del acrosoma y

la fase de maduración, cada una se subdivide en base a las características del núcleo y el desarrollo del sistema acrosómico. Según la morfología de las espermátidas se han definido 16 estadios en el ratón (Figura 6) Durante los primeros cuatro pasos de la espermiogénesis o fase de Golgi, a partir del aparato de Golgi se originan los gránulos pro-acrosómicos que se fusionan posteriormente para dar origen a un granulo acrosómico que se asocia con el núcleo. Durante los estadios 5 a 7 que corresponden a la fase de capucha o capuchón el aparato de Golgi contribuye a la formación del acrosoma y a al capuchón de la cabeza del espermatozoide, en estos estadios también es posible de observar a los centriolos, el axonema en desarrollo, el cuerpo cromatoide y a las mitocondrias. De los estadios 8 a 14 se lleva a cabo la fase acrosómica, las espermátidas sse polarizan, el núcleo se alarga (espermátidas elongantes) tomando la carcterística en forma de hoz y el citoplasma se retrae hacia el otro extremo donde formando una gota o lóbulo alrededor del flagelo que se esta formando en este momento. El aparato de Golgi se separa del sistema acrosómico, el cual sufre cambios dramáticos en la superficie del núcleo. El *manchette* esta presente en estos estadios. Durante los últimos estadios (15 y 16) o fase de maduración el *manchette* desaparece y las mitocondrias migran a lo largo del flagelo. El núcleo cubierto por sistema acrosómico completa los cambios morfológicos . El sistema acrosómico se condensa y se localiza en la región lateral del núcleo. El resto del citoplasma se mueve de manera apical y se separa de las espermátidas en el estadio 16 dando origen al cuerpo residual (Figura 6).

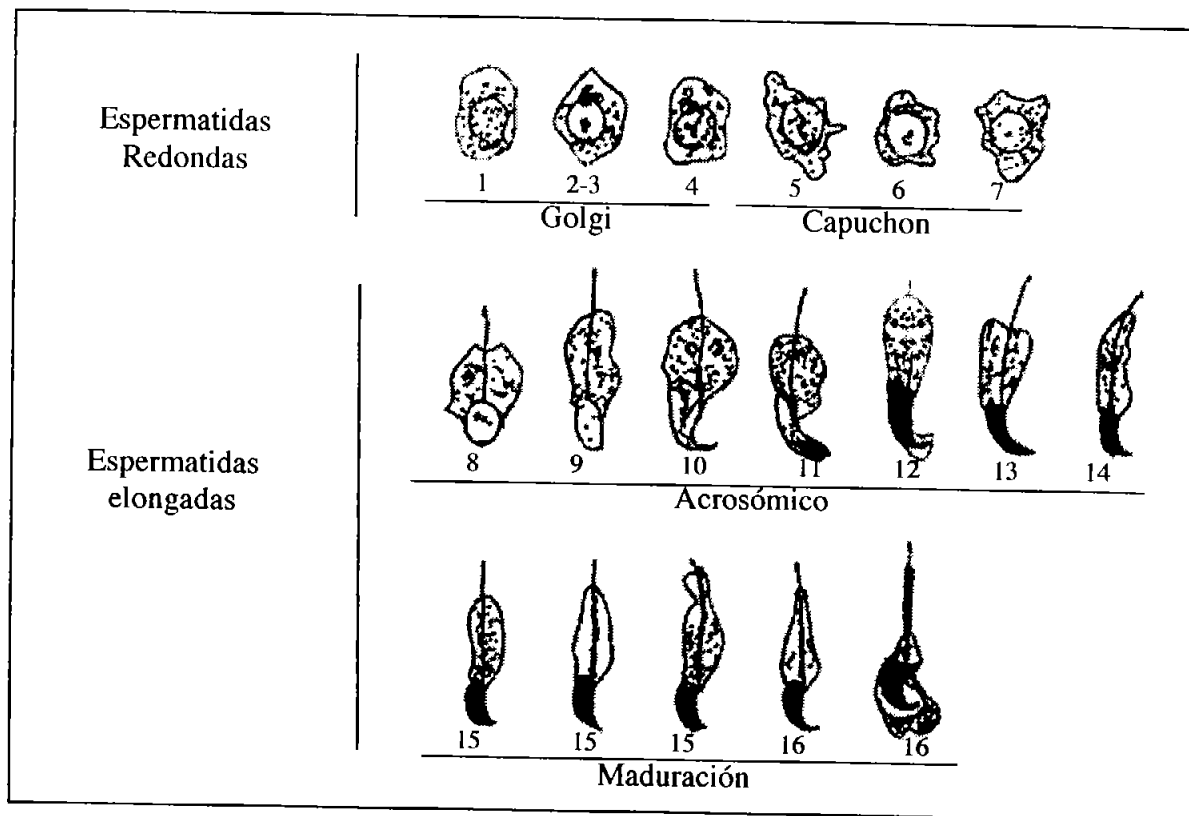


Figura 6 Esquema en donde se muestran los diferentes estadios de la espermiogénesis.

Las diferentes células espermatogénicas en el túbulo seminífero se encuentran altamente organizadas. Esta característica se hace evidente al teñir el acrosoma y el núcleo en cortes finos de testículos. Así las células en diferentes estadios de desarrollo forman colecciones identificables denominadas como asociaciones o estadios. Estos estadios a su vez forman un ciclo espermatogénico que es específico de cada especie, en el ratón se identifican 12 estadios de asociaciones celulares (Russell y col 1990).

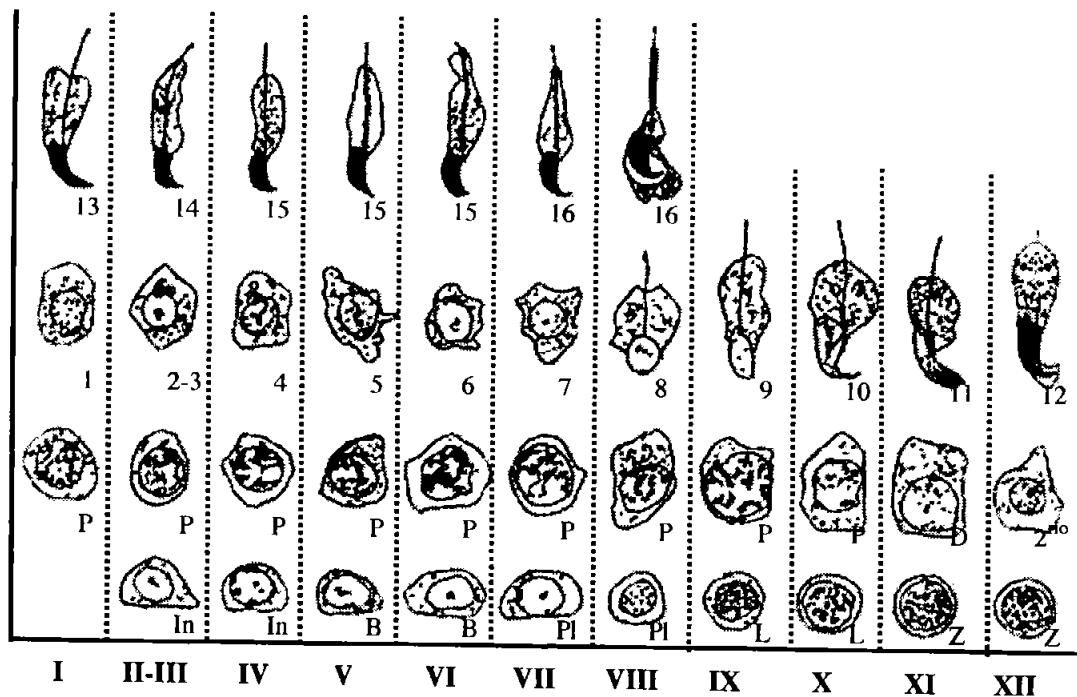


Figura 7 Diagrama del ciclo espermatogénico del ratón.

Estructura de los gametos

-El óvulo

El material necesario para que comience el desarrollo y crecimiento debe encontrarse almacenado en el huevo maduro (óvulo). El huevo en desarrollo u oocito sintetiza o absorbe proteínas que le servirán de reserva al embrión además de ARN y factores morfogenéticos.

Rodeando al citoplasma se encuentra la membrana plasmática que regula el flujo de iones durante el proceso de fertilización y es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del espermatozoide. Alrededor de la membrana plasmática se encuentra la zona pelúcida, esencial para el reconocimiento del espermatozoide. El óvulo se encuentra rodeado de

las células del cumulus que representan a las células foliculares que estuvieron nutriendo al oocito . El espermatozoide debe atravesar estas capas para poder fertilizar al huevo. Debajo de la membrana plasmática se encuentra al córtex o corteza, cuya característica es que el citoplasma en esta región es mas rígido ya que contiene altas concentraciones de actina. Durante la fertilización estas moléculas de actina se polimerizan formando microfilamentos necesarios para las primeras divisiones celulares. También en la corteza se encuentran los gránulos corticales, organelos derivados del aparato de Golgi, que contienen enzimas proteolíticas, mucopolisacáridos, glicoproteínas y hialina. Las enzimas y los mucopolisacáridos tienen la función de prevenir la entrada de otro espermatozoide, mientras que la hialina y las glicoproteínas rodean después de la fertilización al cigoto dándole soporte para las primeras divisiones de los blastómeros.

-El espermatozoide.

El espermatozoide está compuesto de cabeza y cola. La cabeza tiene cuatro componentes que son: un núcleo haploide condensado, la teca perinuclear, que está compuesta a su vez de dos regiones, la región subacrosomal o perforatium y la lámina densa postacrosomal, el tercer componente es el sistema acrosómico que consta del acrosoma propiamente y la cubierta de la cabeza y finalmente la membrana plasmática que se adhiere a la cabeza del espermatozoide con una pequeña porción de citoplasma entre la membrana nuclear y la membrana del acrosoma (Figura 8). La cabeza de los espermatozoides varía en apariencia dependiendo de la especie, en los ratones tiene una forma alargada, curva

y puntiaguda. La cola del espermatozoide esta constituida de cuatro regiones distintivas, la pieza de conexión o cuello, la parte media , la parte principal y la parte final (Figura 8).La parte de conexión es un segmento corto compuesto de material electrodenso y en algunas ocasiones contiene el remanente de los centriolos, esta compuesto de un *capitulum* y el collar estriado . El *capitulum* continúa de manera distal con el collar estriado que a su vez continua con las fibras electrodensas en la unión con la pieza media. La pieza media incluye al axonema compuesto de microtúbulos en un arreglo de nueve dobletes rodeando dos microtúbulos centrales sencillos; nueve grupos de fibras electrodensas con forma de gota orientadas con los nueve dobletes de microtúbulos y las mitocondrias alargadas con una capa delgada de citoplasma delimitada por la membrana plasmática. La pieza principal incluye al axonema y siete fibras electrodensas orientadas hacia los microtúbulos 1,2,3,5,6,7 las fibras electrodensas correspondientes a los microtúbulos 3 y 9 son sustituidas por la lámina fibrosa . La lámina fibrosa esta constituida por columnas longitudinales y transversales. En la superficie de la lámina fibrosa hay una capa delgada de citoplasma delimitada por la membrana plasmática. La pieza final esta compuesta de los elementos del axonema que se encuentran desorganizados; una pequeña porción de citoplasma y la membrana plasmática (Eddy y O'Brien 1994).

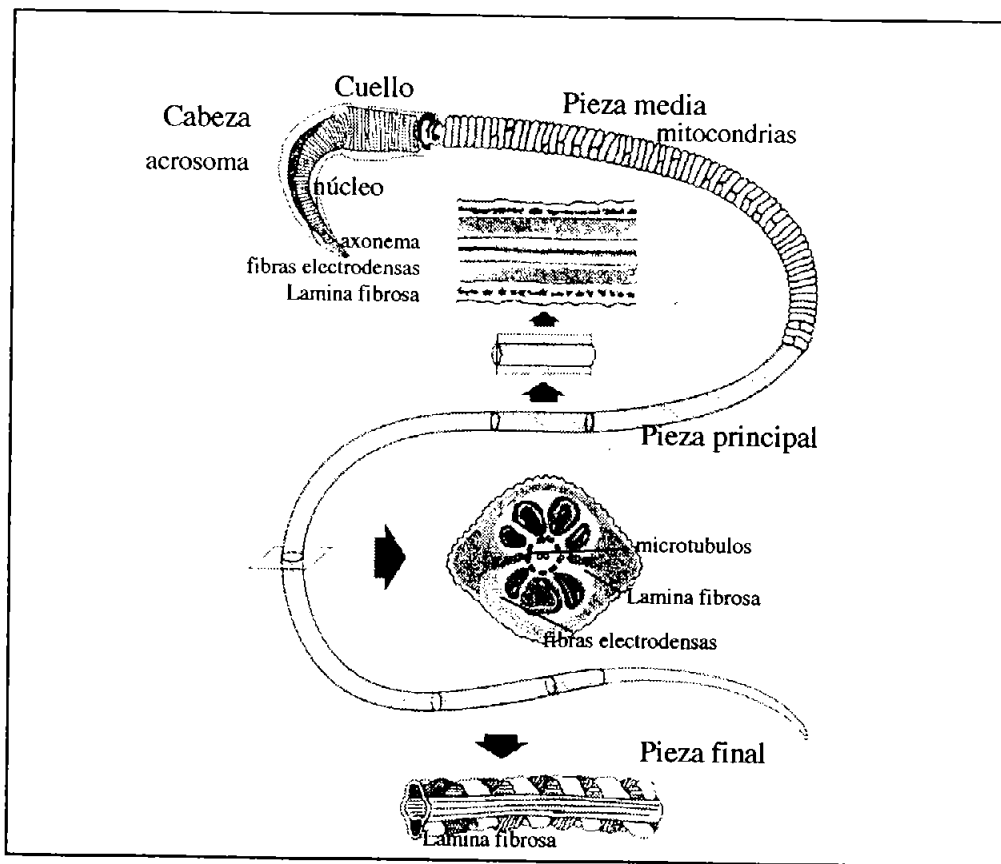


Figura 8 Características generales del espermatozoide de ratón.

La diferenciación a partir de las espermatidas hasta la formación del espermatozoide involucra diferentes procesos como son la condensación del núcleo, la formación del acrosoma y del flagelo. La primera evidencia morfológica de la condensación de la cromatina se observa en los estadios 4-8 con pequeños grupos electrodensos de cromatina. Posteriormente, en los estadios 9 y 10 se forman filamentos de cromatina en el estadio que de manera progresiva se engrosan y agregan para formar masas granulares. La condensación de la cromatina comienza en la punta apical del núcleo elongado, debajo del área ocupada por el sistema acrosómico y progresa de manera caudal. Los grupos de cromatina granulada se unen de manera gradual hasta que en el estadio 11 y para los estadios 12 -14, la cromatina forma una masa sólida con pequeñas cavidades que posteriormente desaparecen en los estadio 15 tardío y 16 , o hasta el espermatozoide

(Clermont y col., 1993). La condensación de la cromatina se encuentra acompañada por la modificación de núcleo-proteínas. Primero se cambian las histonas específicas de testículo por proteínas específicas de las espermatidas. Este cambio ocurre de manera gradual durante el periodo de elongación y la condensación de la cromatina. Posteriormente involucra que se reemplacen estas proteínas por proteínas básicas de los espermatozoides, o protaminas (Meistrich y col., 2003).

En la cabeza del espermatozoide se encuentra además del núcleo, la teca perinuclear la cual esta conformada por una capa de material citoplásmico que se encuentra presente alrededor del núcleo. Esta capa tiene dos regiones distintas, la región subacrosomal y la hoja postacrosomal (Figura 9). La región subacrosomal adquiere la apariencia puntiaguda que se acopla a la extremidad del núcleo. La región postacrosomal comienza cuando el sistema acrosómico termina y cubre la región caudal del núcleo. La formación de las regiones subacrosomal y postacrosomal se originan en diferentes estadios durante la espermiogénesis. La región postacrosomal aparece primero y se ensambla como dos láminas una de ellas a lo largo de la membrana plasmática, la capa externa mientras que la capa interna se deposita a largo de la membrana nuclear al principio del estadio 11 hasta el 14 los estadios. La región subacrosomal se condensa en el estadio 16 a partir de material de baja densidad que se acumula en el espacio subacrosomal en espermatidas (Eddy y O'Brien 1994).

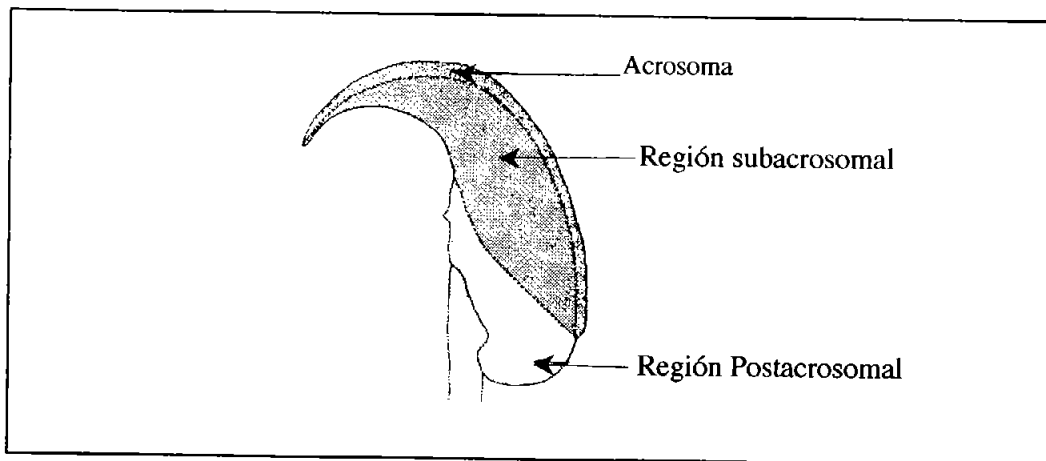


Figura 9 Dominios en la cabeza del espermatozoide.

Durante la formación del acrosoma en la espermiogénesis el aparato de Golgi tiene varios cambios. En los primeros estadios de la espermiogénesis los componentes saculares del Golgi son pequeños y la región intersecular predominan formando los gránulos proacrosómicos. En estadios posteriores el Golgi muestra una gran cantidad de regiones saculares y en menor cantidad regiones intrasaculares, dando origen al sistema acrosómico. El sistema acrosómico es un organelo apilado de manera cercana a la superficie del núcleo de las espermátidas y del espermatozoide. Tiene diferentes regiones estructurales, el acrosoma y capuchón de la cabeza. El contenido del sistema acrosómico es rico en glicoproteínas y está compuesto de enzimas hidrolíticas incluyendo fosfatasa ácida. Durante la espermiogénesis se encuentran tres periodos distintos, el primero es la formación de gránulos proacrosómicos que se encuentran unidos a la membrana nuclear y muestran un centro electrodenso y una corteza más ligera. Posteriormente los gránulos proacrosómicos se fusionan para dar origen a un solo gránulo alargado, que establece una relación cercana con la membrana nuclear. Finalmente el

gránulo acrosómico se alarga al recibir glicoproteínas del aparato de Golgi mediante la fragmentación del trans Golgi a vesículas y túbulos acompañados por la fusión con la membrana acrosomal externa, dando como resultado que el sistema acrosómico se alargue y achate sobre la superficie del núcleo. Durante la formación del acrosoma los centriolos migran hacia el núcleo jalando la membrana plasmática hacia ellos, al mismo tiempo, a partir de uno de los dos centriolos comienza con la formación del axonema. El axonema se larga mediante la agregación de a y b tubulina en las regiones distales de los microtúbulos. El crecimiento total del axonema se completa cuando se termina la formación del acrosoma. Otra estructura que caracteriza a las espermatidas durante la formación del acrosoma es el *manchette* que se observa durante la espermiogenesis en las espermatidas 8 hasta las espermatidas 14. Esta estructura se extiende justamente debajo del sistema acrosómico, tiene una estructura achatada, truncada y cónica, insertándose en una estructura en forma de anillo que rodea al núcleo y se encuentra asociada con la membrana plasmática. El *manchette* esta compuesto de varios microtúbulos que corren de manera paralela unidos por puentes filamentosos y tienen la función de servir como corsé promoviendo que se elimine el exceso de citoplasma. Posteriormente los microtúbulos se disocian debido a la depolimerización de la tubulina y no se observa ningún remanente del *manchette* en las espermatidas tardías o en el espermatozoide (Clermont y col., 1993).

Mutaciones *White spotting* y *Steel*

El estudio de algunas mutantes de ratón ha permitido identificar genes involucrados en el desarrollo de la línea germinal. Dentro de estas mutantes se

encuentran *White Spotting (W)* y *Steel (Sl)* (Besmer y col., 1993; McLaren A. 1992), que codifican para *c-kit* y *steel* respectivamente. A pesar de que ambos genes se expresan en una gran variedad de tipos celulares en el animal adulto, mutaciones nulas en los genes *W* y *Sl*, solamente causan efectos en la hematopoesis, melanogénesis y en las células germinales primordiales (CGP) (Besmer y col. 1993), por lo que es posible que estas mutantes reflejen solamente algunas de las múltiples funciones de dichos genes. Por otra parte alelos débiles de mutaciones en *W* o *Sl* muestran defectos parciales en los diferentes blancos celulares y permiten observar funciones posteriores en el desarrollo; tal es el caso de las mutantes Sl^{7H} donde se observa que la espermatogénesis se encuentra alterada mientras que la oogenesis es normal (Peters y col., 1987), a diferencia de mutaciones como son Sl^{panda} , Sl^t y Sl^{con} en donde la fertilidad en hembras esta afectada mientras que los machos son completamente fértiles (Huang, y col., 1993; Kuroda y col., 1988; Beechey y Searle, 1983).

El receptor c-Kit se expresa en las CGP durante el desarrollo del ratón desde los 7.5dpc durante la fase de la migración y proliferación hasta los 13 d pc. En hembras, c-Kit se vuelve a expresar 5 días después del nacimiento y se acumula en los oocitos durante el desarrollo tardío del folículo. En los machos, se expresa desde los 7 días del nacimiento en las espermatogonias A1 y posteriormente se expresa en el animal adulto en las espermatogonias A, espermatogonias B y en espermatoцитos primarios. Existe una versión truncada de Kit (tr-kit) que corresponde a la porción de fosfotransferasa en el domino catalítico del carboxilo terminal, la cual se acumula en la espermátidas y en el espermatozoide maduro (Sette y col., 1997). Durante el desarrollo de la línea germinal, *steel* se expresa en el

intestino, y en las células somáticas de la gónada. En el animal adulto, se expresa en las células foliculares de hembras mientras que en los machos, se expresa en las células de Sertoli, que se encuentran rodeando a las células espermatogénicas en los túbulos seminíferos (Besmer 1991).

Estructura y vías de traducción de c-Kit

c-kit codifica para un receptor transmembranal de aproximadamente 145-kDa que pertenece a la subfamilia del receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Tiene tres regiones: una región extracelular, que tiene cinco dominios tipo inmunoglobulina (Figura 10). Los primeros tres dominios son necesarios para el reconocimiento del ligando, mientras que el cuarto se requiere para la dimerización del receptor; una región transmembranal y una región citoplásmica donde se encuentra el dominio de cinasa, el dominio de cinasa a su vez se divide en dos subdominios, un subdominio de unión a ATP y un segundo subdominio de fosfotransferasa (Linnekin 1999).

