



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**EFFECTO DE LOS FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN SRY Y CREB EN LA
REGULACIÓN DEL PROMOTOR *CATSPER 1*
DE HUMANO**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental**

P R E S E N T A

Biol. Exp. Adriana Hernández Reyes

Codirección:

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

Dr. Edmundo Bonilla González

Asesoría:

Dr. Javier Hernández Sánchez



México D.F., 2012.

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020, el número de becario otorgado para la elaboración de este proyecto fue 233025” .

“El presente proyecto fue realizado con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de la convocatoria de Ciencia Básica 2007 con numero 79428 y del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la convocatoria a Protocolos de Investigación, 2008 (FIS/IMSS/PROT/549)”

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“EFECTO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SRY Y CREB EN LA REGULACIÓN DEL PROMOTOR CATSPER 1 DE HUMANO”, que presentó

ADRIANA HERNÁNDEZ REYES

El día 07 de Diciembre del año 2012.

SINODALES:

Presidente



Dr. Humberto González Márquez

Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Secretario



Dr. Javier Hernández Sánchez

Depto. de Genética y Biología Molecular,
CINVESTAV, Zacatenco.

Vocal 1



Dra. Irma Jiménez Morales

Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Vocal 2



M. en C. Minerva Mata Rocha

Depto. de Genética y Biología Molecular,
CINVESTAV, Zacatenco.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

U.I.M en Enfermedades Metabólicas C.M.N Siglo XXI, IMSS.

CODIRECTOR

Dr. Edmundo Bonilla González

Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa.

ASESOR

Dr. Javier Hernández Sánchez

Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV Zacatenco.

DEDICATORIA

Porque lo hicimos juntas...

Mi pequeña Fernanda.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas ya sea leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimos, acompañándome en los momentos de estrés y en los momentos de felicidad.

Agradezco a la Dra. Norma Oviedo por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. A la M. en C. Minerva Mata por los consejos, el apoyo y el ánimo que me brindó. Al Dr. Edmundo Bonilla por su participación en este proyecto. Al Dr. Javier Hernández por su asesoría, tiempo y dedicación. Al Dr. Javier Guarneros por permitirme la estancia en su laboratorio.

A la Dra. Elsa de la Chesnaye por su atenta lectura de este trabajo. A la Dra. Irma Jiménez por sus observaciones y, por último pero no menos importante, al Dr. Humberto González por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.

Gracias también a mis queridos compañeros de laboratorio, que me apoyaron y que permitieron que los días de estrés fueran más ligeros: Libo, Anita, Ángeles, Salma gracias.

A mi querida “comadrita” Yuritzí quién siempre estuvo a mi lado trabajando a marchas forzadas.

A mi madre Carolina y a mis herman@s: Marce, Liz y Jessi, quienes cuidaron de mi pequeña hija para poder realizar y culminar satisfactoriamente este importante proyecto. A mi padre Marce, que siempre estuvo atento para saber cómo iba mi proceso.

Y especialmente a mi esposo Ale y mi pequeña hija Fer quienes me acompañaron en esta aventura que significó la maestría y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos.

Gracias a todos.

RESUMEN

Tesis de Maestría en Biología Experimental, Adriana Hernández Reyes, División de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

CATSPER 1 es un gen que descodifica para una de las proteínas del canal CatSper permeable a calcio que es indispensable para la movilidad flagelar del espermatozoide, y su expresión es exclusiva de células germinales masculinas. Es relevante analizar los factores de transcripción (FT) que regulan al promotor del gen *CATSPER 1* de humano, ya que éste es importante para la fertilidad y la anticoncepción masculina. Por lo que si el gen *CATSPER 1* se expresa durante la diferenciación del espermatozoide, se espera que FT como CREB y SRY presentes en la espermatogénesis regulen su expresión. El objetivo es la caracterización molecular de la actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1* y la participación de los FT SRY y CREB en su regulación. Se caracterizó la actividad transcripcional del promotor mediante la delección secuencial del extremo 5', transfección celular en HEK 293 y medición por quimioluminiscencia del gen reportero de luciferasa. Sobreexpresión del FT SRY y su efecto en el promotor. Evaluación de la unión de FT a sitios del promotor por EMSA. La delección en el promotor de los sitios SRY y CREB, lejanos del inicio de la transcripción, incrementa la actividad transcripcional, lo que sugiere que los FT actúan como represores en estos sitios. Por otra parte la sobreexpresión de SRY produce el incremento de la actividad transcripcional en sitios cercanos al inicio de la transcripción. Se sigue determinando la unión de SRY y CREB en sitios específicos del promotor. SRY y CREB son reguladores negativos del gen *CATSPER 1* de humano.

ABSTRACT

CATSPER 1 gene encodes for a protein- forming CatSper channel, a cationic channel that allows calcium entry, essential for motility of sperm flagellum, whose expression is exclusive of male germ cells. The analysis of transcription factors that regulate human *CATSPER 1* promoter is relevant for understanding male fertility and contraception. If the *CATSPER 1* gene is expressed during sperm differentiation, might be that transcription factors SRY and CREB regulate its transcription. The aim is the *CATSPER 1* promoter characterization based on its basal transcriptional activity and the analysis of SRY and CREB participation on its regulation. *CATSPER 1* promoter was assessed throughout sequential deletions on 5´end, HEK 293 cell transfection and luciferase assays to determine transcriptional activity. In the same manner, the effect of SRY overexpression on *CATSPER 1* promoter transcriptional activity was analyzed. In addition, the binding of transcriptional factors to specific sites in the promoter was tested by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). The deletion of distant SRY and CREB binding sites increases transcriptional activity, suggesting that such transcriptional factors are repressors in these sites. On the other hand, the overexpression of SRY increases transcriptional activity on proximal binding sites to the Transcription Start Site (TSS). The specific interaction of SRY and CREB with *CATSPER 1* promoter is still under study due to its complexity. SRY and CREB participate as repressors in the transcriptional regulation of human *CATSPER 1* promoter.

ÍNDICE

MIEMBROS DEL JURADO	iii
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Fisiología del Espermatozoide, Maduración y Fertilización	1
1.2 Espermatogénesis.....	4
1.3 Capacitación Espermática y Reacción Acrosomal	7
1.4 Movilidad Espermática	8
1.5 CATSPER como proteína determinante de la movilidad espermática	9
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>CATSPER</i> 1 de humano.....	13
2.2 Factores de Transcripción	155
2.3 Identificación del sitio de inicio de la transcripción	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVO GENERAL	20
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21

8. METODOLOGÍA.....	22
8.1 Análisis de la expresión del promotor <i>CATSPER</i> 1 humano.....	22
8.2 Material biológico: bacterias, plásmidos y líneas celulares	24
8.3 Deleción secuencial de la región promotora	25
8.4 Amplificación de las construcciones (deleciones) con el promotor <i>CATSPER</i> 1 en un sistema bacteriano	30
8.5 Extracción de plásmidos a gran escala (Protocolo Qiagen)	30
8.6 Cultivo de células	31
8.7 Transfección de la línea celular HEK 293 con las construcciones (deleciones) del promotor del gen <i>CATSPER</i> 1	32
8.8 Experimentos de Co-transfección del promotor <i>CATSPER</i> 1 con el factor transcripcional SRY.....	33
8.9 Análisis de la expresión del promotor del gen <i>CATSPER</i> 1 mediante ensayos de luciferasa.....	34
8.10 Ensayos de Retardamiento Electroforético (EMSA) entre el promotor del gen <i>CATSPER</i> 1 y el factor transcripcional SRY	36
8.11 Análisis estadístico	411
9. RESULTADOS.....	42
9.1 Eliminación secuencial de los sitios de unión a FT en la región promotora del gen <i>CATSPER</i> 1	42
9.2 Actividad transcripcional del promotor <i>CATSPER</i> 1 y sus deleciones en la línea celular HEK 293.....	51
9.3 Efecto de la sobreexpresión del factor transcripcional SRY en la actividad transcripcional del promotor <i>CATSPER</i> 1	555
9.4 Análisis de la interacción <i>in vitro</i> de los sitios de unión a SRY del promotor <i>CATSPER</i> 1 y el factor de transcripción SRY	61
10. DISCUSIÓN	688

10.1	Identificación de regiones importantes en la construcción pCAT Δ BASAL para dar inicio a la transcripción del gen <i>CATSPER 1</i>	711
10.2	La delección secuencial del promotor favorece la actividad transcripcional de <i>CATSPER 1</i>	72
10.3	La sobreexpresión del factor transcripcional SRY favorece la actividad transcripcional del gen <i>CATSPER 1</i>	76
10.4	Interacción del factor transcripcional SRY y el promotor del gen <i>CATSPER 1</i> 777	
11.	CONCLUSIÓN	79
12.	BIBLIOGRAFÍA	80
13.	ANEXOS	90

1. INTRODUCCIÓN

El estudio del origen, diferenciación y función de las células germinales es relevante para la comprensión de la fecundación y reproducción en animales. Uno de los principales participantes es el espermatozoide, el cual ha sido estudiado ampliamente para un mejor conocimiento de su fisiología que a continuación se describe. Asimismo, se ha demostrado que en el espermatozoide se encuentra la proteína de canal *CATSPER 1*, el gen *CATSPER 1* es específico de testículo y determinante de la fertilidad masculina, pese a este descubrimiento se desconoce su regulación a nivel génico. Es por ello que este trabajo se enfocará a descubrir los mecanismos de regulación implicados en la expresión de este gen tan importante para la fertilidad masculina.

1.1 Fisiología del Espermatozoide, Maduración y Fertilización

Los espermatozoides son células móviles altamente especializadas, compuestas por "cabeza" y "flagelo", su finalidad es fertilizar el ovocito. La "cabeza" contiene un núcleo haploide altamente compactado y el acrosoma, una vesícula secretora especializada que contiene enzimas hidrolíticas, la "cola" es un largo flagelo que se divide en tres partes; pieza media, pieza principal y pieza final de acuerdo con su composición intratubular (Fig. 1). El flagelo es el aparato locomotor que genera el movimiento celular y la penetración del espermatozoide en el ovocito. La movilidad del espermatozoide se genera gracias a una estructura organizada en microtúbulos llamada axonema (Garner y Hafez, 2002).

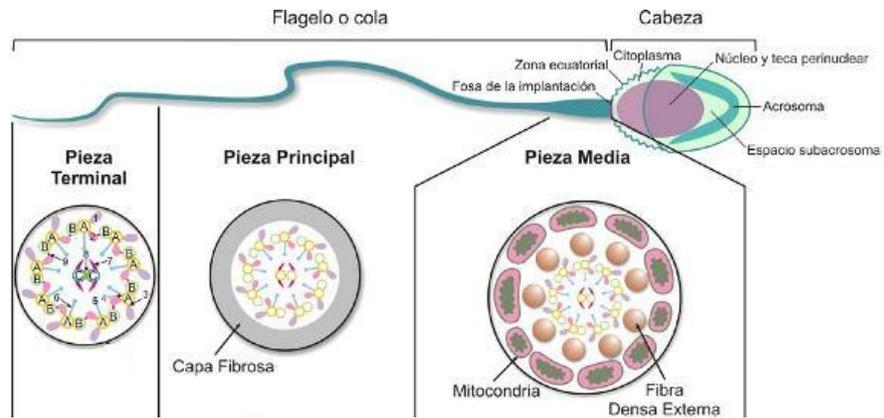


Fig. 1. Esquema de la estructura de un espermatozoide. El espermatozoide se compone principalmente de dos partes: una cabeza (derecha) y su flagelo (izquierda). En la cabeza está el acrosoma y el núcleo, el cual contiene la cromatina (el DNA es haploide y muy compacto). El flagelo se divide en las piezas media, principal y terminal. Cortes transversales del flagelo muestran su composición en las diferentes piezas.

