

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“CLONACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR  
DEL RECEPTOR DE LA FSH DE Neotomodon alstoni alstoni.”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A**

**MARCO ALLÁN PÉREZ SOLIS**

**CODIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. Rubén Gutiérrez Sagal**

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

**ASESORA:**

**Dra. Cristina Aleida Olivares Segura**

**MÉXICO, D.F.**

**30 DE JUNIO DE 2010**

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACyT con número de registro 169591.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco)

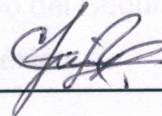
aprobó la Tesis que presentó

Dr. Rubén Gutiérrez Sagal  
Investigador Asociado "B", UIMMP, Instituto Mexicano del Seguro Social  
**MARCO ALLÁN PÉREZ SOLIS**

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana  
Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana  
El día 30 de JUNIO de 2010.

**Sinodales:**

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana (Presidente)**



**Dra. Cristina Aleida Olivares Segura (Secretario)**



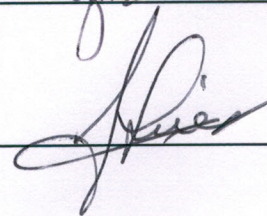
**Dra. Irma Jiménez Morales (Vocal)**



**Dr. Rubén Gutiérrez Sagal (Vocal)**



**Dr. José Luis Contreras Montiel (Vocal)**



## COMITÉ TUTORIAL

### DIRECTORES DE TESIS

**Dr. Rubén Gutiérrez Sagal**

Investigador Asociado “B”, UIMMR, Instituto Mexicano del Seguro Social

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

Profesor Titular “C”, Universidad Autónoma Metropolitana

### ASESOR

**Dra. Cristina Aleida Olivares Segura**

Investigador Asociado “B”, UIMMR, Instituto Mexicano del Seguro Social  
Universidad Nacional Autónoma de México

### SINODALES

**Dra. Irma Jiménez Morales**

Profesor Titular “D”, Universidad Autónoma Metropolitana

**Dr. José Luis Contreras Montiel**

Profesor Titular “C”, Universidad Autónoma Metropolitana

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social en colaboración con el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Bajo la Codirección de:

Dr. Rubén Gutiérrez Sagal

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

## **AGRADECIMIENTOS**

De manera muy particular, quiero agradecer al Dr. Rubén Gutiérrez Sagal, que a través de su apoyo y guía fue posible la culminación de este trabajo. Así también, le agradezco a la Dra. Reyna C. Fierro Pastrana, la paciencia y el impulso que me brindo durante todo este proceso académico que experimente. Agradezco también a la Dra. Cristina A. Olivares Segura por sus acertadas sugerencias y contribuciones a este trabajo, así como también por la amistad y ayuda que me dio en los momentos complicados.

A la Dra. Irma Jiménez Morales y al Dr. José Luis Contreras Montiel por su tiempo e interés que dedicaron a la revisión de esta tesis.

Al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de investigación y de poderme desarrollar profesionalmente.

A la Dra. Guadalupe Maya Nuñez y a todos mis compañeros de laboratorio que de alguna forma siempre me apoyaron cuando lo necesite.

A mis Padres y hermanos por el apoyo moral y el cariño que siempre me han manifestado.

Al CONACYT por la beca que me otorgaron para la realización de mis estudios de posgrado.

*Dedicada a:*

*Dios por darme todo lo que tengo.*

*Adriana e Ian, la luz y el motor de mi vida.*

*“Seis honrados servidores me enseñaron cuanto sé; sus nombres son cómo, cuándo, dónde, qué, quién y por qué.”*

*Rudyard Kipling*



## RESUMEN

La importancia que tiene el receptor de la FSH (FSHR) en la gametogénesis de los mamíferos ha conducido el estudio de su expresión en varios niveles. Sin embargo, los mecanismos que explican la regulación del FSHR a nivel transcripcional en las células de Sertoli aún no están claros. La recopilación de nueva información acerca de los elementos *en cis* y *en trans* en promotor del FSHR, es de gran importancia para una mejor comprensión del proceso de regulación de la expresión de la FSH. El presente estudio, estuvo enfocado en la clonación y caracterización funcional de la región flanqueante 5' del FSHR del ratón de los volcanes, mediante el análisis predictivo de la secuencia de la región promotora clonada y ensayos de expresión transitoria *in vitro*, con construcciones reporteras gobernadas por diferentes segmentos y versiones mutantes del promotor en estudio.

La región flanqueante 5' del promotor del FSHR clonada molecularmente desde el ratón de los volcanes, conserva varios elementos *en cis* reportados con anterioridad en otras especies de mamíferos. Además se lograron detectar nuevos elementos putativos de alta identidad con secuencias consenso para factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional de genes relevantes para el desarrollo y funcionamiento de las gónadas. Tres elementos putativos para factores de la familia SOX/SRY y cuatro elementos para factores de la familia GATA en el promotor del FSHR del ratón de los volcanes, presentaron una regulación transcripcional positiva al ser sometidos a pruebas de mutagénesis sitio

dirigida o por eliminación del elemento. En el caso particular de los elementos en *cis* para GATA, se logró corroborar su actividad al ponerlos en presencia de los factores de transcripción mGATA-1 y hGATA-4.

<b>INDICE</b>	<b>PAG.</b>
<b>1. Introducción y Antecedentes</b> _____	13
1.1. La actividad biológica de la hormona folículo estimulante (FSH) es crítica para un desarrollo testicular normal. _____	14
1.2. Características Moleculares del FSHR. _____	16
1.3. Mecanismos de regulación de la expresión del receptor de la FSH. _____	18
1.4. Regulación transcripcional del promotor del gen del FSHR. _____	20
1.5. Familia de factores de transcripción GATA y su relevancia para el desarrollo testicular. _____	22
<b>2. Justificación</b> _____	25
<b>3. Hipótesis</b> _____	28
<b>4. Objetivos</b> _____	30
<b>5. Materiales y Métodos</b> _____	32
5.1. Extracción de ADN genómico del ratón común y del ratón de los volcanes. _____	33
5.2. Clonación de la secuencia flanqueante 5' del gen del receptor de la hormona folículo estimulante. _____	34
5.3. Análisis de la secuencia. _____	34
5.4. Preparación de las construcciones génicas. _____	35
5.5. Mutagénesis sitio-dirigida. _____	40
5.6. Clonación de los factores de transcripción GATA-4 y GATA-1. _____	42
5.7. Cultivo Celular y Análisis de Expresión Transitoria. _____	43
5.8. Análisis Estadístico. _____	44
<b>6. Resultados</b> _____	45

6.1. Clonación y análisis de secuencia de la región flanqueante 5' del FSHR de ratón de los volcanes. _____	46
6.2. Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas del promotor del FSHR. _____	49
6.3. El promotor del FSHR contiene regiones represoras que actúan célula-específicamente. _____	53
6.4. Los elementos de regulación transcripcional positiva del promotor del nFSHR se encuentran en la región proximal. _____	56
6.5. La eliminación de los elementos GATA del promotor del nFSHR afecta negativamente su actividad transcripcional. _____	59
<b>7. Discusión</b> _____	68
<b>8. Conclusiones</b> _____	75
<b>9. Perspectivas</b> _____	77
<b>10. Bibliografía</b> _____	79

## **1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

### **1.1. La actividad biológica de la hormona folículo estimulante (FSH) es crítica para un desarrollo testicular normal.**

La espermatogénesis es un proceso complejo de diferenciación celular, responsable de la producción de espermátidas viables para la fase final de la maduración en el epidídimo. Este proceso se efectúa en una estrecha asociación con las células de Sertoli (CS), una estirpe celular que reviste los túbulos seminíferos del testículo y que están especializadas en el mantenimiento de las condiciones físicas y de nutrición para la maduración óptima de las células germinales (O'Donnell et al., 2001). Las células de Sertoli, desde sus primeras etapas en el desarrollo testicular, son estimuladas para diferenciarse y realizar sus respectivas funciones. Las hormonas más relevantes involucradas en estos procesos son la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Testosterona (Griswold 1998). La primera es una gonadotropina secretada por la hipófisis, que viaja por el torrente sanguíneo hasta las CS donde se encuentra su correspondiente receptor transmembranal, el receptor de la FSH (FSHR). Su actividad biológica sobre las CS, se ha evidenciado por el incremento del AMPc, por la síntesis de proteínas y la producción de estradiol cuando se estimula a las CS con FSH. Por otro lado, la testosterona es una hormona androgénica de secreción paracrina, producida en las células de Leydig en respuesta a la estimulación de la Hormona Luteinizante (LH). La 5-alfa-dihidrotestosterona, la forma activa de la testosterona, estimula uniéndose al receptor de andrógenos intracelular, el cual a su vez se transloca al núcleo celular donde activa a los genes involucrados con procesos fundamentales

para la reproducción masculina, como son: el desarrollo testicular, el mantenimiento de la espermatogénesis y la expresión de las características sexuales secundarias (Walker y Cheng 2005).

La actividad de la FSH en la función testicular varía de acuerdo con la especie y etapa del desarrollo en la que se estudie. Esto ha provocado controversia en la relevancia de su actividad biológica en la fertilidad masculina. Estudios en ratas adultas inmunizadas contra la Hormona Liberadora de Gonadotropinas y tratadas con testosterona, demuestran que la espermatogénesis se reestablece y se mantiene, pero sólo en forma cuantitativa. En contraste, estudios con ratas hipofisectomizadas y estimuladas con testosterona, no muestran recuperación de la espermatogénesis que se pierde debido a la privación quirúrgica de gonadotropinas (Zirkin et al 1994). Es probable que la diferencia entre estos estudios se deba a que el sistema inmune de las ratas sea ineficiente en el reconocimiento de la hormona liberadora de gonadotropinas unida a su proteína transportadora, permitiendo así que una pequeña cantidad de antígeno logre interactuar con su receptor.

Otros estudios realizados en primates (incluyendo el humano), han demostrado que la testosterona no es suficiente para mantener la producción normal de espermatozoides en individuos adultos con deficiencias gonadotrópicas (Roberts y Zirkin 1991). En base a estos y otros estudios realizados en diferentes especies de mamíferos, la conclusión de que deficiencias en desarrollo testicular

y la baja calidad y cantidad de los espermatozoides causadas por la ausencia de la FSH, pueden diezmar la fertilidad masculina, (Heckert y Griswold, 2001), es la que más se acepta actualmente. Por lo tanto, este sistema de regulación en la producción de espermatozoides, que en primera instancia pareciera redundante, podría estar desempeñando un papel muy importante para la preservación de la fertilidad y así asegurar la reproducción de los mamíferos.

## **1.2. Características moleculares del FSHR.**

El papel central que juega la FSH en el desarrollo y función de sus células blanco, ha promovido una investigación más profunda de la expresión del FSHR y sus implicaciones en la reproducción de los mamíferos superiores. La presencia del receptor de la FSH en el testículo, fue demostrada por primera vez por Means y Vaitukaitis (1972), mediante un ensayo de unión de FSH marcada radiactivamente con tritio ( $^3\text{H}$ -FSH) en diferentes órganos de rata. En varias especies, la  $^3\text{H}$ -FSH se unió con gran especificidad a la membrana de células provenientes de los túbulos seminíferos del testículo (Means y Vaitukaitis 1972). Posteriormente, se llevaron a cabo varios trabajos con el fin de caracterizar la interacción del FSHR (Bhalla and Reichert, 1974), aislar (Dufau et al., 1977) y localizar tisularmente la expresión del FSHR en el testículo (Wahlström et al., 1983). El gen del FSHR fue localizado junto con el receptor de la LH en el cromosoma 2p21-p16, de lo cual se han generado teorías en cuanto a que ambos provienen de un receptor ancestro común (Segaloff y Ascoli 1993; Gromoll et al.,



1994b). La región que codifica el FSHR en varios mamíferos, incluyendo al humano (Kelton et al., 1992; Gromoll et al., 1993; Robert et al., 1994; Yarney et al., 1993; Remy et al., 1995; Houde et al., 1994) y otras especies no mamíferas (You et al., 1996; Akazome et al., 1996), ha sido clonada y secuenciada.

En gran parte de los mamíferos estudiados, se ha encontrado que el marco de lectura abierta del receptor alcanza los 2085 pb (Simoni et al., 1997), mientras que en otras especies como los roedores y el caballo, la longitud es ligeramente menor, de 2076 (Sprengel et al., 1990, Tena-Sempere et al., 1999) y 2082 pb (Robert et al, 1994) respectivamente. A partir de esta información, se ha llevado a cabo la predicción y análisis de la estructura primaria del FSHR de diferentes especies. Conforme se hicieron las comparaciones entre las secuencias peptídicas del FSHR de cada especie y con otros receptores relacionados, se fue estableciendo la función de cada uno de los dominios y regiones del FSHR (Simoni et al., 1997, Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). En el caso particular del humano, la estructura primaria del FSHR cuenta con 695 aminoácidos (a.a.), de los cuales los primeros 17 corresponden al péptido señal. Debido a las diferencias interespecíficas del FSHR, su masa molecular puede variar entre 75 y 76.5 kDa, dependiendo de su fuente (Simoni et al., 1997). Estructuralmente, el FSHR consta de tres regiones o dominios principales; dos de ellas tienen un comportamiento hidrofílico, de las cuales la región amino, que es la más grande (349 a.a.) se localiza extracelularmente. La región carboxilo es la más pequeña con 65 a.a. y se encuentra localizada intracelularmente. La tercera región de 264 a.a., gracias a su

hidrofobicidad es capaz de atravesar la membrana plasmática en siete ocasiones, permitiendo que el receptor pueda quedar anclado en la membrana (Sprengel et al., 1990, Ulloa-Aguirre y Conn, 1998).

### **1.3. Mecanismos de regulación de la expresión del receptor de la FSH.**

A través de ensayos de expresión por *Northern blot*, ha sido posible la detección de, por lo menos, tres transcritos diferentes provenientes del gen del FSHR de tejidos de ovario y testículo de varios mamíferos; sin embargo, el patrón de expresión de estos diferentes ARN mensajeros es similar en ambos tipos y no presentan variaciones en sus niveles de expresión durante la gametogénesis (Heckert y Griswold, 1991). Debido a sus grandes diferencias en tamaño y la modificación que sufren estos transcritos en el marco de lectura, es que se ha sugerido la participación de diferentes mecanismos a nivel postranscripcional, como el *splicing* alternativo, en la síntesis de diferentes isoformas del receptor de la FSH (Rajapaksha et al, 1996; O'Shaughnessy y Dudley, 1993; Tisdall et al, 1995). Las implicaciones en la regulación de la expresión de diferentes transcritos podrían ser: 1) la competencia por la maquinaria traduccional entre los transcritos truncados y el ARNm completo; o 2) el efecto antagonizante que resultaría por la síntesis de receptores sin dominios transmembranales, generando así el secuestro de la FSH (Khan et al,1993; Sairam et al,1996)

Por otra parte, estudios moleculares realizados durante el desarrollo y diferenciación celular del testículo en mamíferos, han aportado evidencias fuertes de que la expresión del FSHR y de otras proteínas encontradas en testículo, puede estar también regulada a través de una comunicación paracrina entre las células de Sertoli y las células germinales (Huhtaniemi et al, 1987; Stallard y Griswold, 1990; Grima et al, 1992). La unión de la FSH y la expresión del ARNm del FSHR pueden ser medidos a partir del día de gestación 28 en el cerdo (Goxe et al, 1993) y del día 17 en la rata (Warren et al 1984). Estos parámetros siguen incrementándose después del nacimiento llegando a un pico máximo entre los días 13 y 20 en los roedores, y disminuye drásticamente a partir del día 21, cuando aparecen células de Sertoli maduras y las espermátidas y espermatocitos comienzan a producirse (Tsutsui et al, 1985; Eskola et al, 1993). Este patrón de expresión ontogénico del receptor ocurre en forma paralela al incremento de los niveles de FSH, de lo cual se sugiere que en las etapas del desarrollo testicular, la FSH es capaz de inducir la producción de su propio receptor.

Sin embargo, durante la pubertad y la edad adulta de ratas, ratones y algunos animales fotosensibles; el patrón de expresión del receptor de la FSH en tejido testicular vuelve a cambiar. Tanto factores endocrinos como factores externos toman el control de la regulación, lo cual se argumenta a partir de los diferentes patrones específicos de expresión del FSHR, registrados en cada especie estudiada. Se ha observado que en algunos animales fotosensibles, como en la codorniz macho, el cambio de días cortos a días largos despliega un

crecimiento testicular sostenido por el aumento de sitios de unión a la FSH, inducidos a su vez por la elevación de los niveles gonadotrópicos, implicando así un mecanismo de regulación positiva del FSHR (Tsutsui et al, 1988; Tsutsui et al, 1992). Pero en los roedores, la privación de la FSH genera un aumento en el índice de FSH unida, sugiriendo un mecanismo de regulación negativa de la hormona en estas especies adultas (Simoni et al, 1997). Aunque, por otra parte, también se ha comprobado que los niveles del ARNm del FSHR se incrementan en el transcurso de los estados XIII, XIV y I de la espermatogénesis de los mamíferos, momento en el que se pueden encontrar las células germinales menos maduras. Una vez que el ARNm del receptor ha alcanzado su máximo en el estado I, comienza una disminución gradual hasta llegar a su mínima expresión durante los estados VI y VII, donde se encuentran las células germinales más avanzadas (Heckert y Griswold, 1991; Simoni et al, 1997). Estos datos vuelven a sugerir fuertemente la existencia de comunicación estrecha entre las células germinales y las células de Sertoli que podría influir de manera importante en la expresión del FSHR, mediante un mecanismo en el que no se ha establecido con claridad cuáles son los estímulos, segundos mensajeros y factores de transcripción que están implicados.

#### **1.4. Regulación transcripcional del promotor del gen del FSHR.**

El advenimiento de las técnicas de biología molecular dio el impulso que se necesitaba para profundizar en los mecanismos moleculares de la expresión del

FSHR, logrando la clonación de las regiones promotoras del gen del FSHR de humano (Gromoll et al, 1996), rata (Heckert et al, 1992), ratón (Huhtaniemi et al, 1992; Levallet et al, 2001) y oveja (Sairam y Subbarayan, 1997). El análisis de la secuencia de cada promotor, permitió encontrar algunos de los elementos en *cis* involucrados en la regulación de la expresión constitutiva del FSHR, entre los que se incluyen un sitio de unión para la proteína de activación-1 *AP-1* en rata y oveja (Heckert et al, 1992; Xing et al, 2002), para el factor esteroideogénico *SF-1* (Levallet et al, 2001; Xing et al, 2002) y para el factor de estimulación *USF* en roedores y oveja (Heckert, 2001; Xing et al, 2002), para *GATA-1* y *E2F* en rata (Kim y Griswold, 2001), para el receptor de estrógenos (RE) en el humano (Gromoll et al, 1994), y secuencias homólogas a la caja CACC (Xing y Sairam, 2001b) y a la caja *E* en rata (Goetz et al, 1996). Así también, existe una región iniciadora (*InR*) muy conservada entre los mamíferos (Heckert, 2001; Xing y Sairam, 2001a; Lavallet et al, 2001). Por otra parte, este promotor no tiene una caja TATA o CCAAT convencional, la cual, por lo común, se encuentra inmediatamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción en otros genes (Smale y Baltimore, 1989; Gromoll et al, 1994a). Una característica interesante del promotor del FSHR, es que contiene dos sitios de inicio de la transcripción a -80 y -98 pb con respecto al sitio de inicio de la traducción (Heckert et al, 1992). Estas características del promotor lo clasifican dentro de la familia de promotores para genes “*housekeeping*” o constitutivos (Smale y Baltimore, 1989). Esto contrasta fuertemente con el hecho de que la expresión específica del FSHR en las células de Sertoli y de la granulosa depende de muchos estímulos paracrinos que se presentan en estados

específicos de la gametogénesis. Sin embargo, ninguno de los elementos en *cis* hasta ahora encontrados, explica la especificidad celular del receptor ni su modulación a través de la gametogénesis (Putowski et al, 2001). Esto indica que es muy probable la intervención de otros factores transcripcionales y coreguladores, que actúan en forma cooperativa y coordinada en la regulación génica del FSHR.

