

7.2. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA TIMOTESTIN.

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

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

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

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

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

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

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

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

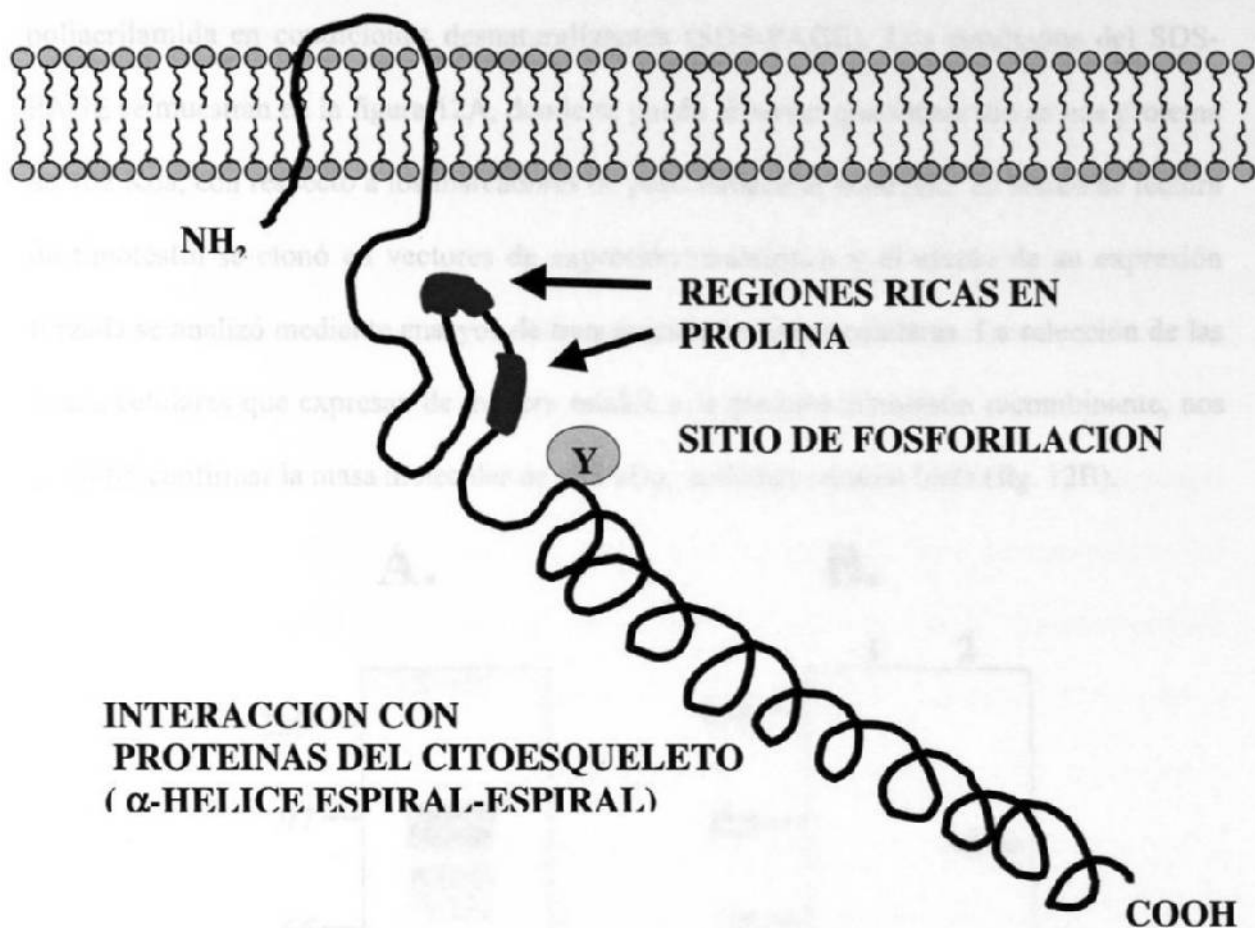
de iniciar transducción de señales, mediante su receptor o ligando, y así mismo interactuar con proteínas contráctiles del citoesqueleto a través de sus dominios α -hélices espiral-espiral (Ver esquema 5).

```

1  MDSTACLKELLLSISQYKAVRSEANATQLLRHLEVVSQGKLRTRLPTSHQI
51  LPSECLSCVLELLEDPN ISASLILSIISLLSOLA IDNETRDCLQNIYNLN
101 SVLSGVVCRSSACHNDSVFLQCIQLLQRLTYNAKFFHSGAHIDDLITFLI
151 GHVQSSSEDELTPCLGGLLANLCRHNLVSVQTQIKTLSNVKSFYRTLISFLA
201 HSSSLTVVVFALSILSSLTE NEEVGEKLPFARNIHQTFQLIFNILINGDGT
251 LTRKYSVDLLMDLLKNPKIADYLTRYEHFSSCLSQVLGLLNAKDPDSSSK
301 VLELLLAFCAVTQLRHVLSQMMFEQSPSGNILGSRPKSLEPTAALLRWLS
351 QPLDGAENC SVLALFLFKEIFEDVIDTGNCSSTDFVTLTLLPTILDQLQF
401 KEQNLDET LVRNKCERMVKAIEVLLTLCGDDSLRMHVVKILTTLKCTTLI
451 EQQPTYGKIDLGFGTKVADSELCLRAADVILKTLTLMNKLKQLVPGNEVS
501 FYKILQDPR LITPLAFALTS DNREQVQSGLGILLEAS PLEDFPAFVLGES
551 IAANNVYRQQET EHLPRKMTFQPLNHGFSTSAKCLT PPPSKDNAPALNIE
601 DLIEKLQAGVMVKDQISDIRISDIMDVYENK LSTLASKESRLQDLLEAKA
651 LALAQAADRLIAQYRCQRTQAETEARTLAGMLREVERKNEELSVLLKSQQL
701 ESERAQNDIEHLFQHSKKLESVAAEHEILTKSYMELVORNEATEKKNTDL
751 QTTCESLNKHLETMKKLNEALKQQNEERTIAQLIEREEQRKEVQSQLADRE
801 CKLSNLHKIAKSQEERLNVLQKEKEDKQETIDILRKELSRTEQIRKELSI
851 KASSLEMHKAQLEGRLEEKESLLKLQQEELNKHSHMIAMIHSLSGGKISP
901 ETVNLSI .