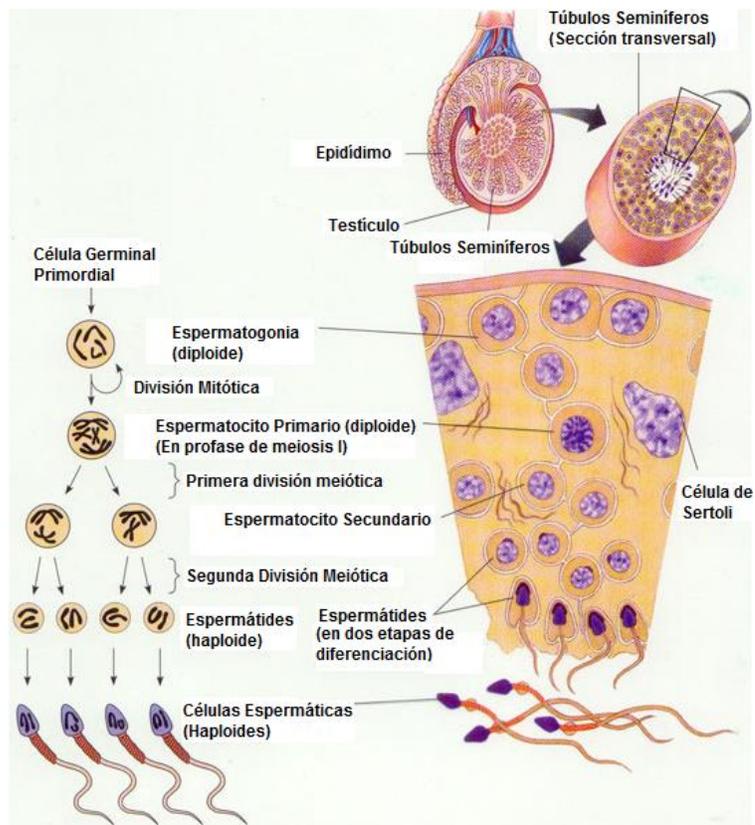


Fig. 2. A la derecha se muestra el corte transversal de los túbulos seminíferos del testículo y a la izquierda un esquema de la espermatogénesis. En el corte del túbulo seminífero se observan los

diferentes estados de diferenciación de las células espermatogénicas. Desde la región basal hacia el haz del túbulo se encuentran: espermatogonias (células diploides), espermatocitos primarios (células diploides arrestados en profase de la meiosis I y donde se experimenta la recombinación genética), espermatocitos secundarios (células haploides), células de Sertoli, espermatidas (diferentes etapas de diferenciación) y espermatozoides (morfológicamente diferenciados). Del lado izquierdo se muestra el proceso de espermatogénesis a partir de una célula germinal primordial (espermatogonia) que experimenta divisiones mitóticas para formar espermatocitos primarios, estos a su vez, por divisiones meióticas formarán espermatocitos secundarios y finalmente espermatidas haploides, las cuales pasarán por el proceso denominado espermiogénesis para adquirir la morfología de un espermatozoide maduro.

Los espermatozoides se producen continuamente en los túbulos seminíferos del epidídimo dentro del testículo (gónada) mediante un proceso permanente de división mitótica de las células germinales o espermatogonias. El proceso de división meiótica, denominado espermatogénesis, está controlado hormonalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatocitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y están en comunicación con la célula nodriza o de Sertoli; estas últimas inducen el proceso denominado espermiogénesis que convierte las espermatidas en espermatozoides (Fig. 2). Una vez formados dentro de los túbulos seminíferos, los espermatozoides inmóviles están libres en el fluido plasmático y son transportados al epidídimo. En humanos, este tránsito de espermatozoides a través del epidídimo toma 2-6 días. Durante este período, los espermatozoides experimentan una serie de cambios esenciales en la maduración para tener la habilidad de nadar y fertilizar el ovocito. En la maduración, los espermatozoides son almacenados en el epidídimo caudal hasta su eyaculación, en donde son expulsados junto con fluido de secreciones alcalinas de las glándulas accesorias (Zhang y Gopalakrishnan, 2005).

1.2 Espermatogénesis

El proceso de espermatogénesis se caracteriza por la transformación de una célula troncal diploide no diferenciada en un espermatozoide haploide altamente diferenciado (Fig. 3). El mecanismo especializado para el control del programa de diferenciación de la espermatogénesis en mamíferos incluye factores de transcripción constitutivos y la expresión de activadores transcripcionales únicos de testículo. La activación transcripcional de los genes que participan en la espermatogénesis, ocurre por la regulación génica, dirigida por histonas, factores de transcripción y el complejo de multisubunidades que permiten la transcripción basal al interactuar con los promotores y la cromatina. La transcripción en las células germinales durante la espermatogénesis tiene una regulación programada que corresponde a los eventos de diferenciación por los que se generan las células espermatogonias, espermatocitos y espermatidas haploides hasta el espermatozoide (Sassone-Corsi 2002). El arresto de la transcripción en la espermiogénesis coincide con cambios en la adquisición de la maquinaria transcripcional y compactación de la cromatina por las protaminas durante la transición de espermátidas redondas a alargadas. En el testículo, la expresión de genes específicos se debe en gran parte al factor de transcripción CREM (Modulador Elemento Responsivo a cAMP), el cual tiene una estructura y función génica conservada en ratón y humano (Masquillier *et al.*, 1993).

La diferenciación de las células germinales en espermatozoides ocurre en el epitelio de los túbulos seminíferos y depende de la comunicación del sistema paracrino y las células de Sertoli (Skinner *et al.*, 1991). La testosterona secretada por las células de Leyding bajo la influencia de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), estas últimas secretadas por la pituitaria, actúa sobre las células de Sertoli, estimulando la transcripción de genes y la secreción de péptidos que promueven la diferenciación de las células germinales (Griswold 1998).

En el ratón, la espermatogénesis comienza en la región basal del túbulo con 9-11 divisiones mitóticas de la espermatogonia diploide, generando células con tres

posibles destinos. Una pequeña población de células espermatogoniales queda como parte de la población de células troncales, algunas experimentan apoptosis y más de la mitad continúa su diferenciación hacia espermatozoides maduros (Rooij 2001). Este periodo de proliferación y diferenciación espermatogonial es seguido por la profase I de la meiosis, donde la espermatogonia madura tipo B experimenta divisiones hasta llegar a la etapa de preleptoteno del espermatozocito. Los espermatozocitos tempranos experimentan la fase S (síntesis) del ciclo celular, generando espermatozocitos diploides en la etapa de leptoteno, lo que marca el comienzo de la profase meiótica. En las células en zigoteno, se alinean los pares de cromosomas homólogos y se forma el complejo sinaptonemal (Parra *et al.*, 2003). La sinapsis se completa con la etapa del paquiteno, permitiendo el entrecruzamiento genético en los sitios del complejo sinaptonemal conocido como nódulos de recombinación (Carpenter 1987). En la etapa más larga del espermatozocito, el diploteno, se completa la meiosis I del espermatozocito; el complejo sinaptonemal se desintegra, los cromosomas bivalentes se alinean sobre la placa de la metafase y las cromátidas hermanas se disocian en dos células hijas. La segunda división meiótica del espermatozocito secundario produce espermátidas haploides. Algunos genes que son esenciales para la meiosis en mamíferos incluyen la proteína 3 del complejo sinaptonemal (SCP3), las cinasas dependientes de ciclinas (CDK-2), entre otras (Rosenberg *et al.*, 1995, Yuan *et al.*, 2000, Guardavaccaro *et al.*, 2003, Ortega *et al.*, 2003). El desarrollo de la fase post-meiótica, la espermiogénesis involucra la diferenciación de espermátidas a espermatozoides. Esta fase es un proceso notable ya que una célula germinal experimenta una enorme transformación morfogénica que incluye la compactación de la cromatina, la eliminación del citoplasma y la formación del acrosoma y del flagelo (Wouters-Tyrou *et al.*, 1998).

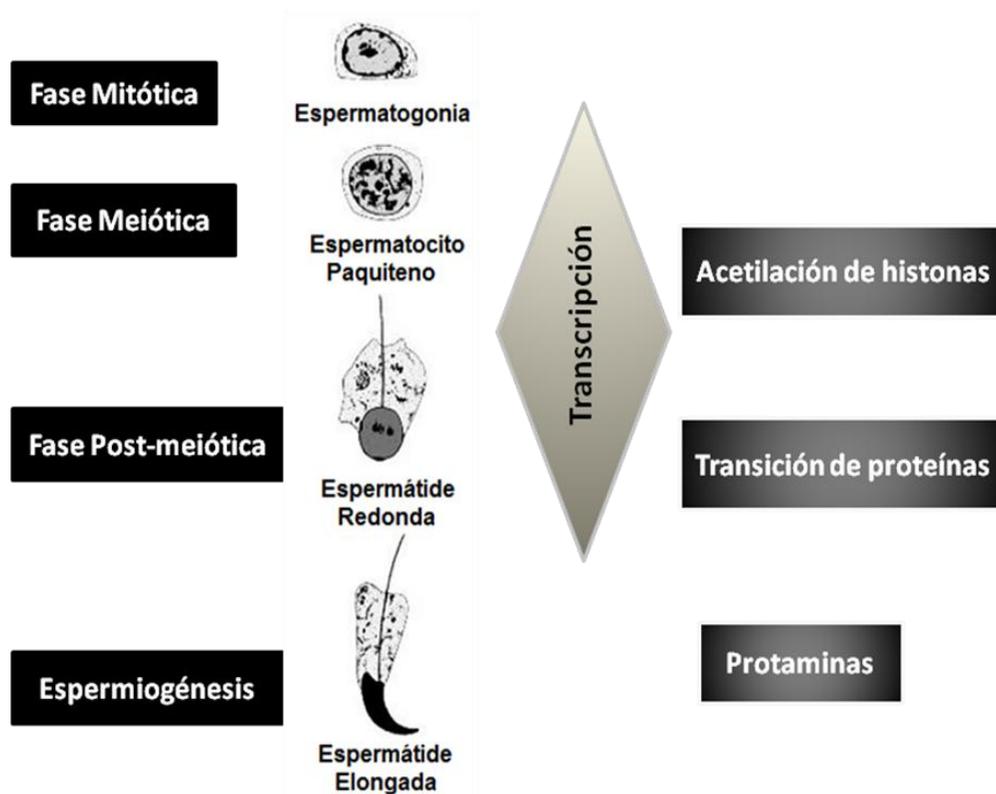


Fig. 3. La espermatogénesis sigue un cuidadoso programa de diferenciación orquestado que depende de la regulación transcripcional. La transcripción inicia en la espermatogonia para su mitosis. Las células meióticas tienen un alto nivel de transcripción que es promovida por la acetilación de histonas, haciendo al DNA accesible. El alto nivel de transcripción en células meióticas se requiere para la condensación de los cromosomas, los mecanismos de recombinación y de sinapsis. En espermátidas post-meióticas hay una segunda ronda de acetilación de histonas y transcripción, seguido por el reemplazamiento secuencial de histonas por protaminas para el empaquetamiento del DNA. Esta arquitectura de cromatina alterada conduce al arresto de la transcripción y diferenciación en espermátidas elongadas (Modificada de Kimmins *et al.*, 2004).