### **1.5. Familia de factores de transcripción GATA y su relevancia para el desarrollo testicular.**

Los miembros de la familia GATA son reguladores nucleares que se caracterizan por unirse al DNA mediante el reconocimiento de la secuencia consenso (A/T)GATA(A/G), a partir de lo cual se toma su nombre. Con base en la localización, estructura y función de sus miembros, esta familia se ha dividido en dos subfamilias. La primera subfamilia está conformada por GATA-1, 2 y 3, los cuales, por lo común, están asociados a estirpes celulares de tipo hematopoyético o nervioso (La Voie 2003). Por otra parte, la subfamilia conformada por los miembros GATA-4, 5 y 6, están más relacionados con el desarrollo de tejidos que tienen como origen al endodermo y mesodermo como: hígado, corazón, pulmón, intestino, gónadas, etc. La función que desempeñan estos factores en los mamíferos es crítica, ya que con excepción de GATA-5, la anulación de su expresión durante el desarrollo es letal (Molketin 2000). Existen varios estudios que involucran a estos reguladores nucleares en la expresión de genes de gran

importancia para el desarrollo gonadal como SRY (Miyamoto et al, 2008), Rhox5 (Bhardwaj et al, 2008), Testina (Cheng et al, 2003), la hormona anti-Mulleriana (Oréal et al, 2002), etc. Incluso hay reportes que indican que la ausencia de GATA-1 o GATA-4 puede ocasionar alteraciones en el desarrollo normal del testículo (Nichols et al, 2000; Ketola et al, 2000).

En la estructura molecular de estos factores, es sobresaliente el alto nivel de conservación que tienen los dominios de unión al ADN, entre las diferentes especies de vertebrados estudiadas. La conformación que toman estos dominios son conocidos como dedos de zinc de los cuales cada miembro de la familia cuenta con dos. Cada dedo de zinc es identificado como amino o carboxilo terminal según su proximidad a cada uno de estos extremos de la proteína. A través de estudios estructurales de resonancia magnética con el factor GATA-1, se sabe que el dedo de zinc amino y la región central adyacente mantienen una interacción específica con el surco mayor del ADN, mientras el dedo de zinc carboxilo interacciona específicamente con el surco menor (Omichinski et al, 1993). También se ha reportado, que el dedo carboxilo terminal del factor GATA-4 es capaz de interactuar con otros co-reguladores (Molketin 2000). Los otros dominios de estos factores, no conservan la similitud de sus secuencias entre especies, pero sus funciones son indispensables para el correcto funcionamiento del factor. Cada miembro de la familia puede tener uno o dos dominios de activación transcripcional en su región amino terminal y un dominio de localización nuclear en la región carboxilo terminal (Morrisey et al, 1997; La Voie 2003). Una

característica estructural que se conserva parcialmente en dos de los miembros de la segunda subfamilia, GATA-5 y 6, son precisamente los dominios de activación transcripcional, lo que sugiere un mecanismo de activación similar para este grupo (Morrisey et al, 1997; Molketin 2000).

El propósito del presente estudio fue clonar la región flanqueante 5' del gen del FSHR del ratón de los volcanes (nFSHR) y estudiar *in vitro* la funcionalidad de sus elementos en *cis* en una línea celular derivada de células de Sertoli de ratón (MSC-1) mediante ensayos de expresión transitoria; con el fin de poder aportar nueva información que ayude a comprender mejor la regulación transcripcional de este u otros genes con características y condiciones semejantes.



## **2. JUSTIFICACIÓN**

Para entender los mecanismos que presenta el promotor de un gen para regular su expresión, es necesario determinar los elementos en posición *cis* del promotor, implicados en el reclutamiento de los factores de transcripción que se expresan en la misma estirpe celular y en el mismo momento del desarrollo. La información con la que se cuenta hasta ahora del promotor del FSHR, no ha logrado explicar claramente la expresión célula-específica que presenta el receptor. Por lo cual, es de gran importancia continuar explorando y analizando todas las regiones del promotor del FSHR, con el fin de poder aportar nuevos elementos. Estos conocimientos pueden redituarse en varios aspectos tanto prácticos como teóricos. En principio, la determinación de regiones funcionales del promotor del FSHR puede ayudar a completar el esquema básico de regulación transcripcional tanto en el desarrollo como en la gametogénesis. También puede ser empleado a largo plazo para estudiar las vías de transducción implicadas en la expresión del FSHR.

Este proyecto se enfocó en la clonación del promotor del nFSHR para la búsqueda de nuevos elementos en *cis* que tengan actividad reguladora *in vitro* y que, dependiendo del patrón de expresión que presente su factor de transcripción correspondiente durante el desarrollo de las células de Sertoli, pueda considerarse con posibilidades de ser funcional *in vivo*. La selección del ratón de los volcanes como modelo de estudio, se basa, principalmente, en sus características conductuales y en las condiciones ambientales en las que se encuentra este roedor en su hábitat natural. El comportamiento y los hábitos de este roedor en

cautiverio, prácticamente no varían de los que se han podido observar en forma silvestre. Su docilidad y poca sensibilidad al estrés por captura o manipulación, lo han propuesto como un buen modelo de estudio para una amplia gama de investigaciones. Por otra parte, las condiciones ambientales de presión, temperatura, altitud (concentración de oxígeno), alimentación, etc. a las que es sometida esta especie en su hábitat natural, son muy diferentes a las que predominan en los ambientes artificiales de la mayoría de los roedores de laboratorio. Estas diferencias ambientales son las que ofrecen la posibilidad de encontrar modelos moleculares alternativos que regulen la expresión de genes de relevancia para la reproducción de los mamíferos, como es el caso del FSHR.

### **3. HIPÓTESIS**

La actividad transcripcional del promotor del FSHR del ratón de los volcanes es regulada por elementos en *cis* que interaccionan con factores de transcripción de las células de Sertoli.

## **4. OBJETIVOS**

## **4.1. Objetivo General**

Determinación de la presencia de nuevos elementos en *cis* implicados en la regulación transcripcional del gen del receptor de la FSH, mediante la caracterización y análisis de su promotor extraído del ratón de los volcanes.

## **4.2. Objetivos Particulares**

4.2.1. Clonación del promotor del receptor de la FSH del ratón de los volcanes.

4.2.2. Diseño de construcciones reporteras con fragmentos de diferentes longitudes del promotor del FSHR del ratón 129/J y del ratón de los volcanes.

4.2.3. Determinación de las regiones del promotor del nFSHR con actividad regulatoria importante.

4.2.4. Mutación sitio dirigida de los elementos en *cis* posiblemente involucrados en la regulación observada.

4.2.5. Determinación del efecto de las mutaciones efectuadas en el promotor del nFSHR, sobre su actividad transcripcional.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 5.1. Extracción de ADN genómico del ratón común y del ratón de los volcanes

Se extrajo hígado de ratón común (*Mus musculus*, cepa 129/J) y de ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) adultos, los cuales fueron donados por la Universidad Nacional Autónoma de México. Los tejidos fueron cortados en piezas de 100 mg y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de haber sido obtenidos. Posteriormente una muestra de cada especie fue pulverizada en nitrógeno líquido en un mortero. Una vez que se obtuvo un polvo fino, se homogeneizó perfectamente en solución de extracción (1mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 20 ng/ml RNasa pancreática, SDS 0.5%) pH 8, en el cual el tejido pulverizado fue incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora, para luego incubarse durante 3 h a  $55^{\circ}\text{C}$  con proteinasa K. Después de las incubaciones, se realizaron tres extracciones consecutivas con fenol equilibrado en Tris-HCl 0.1 M pH 8. Las fases fueron separadas centrifugando el lisado a 3000 rpm durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada en un tubo de centrifuga para llevar a cabo la precipitación del ADN con acetato de amonio y etanol absoluto. La solución se dejó reposar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. El ADN obtenido se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 5000 xg por 5 min. Después el precipitado se secó y se resuspendió perfectamente en TE. La cuantificación del ADN se llevó a cabo por espectrofotometría, midiendo por duplicado la  $A_{260/280}$  (Sambrook et al, 1989).

## **5.2. Clonación de la secuencia flanqueante 5' del gen del receptor de la hormona folículo estimulante.**

Se empleó el ADN genómico extraído del ratón 129/J y del ratón de los volcanes como templado para amplificar por *PCR* un fragmento de ~1100 pb. Se emplearon como cebadores de inicio de la replicación, el oligonucleótido en sentido 5'-GCAGGTAGTAAGTACTAGACATGATCTTAG-3' (FSHRp-fw3) y el oligonucleótido antisentido 5'-GGAATCTCCGTCACCTTGCTGTCTTGGCAG-3' (FSHRp-rev1). Las reacciones se llevaron a cabo en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30s, de alineamiento a 52°C, 2 min y de polimerización a 72°C, 3 min, seguido de una extensión final a 72°C, 10 min. El producto de amplificación fue clonado en el plásmido pGEM-T (Promega, Madison WI). Los insertos de ADN genómico de tres clones diferentes de cada especie fueron secuenciadas en ambas cadenas.

## **5.3. Análisis de la secuencia.**

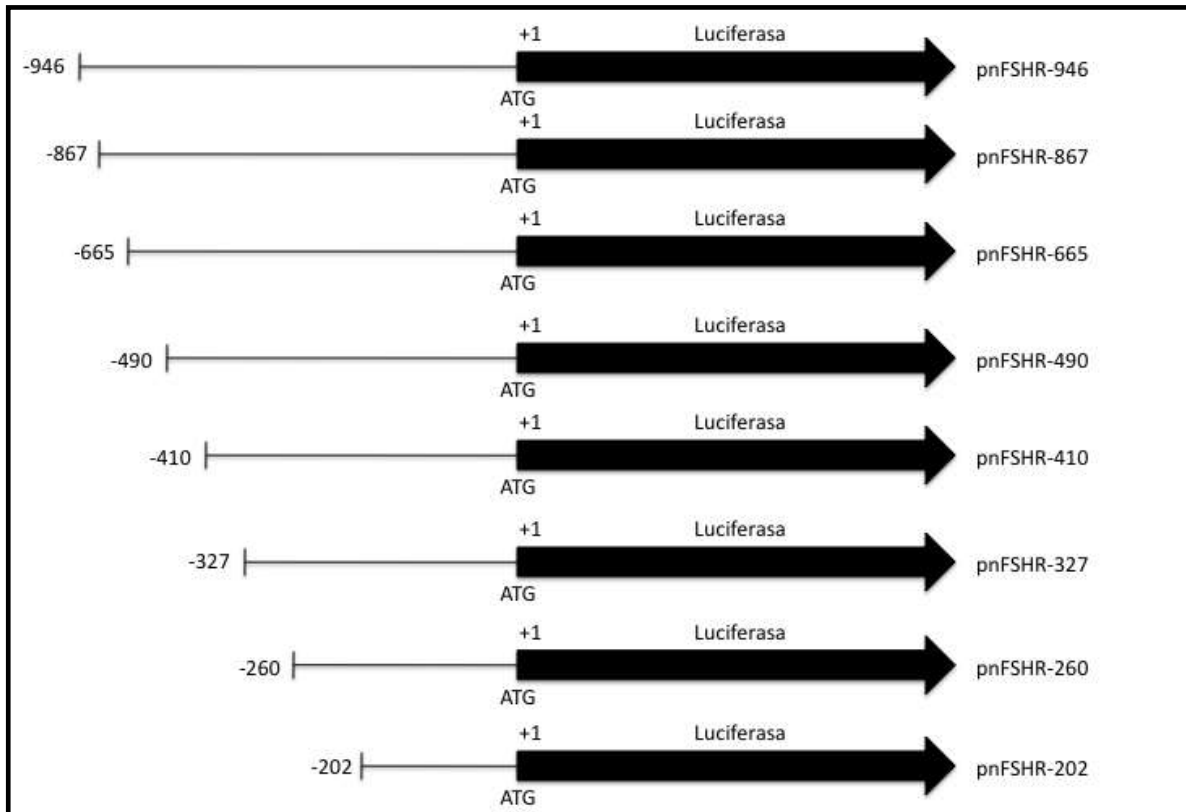
La identidad de la secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen del FSHR del ratón de los volcanes (nFSHR) fue confirmada con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las regiones del promotor del FSHR de diferentes especies fueron alineadas con el programa Clustalw2 (Larkin et al, 2007) ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)), mientras los probables

sitios de unión para la regulación de la transcripción fueron predichos con el programa TFSEARCH (Heinemeyer et al, 1998) ([www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)).

#### **5.4. Preparación de las construcciones génicas.**

Construcciones con el promotor del nFSHR

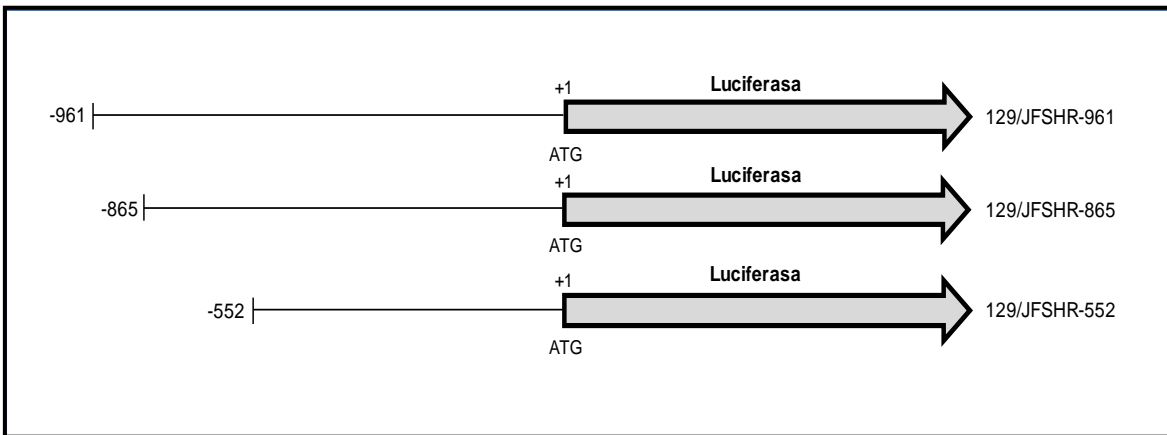
A partir de la región flanqueante 5' del FSHR del ratón de los volcanes (nFSHR) clonado en pGEMT, se amplificaron por *PCR* ocho fragmentos de distintos tamaños (Fig 5.1), usando como cebadores de polimerización los oligonucleótidos mencionados en la Tabla 5.1. Los cebadores en sentido contienen un sitio de restricción para *Xho* I y el cebador en anti-sentido contiene un sitio de restricción para *Nco* I y dos cambios nucleotídicos para conformar la secuencia consenso Kozak. Cada fragmento que se obtuvo fue purificado mediante el sistema comercial *Gene Clean II* (MP Biomedicals, Solon Ohio) y posteriormente digerido con las enzimas de restricción *Xho* I y *Nco* I (Roche Molecular Biochemicals). Todos los fragmentos ya purificados se insertaron en el plásmido reportero pGL3-*Basic* (Promega, Madison WI) previamente digerido con las mismas endonucleasas.



**Figura 5.1.** Representación esquemática de las construcciones génicas del ratón de los volcanes. Se realizaron remociones sucesivas 5'-3' en la región de flanco 5' al codón de inicio (ATG) de la traducción del receptor de la FSH mediante PCR. Los fragmentos se ligaron al plásmido pGL3-Basic y las construcciones fueron empleadas para la transfección de las células MSC-1 y NCI-H441.

Construcciones con el promotor del FSHR de ratón.

A través de la misma estrategia con que se realizaron las construcciones del ratón de los volcanes, se diseñaron las tres construcciones reporteras gobernadas por diferentes fragmentos del promotor del FSHR de ratón (<sub>129/J</sub>FSHR) que se muestran en la Figura 5.2. Los cebadores de polimerización utilizados son también mostrados en la Tabla 5.1.



**Figura 5.2.** Representación esquemática de las construcciones génicas de la cepa de ratón 129/J. Se realizaron remociones sucesivas 5'-3' en la región de flaqueo 5' al codón de inicio (ATG) de la traducción del receptor de la FSH mediante PCR. Los fragmentos se ligaron al plásmido pGL3-Basic y las construcciones fueron empleadas para la transfección de las células MSC-1 y NCI-H441.

**Tabla 5.1.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos del promotor del FSHR necesarios para las construcciones reporteras.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición Relativa	Sitio de Restricción
nFSHR-946	5'-CTCGAGGATGTGTATGCTTTTTGTTG-3'♦	-946/-927	Xho I
nFSHR-867	5'-CTCGAGGAAAATGCCACTGCAAATATC-3'♦	-867/-847	Xho I
nFSHR-665	5'-CTCGAGCAGCCCATGCCTGAGGTCAC-3'♦	-665/-646	Xho I
nFSHR-490	5'-CTCGAGATGGTTTGTGGTCACAGG-3'♦	-490/-473	Xho I
nFSHR-410	5'-CTCGAGGATGTGTCATATGGATGTCC-3'♦	-410/-391	Xho I
nFSHR-327	5'-CTCGAGTGCAGAAAATAATGTGAATTAC-3'♦	-327/-305	Xho I
nFSHR-260	5'-CTCGAGAGGAATAGAACTAAAGTCTTG-3'♦	-260/-239	Xho I
nFSHR-202	5'-CTCGAGACTACTGACACACATTAATTTTAC-3'♦	-202/-179	Xho I
nFSHR-rev	3'-CCATGGTGGCTCATTTATCCATCCAC-5'♦	-1/-18	Nco I
129/JFSHR-961	5'-CTCGAGGAGGTGTACGTTTTTAGTG-3'♣	-961/-943	Xho I
129/JFSHR-865	5'-CTCGAGAAAAATGCCACTGTTGCAAATAC-3'♣	-865/-843	Xho I
129/JFSHR-552	5'-CTCGAGATGGTTTATAACAGATAG-3'♣	-552/-535	Xho I
129/JFSHR-rev	5'-CCATGGtgGCTTATTTATCCATCCAC-3'♣	-1/-18	Nco I

♦ Para la región flanqueante 5' del FSHR del ratón de los volcanes (Fig. 6.1).

♣ Para la región flanqueante 5' del FSHR del ratón 129/J (Fig. 6.2)

Los nucleótidos en letras minúsculas fueron adicionados para la formación de la caja Kozak.

## 5.5. Mutagénesis sitio-dirigida.

Mutación de los elementos GATA en el promotor del nFSHR.