```

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



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

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

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

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

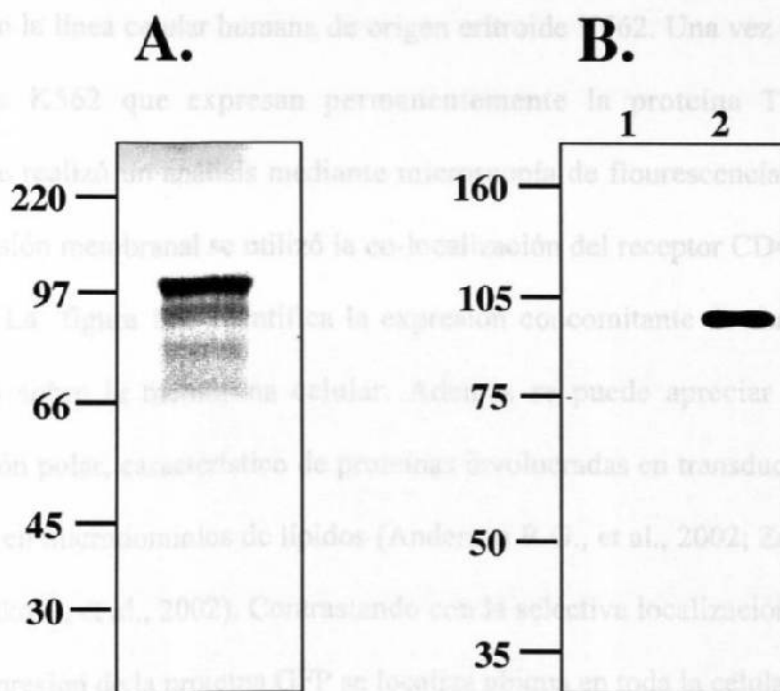


Figura 12. La proteína timotestin tiene una masa molecular de 102 kDa. A. Autoradiografía de un SDS-PAGE al 7.5%. Los Marcadores de peso molecular se encuentran a la izquierda del producto de la reacción de la transcripción- traducción *in vitro* de timotestin. La proteína fue detectada mediante la incorporación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

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

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

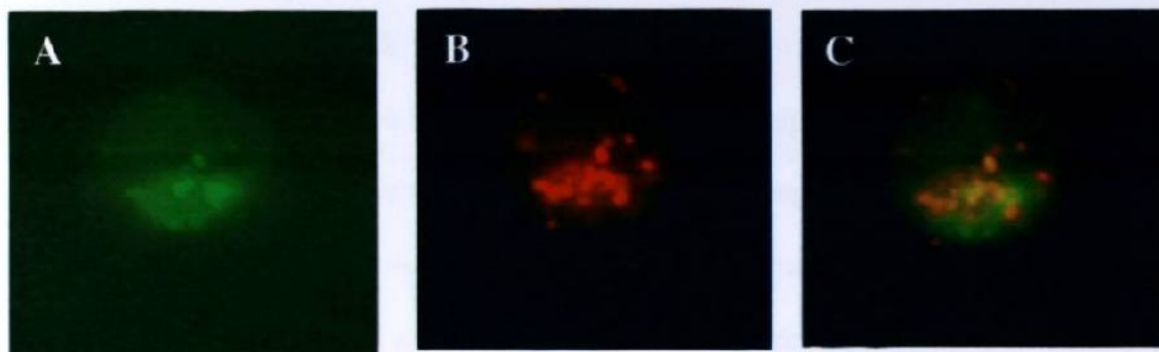


Figura 13. Timotestin se localiza en la membrana de las células K562. A. Análisis de localización subcelular de timotestin-GFP, mediante microscopía de fluorescencia. B. Identificación del marcador de superficie CD43 mediante fluorescencia roja-Alexa-fluor 594. C. Sobrelapamiento de las imágenes A y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