1.3 Capacitación Espermática y Reacción Acrosomal

En los mamíferos, los espermatozoides maduros se diferencian morfológicamente fuera del testículo, sin embargo son incapaces de fertilizar al ovocito inmediatamente después de la eyaculación, ya que requieren un período de incubación en el tracto reproductor femenino para adquirir la habilidad de fertilización. Durante este proceso, el espermatozoide presenta una serie de transformaciones bioquímicas, conocidas como capacitación, en la cual hay cambios en la composición y fluidez de la membrana plasmática, en las concentraciones citosólicas de diversos iones (K^+ y Ca^{2+}), cambios metabólicos, así como un ligero aumento del pH intracelular (pH_i) (Arnoult *et al.*, 1999). El proceso de capacitación espermática se induce por la elevación de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) y bicarbonato (HCO_3^-), lo que resulta en la activación de adenilato ciclasa soluble (ACs), elevación de adenosin mono fosfato cíclico (AMPc) y fosforilación de proteínas específicas. Actualmente, se ha postulado que la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación hace que los canales iónicos específicos para Ca^{2+} transiten de un estado refractario a un estado disponible para ser abiertos en el momento del contacto de los espermatozoides con la zona pelúcida (ZP) del óvulo; la activación de estos canales promueven la reacción acrosomal (RA) (Arnoult *et al.*, 1999).

La RA involucra exocitosis del contenido de la vesícula acrosomal en la cabeza del espermatozoide. Este proceso permite, al espermatozoide maduro y capacitado, penetrar las capas externas del óvulo y fecundarlo (Wassarman *et al.*, 2001). La ZP es una gruesa capa de glucoproteínas extracelulares que rodea al ovocito, la glicoproteína ZP3 es el principal mediador de la RA en los mamíferos. La presencia de Ca^{2+} externo es un requisito indispensable para que ocurra la RA, asimismo, el incremento en la concentración de Ca^{2+} es un paso esencial en el señalamiento intracelular desencadenado por la ZP3 que conduce al desarrollo de la RA (Yanagimachi, 1994). En los mamíferos se han propuesto por lo menos dos tipos diferentes de canales de Ca^{2+} que están involucrados en la RA, el primero de ellos es necesario para una entrada de Ca^{2+} rápida y transitoria que ocurre en milisegundos y

el segundo que mantiene una entrada sostenida de Ca^{2+} mediada por SOCs (Canales Capacitativos) que se requiere para alcanzar altas concentraciones intracelulares, es entonces cuando se desarrolla la RA (O'Toole *et al.*, 2000; Arnoult *et al.*, 1996).

1.4 Movilidad Espermática

Los canales iónicos son críticos para generar la movilidad flagelar en el espermatozoide. La activación de la movilidad espermática ocurre debido a la reducción de la concentración de potasio extracelular (K^+_e). Por su parte, el Ca^{2+} también tiene un papel importante ya que los cambios en la concentración de Ca^{2+}_i influyen en la movilidad espermática. La mayor parte de los espermatozoides en el testículo se encuentran sin movimiento y sólo un pequeño número muestra un movimiento no progresivo de baja frecuencia. Para alcanzar el oviducto del tracto reproductor femenino, el espermatozoide necesita adquirir movilidad progresiva. Los espermatozoides son liberados hacia el epidídimo y durante su trayecto hacia la cauda proximal adquieren la capacidad de movimiento progresivo y su aptitud para la fecundación, su movimiento es lento pero, al ser liberados al líquido seminal, su movilidad se activa. En mamíferos, los espermatozoides muestran dos tipos de movilidad: la movilidad activada que se observa en los espermatozoides recién eyaculados, y la movilidad hiperactivada, que es la que presentan los espermatozoides que alcanzan el oviducto (Ho y Suárez, 2001).

1.5 CATSPER como proteína determinante de la movilidad espermática

Estudios recientes han detectado un gran repertorio de canales permeables a Ca^{2+} en el espermatozoide de mamíferos, los cuales responden a diferentes estímulos y presentan una función celular diferente. Los cambios en la concentración de Ca^{2+}_i se deben a la activación de canales asociados a diferentes aspectos de la función espermática de mamíferos tales como movilidad espermática, capacitación y RA.

Entre los distintos canales de calcio presentes en el espermatozoide, se ha detectado la expresión de genes específicos de testículo, que codifican para los Canales Catiónicos del Espermatozoide (CATSPER por sus siglas en inglés Cation Channel of Sperm), que son esenciales para la hiperactivación del flagelo y los cuales fueron descubiertos *in silico* debido a sus características moleculares similares a canales iónicos (Fig. 4).

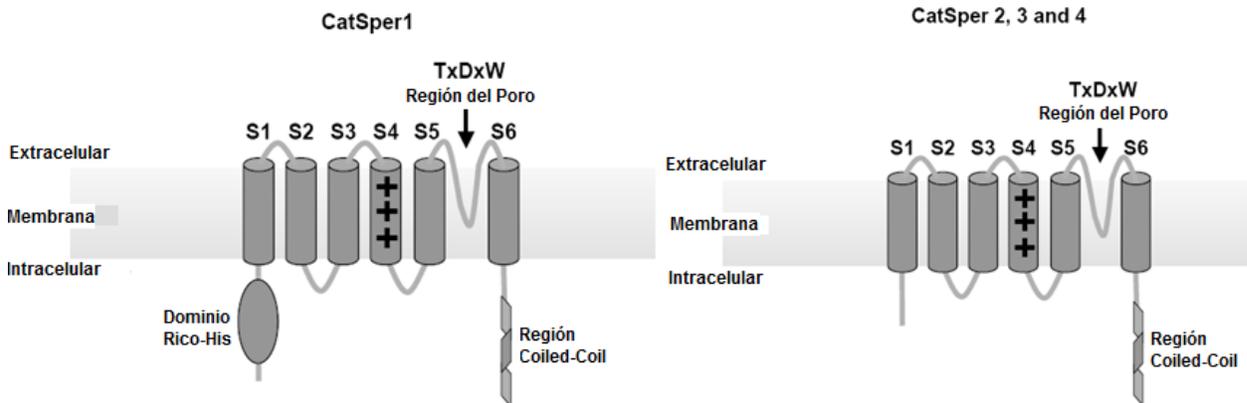


Fig. 4. Topología de los canales CATSPER. CATSPER 1 presenta un dominio rico en residuos de histidinas en el N-terminal, este dominio podría sensor el pH_i durante la capacitación para incrementar la actividad del canal, la entrada de calcio y la movilidad espermática. CATSPER 2, 3 y 4 carecen de este dominio (Modificada de Lobley *et al.*, 2003).

Los genes *CATSPER* (1-4) codifican para un dominio único de seis regiones transmembranales como los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v). Sin embargo, existen evidencias que indican que la región del poro y su homología es más parecida a los dominios repetidos de canales Ca_v dependientes de voltaje. En

ratón, el gen de *CATSPER 1* se localiza en el cromosoma 19 A y en el humano se encuentra en el cromosoma 11, ambos contienen 12 exones. Su expresión es exclusiva de testículo, en ningún otro tejido se expresa. El gen *CATSPER 1* predice una estructura primaria de 686 aminoácidos (aa) en ratón y de 780 aa en el humano. En la región del poro se encuentran cuatro repetidos de residuos de glutamina/aspartato que dan selectividad a Ca^{2+} en el canal. La especificidad del ión está determinada por la región consenso del poro [T/S] x [D/E] x W en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. En *CATSPER* destaca la presencia de un motivo similar conservado TxDxW sugiriendo que el canal iónico *CATSPER* puede ser selectivo a iones Ca^{2+} . Los aa cargados positivamente (lisina/arginina) están interpuestos cada tres aa en la región transmembranal S4 para sensar el voltaje y activar el canal, entre la región S5 y S6 se encuentra una región hidrofóbica conservada. *CATSPER 1* difiere de los demás *CATSPER* (2-4) por presentar un dominio rico en residuos de histidina en el N-terminal (49/250aa), el cual podría funcionar como sensor del pH; durante la capacitación para la activación del canal. Un cambio sutil en el pH_i alcalino induce la entrada de calcio extracelular a través de los canales *CATSPER* al flagelo lo que incrementa la movilidad espermática (Ren *et al.*, 2001; Lobley *et al.*, 2003).

La función fundamental de *CATSPER* está asociada con el aumento del Ca^{2+} intraflagelar y la hiperactivación del espermatozoide (Carlson *et al.*, 2003). Ensayos de electrofisiología han mostrado que *CATSPER* es un canal activo que es permeable al Ca^{2+} , sensible a voltaje y a ligeros cambios en el pH intracelular (Kirichok *et al.*, 2006).

De acuerdo con los estudios realizados por Ren y colaboradores en el 2001, *CATSPER* se inmunolocaliza predominantemente en la pieza principal del flagelo de espermatozoides de ratón y este canal se requiere para la fertilidad masculina en roedores. Asimismo, *CATSPER 1* se inmunoloca también en la pieza principal del espermatozoide humano (Fig. 5) (Hernández *et al.*, 2009). El RNAm y la proteína

están presentes únicamente en testículo, y la falta de organelos intracelulares en la pieza principal sugieren que CATSPER no puede ser un canal intracelular.

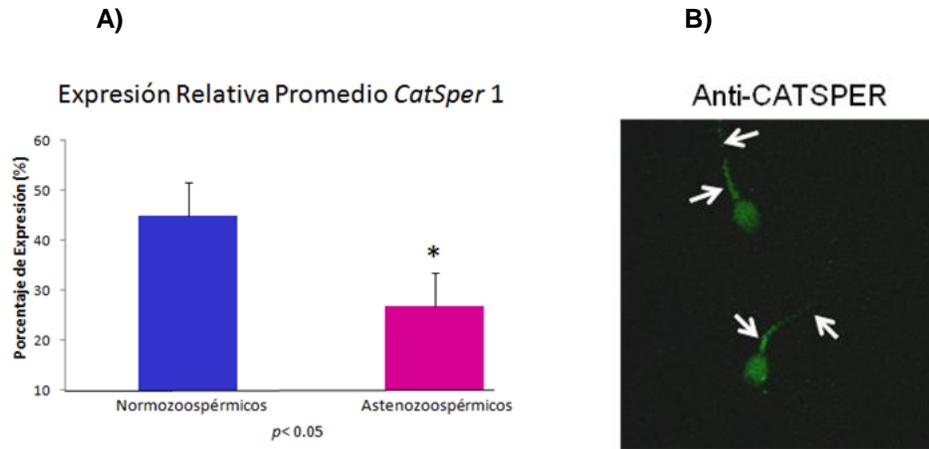


Fig. 5. (A) Expresión del RNAm de *CATSPER 1* en individuos normozoospermicos y pacientes astenozoospermicos. (B) Localización de la proteína *CATSPER 1* en la pieza principal del flagelo del espermatozoide (modificado de Hernández A., 2009).

Por otra parte, espermatozoides de ratones *CatSper*^{-/-} son poco móviles e incapaces de fertilizar al ovocito con una zona pelúcida intacta, sin embargo, pueden fertilizarlo cuando esta matriz extracelular se remueve. Por tanto, CATSPER es una proteína de canal requerida para la movilidad espermática hiperactivada, necesaria para la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida y lograr la fecundación (Fig. 6).