Dentro de la región flanqueante 5' del gen del nFSHR, existen cuatro elementos de alta homología para la secuencia consenso con la que interactúan los factores de transcripción de la familia GATA: NNCWGATARNNNN. Estos elementos se localizan en los intervalos de -737/-741 (GATAd), -796/-800 (GATAm), -444/-449 (GATAp), -7/-12 pb (GATApp) del promotor (Fig. 6.2) y fueron mutadas usando el sistema comercial de mutagénesis *QuickChange* (Stratagene). La construcción génica pnFSHR-867wt fue usada como templado y los oligonucleótidos M1F/M1R, M2F/M2R, M3F/M3R y M4F/M4R (Tabla 5.2), respectivamente como cebadores de polimerización. Al final se obtuvieron las construcciones mutantes pnFSHR-867/GATAd, pnFSHR-867/GATAm, pnFSHR-867/GATAp y pnFSHR-867/GATApp.

La fidelidad y orientación de todas las construcciones mencionadas fueron corroboradas mediante secuencia de ADN automática, utilizando el sistema *BigDye Terminator* (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700.



**Tabla 5.2.** Secuencia de oligonucleótidos empleados para la mutación de los elementos en *cis*.

NOMBRE	SECUENCIA	TAMAÑO	POSICIÓN	MUTACIÓN
<b>M1F</b>	5'-ATCAAGGGCTCACCCACAAG-3'	20	-851/-832	Elemento GATAd
<b>M1R</b>	5'-CTTGTGGGTGAGCCCTTGAT-3'	20	-832/-851	Elemento GATAd
<b>M2F</b>	5'- TATAGACTCGAGCAATTTATT-3'	21	-779/-759	Elemento GATAm
<b>M2R</b>	5'-AATAAATTGCTCGAGTCTATA-3'	21	-759/-779	Elemento GATAm
<b>M3F</b>	5'-CAGACGCTGAAGAGCGCTCCTGTTCCCC-3'	28	-459/-432	Elemento GATAp
<b>M3R</b>	5'-GGGGAACAGGAGCGCTCTTCAGCGTCTG-3'	28	-432/-459	Elemento GATAp
<b>M4F</b>	5'-GCAATGAGCcaccatggaagac-3'	22	-9/-1	Elemento GATApp
<b>M4R</b>	5'-gtgGCTCATTGCTCCATCCACCTG-3'	24	-1/-21	Elemento GATApp

En minúscula se encuentran los nucleótidos correspondientes al vector pGL3-Basic.

## 5.6. Clonación de los factores de transcripción GATA-4 y GATA-1.

El ADN complementario (ADNc) de los factores de transcripción GATA-4 de humano (hGATA-4) y GATA-1 de ratón (mGATA-1) fueron subclonados a partir de los vectores de expresión pMT-CB6/hGATA-4 y pXM/mGATA-1, donados por el Dr. Xiangxi Xu y el Dr. Stuart H. Orkin respectivamente. Por medio de un *PCR*, se amplificaron 1359 pb mediante los oligonucleótidos 5'- C TAGCCACCATGTATCAGAGCTTGCCATG-3' (HsGATA4-F) y 5'-CGCAGTGATTA TGTCCCCGTGAC-3' (HsGATA4-R). Por otra parte, se amplificaron 1250 pb a través de los oligonucleótidos 5'- CTAGCCACCATGGATTTTCCTGGTCTAG-3' (mGATA1-F) y 5'-AGAACTGAGTGGGGCGATCAC-3' (HsGATA1-R). Cada reacción fue llevada a cabo con la Pfu ADN polimerasa (Stratagene) y expuesta a una desnaturalización de 94°C, 1 min con 16 ciclos de desnaturalización a 94°C/30s, de alineamiento a 55°C/30s y de polimerización a 72°C/12min, seguido de una extensión final a 72°C/10min. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron mediante el sistema comercial *Gene Clean II* (MP Biomedicals). El ADNc del factor hGATA4 y mGATA-1 fue insertado en el vector de expresión pcDNA3.1/HisB/V5 (Invitrogen), previamente digerido con *Eco RV* (Roche), para producir los vectores phGATA-4 y pmGATA-1 respectivamente. Cada ligación fue catalizada por la T4 ADN ligasa (Promega) durante una noche a temperatura ambiente. De cada ligación se buscaron tres clonas recombinantes positivas mediante *PCR screening*, para posteriormente corroborar la fidelidad y orientación del ADNc clonado por secuenciación.

## 5.7. Cultivo Celular y Análisis de Expresión Transitoria

Las células MSC-1, donadas por el Dr. James A Dias, fueron establecidas desde un ratón transgénico transformado con el gen que codifica el antígeno de SV40 fusionado a secuencias de regulación transcripcional para la substancia inhibidora Mulleriana, mantienen varias características bioquímicas y morfológicas de las células de Sertoli (McGinness et al, 1994). Esta línea celular se cultivó en DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal de bovino al 10%, sin antibióticos. Por otro lado, la línea celular NCI-H441 donada por el Dr. Rubén Gutiérrez, proveniente de una efusión pericardial de un paciente con adenocarcinoma pulmonar (Brower et al, 1986), fue cultivada en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 5%, sin antibióticos. Ambas líneas celulares se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el análisis de expresión transitoria se sembraron (en placas de 48 pozos) 30,000 células MSC-1 o 40,000 células NCI-H441 por pozo, de 18 a 24 horas antes de la transfección. Cada pozo se cotransfectó mediante el lípido catiónico *Effectene* (Qiagen) con 150 ng de cada una de las construcciones reporteras antes descritas y 50 ng del plásmido pRL-TK (Promega) como control interno de eficiencia de transfección. Después de 48 h de transfección se lavaron con PBS, se lisaron con solución de lisis pasiva (Promega) y se determinó la actividad de las enzimas luciferasas (luciferasa de luciérnaga y luciferasa de Renilla) en un luminómetro (Fentomaster FB15 de Zylux).

## **5.8. Análisis Estadístico.**

Los resultados obtenidos del análisis de expresión transitoria de las diferentes construcciones hechas a partir del promotor del FSHR, fueron analizados mediante la prueba de t de Student, para comparar la expresión del control (construcción silvestre) con la expresión de las construcciones gobernadas por el promotor truncado o mutado.

## **6. RESULTADOS**

## **6.1. Clonación y análisis de secuencia de la región flanqueante 5' del FSHR de ratón de los volcanes.**

Con el fin de poder aislar el promotor del receptor de la FSH del ratón de los volcanes, se alinearon las regiones flanqueantes 5' del gen del FSHR de rata y ratón. Mediante esta comparación fue posible encontrar una región conservada que se localiza entre -881 y -851 pb a partir del sitio de inicio de la transcripción del gen de la rata (Heckert et al, 1992; Huhtaniemi et al, 1992). El oligonucleótido FSHRp-fw3 que contiene esta secuencia, fue usada como cebador de amplificación para la amplificación de ADN genómico mediante PCR. Como cebador antisentido se usó el oligonucleótido FSHRp-rev1, el cual contiene la secuencia que comprende de +123 a +93 pb del ADNc del FSHR de hámster (Zhang y Roy, 2004). Se seleccionó esta especie, ya que el ratón de los volcanes y el hámster pertenecen a la misma familia taxonómica (*Cricetidae*). Un producto de aproximadamente 1.1 kb fue amplificado, purificado, clonado y secuenciado (Fig. 6.1).

Para confirmar la veracidad de la secuencia clonada, 3 clones independientes fueron completamente secuenciados. La región flanqueante 5' del nFSHR clonada contiene una secuencia parecida a la región rica en A/T que se encuentra en muchos promotores que contienen caja TATA. Sin embargo, esta secuencia no concuerda con la secuencia consenso bien definida TATAAA que

presenta la caja TATA canónica. El ADN clonado incluye la secuencia nucleotídica que codifica los primeros 31 amino ácidos del nFSHR, en donde a su vez se encuentran los 17 residuos correspondientes al péptido señal y los primeros 14 aminoácidos de la proteína madura.

```

-946 GATGTGTATGCTTTTGTGAAAGTAGGAAGCCACTTCACTTTCGCCAAATATCCACAAACCCCTTATTACTGAGCTTGAAAATGCCAC
-856 TGCAAATATCAAGGGTATCACCCACAAGGAACACCTAAAATTAAGTATAGACTCGATAAATTTATTAGTGCCGGCGGCCAAAAAGTA
-766 AGGACAGGGTTTTCAGAGTCTGGAAAGGAAAGACAAGAGAAGCCAGAAAGACTAGGCATGACTGGTGGACACCGCAACATTTCCATAGC
-676 CTTGTAAGCAGCAGCCCATGCCTGAGGTCAACAAGGTGAGTTGTCTCTGCAGAGAAGTGTCTGTCCAGTGTCTCCGACCTGCAGAGACC
-586 TGGTGCCTTCTAACCCGCCTCCCCAAAGTCTGCGTAATGCTAGTTCAAGTTGTTAATCAGGTTAAGAAAGAGCATGGATGGCCAGAGCCC
-496 AGATGCATGGTTTGTGGTACAGGAACACTGTGATGCCAGACGCTGAAGATAGCTCCTGTTCCCTCATGCCCGTCCCTTCTGAGGGATG
-406 TGTCATATGGATGTCTTTAGGGGAGGGCCAATTATGTCATCGAGGAGAAGAGAGTGGTGGCCAGCTGGGACCCCTTGTGCAGAAAAAT
-316 AATGTGAATTACTCCAAATGTGCACCAAGGTTCCATTTGCTGTCGTTCTTGGGTCGAGGAATAGAACTAAAGTCTTGAACAATAAGGGA
-226 GAAGCTTAAGTTGTTTCAGAAATCACTACTGACACACATTAATTTTACTTGCTGGAAGTGACAAAAAAATAATAATTAATAAAAAAAGC
-136 ATCCCTTGGTGGGTCATGTGACTTTGCCTGTCTCCAGACAGATCTCTCTTGTCCAGCAGTGTGGAGGAGCTTCCGAAATCTGTGGAGGT
                                     +1
-46 TTTCCCGCCCTGCAGGAAGAAAACAGGTGGATGGATAAATGAGCATGGCCTTGTTCCTCGTCTCCTTGTCTGGCGTTCTGGGCTCGGG
                                     M A L F L V S L L A F L G S G

+45 GACAGGATGTCGTCACCTGGCTGTGCCATTGCTCTAACAGGGTCCTCCTC
    T G C R H W L C H C S N R V L L
    ↑

```

**Figura 6.1.** Secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen del FSHR del ratón de los volcanes. La numeración comienza a partir del sitio de inicio de la traducción, el cual se encuentra indicado por +1. La secuencia peptídica parcialmente codificada por el exón 1 está indicada debajo de la secuencia nucleotídica. La región rica en A/T está subrayada y el sitio de corte putativo para el péptido señal está indicado por una flecha vertical



De la misma forma la región flanqueante del FSHR del ratón 129/J (<sup>129/J</sup>FSHR) fue clonada y analizada. Aunque la secuencia nucleotídica del gen del <sup>129/J</sup>FSHR es casi idéntica a la identificada en el ratón Balb/c (No. de acceso S49632) por Huhtaniemi y colaboradores (1992), difieren en un nucleótido (A/G) posicionado en -339 y contiene cuatro inserciones en las posiciones -390, -436, -865 y -886 (Fig. 6.2). Sin embargo, al comparar la secuencia mostrada en la Fig. 6.2 y la secuencia del cromosoma 17 del ratón C57BL/6J (No. de acceso AC165082), solamente la sustitución A/G en la posición -339 se mantiene. Las diferencias encontradas pueden ser debidas a la cepa particular de ratón que se empleó para la clonación de la región flanqueante 5' del FSHR.

## **6.2. Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas del promotor del FSHR.**

La secuencia del promotor del nFSHR clonado fue alineada con la secuencia del promotor del FSHR de la cepa 129/J de ratón y con el gen del FSHR de rata (Heckert et al, 1992) [No de acceso S81117], con el fin de indicar su relación filogenética (Fig. 6.2). La secuencia del promotor del nFSHR clonado, mantiene una homología del 74 y 71% con el promotor de rata y 129/J, respectivamente. Esta homología disminuye a un 64 y 59% para especies menos relacionadas como el humano y la oveja, respectivamente.

También se detectó la conservación de elementos reportados previamente para en el gen del FSHR de la rata (Goetz et al, 1996) como la caja *E* y la región iniciadora (In R). Sin embargo, la caja *E* del promotor del nFSHR presenta la sustitución de un nucleótido (Fig. 6.2), lo cual provoca la alteración de la estructura palindrómica de la caja *E* y afecta muy probablemente la capacidad de unión de los factores de transcripción USF, ya que las bases del núcleo del elemento caja *E* son cruciales para su reconocimiento y función en el promotor de la rata (Heckert, et al, 1998). La secuencia alrededor de la caja *E* (GGTCAtgTGAC) que se encuentra entre -126 y -116 (Fig. 6.2) ha sido también considerada como un elemento de respuesta a estrógenos putativo (ERE) en los promotores del FSHR humano y oveja (Gromoll et al, 1994a; Sairam y Subbarayan, 1997). Sin embargo, al estimular con 17 $\beta$ -estradiol ( $1 \times 10^{-8}$  M) a células que expresan el receptor de estrógenos (MCF-7) y que fueron previamente transfectadas con 946 pb del promotor del nFSHR, no se presentó ningún efecto con respecto a la transfección control expuesta solamente al vehículo (datos no mostrados). Esto indica que el ERE en el promotor del nFSHR no es funcional. Ni el sitio de unión para GATA-1 presente en el gen de la rata (Kim y Griswold, 2001) ni para COUP-TF en el gen de la oveja (Xing et al, 2002), están conservados en el promotor del ratón de los volcanes.

A través del análisis de la secuencia del promotor del nFSHR con el programa identificador de sitios de unión para factores nucleares TFSEARCH, se

lograron predecir varios elementos en *cis* putativos. Sin embargo, solamente algunos se conservan en las tres especies de roedores analizadas (Fig. 6.2). La secuencia semejante al elemento de respuesta a AMPc (CRE), la cual puede tener un papel en la regulación de la expresión del gen del FSHR mediante AMPc (Levallet et al, 2001), se encuentra bien conservada en las tres especies de roedores. Algo sobresaliente de este análisis fue el hallazgo de un bloque de tres sitios de unión para el factor nuclear SRY, el cual se encuentra ausente en sus contrapartes de rata y ratón. La presencia de estos sitios en el promotor del nFSHR tiene una relevancia potencial para la regulación del nFSHR, dada la importancia que tiene el factor SRY en la diferenciación de las células de Sertoli (DiNapoli y Capel, 2008).

```

Ratón       -961  GAGGTGTACGTTTTTAGTGTTCATAGACTCTGGTGGAAAGAAGATCATCCCTCACTTTTGTAAATATTCCTCAAACCCCTTTATTACT -872
Rata        -948  CATGTGCAAGCTTTTGTCTTCATAGACTCTGGTGAAGGTAGAAAGCCCTCACTTTTGTAAATATTCCTCAA--CCTTTATTACT -861
Neotomodón -946  GATGTGTAAGCTTTT-----GTTGAAAGTAGGAAGCCACTTCACTTTTCGCCAAATATTCCAAACCCCTTTATTACT -874
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ▼
Ratón       -871  AAGCTTAAAAATGCCACTGTTGCAAATACCTAGGTTGTCACACTCACAGGAAATCTCTAAAATTAAGATATAGATGTGATACATTTATTTCG -782
Rata        -860  AAGCTTAAAAATGCCACTG---CAAATACCTAGAGTGTCACTCACAGGAAACCTCTAAAATTAAGATTAAGACATGATAAAATTTATTCA -774
Neotomodón -873  GAGCTTAAAAATGCCACTG---CAAATATCAAGGGATCAACCACAAGGAACACCTAAAATTAAGATATAGACTCGATAAATTTATTAG -787
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      GATAd                                     GATAm

Ratón       -781  TGCCAACCTCTGAATTAGGAAGAAGGACAGTTCCTTAGAGTTAGCAAAGAAAAACAAGAGATGCCAGAAAGACTACGCATGACTGGTGA -692
Rata        -773  TGCCAACCTCATAAAATAGGAAGAAGGACAGTTCCTAGAGTCTGGAAAGGAAAGACA---GATGCCAGAAAGACTATGCATTGCTAGTGG -687
Neotomodón -786  TGCCGGCGGCCCAAAGTAAGGACAGG--GTTTTTCAAGTCTGGAAAGGAAAGACAAGAGAAGGCCAGAAAGACTAGGCATGACTGGTGG -699
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ratón       -691  ACGTGTGACC-----AGAAACAGCCATGCCTGAGGTCTCAGAAGTGAATGTCTCCACAGAGAACC--CTATCAC- -622
Rata        -686  ATAA-----AGAAGCAGCCCGTCTGAGGTACACAAGTGACTTGTCCCACAGAGAACCC--CTATCACA -623
Neotomodón -698  ACACCGCAACATTTTCCATAGCCTTGAAGCAGCAGCCATGCCTCAGGTCACA-AGGTGAGTGTCTCTGCAGAGAACTGTCTGCACC -610
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      CRE

Ratón       -621  -----CCACCTACAGCGGCTTAGTGTCT---AAC-----ACTTGCTTATGTTGTTAA-----TCACA- -574
Rata        -622  GGTGCTCCACCGACAGACTAGTGTCT---AACCACCTTCCCAAGTCTGTTAACACTGCTTATGTGTTAAA---TCACA- -542
Neotomodón -609  AGTGTCTCCGACCTGCAGAGACTGGTGTCTTAAACCGCTCCCAAAGTCTGCGTAATGCTAGTTCAGTTGTTAATCAGGTTAAGA -520
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ratón       -573  -----GGCTAACTATAGCCAGATCTATGTTTATAACAGATAGGTCACAGGAAACAGCAATGCAAAAATCTAAAGGTAATTTTGG -492
Rata        -541  -----GGATGACTATAGCCTAGATGTATGGTTATATCAGATGGGACACAGGAAACAGCAACACCAAATATAAAGGTAATTTTGG -460
Neotomodón -519  AAGAGCATGGATGGCCAGAGCCAGATGCATGGTTTGT-----GGTCACAGGAACACTGTGATGCAGACGCTGAAGATAGCTCTG -438
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      GATAp

Ratón       -491  TCCCTTTCATGTGAGTAGTACATTAGAGATGTGTCATATGGATGTACTTGGCGGAAAGGGACGAAACCTGATATCACTGAGAAGAGAGT -402
Rata        -459  TCCCTTTCATCAGT---CGTTAGAGATGTGTCATGTGGATGTGCTTG--GGGAGAGGGTC-AATTATGTCACTGAGGAGAAGACAGT -377
Neotomodón -437  TCCCTTTCATGCCCCTCCTTCTGAGGGATGTGTCATATGGATGTCCTTTA-GGGGAGGGGCC-AATTATGTCACTGAGGAGAAGAGAGT -350
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ▼
Ratón       -401  AGTGACCAAGTGGGACCTCC-ATGCAGTAAAATAATGTGAATCTGCTGATATCAGTCCATTAGGCTGATATCTCTAAAATATGCACCAAGT -313
Rata        -376  AGTGACCAAGTGGGACCCCT-GTCAGCAAAAATAATGTGAATCTGCTGATAT-----AGACTGATATCTCTAAAATATGCACCAAGT -297
Neotomodón -349  GGTGGCCAGCTGGGACCCCTTGTGCAAAAAATAATGTGAATTA-----CTCCAAATGTGCACCAAGG -287
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ▼
Ratón       -312  TTCTACTTGTGTGCATTTTGGGG-TCAAGGAATAGAAAATAATAGTCTTGAAGGATAAGACAGGTGCTTATTGACAAAATATTAATCACAT -224
Rata        -296  TTCTCTTTCTGTGCATTTTGGGGTCAAGGAATAAAAATAATAGTCTTGAAGGATAAAGCAGAAGATTATTGACACACATTAGTCACAT -207
Neotomodón -286  TTCCATTTGCTGCTCTTGGG-TCGAGGAATAGAACTAAA-GTCTTGAACAATAAGGGAGAAGCTTA-----AGTTGTT--TCAGA- -207
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      SRY     SOX5/SRY     SRY

Ratón       -223  TTCAATCATGTATTAATACATATAGTCTACTACGGACACATATTAATTTTACTTGCTGGAAGCGACAAAAGAAA-----AAAAA -142
Rata        -206  -----ATTAATATATATAATCACTATTGACACATATTAATTTTACTTGCTGGAAGCGACTAA-----AAAAA -142
Neotomodón -206  -----AATCACTACTGACACATTAATTTTACTTGCTGGAAGTGCACAAAATAATTAATTAATAAAAAA -140
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ratón       -141  AGCATCCTTTAGTGGGTACGTGACTTTTGT-GTCTCACAAGCAGATCTCTCTTATCCGGACAGTGTGTGGAGGACCTGGGGAATCCGT -53
Rata        -141  GGCATCTCTTGGTGGGTACGTGACTTTTCCCGTCTCCAAGCAGATCTCTCTTATCCGGACAGTGTGTGGAGGACCTGGGGAATCTGT -52
Neotomodón -139  AGCATCCCTTGGTGGGTCATGTGACTTTGCTGTCCAGACAGATCTCTCTTGTCCAG-CAGTGTG--GAGGAGCTTGCAGAAATCTGT -53
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      E-box                                     In R                                     -1

Ratón       -52  GGAGGTTTTTCGCTGTGGAGCAGGAGCAGGATGGATGATAAATAAGCATG
Rata        -51  GGAAGTTTTTCGC-GCTGATGCAGAAAGAAGTGGTGAATGGATAAATAAGGATG
Neotomodón -52  GGAGGTTTTTCGCCGCCCTGCAGGAAGAAACAGGATGGATGATAAATAAGGATG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      GATAp

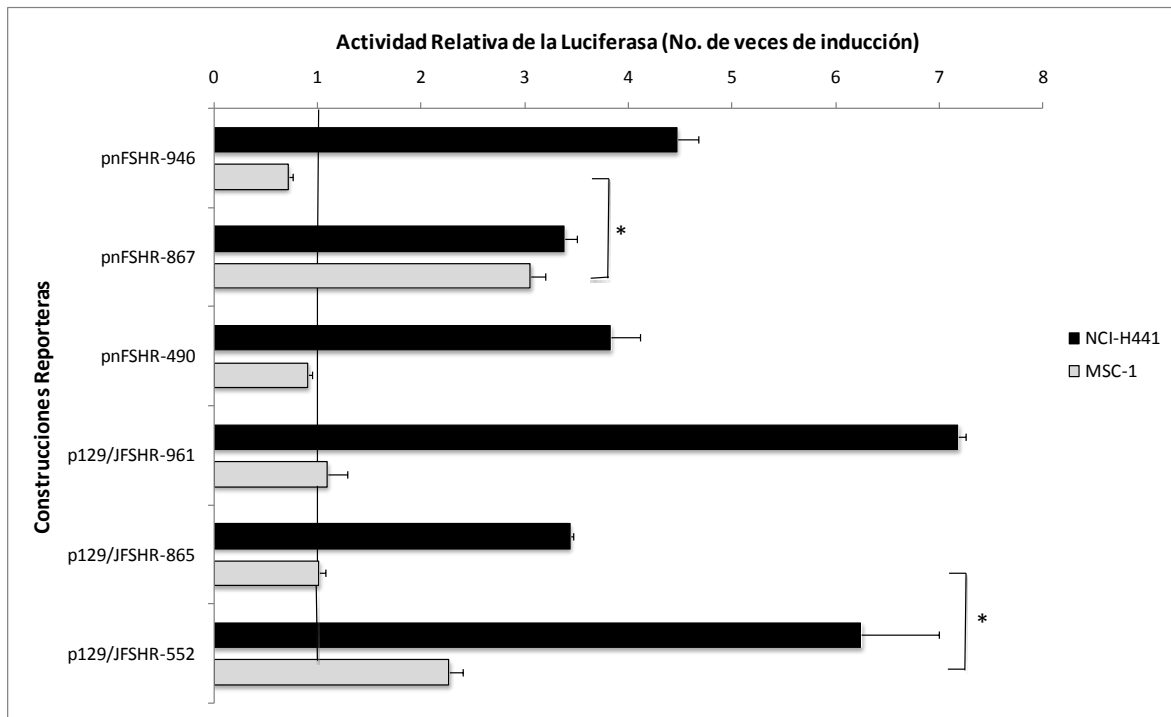
```