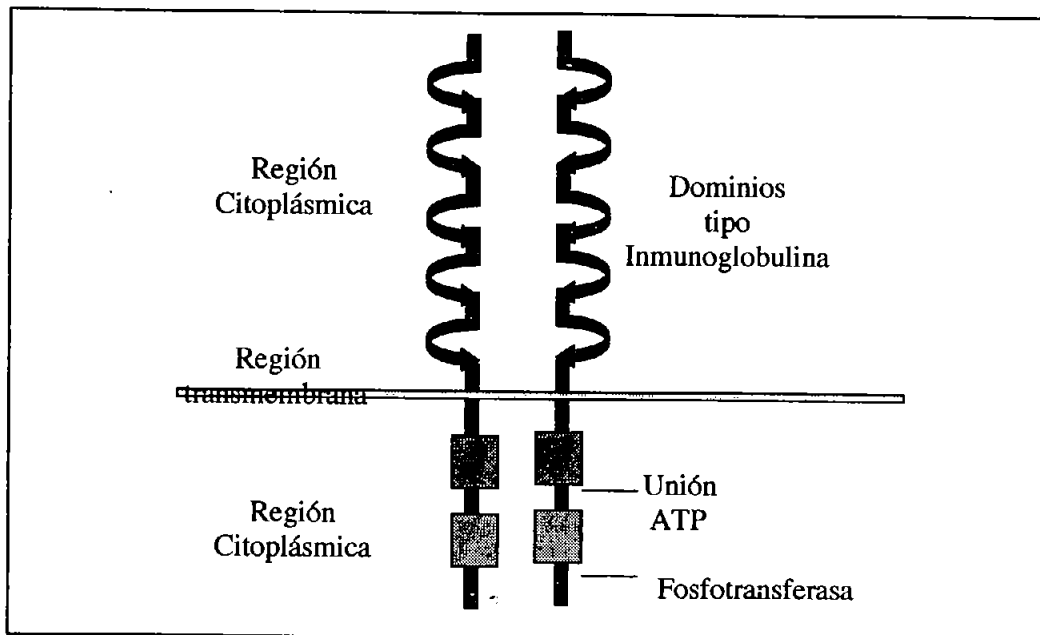


Figura 10 Diagrama de la estructura de c-Kit

El ligando de c-Kit, Steel, se une a c-Kit y promueve que este forme un dímero y se autofosforile. Una vez fosforilado c-Kit es capaz de activar diferentes vías de señalización, dentro de las cuales se encuentra las vías de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), la de cinasas relacionadas con SRC como son Lyn, Fyn y c-Src, las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de la familia de cinasas de janus/ traductores y activadores de la transcripción (JAK/STAT), que a su vez promueven una gran variedad de respuestas celulares como son, la proliferación, la reorganización del citoesqueleto, la inhibición de la apoptosis, el control del ciclo celular, la adhesión y la quimiotaxis y la transcripción de genes. También se ha demostrado que c-Kit es capaz de interactuar con otras proteínas como son la fosfolipasa C gamma 1 (PLC γ -1) y las proteínas activadoras de GTPasas tipo Ras, sin embargo la activación de dichas vías de transducción no ha sido demostrada. La regulación negativa de la actividad y función de c-Kit están mediadas por las proteína cinasa C (PKC), la tirosin-fosfatasa que contiene SH-2 (SHP-1) y la inositol fosfatasa que contiene SH-2 (SHIP) (Taylor y Metcalfe 2000).

A pesar de que se han realizado muchos estudios *in vitro* que demuestran la capacidad de c-Kit para activar una gran variedad de vías de traducción, la participación de cada una de las vías en el control del desarrollo de diferentes tipos celulares *in vivo* ha sido poco estudiado. Un ejemplo de esto es el estudio de la inactivación de la vía de PI3K mediada por c-Kit en ratones transgénicos donde se demostró que la actividad de PI3K es esencial para la espermatogénesis y la oogenesis mientras que la hematopoesis, melanogénesis y desarrollo del las CGP se encuentra normal (Kissel y col.,2000). Lo anterior indica que la gametogenesis es sensible a las

carboxilo terminal, y es catalíticamente inactivo ya que carece del dominio de unión a ATP (Rossi y col., 2000). Al micro-inyectar tr-kit recombinante en oocitos detenidos en la metafase tr-kit es capaz de inducir que culmine la meiosis, como ocurre durante el proceso de fertilización, debido a la formación de un complejo multimolecular conformado por la cinasa Fyn, Sam68 y PLC γ -1 (Partonetto y col.,2003) modulando posiblemente el metabolismo del ARN (Figura 12).

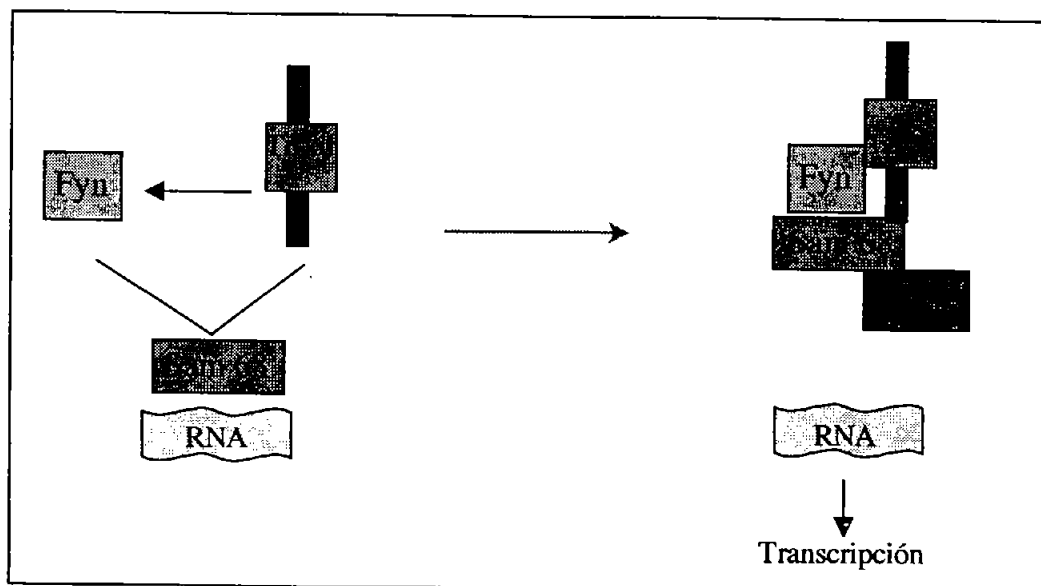


Figura 12 Modelo hipotético del complejo multimolecular inducido por tr-kit. La activación de Fyn promueve la interacción con Sam68 en el compartimento perinuclear Sam 68 a su vez interactúa con PLC γ -1. Liberándose el ARN siendo accesible a los ribosomas.

ANTECEDENTES

Nosotros teníamos interés en estudiar la función de c-kit en el desarrollo de la línea germinal de ratón. Para lograr este fin se utilizó a la mutante $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ y al sistema de *Cre-loxP*, para dirigir la expresión de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ únicamente a la línea germinal.

$\text{Kit}^{\text{D814Y}}$

Además de las mutaciones de pérdida de función mencionadas anteriormente, se han descrito varias mutaciones en el dominio de fosfotransferasa de c-Kit que se encuentran constitutivamente activas como son; la sustitución de aspártico 816 por valina (D816V) o histidina (D816H) que causan mastocitosis y seminomas respectivamente; la sustitución de valina por glicina en el aminoácido 560 (V560G) y aspártico por valina en el aminoácido 816 (D816V) se han identificado en la línea celular de mastocitos de pacientes con leucemia. Se han descrito mutaciones equivalentes en ratón como son las de valina por glicina en el aminoácido 559 (V559G) y aspártico 814 por tirosina (D814Y) que causan la activación y fosforilación constitutiva en ausencia de Steel al introducirse en células HEK 293T (Taylor y Metcalfe 2000). La expresión de la mutante $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ en la línea de mastocitos IC2 causa la fosforilación constitutiva de varias proteínas y la degradación mediante la vía de proteólisis dependiente de ubiquitinación de la fosfatasa SHP-1, regulador negativo de la señalización de c-Kit. Esta mutación también altera la selectividad a los diferentes sustratos *in vitro* (Piao y col. 1996). Se ha demostrado que $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ es capaz de inducir proliferación diferenciación aberrante y transformación neoplásica *in vitro* (Tsujiyama y col 1994;

Kitayama y col, 1995; Piao y Bernstein 1996). Sin embargo la recapitulación *in vivo* no se había intentado anteriormente.

El sistema Cre/LoxP

Con la finalidad de obtener una expresión continua de Kit^{D814Y} específicamente en la línea germinal se utilizó el sistema de Cre/LoxP. Cre es una recombinasa del bacteriofago P1 que pertenece a la familia de integrasas que recombinan en sitios específicos. Cre es una proteína de 38 kDa que cataliza la recombinación entre dos secuencias específicas del DNA de 34 pares de bases, los sitios *loxP* (Hamilton y Abemski, 1984). Los sitios *loxP* están constituidos por un espaciador en el centro de 8 pb flanqueados por dos secuencias palindrómicas de 13 pb. La secuencia del centro define la orientación de los sitios *loxP*. El mecanismo de recombinación se lleva a cabo cuando una molécula de recombinasa se une a la mitad de la secuencia palindrómica del sitio *loxP*, posteriormente las moléculas de la recombinasa forman un tetrámero, uniendo a los dos sitios *loxP* (Voziyanov y col 1999). La recombinación entonces ocurre entre los sitios *loxP* (Figura 13). El resultado de la escisión mediada por Cre depende de la localización y orientación de los sitios *loxP*, estos pueden estar localizados en *cis* o *trans*. El resultado entonces de la recombinación mediada por Cre puede ser la escisión, la inversión de una secuencia en el caso de secuencias que se encuentren en *cis* mientras que puede ocurrir la inserción de una o varias moléculas de ADN (cromosomas) en el caso de sitios *loxP* en *trans*. La recombinación *in vitro* entre los sitios *loxP* en *cis* ocurre sin ninguna selección si se expresa a Cre bajo un promotor fuerte (Nagy y col 1998) La recombinación *in vivo* también es eficiente al sobreexpresar Cre.

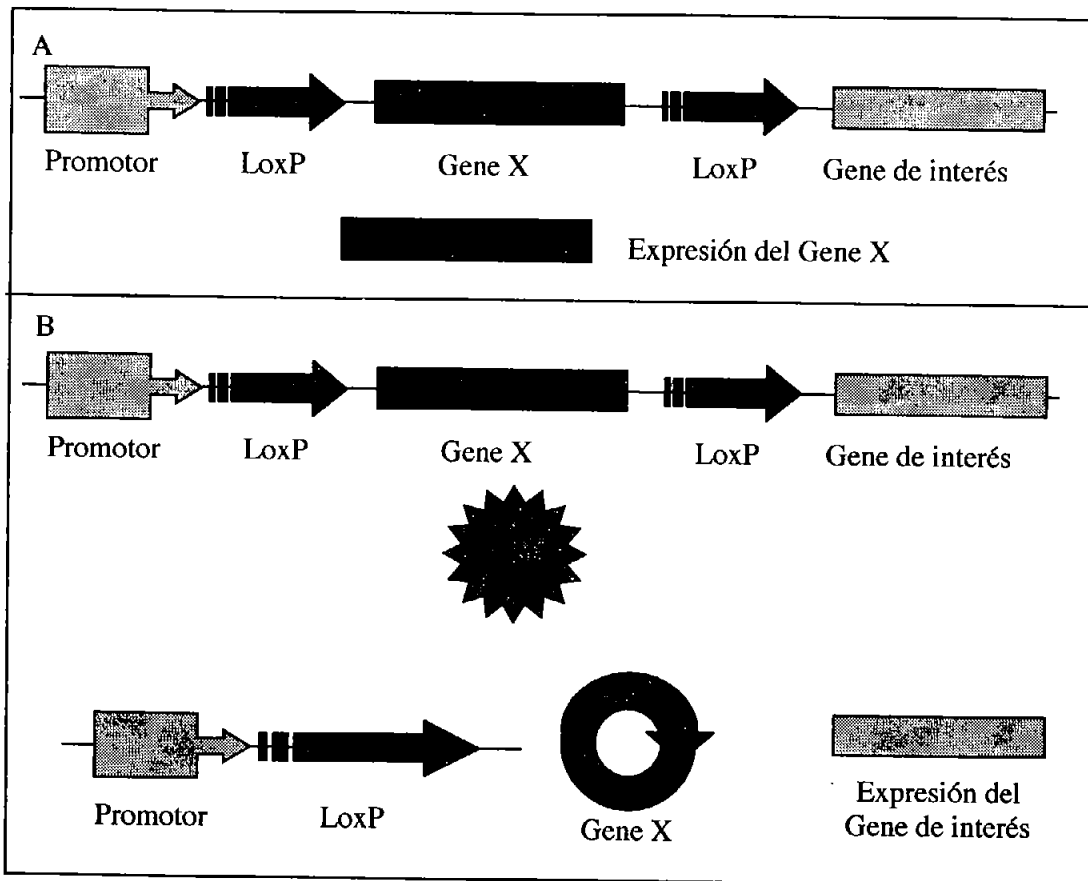


Figura 13 Sistema Cre/loxP A Al no estar la recombinasa Cre el gene X se expresa. B en presencia de la recombinasa de Cre el gene X es escindido.

Para la expresión tejido específica, la mayoría de los promotores que están clonados no están completos, por lo cual la expresión de cre puede no ser confiable, sin embargo se han generado varias líneas de transgénicos con actividad de recombinasa mediada por cre confiable (Behringer y Magnuson 2000). La metodología de Cre/loxP permite abordar el estudio de genes que potencialmente causen un problema de sobrevivencia del embrión o en estadios tempranos del desarrollo. La estructura del transgene condicional es simple; el promotor y la región codificante del gen de interés están separados por una región de ADN (marcador) que contiene un codon de termino y se encuentra flanqueada por sitios loxP. Esto no permite que inicie la transcripción del gene de

interés. Al ser removida esta región (loxP-marcador STOP-loxP) el gene de interés puede expresarse (Lakso y col 1992). Existen dos variaciones posibles de la transgénesis condicional: en una de ellas el transgene condicional se expresa bajo el control de un promotor tipo o linaje celular específico y Cre también se expresa bajo el control de otro promotor linaje y celular específico y en la segunda variación el transgene condicional se expresa bajo un promotor constitutivo (Figura 14).

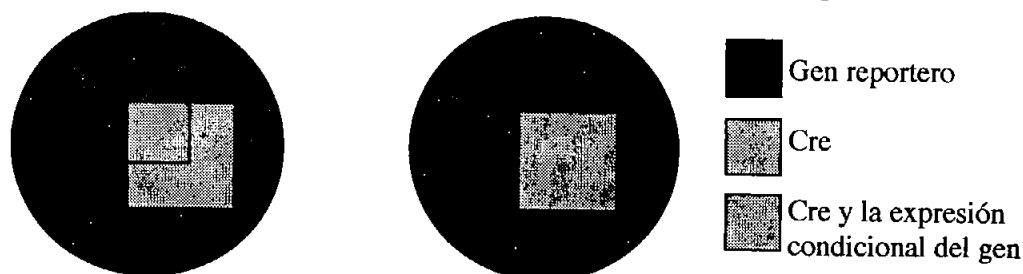


Figura 14 La activación de la transcripción del transgene de interés cuando Cre y el transgene condicional se encuentran bajo un promotor linaje específico (A) o solo cuando la expresión de cre es específica (B)

En el laboratorio contamos con una línea de ratones transgénicos que expresan CRE bajo el promotor de la fosfatasa alcalina tejido no específica (FATN). La FATN se expresa naturalmente tanto en la línea germinal como en el tubo nervioso, sin embargo al caracterizar a ratón transgénico de Cre se observó que en esta línea de ratones transgénicos, (TNAP^{Cre}), Cre se expresa preferentemente en la línea germinal. Al cruzar a este ratón transgénico con otro ratón transgénico que presente una construcción tal que se active la expresión de genes de interés mediante la actividad de Cre se podrán obtener mutaciones en la línea germinal. De esta manera pretendemos abordar la interrogante de la función de *c-kit* en el desarrollo de las CGP. También disponíamos de la línea que contiene un transgen en el cual estaban presentes los genes *lacZ* y *c-Kit*^{D814Y} (*kit*^{D814Y} -

loxP). La línea $kit^{D814Y}-loxP$ regularmente expresa la β -galactosidasa (β -gal) de manera ubicua, ya que esta bajo el promotor de β -actina unido al del citomegalovirus. A su vez la β -gal se encuentra en la construcción flanqueado por los sitios *loxP* lo que permite que sea escindido al cruzarse con el ratón que expresa a Cre únicamente en la línea germinal y en la F1 se sobreexpresen Kit^{D814Y} .

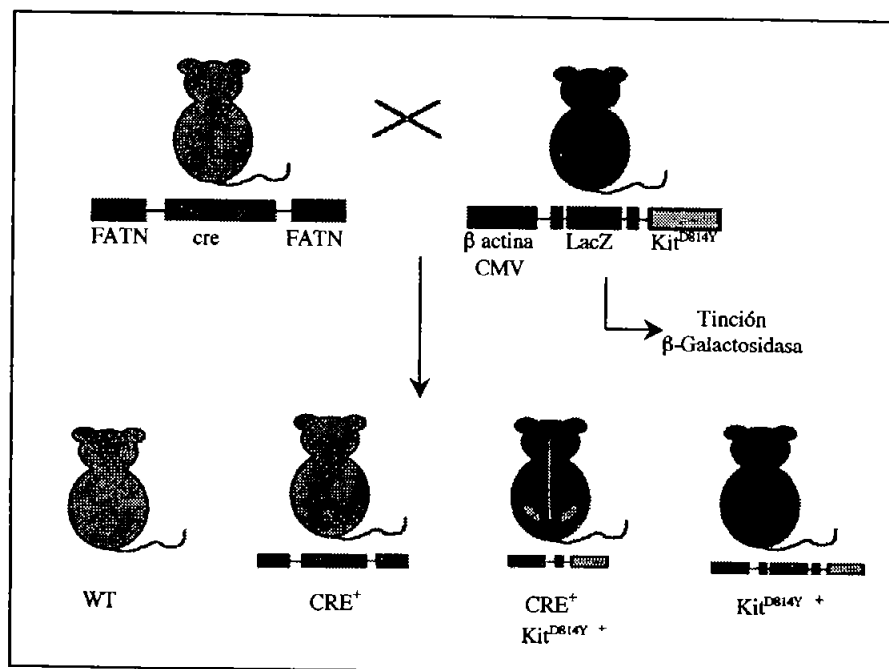


Figura 15 Estrategia para la obtención de ratones dobles transgénicos que expresen Kit^{D814Y} en la línea germinal

JUSTIFICACION

Los alelos constitutivamente activos pueden ser de utilidad para para abordar el estudio de la función de c-Kit *in vivo*, ya que permite evaluar el efecto de c-Kit de manera independiente al ligando, además de no haber una pérdida del linaje celular. La sobreexpresión de alelos constitutivamente activos podrían así interferir con procesos en donde c-Kit participe, revelando así funciones potenciales de este receptor. El introducir la mutación Kit^{D814Y} en la línea germinal *in vivo* podría ayudar en el entendimiento de mecanismos fundamentales del desarrollo como son el crecimiento celular, la migración y la diferenciación inclusive podría ayudar al entendimiento de procesos como la oncogénesis. Así nos pareció interesante el utilizar esta mutante en el estudio de la sobreexpresión de c-kit en la línea germinal.

OBJETIVOS

- Expresar Kit^{D814Y} en el linaje germinal de manera ubicua
- Estudiar el efecto de la expresión ectópica de Kit^{D814Y} en el desarrollo de los gametos.
- Caracterizar a la línea de ratones transgénicos *kit^{D814Y}-loxP* mediante tinciones que detectan la actividad de β -galactosidasa. Durante diferentes estadios del desarrollo, a los 13 dpc, 15dpc, 18 dpc y en hembras y machos adultos.
- Determinar los estadios donde se esta expresando Kit^{D814Y}.
- Caracterización del efecto de la expresión de Kit^{D814Y}.
- Determinar si la proteína Kit^{D814Y} se encuentra activa.
- Determinar la o las vías de traducción activadas por Kit^{D814Y}

RESULTADOS

Líneas de ratones transgénicos utilizadas.

En el presente estudio se utilizaron diferentes líneas de transgénicos en la tabla se describen las características generales de estas líneas de ratones.

nombre de la línea de transgénicos	expresión	sito de expresión
TNAP ^{Cre}	Cre	En la línea germinal
Kit ^{D814Y} -loxP	LacZ	Ubícua
TNAP ^{Cre} / Kit ^{D814Y} -loxP	Kit ^{D814Y}	En la línea germinal

Tabla Nombres de las líneas de transgénicos.

La línea de ratones transgénicos Kit^{D814Y}-loxP se expresa en las células espermatogénicas.

Al caracterizar a la línea kit^{D814Y}-loxP midiendo la actividad de β -galactosidasa (β -gal) en embriones de 13 días *post coitum* (d pc), se observó tinción solamente en el corazón y en los somitas. Sin embargo, estudios realizados en otras líneas de transgénicos en el laboratorio, mostraron que no es posible detectar la actividad de β -galactosidasa en las gónadas, por lo cual realizamos hibridaciones *in situ* del gen de lac Z, en gónadas de 13 d pc. En estas hibridaciones no observamos expresión del transgen en las CGP. En hembras no se detectó actividad de β -galactosidasa en los oocitos. Con la finalidad de determinar si en todas las células espermatogénicas se expresa el transgen se estudió en diferentes estadios del desarrollo en testículos (a los 8 días después del nacimiento (ddn), a los 14 ddn y a los 80 ddn). La tinción en el testículo adulto muestra una fuerte expresión del transgene en

todas las células espermatoogénicas, cabe recordar que en el animal adulto mas del 70% de las células espermatoogénicas son espermatidas, por lo que las tinciones en estadios mas tempranos (8 ddn) nos permitió observar la expresión del transgene tanto en las espermatoogonias como en las células de Sertoli (Figura 16). Debido a que no observamos la actividad de β -galactosidasa en los estadios embrionarios ni en hembras, la caracterización de los ratones dobles transgénicos $TNAP^{Cre} / kit^{D814Y}-loxP$ se realizo únicamente en los machos adultos.

Los análisis de segregación mostraron que el transgene se encuentra localizado en el cromosoma X, lo que podría explicar la baja expresión de este transgene. La inactivación transitoria de l cromosoma X ocurre en los espermatocitos primarios durante la primera fase de la meiosis . Para algunos genes ligados al cromosoma X esta inactivación persite el resto de la espermiogénesis, sin embargo otros genes se reactivan o se activan por primera vez en las espermatidas después de la meiosis (Goto T, Monk M.1998). La presencia del transgene en el cromosoma X no permitió la generación de ratones $kit^{D814Y}-loxP$ homocigotos.

Obtención de ratones dobles transgénicos ($TNAP^{Cre} / kit^{D814Y}-loxP$).

Para obtener la expresión de kit^{D814Y} en las células espermatoogénicas, se realizaron cruza entre ratones machos $TNAP^{Cre}$ y hembras $kit^{D814Y}-loxP$, despues de dos semanas del nacimiento se tomaron muestras de la oreja de cada ratón macho se identificaron mediante PCR la presencia de la construcción de Cre como la de LacZ, como se detalla en materiales y métodos. Se obtubieron así un total de 113 machos dobles transgénicos, los

cuales se cruzaron con hembras silvestres para evaluar si había un efecto en la fertilidad de los machos dobles transgénicos.

La expresión de Kit^{D814Y} en la línea germinal de ratones causa esterilidad y malformaciones en los espermatozoides

Para evaluar si los machos dobles transgénicos presentaban algún fenotipo; a los 2 meses después del nacimiento cada uno de los machos dobles transgénicos de se cruzaron con cuatro hembras silvestres (CD1) y se observó si eran fértiles. También, a manera de control se realizaron cruzas con las otras líneas de ratones transgénicos (TNAP^{Cre} y kit^{D814Y}-loxP) y de ratones silvestres (CD1). Los resultados se muestran en la tabla 3.

	CD1	kit ^{D814Y} -loxP	TNAP ^{Cre}	TNAP ^{Cre} / kit ^{D814Y} -loxP
No. crías	12.02 ± 3.98	13.14 ± 1.86	11.88 ± 1.92	6.60 ± 4.63
n	96	6	6	100

Tabla 3. Porcentaje de crías de las diferentes líneas de ratones.

Los resultados de estas cruzas se analizaron con la prueba de Chi, la cual demostró diferencias significativas entre los ratones dobles transgénicos y los ratones control (p > 0.01). Pudimos detectar dentro de los ratones dobles transgénicos tres subpoblaciones diferentes las cuales se muestran en la tabla 4. Así en el 87% de la población de ratones dobles transgénicos no se observa un efecto dramático en la fertilidad sin embargo el 13% de la población era prácticamente estéril (1.68± 1.82) estos resultados reflejan la eficiencia de Cre.

