

## VERS LA CARACTERITZACIÓ DE GENS DEL SISTEMA NERVIÓS DE MAMÍFERS

J. GREGOR SUTCLIFFE

*Department of Molecular Biology, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, California, EUA*

Versió catalana de Josep Vilardell

### INTRODUCCIÓ

Abans de l'adveniment de les aproximacions experimentals basades en les tècniques de DNA recombinant, l'establiment de les bases moleculars d'un defecte genètic estava essencialment limitat a la caracterització a nivell de proteïnes: es localitzaven els components d'un teixit afectat i es buscaven aquelles estructures que presentessin diferències entre el teixit mutant i el normal.

Tanmateix, amb els mètodes actuals de treball ha estat possible l'aïllament d'un locus mutant basant-se en la seva posició en el cromosoma. També, com es mostra en el present treball, l'aplicació de les tècniques d'hibridació subtractiva fa possible la localització dels RNA específics d'un teixit en particular i considerar-los com a candidats pel producte d'un determinat gen mutat. Aquesta aproximació fou emprada per l'aïllament del gen responsable de la degeneració lenta de la retina (*rds*). L'anàlisi del producte del gen indica que es tracta d'una glicoproteïna associada a la membrana dels discs del segment extern de les cèl·lules fotoreceptores de la retina, l'estructura que no es pot formar en

els mutants *rds*. Nosaltres suggerim que la proteïna Rds (codificada pel gen *rds*) actua, com una molècula adherent, en la compactació dels discs esmentats.

Malgrat que es desconeix la funció de molts gens i tampoc es disposa dels corresponents mutants, actualment és possible la identificació i la descripció dels seus productes gènics. En aquests casos, el paper fisiològic jugat pot esbrinar-se amb experiments d'ablació. Aquesta aproximació es va seguir per l'aïllament d'un clon de cDNA que codifica per a un mRNA específic de cervell i pituïtària, amb identificació de la corresponent proteïna, la seqüència de la qual presenta certa relació amb els membres de la família cromogranina/secretogranina. La proteïna, anomenada secretogranina III, és un component vesicular d'un subgrup de neurones i de les cèl·lules corticotròpiques de la pituïtària. S'ha aconseguit un ratolí amb el gen de la secretogranina III inactivat.

Ja a la dècada de 1970 els estudis basats en anàlisis de les complexitats de les poblacions de mRNA van demostrar que al cervell dels mamífers s'expressen entre 10.000 i 150.000 gens (Hastie i Bishop, 1976; Bantle i Hahn,

1976; Chikaraishi, 1979). A mida que l'aplicació de les tecnologies de clonatge de cDNA ha permès l'examen precís de cada tipus de mRNA s'ha anat delimitant aquesta xifra, de manera que per determinacions de freqüències de mRNA i les seves grandàries hom creu que el nombre de gens expressats en cervell no deu ultrapassar excessivament els 5.000, però en qualsevol cas no pot ésser superior als 30.000. Molts d'aquests gens estarien específicament o majoritària expressats en teixits nerviosos (Milner i Sutcliffe, 1983; Sutcliffe, 1988). Llavors, un requisit previ en la comprensió del funcionament de l'activitat neural es troba en la determinació i l'anàlisi de les funcions d'aquest elevat nombre de gens: com actuen i interaccionen els seus productes proteínics per formar el sistema nerviós?

A nivell molecular, un camí efectiu en l'estudi del funcionament del cervell consisteix en l'aïllament i caracterització de gens que codifiquin per a substàncies neuroactives, els seus receptors i molècules que presentin seqüències relacionades amb aquestes proteïnes. Aquests estudis, que no són més que una extensió directa de les anàlisis bioquímiques clàssiques, estan essent en l'actualitat un dels camps on es dediquen més esforços dins de la moderna neurobiologia molecular. Tanmateix, hi ha una limitació en aquestes investigacions: només és possible obtenir informació d'aquelles molècules amb funció coneguda; i, per tant, amb assaigs específics per les mateixes. Llavors, encara no és possible aplicar aquestes tècniques a una elevada proporció de molècules neuroactives per les quals no s'han establert les respectives funcions.

Hi ha dues estratègies possibles per a l'estudi de les noves proteïnes de cervell encara amb funció desconeguda; de fet, aquestes segueixen aproximacions complementàries. La primera es basa en l'aïllament i la caracterització de gens definits per mutacions neurològiques, de manera que és possible definir una correlació entre els fenotips neurals mutants i l'estructura de la proteïna. D'altra banda, una segona aproximació se centra en l'estudi dels gens els productes dels

quals només apareixen en els teixits neurals, malgrat que se'n desconeix la funció. Els darrers avenços tecnològics indiquen que aquestes aproximacions poden oferir tanta informació com altres estudis més clàssics sobre altres proteïnes del cervell amb funció coneguda. A continuació es discutiran en detall un exemple de les dues estratègies esmentades. El missatge que el lector ha d'extreure, tanmateix, no és el detall, sinó el fet que la tecnologia actual ha esdevingut suficientment potent com per permetre l'estudi productiu d'aquells gens de mamífers que no estan definits, necessàriament, per funcions bioquímiques. La finalitat última de tots aquests estudis és un coneixement global de tots aquells tipus d'activitats que estan codificades pels nostres gens.

## MUTANTS NEURALS

Els defectes genètics que afecten l'activitat neural han estat identificats tant en humans com en animals de laboratori. S'han descrit més d'un centenar de soques de ratolí amb dèficits neurològics hereditaris, i s'han mapejat sobre el genoma les mutacions responsables de la majoria d'aquests fenotips (Sidman, 1983). S'han realitzat descripcions de les anormalitats fisiològiques i anatòmiques que resulten de la majoria de les mutacions (Noebels, 1985). Hi ha un nombre desproporcionadament elevat de mutacions neurològiques que afecten la formació de la mielina, el desenvolupament del cervellet o la retina, ja que aquests són processos que succeeixen predominantment durant la maduració postnatal del ratolí i els defectes de les estructures resultants són, almenys en part, compatibles amb la vida. És més, les anormalitats en la mielina o en el cervellet donen lloc a fenotips fàcilment observables.