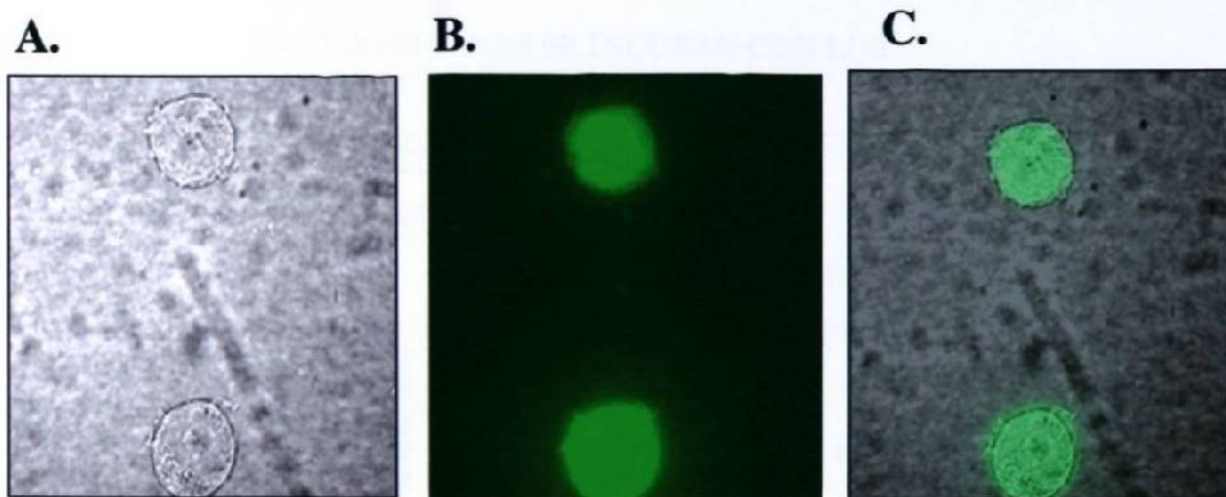
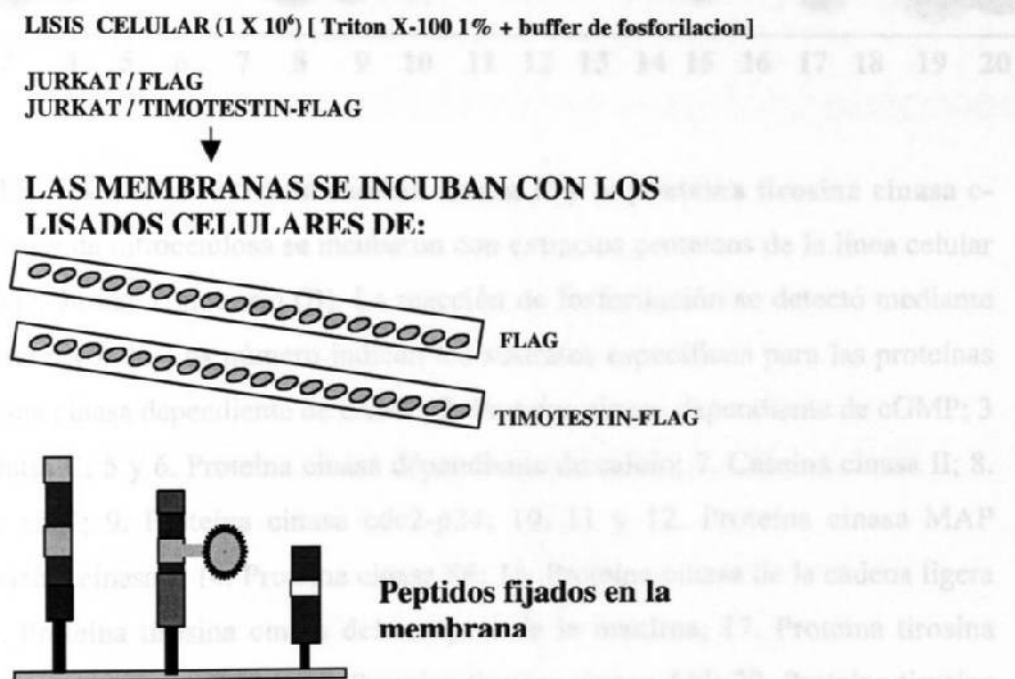


Figura 14. Análisis de expresión de la proteína GFP en células K562. A. Análisis celular mediante microscopía de contraste de fases B. Análisis de localización subcelular del vector-GFP, mediante microscopía de fluorescencia. C. Sobrelapamiento de las imágenes A y B. Las imágenes fueron procesadas mediante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

7.4. LA FUNCION DE TIMOTESTIN

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

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



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

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

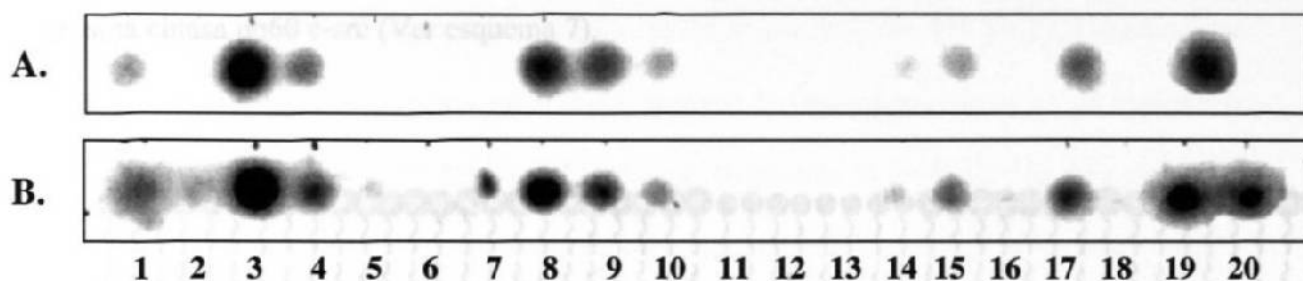


Figura 15. Timotestin activa la caseína cinasa II y la proteína tirosina cinasa c-Src. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con extractos proteicos de la línea celular Jurkat-vector (A) y Jurkat Timotestin (B). La reacción de fosforilación se detectó mediante autoradiografía de rayos X. Los número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