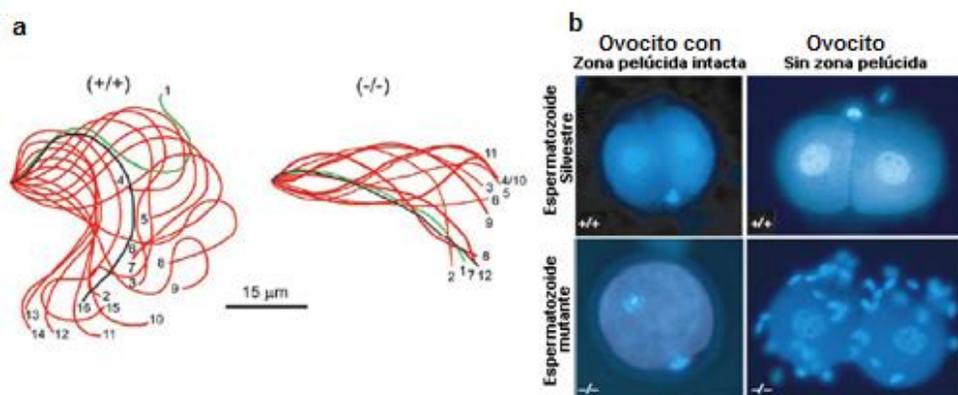


Fig. 6. Defectos en la movilidad espermática y en la fertilización *in vitro* de ratones *CatSper*^{-/-}. a, Trazos del bateamiento flagelar para *CatSper*^{+/+} y *CatSper*^{-/-}. b, Ovocito con zona pelúcida y sin zona pelúcida en donde se incubó a espermatozoides con *CatSper*^{+/+} y *CatSper*^{-/-}. Espermatozoides con

CatSper^{-/-} son pobremente inmóviles e incapaces de fertilizar el ovocito con una zona pelúcida intacta, pero pueden fertilizar al ovocito cuando esta membrana (zona pelúcida) es removida (Modificada de Carlson *et al.*, 2003 y Ren *et al.*, 2001).

Los genes *Catsper* 1 y 2 se han identificado en testículo, observándose que *Catsper* 1 se expresa en espermátidas y *Catsper* 2 se expresa al inicio del paquiteno en espermatoцитos. Con respecto a *Catsper* 3 y 4, estos comparten un perfil de expresión similar, lo que nos indica una regulación transcripcional común (Hong-Gang *et al.*, 2007). Además, los transcritos de *Catsper* 3 y 4 también predominan en testículo, sin embargo, se encuentran en otros tejidos en muy baja expresión (Lobley *et al.*, 2003).

Sin embargo, con respecto al gen *CATSPER* 1 humano, se tiene poca información acerca de su expresión y función. La primera evidencia sobre la función alterada de *CATSPER* se encontró en un paciente con sordera no sindrómica y astenoterazoospermia, el cual presentó una delección de ~70kb en el cromosoma 15q15 que incluye al gen *CATSPER* 2. Esta delección consiste en la pérdida de 225 pb del extremo 3' del RNAm que codifica para la región del poro en el canal, inhabilitándolo (Avidan *et al.*, 2003). Este canal no funcional, se asocia con la falta de movilidad flagelar e infertilidad masculina observada en el paciente. Por otra parte, debido a que el canal *CATSPER* ha demostrado ser esencial para la movilidad y fertilidad en el modelo del ratón, se ha buscado asociar la expresión diferencial de los genes *CATSPER* en humano con casos de infertilidad masculina. Por tal razón, algunos investigadores han evaluado la expresión del gen *CATSPER* 1 en biopsias de testículo de pacientes subfértiles que presentan disminución en el número de espermatozoides y baja movilidad (oligoastenozoospermia), observando una baja expresión del gen (Nikpoor *et al.*, 2004).

Así mismo, se ha pretendido explicar el comportamiento de distintas poblaciones de espermatozoides que presentan diferencias en su movilidad, como consecuencia de la expresión de los genes *CATSPER*. En los estudios realizados han observado una expresión diferencial en los cuatro genes *CATSPER*, señalando que la cuantificación

de los diferentes transcritos no presenta diferencia entre los espermatozoides con alta y baja movilidad ya que posiblemente la regulación ocurra a nivel traduccional, aspecto aún no estudiado (Gur y Breitbart, 2006; Hong-Gang *et al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Análisis *in silico* de la región promotora de *CATSPER 1* de humano

Los resultados obtenidos por nuestro laboratorio muestran que la caracterización *in silico* del promotor *CATSPER 1* de las regiones que preceden al gen, delimitan un promotor de 739 pb (Fig. 7) e identifica secuencias de unión a factores de transcripción (FT). El promotor comprende parte del primer exón, indicando que dentro de este se encuentran secuencias importantes que funcionan como sitios de unión a FT necesarios para reclutar a la maquinaria transcripcional basal y factores de transcripción específicos de la espermatogénesis para que se pueda llevar a cabo la transcripción completa del gen (Alvarado, 2010).

Una vez identificado el promotor de 739 pb de *CATSPER 1* mediante el análisis *in silico* y usando el programa www.genomatix.de, se determinó que comprende 239 pb del primer exón y 500 pb río arriba del inicio putativo de la transcripción. Por otro lado, se identificaron sitios de unión a diferentes FT, como son CREB, EREF, OCT-1, Sp1, SRY y SOX5 (Fig. 7). Algunos de estos factores son importantes para el reclutamiento de la maquinaria basal y otros importantes en la determinación de la diferenciación sexual masculina. A diferencia del promotor murino, no se encontraron sitios de unión específicos a SOX9, los que se han caracterizado como elementos reguladores positivos de la transcripción de *CatSper1* murino (Mata *et al*, sin publicar).

En muchos genes, el elemento TATA es el responsable del posicionamiento de la maquinaria transcripcional basal sobre el promotor. Sin embargo, en el promotor de *CATSPER 1* no se encontró caja TATA, aunque se identificaron otras secuencias importantes que le ayudan a reclutar la maquinaria transcripcional basal: la caja

CAAT, que juega un papel importante en la determinación de la eficiencia del promotor y es reconocida en distintos promotores; regiones ricas en GC; factores de transcripción como OCT1, que pertenece a la familia de homeodominios, es una proteína que se une a una secuencia octamérica específica (ATGCAAAT) y puede también regular negativamente ciertos genes y a los elementos iniciadores (Inr), de los cuales existe evidencia de su capacidad para formar complejos de transcripción, al incluir componentes del complejo TFIID ó un activador específico (Sp1) río arriba comúnmente encontrado en muchos promotores sin caja TATA (Weis y Reinberg, 1997).

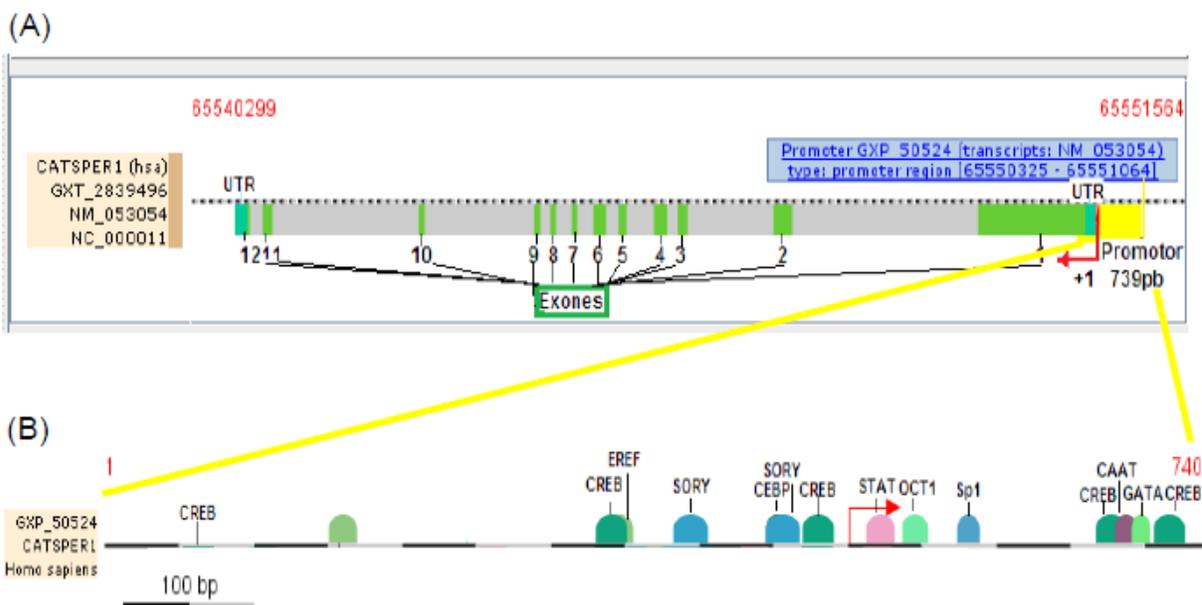


Fig. 7. Análisis del promotor de *CATSPER 1* de humano y predicción de sus sitios de unión a FT. A) Promotor de 739 pb para *CATSPER 1* humano localizado en la región 5' del gen *CATSPER*, en verde se muestran los exones que componen al gen y en azul a la región no traducida del transcrito. B) Ampliación de la región promotora en el que se indican los sitios de unión a diferentes FT dentro del promotor. El inicio putativo de la transcripción se indica en la flecha roja.

2.2 Factores de Transcripción

Por otra parte, se encontraron sitios de reconocimiento para FT que juegan un papel importante en el desarrollo gonadal masculino como: SRY (factor determinante de la diferenciación sexual) y SOX9. SRY se encuentra en el cromosoma Y, es necesario para iniciar la formación de testículo y el desarrollo de las características sexuales masculinas, potencia la diferenciación de células precursoras a células de Sertoli (Sekido y Lovell, 2008). SOX9 juega un papel esencial en la regulación de la transcripción del gen que codifica para la hormona antimulleriana, la cual inhibe en los individuos masculinos, la formación del tracto mulleriano necesario para la formación de trompas de Falopio. SOX9 se expresa en niveles bajos en la gónada indiferenciada de ambos sexos pero aumenta su expresión dramáticamente en las células de Sertoli inmediatamente después del inicio de la expresión de SRY. Los altos niveles de expresión de SOX9 y de SRY se mantienen en testículo aún en la etapa adulta, en el cual se desconoce su papel (Kent *et al.*, 1996; Lahr *et al.*, 1995; Capel *et al.*, 1993).

Así mismo, en mamíferos la diferenciación sexual masculina en mamíferos se controla por el locus SRY ó cromosoma Y (región determinante del sexo en el cromosoma Y), el cual coopera con el factor esteroideogénico 1 (*Sf1*) y activan directamente la expresión de SOX9. SOX9 es un FT importante, involucrado en varios procesos del desarrollo normal y de algunas patologías, se expresa en las células pre-Sertoli las cuales se requieren para la conformación morfológica normal del testículo y para el desarrollo de células germinales. SOX9 se importa al núcleo durante el desarrollo de la gónada masculina e interactúa específicamente con la secuencia consenso A/T ACAA T/A mediante el dominio de unión al DNA denominado grupo de alta movilidad (HMG) (Lardenois *et al.*, 2010).

Algunos estudios mencionan que SRY dirige el desarrollo gonadal masculino, pero actualmente es SOX9, y no SRY, el elemento clave que organiza y estabiliza la diferenciación de las células de Sertoli en la determinación testicular. Al mismo tiempo, SOX9 provee la vía principal de bloqueo de la actividad genética que

conduce a la diferenciación del ovario, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se lleve a cabo (Kashimada y Koopman, 2010).

Por otro lado, también se identificaron cuatro secuencias de unión a CREB en el promotor *CATSPER* 1, CREB es una proteína de unión al AMPc y depende de los niveles de este último lo que hace que aumente o disminuya la transcripción del gen (Don y Stelzer, 2002). Por último, el promotor *CATSPER* presenta también una secuencia de unión al DNA (TGACCT) del factor de receptor a estrógenos, indicando dos sitios de reconocimiento de las isoformas ER α y ER β (Carreau *et al.*, 2007).