Quin camí cal seguir per anar d'una mutació fins a un coneixement del procés defectiu, a nivell molecular? Hi ha dos tipus d'informació disponible. D'una banda hom pot utilitzar com a punt de partida la localització cromosomal del

locus mutat, amb la intenció d'aïllar físicament la informació continguda en aquest locus. Els avenços aconseguits en l'establiment dels mapes genètics de lligament, emprant el polimorfisme en les longituds dels fragments de restricció (RFLP, de l'anglès *Restriction Fragment Length Polymorfism*), han permès la realització de mapes genètics d'alta resolució per a mutacions en el genoma humà, i encara s'ha obtingut una més gran resolució en el cas del ratolí, ja que és possible la utilització de línies pures recombinadores en l'extensió de pedigrís. A causa que la detecció dels RFLP es fa per hibridació amb sondes de DNA, la sonda que detecta el RFLP més pròxim al locus mutant pot emprar-se per clonar, per saturació, la regió del voltant. Seguidament, les zones de DNA que es transcriuen es consideren com a candidates per al locus que es busca, i cadascun d'aquests candidats s'examina detalladament. Es poden esmentar els gens responsables de la fibrosi cística (Rommens *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989) i neurofibromatosi (Wallace *et al.*, 1990; Cawton *et al.*, 1990), com a brillants exemples dels resultats aconseguits seguint aquesta aproximació.

D'altra banda, un segon tipus d'informació útil en l'aïllament d'un gen que es correspon amb un locus determinat s'obté del fenotip mutant. Un estudi detallat dels components de l'estructura biològica afectada per la mutació permet conèixer els seus components moleculars, de manera que es pot disposar d'un nombre de proteïnes candidates, l'estructura de les quals pot comparar-se entre individus normals i afectats. Com a exemple es pot esmentar l'estructura de la mielina, la qual és defectuosa en diferents ratolins mutants. S'han caracteritzat les principals proteïnes de la mielina i se n'han aïllat els gens corresponents (Sutcliffe, 1987; Lemke, 1988). S'han examinat les estructures d'aquests gens i dels seus transcrits en diferents línies mutants. I així, s'ha vist que el fenotip del mutant *tremolós* (*shiverer* en anglès) està provocat per una deleció de part del gen codificant

per la proteïna bàsica de la mielina (Roach *et al.*, 1985; Kimura *et al.*, 1985; Molineaux *et al.*, 1986). El fenotip *saltador* (*jumpy* en anglès) ve causat per una mutació puntual que elimina un dels llocs de processament de l'mRNA corresponent a la proteïna del proteolípide de la mielina (Nave *et al.*, 1987). S'han utilitzat les estructures i localitzacions ultraestructurals d'aquestes proteïnes en la interpretació de les patologies específiques dels ratolins mutants.

## EL GEN *rds*: AÏLLAMENT DE CANDIDATS

La informació que es té d'un fenotip mutant es pot emprar d'una manera conceptualment similar, però diferent metodològicament, per aconseguir els gens responsables dels fenotips neurològics. A l'exemple que es discuteix aquí, a partir del fenotip hom va formular una hipòtesi sobre les cèl·lules en particular on s'expressa el gen. Seguidament, gràcies a les recents tècniques de la biologia molecular, es van aïllar clons de DNAa corresponents a mRNA expressats específicament en aquestes cèl·lules, els quals es van emprar com a candidats per a una investigació més exhaustiva. Conceptualment, aquesta aproximació representa una via diferent per la descripció dels components d'una estructura biològica.

El gen responsable de la degeneració lenta de la retina (*rds*) en ratolí està localitzat al cromosoma 17 (Van Nie *et al.*, 1978). Els ratolins homozigots *rds* mostren un desenvolupament normal fins a la primera setmana postnatal. En aquest moment les neurones fotoreceptores comencen a formar els segments externs, disposicions estretament empaquetades de discs tancats de membrana on té lloc la fototransducció. A les retines mutants, només es formen uns segments externs rudimentaris, sense les estructures de discs compactats (Sanyal i Jansen, 1981; Jansen i Sanyal, 1984). Tanmateix, les neurones fotoreceptores semblen normals fins a

la tercera setmana postnatal, i són capaces de fototransducció, encara que amb una eficiència inferior a la normal (Cohen, 1983). A partir de la tercera setmana postnatal, hi ha una degeneració gradual de les neurones fotoreceptores, de manera que en un any hi ha una pèrdua total de les mateixes (Sanyal *et al.*, 1985). Aquesta degeneració sembla limitada a les neurones fotoreceptores. Els experiments amb ratolins quimèrics tetraparentals (Sanyal i Zeimaker, 1984; Sanyal *et al.*, 1986) demostren que tan sols les neurones fotoreceptores genotípicament mutants degeneren, fins i tot quan estan envoltades per epitel·li pigmentat genotípicament normal. Aquest fet suggereix que cal que el gen *rd5* estigui actiu en les neurones fotoreceptores. Els heterozigots mostren un fenotip mitjà, amb segments externs més curts que contenen els discs vacuolats i en una disposició irregular. També experimenten una pèrdua lenta, més tardana, de cèl·lules fotoreceptores (Hawkins *et al.*, 1985). Aquestes observacions permeten formular la hipòtesi (Travis *et al.*, 1989) segons la qual el gen *rd5* al cromosoma 17 expressa un mRNA que és exclusiu de les neurones fotoreceptores.