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

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

El estudio de la cinasa pp60 c-src, muestra de interacción de complejos

de la cinasa pp60 c-src, muestra de interacción de complejos

LA TIROSINA CINASA pp60 c-Src:

ES UNA CINASA ASOCIADA A MEMBRANA CELULAR

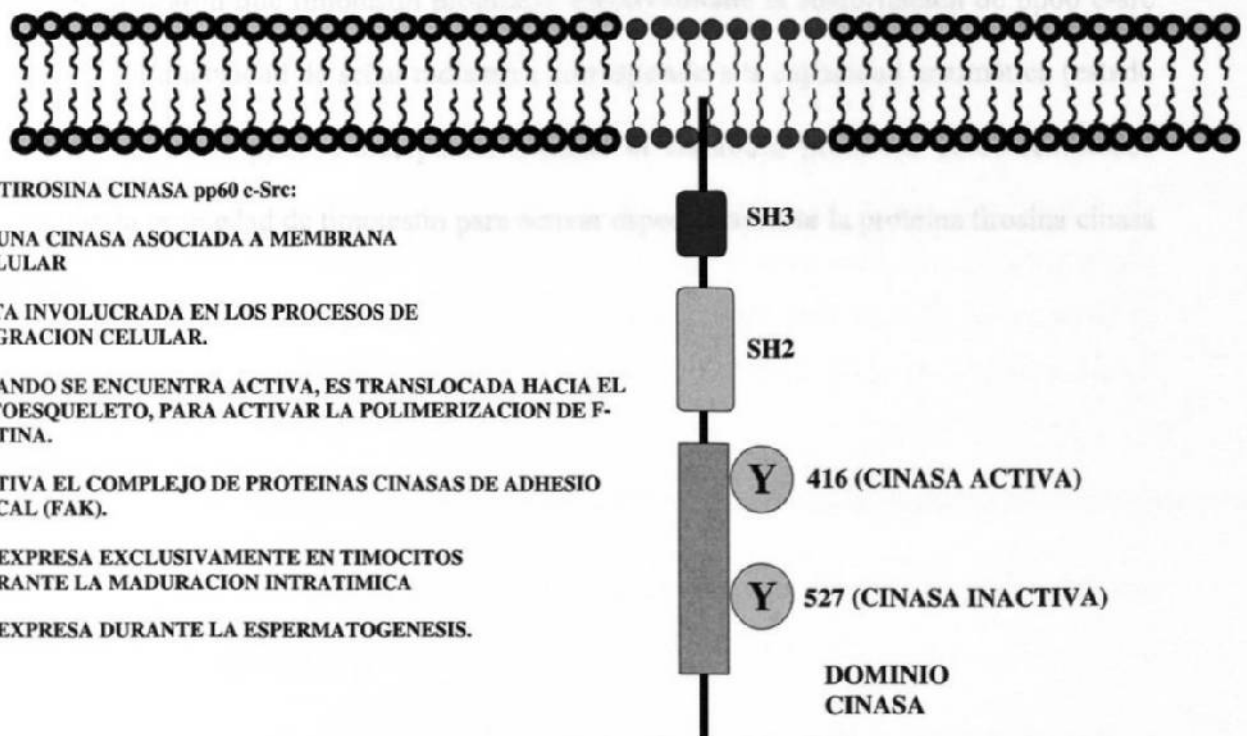
ESTA INVOLUCRADA EN LOS PROCESOS DE MIGRACION CELULAR.

CUANDO SE ENCUENTRA ACTIVA, ES TRANSLOCADA HACIA EL CITOESQUELETO, PARA ACTIVAR LA POLIMERIZACION DE F-ACTINA.

ACTIVA EL COMPLEJO DE PROTEINAS CINASAS DE ADHESIO FOCAL (FAK).

SE EXPRESA EXCLUSIVAMENTE EN TIMOCITOS DURANTE LA MADURACION INTRATIMICA

SE EXPRESA DURANTE LA ESPERMATOGENESIS.



