

Relaciones genotipo-fenotipo en la formación de células altamente especializadas

Eduardo Roldán

Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos de la biología evolutiva es comprender los cambios genómicos que controlan la variación en morfología y función, y también entender cómo estos cambios generan diversidad. Por tanto, la evolución del fenotipo a través de cambios en el genotipo es un tema central de la biología. Muchos estudios han investigado este problema con la intención de comprender los procesos de desarrollo y evolución, pero también con el fin de conocer las bases genéticas de muchas enfermedades. Con el fin de entender los efectos funcionales y fenotípicos de un gen, un enfoque habitual es el uso de genética inversa, la cual investiga qué fenotipo resulta cuando se altera una secuencia génica particular (enfoque opuesto al de la genética clásica que busca conocer las bases genéticas de un rasgo biológico). Con la genética inversa los productos de genes de interés son modificados (por ejemplo, sobreexpresados o anulados) y se evalúan los cambios fenotípicos resultantes. Aunque esta es la estrategia más directa, tiene como desventaja que exagera el fenotipo resultando, en muchas ocasiones, en pérdida de función y falsos positivos, además de no considerar aspectos de redundancia funcional. Por otra parte, las asociaciones genotipo-fenotipo pueden estudiarse mediante el análisis de la diversidad natural y las fuerzas selectivas subyacentes. Esta aproximación permite un análisis más detallado del fenotipo, tal como puede ser afectado por la diversidad genotípica y las fuerzas selectivas que le influyen, en comparación al que puede realizarse a través de modificación genética o evolución experimental.

Usando este enfoque, por ejemplo, un programa de investigación sobre mariposas del género *Heliconius* ha identificado que el desarrollo de los patrones de morfología y coloración de las alas está controlado por un número reducido de genes. Las investigaciones sobre secuencias de genomas de individuos a lo largo del área de distribución de especies cercanas permitieron caracterizar la variación genómica asociada a la diversidad en el patrón morfológico. Se encontró que los genes que controlan la complejidad en los patrones de las alas son, en realidad, muy pocos y que este pequeño grupo de genes

ha sido utilizado repetidamente para generar fenotipos tanto convergentes como divergentes. Los convergentes responden a casos de mimetismo que evoluciona como defensa frente a predadores y los divergentes en respuesta a procesos de selección sexual, lo que es importante para entender el efecto de diversas fuerzas selectivas. La clave de la evolución de los diversos patrones de coloración de alas, sin embargo, no se encuentra en los genes mismos, ya que estos están altamente conservados a nivel de secuencia, sino en las regiones reguladoras que controlan expresión génica durante el desarrollo de las alas. La variación es altamente modular, con intervalos genómicos estrechos asociados a diferencias específicas en color y patrón. Esta arquitectura modular en la regulación es capaz de explicar la diversidad de patrones de color y provee un mecanismo flexible para una rápida diversificación morfológica.

Nuestras investigaciones se fundamentan en una estrategia similar, pero a nivel celular en lugar de orgánico, para comprender los cambios en las secuencias codificantes y regulación génica de proteínas que son importantes para la compactación del ADN y la formación de la cabeza de células altamente especializadas, como son los espermatozoides (*Figura 1*). Más aún, empleando un conjunto de especies de roedores que muestran una enorme diversidad natural en la forma y tamaño de los espermatozoides, podemos explorar el papel de la selección sexual, una potente fuerza selectiva, en la evolución de esta diversidad.