Per comprovar aquesta hipòtesi es va emprar un mètode essencialment quantitatiu i altament sensible d'hibridació subtractiva (Travis i Sutcliffe, 1988). Seguint aquest procediment, basat en hibridacions dirigides per clonació i intensificades amb fenol, es van poder aïllar una sèrie de clons representants de mRNA presents exclusivament en neurones fotoreceptores. L'obtenció d'aquests clons va ser possible gràcies a la utilització d'una soca especial de ratolins cecs (C3J/HeJ) amb la retina degenerada, sense neurones fotoreceptores ni cap relació amb la mutació *rd5*. Llavors, un RNA present en la retina normal però no en la retina C3J/HeJ es pot considerar operacionalment com a específic de fotoreceptor. Així, per la selecció d'aquests clons es va emprar com a sonda un DNAC radioactiu obtingut a partir de mRNA de retina normal, després d'haver-li eliminat les seqüències C3J/HeJ a l'cDNA total. Es van dur a terme anàlisis

*northern* a cada clon seleccionat per comprovar que aquests representaven realment mRNA específics de neurona fotoreceptora (Travis *et al.*, 1989). Finalment es va acabar amb un grup de clons producte de 12 mRNA diferents i específics de fotoreceptor. Un d'aquests mRNA, representat per 70 clons independents, codifica per l'opsina, coneguda molècula específica de fotoreceptor.

## IDENTIFICACIÓ DEL GEN *rd5*

Les sondes obtingudes a partir dels clons de cDNA, corresponents a cadascun dels 12 mRNA específics de fotoreceptor, es van hibridar a transferències *southern* de digestions amb endonucleases de restricció de DNA genòmic. Les transferències contenien DNA obtingut de cèl·lules d'híbrids somàtics hámster-ratolí amb diferents subgrups de cromosomes de ratolí i, com a control, digestions de DNA d'hámster i ratolí. Una sonda va detectar fragments de DNA específics de ratolí a les mostres híbrides, només quan la línia híbrida contenia el cromosoma 17 de ratolí (Travis *et al.*, 1989). Així doncs, el clon del qual s'havia obtingut la sonda corresponia a un gen específic de neurona fotoreceptora, localitzat al cromosoma 17 i, segons la hipòtesi, un candidat pel gen *rd5*.

Aquest clon va ser emprat com a sonda en anàlisis per hibridació de transferències *northern* amb mRNA extret de retines normals o pertanyents a ratolins mutants *rd5*. Les mostres de RNA es van obtenir de ratolins de 2 mesos d'edat, període anterior a la degeneració total de la retina. A les mostres provinents de ratolins normals es van detectar dos mRNA de 1.600 i 2.700 nucleòtids. D'altra banda, en extractes de retines mutants les bandes són de menys intensitat i corresponien a una grandària uns 10.000 nucleòtids superior. Quan, com a control, la mateixa transferència s'híbrida amb el clon de l'opsina, les bandes aparegudes en cada cas eren equivalents i de la grandària normal; per tant, els fotoreceptors estaven encara intactes en les retines pre-degeneratives *rd5* emprades en aquest

experiment. Això va suggerir que els dos mRNA detectats pel clon que s'estudiava estaven afectats per la mutació *rds*.

Es va identificar un marc obert de lectura a partir de la seqüència nucleotídica dels clons de cDNA, de longitud sencera, corresponents als dos mRNA identificats. Aquest marc de lectura codificaria per a una proteïna de 346 aminoàcids, idèntica pels 2 mRNA. La presència de dos mRNA diferents és deguda a la utilització de dos llocs diferents de poliadenilació, afectant només la regió 3' no codificant. Per analitzar les digestions amb enzims de restricció de l'DNA provinent de ratolins normals i mutants *rds* es van realitzar anàlisis per hibridació de transferències *southern* de DNA genòmic, emprant sondes derivades de la suposada regió codificadora dels dos DNAc. En el cas de la mostra provinent del mutant les sondes detectaven fragments addicionals o més grans. Es van aïllar els clons dels corresponents gens a partir de DNA genòmic de ratolins normals i mutants, determinant-se la seva seqüència nucleotídica en la zona codificadora per a proteïna. Es va trobar una inserció d'uns 10.000 nucleòtids al gen mutant, comparat amb la seqüència del gen normal. Aquesta inserció trenca la possible proteïna codificada en l'aminoàcid 258, explicant el mecanisme de la mutació *rds* (Travis *et al.*, 1989).

### EL PRODUCTE *rds* ÉS UNA GLICOPROTEÏNA ASSOCIADA A LA MEMBRANA DEL DISC

Es va comprovar la novetat de la seqüència de 346 aminoàcids després de realitzar comparacions per ordinador sobre els bancs de dades de proteïnes existents. La seqüència conté quatre regions sense càrrega i dos llocs potencials per a una N-glicosilació; per tant, la proteïna postulada pot tractar-se d'una glicoproteïna de 39 kD associada a membrana. S'han determinat recentment les seqüències homòlogues de rata (Begy i Bridges, 1990), humanes (Travis *et al.*,

1990) i bovines (Travis *et al.*, 1990). Les seqüències (comparades a Travis *et al.*, 1990) exhibeixen un 85 % d'identitat mútua al llarg de les seves longituds totals de 346 aminoàcids; les diferències són predominantment conservadores, preservant les possibles regions que travessarien la membrana i un dels possibles llocs de glicosilació. La zona menys conservada és la regió carboxil terminal.

Per detectar aquesta possible proteïna es van sintetitzar químicament una sèrie de pèptids corresponents a regions no sobreposades de la seqüència aminoacídica. Aquests pèptids sintètics es van acoblar a una proteïna transportadora immunogènica, i els conjugats es van emprar per a l'obtenció dels corresponents antisèrums de conill. Els sèrums detectaven una proteïna d'uns 39 kD en immunotransferències *western* preparades a partir d'extractes de retina normal. La proteïna estava absent en extractes de retina mutant C3J/HeJ, sense les neurones fotoreceptores (Travis *et al.*, 1991). La immunoreactivitat es bloquejava per preincubació dels antisèrums amb el pèptid sintètic immunogen.