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

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

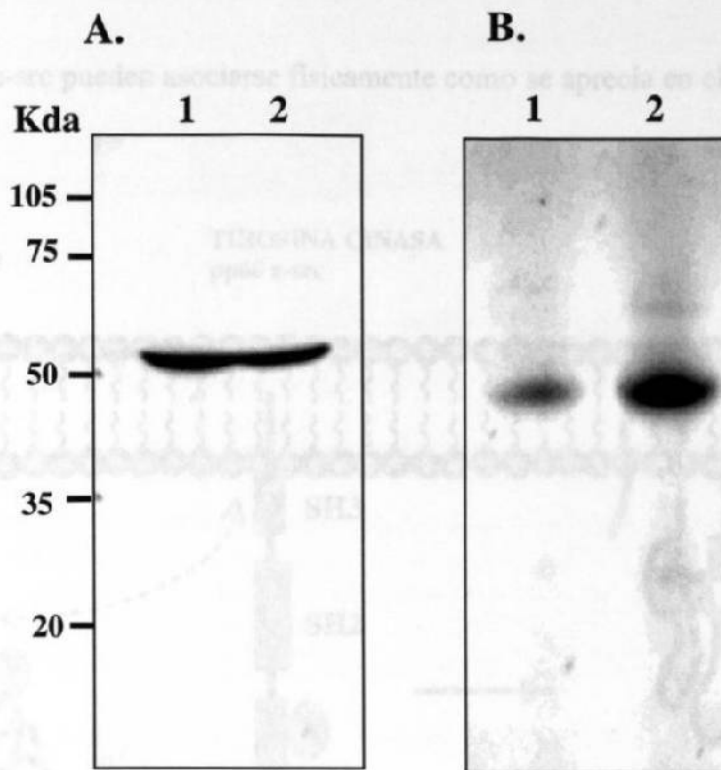
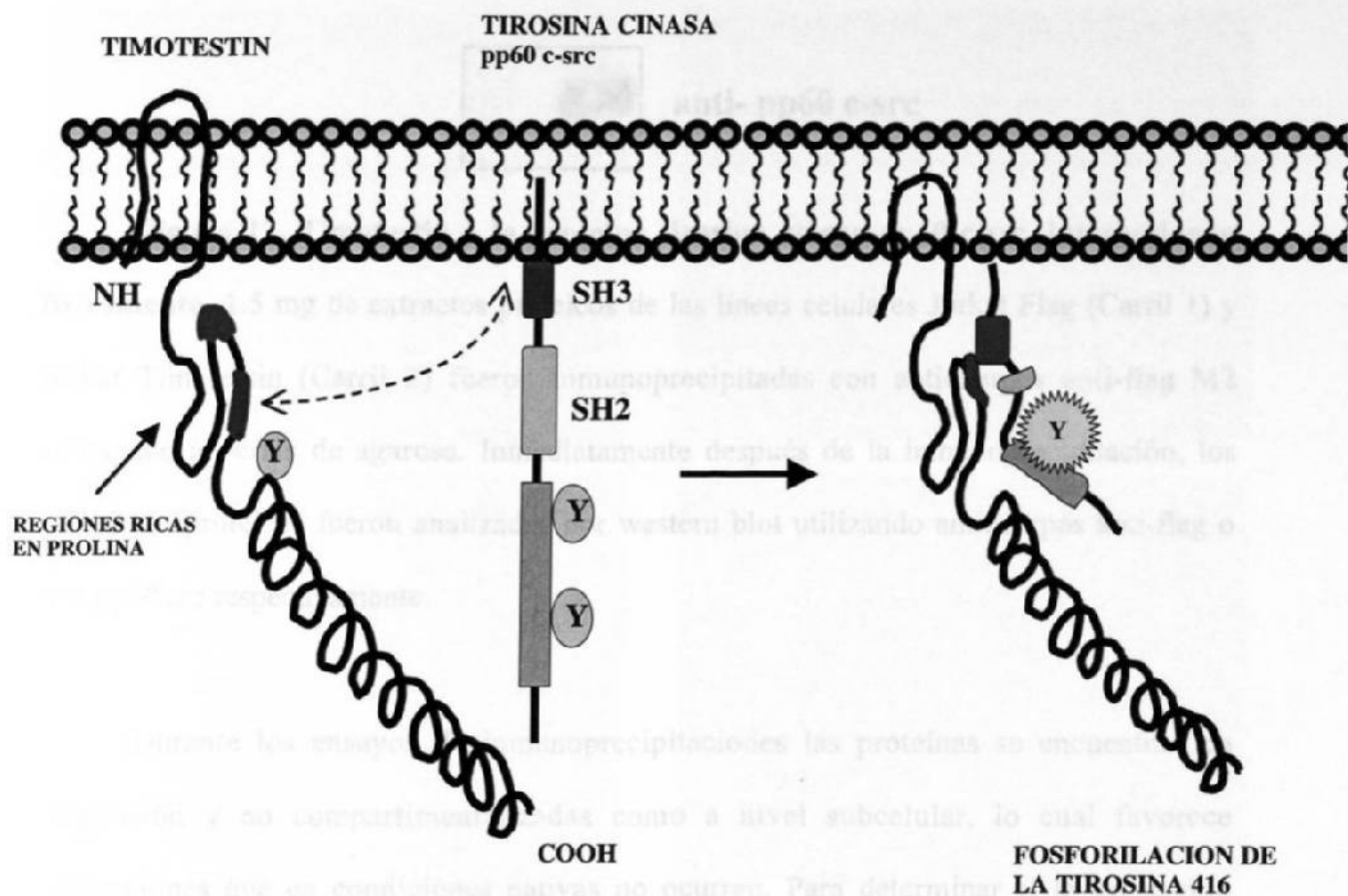


Figura 16. Análisis de expresión y fosforilación de la proteína tirosina pp60 c-Src. **A.** Análisis de western blot con 30 μ g de extractos proteicos. **B.** Ensayo de inmunoprecipitación de complejos cinasas, la reacción se detectó mediante autoradiografía de rayos X, con un tiempo de exposición de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

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

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

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



Esquema 8. Modelo hipotético de interacción entre la proteína timotestin y la tirosina cinasa pp60 c-src.