Es bien conocido que hay una serie de factores genéticos que influyen en la forma y función de los espermatozoides. Por ejemplo, hay una serie de mutaciones de genes que regulan la espermatogénesis que resultan en alteraciones de la normalidad morfológica de las células espermáticas. El control genético de la forma espermática ha quedado claramente demostrado mediante xenotrasplante de espermatogonias de diversas especies a testículos de ratones inmunodeprimidos, en los que se ha visto que los espermatozoides que desarrollan poseen la forma de la especie donante y, más aún, que la cinética de la formación espermática obedece a la célula

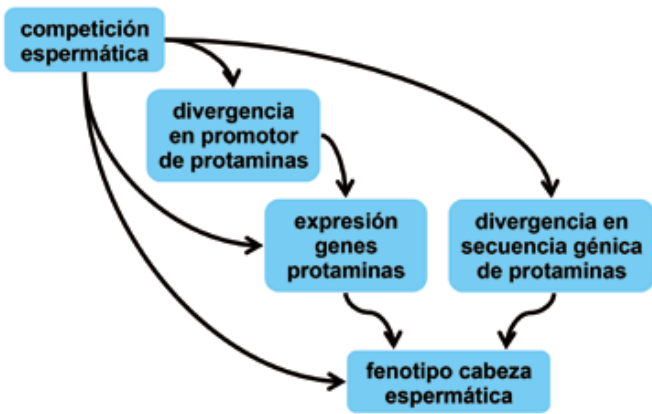


Figura 1
Posibles asociaciones entre competición espermática, protaminas y fenotipo espermático.

trasplantada, no dependiendo del tejido del huésped. También es bien conocido el hecho de que pueden modificarse la morfología y dimensiones de los espermatozoides mediante procesos de selección artificial y, en particular, que la evolución experimental en condiciones de competición espermática conlleva el desarrollo de espermatozoides de mayores dimensiones.

DIVERSIDAD NATURAL EN FORMA Y FUNCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

El gameto masculino es una célula de vida libre, compartimentada, muy polarizada y altamente especializada. En especies con fecundación interna (como los mamíferos), la función del espermatozoide es llevar el genoma paterno hasta el sitio del tracto reproductor femenino donde tiene lugar la fecundación, interactuar con el gameto femenino, atravesar sus cubiertas celulares y acelulares, fusionarse con el óvulo, descondensar el núcleo, restaurar diploidía y activar el desarrollo embrionario. La estructura de esta célula consiste en: (a) una cabeza, que lleva el genoma paterno en el núcleo y un gránulo exocitótico con enzimas necesarias para penetrar las cubiertas del óvulo, y (b) un flagelo, con dos componentes, la pieza intermedia en la que se ubican las mitocondrias, y las piezas principal y terminal; el flagelo genera la fuerza motriz para el desplazamiento y contiene la maquinaria celular encargada de generar la energía necesaria para dicho movimiento. A partir de este diseño básico, se ha desarrollado una enorme diversidad de espermatozoides con un amplio rango de formas y tamaños.

¿Por qué hay tantas diferencias en forma y dimensiones de los espermatozoides? Los espermatozoides están sometidos a una presión selectiva muy intensa ya que el éxito reproductor del macho depende en última instancia de la capacidad de fecundar de sus espermatozoides.

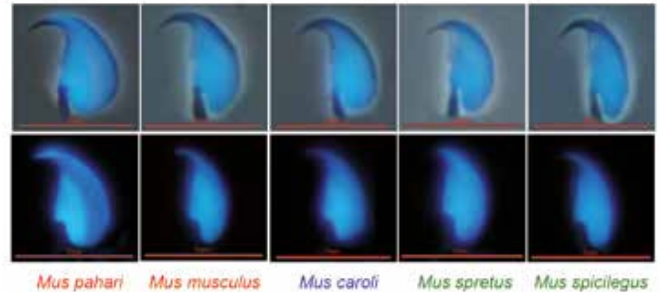


Figura 2
Forma de la cabeza espermática (arriba) y núcleo (debajo) en especies de ratón del género *Mus* ordenadas (de izquierda a derecha) según orden creciente de niveles de competición espermática.