TNAP ^{Cre} / kit ^{D814Y} -loxP		
KDY		
1	2	3
10.89 ± 1.93	7.22 ± 1.10	1.68 ± 1.82
65	22	13

Tabla 4 Subpoblaciones de ratones dobles transgénicos TNAP^{Cre} / kit^{D814Y}-loxP

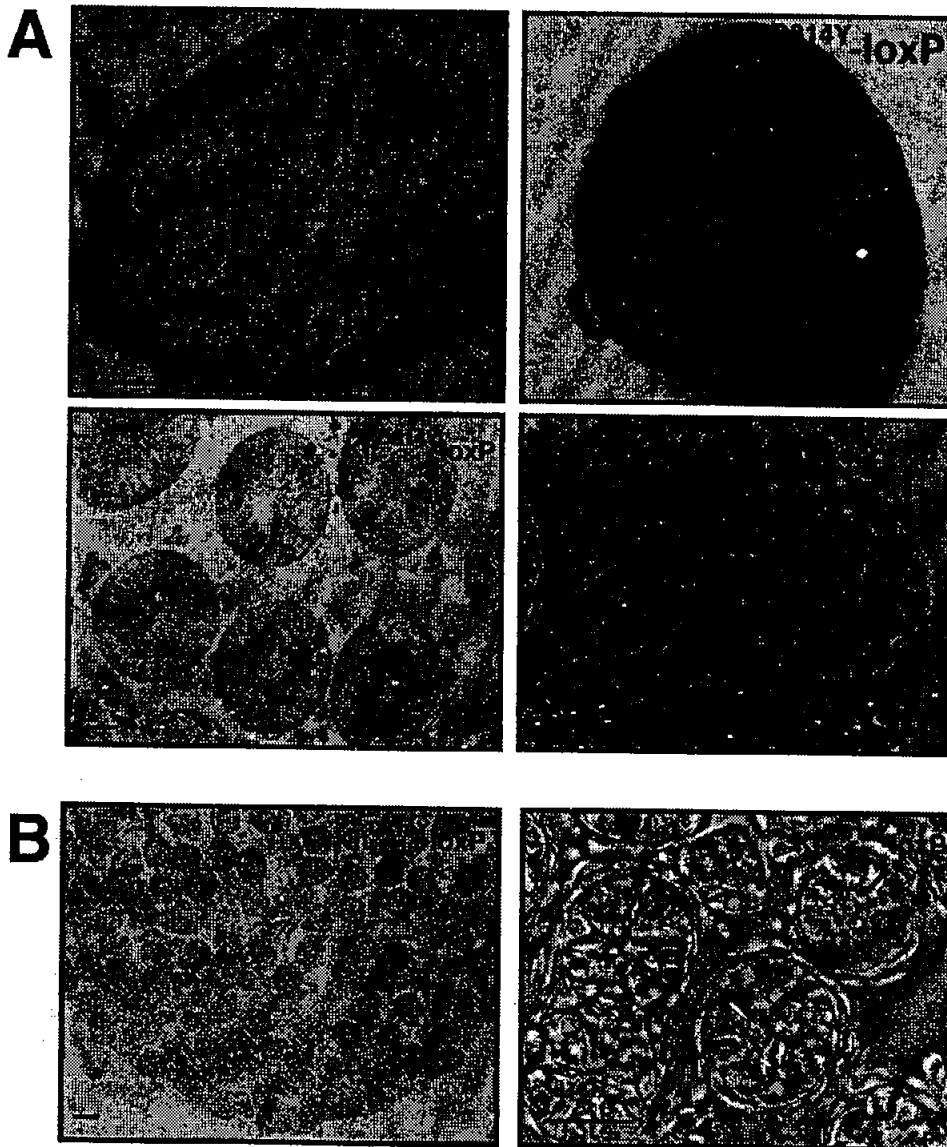


Figura 16 Expresión del transgen en testículos de la línea Kit^{D814Y}-loxP. A Cortes transversales de testículos de ratones silvestres (Wt) y de ratones de la línea de transgénicos (Kit^{D814Y}-loxP), teñidos para detectar la actividad de β -galactosidasa. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina para observar los núcleos (panel

superior) . La señal positiva (azul) de la expresión de lac Z se detecta en las células espermatogénicas de $Kit^{D814Y}-loxP$ B La actividad de β -galactosidasa se detecta en las espermatogonias y células de Sertoli en los testículos de 8 días después del nacimiento en ratones $Kit^{D814Y}-loxP$. Escala representa 50 μ m.

Para detectar la expresión de c-kit en los ratones dobles transgénicos se realizaron *western blots* en extractos totales de células espermatogénicas. En análisis de densitometría, observamos que los ratones dobles transgénicos fértiles expresan 1.7 veces mas kit; mientras que las células espermatogénicas del ratones estériles expresan 4.5 veces mas cantidad de kit que los ratones y $kit^{D814Y}-loxP$ (Figura 17). y CD1. Por lo cual el resto de los análisis lo llevamos a cabo con los ratones de fertilidad baja o completamente estériles denominados KDY.

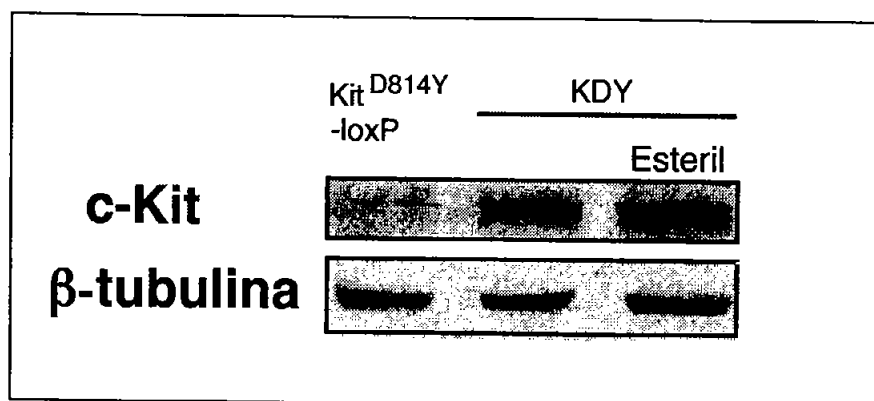


Figura 17 . Las células espermatogénicas del ratón doble transgénico (KDY) expresan 1.8 o 5 veces mas Kit^{D814Y} , comparado con la expresión de Kit en $Kit^{D814Y}-loxP$. Panel superior: *Western blot* anti-c-kit de lisados totales de células espermatogénicas. Panel inferior las membranas se lavaron y se detecto b-tubulina para mostrar los niveles totales de proteína.

Al analizar cortes en parafina de los testículos de un ratón doble transgénico estéril se observaron todos los tipos de células espermatogénicas

incluyendo espermatozoides. Debido a esto, una posibilidad de que las hembras no tuvieran crías al cruzarlas con ratones KDY es que hubiera muerte en estadios tempranos del desarrollo del cigoto. Así se realizaron cruzas con hembras silvestres y se obtuvieron los oocitos a los 0.5 d pc y se hicieron tinciones del núcleo. En las cruzas de los ratones silvestres se muestran los dos pronúcleos después de que ocurrió la fecundación, y la tinción del segundo cuerpo polar, mientras que las cruzas de ratones silvestres con ratones dobles transgénicos estériles no se observaron los dos pronúcleos, y se observa la tinción del DNA característico del estado de detención en meiosis de oocitos no fecundados. Esto muestra que a pesar de que los ratones estériles tienen espermatozoides; estos no eran capaces de fecundar a los oocitos (Figura 18).

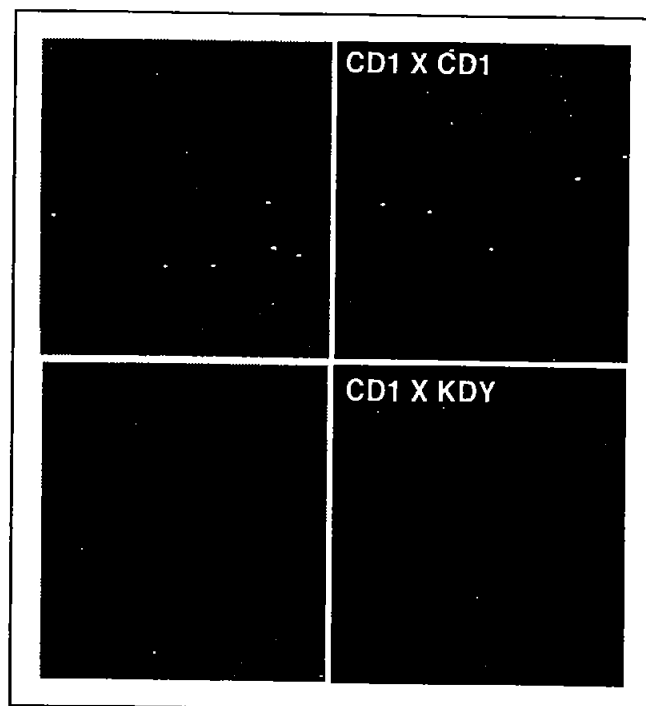


Figura 18. Oocitos 0.5 d pc obtenidos de cruzas de ratones silvestres (CD1 X CD1) y de ratones silvestres con machos dobles transgénicos estériles (CD1XKDY). En campo claro (izq.) o teñidos con Hoescht para detectar los núcleos (der.).

Sin embargo al obtener los oocitos de 0.5 *post coito* observamos espermatozoides en el útero de la hembra, lo que sugiere que la maduración de los espermatozoides es completa. A continuación procedimos a observar la morfología de los espermatozoides. Para ello se realizaron cruzas y se hicieron lavados en el día 0.5 *post coito* del útero, de estos lavados obtuvimos espermatozoides de los diferentes ratones dobles transgénicos (KDY) y de ratones $Kit^{D184Y}/loxP$ como control. Se observaron diferentes morfologías de los espermatozoides que son: espermatozoides normales, espermatozoides con el flagelo doblado y con el flagelo enrollado alrededor de la cabeza y espermatozoides con la cabeza del espermatozoide expandida y deforme. Estas malformaciones se observaron también en los espermatozoides obtenidos de epidídimo (Figura 19).

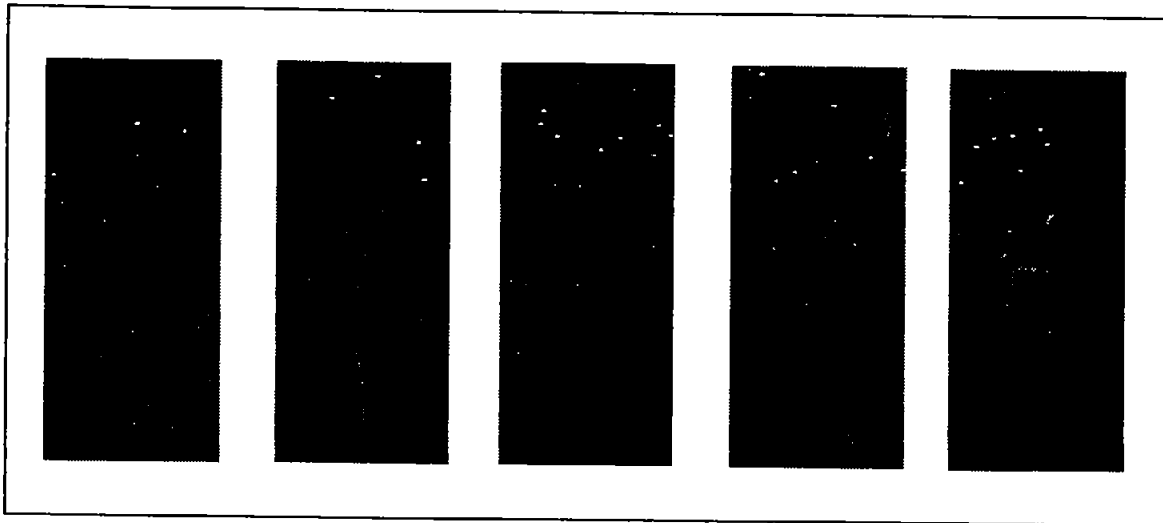
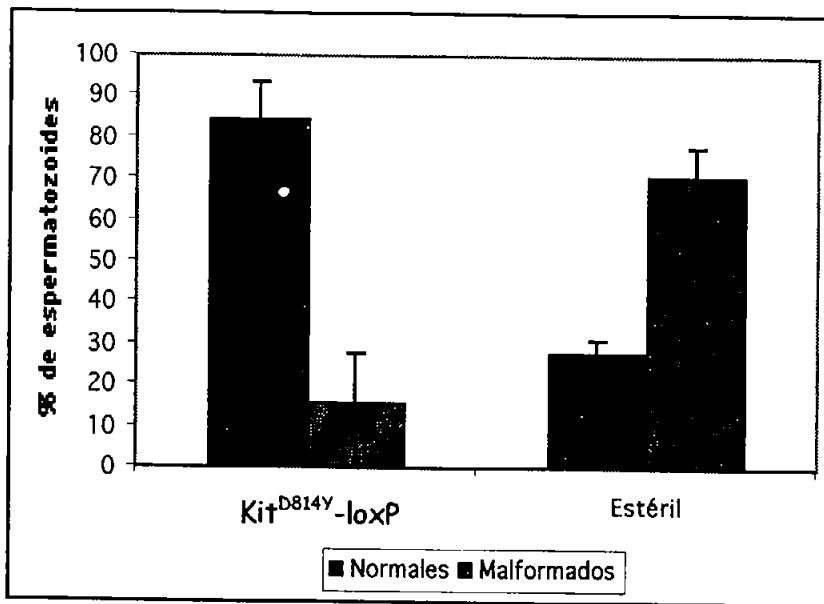
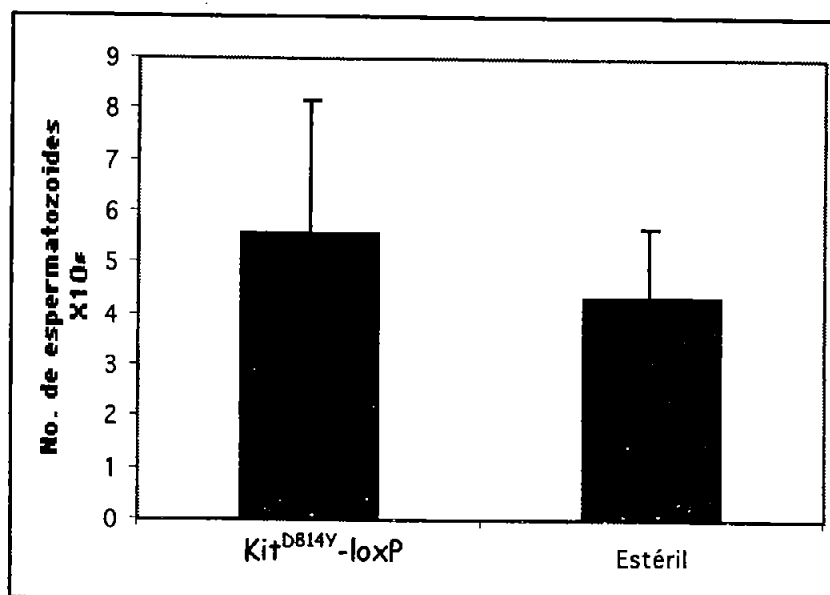


Figura 19. La morfología de los espermatozoides es anormal en los ratones KDY. Microscopia de Normasky de los espermatozoides de ratones KDY, (1) Espermatozoide con apariencia normal. Flagelos anormales (2) doblados, (3) en forma de lazo, o (4) con el flagelo enrollado y (4 y 5) malformaciones en la cabeza

Aunque en los ratones control ($\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$) y CD1 silvestres se pueden encontrar estas diferentes morfologías, al comparar con los ratones estériles las proporciones de los espermatozoides con morfología alterada es significativamente diferente como se muestra en la gráfica 1; a pesar de que en la cantidad de espermatozoides del epidídimo no se observan diferencias significativas (Gráfica 2).



Gráfica 1 Porcentaje de las diferentes morfologías de los espermatozoides en los ratones transgénicos $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$ y de ratones dobles transgénicos estériles



Gráfica 3 Número de espermatozoides obtenidos de epidídimos de ratones $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$ y de ratones dobles transgénicos estériles

Para caracterizar la morfología de los espermatozoides con deformaciones en los ratones dobles transgénicos estériles se realizaron diferentes tinciones para detectar los filamentos de actina, las mitocondrias, los microtúbulos y los núcleos. Se utilizaron ratones $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$ de la misma edad como controles. En el flagelo no se observaron diferencias en los filamentos de actina, ni en los microtúbulos y las mitocondrias se encuentran localizadas en la parte media igual que en el ratón $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$. Sin embargo en la región subacrosomal de la cabeza no se observó la tinción de actina, que caracteriza a los espermatozoides de un ratón silvestre (Figura 20).

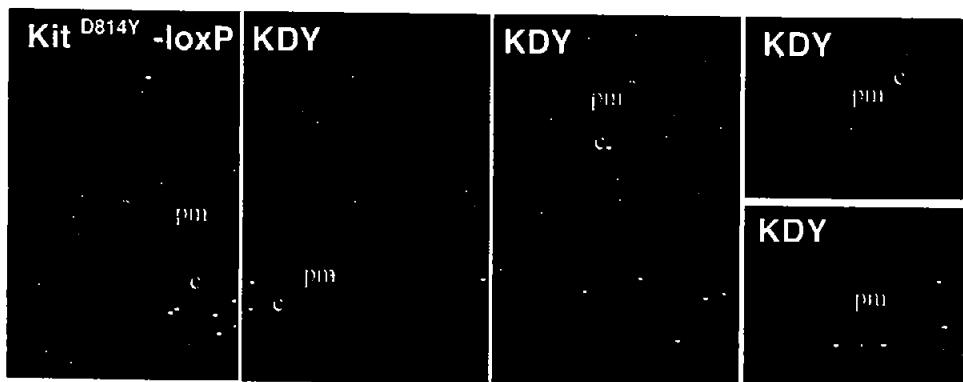


Figura 20 Tinción de actina de espermatozoides del ratón control, $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$ y del ratón KDY. En el ratón KDY no se observa la tinción de actina en citoesqueleto postacrosomal en la cabeza de espermatozoide, como en los espermatozoides del ratón control $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$. pm pieza media, c cabeza del espermatozoide en la región postacrosomal

En la tinciones realizadas con Sytox green para detectar Inúcleos, observamos que en algunos casos estos no tienen la morfología característica de la cabeza del espermatozoide, mientras que en aquellos que tienen una morfología similar el tamaño de las cabezas de los espermatozoides de los

ratones dobles transgénicos son mas grandes con respecto a las cabezas de los espermatozoides de los ratones silvestres (Figura 21), lo que sugiere que la formación de la cabeza no es correcta.

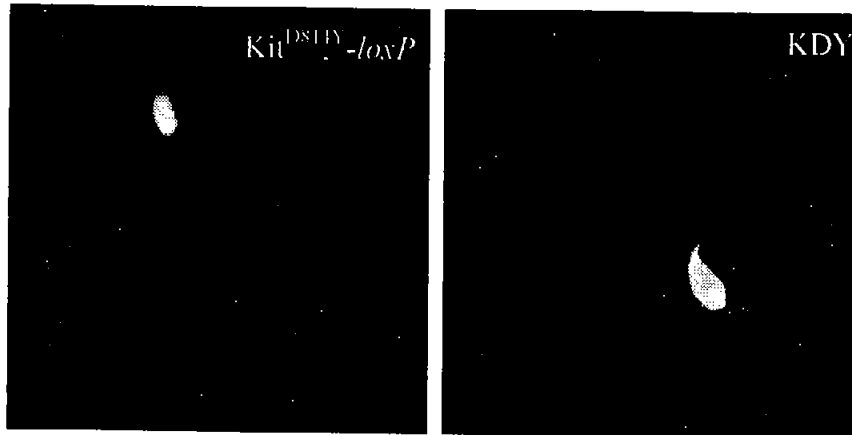


Figura 21 Tinción de núcleos con Sytox en espermatozoides del ratón control ($\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$) y estéril (KDY).

Con respecto a la tinción para detectar mitocondrias activas con dihidro rodamina 123, en algunos casos detectamos mitocondrias en la cabeza de los espermatozoides (Figura 22).

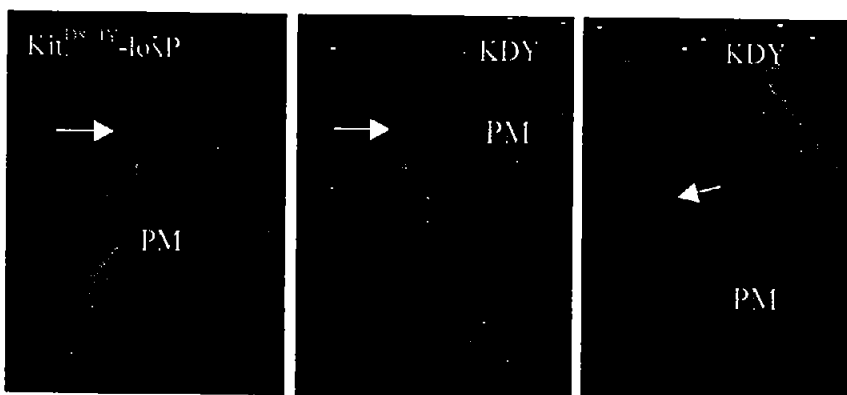


Figura 22 Tinción de mitocondrias en espermatozoides del ratón control ($\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$) y estéril (KDY). Se observa la tinción en la pieza media en los espermatozoides control (PM), mientras que en KDY además se observa en la región de la cabeza (flecha).

Para llevar a cabo una caracterización con mayor detalle se realizaron análisis con microscopía electrónica de transmisión en cortes de epidídimo. Así se observó que no se lleva a cabo la espermiogénesis completamente ya que no hay una liberación del citoplasma. También se observó hipoplasia o formación deficiente del acrosoma, sin embargo todos los componentes del flagelo como son la mitocondrias, microtúbulos, hojas fibrosas y fibras densas externas, se observan organizadas de una manera normal, lo que correlaciona con las tinciones realizadas anteriormente (Figura 23). Estos resultados sugieren que el enrollamiento del flagelo está causado no por la desorganización o la falta de algún componente en el flagelo, sino como resultado de que no se libera el citoesqueleto, que es el último evento durante la espermiogénesis.

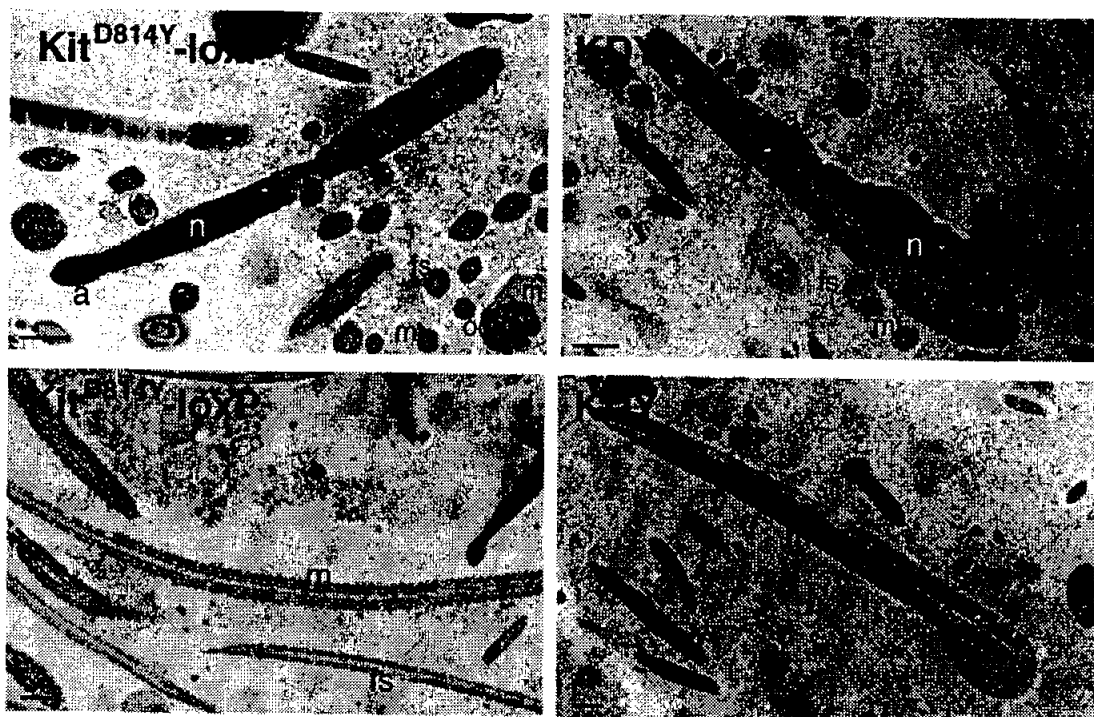


Figura 23. Micrografías electrónicas de cortes transversales y longitudinales de espermatozoides de ratones $Kit^{D814Y}/loxP$ y KDY. En los cortes de espermatozoides de ratones KDY se observa que el núcleo y varias secciones de la pieza media y principal se encuentran contenidas en un citoplasma común, también observamos hipoplasia acrosómica. Mientras que la organización del flagelo y los componentes de este se ven normales. Barra: 1mm. a, acrosoma; fs, hoja fibrosa; m, mitocondrias; mt, microtúbulos; n, núcleo; odf, fibras densas externas.

Para determinar si la morfología alterada en los espermatozoides observada en ratones dobles transgénicos correlacionaba con la expresión de Kit^{D814Y} se realizaron inmunocitoquímicas en espermatozoides. Se detectó la proteína c-kit en los espermatozoides del ratón estéril mientras que en ratón silvestre no se observó esta expresión en los espermatozoides (Figura 24).