2.3 Identificación del sitio de inicio de la transcripción

Para confirmar que el inicio de la transcripción se encuentra dentro de la región promotora predicha por el análisis bioinformático se empleó la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE). Se determinó una base nitrogenada A como sitio de inicio de la transcripción (SIT) principal, ubicada a -134pb río arriba del sitio de inicio de la traducción y dentro del promotor (Fig. 8) Además de otros SIT secundarios a -97 y -92.

```

-481 TCTCAAAAAC AAACAAAGAA ACAACAACA ACAACAACAA CAAAACCAT GTATTATGCT
-421 GTTAATATAA GGCTTACATA TCTTAACTTT TTTGATCCTG TGGGCTAGGT ATTATTATTC
-361 CCATTTTTACA GAGGAAGAAA CTGAGGCACG GGAAAGTTCA GCAACAAGCC CAAGGTCACA
-301 CACCTACTTA TGAGGGAGTC AGGCAGTCTT CACCCCAGAG CCAGCTGATC TCTAGATGGG
-241 ACTGAAGACT GGACCACTTG GACCATTTTC TTTCCAACAA CAGGGCTAAA GTAGCTGATG
-181 AAGCCATGGC GCCCCCATGG ACTTCTTTGT CCAGCTTTGC CAGTGACCTG TGAGGTCACC
-121 TTGGTCTAGT CCTTCCCTTT TCTTGACCTC GGTTCCTCA TTTACAATGTA AGGAGTTTGA
-61 CACAATAATT CTTGATTCCG AACTTATAGCC CAGGAAGAGG CATTTGGGAA TGAGGCCCTG

+1 GCCTGCTGGT GACATCATAG AGGGGAGAGT TCCCGAGAA TAGTCAGGCC TTTCTGGAAG
+61 CCCAGTGCCA CAGTCTGCAT TGAGCTTGGC TCAGGAAAGA AGGGAAATCC AGGCGGGGCC
+121 TGTTGGGGCC AGGTCTTGAG CTCTTTTGGC TCCAGAGTTC CCAGCACAGT CATGGATCAA
+181 AACTCAGTGC CTGAAAAGGC TCAGAATGAG GCAGACACCA ATAACGCAGA TAGGTTCTTT
+241 CGCTCTCACT CATCACCCCC ACACCACAGG CCAGGCCACA GCAGAGCTCT CCACCATTAC

```

Fig. 8. Secuencia nucleotídica que comprende el promotor de 739pb (delimitadas por las bases C y A de mayor tamaño). En verde se señala el comienzo del primer exón, la A marcada en rojo es el sitio de inicio de la transcripción determinada por la técnica de RACE. En amarillo se ubica el sitio de inicio de la traducción. En rosa se ubican los elementos iniciadores, en azul la caja CG, en rojo las

cajas CAAT y en café se denota la caja TATAG. Estas cajas y elementos iniciadores ayudan a reclutar la maquinaria transcripcional basal.

Por otra parte, para determinar la actividad de la región promotora del gen *CATSPER 1* de humano, se subclonó en el vector pRL-null, que tiene el gen reportero de luciferasa de *Renilla*, obteniendo la construcción completa pRL-*CATSPER 1*(pCAT), con la cual se analizó la actividad y, posteriormente, la participación de las regiones adyacentes al promotor predicho. Para analizar la actividad y la participación de las regiones adyacentes se obtuvieron las deleciones pCAT Δ 3' y pCAT Δ 5' (pCAT739) a partir de la construcción pCAT1, con lo cual se eliminó la región río abajo y río arriba del promotor, delimitándose el promotor predicho y eliminando algunos de los sitios de unión a FT como SRY y CREB (Fig. 9).

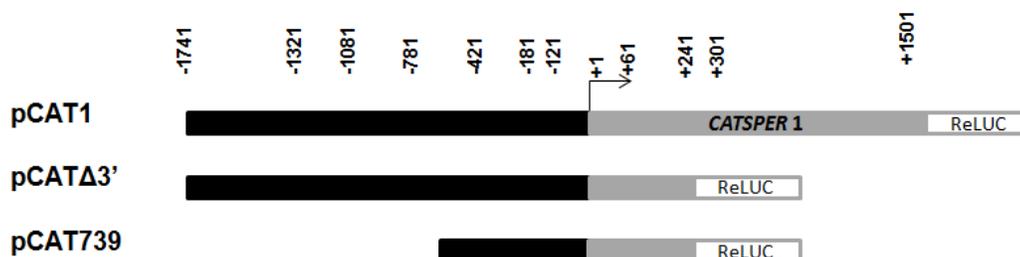


Fig. 9. Deleciones de la región promotora *CATSPER1* en extremos 3' y 5'. (a) Construcción completa pCAT1 con un peso total de 7022 pb en donde el inserto es de 3702pb. (b) Delección pCAT Δ 3' a partir de la construcción pCAT1 donde se deletaron 1450pb dejando un peso total de 5573pb. En esta delección se eliminó parte del primer exón que no comprende el promotor. (c) Delección pCAT Δ 5' ó pCAT739 a partir de la construcción pCAT Δ 3' donde se deletaron 1497pb dejando un peso de 4059pb. En esta construcción se delimito el promotor de 739pb. Los sitios de reconocimiento a los FT SRY y CREB se localizan en la zona negra y en gris se muestra la región promotora de *CATSPER 1* (modificado de Mata *et al.* 2012, sin publicar).

Con base en lo anterior, se hicieron transfecciones en la línea celular HEK 293 y se demostró que en los fragmentos clonados se encuentra incluida una región que funciona como promotor para el gen *CATSPER 1* y que su actividad se ve afectada tanto por secuencias represoras río abajo del promotor como por secuencias represoras y activadoras en la región 5' dependiendo del ambiente celular (Fig. 10).

La eliminación de los sitios SRY y CREB en el promotor, mostró una disminución en la actividad, probablemente porque estos factores son importantes para la expresión de este promotor.

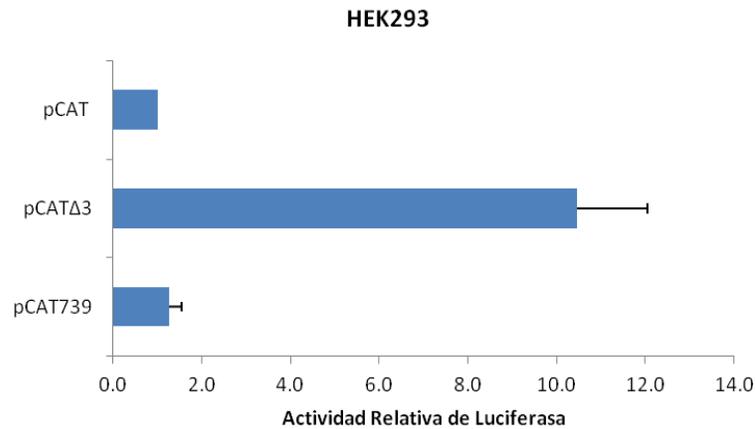


Fig. 10. Transfección en la línea celular HEK 293. En la gráfica se muestra que en la construcción completa (pCAT) hay menos actividad transcripcional comparado con las deleciones 3' y 5' en donde se eliminó parte del primer exón y algunos sitios de reconocimiento a FT respectivamente. La deleción pCAT Δ 3' mostro mayor actividad, sin embargo, cuando se eliminan los sitios de reconocimiento a factores de transcripción hay una notable disminución en la actividad transcripcional.

Por tanto, el promotor del gen *CATSPER 1* de 739 pb (-500 y +239 del primer exón) tiene actividad transcripcional con un sitio de inicio de la transcripción, en la base nitrogenada A localizada a 134 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. Su actividad se ve afectada tanto por secuencias represoras y activadoras en la región 5' dependiendo del ambiente celular y por secuencias represoras río abajo como la eliminación de los sitios SRY y CREB que disminuyen su actividad, probablemente porque estos factores son importantes para su expresión.

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante dilucidar como se lleva a cabo la expresión génica del gen *CATSPER* 1 durante la espermatogénesis, ya que de su correcta expresión depende la hiperactivación del flagelo y la capacidad de fertilidad del espermatozoide (Quill, *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la ausencia de la expresión del gen *CATSPER* 1 provoca una disminución de la hiperactivación del flagelo en el espermatozoide, la cual es mediada por el canal CATSPER, debido a que este canal es esencial para el aumento en la concentración de Ca^{2+} intraflagelar (Ren *et al.*, 2001). A pesar de ser una región promotora que se activa transcripcionalmente con alta especificidad sitio-temporal durante la espermatogénesis en el testículo, no se han realizado estudios moleculares del promotor de *CATSPER* 1 humano, que expliquen dicha actividad transcripcional. Sólo se han realizado estudios enfocados a la expresión del RNAm y a demostrar la funcionalidad del canal CATSPER, los cuales se han limitado al estudio de su expresión génica, sin identificar tanto las regiones importantes que actúan como promotores como los sitios de reconocimiento a factores de transcripción que regulen positiva o negativamente la expresión del gen. De acuerdo con lo anterior, en la presente propuesta se planteó realizar estudios moleculares sobre la región promotora del gen *CATSPER* 1 para identificar las secuencias de DNA reguladas por factores de transcripción que controlan la expresión génica durante la espermatogénesis. Se espera, con la información obtenida, proponer un mecanismo inicial de regulación genética para *CATSPER* 1 y aportar nueva información acerca de la regulación transcripcional específica que ocurre durante la espermatogénesis y de las regiones de DNA susceptibles a esta regulación.

4. HIPÓTESIS

Si el gen *CATSPER 1* se expresa exclusivamente en testículo, se espera que factores transcripcionales como CREB y SRY actúen en la espermatogénesis regulando su expresión.

5. OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar molecularmente la actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1* humano y evaluar la participación de SRY y CREB en su regulación.

6. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Eliminar de manera secuencial los sitios de reconocimiento a SRY y CREB en el promotor del gen *CATSPER 1*.
- Evaluar la actividad transcripcional de la región promotora y sus deleciones en la línea celular HEK-293.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de SRY sobre el promotor *CATSPER 1*.
- Evaluar la interacción física de SRY con los sitios de reconocimiento en el promotor *CATSPER 1*.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

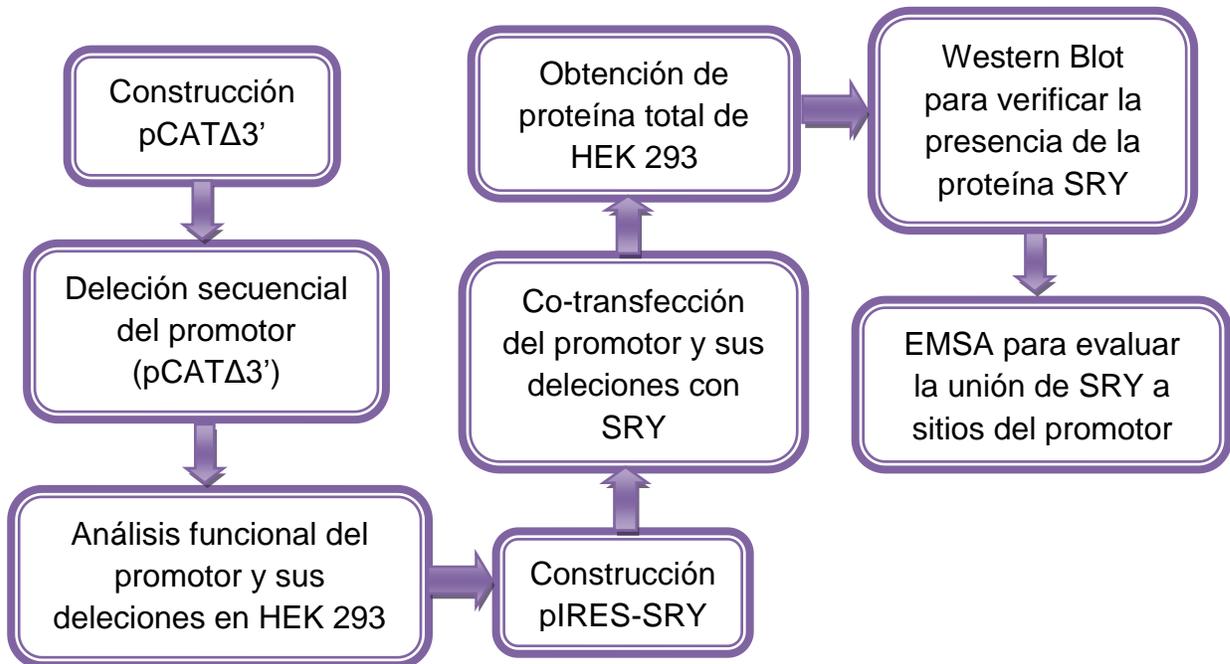


Fig. 10 bis. Técnicas para la identificación de la interacción de SRY y CREB en el promotor del gen CATSPER 1 de humano.