Una fuerza selectiva muy potente, responsable en parte de la diversidad en forma y función presente en los gametos masculinos, es la selección sexual poscópula que incluye la competición entre los espermatozoides de machos rivales por fecundar al óvulo y la elección críptica por parte de la hembra, en este caso en el tracto genital femenino. El papel de la competición espermática en la evolución de las células espermáticas se ha descrito en muchos taxones, incluyendo los mamíferos, y se sabe que esta fuerza selectiva ha influido en una variedad de rasgos fenotípicos incluyendo forma de los espermatozoides (Figura 2) y los patrones de natación. Los cambios en forma y dimensiones son importantes porque los espermatozoides con cabeza más elongada, o más largos, nadan más deprisa y son más eficaces durante el transporte en el tracto femenino y en la fecundación.

Los espermatozoides se producen en el testículo mediante el proceso de espermatogénesis y hay grandes diferencias entre individuos y entre especies, en cantidad y calidad de los mismos. Cabe esperar por tanto que este proceso esté influenciado por la competición espermática. De acuerdo con esta expectativa, la evidencia muestra que hay relaciones entre niveles de competición espermática, la arquitectura del testículo y la cinética de proliferación y diferenciación celulares.

FORMACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y PAPEL DE LAS PROTAMINAS EN LA FORMA DE LA CABEZA

La producción de espermatozoides comienza con las espermatogonias, las células madre diploides del testículo, que atraviesan por fases de división mitótica y meiótica y, finalmente, se diferencian hacia espermátidas haploides en el proceso conocido como espermiogénesis. Durante este proceso las espermátidas >>>

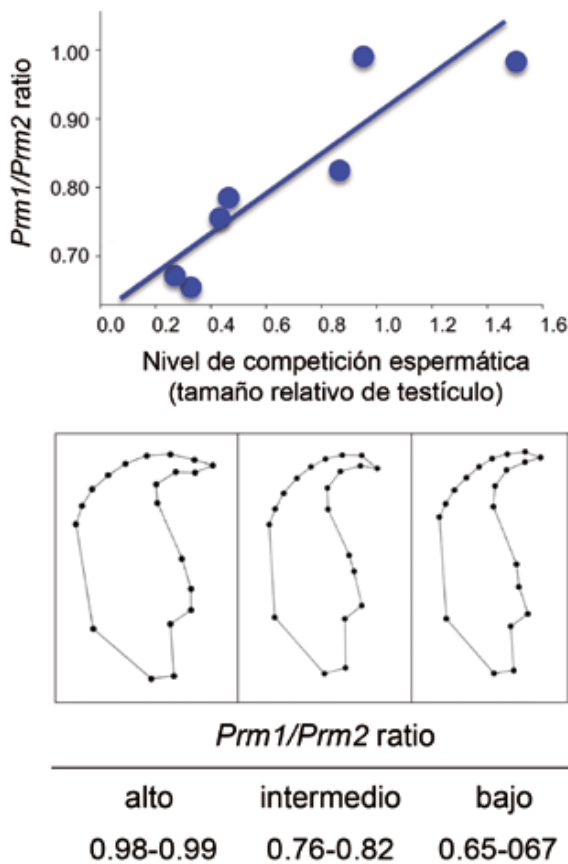


Figura 3

Expresión de protaminas, competición espermática y forma de la cabeza de los espermatozoides. Arriba: Relación entre niveles de competición espermática (cuantificado usando tamaño relativo de testículo como proxy) y ratio de expresión de *Prm1* y *Prm2*. Debajo: Asociación entre ratio de expresión de protaminas (alto, intermedio, bajo) y forma de la cabeza espermática.

»» redondas se diferencian en espermátidas elongadas adquiriendo una forma de cabeza espermática y dimensiones características de cada especie. En esta etapa, las histonas que se encuentran unidas al ADN son reemplazadas gradual y secuencialmente por variantes de histonas específicas del testículo, proteínas de transición (TNPs) y, finalmente, protaminas (PRMs) resultando en una hipercondensación del genoma haploide paterno.