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

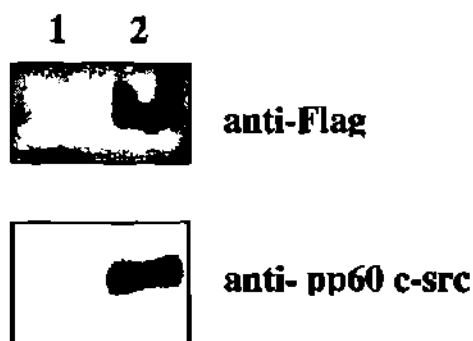


Figura 17. Timotestin y la proteína tirosina cinasa pp60 c-src, interaccionan físicamente. 1.5 mg de extractos proteicos de las líneas celulares Jurkat Flag (Carril 1) y Jurkat Timotestin (Carril 2) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-flag M2 conjugado a perlas de agarosa. Inmediatamente después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

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

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

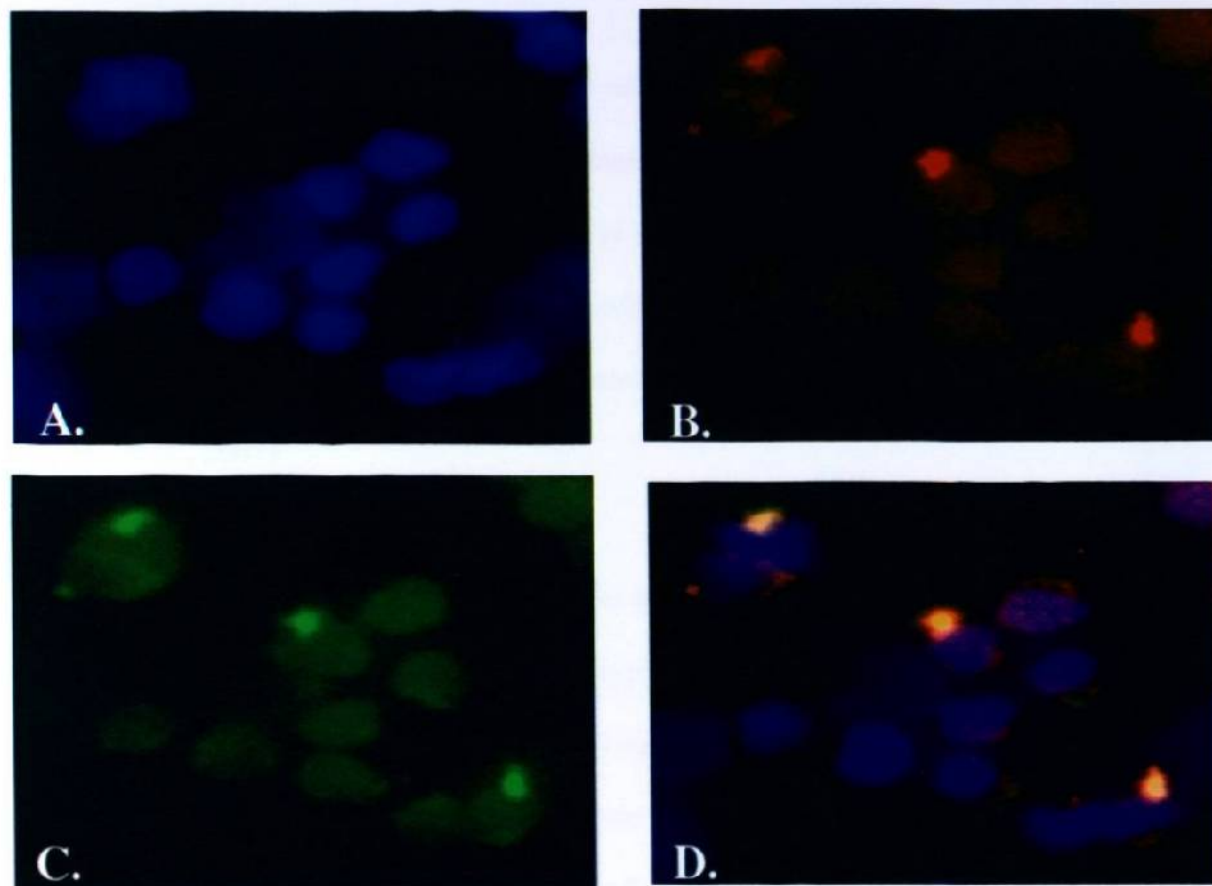


Figura 18. Timotestin y la proteína pp60 c-src se localizan en forma polar en la membrana de la línea celular Jurkat que expresa de manera estable la proteína recombinante. Análisis de co-localización mediante microscopía de fluorescencia, con una amplificación 40X. **A.** Tinción nuclear con Hoechst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