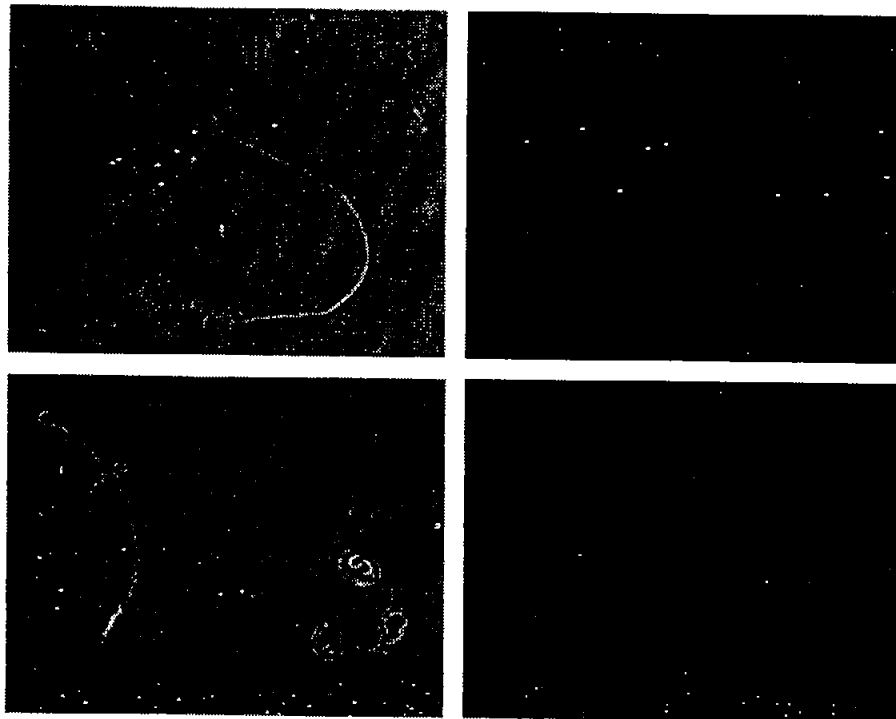


Figura 24. Las células espermatogénicas del ratón estéril (KDY) expresan $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$. Inmunocitoquímica en espermatozoides muestran la expresión de la proteína c-Kit en los espermatozoides con malformaciones en ratones estériles (KDY), mientras que en los espermatozoides de los ratones control ($\text{Kit}^{\text{D814Y}}-loxP$) no se observa esta expresión. Escala: 10 μm .

Las malformaciones observadas en los espermatozoides reflejan que la espermiogénesis no se llevo de manera correcta. Por lo cual nos pareció importante identificaren la presencia de la proteína c-kit, así se realizaron inmunohistoquímicas en cortes de testículos en parafina. Los resultados mostraron que c-kit se expresa en las espermatogonias al igual que en el raton silvestre (Figura 25), además observamos una expresión ectópica de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ tenue en todas las células espermatogénicas, sin embargo apartir del la espermiogénesis en estadio 2 -3 observamos una fuerte expresión que se localiza de manera particular en los gránulos proacrosómicos y posteriormente en el estadio 6 se observa la expresión en un extremo cercano al núcleo; esta localización resulta interesante ya que es el sitio donde se forma el acrosoma y el anillo perinuclear (Figura 25) En estadios posteriores observamos la expresión de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ asociada al núcleo de las espermatidas. Estos resultados son correlativos con el fenotipo que observamos en los espermatozoides de los ratones estériles el cual esta asociado a la mala formación de la cabeza.

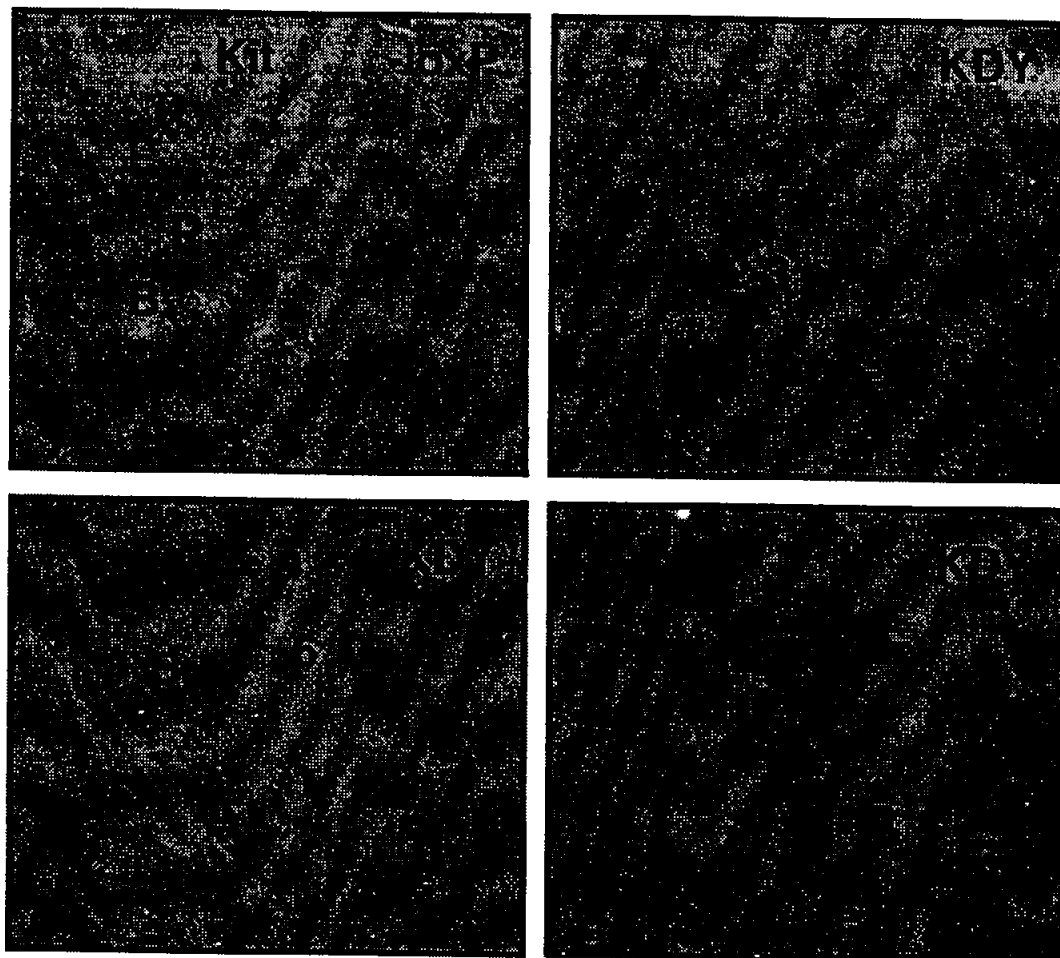
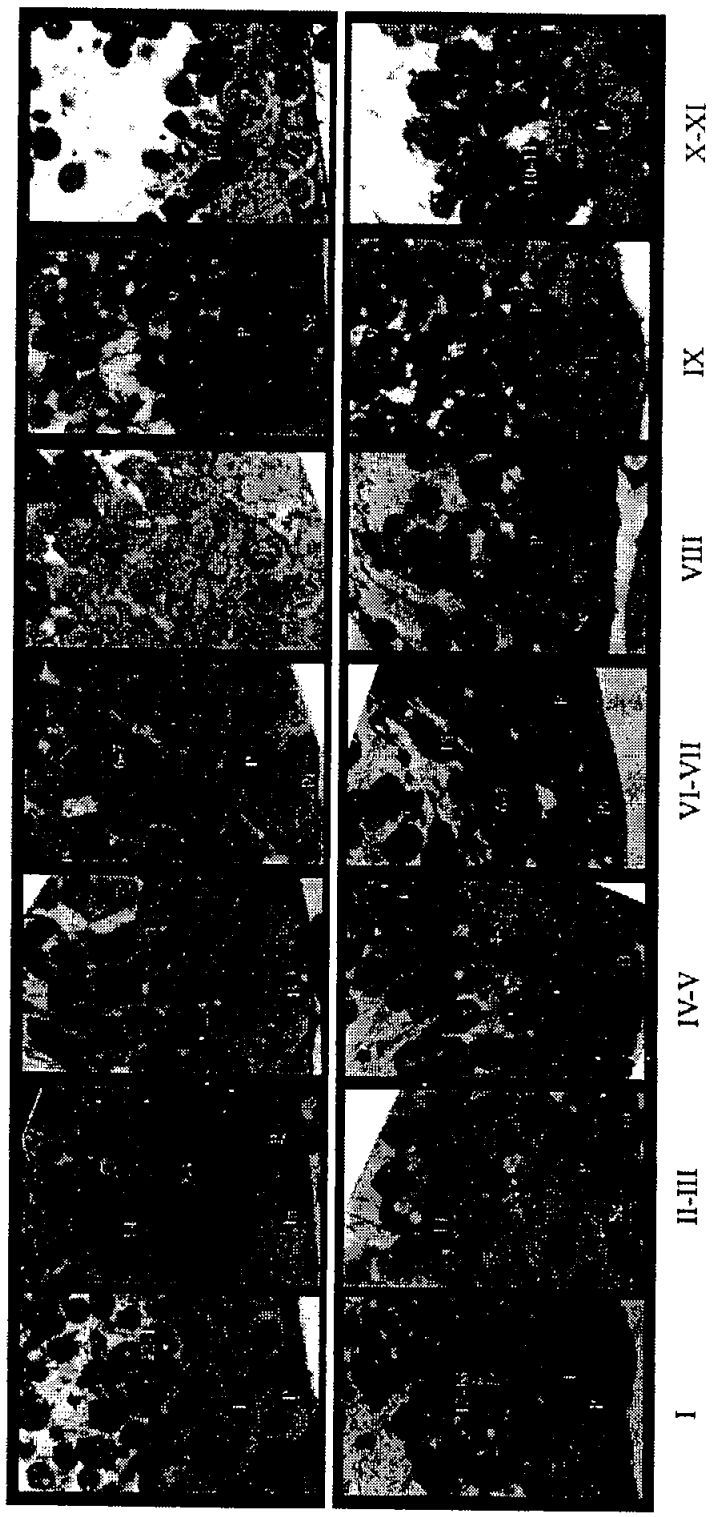


Figura 25. Inmunocitoquímica de c-Kit en cortes de parafina de testículos de ratones dobles transgénicos estériles (KDY) y ratones control ($Kit^{D814Y}-loxP$). Se observa expresión de c-kit en las espermatogonias B en el ratón $Kit^{D814Y}-loxP$ espermatogonias B. En los ratones KDY además se observa expresión en las espermatidas 2-3, 6 y 9. La expresión se encuentra localizada rodeando al núcleo, en el sistema acrosómico. Escala; $10\mu m$. B, espermatogonias B; P, espermatocito en paquiteno; 2-3, 6 y 9 espermatidas estadio 2-3, 6 y 9 respectivamente; Se células de Sertoli.

Los últimos estadios de la espermiogénesis estan afectados en los ratones KDY

Con la finalidad de determinar el estadio en que comienza la malformación del espermatozoide, realizamos cortes seriados semi-finos e identificamos los diferentes estadios de la espermatogénesis y espermiogénesis. Observamos que la espermatogénesis se lleva a cabo de manera normal durante la división celular, la meiosis y los primeros estadios de la espermiogénesis, sin embargo en la transición a espermatidas alargadas es donde se comienza a ver malformaciones. Observamos que la malformación en los ratones dobles transgénicos estériles comienza en la etapa 8 de la espermiogénesis y para la etapa 9 es muy notoria. En la etapa 8 las espermatidas presentan una membrana nuclear con deformaciones y los cúmulos de cromatina característicos de este estadio no se observan comparadas con las espermatidas de ratones control. En espermatidas de etapa 9 se observan los núcleos con deformaciones y distendidos a comparación de los núcleos alargados en las espermatidas de ratones control (Figura 26).



Kit D814Y - JoxP

KDY

Figura 26. La elongación de espermátidas se encuentra afectada en los ratones estériles (KDY). Cortes semifinos de testículos de ratones $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$ y KDY de estadio I al XI. Las malformaciones en los espermátidas comienzan en el paso 8 de la espermiogénesis en el ratón KDY. Las espermátidas en el paso 9 presentan un núcleo deformado, comparado con la apariencia normal de un núcleo en fase de elongación. Escala :10 μm . In, espermatogonias intermedias; B, espermatogonias B; Pl, preleptoteno; L, leptoteno; Z, cigoteno; P, paquiteno; Se, célula de sertoli; 1 a 12, espermátidas estadio 1 al 12 espermátidas.

Para analizar con mayor detalle la morfología de las espermátidas de los estadios 10-12, realizamos microscopia de transmisión en cortes de testículos de ratones dobles transgénicos estériles, como control utilizamos ratones $\text{Kit}^{\text{D814Y}}\text{-loxP}$ de la misma edad. Así observamos que la formación del anillo perinuclear y del *manchette* esta desorganizada, observamos una proyección asimétrica del anillo perinuclear acompañado de una inserción engrosada del manto de microtúbulos, lo que podría explicar el porque no se lleva a cabo la formación de la cabeza de manera correcta. Confirmamos de esta manera la deformidad del núcleo en los espermátidas y la ausencia o hipoplasia del acrosoma (Figura 27).

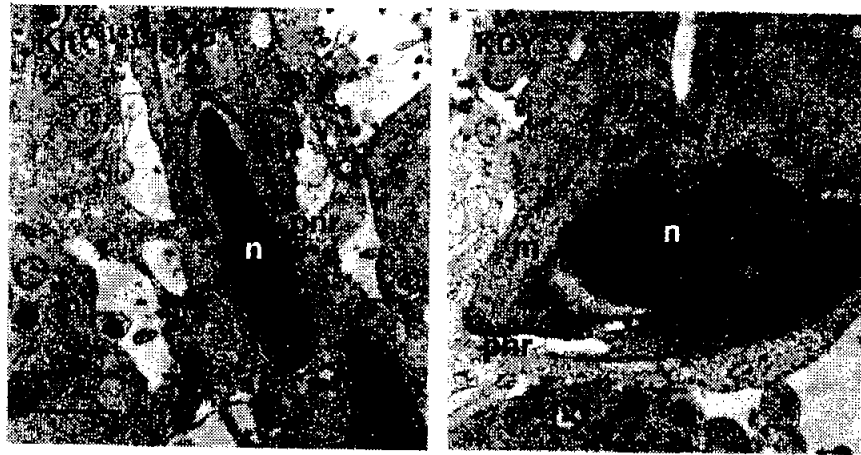


Figura 27. Micrografías electrónicas de espermatidas estadio 11. En cortes transversales de espermatidas de estadio 11 se muestra en el ratón KDY la proyección asimétrica del anillo perinuclear con un manchette engrosado y un núcleo deformado. Escala: 1 μ m. n, núcleo; pnr, anillo perinuclear; m, manchette.

La activación de Kit^{D814Y} incrementa la forforilación de PLC γ -1 y disminuye la cantidad de SHP-1

Kit es capaz de activar diferentes vías de señalización, dentro de las cuales se encuentra las vías de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), la de cinasas relacionadas con SRC como son Lyn, Fyn y c-Src, las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de la familia de cinasas de janus/ traductores y activadores de la transcripción (JAK/STAT), que a su vez promueven una gran variedad de respuestas celulares como son, la proliferación, la reorganización del citoesqueleto, la inhibición de la apoptosis, el control del ciclo celular, la adhesión y la quimiotaxis y la transcripción de genes. También se ha demostrado que c-Kit es capaz de interaccionar con otras proteínas como son la fosfolipasa C gamma 1 (PLC γ -

1) y las proteínas activadoras de GTPasas tipo Ras. La regulación negativa de la actividad y función de c-Kit están mediadas por las proteína cinasa C (PKC), la tirosin-fosfatasa que contiene SH-2 (SHP-1) y la inositol fosfatasa que contiene SH-2 (SHIP) (Taylor y Metcalfe 2000).

Para detectar que vía de c-kit se encontraba mas activa en los ratones dobles transgénicos estériles se realizaron inmuno detecciones en membrana (*western blots*) en extractos totales de células espermatogénicas. Así, realizamos *western blots* para detectar la fosforilación en tirosinas totales. Detectamos principalmente a tres proteínas que se encuentran mas fosforiladas en tirosinas una de ellas resulto ser PLC γ -1, otra de ellas Kit y la tercera no la hemos identificado. Sin embargo el patron general de fosforilación observado es similar al patron de fosforilación en células espermatogeenicas de los ratones silvestres lo que sugiere que la fidelidad de las vías de transduccion no estan dramáticamente alteradas. La mutación Kit^{DB14Y} es capaz de inducir la degradación de SHP-1 (Piao y col 1996), por lo cual realizamos *western blots* para detectar la presencia de SHP-1. Los resultados mostraron que s SHP-1 es menor en el extracto de células del ratón estéril, lo que sugiere que se encuentra Kit^{DB14Y} activo.

También realizamos *western blots* contra diferentes proteínas representativas de las vías de transducción normal de c-Kit. Así escogimos a PLC γ -1, que se ha demostrado interacciona también con tr-kit durante el proceso de fertilización (Sette y col., 2002); a p85 α , la

subunidad catalítica de PI3K, nos intereso evaluar la fosforilación de PI3K por su función descrita en la proliferación de espermatogonias (Kissel y col., 2000). STAT3 fue escogido como miembro de la familia de las STAT) además previamente se ha descrito que STAT4 se localiza en la teca perinuclear del espermatozoide de ratón (Herrada G, Wolgemuth DJ. 1997), y el anticuerpo que nosotros utilizamos cruza con STAT 4 de ratón. También escogimos evaluar la fosforilación de ERK1/2 ya que representan la convergencia de varias vías de MAPK además de que se ha demostrado que Erk1 es importante durante la meiosis (Sette y col 1999; Inselman A, Handel MA. 2004). Así escogiendo estas proteína pudimos tener una visión general de las diferentes vías y procesos celulares que podrían estar afectados al expresar de manera ectópica Kit^{D814Y}. Los *western blots* de PLC γ -1 fosforilado, p85 α , STAT 3 fosforilada, ERK1/2 fosforilados mostrarán que únicamente PLC γ -1 se encuentra mas fosforilado en los ratones dobles transgénicos estériles con respecto a los ratones silvestres. Los resultados se analizaron mediante densitometría y se cuantifico un aumento de dos veces mas fosforilación de PLC γ -1 en los extractos totales de células espermatogénicas de ratones dobles transgénicos. A diferencia de las demás proteínas evaluadas en donde no se observo un aumento en la fosforilación (Figura 28).

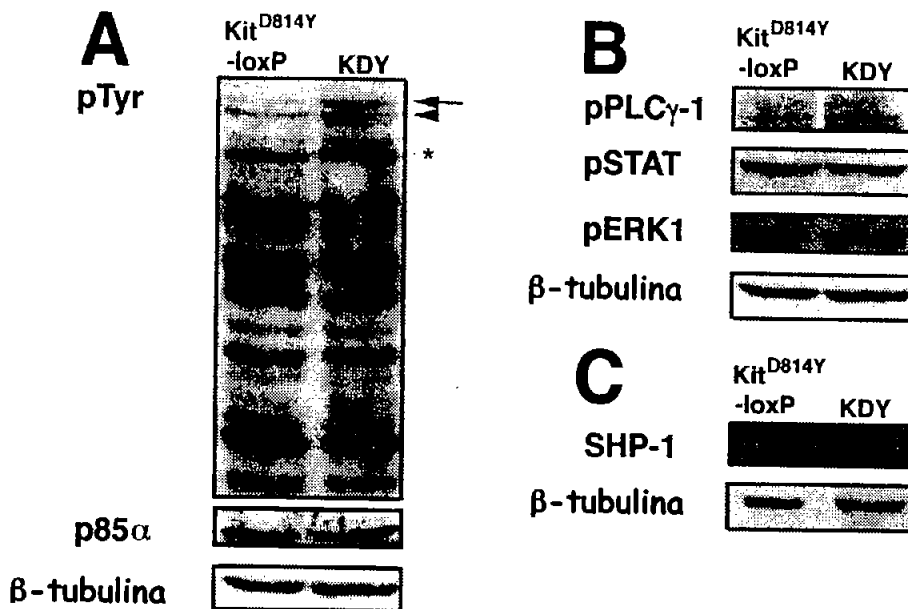


Figura 28. Extractos totales de células espermatoogénicas de KDY muestran un incremento en la fosforilación de PLCγ-1. (A) *Western blots* para detectar la fosforilación en tirosinas en lisados totales de células espermatoogénicas de Kit^{D814Y}-loxP y KDY. Los extractos de KDY muestran un incremento en fosforilación en tres proteínas (flecha, cabeza de flecha y asterisco). Las membranas se utilizaron para detectar a PLCγ-1, p85α y β-tubulina. La banda marcada con un flecha (←) fue positiva para PLCγ-1. El *western blot* contra β-tubulina muestra los niveles de proteínas. (B) *Western blot* de fosfo-PLCγ-1, fosfo-STAT3 y fosfo-ERK en extractos totales de proteínas de células espermatoogénicas de Kit^{D814Y}-loxP y KDY. Se observa un incremento de 2 veces más en la fosforilación de PLCγ-1. Las membranas se utilizaron para detectar β-tubulina para mostrar la cantidad de proteína cargada (C) *Western blot* de la proteína SHP-1 en extractos totales de proteínas de células espermatoogénicas de Kit^{D814Y}-loxP y KDY. En los extractos de KDY se observa menor cantidad de SHP-1 comparada con la fuerte detección en los lisados celulares de Kit^{D814Y}-loxP. Las membranas se utilizaron para detectar β-tubulina para mostrar que la cantidad de proteína cargada es equivalente.

La fosforilación de PLC γ -1 ocurre en la espermatidas elongantes *in vivo*.

Nuestros resultados muestran la activación de PLC γ -1 mediado por la activación de Kit^{D814Y}, así resulto interesante el identificar los sitios de expresión de PLC γ -1 durante la espermiogénesis; para esto realizamos inmunocitoquímica en contra de PLC γ -1 y pPLC γ -1 en cortes de testículos de ratones dobles transgénicos estériles y como control utilizamos ratones Kit^{D814Y}-*loxP*. La proteína PLC γ -1 se encuentra de manera ubicua en los testículos durante la espermatogénesis, sin embargo durante los primeros estadios de la espermiogénesis (2-3) se localiza en los gránulos preacrosomales y posteriormente en los siguientes estadios se localiza al rededor del núcleo posiblemente en lo que dará origen al acrosoma (Figura 29).

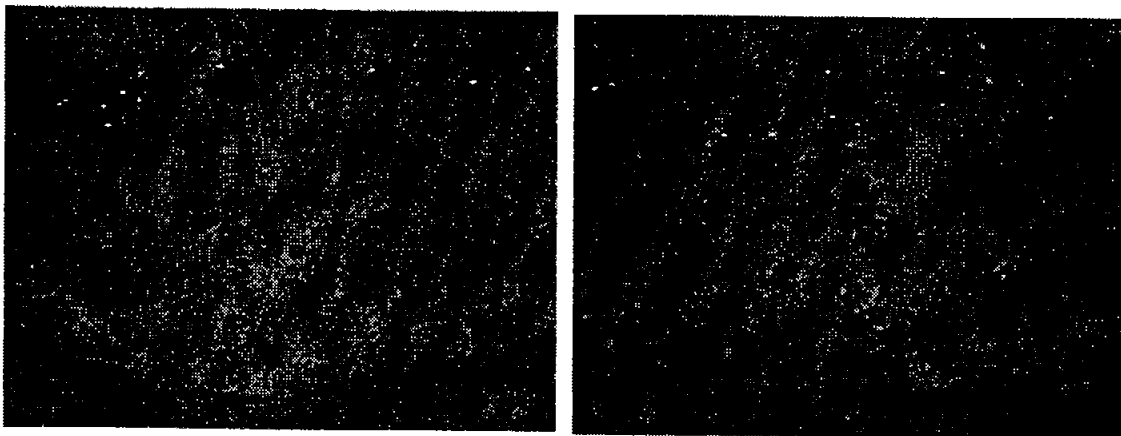


Figura 29. Inmunocitoquímica de PLC γ -1 en cortes de parafina de testículos de la línea de ratones Kit^{D814Y}-*loxP*. Observamos la expresión de PLC γ -1 de manera ubicua durante la espermatogénesis; sin embargo en los primeros estadios de la espermiogénesis la localización de PLC γ -1 se observa en los gránulos proacrosómicos. En estadios posteriores se observa también alrededor del núcleo. Escala: 10 μ m. In, espermatogonias intermedia; Pl,

espermátidos en preleptoteno; P, espermátidos en paquiteno; 2-3 espermátidos de estadio 2 ó 3; 5-6 espermátidos de estadio 5 ó 6.

Estos resultados resultan interesantes ya que es en esta misma localización subcelular donde se expresa de manera ectópica Kit D814Y en los ratones transgénicos. Por otra parte la activación de PLC γ -1 se encuentra localizada exclusivamente en espermátidos en preleptoteno y esta activación baja en los espermátidos en leptoteno posteriormente se observa que la fosforilación de PLC γ -1 comienza durante la enlongación de las espermátidos en los estadios 8-9 y se mantiene activa hasta el estadio 13 y 14 (Figura 30). La fosforilación de PLC γ -1 coincide durante la espermiogénesis con los estadios donde se encuentra presente el *manchette*, lo que sugiere una posible participación de PLC γ -1 durante la espermiogénesis ya que nosotros observamos un defecto en esta estructura.