Las protaminas son ricas en residuos de arginina cargados positivamente y median una unión fuerte al surco menor del ADN cargado negativamente. Además, los residuos de cisteína forman uniones disulfuro intra e intermoleculares, estabilizando así el complejo ADN-protamina. Los complejos de protamina espermáticos

forman toroides que resultan en una compactación de hasta seis veces mayor que la que promueven las histonas cuando se unen al ADN. Esta hipercondensación que tiene lugar en las espermátidas elongadas ocasiona un silenciamiento completo de la transcripción y protege al genoma de daños ambientales.

En primates (incluido el hombre), la mayoría de los roedores y en algunas otras especies, existen dos protaminas, designadas protamina 1 (PRM1) y protamina 2 (PRM2). En algunas especies de roedores (rata y algunos hamsters) y en toro y cerdo, la PRM2 está ausente en los espermatozoides por mutaciones en la secuencia codificante o del promotor. La PRM1 se traduce como una proteína madura mientras que la PRM2 es traducida como un precursor que madura mediante clivaje a medida que se va uniendo al ADN. La PRM1 y la PRM2 son traducidas en un ratio específico para cada especie. En humanos hay cantidades iguales de ambas; en ratones la PRM2 es más abundante. Una desviación de la ratio de protaminas está asociada a subfertilidad y disminución de la integridad del ADN.

Estudios de modificación genética basados en tecnología de quimeras generadas con células madre embrionarias mostraron que la heterocigosis de un alelo de cualquiera de las dos protaminas resultaba en infertilidad, con anomalías en la forma de la cabeza espermática, alteración en la integridad del ADN y descenso de la motilidad. Sin embargo, investigaciones más recientes utilizando tecnología CRISPR/Cas9 han mostrado que es posible generar ratones deficientes en PRM2 sin alterar la estructura general del gen o afectar las secuencias reguladoras; con ello se ha podido mostrar que los heterocigotos son fértiles, con morfología espermática normal, mientras que los *knockout* son infértiles, con anomalías morfológicas de la cabeza y motilidad espermática alterada.

EVOLUCIÓN DE PROTAMINAS Y RELACIÓN CON FENOTIPO ESPERMÁTICO

Para comprender los factores clave que influyen en la estructura y funcionamiento del espermatozoide es importante responder a una serie de preguntas. Entre otras ¿Cómo evolucionan genes relacionados con la formación de los espermatozoides? ¿Hay diferencias entre diversos linajes (por ejemplo entre especies de roedores) en la evolución de genes que regulan forma de la cabeza? ¿Es importante la forma de la cabeza para la velocidad o para la trayectoria de natación? A partir de estas preguntas hemos desarrollado un programa de investigación que nos permita comprender la evolución de genes de protaminas que regulan procesos de formación de la cabeza de los espermatozoides. Nuestros objetivos principales son análisis comparativos integradores en un marco filogenético

para comprender (a) relaciones entre el diseño de cabeza y otros componentes celulares, el metabolismo y la natación de los espermatozoides de diversas especies, con particular atención a eficiencia hidrodinámica y biomecánica y (b) asociaciones genotipo-fenotipo, prestando atención a la evolución de secuencias codificantes y de promotores, así como expresión génica, de protaminas involucradas en procesos de espermiogénesis.

Los genes *Prm1* y *Prm2*, o las regiones de los promotores, podrían estar bajo fuerte selección y sus tasas evolutivas podrían estar relacionadas con la forma de la cabeza espermática (por el papel de las protaminas en la condensación del ADN), y con la velocidad de natación (porque la forma de la cabeza podría influir en la eficiencia hidrodinámica del espermatozoide). Se ha argumentado que las protaminas son las proteínas reproductivas que evolucionan más deprisa. Sin embargo, no está claro cuál es el papel de diversas fuerzas selectivas en esta rápida evolución. Se ha detectado selección positiva en *PRM1* en primates y roedores, pero nuestros resultados recientes muestran que los patrones de evolución de ambas protaminas en los mamíferos son más complejos de lo anticipado.