El tractament dels extractes de retina amb endoglicosidasa F, un enzim que elimina els glicans units per enllaços N, reduïa la grandària aparent a uns 36 kD, indicant que la proteïna *rds* és una glicoproteïna, probablement contenint un glicà, tal com se sospitava a partir de les comparacions entre seqüències de diferents espècies. La mobilitat de la proteïna era d'uns 75 kDa en extractes preparats en condicions no reductores, indicant que aquesta es troba *in vivo* unida covalentment a una altra proteïna, possiblement formant un homodímer. Quan els segments externs es van aïllar i sotmetre a una separació de fases de Tritó X-114 la proteïna Rds es trobava únicament a la fracció de membrana. Així, el gen *rds* codifica per a una glicoproteïna de membrana de 346 residus que manté interaccions covalents (Travis *et al.*, 1991).

Les anàlisis per hibridació *in situ* de retines normals van mostrar com l'mRNA *rds* es trobava

restringit als segments interns de les neurones fotoreceptores, les quals són predominantment bastons en els ratolins. En sèries de desenvolupament examinades per aquest mètode, la detecció de l'mRNA s'inicià al dia 5 postnatal. També es va observar hibridació sobre les neurones fotoreceptores en retines predegeneratives de ratolins *rds*, encara que en menor intensitat que a les retines normals, suggerint que l'mRNA *rds* mutant, més llarg, és menys estable que el normal. L'mRNA *rds* també es va detectar per hibridació *in situ* en la fòvea de la retina humana, la qual està formada únicament per cèl·lules cons, de manera que és possible que el gen *rds* s'expressi tant en neurones fotoreceptores del tipus bastó com del tipus con.

Els sèrums antipeptíds reaccionaven, en seccions fines de retina, gairebé exclusivament amb la capa de segments externs del fotoreceptor (Travis *et al.*, 1991), que és la capa afectada selectivament per la mutació *rds*. En sèries de desenvolupament, l'inici de la detecció immunoquímica va tenir lloc als 6 dies, moment en el qual els segments externs s'observen per primer cop. A nivell de microscòpia electrònica, les anàlisis histoquímiques d'immunodetecció amb or van mostrar que la proteïna Rds es troba associada a la membrana laminada del disc, distribuïda en tota l'amplada del disc i al llarg del segment extern.

### MODEL PER LA FUNCIO DE LA PROTEÏNA RDS EN L'ADHESIO ENTRE DISCS

Les dades mostren que el gen de ratolí *rds* codifica per una glicoproteïna específica de neurona fotoreceptora, que travessa la membrana i es localitza específicament als discs del segment extern. La mutació *rds* és el resultat d'una inserció d'uns 10.000 nucleòtids dins el gen codificant per aquesta glicoproteïna de membrana que altera el seu extrem carboxil terminal. Malgrat que la funció bioquímica de la proteïna Rds encara no s'ha establert, sembla

clar que aquesta deu ser un component indispensable del segment extern, ja que aquesta estructura no es forma en el mutant.

S'ha proposat un model per a l'estructura de la proteïna Rds (Travis *et al.*, 1991), basant-se en les característiques de les seqüències de la proteïna que s'han conservat entre les espècies i les observacions bioquímiques que confirmen la hipòtesi que aquesta es troba associada a la membrana i N-glicosilada. Es proposa que la proteïna formaria part del component integral de la membrana, amb quatre dominis que romandrien a l'interior de la bicapa lipídica. Es proposa que una petita cua amino-terminal i una de llarga a l'extrem carboxil terminal estarien a la cara citoplasmàtica de la membrana dels discs dels segments externs. Dos dominis, un d'ells N-glicosilat, sobresortirien de la membrana, cap a l'interior del disc. Hi ha dotze residus de cisteïna conservats entre les espècies, set dels quals es localitzen al gran domini que sobresurt al lumen del disc. Algunes de les dotze cisteïnes estan involucrades en interaccions covalents amb una altra proteïna. La grandària aparent de la proteïna Rds, sota condicions no reductores, suggereix que aquesta es troba *in vivo* com un homodímer.

Donada la seva localització a la membrana dels discs i la seva probable topologia s'ha proposat que la proteïna Rds actuaria com una molècula d'adhesió en la compactació dels discs del segment extern de la retina (Travis *et al.*, 1991). Diferents observacions suporten aquesta hipòtesi.

En les retines dels homozigots *rds*, es formen estructures vesiculars amb opsina que sobresurten de les projeccions ciliars dels segments interns, però aquestes estructures no es compacten en la disposició laminar de discs compactats (Nir i Papermaster, 1986; Usukura i Bok, 1987; Jansen *et al.*, 1987). Als heterozigots, la compactació dels discs té lloc però no és pas completa, amb l'aparició d'espais vacuolats (Hawkins *et al.*, 1985). Aquests fenotips consisteixen en l'absència d'una molècula d'adhesió en homozigots i la reducció de la seva quantitat, deguda a la insuficiència haploide, en

heterozigots. El fenotip de degeneració llavors seria secundari, conseqüència del proposat defecte en l'adhesió.

Els explants de retines en presència de tunicamicina, un antibiòtic que inhibeix la glicosilació, mostren un fenotip similar al dels mutants *rds* (Fliesler *et al.*, 1985), la qual cosa suggereix que la glicosilació, presumiblement de la proteïna Rds, és necessària per a la compactació. Això implica el gran domini que entra al lumen com a important en el procés d'adhesió. La seqüència d'aquest domini és altament conservada entre les espècies. Queda per demostrar també si l'adhesió està mitjançada per interaccions homotípiques o heterotípiques, i si s'empren enllaços covalents.