**Figura 6.2.** Alineamiento de las regiones promotoras del gen del FSHR de ratón de los volcanes (Neotomodón), ratón (129/J) y rata. Las diferencias encontradas entre el promotor de 129/J y la reportada por Huhtaniemi et al, 1992 están señaladas con puntas de flecha. Los sitios de unión putativos para factores de transcripción relevantes fueron subrayados y etiquetados. Los nucleótidos conservados están marcados con un \*, mientras el codón de inicio de la traducción está resaltado.

### **6.3. El promotor del FSHR contiene regiones represoras que actúan célula-específicamente.**

Se analizó la actividad del promotor del nFSHR en la línea celular de Sertoli (MSC-1) y en la línea celular no relacionada con el testículo (NCI-H441). La línea celular NCI-H441 fue aislada a partir de un adenocarcinoma de pulmón humano y ha sido usada previamente para la identificación de elementos *in cis* y factores que actúan *in trans*, implicados en la regulación de genes específicos de pulmón (Acosta et al, 2007; Stripp et al, 1992). Construcciones reporteras de luciferasa gobernadas por varias regiones del promotor del nFSHR, se transfectaron transitoriamente en las líneas celulares ya mencionadas y sus actividades fueron comparadas con las construcciones homólogas de ratón 129/J. Este ensayo indica que tanto la construcción p<sub>129/J</sub>FSHR-961 como p<sub>129/J</sub>FSHR-865, tienen una actividad menor que la del vector vacío en la línea celular MSC-1. Mientras que la construcción p<sub>129/J</sub>FSHR-552, logra incrementar la actividad del reportero luciferasa 2.7 veces la actividad de la construcción de -865 pb ( $p < 0.05$ ), sugiriendo la existencia de factores represores de la transcripción célula-específicos que se unen a la región removida (Fig. 6.3). Resultados similares se obtuvieron con las construcciones de ratón de los volcanes, aunque la región inhibidora parece estar localizada entre -946 y -868 pb. Por otro lado, inesperadamente todas las construcciones reporteras tuvieron actividad en las células NCI-H441, indicando que éstas son transcripcionalmente funcionales. En

esta línea celular, las construcciones p<sub>129/J</sub>FSHR-961 y -552 fueron aproximadamente 60% más activas que su contraparte en el ratón de los volcanes, mientras que las construcciones p<sub>129/J</sub>FSHR-865 y pnFSHR-867 mantienen una actividad de luciferasa similar (Fig. 6.3).



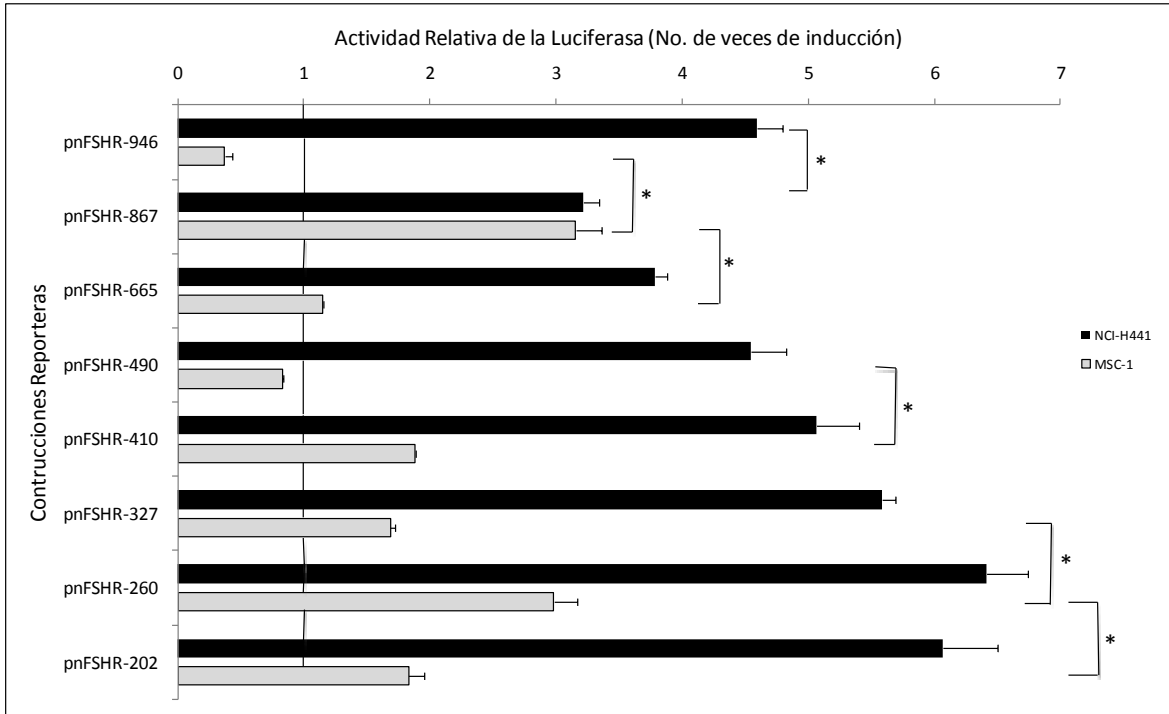
**Figura 6.3** Actividad transcripcional del promotor del gen FSHR de ratón de los volcanes (n) y de ratón común (129/J). Cada fragmento clonado en el vector reportero de luciferasa fue cotransfectado con el plásmido pRL-TK (luciferasa *Renilla*) en las líneas celulares MSC-1 y NCI-H441. La actividad relativa de la luciferasa fue determinada en lisados celulares después de 48 h después de la transfección y se encuentra expresada en veces de inducción, asumiendo que la actividad del vector sin promotor pGL3B es 1. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3) de un experimento representativo. Las diferencias en la actividad transcripcional fueron evaluadas por la prueba de *t* de Student. \* P < 0.05

#### **6.4. Los elementos de regulación transcripcional positiva del promotor del nFSHR se encuentran en la región proximal.**

Tomando en cuenta la baja expresión del promotor del nFSHR en las células de Sertoli, se llevaron a cabo más construcciones reporteras dirigidas por otros segmentos diferentes del promotor, de tal forma que fuera posible un análisis y caracterización más profunda de sus regiones, mediante su transfección en las líneas celulares MSC-1 y NCI-H441. En las células NCI-H441, la construcción mayor que abarca desde -946 hasta -1 pb (pnFSHR-946), presenta un incremento en la actividad del reportero de 4.3 veces con respecto al vector vacío (control), mientras que en las células MSC-1 su actividad está por debajo del control (Fig. 6.4). La remoción de 79 pb genera una disminución del 25.4% ( $p < 0.05$ ) de la actividad promotora en la línea celular NCI-H441, lo cual contrasta fuertemente con el incremento en la actividad reportera de 8.4 veces que exhibe en las células de Sertoli. Esto sugiere la participación de uno o varios elementos reguladores en esta región, que inhiben la transcripción a través de su interacción con factores represores que se expresan específicamente en células MSC-1. Por otra parte, la eliminación de otros 202 pb más, para la obtención de la construcción pnFSHR-665, provoca una disminución en la actividad de la luciferasa en las células MSC-1 indicando la presencia de factores de transcripción positivos en esa región del promotor; mientras que en las células NCI-H441 la misma remoción restaura la actividad antes exhibida. La construcción pnFSHR-490 produce una disminución mayor en la actividad del reportero cuando se transfecta en células MSC-1, pero



ningún cambio en la actividad del promotor se manifiesta en las células NCI-H441 (Fig. 6.4). Las construcciones con los fragmentos de -410, -327, -260 y -202 pb incrementan la actividad transcripcional del promotor en la línea celular NCI-H441, hasta alcanzar un máximo de 6.6 veces sobre el vector vacío con la construcción pnFSHR-260. Por otro lado, en las células MSC-1 con las mismas construcciones reporteras, se identificaron dos regiones inhibidoras adicionales a -490/-410 y -327/-260 pb, así como una región en -260/-202 con regulación positiva, lugar donde se encuentra situado el bloque de elementos para SRY (Fig. 6.4). En resumen, la mayoría de las construcciones reporteras con fragmentos cortos fueron más activas que aquellas que tenían los segmentos más largos en ambas líneas celulares, lo que concuerda con las observaciones en el promotor del FSHR de otras especies (Gromoll et al, 1994a; Heckert et al, 1998; Xing y Sairam, 2001a).

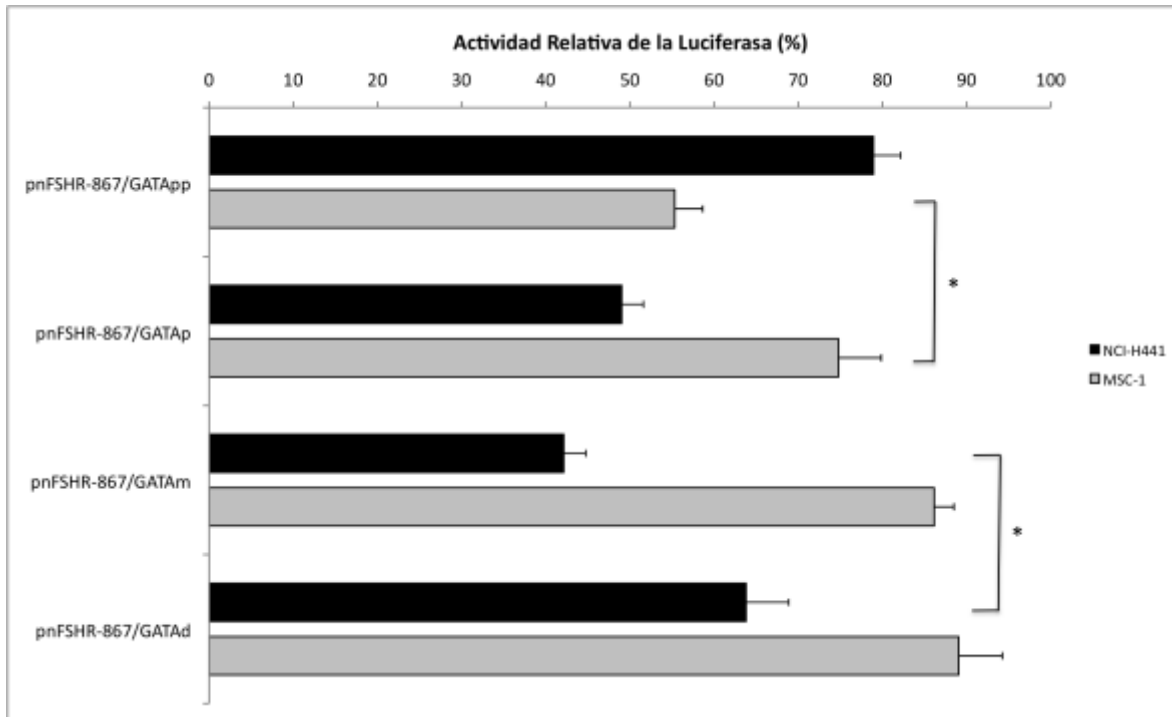


**Figura 6.4.** Efecto de las remociones efectuadas al promotor del nFSHR en diferentes contextos celulares. Cada construcción fue cotransfectada con el plásmido pRL-TK (Luciferasa *Renilla*) en ambas líneas celulares y su actividad relativa fue determinada en lisados celulares 48 h después. La actividad relativa de la luciferasa está expresada como veces de inducción asumiendo que la actividad del vector vacío pGL3B es 1. Los valores representan la media  $\pm$  DS ( $n = 3$ ) de un experimento representativo. Diferencias en la actividad transcripcional fueron evaluadas por la prueba de *t* de Student. \*  $p < 0.05$

## **6.5. La eliminación de los elementos GATA del promotor del nFSHR afecta negativamente su actividad transcripcional.**

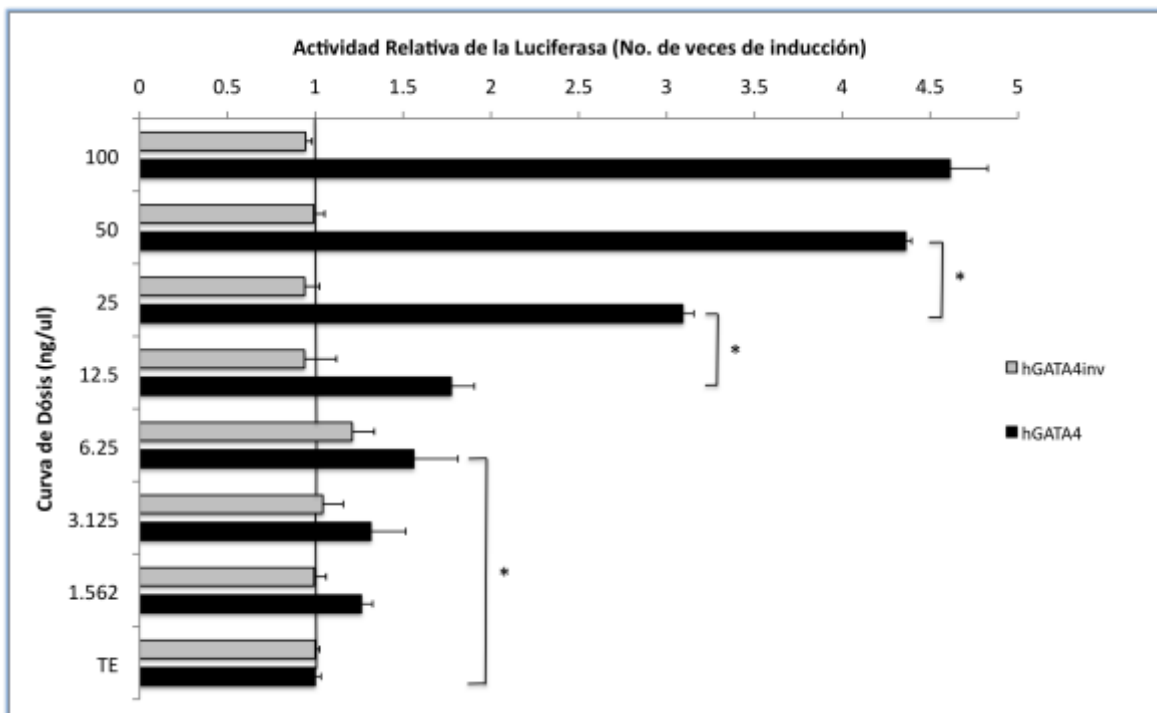
El análisis de la secuencia a través de programa TFSEARCH, propone cuatro elementos en *cis* del promotor del nFSHR como posibles sitios de unión para los miembros de la familia GATA. Estos elementos fueron mutados individualmente en el núcleo de la secuencia, con el fin de impedir la posible interacción de dichos factores en estas regiones. La transfección de las cuatro construcciones mutantes tanto en células NCI-H441 como en células MSC-1, presentan una actividad del gen reportero significativamente menor (11% como mínimo) a la construcción silvestre que representa el 100% en la Fig. 6.5. Esto sugiere la presencia de, por lo menos, un factor de la familia GATA en estas líneas celulares. Sin embargo, la actividad generada por las construcciones mutantes pnFSHR-867/GATAd, GATAm y GATAp en la línea celular MSC-1, es significativamente mayor que la actividad alcanzada por las mismas construcciones en las células NCI-H441. En contraste, la construcción pnFSHR-867/GATApp presenta una actividad del gen reportero 23% mayor en las células NCI-H441 con respecto a la actividad de esta construcción en la línea celular MSC-1 (Fig. 6.5). Esto indica que los factores GATA que inducen la actividad transcripcional en el promotor del nFSHR son diferentes en cada contexto celular. Las mutaciones efectuadas en los elementos GATAm y GATApp son las que provocan una mayor disminución en la actividad de la luciferasa en NCI-H441 (42%) y MSC-1 (55%), respectivamente (Fig. 6.5). Esto las coloca como los sitios

GATA de mayor relevancia del promotor del nFSHR, dependiendo del miembro de la familia GATA que se encuentre presente.