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

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

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

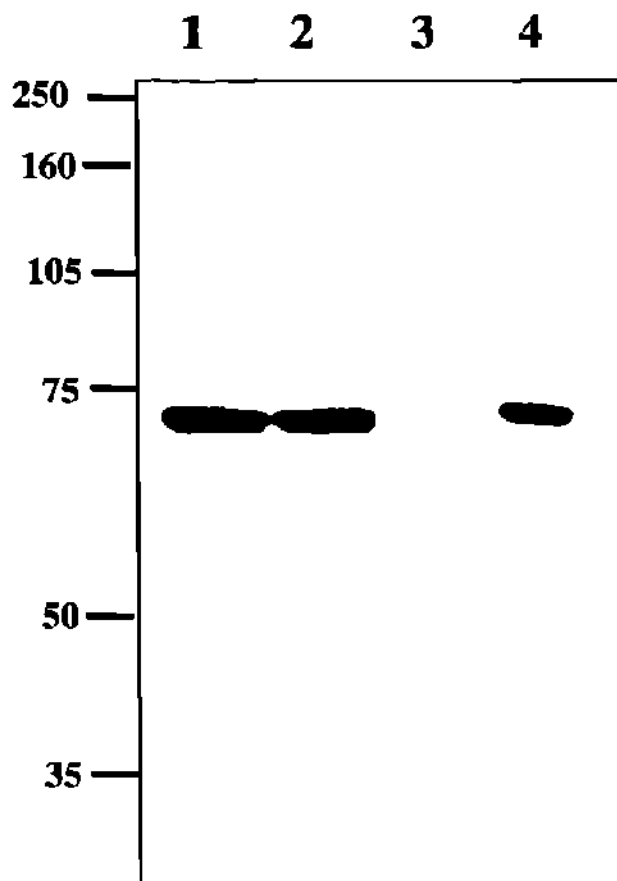


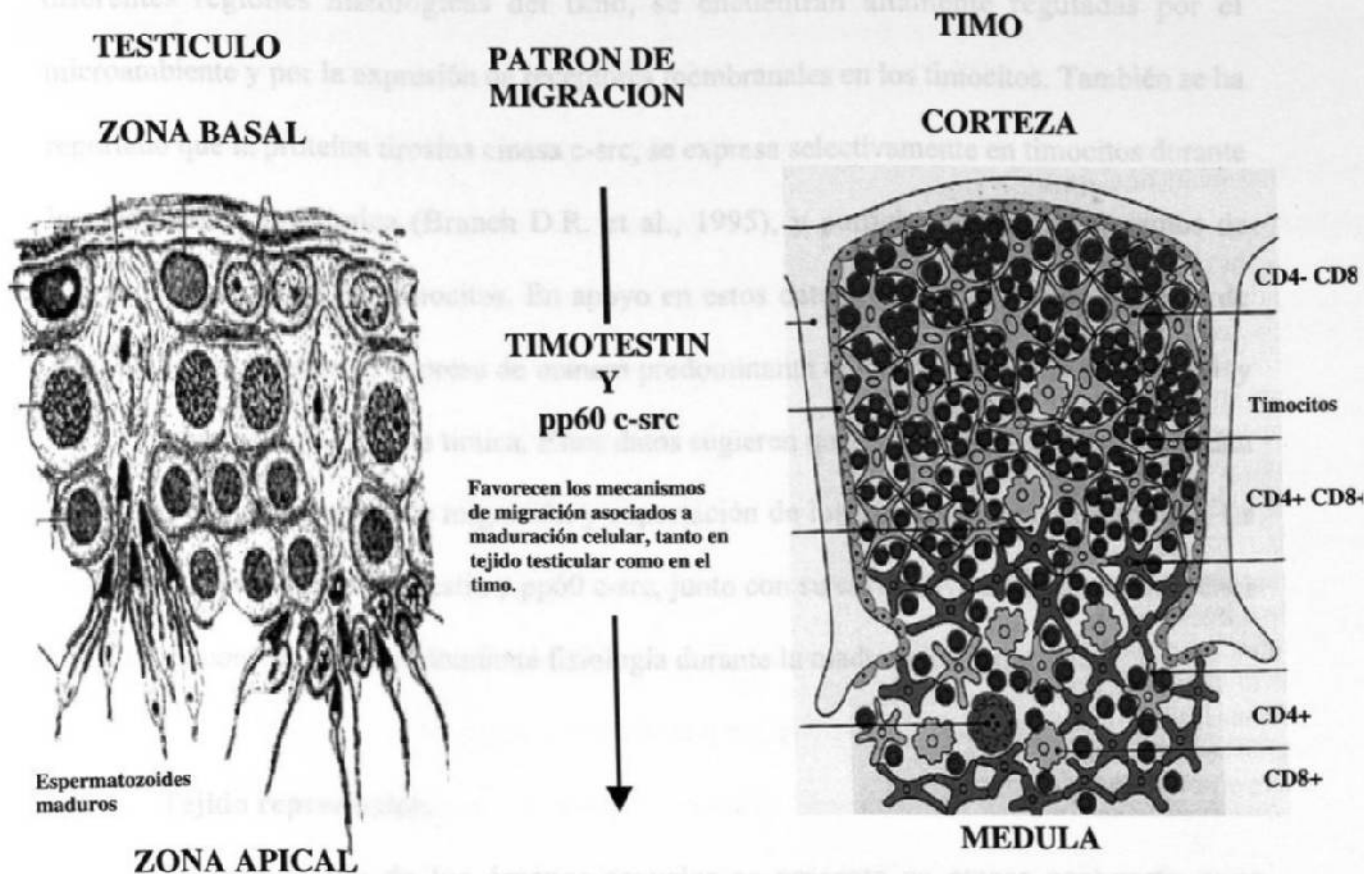
Figura 19. Timotestin induce la translocación de la proteína cinasa c-src hacia el citoesqueleto. Análisis mediante western blot de las fracciones proteicas del citosol (Carril 1 y 2) y citoesqueleto (Carril 3 y 4). Extractos proteicos de las líneas celulares Jurkat-Vector (Carril 1 y 3) y Jurkat-timotestin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

8. DISCUSION

Relevancia de la expresión de timotestin durante el desarrollo embrionario.

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

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



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

Timo.

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

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

Tejido reproductor.

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

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

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

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

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

Procesamiento o estabilidad del ARNm.

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

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

Significado de la estructura y conformación molecular.