8. METODOLOGÍA

8.1 Análisis de la expresión del promotor *CATSPER 1* humano

Previo al análisis de la actividad del promotor con los diferentes FT, en el laboratorio, se clonó el promotor de *CATSPER 1* humano a partir de la clona DH10B (pBAC) con un inserto de 170Kb, adquirida comercialmente para obtener un fragmento de 3702pb, esta clona que contiene la región genómica de *CATSPER 1* y se subclonó mediante restricción con endonucleasas específicas (*HindIII* y *XhoI*), posteriormente para obtener un tamaño total de 7022pb, se ligó en el vector pRL-null (Fig. 11). Este vector carece de promotor y contiene el gen reportero para la luciferasa (*Renilla reniformis*), cuya expresión indica la actividad transcripcional de la región clonada. El vector pRL-null se empleó porque contiene los sitios que permitieron realizar la subclonación de manera orientada y porque permitió evaluar la expresión del gen. La construcción plasmídica se verificó con endonucleasas específicas en la región promotora y por secuenciación automática para confirmar la fidelidad del inserto (Fig. 12). Todas las técnicas de biología molecular de rutina, se realizaron de acuerdo con los protocolos de Sambrook y colaboradores (2001).

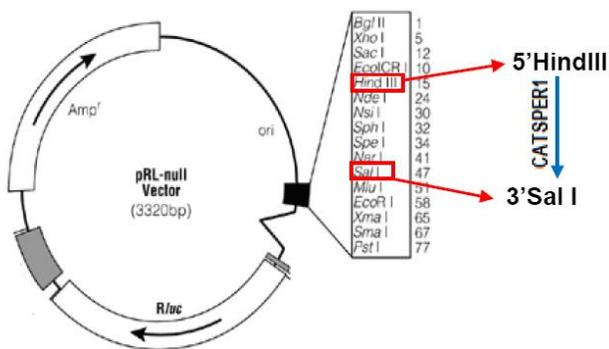
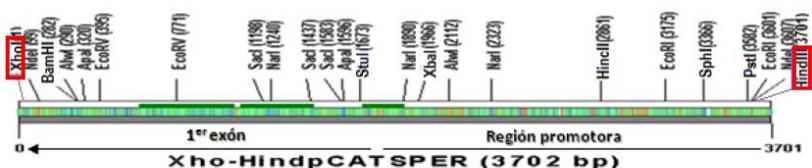


Fig. 11. Región genómica de *CATSPER 1* y vector pRL-null. La clona que contiene la región genómica de *CATSPER 1* fue subclonado mediante restricción con endonucleasas específicas (*HindIII* y *XhoI*), para obtener un fragmento de 3702pb, posteriormente se ligó en el vector pRL-null, para obtener un tamaño total de 7022pb.

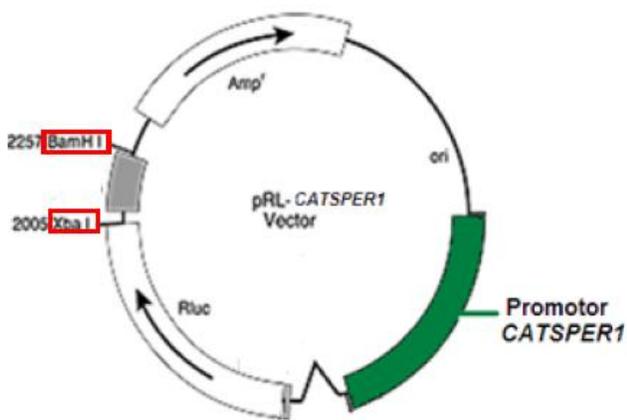


Fig. 12. Construcción portadora del gen *CATSPER 1*. La construcción tiene un fragmento de 3702pb subclonado en el vector pRL-null en dirección hacia el gen de luciferasa de *Renilla*.

Posteriormente, a partir de la construcción de la región promotora completa y sus deleciones en el vector portador del gen reportero de luciferasa, se llevó a cabo el

análisis de la actividad del promotor con los diferentes factores transcripcionales (Fig. 12).

8.2 Material biológico: bacterias, plásmidos y líneas celulares

La cepa bacteriana empleada para la transformación fue *Escherichia coli* DH5 α . A continuación se muestra su genotipo:

F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*

El vector reportero de luciferasa pGL3 basic se empleó como control, contiene la secuencia codificante para la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) para monitorear la actividad transcripcional de las células transfectadas. Presenta una región de policlonación, un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación. Los plásmidos pRL-null y pGL3-null (basic) se emplearon como controles negativos en las co-transfecciones. El plásmido pRL-CMV se empleó como control positivo y se utilizó en combinación con pGL3-CMV (control interno) en los experimentos de co-transfección. Estos vectores contienen el potenciador del citomegalovirus (CMV) y elementos promotores para proporcionar un alto nivel de expresión de luciferasas de *Renilla* y *Photinus* respectivamente, en las células co-transfectadas, es decir, se emplearon como controles positivos en las cotransfecciones. El plásmido pGEM-T-easy, se empleó para completar la carga de DNA en las transfecciones, presenta un origen de replicación, un codón de inicio *lacZ* y un gen de resistencia a ampicilina.

Para los ensayos de co-transfección se empleo la construcción pIRES-SRY. El vector pIRES-EGFP contiene un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) entre el sitio de clonación múltiple (MCS) y la región codificante de la proteína verde fluorescente (EGFP). Permitiendo que tanto el gen de interés (SRY) y el gen EGFP se traduzcan de manera independiente.

La línea celular utilizada fue HEK 293, proveniente de riñón embrionario de humano masculino. Estas células fueron generadas por transformación de células de riñón embrionario humano normal con DNA de adenoviral.

8.3 Delección secuencial de la región promotora

De acuerdo con los antecedentes, se observó que hay mayor actividad transcripcional cuando se elimina parte del primer exón del gen *CATSPER 1*, hacia el extremo 3' ya que esta región no corresponde al promotor predicho, sin embargo, partiendo de esta delección se eliminó el extremo 5' y se mostró una disminución de la actividad transcripcional del mismo, atribuido a que posiblemente algunos sitios de reconocimiento a FT como SRY y CREB estén implicados en la regulación de la expresión del gen.

Con base en lo anterior, se hicieron delecciones de las secuencias que posiblemente estén regulando la actividad del promotor, estas delecciones se construyeron mediante PCR a partir del plásmido que no contiene parte del exón 1, es decir, la pCAT Δ 3' ya que presenta la región promotora completa. Los pares de oligonucleótidos se diseñaron para eliminar los sitios de reconocimiento por FT y se tomó como referencia la localización de los sitios SRY y CREB predichos en el promotor. También se diseñó un par de oligonucleótidos para eliminar los sitios de reconocimiento de la maquinaria transcripcional basal (cajas y elementos iniciadores) que se denominó pCAT Δ BASAL.

Se produjeron seis delecciones mediante delección sitio dirigida por PCR (Quick-Change site directed mutagenesis) utilizando el plásmido con la pCAT Δ 3' como molde y pares de oligonucleótidos dúplex. Se generaron una serie de plásmidos con diferentes longitudes de la región promotora del gen *CATSPER 1*, estas construcciones portadoras de las delecciones se analizaron por restricción con endonucleasas específicas (*EcoRI*) y por secuenciación para el acortamiento de la región y la integridad del promotor.

Para la obtención de las deleciones por PCR se prepararon para cada deleción, dos reacciones, una con el oligonucleótido sentido y otra con el oligonucleótido antisentido, usando el dúplex de oligonucleótidos se amplificó por PCR todo el plásmido empleando un estuche de mutagénesis (Quick Change site-directed mutagenesis, Stratagene) y siguiendo una modificación para la obtención de grandes deleciones (Wang y Malcolm, 2002). Brevemente, para cada uno se usaron 25ng de DNA plasmídico de la construcción pCATΔ3', 1μl de amortiguador 10X, 0.2μl de dNTP's, 0.6μl de solución Quick, 0.2μl de cada oligonucleótido y agua para obtener un volumen de 9.8μl. Posteriormente, las reacciones se incubaron a 95°C por 3min., y posteriormente, se le adicionó 0.2μl de DNA polimerasa Turbo, para un volumen final de 10μl. A continuación, se incubó a 95°C por 30s., 55°C por 1min., y 68°C por 8min., durante 5 ciclos. Posteriormente se mezclaron las dos reacciones y se dejó a 95°C por 30s., 55°C por 1min., y 68°C por 8min., durante 16 ciclos. En seguida, se adicionaron 0.4μl de *DpnI* y se dejó a 37°C por 65min., para la digestión del DNA metilado que se utilizó como molde inicial. El producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 0.8% para confirmar que hubo amplificación total del plásmido.

pCATΔSR3 (1623pb)

Vector	Promotor
F 5' CGAGCTCTAAGCTT ACTGGGAACC GAAGCAATCCTCAATAAATGATGG 3' 48nt	
R 3' GCTCGAGATTCGAATGACCCTTGGCTTCGTTAGGAGTTATTTACTACC 5'	

pCATΔCREB2 (1313pb)

F 5' CGAGCTCTAAGCTT ACTGGGAACC CTGTAGTCGCAGCTACTAGGAAAG 3' 48nt	
R 3' GCTCGAGATTCGAATGACCCTTGGGACATCAGCGTCGATGATCCTTTC 5'	

pCATΔSR2 (1032pb)

F 5' CGAGCTCTAAGCTT ACTGGGAACC CTGGGCGCAGTGGCTCACAC 3' 44nt	
R 3' GCTCGAGATTCGAATGACCCTTGGGACCCGCGTCACCGAGTGTG 5'	

pCATΔSR1 (709pb)

F 5' CGAGCTCTAAGCTT ACTGGGAACC CCATGTATTATGCTGTTAATATAAGGC 3' 51nt	
R 3' GCTCGAGATTCGAATGACCCTTGGGGTACATAAATACGACAATTATATTCCG 5'	

pCATΔBASAL (550pb)

F 5' CCTGTGAGGTCACCTTGGTCTAG ATTGAGCTTGGCTCAGGAAAGAAG 3' 47nt	
R 3' GGACACTCCAGTGAACCAGATCTAACTCGAACCGAGTCCTTTCTTC 5'	

pCATΔCREB1 (381pb)

F 5' CGAGCTCTAAGCTT ACTGGGAACC CTTTTCTTGACCTCGGTTTCCTC 3' 47nt	
R 3' GCTCGAGATTCGAATGACCCTTGGGAAAAGAAGTGGAGCCAAAGGAG 5'	

Fig. 13. Oligonucleótidos para la obtención de las delecciones. Cada tabla muestra el par de oligonucleótidos en sentido y antisentido, así como parte de la secuencia que se ubica en el vector y en el promotor.