Alguns anticossos monoclonals dirigits a l'extrem carboxil terminal de l'homòleg boví de la proteïna Rds reaccionen preferentment amb les vores dels discs del segment extern (Connell i Molday, 1990). Anticossos policlonals contra l'extrem carboxil terminal de la proteïna Rds de ratolí reaccionen amb l'antigen distribuït per tota l'amplada del disc (Travis *et al.*, 1991). Aquestes observacions suggereixen que la cua citoplasmàtica de la proteïna Rds existeix en diferents formes conformacionals, a la vora i a l'interior, respectivament, i els anticossos monoclonals només detectarien la conformació de la vora. Aquestes formes conformacionals diferents podrien ser conseqüència d'interaccions proteïna-proteïna formades per molècules només localitzades a l'interior del disc.

Aquests estudis il·lustren com hom pot emprar tecnologies desenvolupades recentment per anar d'una hipòtesi sobre l'expressió selectiva d'un gen basada en el fenotip d'un mutant a una comprensió biològica detallada, a nivell cel·lular, bioquímic i molecular del producte normal del gen. Aquestes dades, juntament amb la informació sobre el fenotip del mutant, poden conduir ràpidament a un model explícit sobre la funció de la proteïna i a una explicació pel defecte al mutant. El següent exemple mostrarà com hom pot anar des de la descripció bioquímica

d'un gen, el producte del qual és de funció desconeguda, a la producció i anàlisi de ratolins amb el gen eliminat. Un altre cop, és la integració de la informació sobre el fenotip amb dades bioquímiques i de seqüència el que treballa heurísticament per produir models sobre la funció de les proteïnes neurals.

### CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE NOUS GENS CLONATS DEL SNC: SECRETOGRANINA III

Gràcies a què una part important del genoma dels mamífers està dedicat a la funció neuronal, una fracció significant de la massa total dels mRNA del cervell (aproximadament un 25 %) està composta per transcrits presents exclusivament al cervell. Per aquesta raó, és possible aïllar clons de cDNA específics de cervell triant-ne a l'atzar d'una llibreria, no seleccionada, de cDNA de cervell (Milner i Sutcliffe, 1983). Els esquemes basats en la hibridació subtractiva són útils en l'aïllament de RNA expressats amb alguna especificitat anatòmica regional dins el cervell (Travis i Sutcliffe, 1988; Watson *et al.*, 1990; Bernal *et al.*, 1990; Clayton *et al.*, 1988). El repte consisteix en atribuir funcions als gens, els productes dels quals s'han identificat primerament pels seus llocs d'expressió.

Es va seleccionar a l'atzar d'una llibreria de cDNA de cervell de rata un clon d'un RNA, anomenat 1B1075 (Ottiger *et al.*, 1990). En transferències *northern* el clon hibrida amb mRNA de cervell i pituitària, però no amb RNA d'altres teixits. La seqüència nucleotídica del clon de cDNA 1B1075 conté un marc obert de lectura codificant per una proteïna de 533 aminoàcids. La seqüència deduïda de la possible proteïna conté una seqüència senyal aparent i és bastant àcida, malgrat contenir molts grups de residus bàsics en tàndem. Malgrat que les anàlisis per ordinador indiquen que la proteïna és nova, la seva seqüència està relacionada amb la dels

membres de la família de proteïnes de vesícules secretores de la cromogranina/secretogranina, cadascuna de les quals es troba en un subgrup de teixits neuroendocrins.

Per la detecció de la possible proteïna es van sintetitzar químicament pèptids corresponents a fragments no sobreposats de la seqüència d'aminoàcids deduïda, els quals es van emprar per la producció d'antisèrums en conills. Els corresponents sèrums antipèptids van ser utilitzats per examinar extractes proteics de teixits mitjançant immunotransferències *western*. Cadascun detectà una proteïna de 57 kDa, específica de cervell i pituitària, i la immunoreactivitat podia ser bloquejada amb la incubació de l'antisèrum amb el corresponent pèptid sintètic (Ottiger *et al.*, 1990). Aquestes dades, particularment la coincidència en la reactivitat dels antisèrums contra una sèrie de fragments, no sobreposats, de la seqüència putativa, eren una evidència de que la proteïna de 57 kDa era el producte de l'mRNA 1B1075.

Les anàlisi per hibridació *in situ*, amb sondes derivades del clon de cDNA, i immunocitoquímiques, amb els anticossos antipèptid, detectaven ambdues neurones amb llargues projeccions a través del SNC, especialment en estructures corticals com el còrtex del cervell, l'hipocamp i el cervellet, encara que també en alguns nuclis subcorticals (Ottiger *et al.*, 1990). Molta immunoreactivitat estava associada amb fibres, axons i més rarament dendrites, projectant-se dels cossos neuronals detectats per la hibridació *in situ* i la immunocitoquímica.

Els sèrums antipèptids es van emprar per a l'estudi de la distribució subcel·lular de la proteïna 1B1075 a nivell de microscòpia electrònica. La immunoreactivitat es trobà associada amb petits orgànuls arrodonits, semblants a les vesícules sinàptiques. Als axons, aquests orgànuls s'observaven més freqüentment als botons pre-sinàptics, agrupats molt a prop de les especialitzacions sinàptiques. A les dendrites apicals, les vesícules immunoreactives semblaven més vesícules del reticle endoplàsmic

llis. Dins de la pituitària anterior, la immunocitoquímica de seccions seriades mostrava com la immunoreactivitat estava en les vesícules de les cèl·lules corticotròpiques productores d'ACTH. Basant-se en semblances de seqüència entre la proteïna 1B1075 i membres de la família de proteïnes cromogranina/secretogranina, així com la seva localització en vesícules, s'ha proposat d'anomenar-la provisionalment secretogranina III.

### PRODUCCIÓ D'UN RATOLÍ MUTANT SECRETOGRANINA III

Les anàlisi per transferència *southern* van demostrar que només hi ha un únic gen codificant per la secretogranina III en rates i ratolins. Es va mapejar l'homòleg de ratolí del gen per anàlisi de RFLP en ratolins de línies pures recombinants al cromosoma 9, a prop del locus *dil* (Blatt *et al.*, 1985). Aquesta regió del cromosoma 9 es troba englobada dins del petit nombre de segments de cromosomes de mamífers pels quals hi ha nombroses delecions cromosòmiques mantingudes en línies de ratolí (Russell, 1971). Moltes d'aquestes delecions s'han de mantenir en estat heterozigòtic, ja que hi ha localitzats diversos gens essencials.