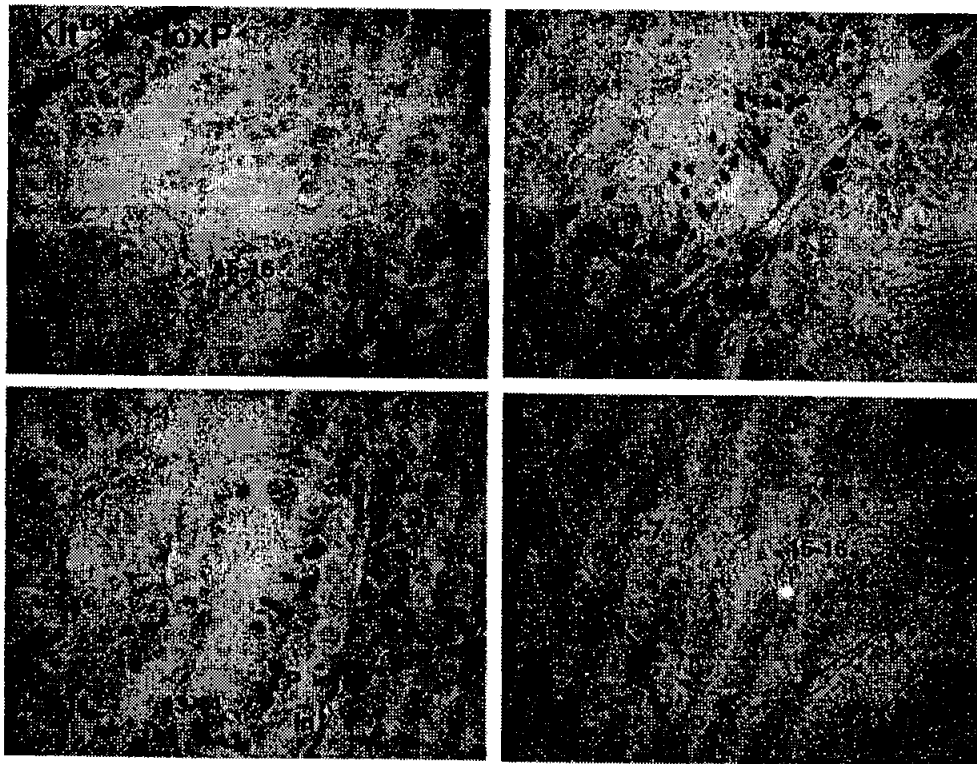


Figura 30. La fosforilación de PLC γ -1 tiene una distribución particular durante la espermiogénesis. En espermatocitos en preleptoteno se observa PLC γ -1 fosforilada y disminuye en espermatocitos en leptoteno. Se observó la fosforilación de PLC γ -1 de los estadios 9 al 14 de la espermiogénesis. Mientras que en los estadios de espermatidas 15 y 16 no se observó fosforilación de PLC γ -1. Escala: 10 μ m. In, espermatogonias intermedia; Se, célula de sertoli; PI, espermatocito en preleptoteno; L, espermatocitos en leptoteno; P, espermatocitos en paquiteno; 2-16 espermatidas de estadios de 2 al 16.

Posteriormente nos interesó evaluar la activación de PLC γ -1 en los ratones dobles transgénicos. Los resultados mostraron que la activación de PLC γ -1 es en los mismos estadios de la espermiogénesis sin embargo esta se observa más intensa; lo que concuerda con los resultados de los *western blots* en donde se observa una mayor fosforilación de PLC γ -1 (Figura 31). Esta

localización de la activación de PLC γ -1 resulta interesante ya que son los estadios de la espermiogénesis donde se forma el anillo perinuclear y el manchete que dan estructura al núcleo y al flagelo, además coincide con el periodo de expresión de tr-kit. Tr-kit es capaz de activar a la vía de PLC γ -1, sin embargo requiere de la activación previa de una cinasa (Rosi y col. 2003).

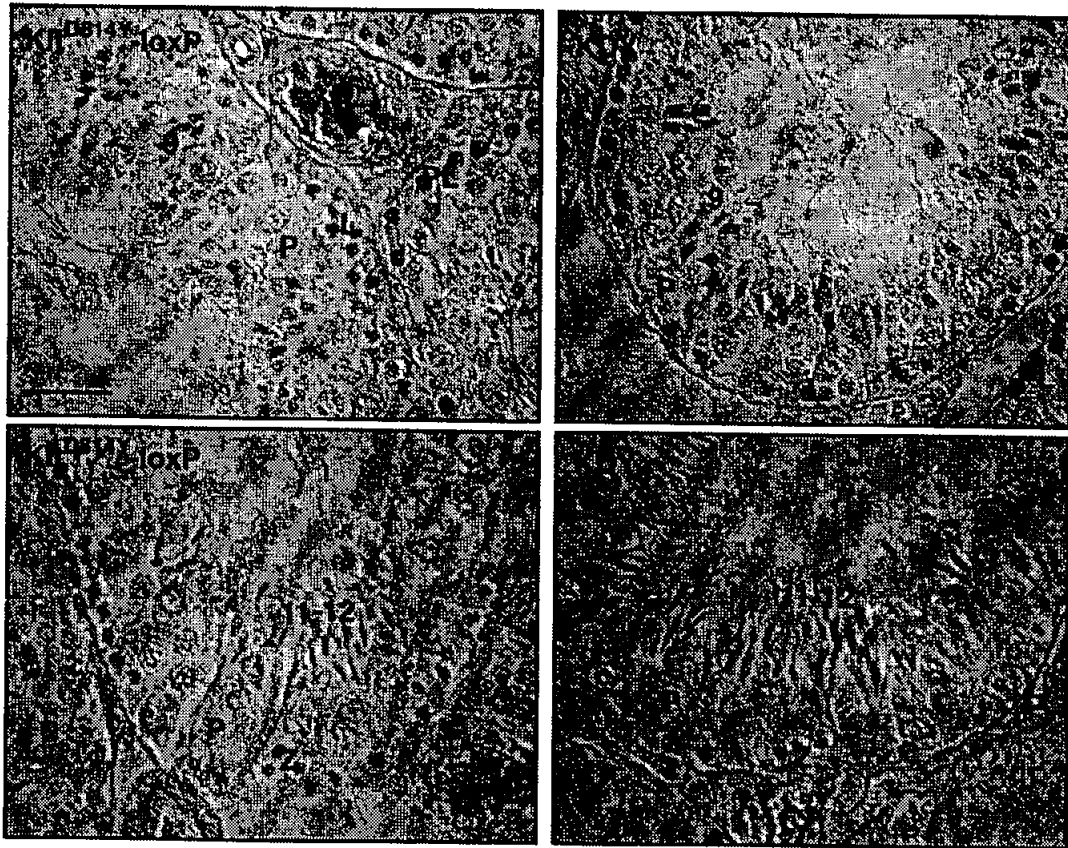


Figura 31. Inmunocitoquímica de PLC γ -1 fosforilado en cortes de parafina de testículos de las líneas de Kit^{D814Y}-loxP y KDY. La fosforilación de PLC γ -1 se observa en los mismos estadios de la espermiogénesis que en el ratón control (Kit^{D814Y}-loxP) Sin embargo las células espermatogénicas en los testículos de ratones dobles transgénicos estériles (KDY) se encuentran mas fosforiladas comparadas con las células espermatogénicas del ratón Kit^{D814Y}-loxP. Escala : 50 μ m. PI, espermatoцитos en preleptoteno; P, espermátidas en paquiteno; L,

espermatoцитos en leptoteno; Z, espermatidas en cigoteno; 9, espermatidas estadio 9; 11-12 espermatidas estadio 11 y 12.

DISCUSION

En este trabajo caracterizamos la expresión constitutiva de Kit^{D814Y} durante la espermatogénesis. Esta mutación en el receptor c-Kit se caracteriza por ser activa independientemente de la presencia de Steel, (Piao X. y Berstein, A. 1996) lo cual permite inducir la actividad de c-kit de manera constitutiva y ectópica durante el desarrollo de la línea germinal. Se demostró la presencia de la proteína Kit^{D814Y} en las espermatidas y espermatozoides maduros de ratones dobles transgénicos. Sin embargo, posiblemente debido al sitio de inserción del transgen, la línea de ratones $kit^{D814Y}/loxP$ no expresa el transgen en los oocitos ni en las células germinales primordiales, por lo cual nos dedicamos a caracterizar únicamente a los machos dobles transgénicos ($TNAP^{Cre}/kit^{D814Y}/loxP$). Observamos que la expresión de Kit^{D814Y} causa la malformación de los espermatozoides provocando en las situaciones más dramáticas la esterilidad (KDY).

Se ha descrito con anterioridad que la mutación kit^{D814Y} es equivalente a las mutaciones en *kit* en humano en el aminoácido 816 en una sustitución de aspártico por valina (D816V) descrita en mastocitomas y seminomas. (Kitayama, H. y col. 1995). La expresión de Kit^{D814Y} en líneas celulares de mastocitos es suficiente para promover la proliferación y diferenciación (Piao, X. y Berstein, A. 1996). Otra característica de esta mutación es que es capaz de promover la degradación de SHP-1 y que es capaz de reconocer otros substratos *in*

vitro (Piao, X. y col. 1996). En nuestro trabajo demostramos que en las células espermatozógenas de los ratones KDY tienen menos SHP-1, lo que sugiere que el receptor Kit^{D814Y} es funcional. Por otra parte evaluamos el patrón general de fosforilación y únicamente tres proteínas se observan más fosforiladas una de ellas resulto ser PLC γ -1 mientras otra corresponde a Kit y una tercera proteína que no pudimos identificar. Estos resultados lo que nos sugieren es que no hay una alteración dramática y/o significativa en la fidelidad de la vía de traducción de Kit.

Se ha demostrado que la vía de la PI3K mediada a través de c-Kit es necesaria para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Blume-Jensen, P. y col., 2000) además de que la proliferación celular mediada a través de c-Kit esta asociada a la activación de la PI3K (Linnekin, D. 1999; Blume-Jensen, P. y Hunter, T. 2001). Por estos datos, una posibilidad de la expresión de Kit^{D814Y} es que se activara la vía de PI3K causando un aumento en la proliferación. Sin embargo nosotros no observamos dicho aumento, y en los análisis hechos mediante inmuno detección en membranas (*western blot*) no observamos un aumento en los niveles de fosforilación de p85 α en las células espermatozógenas de ratones dobles transgénicos comparados con los extractos celulares de ratones kit^{D814Y}-*loxP*. A pesar de que observamos expresión de Kit en las espermatozonias de ratones dobles transgénicos no

observamos un aumento en la proliferación, estos resultados sugieren que se requiere de un nivel de expresión mas alto de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ en las espermatogonias para poder observar un efecto relacionado con la proliferación.

La mutante KDY por otra parte presentó otro fenotipo; que fue el alterar la diferenciación del espermatozoide, lo cual condujo en los casos mas severos a la esterilidad. En este trabajo se demostró que la población de ratones transgénicos que expresaron en las células espermatogénicas mayor cantidad de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ (4.5 veces más) era la población de ratones estériles. Sin embargo el bajo porcentaje de ratones dobles transgénicos (13%) estériles sugiere que se requiere de un nivel elevado de expresión de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ para observar un efecto en la morfología del espermatozoide causando así la esterilidad. Debido a que solamente un trece por ciento de los ratones dobles transgénicos fuese estéril sugiere que es necesario una completa escisión para observar un efecto dramático en la fertilidad.

La morfogénesis del espermatozoide es un proceso complejo donde se pueden distinguir al menos tres estados: que son la proliferación y mantenimiento de células precursoras (espermatogonias), la meiosis y la espermiogénesis. En los ratones KDY se vio afectada únicamente la espermiogénesis, la cual incluye la condensación y formación del núcleo; el desarrollo del acrosoma y el flagelo terminando con la eliminación del cuerpo residual. Se observó que la formación del núcleo estaba

alterada, observamos hipoplasia acrosomal y que el flagelo se enrollaba alrededor de la cabeza del espermatozoide. Análisis ultraestructurales indicaron que la espermiogénesis se encuentra afectada durante la fase de elongación. Las malformaciones en el núcleo de las espermatidas se encontraron asociadas a la desorganización del *manchette* y al anillo perinuclear. El *manchette* es una estructura que se encuentra presente durante el proceso de elongación de las espermatidas, además se ha observado que la posición anormal de el *manchette* en algunas mutantes o en tratamientos con diferentes químicos, correlaciona con deformaciones del núcleo en las espermatidas, también se ha propuesto que el *manchette* es importante para la correcta formación de la cabeza del espermatozoide (Meistrich 1993; Russell LD y col., 1991). Un ejemplo de una mutación bien caracterizada en la que se encuentra el núcleo de las espermatidas deformado y el flagelo enrollado de manera similar a la mutante descrita en este trabajo es la mutante en *azh* (Meistrich, M. L., y col., 1990). El gene afectado en la mutante de *azh* corresponde a *Hook1*. La proteína HOOK1 pertenece a la familia de proteínas que unen microtúbulos y a diferentes organelos. Se ha sugerido que HOOK1 podría establecer contactos entre el *manchette* y la membrana nuclear (Mendoza-Lujambio y col. 2002). Debido a que en los ratones KDY los microtubulos del *manchette* a pesar de estar formados correctamente están desorganizados con respecto al anillo perinuclear, una posibilidad es que dentro de los posibles blancos de la expresión ectópica de $\text{Kit}^{\text{D814Y}}$ se encuentre HOOK1. Sin embargo a

diferencia de la mutante en *azh*, en la mutante KDY el *manchette* no se localiza de manera ectópica además, de que no observamos invaginaciones del *manchette* en el núcleo del espermatozoide, por otra parte nosotros observamos defectos en la formación del acrosoma, por lo que la mutante descrita en este trabajo presenta una nueva condición genética en donde existe malformación del *manchette* que correlaciona con la deformación de la cabeza, lo que sugiere la participación de esta estructura es necesaria para la correcta formación del espermatozoide. Mas aún la correlación con los defectos morfológicos observados en los espermatozoides con la activación de PLC γ -1 sugiere que el *manchette* tienen una función en la elongación nuclear. A pesar de que observamos que el flagelo se enrolla en los espermatozoides de los ratones KDY la estructura molecular de este se encuentra ensamblada correctamente. Actualmente se desconoce la función del *manchette* en los defectos observados en otras mutantes en el flagelo. Nuestros resultados sugieren que no se lleva a cabo correctamente la eliminación del citoplasma residual lo que podría causar que el flagelo no se pueda extender, o bien por el contrario que el enrollamiento del flagelo no permite la correcta eliminación del citoplasma.

Los resultados de este trabajo muestran la expresión de la proteína Kit^{D814Y} en los espermatozoides maduros y en las espermátidas. En las espermátidas observamos la localización de la proteína Kit^{D814Y} asociada

a los gránulos proacrosómicos y en estadios posteriores alrededor de núcleo posiblemente en el sistema acrosómico de las espermatidas elongantes. Este resultado es interesante ya que también observamos expresión de PLC γ -1 en las mismas regiones subcelulares, además de que en estos estadios del desarrollo la región anterior de las espermatidas es la que se encuentra afectada acompañada de la hipoplasia acrosomal. Se ha propuesto que la región entre el acrosoma y el núcleo, al que se denomina acroplaxoma, es importante para la organización del acrosoma y el núcleo (Russell, L. D., y col. 1986). El acroplaxoma está constituido por filamentos de actina y se ha propuesto que mediante el anclaje del acrosoma modula las fuerzas responsables de la morfogénesis de la cabeza del espermatozoide (Kierszenbaum y col 2003; Kierszenbaum y col 2004). Adicionalmente el complejo acrosómico mantiene una relación estructural con el manchete a través del anillo perinuclear, por lo que la localización subcelular de Kit^{D814Y} concuerda con el defecto en la organización del manchete y además existe una correlación con el fenotipo descrito. Es interesante que la tinción para detectar filamentos de actina en espermatozoides maduros de los ratones KDY resultó ser negativa en la región subacrosomal en la cabeza del espermatozoide, lo que sugiere una regulación anormal de la polimerización de actina durante la espermiogénesis, posiblemente durante la sobreexpresión de Kit^{D814Y}.

Los efectos descritos en la morfología del espermatozoide se deben a la activación ectópica de la vía de señalización de c-Kit.

Observamos un decremento en la concentración de SHP-1 en los ratones KDY, lo que sugiere que vía de Kit^{D814Y} se encuentra activa, este decremento en SHP-1 podría estar involucrado en el fenotipo de los ratones KDY. Sin embargo las mutaciones en SHP-1 descritas en ratón (Paulson y col 1996) no se han analizado con respecto a la fertilidad debido estas mutaciones causan mortalidad en estadios tempranos del desarrollo. Análisis bioquímicos indicaron que de las proteínas de la vía de traducción de c-kit probadas, la que se observó más fosforilada fue PLC γ -1. A pesar de que no podemos descartar la posibilidad de que otros sustratos se encuentren más fosforilados, los datos correlativos sugieren que los efectos en la espermiogénesis están relacionados a la activación de PLC γ -1. De manera interesante pudimos observar mediante ensayos de inmunocitoquímica que PLC γ -1 se expresa en todas las células espermatogénicas, sin embargo la fosforilación de esta proteína se localiza únicamente en ciertos estadios de la espermatogénesis en la membrana perinuclear de los espermatocitos en preleptoteno y durante la fase de elongación de las espermátidas (estadios 9 al 14). Esta localización una vez más concuerda en tiempo y espacio con la presencia del *manchette*, lo que sugiere una posible participación de PLC γ -1 durante la fase de elongación de las espermátidas. PLC β 1 también tiene una localización nuclear (Irvine, 2003) y se ha observado que participa en procesos de diferenciación y proliferación; sin embargo este trabajo es el primer reporte en donde se muestra *in vivo* la localización de PLC γ -1

fosforilado en el núcleo. También resulta interesante la posible participación de PLC γ -1 en la morfogénesis de la cabeza del espermatozoide porque coincide en los mismos estadios donde se expresa tr-kit en la espermiogénesis (Albanesi C., 1996). Kit es capaz de unir y fosforilar PLC γ -1, aunque diferentes resultados sugieren que esto no induce la activación de la vía de PLC γ -1 (Herbst y col, 1991; Blume-Jensen y col 1994; Linnekin, 1999). Además se ha demostrado que la fosforilación de PLC γ -1 en el residuo 783 por PDGF, es importante para la interacción de PLC γ -1 con el citoesqueleto modulando la polimerización de actina (Yu y col., 1998; Pei y Williamson 1998) El incremento en la fosforilación de PLC γ -1 promueve el desensamblamiento de los filamentos de actina en células 3T3 . Por lo que los resultados presentados nos permiten especular que la mutante de c-kit , Kit^{D814Y} aumenta la fosforilación de PLC γ -1, produciendo alteraciones en la dinámica de los filamentos de actina presentes en el acroplaxoma, causando de esta manera la malformación de las espermáticas afectando a su vez la espermiogénesis. Además se ha descrito anteriormente por Sette y col. (1998) que tr-kit es capaz de inducir la fosforilación de PLC γ -1 en oocitos, por lo que nuestros datos correlacionan con una posible función de tr-kit durante la espermiogénesis mediada a través de PLC γ -1.

Debido a que tr-kit no tiene el dominio de unión a ATP se ha propuesto que es necesaria otra cinasa para su activación en los oocitos y que esta cinasa podría ser c-Kit que se encuentra acumulado en el

oocito maduro, por lo que Kit^{D814Y} podría mimetizar en los ratones KDY a esa cinasa y sobre activar a tr-kit el cual a su vez activaría a PLC γ -1 causando un efecto en la morfogénesis de los espermatozoides. A pesar de que observamos un incremento en la fosforilación de PLC γ -1 en los ratones KDY este incremento únicamente se observó en los mismos tipos celulares que en ratones control; esto sugiere que se requieren de otros componentes además de Kit^{D814Y} para activar a PLC γ -1 en las demás células espermatogénicas, una posibilidad es que tr-kit sea esta componente. Para poder evaluar las diferentes posibilidades descritas sería necesario determinar si tr-kit se encuentra mas fosforilado en las espermátidas de ratones KDY.

CONCLUSIONES

En este trabajo se produjo una línea de ratones mutantes que se encuentra afectada en los últimos estadios de la espermiogénesis. Esta mutante puede servir como modelo de estudio de la espermiogénesis, y la participación de vías de traducción en este proceso. A pesar de que la sobreexpresión de Kit^{D814Y} y el efecto en el aumento en la fosforilación de PLC γ -1 fue provocado de manera artificial, permitieron evidenciar la importancia de la vía de traducción de PLC γ -1 durante la espermiogénesis y la posible correlación con tr-kit. Sin embargo queda por evaluar si tr-kit se encuentra mas fosforilado en las espermátidas del ratón doble transgénico estéril y si tr-kit es el responsable de la activación de PLC γ -1 durante la espermiogénesis

MATERIAL Y METODOS

Generación de ratones transgénicos

Para expresar específicamente Kit^{D814Y} en la línea germinal se utilizó el sistema de Cre/loxP. Con la finalidad de generar la línea de transgénicos, *kit^{D814Y}-loxP*, se introdujo el transgen a células ES con el vector pCCALL (Lobe y col. 1999). Este vector contiene al gene del reportero LacZ flanqueado por los sitios loxP y de manera inmediata a la secuencia de loxP el sitio Xho I permitió la inserción de la secuencia codificante de *kit^{D814Y}*. Las células ES transgénicas se utilizaron para agregaciones con blastocistos, y se seleccionaron las quimeras que transmitieran a la línea germinal. El ratón transgénico fundador se expandió y mantuvo cruzando con hembras CD1. En la línea transgénica *kit^{D814Y}-loxP* obtenida el gen reportero *lacZ* debe expresarse de manera ubicua antes de la recombinación mediada por Cre.

Para establecer el genotipo de las crías de las cruzas entre *TNAP^{Cre}/*, *kit^{D814Y}-loxP* se realizaron PCR de DNA genómico obtenido de biopsias de orejas en buffer de lisis.

Para amplificar el reportero *lacZ* se utilizaron los oligos:

LacZ upper 5'-GGAAAACCCTGGCGTTACCC

LacZ lower 5'-AGATGGGCGCATCGTAACCG

Y se obtiene un fragmento de 250 pares de bases (pb).

Para amplificar al gene *cre* se utilizaron los oligos:

PGKpA/U1 5'-TAAGGGCCAGCTCATTCTCC

TNAP/3x6L 5'-CACGTCGATGGCCGCTCTA

Y se obtiene un fragmento de 262 pb.

Tinción para detectar la actividad de β -galactosidasa

Embriones de 13 dpc, ovarios de hembras de 2 meses de edad y testículos de ratones de 8, 14, 20 y 60 días después del nacimiento se fijaron en la solución de fijación en buffer de fosfatos salino (PBS), durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron 2 veces con la solución de lavado y se incubaron de 5 a 12 horas con la solución de tinción en PBS.

Los tejidos teñidos se fijaron con formaldehído 4% en buffer de fosfatos salino durante 12 horas a 4°C. Se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 10 μ m de grosor. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Ehrlich y se observaron con microscopia de luz en el microscopio LEICA DM L, las fotos se tomaron con la cámara digital Cool Pix 990.

Tinción de Hoescht para detectar núcleos en oocitos

Se obtuvieron oocitos de 0.5 dpc de cruzas realizadas entre ratones KDY y hembras silvestres. Los oocitos se obtuvieron en PBS y se fijaron con fijador de Carnoy durante 30 minutos a temperatura ambiente. El colorante Hoescht 33258 se disuelve en solución salina de Hank (pH 7.0) a una concentración final de 0.05mg/ ml y se agrego a los oocitos por 12 horas . Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS y se observaron las células con luz UV.

Tinción de actina en espermatozoides

Los espermatozoides se obtuvieron de epidídimo en PBS. Se fijaron en la solución de fijación y tinción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces 5 minutos cada ocasión en medio de espermatozoides.

Inmunodetección en espermatozoides

Espermatozoides de epidídimo se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se diluyeron 1:1 con paraformaldehído al 10% en PBS 10 minutos. Se pusieron 150µl en cada pozo de la laminilla (Cel-line/Serie Scientific Co.) y se dejaron sedimentar por 90 minutos a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron lavados con PBS en intervalos de 5 minutos. Se dejaron secar a temperatura ambiente. Se agregó Tritón X-100 al 0.1% en PBS e incubaron por 10 minutos. Se realizaron lavados 3 veces con PBS en intervalos de 5 minutos. Posteriormente se bloquearon con suero de cabra al 1.5%. Y se agregaron 100 µl del anticuerpo de c-kit (H-300) diluido 1:200 . Se incubo durante 12 horas a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS en intervalos de 5 minutos, e incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (Goat anti-rabbit, A-11012) en una dilución 1:100 durante 90 minutos. Se lavaron tres veces con PBS y montaron con Citifluor.

Tinción de mitocondrias en espermatozoides

Espermatozoides obtenidos de epidídimo se tiñeron con dihidro-rodamina 123 (1:1000) por 30 minutos en una cámara húmeda. Se realizaron dos lavados con PBS. Y se observaron en el confocal.