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

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

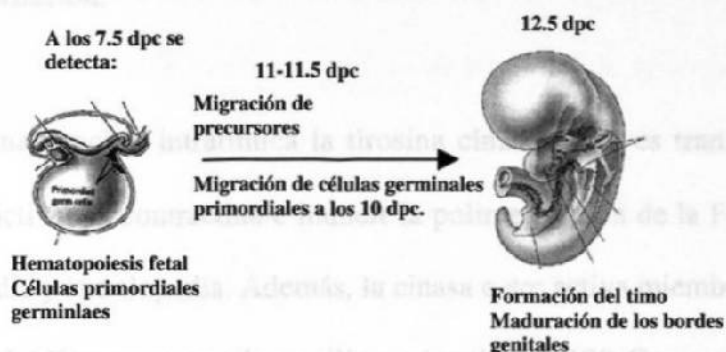
moleculares, timotestin posee una similitud del 27% con estos dominios, lo cual sugiere que timotestin es una proteína que puede unirse a proteínas del citoesqueleto y formar un puente de unión con receptores membranales, durante los mecanismos de polarización celular.

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

Relevancia Funcional

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

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



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

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

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

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

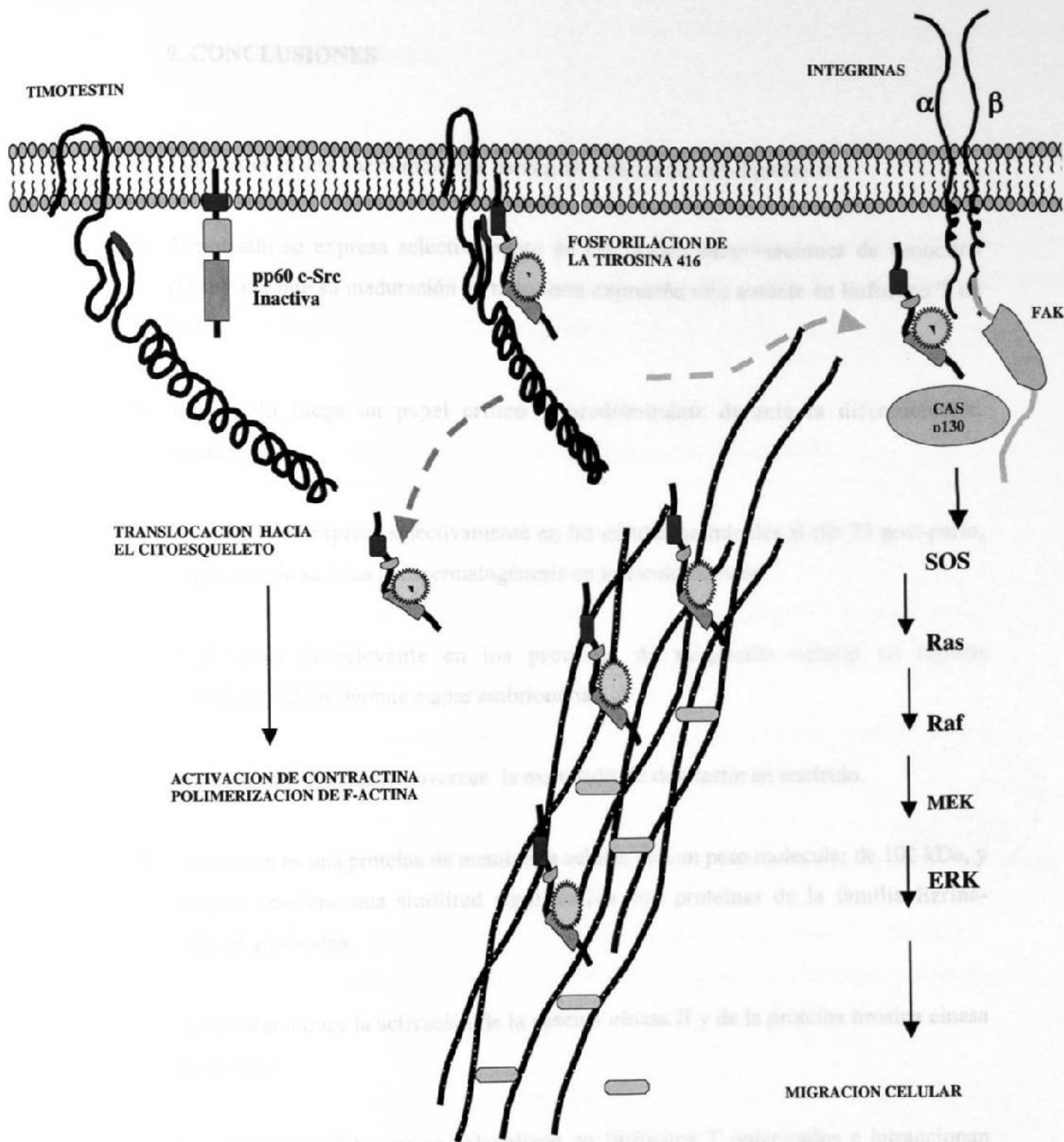
En el caso de los espermatozoides, existen otras proteínas del citoesqueleto que favorecen la motilidad de los espermatozoides, como son la FS39, Stap, Spag4 y Spag5 que proporcionan rigidez a los filamentos de tubulina que constituyen el flagelo. Estas proteínas están altamente reguladas por tirosinas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

durante la espermatogenesis, al igual que ocurre durante la maduración intratfmica, indican que timotestin activa y regula protefnas del citoesqueleto en las células germinales.

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

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

9. CONCLUSIONES



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

9. CONCLUSIONES

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

10. ESTUDIOS FUTUROS

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

REFERENCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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