El DNA de ratolins que portaven en heterozigosi cadascuna de les delecions del cromosoma 9 es va digerir amb enzims de restricció, i es va examinar per hibridació d'una transferència *southern*, emprant un clon de cDNA de la secretogranina III de longitud sencera com a sonda. Era possible distingir amb un RFLP el cromosoma portador de la delecio del cromosoma 9 no deleccionat del conjunt diploide. Es va determinar per a cadascun dels heterozigots si aquests contenien un o dos gens de la secretogranina III: si només hi havia un gen, la delecio cobria el locus. Es van identificar diverses delecions que cobrien el gen de la secretogranina III (Kingsley *et al.*, 1990).

Es va suposar que el gen de la secretogranina



III estaria contingut en la mínima regió comuna entre aquestes deleccions. Per comprovar aquesta hipòtesi es van aparellar ratolins heterozigòtics per les deleccions més petites que cobrissin el gen. La descendència amb el cromosoma deleccionat de cada progenitor es va identificar per cosegregació de marcadors lligats. Es va aïllar l'DNA de la progènie amb doble deleció i sense cap deleció, i es va examinar per hibridació d'una transferència *southern* hibridada amb l'cDNA de la secretogranina III. No es va detectar cap seqüència que hibridés amb la sonda en l'DNA dels ratolins amb doble deleció, indicant que el gen de la secretogranina III és absent d'ambdós cromosomes (Kingsley *et al.*, 1990). Així, aquesta progènie eren mutants nuls pel gen de la secretogranina III.

Les observacions d'aquests mutants han indicat que, malgrat que hi ha una manca d'expressió del gen, els individus són aparentment normals, sense que exhibeixin anormalitats visibles o de comportament, ni impediments de moviment. Sense que siguin especialment fecunds, són fèrtils. Si aquests ratolins tenen defectes, llavors l'estudi dels llocs normals d'expressió de la secretogranina III als mutants ha de ser informatiu. Els estudis preliminars suggereixen que el nombre de vesícules en algunes cèl·lules que normalment expressen secretogranina III podria ser reduït, la qual cosa sembla indicar que un dèficit d'aquesta proteïna podria afectar el ritme de formació o l'estabilitat de certes vesícules intracel·lulars. Encara que cal una confirmació rigorosa, s'han observat possibles anormalitats en els estressos provocats per corticòtrops. Ja que aquestes observacions suggereixen hipòtesis comprovables, hom ha de treure profit del sistema d'estudi que és el ratolí per avançar en la funció de la secretogranina III en la fisiologia normal. Aquest estudi també podria donar informació sobre les funcions dels altres membres d'aquesta família de proteïnes, els quals han estat identificats fins ara per les seves característiques estructurals.

## PERSPECTIVA: OBTENCIÓ DE MUTANTS

Són abundants els clons de mRNA amb distribucions interessants i que codifiquen per a proteïnes amb estructures engrescadores; la hibridació subtractiva té el poder de proveir clons de la majoria de mRNA amb expressió limitada a subgrups neuronals definits anatòmicament i que poden ser disseccionats. En la majoria dels casos serà necessària la producció de mutants per interpretar el significat fisiològic de cadascun. Tanmateix, per la majoria dels gens no es disposarà dels parells convenients de deleccions com els emprats en la producció dels mutants per la secretogranina III. En aquests casos es requeriran mètodes directes d'interferència amb l'expressió de gens particulars.

Les tècniques assequibles inclouen: la utilització de la recombinació homòloga en cèl·lules totipotents del tronc embrionari, per la introducció de mutacions específiques de localització dins la línia germinal de ratolí (Capecchi, 1989); la utilització d'un RNA antisentit, produït per un gen transformador, per inhibir el processament, transport i traducció de les molècules de RNA endogen (Izant i Weintraub, 1984; Katsuki *et al.*, 1988); i la introducció, per un gen transformador, de ribozims (els quals són RNA amb especificitat de lloc d'actuació) en ratolins, on podrien tallar i inactivar significativament certs transcrits en particular (Haseloff i Gerlach, 1988; Sarver *et al.*, 1990). Aquests tipus d'estratègies ofereixen la possibilitat de produir mutants dels gens neurals. Les anàlisis d'aquests mutants podrien ser informatives si els llocs normals d'actuació de la proteïna es coneixessin amb antelació. Els seus fenotips haurien de tenir un valor heurístic en l'enteniment de les funcions normals d'aquests gens de cervell en la fisiologia i el comportament. També es poden aplicar aquests mètodes en la producció de models animals per a malalties humanes. Una qüestió encara oberta és el percentatge de gens que produeixen fenotips

observables. Això és en part per la probable redundància que tenen molts sistemes biològics, i en part per la nostra ignorància del comportament del ratolí; és a dir, les nostres limitacions per a entendre el comportament anormal del ratolí.

## AGRAÏMENTS

Un agraïment pels meus col·legues Elena Battenberg, Floyd Bloom, Dean Bok, Miles Brennan, Frank Burton, Patria Danielson, Dan Gerendasy, Martin Godbout, Karl Hasel, Dave Kingsley, Rob Milner, Hans-Petter Ottinger, Gabriel Travis i Ken Wong, els estudis dels quals he revisat aquí. Aquesta revisió ha estat adaptada d'un article de Sutcliffe i Travis (1991). Agraïxo també al National Institutes of Health, National Science Foundation i Alzheimer's Disease and Related Disorders Association pel seu suport a la recerca.