**Figura 6.5.** Efecto de las mutaciones realizadas en los elementos GATApp, GATAp, GATAm y GATAd del promotor del nFSHR en su actividad transcripcional. Se transfectaron las células NCI-H441 y MSC-1 con la construcción pnFSHR-867 silvestre y sus cuatro variantes mutantes. El plásmido pRL-TK se cotransfectó como control de eficiencia de la transfección. Los valores representan la media  $\pm$  DS ( $n = 3$ ) de un experimento representativo. A la media obtenida por la construcción silvestre se le asignó el 100% y se calculó el porcentaje de la actividad relativa de cada construcción mutante. Las diferencias en la actividad transcripcional fueron evaluadas por la prueba de  $t$  de Student. \*  $p < 0.05$

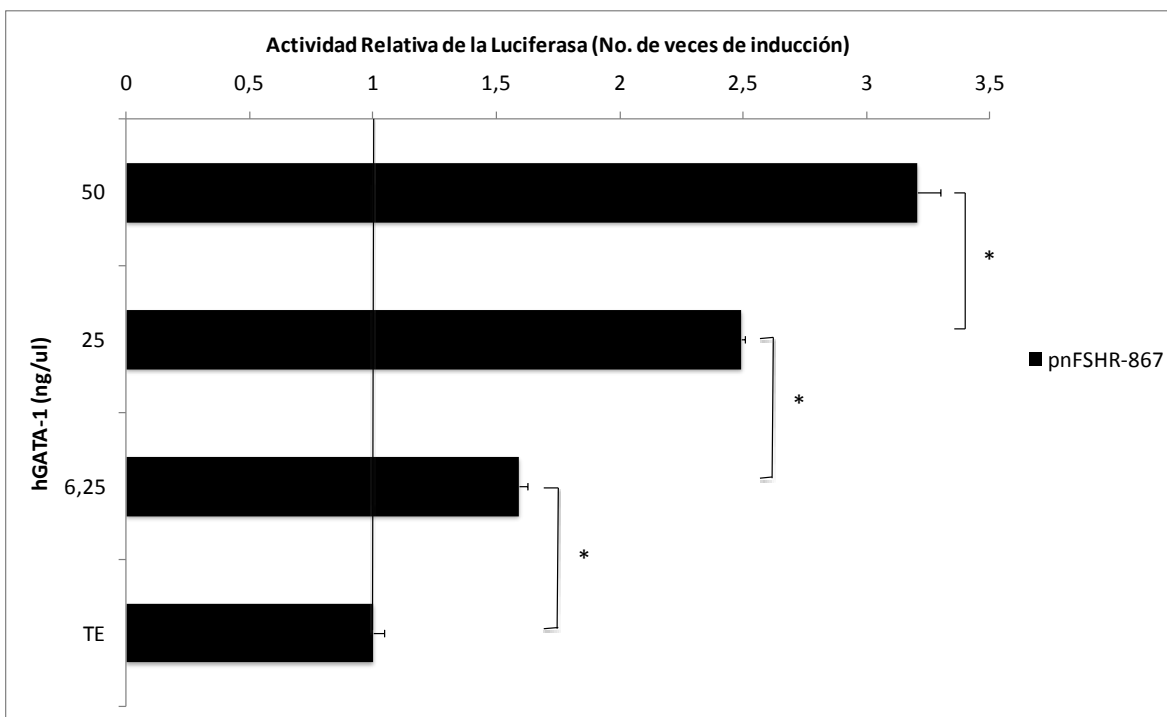
Tomando en cuenta que las células NCI-H441 solamente expresan sutilmente el factor GATA-2 humano (German et al, 2000) y que en las células MSC-1 está reportada la expresión de GATA-1 y GATA-4 de ratón (Feng et al, 2000), se realizaron ensayos de expresión transitoria con curvas dosis respuesta de vectores de expresión para GATA-4 humano (phGATA4) y GATA-1 de ratón (pmGATA1), con el fin de comprobar si el promotor es capaz de responder a estos transfactores. Para el primer ensayo con hGATA-4 y la construcción pnFSHR-867, se llevó a cabo un experimento control paralelo, en el cual se cotransfectó un vector de expresión con el ADNc de hGATA-4 invertido (phGATA4inv). Cuando es estimulado el promotor con hGATA-4 ectópico, se puede observar una clara tendencia de regulación transcripcional positiva conforme la cantidad del factor de transcripción va aumentando (Fig. 6.6). Por el contrario, es importante hacer notar que el vector de expresión con el ADNc invertido no causa efectos significativos a ninguna de las concentraciones probadas. Esto indica que el efecto dosis - respuesta presentado por el vector de expresión para hGATA-4 en sentido, sobre el promotor del nFSHR es real y es generado por la presencia e interacción de dicho factor con algún sitio GATA y no por algún artificio de la técnica. Los incrementos significativos se pueden observar a los 6.25, 25 y 50 ng del vector p /hGATA-4



**Figura 6.6.** Efecto del aumento en la expresión del factor hGATA-4 en la actividad transcripcional del promotor del nFSHR. Concentraciones crecientes del vector phGATA4 o de phGATA4inv fueron cotransfectadas con una concentración constante de la construcción silvestre pnFSHR-867 en la línea celular NCI-H441. El plásmido pRL-TK se cotransfectó como control interno de eficiencia de la transfección. Los valores representan la media  $\pm$  DS ( $n = 3$ ) de un experimento representativo. A la media obtenida con la construcción pnFSHR-867 en ausencia de hGATA-4 (TE) se le asignó el valor 1 y se calcularon las veces de inducción de la actividad relativa de la luciferasa para cada dosis. Las diferencias existentes en la actividad transcripcional fueron evaluadas mediante la prueba de  $t$  de Student. \*  $p < 0.05$

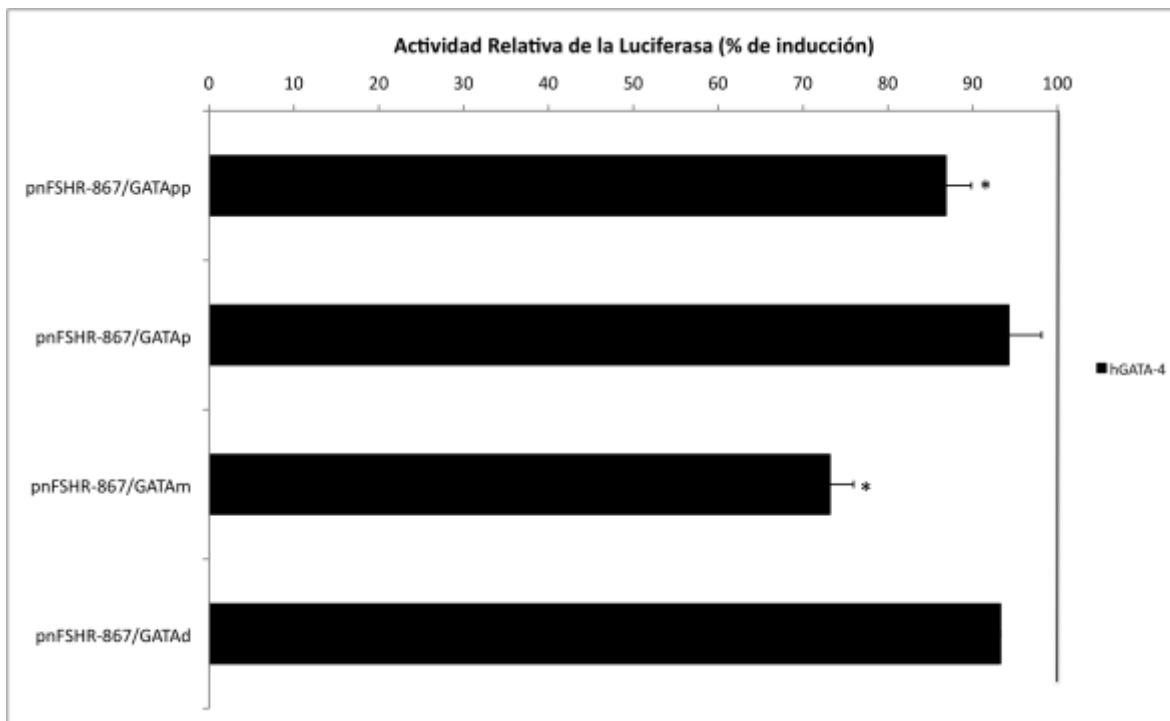
Por otro lado, en el ensayo realizado con la misma construcción de -867 pb del promotor del nFSHR, estimulada con dosis progresivamente mayores de mGATA-1 (Fig. 6.7), es posible ver un efecto similar al sucedido con hGATA-4. Sin embargo, la inducción máxima obtenida con hGATA-1 es de sólo 3.2 veces la actividad relativa obtenida con el vehículo (TE), mientras que con hGATA-4 la inducción máxima alcanza las 4.6 veces la actividad relativa de la luciferasa generada solo con el vehículo (Fig. 6.6 y 6.7). Estos experimentos indican que ambos factores pueden regular la transcripción del promotor del nFSHR *in vitro* y son fuerte evidencia de la posible participación de uno o ambos factores en la regulación transcripcional de este promotor *in vivo*, en las células de Sertoli.





**Figura 6.7.** Efecto del aumento en la expresión del factor mGATA-1 en la actividad transcripcional del promotor del nFSHR. Concentraciones crecientes del vector pmGATA1 fueron cotransfectadas con una concentración constante de la construcción silvestre pnFSHR-867, en la línea celular NCI-H441. El plásmido pRL-TK se cotransfectó como control interno de eficiencia de la transfección. Los valores representan la media  $\pm$  DS ( $n = 3$ ) de un experimento representativo. A la media obtenida con la construcción pnFSHR-867 en ausencia de mGATA-1 (TE) se le asignó el valor 1 y se calcularon las veces de inducción de la actividad relativa de la luciferasa para cada construcción. Las diferencias existentes en la actividad transcripcional fueron evaluadas mediante la prueba de *t* de Student. \*  $p < 0.05$

Con el fin de poder determinar si alguno de los sitios GATA del promotor del nFSHR presenta un mejor desempeño, en presencia del factor GATA que ejerce mayor inducción (hGATA-4), se realizaron ensayos de expresión transitoria cotransfectando el factor hGATA-4 con la construcción silvestre pnFSHR-867 y sus cuatro variantes con las mutaciones en los elementos GATA. Al comparar el porcentaje de inducción alcanzado por cada construcción mutante con respecto a la inducción del promotor silvestre, solamente la mutaciones efectuadas sobre los sitios GATAm y GATApp ocasionan disminuciones significativas (27 y 13 % respectivamente) en la inducción generada por hGATA-4 (Fig.6.8). Estos resultados indican que la transactivación lograda por hGATA-4 sobre el promotor del nFSHR se puede atribuir, principalmente, a la interacción de este factor con los sitios GATAm y GATApp, mientras que los otros dos sitios no participan de forma importante en la regulación por hGATA-4; ya que al mutarlos no presentan un efecto significativo en su inducción con respecto a la inducción alcanzada por la construcción silvestre.



**Figura 6.8.** Efecto de la mutación de los sitios GATApp, GATAp, GATAm y GATAd en la inducción de la actividad transcripcional ejercida por el factor nuclear hGATA-4. Cada construcción reportera fue transfectada en ausencia o presencia del vector phGATA-4 (50 ng/ $\mu$ l) en línea celular NCI-H441. La actividad del gen reportero fue determinada en lisados celulares 48 h después de la transfección. Los resultados son representados por la media  $\pm$  DS (n = 3) de la actividad de cada construcción de un experimento representativo. A la media de la inducción obtenida por la construcción silvestre se le asignó el 100% y se calculó el porcentaje de inducción de cada construcción mutante. Las diferencias en la actividad transcripcional con respecto al promotor silvestre fueron evaluadas mediante la prueba de *t* de Student. \*  $p < 0.05$

## **7. DISCUSIÓN**

A pesar de la importancia que tiene el FSHR para la regulación de la función reproductora de los vertebrados, los mecanismos que explican su regulación y expresión célula específica de este receptor en las gónadas, son aún poco claros. Con el fin de aportar nueva información a este respecto, el promotor del FSHR del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) fue clonado y comparado con el de otras especies reportadas previamente. La homología de su secuencia con el promotor del FSHR de otros roedores es considerable, en comparación a la de oveja y humano. El promotor nFSHR contiene elementos *cis* filogenéticamente conservados, como el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) encontrado en el promotor de oveja y humano (Gromoll et al, 1994a; Sairam y Subbarayan, 1997). Sin embargo, este elemento *cis* no demostró tener alguna actividad en el promotor del ratón de los volcanes, muy probablemente debido a la ausencia del tercer nucleótido que separa la secuencia palindrómica del ERE. También, se encontró, un elemento caja *E* que se ha demostrado, interactúa con el factor de estimulación corriente arriba 1 y 2 (USF1 y 2) tanto *in vitro* (Goetz et al, 1996; Heckert et al, 1998; Themmen et al, 1991) como *in vivo* en roedores (Heckert et al, 2000; Hermann et al, 2008) y un elemento semejante a *CRE*, el cual se ha asociado con la regulación transcripcional mediada por AMPc (Levallet et al, 2001). Por otro lado, es de gran importancia, el hallazgo de nuevos elementos putativos *cis* para factores de transcripción involucrados en la transactivación de genes importantes para la función testicular, como son los miembros de la familia SRY/SOX (Yuan et al, 2001; Haqq et al, 1993; Cheng et al, 2003), GATA (Kim et al, 2001; Feng et al, 2000; Cheng et al, 2003).

Los ensayos de expresión transitoria con varias construcciones génicas, revelan que el promotor del nFSHR tiene una actividad transcripcional mayor en la línea celular NCI-H441 que en las células MSC-1. Sin embargo, en algunos casos la actividad del promotor en este último tipo celular fue tan activo como en la línea NCI-H441 (Fig. 6.3, ver pnFSHR.867), lo cual indica que por lo menos un factor nuclear diferente a los factores de transcripción ubicuos, atenúa la actividad del promotor del nFSHR. Esto concuerda con los niveles bajos de transcripción observados en la línea celular de Sertoli 15P1 que fue transfectada transitoriamente con el promotor del FSHR de oveja (Xing y Sairam, 2001a).

La comparación del promotor del nFSHR con el de ratón 129/J, reveló similitudes y diferencias interesantes en sus patrones de expresión. Aunque el promotor del FSHR de 129/J también mostró una mayor actividad en la línea celular NCI-H441, la actividad transcripcional de dos construcciones génicas ( $p_{129/J}$ FSHR-961 y  $p_{129/J}$ FSHR-552) fue más alta (60%) que sus correspondientes contrapartes en el ratón de los volcanes (Fig. 6.3). Estos resultados sugieren que diferencias sutiles en los elementos en *cis* del promotor de 129/J son las responsables de su alta actividad, remarcando así la importancia de las diferencias interespecíficas en la función de este promotor en particular.

Experimentos de transfección con una serie de construcciones génicas gobernadas por versiones del promotor del nFSHR de diferentes tamaños,

permitió identificar con mayor precisión algunas regiones regulatorias. En las células MSC-1, tres regiones involucradas en la regulación transcripcional negativa fueron identificadas en -946/867, -490/-410 y -327/-260 pb. Estas regiones juegan un papel importante en la baja actividad presentada por el promotor en esta línea celular en particular. Otros estudios realizados en diferentes líneas gonadales, han reportado también la actividad de regiones inhibitorias en el promotor del gen del FSHR (Gromoll et al, 1994a; Heckert et al, 1998; Xing y Sairam, 2001; Putowski et al, 2004), como el que fue encontrado entre -946 y -867 del promotor del ratón de los volcanes. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la línea celular MSC-1 cuenta con factores de transcripción célula-específicos que regulan negativamente la expresión del gen del nFSHR.

En el presente estudio, se demostró que la eliminación de la región (-260/-202) que contiene los sitios de unión para SRY en el promotor del nFSHR, reduce significativamente la actividad del gen reportero en células de Sertoli. La identidad que presentan estos tres sitios con la secuencia consenso y la relevancia que tiene SRY en el desarrollo de las células de Sertoli (Harley et al, 2003; DiNapoli y Capel, 2008) apuntan hacia un probable rol de SRY en la regulación transcripcional del nFSHR. De igual forma, los resultados obtenidos tanto en el análisis de la secuencia del promotor del nFSHR por Mat-Inspector como en la caracterización funcional de sus diferentes regiones por los ensayos de expresión transitoria, sirvieron como guía para la selección de los elementos que se mutarían

para determinar su papel en la regulación transcripcional. Como se mencionó anteriormente, en la línea celular MSC-1, la región que se encuentra entre -867 y -665 pb del promotor del ratón de los volcanes y que logra inducir el máximo de actividad del promotor, contiene dos de los elementos que resultaron con una identidad alta con la secuencia consenso reconocida por los factores de la familia GATA. Así también, la región que se encuentra entre -202 y -1 pb, de este mismo promotor, que cuenta con otro de los elementos GATA de alta identidad, logra inducir dos veces la actividad del gen reportero en MSC-1, muy a pesar de la ausencia de los elementos SRY. Fue así como se decidió mutar los cuatro elementos GATA de alta identidad del promotor del nFSHR y corroborar su funcionalidad experimentalmente. Como se esperaba, la actividad del gen reportero en ambas líneas celulares, disminuyó significativamente con respecto al promotor silvestre al mutar los cuatro sitios GATA, sin embargo, los patrones de transcripción de la serie de mutaciones es diferente en cada contexto celular (Fig. 6.5). Esto sugiere que los factores que interactúan con estos elementos son distintos, ya que por ejemplo, la mayor susceptibilidad a la mutagénesis por parte del promotor se presentó en el sitio GATApp en las células MSC-1, mientras que el sitio GATAm es el que afecta más la transcripción en NCI-H441.

En general las mutaciones efectuadas en los sitios GATA afectan menos la actividad transcripcional del promotor cuando son transfectadas en MSC-1, lo que podría ser debido a que, en esta línea celular, se expresan dos de los miembros de la familia GATA (GATA1 y GATA-4; Feng et al, 2000); mientras que en NCI-



H441 solamente se ha reportado la expresión de GATA-2 en niveles muy bajos (German et al, 2000). Debido a que, tanto el factor GATA-1 como GATA-4, son expresados por las células de Sertoli para la regulación de varios genes específicos de este linaje celular (LaVoid 2003), se decidió determinar si estos factores pueden inducir la actividad transcripcional del promotor del nFSHR silvestre. Al cotransfectar la construcción de -867 pb con una serie de dosis en incremento de hGATA-4 y mGATA-1 en la línea celular NCI-H441, el promotor aumenta la actividad del gen reportero al incrementar la concentración de los factores de transcripción (Fig. 6.6 y 6.7), indicando que ambos factores podrían tener un papel en la regulación de la expresión del nFSHR *in vivo*.