Examinamos, en especies filogenéticamente cercanas de ratones del género *Mus*, la divergencia en secuencias de protaminas, encontrando que la *Prm1* está altamente conservada mientras que en *Prm2* se observa evidencia de selección positiva. En estas especies se ha verificado una relación positiva entre la divergencia en el promotor de *Prm2* y los niveles de competición espermática. En estudios posteriores, también en ratones del género *Mus*, observamos diferencias en niveles de expresión génica, que están asociados a los niveles de competición espermática (Figura 3) y una relación entre los ratios de expresión de las protaminas y la forma de la cabeza espermática (Figura 3). Estas diferencias en forma muy probablemente influyen en la hidrodinámica de la célula espermática y su velocidad y trayectoria de natación.

Extendiendo el estudio a otros grupos de especies de roedores (arvicólidos y cricétidos) hemos notado diferencias en los patrones de evolución de *Prm1* y *Prm2*, y también una asociación entre cambios en esta última y la forma de la cabeza de los espermatozoides. Además, que los patrones de cambios en secuencia y regulación génica difieren entre los diversos grupos de roedores. Nuestros resultados sugieren por tanto que los cambios evolutivos en protaminas pueden estar asociados a modificaciones complejas en el desarrollo de la cabeza espermática.

CONCLUSIÓN

La caracterización de aspectos importantes en la regulación génica que parecen modular variación fenotípica ha mostrado que diversas morfologías espermáticas pueden estar vinculadas a la evolución de procesos reguladores. De manera general, nuestras investigaciones proveen un marco para continuar investigando la complejidad en la regulación génica durante la formación de los espermatozoides. Los trabajos futuros pueden centrarse en identificar elementos reguladores distintivos que podrían estudiarse mediante edición génica. Con una aproximación integradora podría anticiparse un incremento importante en el conocimiento de relaciones entre genotipo y fenotipo y cómo estas relaciones participan en el desarrollo de las células espermática. Teniendo en cuenta que las protaminas intervienen en la condensación de cromatina de todos los mamíferos, esta investigación tiene importantes ramificaciones para comprender cómo unos cambios aparentemente sencillos tienen grandes repercusiones en la diferenciación de estas células y en la transmisión de material genético. Estas investigaciones serán también cruciales para identificar bases genéticas de anomalías espermáticas relevantes para infertilidad humana y de otras especies, pensar en posibles dianas para la consecución de nuevos anticonceptivos, y focalizar en determinados aspectos clave de la formación de los espermatozoides de cara al desarrollo de tecnologías de generación de gametos artificiales. ■

PARA LEER MÁS

- Lüke L, Campbell P, Varea-Sánchez M, Nachman MW, Roldan ERS. Sexual selection on protamine and transition nuclear protein expression in mouse species. *Proc. Roy. Soc. B* 281 (2014) 20133359.
- Lüke L, Tourmente M, Roldan ERS. Sexual selection of protamine 1 in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 174-84.
- Lüke L, Tourmente M, Dopazo H, Serra F, Roldan ERS. Selective constraints on protamine 2 in primates and rodents. *BMC Evol. Biol.* 16 (2016) 21.
- Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl P. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839 (2014) 155-68.
- Schneider S, Balbach M, Jikeli JF, Fietz D, Nettersheim D, Jostes S, Schmidt R, Kressin M, Bergmann M, Wachten D, Steger K, Schorle H. Re-visiting the protamine-2 locus: deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile. *Sci. Rep.* 6 (2016) 36764.
- Van Belleghem SM, Rastas P, Papanicolaou A, Martin SH, Arias CF, Supple MA, Hanly JJ, Mallet J, Lewis JJ, Hines HM, Ruiz M, Salazar C, Linares M, Moreira GRP, Jiggins CD, Counterman BA, McMillan WO, Papa R. Complex modular architecture around a simple toolkit of wing pattern genes. *Nat. Ecol. Evol.* 1 (2017) pii: 0052.