Tinción de núcleos en espermatozoides

Espermatozoides obtenidos de epidídimo en PBS se fijaron durante 5 minutos en acetona. Se tiñeron con una solución de Sytox al 3% en PBS con

suero de cabra al 10%. Se lavaron 3 veces con PBS. Y se montaron y observaron con microscopia confocal.

Microscopia de luz y de transmisión electrónica

De ratones KDY y Kit^{D814Y}-loxP de 1 año de edad aproximadamente se obtuvieron testículos y epidídimos y se fijaron durante 12 horas a 4°C con glutaraldehído al 2% en buffer de cacodilatos al 0.2%. Posteriormente se lavaron con buffer de cacodilatos y se post-fijaron con osmio.

Posteriormente se deshidrataron con series de etanol y finalmente se incluyeron en EPON 812. Los cortes semifinos y ultrafinos se cortaron en ultratomo Nova. Los cortes semifinos (1µm) se tiñeron con azul de toluidina. Mientras que los cortes finos (60 a 90 nm) se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo alcalino y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM900.

Inmunocitoquímica en cortes de parafina

Los testículos se fijaron en el fijador de Bouin's durante 12 horas a temperatura ambiente, posteriormente se deshidrataron con series de etanol y xilol e incluyeron en parafina. Cortes de 10µm de grosor se desparafinaron y rehidrataron con series de etanol y xilol. Las proteínas c-kit, PLCγ-1 y fosfo-PLCγ-1 se detectaron utilizando el Vectastain Elite ABC kit .

Inmunodetección de proteínas.

Las células espermatozógenas se aislaron de túbulos seminíferos en PBS. Las células espermatozógenas se lisaron durante 30 minutos a 4°C en buffer de lisis, recuperándose las proteínas solubles. Las proteínas se

cuantificaron con el método de Bradford. Se realizaron geles al 7 ó 10% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45µm. Las membranas se bloquearon con BSA o leche en buffer Tris salino-tween (TBST). Se incubaron con el anticuerpo primario diluído en TBST durante 12 horas a 4°C. Después de tres lavados de 30 minutos cada uno con TBST se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. La visualización de las proteínas se realizo con ECL con las especificaciones del proveedor.

Medios y soluciones

Buffer de Lisis para obtención de ADN genómico.

KCl	50mM
Tris pH 8.3	10mM
MgCl ₂	2mM
Gelatina	0.01%
NP-40	0.45%
Tween-20	0.45%
Proteinasa K	100µg/ml

PBS

NaCl	137mM
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.3mM
KH ₂ PO ₄	1.4mM

Solución de fijación

Formaldehído	1%
--------------	----

Glutaraldehído	0.2%
MgCl ₂	2mM
EDTA	5mM
Nonidet P-40	0.02%

Solución de lavado

MgCl ₂	2mM
EDTA	5mM
Nonidet P-40	0.02%
Deoxicolato de sodio	0.01%

Solución de tinción

MgCl ₂	2mM
Nonidet-40	0.02%
Deoxicolato de sodio	0.01%
K ₃ Fe(CN) ₆	5mM
K ₄ Fe(CN) ₆	5mM
5-bromo-4cloro-3indoil b-D -Galactosidasa (X-gal)	1mg/ml

Fijador Carnoy

Metanol : ácido acético, 3:1.

Solución de Hank (pH 7.4)

KCl	5.4mM
Na ₂ HPO ₄	0.3mM
KH ₂ PO ₄	0.4mM

NaHCO ₃	4.2mM
CaCl ₂	1.3mM
MgCl ₂	0.5mM
MgSO ₄	0.6mM
NaCl	137mM
D-glucosa	5.6mM

Solución de fijación y tinción de actina

En 1 ml de paraformaldehído al 4% agregar 1 µl de Tritón X-100.

Diluirlo 1:1 con medio de espermatozoides y agregar Alexa faloidina-rodmina.

Buffer de Cacodilatos

Cacodilato de Sodio	20.15 g
HCl	0.1 ml

En 250 ml de agua bidestilada.

Azul de toluidina

Borato de Sodio	1%
Azul de toluidina	0.5%

Fijador de Bouin

Acido pícrico saturado	85ml
Formalina (formaldehído al 40%)	10ml
Acido acético glacial	5ml

Buffer de lisis para proteínas

HEPES pH 7.5	25mM
--------------	------

NaCl	150mM
MgCl ₂	1.5mM
EDTA	0.2mM
Tritón X-100	0.5%
PMSF	1mM
BGP	10mM
NAF	10mM
NaVO ₄	200μM
Leupeptina	1μg/ml
Antipaina	50 μg/ml
DTT	0.3mM

TBST

Tris pH 7.5	20mM
NaCl	150mM
Tween 20	0.05%

Anticuerpos

	Marca	Dilución
Anti c-kit (H-300)	Santa Cruz	(1:250)/BSA
Anti-b-tubulina(H-235)	Santa Cruz	(1:250)/Leche
Anti-fosfo-tirosina (4G10)	Upstate	(1:4000)/BSA 0.1%
Anti-p85a (Z-8)	Santa Cruz	(1:100)/BSA1%
Anti-fosfo-PLCg-1 (H-162)	Santa Cruz	(1:250)/Leche

Anti-fosfo-STAT3 (44-384) Biosource	(1:800)/Leche
Anti-fosfo-ERK (E-4) Santa Cruz	(1:500)/Leche
Anti-SHP-1 (C-19) Santa Cruz	(1:250)/Leche
Anti-c-kit (M-14) Santa Cruz	
Anti-PLCg-1 (1249) Santa Cruz	

BIBLIOGRAFIA

- Albanesi C, Geremia R, Giorgio M, Dolci S, Sette C. 1996. A cell-and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated *c-kit* protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122, 1291-1302.
- Beechey CV, Searle AG. 1983. Contrasted a steel allele in the mouse with intermediate effects. *Genet. Res.* 42, 183-191.
- Behringer R, Magnuson T. 2000. *Genesis* The journal of genetics and development Special issue Tissue specific expresión of cre recombinase in mice. 2000 Behringer R, y Magnuson T. eds Wiley-liss 26(2):99-166.
- Bellvé AR. 1993 Purification culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods in Enzymol* 225:84-113.
- Besmer P. 1991 The kit ligand encoded at the murine Steel locus: a pleiotropic growth and differentiation factor. *Curr Opin Cell Biol.* 3(6):939-946.
- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. 1993. The kit-ligand (steel factor) and its receptor *c-kit/W*: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* :125-137.
- Blume-Jensen P, Ronnstrand L, Gout I, Waterfield MD, Heldin CH. 1994. Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. *J Biol Chem.* 269(34):21793-21802.

- Blume-Jensen, P., Jiang, G., Hyman, R., Lee, K.F., O'Gorman, S., Hunter, T., 2000. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat. Genet.* 24 (2), 157-162.
- Blume-Jensen P, Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411 (6835), 355-365.
- Clermont Y, Oko r, Hermo L. 1993 Cell biology of mammalian spermatogenesis. In DeJardinsC, Ewing LL, editors. *Cell and molecular biology of the testis*. New York Oxford University press pp 332-376.
- De Felici M. 2000. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *Int J Dev Biol.* 44(6):575-80.
- Eddy ME, O'Brien DA. 1994. *The physiology of reproduction second edition* Knobil E y Nelly J.D editors. Raven Press Ltd.New York. The spermatozoon pp29-77
- Gilbert SF. 2003. *Developmental Biology* Sinauer Associated Ed. Pp.
- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 110 (2):521-528.
- Goto T, Monk M. 1998. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(2):362-378.
- Hamilton DL, y AbemskiK. 1984. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178:481-486.

- Herbst R, Lammers R, Schlessinger J, Ullrich A. 1991 Substrate phosphorylation specificity of the human c-kit receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* Oct 25;266(30):19908-19916.
- Herrada G, Wolgemuth DJ. 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J Cell Sci.* 110 (Pt 14):1543-1553.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lasy, E. 1994. Manipulating the mouse embryo. Haraste, E ed. Laboratory manual Cold Spring Harbor Lab Press. Pp.
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. 1993 The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol.* 157(1):100-109.
- Inselman A, Handel MA. 2004. Mitogen-activated protein kinase dynamics during the meiotic G2/MI transition of mouse spermatocytes. *Biol Reprod.* 71(2):570-578
- Irvine, R F. 2003. Nuclear lipid signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4:1-12.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2003. The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res.* 103(3-4):337-344.
- Kierszenbaum AL, Tres LL, Rivkin E, Kang-Decker N, van Deursen JM. 2004. The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin

- Va/Rab27a/b- containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. *Biol Reprod.* 70(5):1400-1410.
- Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, Angeles M, Whitlow SR, Manova K, Besmer P. 2000. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J.* 19(6):1312-1326.
 - Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, Sugahara H, Mitsui H, Kanayama Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y, 1995. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85:790-798.
 - Krestser DM, Kerr JB. 1994 *The physiology of reproduction second edition* Knobil E y Nelly J.D editors. Raven Press Ltd. New York. The cytology of the testis. Pp1177-1290.
 - Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y 1998 Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in *Sl/Sl^f* mice *Dev Biol* 126 71-79
 - Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. 1992 Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(14):6232-6236.
 - Linnekin, D. 1999. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(10):1053-1074.

- Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M, Nagy A. 1999. Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol.* 208(2):281-92.
- McLaren A. 1992. Development of primordial germ cells in the mouse. *Andrologia.* 24(5):243-247.
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Russell LD. 1990. Abnormal manchette development in spermatids of *azh/azh* mutant mice. *Am J Anat.* 188(1):74-86.
- Meistrich ML. 1993. Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. In: De Kretser, D. editor. *Molecular biology of the male reproductive system.* Academic Press New York pp.67-97.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 111(8):483-488.
- Mendoza-Lujambio I, Burfeind P, Dixkens C, Meinhardt A, Hoyer-Fender S, Engel W, Neesen J. 2002. The *Hook1* gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (*azh*) mutant mouse. *Hum Mol Genet.* 11(14):1647-1658.
- Nagy A, Moens C, Ivanyi E, Pawling J, Gertsenstein M, Hadjantonakis AK, Purity M, Rossant J. 1998 Dissecting the role of *N-myc* in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol.* 8(11):661-664.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring *Genesis* 26:99-109.

- Paronetto MP, Venables JP, Elliott DJ, Geremia R, Rossi P, Sette C. 2003 Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLCgamma1 and Sam68. *Oncogene*. 22(54):8707-8715.
- Paulson RF, Vesely S, Siminovitch KA, Bernstein A. 1996 Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat Genet*. 13(3):309-315.
- Peters J, Ball ST, Loutit JF, 1987. A new steel allele which does not lead to dilution of coat color. *Mouse News L*. 77, 125-126.
- Piao X, Bernstein A, 1996. A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells. *Blood* 87:3117-3123.
- Piao X, Paulson R, van der Geer P, Pawson T, Bernstein A. 1996. Oncogenic mutation in the Kit receptor tyrosine kinase alters substrate specificity and induces degradation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93, 14665-14669.
- Pei ZD, Williamson JR. 1998. Mutations at residues Tyr771 and Tyr783 of phospholipase C-gamma1 have different effects on cell actin-cytoskeleton organization and cell proliferation in CCL-39 cells. *FEBS Lett*. Feb 13;423(1):53-56.
- Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R. 2000. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest*. 23(9):609-615.
- Rossi P, Dolci S, Sette C, Geremia R. 2003. Molecular mechanisms utilized by alternative c-kit gene products in the control of

spermatogonial proliferation and sperm-mediated egg activation.

Andrologia. 35(1):71-78.

- Russell LD, Weber JE, Vogl AW. 1986. Characterization of filaments within the subacrosomal space of rat spermatids during spermiogenesis. *Tissue Cell*. 18(6):887-898.
- Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. 1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat*. 188(1):21-30.
- Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML. 1991. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am J Anat*. Oct;192(2):97-120.
- Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R, Rossi P. 1997. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development*. 124(11):2267-2274.
- Sette C, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. 1998. Involvement of phospholipase Cgamma1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the C-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *J Cell Biol*. 142(4):1063-1074.
- Sette C, Paronetto MP, Barchi M, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. 2002. Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. *EMBO J*. 21(20):5386-5395.

- Taylor M. L. y Metcalfe D. D. 2000. Mast cell disorders : kit signal transduction *Hematol. Oncol. Clin North America* 14:1-14
- Tsujimura T, Furitsu T, Morimoto M, Isozaki K, Nomura S, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y. 1994. Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood*. 83(9):2619-2626.
- Voziyanov Y, Pathania S, Jayaram M. 1999. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res.* 27(4):930-941.
- Yu H, Fukami K, Itoh T, Takenawa T. 1998. Phosphorylation of phospholipase Cgamma1 on tyrosine residue 783 by platelet-derived growth factor regulates reorganization of the cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 243(1):113-122.

RESEARCH ARTICLE

Ectopic Expression of Kit^{D814Y} in Spermatids of Transgenic Mice, Interferes With Sperm Morphogenesis

Denhí Schnabel,¹ Laura Ramírez,¹ Marina Gertsenstein,² Andras Nagy,² and Hilda Lomeli^{1*}

Kit is a receptor tyrosine kinase that plays a fundamental role during the development of germ cells. Additionally, a truncated product, tr-kit, expressed in haploid spermatids and mature spermatozoa can induce parthenogenetic activation when microinjected into mouse eggs, through the activation of PLC γ -1. In this work, we induced ectopic expression of a mutated Kit protein, Kit^{D814Y} during germ cell development. The in vivo expression of this mutant in spermatids produced malformations in mature spermatozoa, and in the most severe cases, sterility. Ultrastructural analysis indicated that condensing spermatids in the transgenic mouse presented a mislocalization of the manchette; a structure that has a crucial role during the elongation steps of spermiogenesis. This morphogenetic phenotype was accompanied by an increased phosphorylation of PLC γ -1 in spermatogenic cells. Interestingly, we also found that, in wild-type testis, PLC γ -1 is specifically phosphorylated in condensing spermatids, coincident with the timing of expression of tr-kit in spermiogenesis. We propose that alterations of PLC γ -1 activity artificially promoted by ectopic Kit^{D814Y} expression are related to the abnormalities of spermiogenesis. Our observations suggest that PLC γ -1 activity could be involved in the shaping of spermatozoa. *Developmental Dynamics* 000:000-000, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Kit; spermatogenesis; differentiation; Kit^{D814Y}; phospholipase C γ -1; transgenic mice; manchette

Received 30 June 2004; Revised 19 October 2004; Accepted 19 October 2004

INTRODUCTION

Fu

The *c-kit* gene encodes a receptor tyrosine kinase member of the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor subfamily. This subfamily is characterized by an extracellular domain containing five immunoglobulin repeats and a cytoplasmic kinase domain, which is divided into two subdomains: an ATP-binding site and a phosphotransferase domain (Besmer et al., 1993). Signaling by Kit occurs upon binding to its ligand (Kit1),

which induces dimerization and autophosphorylation of the receptor followed by the phosphorylation of different substrates. Downstream signal transduction components activated by Kit include the p85 α subunit of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-kinase); Src-related kinases such as Lyn, Fyn, and c-Src; components of the JAK/STAT pathway; and adaptor proteins such as SOCS1, GRB2, and GRB7. Interactions of Kit with other transducers such as phospholipase

C γ -1 (PLC γ -1) and the Ras-GTPase-activating protein also have been observed, but the activation of the corresponding pathways has not been demonstrated. Negative regulators of Kit function are the protein kinase C (PKC), the SH-2-containing tyrosine phosphatase-1 and -2 (SHP-1 SHP-2), and the SH2-containing inositol phosphatase (SHIP; Linnekin, 1999; Taylor and Metcalfe, 2000).

Kit and its ligand are encoded at the dominant *white spotting* (*W*) and the

AQ9.

AQ8

¹Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

²Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

Grant sponsor: DGAPA-UNAM; Grant number: IN213602-3; Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 40336-Q.

*Correspondence to: Hilda Lomeli, Departamento de Fisiología Molecular y Genética de Desarrollo, Instituto de Biotecnología/UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, México. E-mail: hilda@ibt.unam.mx

DOI 10.1002/dvdy.20292

Published online 00 Month 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

steel (*Sl*) loci, respectively (Chabot et al., 1988; Zsebo et al., 1990). Mutations at these loci result in developmental defects mainly affecting three migratory lineages: pigment cells, hematopoietic cells, and germ cells. Inactivating mutant alleles of *c-kit* frequently display as loss of these cell lineages (Besmer et al., 1993). In the case of the germ lineage, this loss has been associated to impaired migration and decreased cell survival of mutant cells (Dolci et al., 1991; Pesce et al., 1993; Buehr et al., 1993). The Kit receptor also plays additional roles in further stages of the development of the germ cell lineage, because both oogenesis and spermatogenesis become affected in weak *W* and *Sl* alleles. For example, in *Sl^{17H}* mice, spermatogenesis is severely affected, but oogenesis is normal (Peters et al., 1987). In contrast, *Sl^{panda}*, *Sl^r*, and *Sl^{con}* mutations impair female fertility, whereas males are fertile (Beechey and Searle, 1983; Kuroda et al., 1988; Huang et al., 1993). These observations indicate that Kit participates in several processes during the development of germ cells and gametes, involving both cell proliferation and survival of the earliest precursor cells, as well as differentiation of postnatal cells.

The participation of Kit in gametogenesis is in agreement with its expression pattern. This receptor is first expressed in migratory primordial germ cells (PGC) from day 7.5 postcoitum (7.5 dpc) to 13.5 dpc (Manova and Bachvarova, 1991). In the ovary, Kit is expressed in primordial oocytes and growing oocytes throughout follicle development and in theca cells (Horie et al., 1991). In the testis, *c-kit* expression is restricted to spermatogonia, primary spermatocytes, and Leydig cells (Sorrentino et al., 1991). Additionally, a truncated Kit product, tr-Kit, is specifically expressed in males at postmeiotic stages and present in mature spermatozoa (Albanesi et al., 1996). The tr-Kit corresponds to the phosphotransferase domain and the cytoplasmic catalytic tail of full-length Kit (Rossi et al., 2003). This signaling molecule has been shown to induce parthenogenetic activation when microinjected into mouse eggs, suggesting that it could play a role in fertilization (Sette et al.,

1997). It has been demonstrated that tr-kit is able to induce PLC γ -1 tyrosine phosphorylation and that this activity is required for tr-kit mouse oocyte activation (Sette et al., 1998). The accumulation of tr-kit during spermiogenesis also suggests its participation in this process.

Despite the many *in vitro* studies on the ability of the Kit receptor to activate multiple signaling cascades, the role of individual pathways in the control of developmental processes in the intact animal are only starting to be understood. An interesting example is the demonstration that inhibition of Kit-induced activation of the PI3-kinase in the live mouse is essential for spermatogenesis and oogenesis (Blume-Jensen et al., 2000; Kissel et al., 2000), whereas melanogenesis, hematopoiesis, and PGC development are not affected. This finding indicates that gametogenesis is a sensitive target when Kit function is altered.

Activating mutations in the Kit receptor have also been identified in both rodent and human mast cell leukemia (Kitayama et al., 1995; Blume-Jensen and Hunter, 2001). Expression of these variant forms of Kit in cell lines results in oncogenic transformation (Blume-Jensen and Hunter, 2001). One activating Kit mutation involving the substitution of a tyrosine for aspartic acid at codon 814 (D814Y) has been described in the mouse mastocytoma cell line P815. This mutation confers a dominant-positive activity to the receptor, which upon this conversion exhibits constitutive phosphorylation in the absence of stimulation with Kit1 and causes oncogenic activation, mimicking the human mutation D816V (Piao and Bernstein, 1996; Piao et al., 1996). D816V has been identified in different types of human tumors, including seminomas (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Sakuma et al., 2003). Although the ability of the Kit^{D814Y} mutation to induce excessive proliferation, aberrant differentiation and neoplastic transformation *in vitro* has been demonstrated in different cell lines (Tsujiyama et al., 1994; Kitayama et al., 1995; Piao and Bernstein, 1996), the *in vivo* recapitulation of these phenotypes has not been attempted. The reintroduction of the Kit^{D814Y} mutation to an *in vivo* system could provide insight into the fun-

damental mechanisms underlying regulation of cell growth, migration, and differentiation and further understanding of oncogenesis.

In this work, we generated a transgenic mouse that expresses the D814Y mutation in male haploid germ cells. The *in vivo* expression of this mutant had an effect on spermiogenesis that lead to sterility and malformations in mature spermatozoa. These effects were coincident with an enhanced phosphorylation of PLC γ -1 in spermatogenic cells. Of interest, immunolocalization of phosphorylated PLC γ -1 in wild-type testis revealed that this signaling molecule is specifically activated in condensing spermatids, suggesting that PLC γ -1 activity could be involved in the shaping of spermatozoa.

RESULTS

Activation of Kit^{D814Y} Expression in Germ Cells by Cre-Mediated Recombination

To study the effects of reintroducing the Kit^{D814Y} mutation to an *in vivo* system, we produced a transgenic mouse in which Kit^{D814Y} would be transcribed in germ cells and thereafter in gametes. We used the conditional Cre/loxP gene targeting approach. To activate the Kit^{D814Y} expression, we used the TNAP^{Cre} and the Kit^{D814Y}-loxP transgenic lines. The TNAP^{Cre} line allows the targeting of PGCs for restricted genomic alterations (Lomed et al., 2000); and the Kit^{D814Y}-loxP line, which was generated for the present work as described in the experimental procedures, contains a transgene that allows the expression of the β -geo reporter gene before Cre-mediated excision occurs. Cre excision removes the reporter gene and should induce a strong expression of *kit^{D814Y}* from the pCAGG promoter. Due to the methodology used for the generation of these mice (see Experimental Procedures section), only one Kit^{D814Y}-loxP line was obtained and analyzed for β -galactosidase expression. We found that, in 13 dpc embryos, transgenic expression was not ubiquitous but rather restricted to the heart and somites. Because our previous observations had indicated that β -galactosidase activity could not be

AQ10

AQE

AQ:1

AQ 11

positively assayed in the embryonic gonad, we performed *in situ* hybridization for β -galactosidase in 13 dpc gonads to determine the activity of the transgene in PGC. We found no expression of the transgene in the germ cells at this stage. Testis and ovaries were analyzed by 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactosidase (X-gal) staining. In adult ovaries, oocytes were found negative at all stages. In contrast, spermatogenic cells were efficiently stained in adult testis, where particularly spermatids and spermatozoa showed a strong signal (Fig. 1A), indicating that the transgene was active in postmeiotic germ cells. On the other hand, diploid spermatogenic cell types presented a subtle staining. The analyses of younger testis (8, 10, and 13 days postnatal [dnp]) confirmed that spermatogonia and spermatocytes presented a low activity of β -galactosidase, suggesting that, at diploid stages, the transgene was partially silenced (Fig. 1B).

A segregation analysis of the transgene indicated that it was present in the X chromosome. Transient inactivation of the X chromosome is known to occur in primary spermatocytes during the first meiotic prophase. For some X-linked genes, this transcriptional inactivation persists for the remaining of spermatogenesis, but others become reactivated or activated for the first time in postmeiotic spermatids (Lifschytz and Lindsley, 1972). In the case of the Kit^{D814Y}-loxP line, a significant transgenic expression was found only after this meiotic stage, then X chromosome inactivation could contribute to the silencing of the transgene in spermatocytes, but it should not have a further influence on the transgenic expression during spermiogenesis. In the same way, it should not alter the level of expression found in spermatogonia. Although as mentioned, spermatogonia expressed only weakly the transgene, because the Kit^{D814Y} mutant could be expected to have a strong effect on proliferation, we used the transgenic line to study the effects of the Kit^{D814Y} on spermatogenesis. However, the presence of the transgene in the X chromosome precluded the generation of male homozygous Kit^{D814Y}-loxP mice. Therefore, the phenotypes described

below were observed in hemizygous male transgenic mice.

The mating of the described transgenic lines allowed the generation of double transgenics in which the Kit^{D814Y} gene was activated in male germ cells. Mutant mice derived thereof were designated KDY mutants and genotyped by polymerase chain reaction (PCR) as detailed in methods.

Ectopic Expression of Kit^{D814Y} in Male Germ Cells Causes Sterility and Malformations in Spermatozoa

Each of approximately 100 male KDY mutants was mated with at least four wild-type females to test their fertility. The average progeny size for each mouse was established, and the data were processed using a Chi-squared test. According to this analysis the mutant population presented an abnormal fertility showing statistically significant difference ($P < 0.01$) compared with the wild-type population. Among the mutant mice, only 65% presented a normal CD1 litter size (approximately 12 pups). The rest produced a smaller number of offspring, including a group (13%) in which mice were either completely or nearly sterile (1.68 ± 1.82 pups). The variability of this mutant population, thus, was abnormally high, presenting an average litter size of 6.6 ± 4.63 compared with 12.02 ± 3.98 in the control population. The heterogeneity of this behavior could be explained as a function of the amount of Kit^{D814Y} protein in spermatogenic cells, which in turn depended on the Cre-excision efficiency. This finding was demonstrated by immunoblot analysis of spermatogenic cells that showed an average of 4.6-fold increase of the Kit^{D814Y} protein with respect to the endogenous Kit level in spermatogenic cells of the so-called sterile mice, compared with an average of 1.65 increase in the remaining transgenic population (Fig. 1C). The sterile group of mice were used for the analysis of the present work, whereas single transgenic Kit^{D814Y}-loxP littermates were used as controls.