La inducción generada por mGATA-1 sobre el promotor silvestre es menor (3.2 veces) que la lograda por hGATA-4 (4.5 veces); sin embargo, la inducción promovida por este último factor sufre una disminución significativa solamente al ser mutado en los sitios GATApp y GATAm (Fig 6.8). Esto significa que estos sitios podrían ser los sitios del promotor con los que interactúa el factor GATA-4 para regular la transcripción del nFSHR.

La cantidad de elementos GATA en el promotor del nFSHR y la notoria actividad regulatoria que muestran en presencia de factores miembros de la familia GATA *in vitro*, sugiere la posibilidad de que este promotor lleve a cabo un mecanismo de regulación semejante *in vivo*, ya que como se mencionó anteriormente, tanto GATA-1 como GATA-4 son factores que se ha demostrado

tienen un papel relevante en la regulación transcripcional de otros genes estrechamente asociados con el desarrollo testicular normal de los mamíferos (Cheng et al 2003; Oréal et al, 2002; Ketola et al, 2000).

## **8. CONCLUSIONES**

El promotor del nFSHR mantiene una alta homología con el de otras especies de roedores como rata y ratón, así como elementos en *cis* reportados en otros mamíferos.

El promotor del nFSHR carece de una caja TATA canónica pero contiene una región rica en A/T muy semejante a la de otros promotores que contienen una caja TATA.

La línea celular MSC-1 expresa factores de transcripción célula específica que inhiben la transcripción del promotor del FSHR del ratón de los volcanes.

La ausencia del bloque de elementos genéticos en *cis* con alta identidad con la secuencia consenso para los miembros de la familia SOX/SRY, afecta negativamente la actividad del promotor del nFSHR.

Los elementos en *cis* de alta identidad GATAm y GATApp, activan la transcripción del promotor del nFSHR, al ser inducidos por los factores GATA-1 y GATA-4.

## **9. PERSPECTIVAS**

La nueva información encontrada a través de este estudio, puede ser ampliada y corroborada mediante la mutación de los elementos en *cis* de alta identidad con la secuencia consenso para la familia de factores de transcripción SOX/SRY, con el fin de saber si están involucrados con la regulación positiva inducida por la región comprendida entre -260 y -202 pb del promotor del FSHR del ratón de los volcanes.

Por otro lado, la comprobación de la interacción física de los factores GATA-1 y GATA-4 con los elementos funcionales GATA encontrados en el promotor del FSHR del ratón de los volcanes, a través de ensayos de cambio en la movilidad electroforética y de super-retardo, sería un estudio que complementaría de manera importante los resultados aquí reportados.

Por último, la demostración de que los mecanismos de regulación transcripcional para el promotor del FSHR aquí propuestos ocurren *in vivo* en las células de Sertoli, es un estudio de gran relevancia para el planteamiento de la aplicación biológica de esta investigación. Para lograr esta meta es necesario llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina o ensayos de expresión transitoria en cultivo primario de células de Sertoli.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

Acosta A, Zariñán T, Macías H, Pasapera AM, Pérez-Solis MA, Olivares A, Ulloa-Aguirre A, Gutiérrez-Sagal R 2007 Regulation of Clara cell secretory protein gene expression by the CCAAT-binding factor NF-Y. *Arch Biochem Biophys* 459:33-9

Akazome Y, Ogasawara O, Park MK, Mori T 1996 Highly heterologous region in the N-terminal extracellular domain of reptilian follitropin receptors. *Gen Comp Endocrinol* 104:374–381.

Bhalla VK, Reichert LE Jr 1974 Properties of follicle-stimulating hormone-receptor interactions. Specific binding of human follicle-stimulating hormone to rat testes. *J Biol Chem* 249:43-51.

Bhardwaj A, Rao MK, Kaur R, Buttigieg MR, Wilkinson MF 2008 GATA factors and androgen receptor collaborate to transcriptionally activate the Rhox5 homeobox gene in Sertoli cells. *Mol Cell Biol* 28:2138-2153.

Brower M, Carney DN, Oie HK, Gazdar AF, Minna JD 1986 Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res* 46:798-806.

Cheng CK, Cheung CH, Lee WM 2003 Mouse testin: complementary DNA cloning, genomic organization, and characterization of its proximal promoter region. *Biol Reprod* 68:1376-1386.



DiNapoli L, Capel B. 2008 SRY and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol* 22:1-9.

Dufau ML, Ryan DW, Catt KJ 1977 Soluble FSH receptors from the rat testis. *FEBS Lett* 81:359-362.

Eskola V, Nikula H, Huhtaniemi I 1993 Age-related variation of follicle-stimulating hormone-stimulated cAMP production, protein kinase C activity and their interactions in the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 93:143–148.

Feng ZM, Wu AZ, Zhang Z, Chen CL 2000 GATA-1 and GATA-4 transactivate inhibin/activin beta-B-subunit gene transcription in testicular cells. *Mol Endocrinol* 14:1820-1835.

German Z, Chambliss KL, Pace MC, Arnet UA, Lowenstein CJ, Shaul PW 2000 Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in airway epithelium. *J Biol Chem* 275: 8183-8189.

Goetz TL, Lloyd TL, Griswold MD 1996 Role of E-box and initiator region in the expression of the rat follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 271:33317-33324.

Goxe B, Prunier A, Remy JJ, Salesse R 1993 Ontogeny of gonadal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in the fetal pig and related changes in gonadotropin and testosterone secretion. *Biol Reprod* 49:609–616.

Grima J, Pineau C, Bardin CW, Cheng CY 1992 Rat Sertoli cell clusterin, a2-macroglobulin, and testins: biosynthesis and differential regulation by germ cells. *Mol Cell Endocrinol* 89:127–140.

Griswold MD 1998 The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Develop Biol* 9:411-416.

Gromoll J, Dankbar B, Gudermann T 1994a Characterization of the 5'flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 102:93-102.

Gromoll J, Dankbar B, Sharma RS, Nieschlag E 1993 Molecular cloning of the testicular follicle-stimulating hormone receptor of the non-human primate *Macaca fascicularis* and identification of multiple transcripts in the testis. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1066–1072.

Gromoll J, Ried T, Holtgreve-Grez H, Nieschlag E, Gudermann T 1994b Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10. *J Mol Endocrinol* 12:265-271.

Gromoll J, Pekel E, Nieschlag E 1996 The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. *Genomics* 35:308–311.

Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A 2003 The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr Rev* 24:466-487.

Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA 1993 SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1097–1101.

Heckert LL 2001 Activation of the rat follicle-stimulating hormone receptor promoter by steroidogenic factor 1 is blocked by protein kinase A and requires upstream stimulatory factor binding to a proximal E-box element. *Mol Endocrinol* 15:704-715.

Heckert LL, Daggett MA, Chen J 1998 Multiple promoter elements contribute to activity of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene in testicular Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 12:1499-1512.

Heckert LL, Daley IJ, Griswold MD 1992 Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 6:70–80.

Heckert LL, Griswold MD 1991 Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 5:670–677.

Heckert LL, Griswold MD 2001 The expression of follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 57:129-148.

Heckert LL, Sawadogo M, Daggett MA, Chen JK 2000 The USF proteins regulate transcription of the follicle-stimulating hormone receptor but are insufficient for cell-specific expression. *Mol Endocrinol* 14:1836-48.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA 1998 Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL *Nucleic Acids Res* 26: 362-367.

Hermann BP, Hornbaker K, Rice DA, Sawadogo M, Heckert LL 2008 In vivo regulation of follicle-stimulating hormone receptor by the transcription factors upstream stimulatory factor 1 and upstream stimulatory factor 2 is cell specific. *Endocrinology* 149: 5297-5306.

Houde A, Lambert A, Saumande J, Silversides DW, Lussier JG 1994 Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Mol Reprod Dev* 39:127–135.

Huhtaniemi IT, Eskola V, Pakarinen P, Matikainen T, Sprengel R 1992 The murine luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes: transcription initiation sites, putative promoter sequences and promoter activity. *Mol Cell Endocrinol* 88:55-66.

Huhtaniemi IT, Yamamoto M, Ranta T, Jalkanen J, Jaffe RB 1987 Follicle-stimulating hormone receptors appear earlier in the primate fetal testis than in the ovary. *Endocrinol* 65:1210–1214.

Kelton CA, Cheng SVY, Nugent NP, Schweickhardt RL, Rosenthal JL, Overton SA, Wands GD, Kuzeja JB, Luchette CA, Chappel SC 1992 The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 89:141–151.

Ketola I, Pentikäinen V, Vaskivuo T, Ilvesmäki V, Herva R, Dunkel L, Tapanainen JS, Toppari J, Heikinheimo M 2000 Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:3925-3931.

Khan H, Yarney TA, Sairam MR 1993 Cloning of alternative spliced mRNA transcripts coding for variants of ovine testicular follitropin receptor lacking the G protein coupling domains. *Biochem Biophys Res Commun* 190:888–894.

Kim JS, Griswold MD 2001 E2F and GATA-1 are required for the Sertoli cell-specific promoter activity of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Androl* 22:629-639.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-8.

Levallet J, Koskimies P, Rhaman N, Huhtaniemi I 2001 The promoter of murine follicle-stimulating hormone receptor: functional characterization and regulation by transcription factor steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* 15:80-92.

La Voie HA 2003 The role of GATA in mammalian reproduction. *Exp Biol Med* 228:1282-1290.

McGuinness MP, Linder CC, Morales CR, Heckert LL, Picus J, Griswold MD 1994 Relationship of a Mouse Sertoli Cell Line (MSC-1) to normal Sertoli cells. *Biol Reprod* 51:116-124.

Means AR, Vaitukaitis J 1972 Peptide hormone receptors: specific binding of <sup>3</sup>H-FSH to testis. *Endocrinol* 90:39-46.

Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS 2008 A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol* 9:44.

Molketin JD 2000 The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *J Biol Chem* 275:38949-38952.

Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Parmacek MS 1997 GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J Biol Chem* 272:8515-8524.

Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, Weiss MJ 2000 Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 24:266-270.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER 2001 Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:289-318.

Omichinski JG, Trainor C, Evans T, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G 1993 A small single-"finger" peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1676-1680.

Oréal E, Mazaud S, Picard JY, Magre S, Carré-Eusèbe D 2002 Different patterns of anti-Müllerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev Dyn* 225:221-232.

O'Shaughnessy, Dudley K 1993 Discrete splicing alternatives in mRNA encoding the extracellular domain of the testis FSH receptor in the normal and hypogonadal (hpg) mouse. *J Endocrinol* 10:363–366.

Putowski L, Gastor W, Gogaez M, Gagala J, Jakowicki JA 2001 Differences in human and rat FSH receptors promote activity as a result of the transcriptional factors: E2F1, E2F4 and E2F5 overexpression. *Ginekol Pol* 72:1560-1566.

Putowski LT, Schillings WJ, Lee CM, Reddy EP, Jakowicki JA 2004 Human follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) promoter/enhancer activity is inhibited by transcriptional factors, from the upstream stimulating factors family, via E-box and newly identified initiator element (Inr) in FSH-R non-expressing cells. *Gynecol Endocrinol* 19:9-17

Rajapaksha WR, Robertson L, O'Shaughnessy PJ 1996 Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA alternate transcripts in bovine granulosa cells during luteinization *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 120:25–30.



Remy JJ, Lahbib-Mansais Y, Yerle M, Bozon V, Couture L, Payot E, Greber D, Salesse R 1995 The porcine follitropin receptor: cDNA cloning, functional expression and chromosomal localization of the gene. *Gene* 163:257–261.

Robert P, Amsellem S, Christophe S, Benifla JL, Bellet D, Koman A, Bidart JM 1994 Cloning and sequencing of the equine testicular follitropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 201:201–207.

Roberts KP, Zirkin BR 1991 Androgen regulation of spermatogenesis in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 637:90-106.

Sairam MR, Jiang LG, Yarney TA, Khan H 1996 Follitropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of receptor which inhibits hormone action. *Biochem Biophys Res Commun* 226:717–722.

Sairam MR, Krishnamurthy H 2001 The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. *Arch Med Res* 32:601-608

Sairam MR, Subbarayan VS 1997 Characterization of the 5'-flanking region and potential control elements of the ovine follitropin receptor gene. *Mol Reprod Dev* 48:480-407.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Stripp BR, Sawaya PL, Luse DS, Wikenheiser KA, Wert SE, Huffman JA, Lattier DL, Singh G, Katyal SL, Whitsett JA 1992 cis-acting elements that confer lung epithelial cell expression of the CC10 gene. *J Biol Chem* 267:14703-14712.

Segaloff DL, Ascoli M 1993 The lutropin/choriogonadotropin receptor. . . 4 years later. *Endocr Rev* 14:324–342.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.

Smale ST, Baltimore D 1989 The “initiator” as a transcription control element. *Cell* 57:103–113.

Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH 1990 The testicular receptor for follicle-stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 4:525–530.

Stallard BJ, Griswold MD 1990 Germ cell regulation of Sertoli cell transferrin mRNA levels. *Mol Endocrinol* 4:393-401.

Tena-Sempere M, Manna PR y Huhtaniemi I 1999 Molecular cloning of the mouse follicle-stimulating hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: functional expression of alternatively spliced variants and receptor inactivation by a C566T transition in exon 7 of the coding sequence. *Biol Reprod* 60, 1515–1527.

Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP 1995 FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Endocrinol* 15:273–281.

Themmen AP, Blok LJ, Post M, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Parmentier M, Vassart G, Grootegoed JA, 1991 Follitropin receptor down-regulation involves a cAMP-dependent post-transcriptional decrease of receptor mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol* 78:R7-R13

Tsutsui K, Kawashima S, Masuda A, Oishi T 1988 Effects of photoperiod and temperature on the binding of follicle-stimulating hormone (FSH) to testicular preparations and plasma FSH concentration in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Endocrinology* 122:1094–1102.

Tsutsui K, Kawashima S, Saxena VL, Saxena AK 1992 Binding properties and photoperiodic influence of follicle-stimulating hormone receptors in the subtropical wild quail. *Zool Sci* 9:649–657.

Tsutsui K, Shimizu A, Kawamoto K, Kawashima K 1985 Developmental changes in the binding of follicle-stimulating hormone (FSH) to testicular preparations of mice and the effects of hypophysectomy and administration of FSH on the binding. *Endocrinol* 117:2534–2543.

Ulloa-Aguirre A, Conn PM 1998 G protein-coupled receptors and the G protein family. In: Conn PM (ed) *Handbook of Physiology: Molecular and Cellular Endocrinology*. Oxford University Press, New York

Walker WH, Cheng J 2005 FSH and testosterone signalling in Sertoli cells. *Reproduction* 130:15-28.

Wahlström T, Huhtaniemi I, Hovatta O, Seppälä M 1983 Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *J Clin Endocrinol Metab* 57:825-830.

Warren DW, Huhtaniemi I, Tapanainen J, Dufau M L, Catt KJ 1984 Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology* 114:470–476.

Xing W, Sairam MR. 2001a Characterization of regulatory elements of ovine follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene: the role of E-box in the regulation of ovine FSHreceptor expression. *Biol Reprod* 64:579-89.

Xing W, Sairam MR 2001b Role of CACC box in the regulation of ovine FSH receptor expression. *Biol Reprod* 65:1142-1149.

Xing W, Danilovich N, Sairam MR 2002 Orphan receptor chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors inhibit steroid factor -1, upstream stimulatory factor and activator protein-1 activation of ovine follitropinreceptor gene. *Biol Reprod* 66:1656-1666.

Yarney TA, Sairam MR, Khan H, Ravindranath N, Payne S, Seidah NG 1993 Molecular cloning and expression of the ovine testicular follicle-stimulating hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 93:219–226.

You S, Bridgham JT, Foster DN, Johnson AL 1996 Characterization of the chicken follicle-stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biol Reprod* 55:1055–1062.

Yuan X, Lu ML, Li T, Balk SP 2001 SRY Interacts with and Negatively Regulates Androgen Receptor Transcriptional Activity. *J Biol Chem* 276: 46647–46654.

Zhang YM, Roy SK 2004 Downregulation of follicle-stimulating hormone (FSH)-receptor messenger RNA levels in the hamster ovary: effect of the endogenous and exogenous FSH. *Biol Reprod* 70:1580-1588.

Zirkin BR, Awoniyi C, Griswold MD, Russell LD, Sharpe R 1994 Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl* 15:273-276.

## Molecular cloning and functional analysis of the FSH receptor gene promoter from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*)

Marco Allán Pérez-Solis · Héctor Macías · Adriana Acosta-MontesdeOca · Ana María Pasapera · Reyna Fierro · Alfredo Ulloa-Aguirre · Rubén Gutiérrez-Sagal

Received: 15 June 2009 / Accepted: 11 October 2009 / Published online: 28 October 2009  
© Humana Press 2009

**Abstract** To gain further insights on the genetic divergence and the species-specific characteristics of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), we cloned 946 bp of the 5'-flanking region of the *FSHR* gene from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*), and compared its features with those from other mammalian species. The sequence of neotomodon FSHR (nFSHR) gene from the translation initiation site to -946 is 74, 71, 64, and 59% homologous to rat, mouse (129/J), human, and sheep, respectively. The nFSHR 5'-flanking region exhibits new interesting putative *cis*-regulatory elements including those for the SRY transcription factor, which had not been previously related to the *FSHR* gene. The transcriptional regulation properties of nFSHR gene were studied in mouse Sertoli (MSC-1) and non-Sertoli (H441) cell lines, and compared with those obtained with similar 129/J constructs. All constructs tested were more active in H441 than in MSC-1 cells. The low transcription levels detected in MSC-1 cells probably reflect the recruitment of Sertoli cells-specific nuclear factors that repress transcription of the *FSHR* gene. In H441 cells, 129/J constructs were more active than their neotomodon counterparts, indicating important species-specific

differences in their transcription pattern. Functional analysis of a series of progressive 5'-deletion mutants identified regions involved in positive and negative transcriptional regulation as well as the strongest minimal promoter spanning 260 bp upstream the translation initiation site. The identification of inhibitory nuclear transcription factors, which are apparently expressed in MSC-1 cells, may contribute to a better understanding of the transcriptional regulation of the *FSHR* gene.

**Keywords** Gonadotropin receptors · FSH · *FSHR* gene · Neotomodon · Sertoli cells · Testis

### Introduction

Follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) are the pituitary hormones that regulate gonadal function in vertebrates through their interaction with their cognate receptors (R), the FSHR and the LHR. These receptors belong to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs), which act through interactions with guanine-nucleotide-binding signal transducing proteins (G-proteins). As other GPCRs, the FSHR contains seven transmembrane domains and a large extracellular domain that interact with the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the FSH. Binding of FSH to its receptor activates the trimeric  $G_s$  protein, which stimulates the membrane-bound effector enzyme adenylyl cyclase leading to formation of cAMP and activation of multiple intracellular signaling cascades that influence expression of FSH-dependent genes in the gonads [1].

The cDNA of the FSHR has been cloned from several mammalian and non-mammalian species [2]. These studies have been instrumental not only for a better understanding

---

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database under the accession number AM943661.