## BIBLIOGRAFIA

- BANTLE, J. A. W. E. HAHN (1976). «Complexity and characterization of polyadenylated RNA in mouse brain». *Cell*, núm. 8, pàg. 139-150.
- BEGY, C.; C. D. BRIDGES. «Nucleotide and predicted protein sequence of rat retinal degeneration slow (*rd*s)». *Nucleic Acids Res.*, núm. 18, pàg. 3058.
- BERNAL, J., M. GOUBOUT, K. W. HASEL, G. H. TRAVIS; J. G. STUTCLIFFE (1990). «Patterns of cerebral cortex mRNA expression». *J. Neurosci. Res.*, núm. 27, pàg. 153-158.
- BLATT, C., L. WEINER, J. G. STUTCLIFFE, M. N. NESBITT; M. I. SIMON (1985). «Chromosomal mapping of murine brain-specific genes». *Cytogenet. Cell Genet.*, núm. 40, pàg. 583.
- CAPECCHI, M. R. (1989). «The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting». *Trends In Genetics*, núm. 5, pàg. 70-76.
- CAWTHON, R. M., R. WEISS, G. XU, D. VISKOCHIL, M. CULVER, J. STEVENS, M. ROBERTSON, D. DUNN, R. GESTELAND, P. O'CONNELL; R. WHITE (1990). «A major segment of the neurofibromatosis Type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations». *Cell*, núm. 62, pàg. 193-201.
- CHIKARAISHI, D. M. (1979). «Complexity of cytoplasmic polyadenylated and nonadenylated rat brain ribonucleic acids». *Biochemistry*, núm. 18, pàg. 3249-3256.
- CLAYTON, D. R., M. E. HEUCAS, E. Y. SINCLAIR-THOMPSON, K. L. NASTIUK; F. NOTTEBOHM (1988). «Probes for rare mRNAs reveal distributed cell subsets in canary brain». *Neuron*, núm. 1, pàg. 249-261.
- COHEN, A. I. (1983). «Some cytological and initial biochemical observations on photoreceptors in retinas of *rd*s mice». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, núm. 24, pàg. 832-843.
- CONNELL, G.; R. S. MOLDAY (1990). «Molecular cloning, primary structure and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane». *Biochemistry*, núm. 29, pàg. 4691-4698.
- FLIESLER, S.J., M. E. RAYBORN; J. G. HOLLYFIELD (1985). «Membrane morphogenesis in retinal rod outer segments: Inhibition by tunicamycin». *J. Cell Biol.*, núm. 100, pàg. 574-587.
- HASELOFF, J.; W. L. GERLACH (1988). «Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities». *Nature*, núm. 334, pàg. 585-591.
- HASTIE, N. D.; J. O. BISHOP (1976). «The expression of three abundance classes of messenger RNA in mouse tissues». *Cell*, núm. 9, pàg. 761-774.
- HAWKINS, R. K., H. G. HANSEN; S. SANYAL (1985). «Development and degeneration of retina in *rd*s mutant mice: photoreceptor abnormalities in the heterozygotes». *Exp. Eye Res.*, núm. 41, pàg. 701-720.
- IZANT, J.G.; H. WEINTRAUB (1984). «Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis». *Cell*, núm. 36, pàg. 1007-1015.
- JANSEN, H. G.; S. SANYAL (1984). «Development and degeneration of retina in *rd*s mutant mice: electron microscopy». *J. comp. Neurol.*, núm. 224, pàg. 71-84.
- JANSEN, H. G., S. SANYAL, W. J. DEGRIP; J. J. SCHALKEN (1987). «Development and degeneration of retina in *rd*s mutant mice: ultraimmunohistochemical localization of opsin». *Exp. Eye Res.*, núm. 44, pàg. 347-361.
- KATSUKI, M., M. SATO, M. KIMURA, M. YOKOYAMA, K. KOBAYASHI; T. NOMURA (1988). «Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice». *Science*, núm. 241, pàg. 593-595.
- KEREM, B. S., J. M. ROMMENS, J. A. BUCHANAN, D. MARKIEWICZ, T. K. COX, A. CHAKRAVARTI, M. BUCHWALD; L. C. TSUI (1989). «Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis». *Science*, núm. 245, pàg. 1073-1077.
- KIMURA, M., H. INOKO, M. KATSUKI, A. ANDO, T. SATO, T. HIROSE, H. TAKASHIMA, S. INAYAMA, H. OKANO, K. TAKAMATSU, K. MIKOSHIBA, Y. TSUKADA; I. WATANABE (1985). «Molecular genetic analysis of myelin-deficient mice: Shiverer mutant mice show deletion in gene(s) coding for myelin basic protein». *J. Neurochem.*, núm. 44, pàg. 692-696.