To confirm that mice considered

sterile were in fact unable to fertilize an oocyte, and thus discard a possible effect on preimplantation development, we mated mutant mice with wild-type females and recovered eggs at 0.5 dpc. Nuclei of eggs exposed to control and mutant sperm were stained. We found that, in the latter group, the two pronuclei that characterize fertilized oocytes were not formed, even though sperm were present in the flushed material (not shown).

Light microscopy observations of testis sections from sterile KDY mice showed apparently normal seminiferous tubules where cells of all spermatogenic stages, including mature spermatozoa, were present. However, sperm from sterile KDY mutants under the light microscope exhibited morphological abnormalities both in the head, which looked loose and expanded (sometimes presenting a club-shape), and in the flagellum, which was partially or completely coiled around the head (Fig. 2A). These defects looked the same in epididymal spermatozoa or in ejaculated sperm. A quantification of the malformations indicated that, in sterile KDY mice, $93 \pm 9\%$ of spermatozoa were abnormal, compared with $24 \pm 15\%$ in control spermatozoa ($n = 13$). In a further characterization, phalloidin-Alexa staining of control and mutant sperm indicated the anomalous absence of F-actin in the head of all abnormal spermatozoa ($n = 4$ sterile mice; Fig. 2B). In contrast anti- β -tubulin staining indicated that this molecule was present in the subacrosomal region as in normal spermatozoa. The flagellum presented an apparently normal staining of both markers. dihydrorhodamine 123 staining showed that mutated sperm had ectopically localized mitochondria in the head, in addition to a normal distribution of these organelles in the middle-piece of the sperm-tail (not shown).

To characterize more precisely the defects of mutant spermatozoa, observations were made using transmission electron microscopy (Fig. 2C). Sections of an epididymal coiled spermatozoa showed that the head and different parts of its tail were embedded in a common cytoplasm, indicating an improper elimination of the residual body. This finding perhaps prevented

F1

F2

AQ12

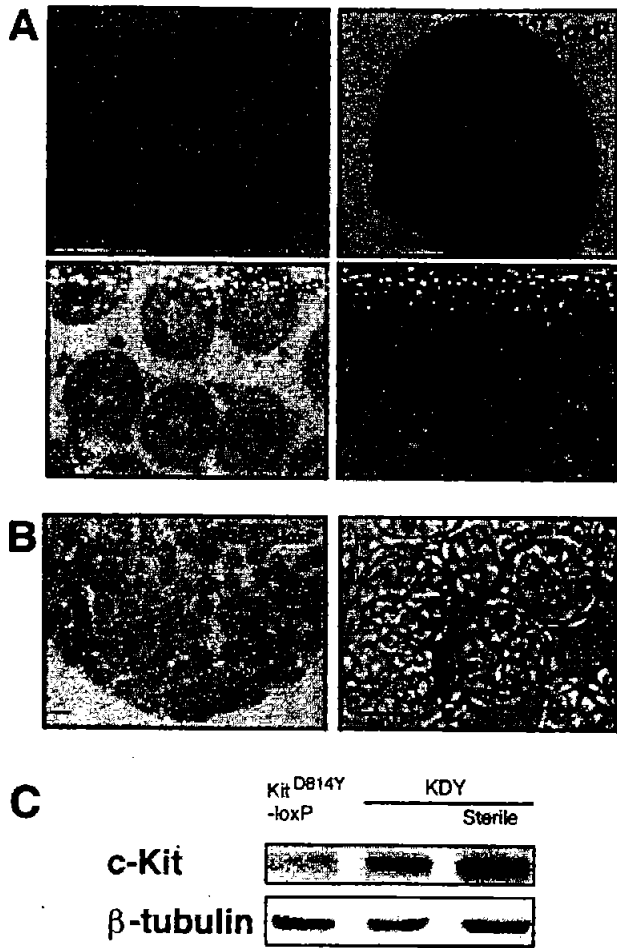


Fig. 1.

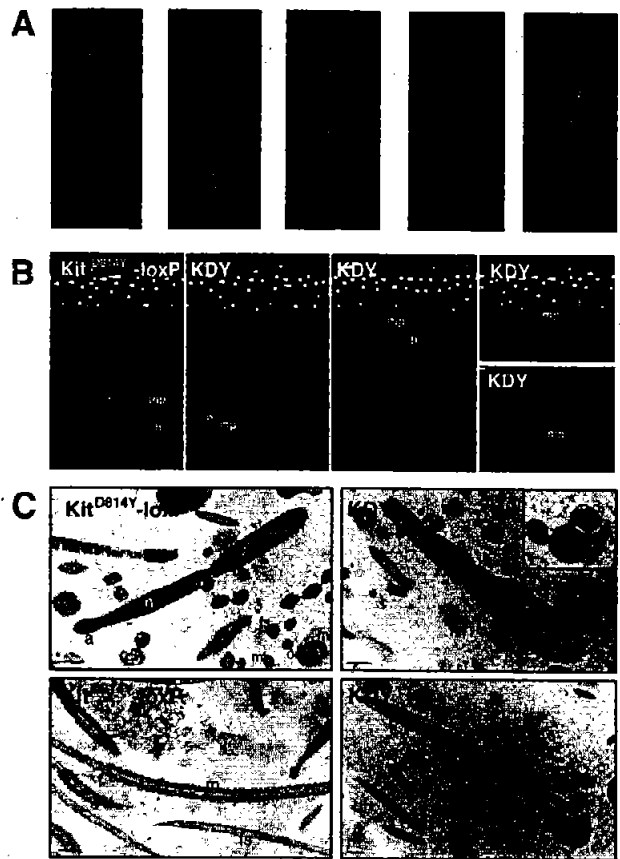


Fig. 2.

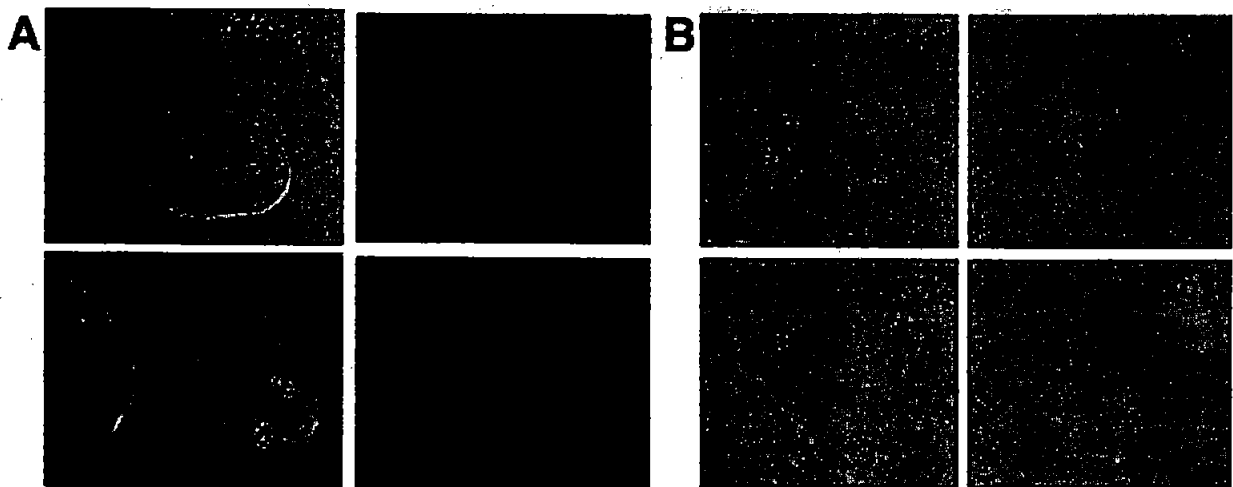


Fig. 3. Spermatogenic cells of KDY mice express Kit^{D814Y}. **A:** Immunohistochemistry in mature sperm preparations shows expression of Kit^{D814Y} in abnormal sperm from KDY mice compared with Kit^{D814Y}-loxP sperm where no expression was detected. **B:** Immunohistochemistry of Kit in testis paraffin sections. In Kit^{D814Y}-loxP sections, only spermatogonia B show Kit endogenous expression. In contrast, in KDY sections, additional positive signal is detected in step 2, 3, 6, and 9 spermatids. In spermatids, the highest expression was localized around the nuclei. B, spermatogonia B; P, pachytene spermatocytes; 2-3, 6, and 9, spermatids step 2-3, 6, and 9, respectively; Sc Sertoli cell. Scale bar = 10 μm in A (applies to A,B).

the normal organization of the head and flagellum and caused the coiling observed by light microscopy. Additional alterations found in the head included acrosomal hypoplasia and a misshapen nucleus. In contrast, the flagellum components (mitochondrion, microtubules, fibrous sheath, and outer dense fibers) were correctly arranged and distributed, and cross-sections of the tail demonstrated a normal axonemal structure (inset in Fig. 2C).

To provide additional evidence that correlated the sperm malformations with the expression of Kit^{DB14Y}, we performed anti-Kit immunostaining in testis sections and sperm from control and sterile mice. We confirmed that defective sperm strongly expressed Kit^{DB14Y} (Fig. 3A). In testis sections, we found that the Kit mutant form was present in all types of haploid germ cells. Remarkably, a particular subcellular localization for Kit^{DB14Y} was found in round spermatids. In early round spermatids, Kit^{DB14Y} was localized in the proacrosomic granules, and in late round spermatids, it was detected outlining the nucleus hemisphere, on the acrosomic membrane (Fig. 3B). On the other hand, none of the diploid types showed a significant expression of Kit^{DB14Y} (Fig. 3B), indicating that excision by Cre of the floxed sequence was insufficient to allow a minimal expression of the mutant gene. Based on this result, we considered it unlikely to find a phenotype associated to these cell types.

Mutant Kit^{DB14Y} Mice Present Abnormalities at Late Stages of Spermiogenesis

Consistent with the expression pattern of Kit^{DB14Y} in the KDY mouse, many of the abnormalities seen in the sterile mice were indicative of a differentiation problem during spermiogenesis. For this reason, we analyzed semithin sections of sterile and control testis to establish the timing of abnormal development. By light microscopy, we were able to identify morphologically normal spermatogonia and spermatocytes at all stages of development and in apparently similar quantities as in control testis. This observation indicated that spermatogenesis proceeded normally throughout cell division and meiosis. Similarly, we found that spermatids progressed through the early stages of spermiogenesis until step 8 of development that corresponds to the transition between round and elongating spermatids. In stage VIII tubules, we found that step 8 round spermatids presented a different nuclear appearance and the typical clumps of chromatin were not observed (Fig. 4A). Spermatids of step 9 appeared clearly defective, with a misshapen and distended nucleus instead of the normal elongating nucleus (Fig. 4A). Transmission electron microscopy yielded additional details on the position of the perinuclear ring of the manchette and microtubular mantle in spermatids from stage X–XI tubules. We observed an asymmetric lateral projection of the

perinuclear ring accompanied by a wider insertion of microtubules of the mantle, confirming the nuclear deformity and the lack or hypoplasia of the acrosome (Fig. 4B).

Constitutively Active Kit^{DB14Y} Increases PLC γ -1 Phosphorylation and Decreases SHP-1

To explore the signaling pathways that are activated in the Kit^{DB14Y} mutant mouse, we wanted to compare the spectrum of tyrosine phosphorylated proteins from transgenic and control spermatogenic cells. Spermatogenic cells at different stages of differentiation can be fractionated as described by Bellvé (1993); however, this method requires a high number of testes. Given that a low percentage of sterile KDY mice were available, fractionation was not possible. For this reason, we used spermatogenic whole cell lysates. The biochemical analysis led to the detection of four proteins that presented a stronger tyrosine phosphorylation in the Kit^{DB14Y} overexpressing spermatogenic cells (Fig. 5A). Among them, a 160-kDa protein was identified as PLC γ -1 with the corresponding antibody, a 140-kDa protein corresponded to Kit, and two proteins of 124 kDa and approximately 40 kDa could not be identified. Additionally, we carried out immunoblot analysis for proteins that are phosphorylated in the Kit signaling pathway. The proteins tested were as follows: p8 α , which could indicate possible changes in the activity of the

Fig. 1. The transgene is expressed in the testes of the Kit^{DB14Y}-loxP line. **A:** Transverse sections of wild-type (Wt) and transgenic (Kit^{DB14Y}-loxP) adult testes stained for β -galactosidase activity. Sections were counterstained with hematoxylin for nucleus detection (upper pictures). **B:** β -Galactosidase-positive signal is detected in the spermatogenic cells of the Kit^{DB14Y}-loxP mouse by the blue staining observed in the different amplifications shown. Transverse sections of transgenic (Kit^{DB14Y}-loxP) 8 days postnatal testes stained for β -galactosidase activity. β -Galactosidase-positive signal is detected in spermatogonia and Sertoli cells of the Kit^{DB14Y}-loxP mouse by the blue staining. **C:** Spermatogenic cells of the double-transgenic mice (KDY) expressed 1.8- or 5-fold increased concentration of the Kit^{DB14Y} protein, compared with the expression in spermatogenic cells of Kit^{DB14Y}-loxP. Upper panel: Anti-Kit immunoblots of whole spermatogenic cells lysates. Lower panel: Membranes were stripped and re-blotted with the anti- β -tubulin antibody to show protein levels. Scale bar = 50 μ m in A,B.

Fig. 2. Sperm morphology is abnormal in the KDY mice. **A:** Nomarski microscopy imaging of KDY mice spermatozoa. 1: Sperm with normal appearance. 2–5: Abnormal flagella with (2) bending tail, (3) looping tail, (4) coiling tail, (4) and (5) head malformations. **B:** Actin filaments staining of Kit^{DB14Y}-loxP and KDY mice. In KDY, sperm actin filaments are observed in the middle piece of the sperm tail but not in the postacrosomal region of the sperm head, as in control sperm. mp, middle piece; h sperm head, postacrosomal region. **C:** Transmission electron photomicrographs of cross- and transverse-sectioned epididymal sperm of Kit^{DB14Y}-loxP and KDY mice. The nuclei and several sections of middle and principal piece of the tail are contained within a common cytoplasm in the KDY sperm; also, acrosome hypoplasia is observed. Cytoskeleton and general organization of the flagella in KDY sperm appear normal; inset shows more detail of KDY sperm. Scale bar = 1 μ m in C. a, acrosome; fs, fibrous sheet; m, mitochondria; mt, microtubules; n, nucleus; odf, outer dense fibers.

F3

 F5
F4

AQ 13

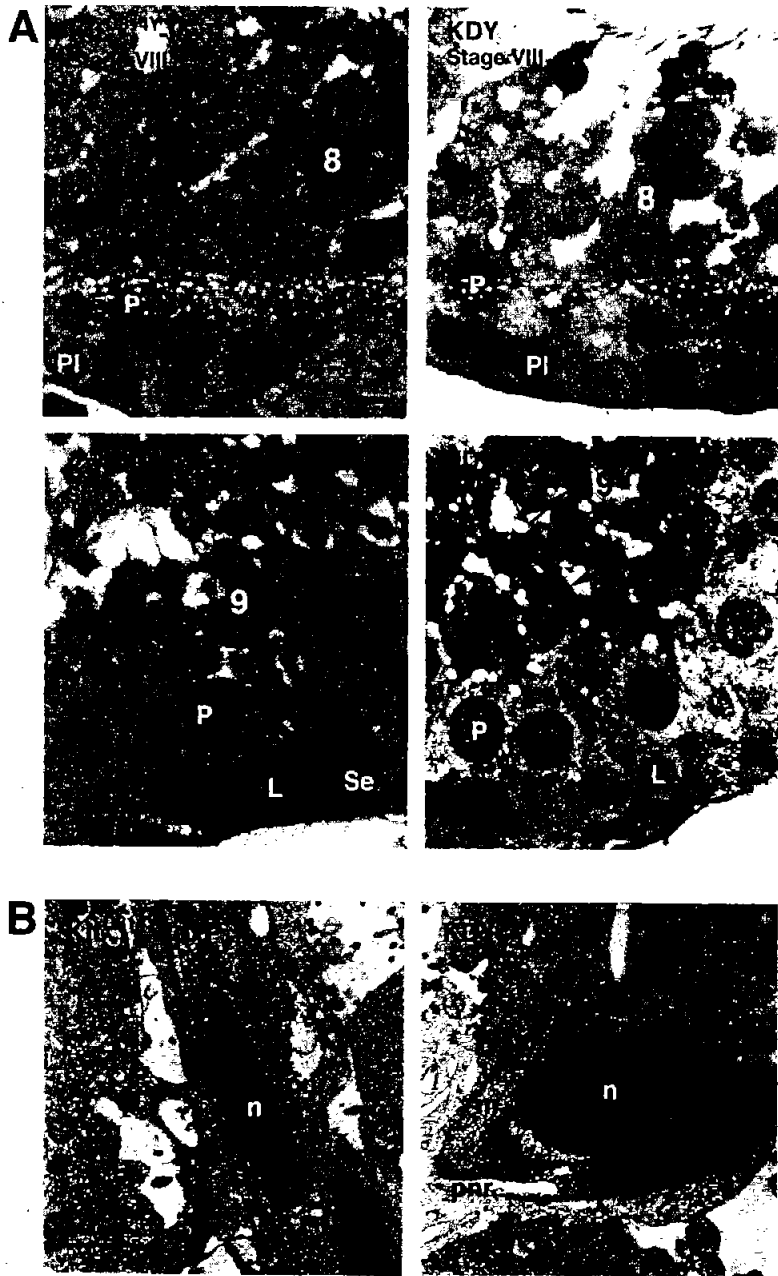


Fig. 4. Malformations during spermiogenesis in the KDY mouse. **A:** Semithin sections of *Kit^{DB14Y-loxP}* and KDY testes at VIII and IX stages. Malformations of spermatids begin in step 8 in KDY. Spermatids of step 9 presented anomalously shaped and distended nuclei (arrows), compared with the normal appearance of the elongating nuclei. PI, pre-leptotene; P, pachytene; L, leptotene; Se, Sertoli cell; 8, spermatids step 8; 9, spermatids step 9. **B:** Transmission electron photomicrographs of step 11 spermatids transversal sections. The KDY mouse shows an asymmetrical lateral projection of the perinuclear ring with a wider manchette and a deformed nucleus. n, nucleus; prr, perinuclear ring; m, manchette. Scale bars = 10 μ m in A, 1 μ m in B.

PI3K pathway; Erk-1, which has been implicated in meiosis progression of spermatogenic cells (Sette et al., 1999); STAT3, which is directly phosphorylated by Kit; and the previously identified PLC γ -1. Through these experiments, we confirmed by

immunoblot analysis (see Experimental Procedures section) that phosphorylation of PLC γ -1 in tyrosine residue 783 was increased (1.9 ± 0.42 ; $n = 4$) in spermatogenic cells of mutant mice compared with those of wild-type testis. Other sig-

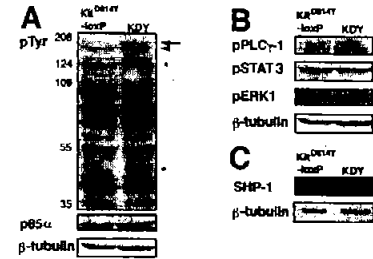


Fig. 5. KDY spermatogenic cells show an enhanced phospholipase C γ -1 (PLC γ -1) tyrosine phosphorylation. **A:** Anti-phosphotyrosine immunoblots of whole spermatogenic cell lysates from the *Kit^{DB14Y-loxP}* and the KDY mice. The KDY mouse presents an increased phosphorylation in four proteins labeled with an arrow, arrowhead, and stars. Membranes were stripped and re-blotted with the anti-PLC γ -1, anti-p85 α , and anti- β -tubulin. The band labeled with an arrow was positive for anti-PLC γ -1, the protein labeled with an arrowhead corresponds to c-Kit, and proteins labeled with stars were not identified. Anti- β -tubulin immunoblot shows protein levels. **B:** Immunoblots for anti-pPLC γ -1, anti-pSTAT3, and anti-pERK-1 proteins in whole cell lysates of *Kit^{DB14Y-loxP}* and KDY spermatogenic cells. An increased phosphorylation is observed only for PLC γ -1. Membranes were stripped and re-blotted with the anti- β -tubulin antibody to show protein levels. **C:** Immunoblot to detect SH-2-containing tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) protein in whole cell lysates of *Kit^{DB14Y-loxP}* and KDY spermatogenic cells. SHP-1 protein is barely detected in the KDY protein extract compared with the detection in spermatogenic cells lysates of *Kit^{DB14Y-loxP}*. Membranes were stripped and re-blotted with the anti- β -tubulin antibody to show that equivalent amounts of proteins were loaded.

naling molecules (p85 α , STAT, and Erk-1) did not present a higher level of phosphorylation in the mutant mice (Fig. 5A,B).

The KDY mutation is known to induce degradation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in IC2 cells (Piao et al., 1996). As mentioned, SHP-1 is a negative regulator of signaling by Kit and other receptors, and its degradation constitutes part of the mechanism of ligand-independent activation by *Kit^{DB14Y}*. For this reason, we tested whether the amount of SHP-1 was affected in spermatogenic cells from the KDY mutant mouse and accordingly, we found that the 65-kDa protein corresponding to SHP-1 was significantly reduced in the protein extract obtained from the transgenic testis (Fig. 5C).

AQ14

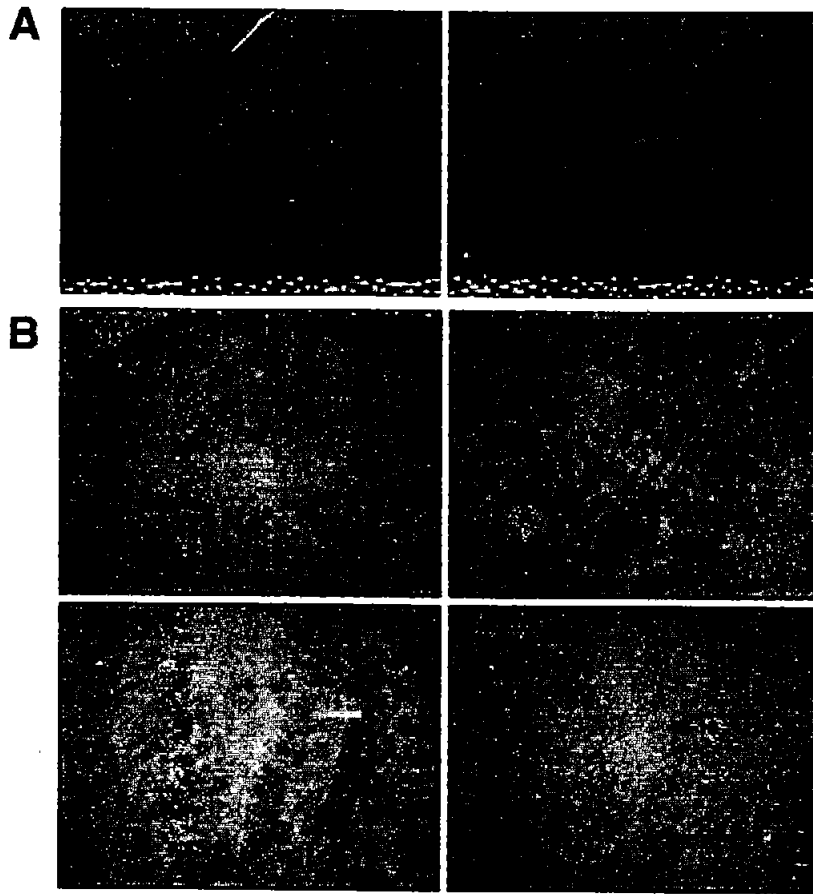


Fig. 6.

Specific In Vivo Phosphorylation of PLC γ -1 Occurs in Elongating Spermatids

Our evidence indicated that the effects of Kit^{DB14Y} in spermiogenesis were coincident with an enhanced phosphorylation of PLC γ -1. To evaluate if this finding could be meaningful, we determined whether phosphorylation of the PLC γ -1 protein occurred at specific stages of spermatogenesis. For this purpose, we performed anti-PLC γ -1 and anti-p-PLC γ -1 immunostaining in testis sections of wild-type and sterile mice. In wild-type mice, PLC γ -1 was expressed in the cytoplasm of all spermatogenic cell-types; at the first stages of spermiogenesis (steps 2-3), it presented a particular distribution in the proacrosomic granules; later in round spermatids, PLC γ -1 was detected within the acrosome (Fig. 6A). Whereas PLC γ -1 was found ubiquitously expressed, the phosphorylation of this protein occurred at particular developmental stages. Wild-type preleptotene sper-

Fig. 6. Immunohistochemistry of phospholipase C γ -1 (PLC γ -1) and pPLC γ -1 in paraffin sections of Kit^{DB14Y}-loxP testes. A: PLC γ -1 is observed ubiquitously in all spermatogenic cells. In step 2, spermatids PLC γ -1 is strongly detected in the proacrosomic granule. At later stages (5-6), PLC γ -1 is also observed surrounding the nucleus. B: Phosphorylation of PLC γ -1 is first observed in preleptotene spermatocytes, and decreases in leptotene spermatocytes. Phosphorylation of PLC γ -1 is again observed in step 9 to step 14 spermatids. In steps 15 and 16, spermatids phosphorylation of PLC γ -1 is not observed. Spermatogenic cells are negative in the control immunohistochemistry, where no primary antibody was used. In, intermediate spermatogonia; Se, Sertoli cell; PI, preleptotene spermatocytes; L, leptotene spermatocytes; P, pachytene spermatocytes; 2-16 spermatids from step 2 to step 16. Scale bars = 10 μ m in A,B.