(A) Secuencia del vector pRL-null

AGATCTCGAGCTCTAAGCTTACATATGCATGCACTAGTGGCGCCTGTCGACGCGTAGAATTCACCCGGGTACTG
CAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGA

(B) Secuencia del promotor *CATSPER 1*

ACTGGGAACC CCACTGCACT CCACCCTAGG TGACAGAGCA AGACTGTGTC

-1741 TCTGTCAAAT GGGGATAAAC AATATCTACC ATGTGGGGCT ATTGTGAGGA TTAAATTTAA
----->**SRY**

-1681 TGTGTATGGG CCGGGCACGG TGGCGCATGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG GTTGTGCGAGG
-1621 CGGGCAGATC GTTTGAGATC AGGAGTTCGA GACCAGCCTG ACCAACAGGG TGAAACCCCA
-1561 TGAAACCCCA TCTCTACTAA AATACAAAAG AAGTTAGCTG GCGGTAGTGG TGCACGCCTG

----->**SRY**

-1501 TACTTTTCAGC TACTTGGGAG ACTGAGGCAG GAGAATTGCT TGAATTCAGG AGGTGGAGGT
-1441 TGCTGTGAGC TGAGACCATG CCACTGCACT CCACCCTAGG TGACAGAGCA AGACTGTGTC
-1381 TCAAAAAAAAA AAAAAGAAAAG AAAGAAAACA AAATGTGTAT **GAAGCAATCC** **TCAATAAATG** pCATΔSRY3
----->**SRY**

-1321 **ATGG**CTGATA GTTTAATTTT GGTAATAACC CTAAAGGGGG GTTCCAAGAT CAAGAAGAGA
-1261 ATAATAATGC CAATTAACAT GTATTGGCCA GGCATGGTGG CTCACACCTG AAATCCCAGC
-1201 ACTTAGGGAG TGCGAGGTGG GTGGATCATT TGAGGTCAGG AGTTCAAGAG CAGCCTCGTC

----->**CREB**

-1141 AACATGGTGA AACCCCGTCT CTAATAAAAA TACAAAAATT AGCTGGGTGT GGTGTGCAC**C** pCATΔCREB2
-1081 **TGTAGTCGCA** **GCTACTAGGA** **AAG**CTGAGGC AGGAGAATTG CCTGAACCCA GGAGGCAGAG
-1021 ATTGCAGTGA GCCAAGATTG CACCCCGGCA CTCCAGCCTA GTGACAGAGT AAGACTCTGT
-961 CTCAAAAAAAA AAAAAAAAAA AATTAGCCGG GGTGGGGTAT GGTGGTGGGT GGCTGTAATC
-901 CCAGCTACTC AGGGGGCTAA GGCAGGAGGC TCACCTGAAC CTGGGAGGCA GAGATTGCCA
-841 TGAGTGAGAG TCATGCCGCT GCACTCCAGC CTGGGTGACA GTGAGACTGT CTCAAAAAAC

----- **SRY**

-781 AAAAAACAAA ACAAAAAAAC ATGGG**CTGGG** **CGCAGTGGCT** **CACAC**CTGTA ATCCCAACAC pCATΔSRY2
----->**SRY**

-721 TTTGGAAGGG CAAGGCAGGC GGATCACGAG GTCAGGAGAT CAAGACCATT CTGGCTAACA
-661 TGGTGAACC CCGTCTCTAC TAAAAATAGA AAAAGTTAGC CGGGCGTGGT GGTGGGCGCC
-601 TGTAGTCCCA GCTACTTGGG AGGCTGAGGC AGGAAAATGG CATGAAGCTG GGAGGTGGAG
-541 GTTGCAGTGA GTCAAGATCG TGCCACTGCA CTCCAGCCTG GCGGACAGAG CGAGACT**CCA** pCATΔ5'
-481 **TCTCAAAAAC** **AAA****CAAAGAA** **ACAAACAACA** **ACAACAACAA** **CAAAAA****CCAT** **GTATTATGCT** pCATΔSRY1
----->**SRY**

-421 **GTTAATATAA** **GGC**TTACATA TCTTAACTTT TTTGATCCTG TGGGCTAGGT ATTATTATTC
-361 **CCATTTT**TACA GAGGAAGAAA CTGAGGCACG GGAAAGTTCA GCAACAAGCC CAAGGTCACA
-301 CACCTACTTA TGAGGGAGTC AGGCAGTCTT CACCCAGAG CCAGCTGATC TCTAGATGGG
-241 ACTGAAGACT GGACCACTTG **GAC****CCATTTT**C TTTCCAACAA CAGGGCTAAA GTAGCTGATG
-181 AAGCCAT**GGC** **GCCCC**CATGG ACTTCTTTGT CCAGCTTTGC CAGTGA**CCTG** **TGAGGTCACC** pCATΔBASAL
----->**CREB**

-121 **TTGGTCTAGT** CCTTCC**CTTT** **TCTTGACCTC** **GGTTTCCTCA** TTT**ACAAT**GA AGGAGTTTGA pCATΔCREB1

```

-61 ACAATAATT CTTGATTCCG AACTTATAGCC CAGGAAGAGG CATTGGGAA TGAGGCCCTG
+1 GCCTGCTGGT GACATCATAG AGGGGAGAGT TCCACGAGAA TAGTCAGGCC TTTCTGGAAG
----->CREB
+61 CCCAGTGCCA CAGTCTGCAT TGAGCTTGGC TCAGGAAAGA AGGGAAATCC AGGCGGGGCC pCATΔBASAL
+121 TGTTGGGCC AGGTCTTGAG CTCTTTTGGC TCCAGAGTTC CCAGCACAGT CATGGATCAA
-----
+181 AACTCAGTGC CTGAAAAGGC TCAGAATGAG GCAGACACCA ATAACGCAGA TAGGTTCTTT
----->SRY
+241 CGCTCTCACT CATCACCC ACACCACAGG CCAGGCCACA GCAGAGCTCT CCACCATTAC pCATΔ3'
+301 GAGTTGCACC ATCACGGCGT

```

Fig. 14. Secuencia de la construcción pCAT1. (A) Ubicación de los primeros 14 nucleótidos del oligonucleótido en sentido en el vector pRL-null. Se subraya el sitio de reconocimiento de las enzimas Xho, HindIII y Sall, respectivamente, donde se inserto el promotor completo de *CATSPER 1*. **(B)** Ubicación del resto del oligonucleótido en sentido de cada una de las seis delecciones dentro del promotor de *CATSPER 1*. Las secuencias subrayadas muestran los oligonucleótidos empleados para eliminar los extremos 5 y 3' respectivamente. La secuencia del promotor de 739pb se delimita por las bases C y A de mayor tamaño, la base A resaltada en verde fosforescente muestra el inicio del primer exón y en rojo el sitio de inicio de la transcripción determinado por la técnica de RACE. La secuencia ATG es el sitio de inicio de la traducción. Por último, las secuencias subrayadas en morado, azul, rojo y café, son las cajas CAT, GC y ACAAT, TATAG, respectivamente.

Finalmente, bacterias *E. coli* DH5α competentes se transformaron con los plásmidos portadores de las delecciones correspondientes (Maniatis *et al.*, 2001). Posteriormente, para identificar las bacterias transformantes, se procedió a hacer PCR de varias colonias.

Las construcciones obtenidas como productos de las delecciones se analizaron por restricción con la enzima *EcoR I* que linealizó el plásmido y electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y posteriormente se verificó por secuenciación automática.

8.4 Amplificación de las construcciones (deleciones) con el promotor CATSPER 1 en un sistema bacteriano

Para amplificar en el sistema bacteriano, se comenzó con la amplificación de los plásmidos obtenidos como producto de cada deleción, para ello se empleó el método de transformación bacteriana, el cual se basa en la utilización de bacterias quimiocompetentes (*E. coli* DH5 α producen transformantes con una eficacia $\geq 10^8$ colonias/ μ g de DNA plasmídico) que permiten la entrada del DNA plasmídico. La amplificación se llevó a cabo mezclando en un tubo eppendorf, 100 μ l de células competentes con aproximadamente 5ng de DNA plasmídico e incubando en hielo durante 15min., las bacterias se transformaron mediante choque térmico a 42°C por 2min., y posterior incubación en hielo por 15min. Posteriormente, se agregó 1ml de medio rico en glucosa SOC y se incubó 1h., a 37°C, transcurrido el tiempo, se esparcieron 100 μ l en agar LB con ampicilina 100 μ g/ml y se dejó incubando toda la noche a 37°C. Debido a que el plásmido contiene el gen de resistencia a ampicilina, todas las transformantes obtenidas son portadoras del plásmido. Por último, estas se sembraron en medio líquido LB con ampicilina 100 μ g/ml y se incubaron a 37°C con agitación constante toda la noche con la finalidad de multiplicar las copias del plásmido, gracias a que contienen un origen de replicación para *E. coli*, permitiendo así la extracción del plásmidos por lisis alcalina en gran escala, que se detalla a continuación.

8.5 Extracción de plásmidos a gran escala (Protocolo Qiagen)

Se purificaron los plásmidos portadores de las deleciones y el promotor *CATSPER 1*, los plásmidos pRL-null y pGL3-null que carecen de promotor como controles negativos y los plásmidos pRL-CMV y pGL3-CMV que contienen el promotor de CitoMegalovirus como controles positivos de transfección. Se purificaron por medio del protocolo de QIAGEN plasmid. Se preparó un cultivo bacteriano a partir de 2-5ml de medio LB con antibiótico (ampicilina 100 μ g/ml) como preinoculo, el cual se incubó 8hrs., aproximadamente a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se inocularon 300ml de medio LB-ampicilina con 3ml de este cultivo inicial y se dejó

crecer de 12-16hrs., a 37°C en agitación constante. Luego el cultivo se centrifugó a 6,000 r.p.m por 15min., a 4°C, en seguida, el sedimento se resuspendió el sedimento en 4ml de amortiguador P1 y se adicionaron 4ml de amortiguador P2, se mezcló por inversión de 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 3min. A continuación, se adicionaron 4ml de amortiguador S3 frío, se mezcló inmediatamente por inversión y el lisado se transfirió al filtro y se incubó a temperatura ambiente por 10min. Durante la incubación se prepararon las columnas de QIAGEN Midi y el vacío. Pasados los 10min., el pistón se insertó en el filtro y se filtró el lisado a un tubo nuevo. Posteriormente se adicionaron 2ml de amortiguador BB y se mezcló por inversión de 4-6 veces. En seguida, el lisado se transfirió a la columna de QIAGEN Midi y se conectó a la fuente de vacío para eliminar el amortiguador y dejar en la columna el DNA. Inmediatamente se lavó la columna con 0.7ml de amortiguador ETR y se centrifugó a 12,000 r.p.m por 1min., y se descartó el sobrenadante. En seguida, se agregaron 0.7ml de amortiguador PE y se centrifugó a 12,000 r.p.m por 1min., y se descartó el sobrenadante. Para remover completamente los residuos de amortiguador PE se centrifugó nuevamente la columna a 12,000 r.p.m por 1min. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo y el DNA se eluyó el DNA adicionando 200µl de amortiguador EB en el centro de la columna, se dejó incubando por 1min., se centrifugó a 12,000 r.p.m por 1min. El DNA plasmídico que se obtuvo fue con un alto grado de pureza, el cual fue ideal para la transfección.

8.6 Cultivo de células

La línea celular adherente HEK-293 se cultivó en monocapa en medio DMEM a 37°C y con 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80% aproximadamente, el medio de cultivo se retiró el medio de cultivo mediante aspiración, se agregó 1ml de medio suplementado nuevo y se comenzó a despegar las células en forma mecánica. En seguida, se transfirieron a una nueva placa en una dilución 1:100 para el mantenimiento del cultivo o en el caso de cultivos para transfectar se inocularon en una dilución 1:10 en placas de 24 pozos con 1ml de medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%, al día siguiente,

las células se encuentran adheridas a la placa y han alcanzado una confluencia aproximada de 90% para la transfección.