---

M. A. Pérez-Solis · H. Macías · A. Acosta-MontesdeOca · A. M. Pasapera · A. Ulloa-Aguirre · R. Gutiérrez-Sagal (✉)  
Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Gineco Obstetricia No. 4, Luis Castelazo Ayala, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Apartado Postal 99-065, Unidad Independencia, C.P. 10101 Mexico, D.F., Mexico  
e-mail: ruben.gutierrezs@imss.gob.mx

R. Fierro  
Depto. Ciencias de la Salud, U.A.M.-I., Mexico, D.F., Mexico

of the structure–function relationship of the FSHR [3, 4], but also for the improvement of our knowledge of the phylogenetic relationships and divergence of the FSHR and related receptors. In sharp contrast, the 5′-flanking region of the FSHR has only been cloned from human and sheep, as well as from two rodent species, the rat and mouse [5–8]. These studies have allowed the identification of some transcription factors involved in the transcriptional control of the *FSHR* gene. The nature of the transcription factors so far studied is fundamentally ubiquitous and have been implicated in the basal transcription of the *FSHR* gene [9], while the identification of nuclear factors that control the extraordinary cell specificity and temporal-specific pattern of expression of *FSHR* gene still remains unknown. The study of the FSHR and its gene in other animal species may potentially shed new insights on both the structure–function relationship and the genetic features responsible for its cell-specific pattern of expression.

In the present study, we cloned the 5′-flanking region of the *FSHR* gene from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*), a particular rodent species endemic to the mountains of the Mexican Transvolcanic Belt, occurring at an altitudinal range of 8,500–14,000 ft. This species has survived for thousands of years due to particular adaptive mechanisms which may have imprinted unique features on its genome [10]. In addition, we compared the structure of the neotomodon 5′-regulatory region and its transcriptional regulatory properties with that of the 129/*JFSHR* gene. The results demonstrate that the 5′-flanking region of the *nFSHR* gene is active in non-Sertoli cells (H441 cell line) and less active in Sertoli cells (MSC-1 cell line), suggesting that the MSC-1 cell line possesses strong inhibitory factors that interact with specific regions of the *nFSHR* gene.

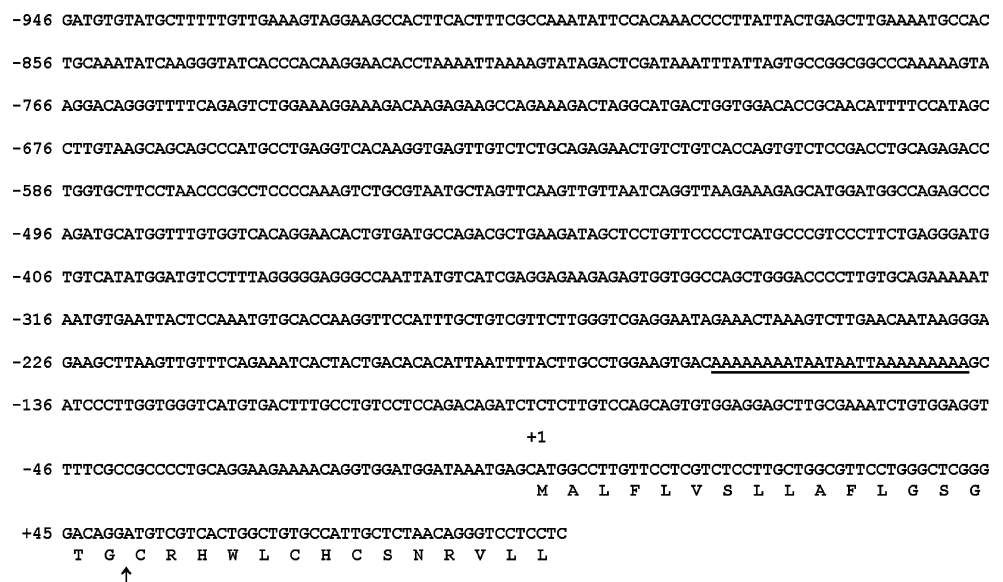
**Results**

Isolation and sequence analysis of the 5′-flanking region of the *nFSHR* gene

In order to isolate the 5′-flanking region of the *nFSHR* gene, we aligned the 5′-flanking regions of the *FSHR* gene from rat and mouse [6, 7] and found a conserved region localized at –881/–851 bp from the transcription start site of the rat gene. A synthetic oligonucleotide (FSHRp-fw3) containing this sequence was used as primer for the amplification of neotomodon genomic DNA by PCR. The downstream primer was an oligonucleotide (FSHRp-rev1) corresponding to the sequence +122/+93 of the hamster FSHR cDNA [11]. This latter species was chosen considering that the neotomodon and hamster belong to the same taxonomic family (*Cricetidae*). An amplified product of approximately 1.1 kb was isolated, cloned, and sequenced (Fig. 1). To confirm the fidelity of the sequence, two other independent clones were completely sequenced. The *nFSHR* 5′-flanking region contains a sequence (Fig. 1, –163/–139) that resembles the A/T-rich region found in many TATA-containing promoters. Nevertheless, it does not perfectly match the well defined consensus sequence (TATAAA) of the canonical TATA box. The DNA cloned also includes the nucleotide sequence that encodes the first 31 amino acids of the *nFSHR*; it spans the complete signal peptide (17 residues) and the first 14 amino acids of the mature protein.

We also cloned and analyzed the 5′-flanking region of the 129/*JFSHR* (129/*JFSHR*) gene following the above mentioned strategy. Although the nucleotide sequence of the 129/*JFSHR* gene is almost identical to that identified in the Balb/c mouse by Huhtaniemi et al. [7] (Accession No. S49632), we detected a nucleotide change (A/G) at position

**Fig. 1** Nucleotide sequence of the 5′-flanking region of the neotomodon *FSHR* gene. Nucleotides are numbered from the translation initiation site, which is indicated by +1. The predicted amino acid sequence partially encoded by exon 1 is indicated below the nucleotide sequence. The A/T rich region is underlined and the putative cleavage site of the signal peptide is indicated by a vertical arrow





129/J	-961	GAGGTGTACGTTTTTTAGTGTTCATAGACTCTGGGTGGAAAGAAGATCATCCCTTCACTTTTGTAAATATTCTCTCAAACCCTTTACT	-872
Rat	-948	CATGTGCAAGCTTTTTAGTCTTCATAGACTCTGGGTGGAAAGAAGATCATCCCTTCACTTTTGTAAATATTCTCTCAAACCCTTTACT	-861
Neotomodon	-946	GATGTGTATGCTTTTTT-----GTTGAAAGTAGGAAAGCCACTTCTCTTCCGCAATATTTCACAAAACCCTTTACT	-874
		* ** * * * * *	
129/J	-871	AAGCTTAAAAATGCCACTGTTGCAAATACCTAGGGTGTCTCACAGGAAATCTCTAAAATTAAGAATATAGATGTGATACATTTATTTCG	-782
Rat	-860	AAGCTTAAAAATGCCACTG---CAAATACCTAGAGTGTCTCACAGGAAATCTCTAAAATTAAGAATATAGATGTGATACATTTATTTCG	-774
Neotomodon	-873	GAGCTTAAAAATGCCACTG---CAAATACCTAGGGTGTCTCACAGGAAATCTCTAAAATTAAGAATATAGATGTGATACATTTATTTCG	-787
		*****	
129/J	-781	TGCCAATCTTGAATTAGGAAGAAAGGACAGTTCCTAGAGTTAGCAAAGGAAAACAAGAGATGCCAGAAAGACTACGCATGACTGGTGA	-692
Rat	-773	TGCCAATCTTAAAAATAGGAAGAAAGGACAGTTCCTAGAGTTCGAAAGGAAAAGACA--GATGCCAGAAAGACTATGCATTGCTAGTGG	-687
Neotomodon	-786	TGCCGGCGGCCCAAAGTAAGGACAGG--GTTTTCAGAGTCTGAAAGGAAAAGACAAGAGAAGCCAGAAAGACTAGGCATGACTGGTGG	-699
		*****	
129/J	-691	ACGCTGTGACC-----AGAAAAGCCATGCGCTGAGGTCTCAGAAGTGAATGTCTCCAGAGAGAACC--CTATCAC-	-622
Rat	-686	ATAA-----AGAAAGCAGCCCGTCTGAGGTCTCAGCAAGTGAATGTCTCCAGAGAGAACC--CTATCAC-	-623
Neotomodon	-698	ACACCGCAACATTTTCCATAGCCTTGTAAAGCAGCAGCCCATGCTGAGGTCTCAGCAAGTGAATGTCTCCAGAGAGAACC--CTATCAC-	-610
		* ** * * * * *	
		CRE	
129/J	-621	-----CCACCTACAGCGGTTAGTGCT---AAC-----ACTTGCTTATGTTGTTAA---TCACA-	-574
Rat	-622	GGTGCTCCACCGACAGAGACTAGTGCT---AACCCACTTCCCAAGTCTGTTAACACTAGCTTATGTTGTTAA---TCACA-	-542
Neotomodon	-609	AGTGCTCCAGCTGCAGAGACTAGTGCTTCTTAACCCCGCTCCCAAGTCTGCGTAATGCTAGTTCAGTTGTTAATCAGGTTAAGA	-520
		*****	
129/J	-573	-----GGCTAACTATAGCCAGATCTATGGTTTATAACAGATAGGTCACAGGAAAACAGCAATGCAAAATACTAAAGGTAATTTTG	-492
Rat	-541	-----GGATGACTATAGCCTAGATGTATGGTTTATATCAGATGGGACAGGAAAACAGCAACCAATACTAAAGGTAATTTTG	-460
Neotomodon	-519	AAGAGCATGGATGCCAGAGCCAGATGCTATGGTTTATATCAGATGGGACAGGAAAACAGCAACCAATACTAAAGGTAATTTTG	-438
		*****	
		GATA	
129/J	-491	TCCCCTTCATGTCTAGTAGTACATTAGAGATGTGTCTATGATGACTTGCCTGGGAAAGGGACGAAACCCTGATATCACTGAGAAGAGAGT	-402
Rat	-459	TCCCCTTCACATCAGT---CGTTAGAGATGTGTCTATGTTGATGTGCTTG--GGGAGAGGGTC-AATTATGTCTCAGGAGGAAGAGAGT	-377
Neotomodon	-437	TCCCCTTCATGCTCCCTTCTGAGGGATGTGTCTATGATGACTTGCCTTGA--GGGGAGGGCC-AATTATGTCTCAGGAGGAAGAGAGT	-350
		*****	
129/J	-401	AGTGACCAGTAGGGACCTCC-ATGCAGTAAATAATGTGAATCTGCTGATATCAGTCCATTAGGCTGATATCTCTAAAATATGCACCAAGT	-313
Rat	-376	AGTGACCAGTAGGGACCCCT-GTGCAGCAAAATAATGTGAATCTGCTGCTAT-----AGACTGATATCTTCAAAATATGCACCAAGT	-297
Neotomodon	-349	GGTGCCAGCTGGGACCCCTTGTGCAGAAAATAATGTGAATTA-----CTCAAATGTGCACCAAGG	-287
		*****	
129/J	-312	TTCTACTTGTGTCTATTTGGGG-TCAAGGAATAGAAAATATAGTCTTGAAGGATAAGACAGGTGCTTATGACAAAATATTAATCACAT	-224
Rat	-296	TTCTCTTTCTGTCTATTTGGGGGTCAAGGAATAAAAAATATAGTCTTGAAGGATAAAGCAGAAGATTAATGACACACATTAATCACAT	-207
Neotomodon	-286	TTCCATTTGCTGCTGTTCTTGGG-TCGAGGAATAGAACTAAA-GTCTGGAACAATAAGGGAGAAGCTA---AGTGTGTT--TCAGA-	-207
		*****	
		SRY                      Sox5/SRY                      SRY	
129/J	-223	TTCAATCATGTATTAATACATATAGTTACTACGGACACATATTAATTTTACTTGCCTGGGAGGGACAAAAGAAA-----AAAAAAA	-142
Rat	-206	-----ATTAATATATATAATCACTATGACACATATTAATTTTACTTGCCTGGGAGGGACAAA-----AAAAAAA	-142
Neotomodon	-206	-----AATCACTACTGACACACATTAATTTTACTTGCCTGGGAGGTGACAAAATAATAATTAATAATAA-----AAAAAAA	-140
		*****	
129/J	-141	AGCATCCTTTAGTGGGTACGTGACTTTGCT-GTCCTCCAAGCAGATCTCTCTTATCCGGACAGTGTGTGGAGGAGCCTGGGGAATCCTG	-53
Rat	-141	GGCATCTCTTGGTGGGTACGTGACTTTGCGCTTCCAAGCAGATCTCTCTTATCCGGACAGTGTGTGGAGGAGCCTGGGGAATCCTG	-52
Neotomodon	-139	AGCATCCTTGGTGGGTATGTGACTTTGCGCTGCTCCAGCAGATCTCTCTTATCCGGACAGTGTGTGGAGGAGCCTGGGGAATCCTG	-53
		*****	
		E box                      In R                      -1	
129/J	-52	GGAGGTTTTGCTGCTGGAGCAGGCAAGGAGGATGGATGGATAAATAAGCATG	
Rat	-51	GGAGGTTTTGCTGCTGGAGCAGGCAAGGAGGATGGATGGATAAATAAGCATG	
Neotomodon	-52	GGAGGTTTTGCTGCTGGAGCAGGCAAGGAGGATGGATGGATAAATAAGCATG	
		*****	

**Fig. 2** Alignment of the promoter regions of neotomodon, 129/J, and rat *FSHR* gene. The nucleotide differences between the 129/J *FSHR* promoter and that reported by Huhtaniemi et al. [7] are indicated with

–339 and four single nucleotide insertions at positions –390, –436, –865, and –886 (Fig. 2). A comparison between the sequence shown in Fig. 2 and that covering the C57BL/6J mouse chromosome 17 (Accession No. AC165082) revealed that only the (A/G) substitution at position –339 remained present. The differences detected may be due to the particular mouse strain employed to obtain the *FSHR* 5′-flanking region.

Comparative analysis of the nucleotide sequences of the *FSHR* promoter

Alignment of the neotomodon *FSHR* 5′-flanking region with two other phylogenetically related rodent species [129/J and rat *FSHR* gene [6] (Accession No. S81117)] indicated their evolutionary relationship (Fig. 2). The sequence of the *nFSHR* gene from the translation initiation site to –946 is 74 and 71% homologous to rat and 129/J, respectively; this homology decreases to 64 and 59% for

arrow heads. Putative relevant transcription factor binding sites are underlined and *labeled*. Conserved nucleotides (\*) and the translation initiation site ATG (underlined) are indicated

less related species such as human [5] and sheep [8], respectively (not shown).

We also detected high sequence homology with the E box and the initiator region (In R) previously described for the rat *FSHR* gene [12]. However, a 1-bp change in the neotomodon E box (Fig. 2) was noticed. This change disrupts the palindromic structure of the E box and probably affects negatively the binding of USF transcription factors since bases within the core of the E box are critical for recognition and function of the rat element [13]. The sequence around the E box (GGTCA<sub>T</sub>GTGAC) (Fig. 2, –126/–116) has also been identified as a putative estrogen responsive element (ERE) in the human and ovine *FSHR* promoters [5, 8]. This *cis*-element, however, failed to act as an ERE in the neotomodon promoter since no change in promoter activity was detected when estrogen receptor-positive MCF-7 cells transiently transfected with the reporter plasmid p*FSHR*-946 were stimulated with either vehicle or 17β-estradiol (1 × 10<sup>-8</sup> M) (data not shown).

Neither the GATA 1 binding site (TATC) in the rat gene [14] nor the COUP-TFs binding site in the ovine gene [15] are conserved in the neotomodon promoter.

We then examined the nFSHR promoter for putative transcription factor binding sites. Although binding sites were predicted for a number of transcription factors, only few of them are conserved in the three rodent species analyzed (Fig. 2). The CRE-like sequence, which may be involved in the regulation of *FSHR* gene expression by cAMP [16, 17], is well conserved in the three rodent species examined. Noteworthy is a cluster of three SRY binding sites in the nFSHR promoter, which is absent in the mouse and rat counterparts. The presence of SRY binding sites within the nFSHR promoter is of potential interest given the fundamental role of SRY expression in Sertoli cell differentiation [18].

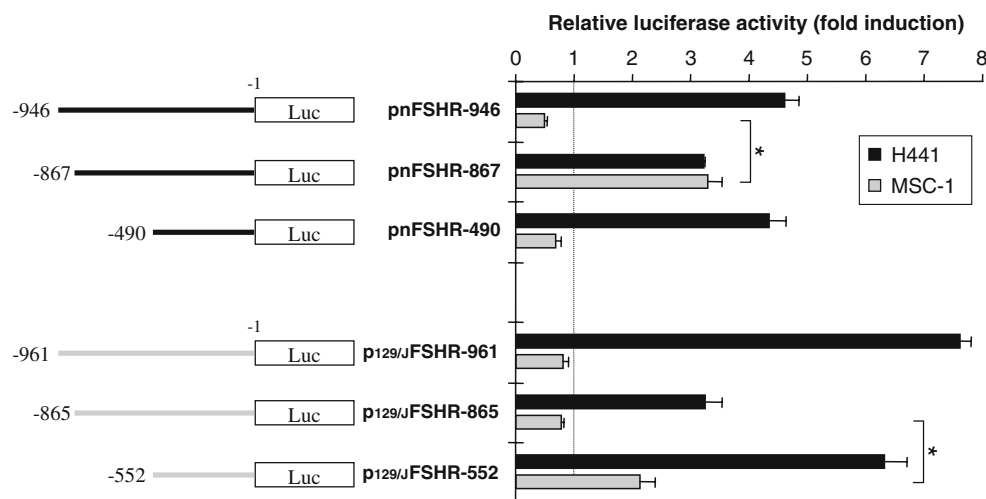
### Comparative analysis of the FSHR promoter activity

The activity of the nFSHR promoter in mouse Sertoli (MSC-1) and non-Sertoli (H441) cell lines was analyzed. The H441 cell line was isolated from a human lung adenocarcinoma and has been previously used to identify *cis*-acting elements and *trans*-acting factors implicated in the regulation of lung-specific genes [19, 20]. Luciferase reporters driven by various regions of the nFSHR promoter were transiently transfected into the above mentioned cell lines and their activities were compared to those of similar 129/J constructs (based upon homology). The results shown in Fig. 3 indicate that in MSC-1 cells the relative luciferase activity of p129/JFSHR-961 reporter was even

lower than that obtained with the vector alone. Removal of the first 96 bp (p129/JFSHR-865) resulted in no change in luciferase activity. Meanwhile, removal to  $-552$  bp increased the activity of the luciferase reporter to 2.7-fold the activity of p129/JFSHR-865 ( $P < 0.05$ ), suggesting that cell-specific inhibitory factors bind to the deleted region. Similar results were obtained with neotomodon constructs; however, the inhibitory region seemed to be located between  $-946$  and  $-868$  bp (see below). Unexpectedly, all luciferase-reporters were active in the H441 cell line, indicating that they are transcriptionally competent. In this cell line the p129/JFSHR-961 and  $-552$  constructs were  $\sim 60\%$  more active than their neotomodon counterparts, whereas the p129/JFSHR-865 and pnFSHR-867 constructs showed similar reporter activities.