- KINGSLEY, D. M., E. M. RINCHIK, L. B. RUSSELL, H. P. OTTIGER, J. G. SUTCLIFFE, N. G. COPELAND; N. A. JENKINS (1990). «Genetic ablation of a mouse gene expressed specifically in brain». *EMBO J.*, núm. 9, pàg. 395-399.
- LEMKE, G. (1988). «Unwrapping the genes of myelin». *Neuron*, núm. 1, pàg. 535-543.
- MILNER, R. J.; J. G. SUTCLIFFE (1983). «Gene expression in rat brain». *Nucleic Acids Res.*, núm. 11, pàg. 5497-5520.
- MOLINEAUX, S. M., H. ENGH, F. DE FERRA, L. HUDSON; R. A. LAZZARINI (1986). «Recombination within the myelin basic protein gene created the dysmyelinating shiverer mouse mutation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 83, pàg. 7542-7546.
- NAVE, K. A., F. E. BLOOM; R. J. MILNER (1987). «A single nucleotide difference in the gene for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in the mouse». *J. Neurochem.*, núm. 49, pàg. 1873-1877.
- NIR, I.; D. S. PAPERMASTER (1986). «Immunocytochemical localization of opsin in the inner segment and ciliary plasma membrane of photoreceptors in retinas of *rd*s mutant mice». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, núm. 27, pàg. 836-840.
- NOEBELS, J. L. (1985). «Tracing the cellular expression of neuromodulatory genes». *Trends in Neuroscience*, núm. 8, pàg. 327-331.
- OTTIGER, H. P., E. F. BATTENBERG, A. P. TSOU, F. E. BLOOM; J. G. SUTCLIFFE (1990). «IB1075: A brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles». *J. Neurosci.*, núm. 10, pàg. 3135-3147.
- RIORDAN, J. R., J. M. ROMMENS, B. S. KEREM, N. ALON, R. ROZMAHEL, Z. GRZELCZAK, J. ZIELENSKI, S. LOK, N. PLAVSIC, J. L. CHOU, M. L. DRUMM, M. C. IANNUZZI, F. S. COLLINS; L. C. TSUI (1989). «Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA». *Science*, núm. 245, pàg. 1066-1072.
- ROACH, A., N. TAKAHASHI, D. PRAVTCHEVA, F. RUDDLE; L. HOOD (1985). «Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice». *Cell*, núm. 42, pàg. 149-155.
- ROMMENS, J. M., M. C. IANNUZZI, B. S. KEREM, M. L. DRUMM, G. MELMER, M. DEAN, R. ROZMAHEL, J. L. COLE, D. KENNEDY, N. HIDAKA, M. ZSIGA, M. BUCHWALD, J. R. RIORDAN, L. C. TSUI; F. S. COLLINS (1989). «Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping». *Science*, núm. 245, pàg. 1059-1065.
- RUSSELL, L. B. (1971). «Definition of functional units in a small chromosomal segment of the mouse and its use in interpreting the nature of radiation-induced mutations». *Mutat. Res.*, núm. 11, pàg. 107-123.
- SANYAL, S., G. CHADER; G. AGUIRRE (1985). «Expression of retinal degeneration slow (*rd*s) gene in retina of the mouse». *Retinal Degeneration: Experimental and Clinical Studies*, pàg. 239-256, Nova York: Alan R. Liss, Inc.
- SANYAL, S., C. DEES; G. H. ZEIMAKER (1986). «Development and degeneration of retina in *rd*s mutant mice: observations in chimaeras of heterozygous mutant and normal genotype». *J. Embryol. exp. Morph.*, núm. 98, pàg. 111-121.
- SANYAL, S.; H. JANSEN (1981). «Absence of receptor outer segments in the retina of *rd*s mutant mice». *Neurosci. Lett.*, núm. 21, pàg. 23-26.
- SANYAL, S.; G. H. ZEIMAKER (1984). «Development and degeneration of retina in *rd*s mutant mice: Light and electron microscopic observations in experimental chimaeras». *Exp. Eye Res.*, núm. 39, pàg. 231-246.
- SARVER, N., E. M. CANTIN, P. S. CHANG, J. A. ZAIA, P. A. LADNE, D. A. STEPHENS; J. J. ROSSI. «Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents». *Science*, núm. 247, pàg. 1222-1225.
- SIDMAN, R. L. (1983). «Experimental Neurogenetics». *Genetics of Neurological and Psychiatric Disorders* (S. S. Kety, L. P. Roland, R. L. Sidman; S. W. Matthysse, ed.), pàg. 19-48, Nova York: Raven Press.
- SUTCLIFFE, J. G. (1987). «The genes for myelin». *Trends in Genetics*, núm. 3, pàg. 73-76.
- (1988). «mRNA in the mammalian central nervous system». *Ann. Rev. Neurosci.*, núm. 11, pàg. 157-198.
- SUTCLIFFE, J. G.; G. H. TRAVIS (1991). «Molecular biological approaches to genetic defects of the mammalian nervous system». *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, núm. 41, pàg. 241-258.
- TRAVIS, G. H., M. B. BRENNAN, P. E. DANIELSON, C. A. KOZAK; J. G. SUTCLIFFE (1989). «Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (*rd*s)». *Nature*, núm. 338, pàg. 70-73.
- TRAVIS, G. H., L. CHRISTERSON, P. E. DANIELSON, I. KLISAK, R. S. SPARKES, L. B. HAHN, T. P. DRYJA; J. G. SUTCLIFFE (1990). «The human retinal degeneration slow (*rd*s) gene: chromosome assignment and structure of the mRNA». *Genomics*, núm. 10, pàg. 733-739.
- TRAVIS, G. H.; J. G. SUTCLIFFE (1988). «Phenol emulsion-enhanced DNA-driven subtractive cDNA cloning: Isolation of low abundance monkey cortex-specific mRNAs». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 85, pàg. 1696-1700.
- TRAVIS, G. H., J. G. SUTCLIFFE; D. BOK (1991). «The retinal degeneration slow (*rd*s) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein». *Neuron*.
- USUKURA, J.; D. BOK (1987). «Changes in the localization and content of opsin during retinal development in the

- rds* mutant mouse: immunocytochemistry and immunoassay». *Exp. Eye Res.*, núm. 45, pàg. 501-515.
- VAN NIE, R., D. IVANYI, P. DEMANT (1978). «A new H-2 linked mutation, *rds*, causing retinal degeneration in the mouse». *Tissue Antigens*, núm. 12, pàg. 106-108.
- WALLACE, M. R., D. A. MARCHUK, L. B. ANDERSEN, R. LETCHER, H. M. ODEH, A. M. SAULINO, J. W. FOUNTAIN, A. BRERETON, J. NICHOLSON, A. L. MITCHELL, B. H. BROWNSTEIN; F. S. COLLINS (1990). «Type I neurofibromatosis gene: Identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients». *Science*, núm. 249, pàg. 181-186.
- WATSON, J. B., E. F. BATTENBERG, K. K. WONG, F. E. BLOOM; J. G. SUTCLIFFE (1990). «Subtractive cDNA cloning of RC3, a rodent cortex-enriched mRNA encoding a novel 78 residue protein». *J. Neurosci. Res.*, núm. 26, pàg. 397-408.