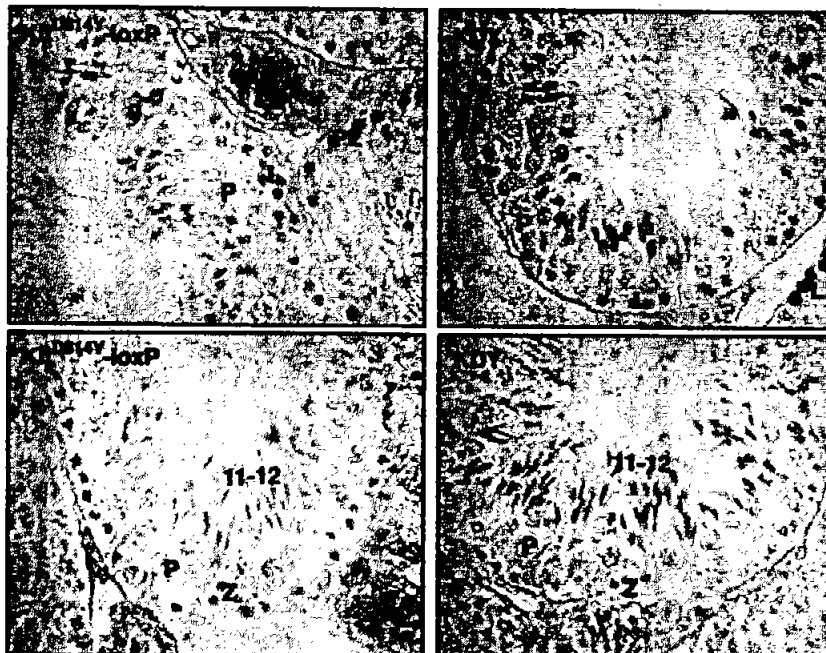


Fig. 7.

Fig. 7. In KDY spermatogenic cells, phospholipase C γ -1 (PLC γ -1) presents a stronger positive signal compared with Kit^{DB14Y}-loxP. Phosphorylation of PLC γ -1 is observed in the same stages of spermiogenesis as in the Kit^{DB14Y}-loxP testes in the KDY mouse spermatids. A higher intensity of staining is appreciated at step 9 and more clearly observed at steps 11 and 12. PI, preleptotene spermatocytes; L, leptotene spermatocytes; Z, zygotene spermatocytes; 9, spermatids from step 9; 11-12, spermatids from steps 11 and 12. Scale bar = 50 μ m.

F8

BOFOC

AQ15

BOFOC

AQ: 6

matocytes were p-PLC γ -1-positive, but signal decreased in leptotene spermatocytes and was weak in zygotene. The next stage where positive p-PLC γ -1 signal was detected in the spermatogenic cells corresponded to step 9 spermatids. PLC γ -1 remained phosphorylated in condensing spermatids until step 14, and importantly it was localized around the nuclear envelope in these spermatids. In step 15 and 16 spermatids PLC γ -1 was no longer phosphorylated (Fig. 6B). The KDY sterile mice conserved the same pattern of phosphorylation of PLC γ -1 as the wild-type mouse, both in spermatocytes and condensing spermatids (Fig. 7). However, an image analysis with the Image J (NIH) program on three different samples indicated that signal in KDY-positive cells was more intense, pointing to the possibility of an enhanced phosphorylation in these cells. This result is in agreement with the observation made in the quantitative immunoblot and suggests an interaction of KDY with the PLC γ -1 pathway that occurs in parallel with the described phenotypical alterations in spermatids of sterile mice.

DISCUSSION

In this work, we have characterized the phenotype of mice obtained by a *Cre-loxP* approach, expressing a mutant Kit receptor (Kit^{D814Y}) in germ cells. This mutation is known to produce a ligand-independent activation of the receptor (Piao and Bernstein, 1996) and, thus, was expected to induce an ectopic and increased Kit signaling during germ cell development. We demonstrated the presence of the Kit^{D814Y} protein in spermatids and mature sperm. However, despite that we used the pCAGG promoter, which has been shown to be active in all types of germ cells in different transgenic mouse lines (Lobe et al., 1999; Ramos-Mejia et al., in press), in the Kit^{D814Y}-*loxP* line, the transgene was silenced in primordial germ cells and oocytes and only weakly expressed in diploid spermatogenic cells. Therefore, these cells did not express the Kit mutant form in double-TNAP^{Cre}/Kit^{D814Y}-*loxP* transgenic mice. Consequently, our study focused on the determination of the effects of the transgenic expression during spermi-

genesis, in which we found that ectopic Kit^{D814Y} caused malformations in sperm morphology and sterility.

The *kit*^{D814Y} mutation is equivalent to the D816V human mutation that was originally described in mastocytomas (Kitayama et al., 1995). Expression of Kit^{D814Y} in mast cell lines is sufficient to produce sustained proliferation and oncogenic activation due to a deregulation of cell growth and differentiation (Piao and Bernstein, 1996). The mechanism of Kit constitutive activation in cell lines by this mutation has been found to be associated to the ubiquitin-mediated degradation of SHP-1 and to an increased in vitro catalytic activity of the mutant form compared with Kit (Piao et al., 1996). Accordingly, spermatogenic cells in the KDY mutant mouse showed an increased degradation of SHP-1, indicating that the receptor is functional and suggesting an enhanced Kit activity. On the other hand, the general pattern of protein tyrosine phosphorylation of the mutant cells was very similar to that of wild-type cells, suggesting that the constitutive active Kit^{D814Y} does not lead to significant alterations in the fidelity of signaling. However, differences were detected in the intensity of phosphorylation of at least four particular proteins. One was identified as PLC γ -1 and other corresponded to Kit.

The mutant KDY mice presented a distinct phenotype. The ectopic expression of the Kit mutant protein produced abnormal spermatozoa. We provided evidence that sterility in the mutant population was associated with the presence of a higher amount of the mutant Kit protein. However, the low percentage of sterile mice indicates that a large amount of the protein was needed to cause detectable morphogenetic alterations. Considering the evaluated efficiency for the TNAP^{Cre} mouse, it seems that only a complete excision of the floxed sequence resulted in a sufficient expression to produce a notable effect.

The production of mature spermatozoa from precursor germ cells is a complex process in which three major stages can be distinguished: spermatogonial proliferation, meiosis, and spermiogenesis. Consistent with the expression pattern of the transgene, in the KDY mouse, only spermiogene-

sis was affected. We found a defective sperm nuclear shaping process, in addition to acrosome hypoplasia and flagellar abnormalities such as looping and folding. Ultrastructural analysis indicated that morphogenesis started to fail by the time spermatids initiate their elongation. Elongation spans from step 8 to 14 and is mainly characterized by the shaping and condensation of the nucleus, which changes from a spherical to a flattened shape. Head abnormalities in spermatozoa of the KDY mouse, were preceded by a deficient development of the acrosome and a disorganization of the manchette and perinuclear ring extension in elongating spermatids. The manchette is a distinctive structure composed of microtubules that is inserted into the perinuclear ring surrounding the nucleus, and extends from the acrosomic system into the cytoplasmic lobe (Clermont et al., 1993). It is a transient structure, whose existence overlaps with the process of nuclear elongation. This timing, combined with several observations made in mutant mice and after drug treatments that correlated an abnormal position of the manchette with an abnormally shaped spermatid nucleus, have led to the belief that it is mechanically involved in the shaping process (Russell et al., 1991; Meistrich, 1993). The KDY mouse represents a new genetic condition that results in the improper formation of the manchette. Moreover, the correlation between these particular morphological defects with the ectopic activation of Kit signaling, introduces a novel aspect, suggesting a participation of signaling molecules in nuclear elongation. Another well-characterized example among mutant mice is the *azh/azh* mouse, which also displays deformed sperm nuclei and multiple coiling of the sperm tail (Meistrich et al., 1990). The *azh* phenotype is highly similar to that of the KDY mouse. The gene affected in the *azh* mutation has been identified as *Hook1*. The HOOK1 protein belongs to a microtubule-binding family that also can bind to specific organelles. It has been assumed that HOOK1 might establish contact between the manchette and the nuclear envelope (Mendoza-Lujambio et al., 2002). Considering that, in the KDY mouse, microtubules of the

F7

AQ16

manchette are normally formed but not properly positioned in the perinuclear ring, it is possible that, among the targets of the ectopic Kit signaling, a protein that interacts with HOOK1 is included.

Immunolocalization studies of the Kit^{DB14Y} protein revealed that, in round and elongating spermatids, this transgenic protein was conspicuously localized to the prospective acrosome complex. This result is meaningful because, in later stages of development, in addition to the acrosome hypoplasia, the anterior part of the spermatid nucleus is not formed correctly. In this region between the acrosome and the nucleus, a cytoskeletal plate called the acroplaxome has been described (Kierszenbaum et al., 2003a). The acroplaxome contains F-actin and keratin 5 and is anchored to the spermatid nucleus. Recent experimental evidence supports the proposal of a contribution of the acrosome to the spermatid nuclear shaping and assigns a role to the acroplaxome in an anchoring mechanism that fastens the acrosome and modulates the forces operating during nuclear shaping (Kierszenbaum et al., 2003b, 2004). On the other hand, the acrosomal complex maintains a structural relationship with the manchette through the perinuclear ring. Thus, the subcellular localization of Kit^{DB14Y} could provide an explanation for the anomalous organization of the manchette and is in agreement with the phenotype described. In this context, it is interesting that, in the KDY mouse, phalloidin staining of mature spermatozoa showed the absence or mislocalization of actin filaments in the subacrosomal region, suggesting an abnormal regulation of actin polymerization, possibly originated at spermatid-stages. Further characterization of the acroplaxome components would be important to determine the integrity of this cytoskeletal plate in the spermatids of the KDY mouse.

The morphological effects on spermiogenesis here described were all due to an ectopic activation of the Kit-signaling pathway. Potentially, the decreased concentration of SHP-1 found in the KDY spermatogenic cells could be involved in the KDY phenotype. Although SHP-1 mutant alleles have been described in mouse (Paul-

son et al., 1999), these models have not been studied in terms of their fertility. Quantitative biochemical analysis indicated that, among the components that participate in the Kit cascade that were tested, one that seemed to be affected was PLC γ -1 whose phosphorylation was increased twofold. Although we do not demonstrate that the phenotype of the KDY mouse is mechanistically associated to the PLC γ -1 pathway, we found correlative data suggesting a relevant role for this pathway during sperm elongation. Among these data, a very interesting finding of our work is the immunolocalization of PLC γ -1 phosphorylation during the elongation steps of spermiogenesis (steps 9 to 14), although PLC γ -1 expression was found through all the spermatogenic stages. This phosphorylation was absent after the nucleus shaping was completed, making the observation more significant, because it correlates with the stages where the manchette is present. Also interesting is the observation that phospho-PLC γ -1 was localized in the vicinity of the nuclear membrane. This localization is uncommon for this phospholipase, but it is consistent with the expected site of action of this signaling molecule, if we suppose a putative function during the nuclear elongation.

In the hypothetical situation that the PLC γ -1 pathway was involved in the sperm phenotype in the KDY mouse, an obvious question is how the expression of Kit^{DB14Y} combines with this pathway to produce a defective morphogenesis. As mentioned, c-kit can bind and phosphorylate PLC γ -1, but different results have suggested that these actions do not lead to the activation of the pathway (Herbst et al., 1991; Blume-Jensen et al., 1994; Kosawa et al., 1997; Linnekin, 1999). Furthermore, it has been shown that phosphorylation of PLC γ -1 in tyrosine residue 783 by PDGF, plays an important role in localizing PLC γ -1 to the cytoskeleton and modulating actin polymerization (Yu et al., 1998; Pei and Williamson, 1998). Yu et al. found that an increased phosphorylation of PLC γ -1 led to the disassembly of actin filaments in 3T3 cells that was independent on PLC catalytic activity. In the same way, we speculate

that mutant c-kit could lead to the overstimulation of PLC γ -1 phosphorylation, producing alterations in the dynamics of the actin filaments present in the acroplaxome. Another interesting aspect worth noting is that PLC γ -1 phosphorylation in the wild-type mouse is coincident with the time when tr-kit is expressed in spermatids (Albanesi et al., 1996). As mentioned, injected tr-kit induces the activation of PLC γ -1 during promotion of parthenogenetic activation in oocytes (Sette et al., 1998). Therefore, potentially, tr-kit could act as a mediator of PLC γ -1 activation also during spermiogenesis. Activation of PLC γ -1 by tr-kit in oocytes is known to involve the formation of a multi-molecular complex composed of PLC γ -1, the Src-like kinase Fyn, and the RNA binding protein Sam 68 (Paronetto et al., 2003). To this respect, it would be interesting to explore which Src-like kinases are present in elongating spermatids and what is their subcellular localization.

An additional hypothesis in relation to the actions of mutant c-kit in the KDY mouse that involves the participation of tr-kit, is that Kit^{DB14Y} could be mimicking a nonreceptor kinase and activate tr-kit during spermatid elongation, increasing its natural activity and allowing the posterior activation of PLC γ -1. To evaluate the different suggested hypothesis it would be essential to determine whether tr-kit is hyperphosphorylated in the spermatids of the KDY mice.

In conclusion, in this work we have produced a mouse mutant that displays defects in the last steps of spermiogenesis. This mouse offers an opportunity to study the process of spermatid elongation in relation to the activation of specific signaling molecules. While the particular subcellular localization of Kit^{DB14Y} in the prospective acrosome, as well as its effect on PLC γ -1 phosphorylation during spermiogenesis are artificially provoked, they contribute to uncover a putative role of PLC γ -1 in spermiogenesis and suggest the participation of tr-kit during the process. To demonstrate a function of PLC γ -1 and tr-kit during sperm morphogenesis, conditional knock-out mouse models would be required.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

The Kit^{DB14Y} germ cell-specific expression was produced by using the Cre/loxP recombination system. Activated alleles were found in progenies from crosses of the TNAP^{Cre} and the Kit^{DB14Y}-loxP transgenic lines. To produce the Kit^{DB14Y}-loxP mouse line, we introduced a transgene to embryonic stem (ES) cells through the pCCALL vector (Lobe et al., 1999). This vector contains the lacZ/neomycin fusion (β -geo) reporter gene flanked by loxP sites, and immediately after the second loxP sequence, a XhoI site allowed the insertion of the Kit^{DB14Y} coding sequence (provided by A. Bernstein). Gene expression in this vector is driven by the CMV enhancer/chicken β -actin hybrid gene promoter (pCAGG), which has been shown to provide a consistent and strong ubiquitous expression in transgenic embryos (Lobe et al., 1999). ES cell genetic manipulation was preferred over oocyte injection to ensure a single insertion of the transgene in the genome. Transgenic ES cell colonies that presented the strongest β -galactosidase expression were used for blastocyst aggregation, and chimeras were selected for germline transmission. This method allowed the generation of only one transgenic founder, which was expanded and maintained by mating with CD1 females. In the obtained transgenic line, the β -geo reporter gene should be ubiquitously expressed before a Cre-mediated recombination event occurs. Mating was done between TNAP^{Cre} males and Kit^{DB14Y}-loxP females.

Genotyping

To establish the genotype of the offspring in the TNAP^{Cre}/Kit^{DB14Y}-loxP mating, genomic DNA was prepared from ear punch biopsy samples (lysis buffer 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20, 100 μ g/ml of proteinase K) and subjected to PCR. To amplify a region corresponding to the reporter β -geo, the LacZ upper 5'-GGAAAACCCTGGCGTTACCC and LacZ lower 5'-AGATGGGCGCATCGTAACCG primers were used (anneal-

ing temperature, 60°C, 30 cycles) and a 250-bp fragment was produced. To amplify a Cre-corresponding region, the PGKpA/U1 5'-TAAGGGCCAGCT-CATTCCTCC and the TNAP/ex6L 5'-CACGTCGATGGCCGCTCTA primers were used (annealing temperature, 56°C, 30 cycles) and a 262-bp fragment was produced.

β -Galactosidase Staining

Testes of mature sexually active CD1 and Kit^{DB14Y}-loxP mice were fixed in phosphate-buffered saline (1% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, 2 mM MgCl₂, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 0.02% Nonidet P-40) at 4°C for 30 min; rinsed twice with phosphate-buffered saline (2 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 0.02% Nonidet P-40, and 0.01% sodium-deoxycholate); and incubated in a substrate solution (2 mM MgCl₂, 0.02% Nonidet P-40, 0.01% deoxycholate Na, 5 mM K₃Fe (CN)₆, 5 mM K₄Fe (CN)₆ and 1 mg/ml of X-gal in phosphate-buffered saline (PBS) for 5–12 hr at 37°C). Stained testes were fixed in Bouin's fixative for 12 hr; embedded in paraffin, and cut into 10- μ m sections. Sections were counterstained with Ehrlich's hematoxylin stock solution. Spermatogenic cell types were determined based on the size and morphology of spermatogenic cells and their nuclei, as described by Bellvé (1993). Sections were observed with light microscopy with a Leica DM L microscope and photos were taken with a Cool Pix 990 digital camera (Nikon).

Western Immunoblotting

Seminiferous tubules of adult testes were separated from Leydig and mesenchymal cells under the microscope in PBS. This procedure completely eliminates these somatic types, while Sertoli cells only constitute the 2% of the cells in the tubules. Cells were recovered by pipetting the cleaned tubules and were observed under the microscope to assess purity. After centrifugation, they were resuspended in lysis buffer. Lysis buffer (25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 10 mM β GP, 10 mM NAF, 200 μ M

NaVO₄, 1 μ g/ml leupeptin, 50 μ g/ml antipaine, and 0.3 mM dithiothreitol) was added at 4°C for 30 min and soluble proteins recovered. Proteins were quantified with the Bradford assay method. The supernatant was mixed at a 1:1 ratio with sample buffer, boiled, and stored at -70°C. Proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (7%) and transferred to 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Richmond, CA); blocked with 3% bovine serum albumin or 5% nonfat milk in TBS-T (50 mM Tris-buffered saline pH 7.5, 0.05% Tween 20); and incubated with the indicated antibody diluted in TBS-T. After three washes with TBS-T, membranes were incubated with the appropriate second antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP) and proteins were visualized by ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), following the manufacturer's instructions. For the immunoblot analysis, the program Quantity One V.4 was used (Bio-Rad).

Anti-c-Kit (H-300), anti- β -tubulin (H-235), anti-phospho-PLC γ -1(Tyr783), anti-PI3K (p85 α Z-8), anti-phospho ERK (E-4) and anti-SH-PTP1 (C-19) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phosphotyrosine 4G10 was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-phospho-STAT3 was from Biosource International (Camarillo, CA). Secondary HRP antibodies were from Biomedica Corp.

Analysis of Sperm Phenotype

Epididymal sperm was collected from sterile KDY and Kit^{DB14Y}-loxP mice by incubation of minced epididymis in green medium-calcium-free pH 7.5 (4 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM glucose, 4 mM ethyleneglycoltetraacetic acid, 2 mM MgCl₂, 25 mM HEPES pH 7) at 37°C for 10 min. Sperm were counted in a hemocytometer and examined by phase microscopy with a Leica DM L microscope. Pictures were taken with a Cool Pix 990 digital camera (Nikon). Aliquots of sperm were fixed with 5% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and incubated overnight at 4°C with c-kit antibody (H-300, from Santa

AQ 17

AQ18

AQ 19

Cruz, CA) at 1:100 dilution. Lastly, samples were incubated for 1 hr with the anti-rabbit Alexa fluor-594 (Molecular Probes) at 1:100 dilution. For actin filament detection, sperm were stained with Alexa 568-phalloidin (Molecular Probes). The fixation, permeation, and staining were performed in one step, in PBS with a final concentration of 2% paraformaldehyde, 0.05% Triton X-100, 1 U of Alexa 568-phalloidin. Images were acquired in a Bio-Rad MRC-600 confocal laser scanning system equipped with a krypton/argon laser coupled to Zeiss microscope.

AQ 20

Light and Electron Microscopy

Adult testes and epididymis were fixed during 12 hr at 4 °C with 2% glutaraldehyde in 0.2% cacodylate buffer. After washing them with cacodylate buffer, the testes were cut into small pieces, immersed in the same fixative for 2 hr at 4 °C, rinsed, and then fixed with OsO₄. Thereafter, the samples were dehydrated through graded ethanol series and then embedded in Epon 812. Semithin and ultrathin sections were cut on an ultratome Nova (LKB produkter AB, Bromma, Sweden). Semithin sections (1 μm) were stained with toluidine blue and thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a Zeiss electron microscope (EM900).

Immunohistochemical Staining

Testes were fixed in Bouin's fixative for 12 hr, then dehydrated through graded ethanol series, and embedded in paraffin. Samples were cut into 10-μm sections, deparaffinated and hydrated through xylenes and graded ethanol series. Kit, PLCγ-1, and phospho-PLCγ-1 proteins were detected with Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame CA), following the manufacturer's instructions. The anti-Kit (M-14), anti-PLCγ-1 (1249) and anti-phospho-PLCγ-1 (Tyr783) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Yvonne Rosenstein and Dr. Christopher Wood for the careful reading of the manuscript. We specially thank Dr. Yvonne Rosenstein for kindly providing several of the antibodies used in this study and Dr. Alan Bernstein for providing the Kit^{D814Y} cDNA. D.S. was the recipient of scholarships from CONACyT and DGAPA-UNAM.

REFERENCES

- Albanesi C, Geremia R, Giorgio M, Dolci S, Sette C: 1996. A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated *c-kit* protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122:1291-1302.
- Beechey CV, Searle AG: 1983. Contrasted a steel allele in the mouse with intermediate effects. *Genet Res* 42:183-191.
- Bellvé AR: 1993. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* 225:84-113.
- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF: 1993. The kit-ligand (steel factor) and its receptor *c-kit/W*: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 125-137.
- Blume-Jensen P, Hunter T: 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411:355-365.
- Blume-Jensen P, Ronnstrand L, Gout I, Waterfield MD, Heldin CH: 1994. Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. *J Biol Chem* 269:21793-21802.
- Blume-Jensen P, Jiang G, Hyman J, Lee KF, O'Gorman S, Hunter T: 2000. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet* 24:157-162.
- Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S: 1993. Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev Dyn* 198:182-189.
- Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A: 1988. The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 335:88-89.
- Clermont Y, Oko R, Hermo L: 1993. Cell biology of mammalian spermatogenesis. In: Desjardins C, Ewing LL, editors. *Cell and molecular biology of the testis*. New York: Oxford University Press. p 332-376.
- Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ: 1991. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352:809-811.
- Herbst R, Lammers R, Schlessinger J, Ulrich A: 1991. Substrate phosphorylation specificity of the human *c-kit* receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 266:19908-19916.
- Horie K, Takakura K, Tani S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T: 1991. The expression of *c-kit* protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol Reprod* 45:547-552.
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P: 1993. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157:100-109.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL: 2003a. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 14:4628-4640.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL: 2003b. The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res* 103:337-344.
- Kierszenbaum AL, Tres LL, Rivkin E, Kang-Decker N, van Deursen JM: 2004. The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b-containing proacrosomal vesicles in wild-type and *Hrb* mutant mouse spermatids. *Biol Reprod* 70:1400-1410.
- Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, Angeles M, Whitlow SR, Manova K, Besmer P: 2000. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J* 19:1312-1326.
- Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, Sugahara H, Mitsui H, Kanayama Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y: 1995. Constitutively activating mutations of *c-kit* receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85:790-798.
- Kozawa O, Blume-Jensen P, Heldin CH, Ronnstrand L: 1997. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase in stem-cell-factor-induced phospholipase D activation and arachidonic acid release. *Eur J Biochem* 248:149-155.
- Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y: 1988. Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in *Sl/S^h* mice. *Dev Biol* 126:71-79.
- Lifschytz E, Lindsley DL: 1972. The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:182-186.
- Linnekin D: 1999. Early signaling pathways activated by *c-Kit* in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1053-1074.
- Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M, Nagy A: 1999. *ZAP*, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol* 208:281-292.
- Lomeli H, Ramos-Mejia V, Gertsenstein M, Lobe CG, Nagy A: 2000. Targeted inser-

AQ 21

AQ 22

AQ 4,
AQ 5