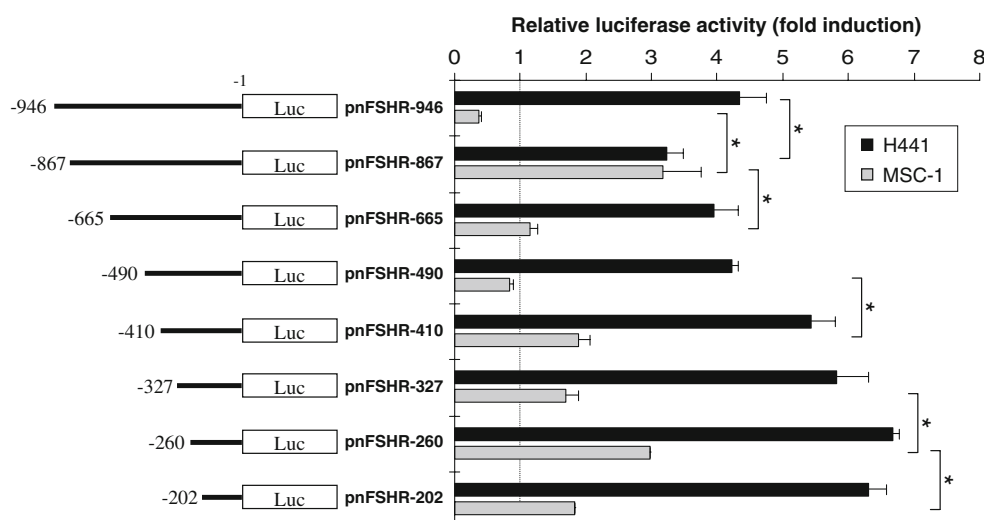
### Functional analysis of the nFSHR promoter

To further characterize the critical promoter sequence in the 5'-flanking region of the nFSHR, a series of deletion mutants were also transiently transfected into MSC-1 and H441 cells. In H441 cells, the 5'-flanking DNA fragment between  $-946$  and  $-1$  bp exhibited a 4.3-fold increase over the promoterless control plasmid, whereas in Sertoli cells (MSC-1) the activity was lower than that exhibited by the vector alone (Fig. 4). Deletion of the region located between  $-946$  and  $-867$  bp led to a decrease (25.4%,  $P < 0.05$ ) of promoter activity in H441 cells but to a significant ( $P < 0.05$ ) increase (8.4-fold the activity of pnFSHR-946) in MSC-1 cells, suggesting that interaction of Sertoli cell-specific proteins with *cis*-element(s) within



**Fig. 3** Transcriptional activity of the 5'-flanking regions of the nFSHR and 129/JFSHR gene. Schematic of the luciferase reporter constructs are shown on the left. Fragments cloned into a luciferase reporter vector were cotransfected with the pRL-TK plasmid (*Renilla* luciferase) into mouse Sertoli (MSC-1) and non-Sertoli (H441) cell lines and their relative activity (luciferase/*Renilla* luciferase) was

determined in cell lysates 48 h later. Relative luciferase activity is expressed as fold induction assuming that the activity of the promoterless plasmid pGL3B is 1. Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) from one representative experiment. Differences in transcriptional activity were calculated by the Student's *t*-test. \*  $P < 0.05$



**Fig. 4** Activity of the 5' deletions mutants of the *nFSHR* gene in different cell lines. The left side of the figure schematically shows the luciferase reporter constructs. Each construct was cotransfected with the pRL-TK plasmid (*Renilla* luciferase) into mouse Sertoli (MSC-1) and non-Sertoli (H441) cell lines and their relative activity (luciferase/*Renilla* luciferase) was determined in cell lysates 48 h later. The

relative luciferase activity is expressed as fold induction assuming that the activity of the promoterless plasmid pGL3B is 1. Values represent means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) from one representative experiment. Differences in transcriptional activity were calculated by the Student's *t*-test. \*  $P < 0.05$

this region probably repressed transcription of the *nFSHR* gene. Deletion to  $-665$  bp reduced (63.5%,  $P < 0.05$ ) luciferase activity in MSC-1 cells indicating that important positive transcription factor(s) interact with the  $-867/-665$  promoter region, while in H441 this deletion restored promoter activity. Deletion to  $-490$  bp further decreased promoter activity in MSC-1 cells, whereas in H441 cells no obvious change was detected. Further deletions of the promoter sequence to  $-410$ ,  $-327$ ,  $-260$ , and  $-202$  bp increased promoter activity in H441 cells to a maximum of 6.6-fold over the promoterless plasmid (Fig. 4, pnFSHR-260), whereas in MSC-1 cells the same genetic constructions identified two additional, less strong inhibitory regions at  $-490/-410$  and  $-327/-260$  bp, as well as a region at  $-260/-202$  bp involved in positive regulation. In general, shorter DNA constructs were more active than the longer constructs in both cell lines, which is in agreement with observations in FSHR promoters from other species [5, 13, 21].

## Discussion

Despite the major regulatory role of the FSHR on reproductive function in vertebrate species, the mechanisms underlying the cell-specific expression and regulation of this particular receptor in the gonads are poorly understood. In the present study, we isolated the 5'-flanking region of the *FSHR* gene from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*) and compared the identified sequence with

those previously described for other species. The *nFSHR* 5'-flanking region shares considerable sequence homology with those from other rodents (Fig. 2), followed by human and sheep. The neotomodon promoter contains some conserved regulatory elements, including that previously described as a putative estrogen responsive element (ERE) in the human and ovine *FSHR* gene [5, 8]. However, this putative *cis*-element failed to act as an ERE in the neotomodon promoter, which may be probably due to the lack of the third nucleotide between the palindromic sequence. Other conserved regulatory elements also include an E box, which binds upstream stimulatory factor 1 (USF1) and USF2 in vitro [12, 13, 21] and in vivo [22, 23] as well as a CRE-like sequence probably involved in cAMP mediated transcriptional regulation [16]. The neotomodon FSHR promoter also contains novel putative *cis*-acting elements for transcription factors of the HMG-box SRY/Sox family, which seem to be important in the positive transcriptional regulation of the *nFSHR* gene, since elimination of the region containing these putative SRY binding sites significantly reduced reporter activity. The high score to the SRY consensus matrix and the importance of the SRY transcription factor in determining Sertoli cell phenotype [18] additionally support its possible role on the transcriptional regulation of the *nFSHR* promoter.

Transient transfection experiments with several genetic constructs indicated that the *nFSHR* promoter was more effective in non-Sertoli (H441) than in Sertoli (MSC-1) cells. The transcriptional activity detected in H441 cells indicates that the promoter function of the 5'-flanking

region of the nFSHR is apparently less efficient in the MSC-1 Sertoli cell line, as disclosed by the low transcription levels detected in this latter cell type. In some instances, however, the promoter activity in MSC-1 cells was as active as in the non-Sertoli cell line H441 (Fig. 3, see pnFSHR-867) indicating that cell-specific inhibitory nuclear factor(s) rather than ubiquitous transcription factor(s) attenuated the FSHR promoter activity. This observation is in line with the low transcription levels observed in the Sertoli cell line 15P1 transiently transfected with the ovine *FSHR* gene promoter [21].

Comparison of nFSHR promoter activity with that from the 129/J unveiled remarkable similarities and some interesting differences in their transcription patterns. Although the 129/J FSHR promoter also showed preferential expression in non-Sertoli cells (H441), the transcriptional activity of two 129/J constructs (p129/JFSHR-961 and p129/JFSHR-552) were higher (~60%) than that of their corresponding neotomodon counterparts. These data indicate the existence of subtle differences in the mouse *cis*-acting elements that determine their higher activity, thus underlining the importance of species differences in the function of this particular promoter.

Transient transfection experiments with a series of deletion mutants allowed to identify more precisely several transcriptional regulatory regions in the nFSHR promoter. In MSC-1 cells, three regions involved in negative transcriptional regulation were identified at -946/-867, -490/-410, and -327/-260 bp; these regions may play an important role in determining low transcription levels in this particular cell line. Noteworthy is the region between -946 and -867 bp, which strongly impaired promoter activity. In fact, strong inhibitory regions in the *FSHR* gene promoter have also been detected in several gonadal cell lines [5, 13, 21, 24].

Collectively, these results strongly suggest that the MSC-1 cell line possesses cell-specific transcription factors that negatively regulate the transcription of the FSHR promoter. Determining these factors will contribute to unveil the positive transcriptional regulation of this particular receptor promoter, which until now has remained elusive.

## Materials and methods

### Animals

Young adult strain 129/J mice (*Mus musculus*) and volcano mice (*Neotomodon alstoni alstoni*) aged 5 months were obtained from the animal care facility of the Universidad Nacional Autónoma de México (México D.F., Mexico). Livers, obtained immediately after killing, were cut into small pieces and stored at -70°C until DNA preparation.

### Genomic DNA cloning

DNA was isolated from the liver of 129/J and neotomodon as described previously [25], and quantified by spectrophotometry at 260 nm. Cloning of the FSHR 5'-flanking regions was carried out by PCR using genomic DNA from each species as template. DNA was amplified using the forward (FSHRp-fw3) and reverse (FSHRp-rev1) oligonucleotides as primers, shown in Table 1. Reactions were subjected to 30 cycles (30 s at 94°C, 2 min at 52°C, and 3 min at 72°C), followed by a final extension cycle at 72°C for 10 min. The PCR reactions were analyzed by agarose gel electrophoresis and the DNA bands of ~1100 bp were excised, recovered (Gene Clean Kit, Bio 101, Carlsbad, CA, USA), and cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA) to obtain the recombinant plasmids designated as pnFSHR1.1 (neotomodon) and p129/JFSHR1.1 (mouse). The genomic DNA inserts from three different clones of each species were sequenced on both strands.

### Sequence analysis

The identity of the nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the *nFSHR* gene was confirmed with the BLAST program ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). The FSHR promoter regions from different species were aligned with ClustalW2 program [26] ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)), while the putative transcription binding sites were predicted with the TFSEARCH program [27] ([www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)).

### Reporter plasmids

The 5'-flanking region of the *nFSHR* gene spanning specific nucleotides was amplified by PCR using the pnFSHR1.1 plasmid as template. The neotomodon (n) specific primers used for PCR amplification are shown in Table 1. The same procedure was used to obtain the 129/J FSHR reporter plasmids [using the p129/JFSHR1.1 plasmid and the 129/J specific oligonucleotides shown in Table 1]. The PCR products were ligated into the pGEMT vector and transformed in the *E. coli* JM109 strain (Promega). The recombinant plasmids were digested with *Xho*I and *Nco*I, and the released fragment was inserted into the luciferase reporter vector pGL3-Basic (pGL3B) (Promega). Reporter plasmids were transformed in JM109 cells and purified by anion-exchange chromatography (Qiagen, Valencia, CA, USA). Plasmid DNAs were quantified by measuring the absorbance at 260 nm and their quality was verified by agarose gel electrophoresis. The orientation and fidelity of all constructs were confirmed by automated DNA sequencing.

**Table 1** Sequence of the oligonucleotides used in this study

Name	Sequence	Size (bp)	Relative position	Application	Restriction site added
FSHRp-fw3	5'-GCAGGTAATAAGTTGTAGACATGATCTTAGA-3'	31	(-881/-851) <sup>a</sup>	Genomic DNA cloning	
FSHRp-rev1	5'-GGAATCTCCGTCACCTTGCTGTCTTGGCAG-3'	30	(+122/+93) <sup>b</sup>	Genomic DNA cloning	
nFSHR-946	5'- <u>CTCGAGG</u> ATGTGTATGCTTTTTGTTG-3'	26	(-946/-927) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-867	5'- <u>CTCGAGG</u> AAAAATGCCACTGCAAATATC-3'	27	(-867/-847) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-665	5'- <u>CTCGAGC</u> AGCCATGCCTGAGGTCAC-3'	26	(-665/-646) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-490	5'- <u>CTCGAG</u> ATGTTTGTGGTCACAGG-3'	24	(-490/-473) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-410	5'- <u>CTCGAGG</u> ATGTGCATATGGATGTCC-3'	26	(-410/-391) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-327	5'- <u>CTCGAGT</u> GCAGAAAAATAATGTGAATTAC-3'	29	(-327/-305) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-260	5'- <u>CTCGAG</u> AGGAATAGAACTAAAGTCTTG-3'	28	(-260/-239) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-202	5'- <u>CTCGAG</u> ACTACTGACACACATTAATTTTAC-3'	30	(-202/-179) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
nFSHR-rev	5'- <u>CCATGG</u> tgGCTCATTTATCCATCCAC-3'*	26	(-1/-18) <sup>c</sup>	Reporter construct	<i>Nco</i> I
129/JFSHR-961	5'- <u>CTCGAGG</u> AGGTGTACGTTTTTAGTG-3'	25	(-961/-943) <sup>d</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
129/JFSHR-865	5'- <u>CTCGAG</u> AAAAATGCCACTGTTGCAAATAC-3'	29	(-865/-843) <sup>d</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
129/JFSHR-552	5'- <u>CTCGAG</u> ATGTTTATAACAGATAG-3'	24	(-552/-535) <sup>d</sup>	Reporter construct	<i>Xho</i> I
129/JFSHR-rev	5'- <u>CCATGG</u> tgGCTTATTTATCCATCCAC-3'*	26	(-1/-18) <sup>d</sup>	Reporter construct	<i>Nco</i> I

<sup>a</sup> Rat FSHR 5'-flanking region (Heckert et al. [6])

<sup>b</sup> Hamster FSHR cDNA (Zhang and Roy [11])

<sup>c</sup> Neotomonon FSHR 5'-flanking region (Fig. 1)

<sup>d</sup> 129/J FSHR 5'-flanking region (Fig. 2)

\* Nucleotides in lowercase letters were added to conform a Kozak consensus sequence. Restriction sites are *underlined*

## Cell culture, transfections, and luciferase assays

NCI-H441 [28] and MSC-1 [29] cells were cultured in RPMI 1640 and DMEM (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). The cell lines were cultured in the absence of antibiotics and maintained in a humidified incubator at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Thirty thousand cells per well of each cell line were plated in 48-well plates 18–24 h before transfection. Plasmid DNAs were transiently transfected using Effectene (Qiagen), following the instructions recommended by the manufacturer. Cells were cotransfected with the *Renilla* luciferase expression plasmid pRL-TK (Promega) to normalize for transfection efficiency. For each well, 150 ng of the reporter construct and 50 ng of pRL-TK were used. After a 48 h incubation period, cells were lysed and assayed for luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). pGL3B was used as background control. Three independent transfections were performed in triplicate.

## Statistical analysis

Differences in transcriptional activity were calculated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student's *t*-test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

**Acknowledgments** The authors thank Dr. James A. Dias (Wadsworth Center, Albany, NY) for kindly providing the MSC-1 cell line. We thank Mario Soriano from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for providing the rodent species used in this study. M. A. P. and A. A-M. are graduate students from the Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (Doctorado en Ciencias Biológicas), and the UNAM, respectively, supported by CONACyT scholarships. A.U-A. is recipient of a Research Career Development Award from the Fundación IMSS, Mexico. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) (grant 52455-M), and the Fondo para el Fomento de la Investigación (FOFOI) IMSS (grant 2005/1/I/063), México.

## References

1. A. Ulloa-Aguirre, T. Zarinan, A.M. Pasapera, P. Casas-Gonzalez, J.A. Dias, *Endocrine* **32**, 251–263 (2007)
2. M. Simoni, J. Gromoll, E. Nieschlag, *Endocr. Rev.* **18**, 739–773 (1997)
3. A. Ulloa-Aguirre, A. Uribe, T. Zarinan, I. Bustos-Jaimes, M.A. Perez-Solis, J.A. Dias, *Mol. Cell. Endocrinol.* **260–262**, 153–162 (2007)
4. A. Uribe, T. Zarinan, M.A. Perez-Solis, R. Gutierrez-Sagal, E. Jardon-Valadez, A. Pineiro, J.A. Dias, A. Ulloa-Aguirre, *Biol. Reprod.* **78**, 869–882 (2008)
5. J. Gromoll, B. Dankbar, T. Gudermann, *Mol. Cell. Endocrinol.* **102**, 93–102 (1994)
6. L.L. Heckert, I.J. Daley, M.D. Griswold, *Mol. Endocrinol.* **6**, 70–80 (1992)
7. I.T. Huhtaniemi, V. Eskola, P. Pakarinen, T. Matikainen, R. Sprengel, *Mol. Cell. Endocrinol.* **88**, 55–66 (1992)

8. M.R. Sairam, V.S. Subbarayan, *Mol. Reprod. Dev.* **48**, 480–487 (1997)
9. B.P. Hermann, L.L. Heckert, *Mol. Cell. Endocrinol.* **260–262**, 100–108 (2007)
10. W.B. Davis, L.A. Follansbee, *J. Mammal.* **26**, 401–441 (1945)
11. Y.M. Zhang, S.K. Roy, *Biol. Reprod.* **70**, 1580–1588 (2004)
12. T.L. Goetz, T.L. Lloyd, M.D. Griswold, *J. Biol. Chem.* **271**, 33317–33324 (1996)
13. L.L. Heckert, M.A. Daggett, J. Chen, *Mol. Endocrinol.* **12**, 1499–1512 (1998)
14. J.S. Kim, M.D. Griswold, *J. Androl.* **22**, 629–639 (2001)
15. W. Xing, N. Danilovich, M.R. Sairam, *Biol. Reprod.* **66**, 1656–1666 (2002)
16. J. Levallet, P. Koskimies, N. Rahman, I. Huhtaniemi, *Mol. Endocrinol.* **15**, 80–92 (2001)
17. A.P. Themmen, L.J. Blok, M. Post, W.M. Baarends, J.W. Hoogerbrugge, M. Parmentier, G. Vassart, J.A. Grootegoed, *Mol. Cell. Endocrinol.* **78**, R7–R13 (1991)
18. L. DiNapoli, B. Capel, *Mol. Endocrinol.* **22**, 1–9 (2008)
19. A. Acosta, T. Zarinan, H. Macias, A.M. Pasapera, M.A. Perez-Solis, A. Olivares, A. Ulloa-Aguirre, R. Gutierrez-Sagal, *Arch. Biochem. Biophys.* **459**, 33–39 (2007)
20. B.R. Stripp, P.L. Sawaya, D.S. Luse, K.A. Wikenheiser, S.E. Wert, J.A. Huffman, D.L. Lattier, G. Singh, S.L. Katyal, J.A. Whitsett, *J. Biol. Chem.* **267**, 14703–14712 (1992)
21. W. Xing, M.R. Sairam, *Biol. Reprod.* **64**, 579–589 (2001)
22. L.L. Heckert, M. Sawadogo, M.A. Daggett, J.K. Chen, *Mol. Endocrinol.* **14**, 1836–1848 (2000)
23. B.P. Hermann, K. Hornbaker, D.A. Rice, M. Sawadogo, L.L. Heckert, *Endocrinology* **149**, 5297–5306 (2008)
24. L.T. Putowski, W.J. Schillings, C.M. Lee, E.P. Reddy, J.A. Jankowicki, *Gynecol. Endocrinol.* **19**, 9–17 (2004)
25. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (eds.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989)
26. M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007)
27. T. Heinemeyer, E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A.E. Kel, O.V. Kel, E.V. Ignatieva, E.A. Ananko, O.A. Podkolodnaya, F.A. Kolpakov, N.L. Podkolodny, N.A. Kolchanov, *Nucleic Acids Res.* **26**, 362–367 (1998)
28. M. Brower, D.N. Carney, H.K. Oie, A.F. Gazdar, J.D. Minna, *Cancer Res.* **46**, 798–806 (1986)
29. J.J. Peschon, R.R. Behringer, R.L. Cate, K.A. Harwood, R.L. Idzerda, R.L. Brinster, R.D. Palmiter, *Mol. Endocrinol.* **6**, 1403–1411 (1992)