8.7 Transfección de la línea celular HEK 293 con las construcciones (deleciones) del promotor del gen *CATSPER 1*

Las células vivas presentan una barrera de libre difusión de moléculas (membrana plasmática). Esta barrera evita la pérdida de componentes fundamentales de la célula, impide la entrada de moléculas externas y posibilita la existencia de gradientes de concentración de productos a través de la membrana. Para poder superar esta barrera de difusión se han diseñado estrategias experimentales, algunas basadas en la formación de poros u orificios en la membrana, más o menos permanentes, y otras en el transporte de moléculas hacia el interior celular mediante el uso de las vías naturales de entrada de macromoléculas como la endocitosis o la utilización de materiales como vehículos: polímeros (catiónicos), liposomas y nanopartículas. El método de lipofección se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. Este complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA foráneo al citosol. Es indispensable optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener una buena eficiencia de la misma, el crecimiento de las células en buenas condiciones suele ser del 70 al 90% de las células de la placa. Los parámetros optimizados fueron los siguientes: la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

Para llevar a cabo la detección de la expresión de la región promotora del gen *CATSPER 1*, se empleo la línea celular HEK 293, la cual se transfectó con las construcciones mediante el método de lipofección. Se colocaron en una placa de 24 pozos $\sim 5 \times 10^5$ células por pozo en una placa de 24 pozos en 1ml de medio suplementado (con suero). Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% hasta que alcanzaron una confluencia del 80-90%. Por cada pozo se diluyó en un tubo 0.5µg de DNA en 50µl de medio sin suplementar, por otra parte, se diluyeron 2µl de lipofectamina (Lipofectamine™ reagent de Invitrogen) en 48µl de medio sin

suplementar, ambos se mezclaron por pipeteo durante 15min., a temperatura ambiente. En seguida, se combinaron ambas diluciones y se mezclaron por pipeteo a temperatura ambiente por 15min., para permitir la formación de complejos DNA-liposomas. Mientras se formaba el complejo se cambió el medio suplementado de las células por 200µl de medio de transfección sin suplementar. Para cada transfección se adicionaron 100µl de los tubos con el complejo DNA-liposomas a las células. Las células se incubaron con el complejo por 3hrs a 37°C y CO₂. Después de la incubación, se adicionaron 200µl de medio suplementado (sin remover la mezcla de transfección). A las 24hrs., después de iniciada la transfección, se reemplazó el medio de las células por medio suplementado fresco. Transcurridas 48hrs., después de la transfección, se cosecharon las células adicionando 100µl de amortiguador de lisis a cada pozo por 15min., en agitación para obtener los extractos proteicos. Posteriormente, los extractos de proteína se emplearon para los ensayos de actividad para luciferasa.

8.8 Experimentos de Co-transfección del promotor *CATSPER 1* con el factor transcripcional SRY

Para llevar a cabo la detección de la expresión de la región promotora del gen *CATSPER 1* se empleo la línea celular HEK 293, la cual fue co-transfectada con la construcción pIRES-SRY mediante transfección *in vitro* con el reactivo TurboFect el cual se basa en la formación de lípidos catiónicos y el DNA. Se colocaron en una placa de 24 pozos ~5 x 10⁵ células por pozo en una placa de 24 pozos en 1ml de medio suplementado (con suero). Se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% hasta que alcanzaron una confluencia del 80-90%. Por cada pozo se diluyó en un tubo 0.5µg de DNA en 50µl de medio sin suplementar, por otra parte, se diluyó 2µl de reactivo TurboFec en 48µl de medio sin suplementar, se mezclaron por pipeteo durante 15min., a temperatura ambiente. En seguida, se combinaron ambas diluciones y se mezclaron por pipeteo a temperatura ambiente por 15min., para permitir la formación de complejos DNA-liposomas. Mientras se formaba el complejo se cambió el medio suplementado de las células por 200µl de medio de transfección suplementado. Por

cada transfección se adicionaron 100µl de los tubos con el complejo DNA-liposomas a las células. Las células se incubaron con el complejo a 37°C y CO₂ por 48hrs. Transcurridas 48hrs., después de la transfección, se cosecharon las células adicionando 100µl de amortiguador de lisis a cada pozo por 15min., en agitación para obtener los extractos proteicos. Posteriormente, los extractos de proteína se emplearon para los ensayos de actividad dual de luciferasa.

8.9 Análisis de la expresión del promotor del gen *CATSPER 1* mediante ensayos de luciferasa

Para el análisis de expresión se utilizaron ensayos de reportero dual de luciferasa. El término de reportero dual se refiere a la expresión simultánea y medida de dos enzimas reporteras individuales dentro de un mismo sistema. Un reportero, el reportero “experimental” esta correlacionado con el efecto de condiciones experimentales específicas, mientras que la actividad del reportero “control” provee un control interno que refleja una respuesta basal. Normalizando la actividad del reportero experimental a la actividad del control interno, minimiza la variabilidad experimental causada por diferencias en viabilidad celular o eficiencia de transfección.

En el ensayo de reportero dual de luciferasa, se mide secuencialmente las actividades de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y la luciferasa proveniente del *cnidario* Pensamiento del mar (*Renilla reniformis*) en la misma muestra. La actividad de luciferasa de luciérnaga se mide primero al adicionar el reactivo de ensayo de luciferasa II (LAR II) para generar señal quimioluminiscente. Después de cuantificar la luminiscencia, se detiene la reacción y se inicia la reacción de luciferasa de *Renilla reniformis* al adicionar el reactivo Stop y Glo al mismo tiempo. Este reactivo produce una señal de la luciferasa de *Renilla* la cual decae con el tiempo.

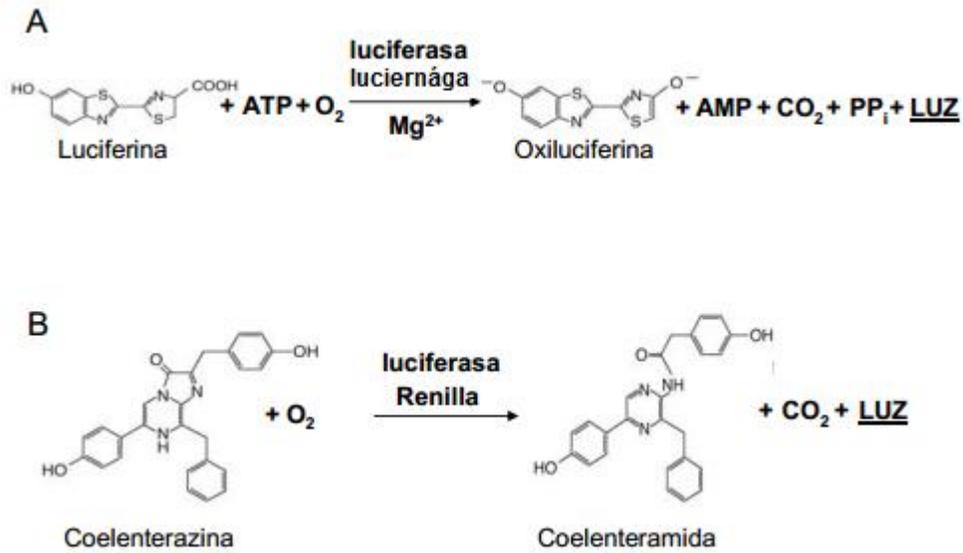


Fig. 15. Reacciones bioluminiscentes catalizadas por la luciferasa de luciernága (A) y luciferasa de Renilla (B).

En seguida, se describe brevemente el método que se siguió para realizar el análisis de expresión:

A) Transfección

Las células se transfectaron con los plásmidos portadores del promotor experimental (*Renilla*) y control (*Photinus*).

B) Lisis

Se preparó amortiguador de lisis pasiva (PLB) a una concentración 1X a partir de PLB 5X. Se retiró el medio de las células y se enjuagaron suavemente con 200µl de PBS 1X. Se adicionaron 100µl de PLB 1X a cada pozo y se dejaron las muestras en agitación a temperatura ambiente por 15min., se recuperó el extracto proteico y se centrifugó para precipitar los restos celulares.

C) Preparación de Reactivos

Se preparó el reactivo de ensayo de luciferasa II resuspendiendo el sustrato de ensayo de luciferasa liofilizado en 10ml de amortiguador de ensayo de luciferasa II (LAR II). Se requieren 100µl por ensayo.

Para la preparación del reactivo Stop and Glo. Primero se preparó el sustrato Stop and Glo 50X transfiriendo 200µl de solvente al sustrato Stop and Glo liofilizado, el cual se resuspendió por vortex. Posteriormente, se adicionó 1µl del sustrato Stop and Glo a 50 volúmenes de amortiguador Stop and Glo.

D) Medición de Luminiscencia

Las muestras se leyeron en el multidetector Victor 3, Perkin Elmer. Primero se colocaron 20µl del lisado celular dentro de la placa opaca del luminómetro. Se prepararon los inyectores P y M con los reactivos LAR II y Stop and Glo, respectivamente. Posteriormente, se inyectaron 20µl de reactivo LAR II a cada pozo con el microinyector P. Las muestras se leyeron con un retardo programado de 2s., con 10s., de integración para detectar actividad de luciferasa de *Photinus*. Después se inyectaron 20µl del reactivo Stop and Glo a cada pozo con el microinyector M. Las muestras se leyeron con un retardo de programado de 2s., y 10s., de integración para detectar la actividad de luciferasa de *Renilla*. Se imprimieron los datos obtenidos y se analizaron.

8.10 Ensayos de Retardamiento Electroforético (EMSA) entre el promotor del gen *CATSPER 1* y el factor transcripcional SRY

La técnica de EMSA permite determinar la formación de complejos proteína-DNA en una electroforesis no desnaturizante en gel de acrilamida debido al retraso en la migración electroforética del complejo respecto a la sonda de DNA no unida a la proteína. La incubación adicional de un anticuerpo específico de una proteína implicada en el complejo provocaría un mayor retraso en la migración, lo cual se conoce como super-retardo y permite demostrar la participación de dicha proteína

en el complejo. La sonda de DNA se marca radiactivamente para permitir la visualización del resultado mediante una autorradiografía. Además, la incubación con un exceso molar de sonda sin marcar (sonda fría) permite identificar por competición cual de las bandas obtenidas corresponde a la unión específica a dicha secuencia.

Se sintetizaron sondas únicamente para los sitios SRY dentro del promotor y sus deleciones debido a que para el sitio CREB aún no se cuenta con las clonas correspondientes. En seguida se muestran las sondas que fueron marcadas con ³²P:

pCATΔSRY3

$$T_m = 81.5 + 0.41 (39\%) - 675/59 - 10\% = 76^\circ\text{C}$$

5' CTGTGTCTCAAAAAAAAAAAGCCGGAAAGAAGGCAAAATGTGTATGAAGCAATCCTC 3'
 3' GACACAGAGTTTTTTTTTTTTTTCGGCCTTTCTCCCGTTTTACACATACTTCGTTAGGAG 5'

SRY3 Silvestre

$$T_m = (42 \times 2) + (17 \times 4) = 152^\circ\text{C}$$

5' CTGTGTCTCAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAACAAAATGTGTATGAAGCAATCCTC 3'
 3' GACACAGAGTTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTCTTTTGTTTTACACATACTTCGTTAGGAG 5'

pCATΔSRY2

$$T_m = 81.5 + 0.41 (56\%) - 675/59 - 15\% = 78^\circ\text{C}$$

5' GACAGTGAGACTGTCTCAAAAGGCAAGGCAAAAACAAGAAACATGGGCTGGGCGCAG 3'
 3' CTGTCACTCTGACAGAGTTTCCCGTTCCCGTTTTTGTCCCTTTGTACCCGACCCGCGTC 5'

SRY2 Silvestre

$$T_m = (35 \times 2) + (24 \times 4) = 166^\circ\text{C}$$

5' GACAGTGAGACTGTCTCAAAAAACAAACAAAACAATAAACATGGGCTGGGCGCAG 3'
 3' CTGTCACTCTGACAGAGTTTTTGTTTTTGTTTTTGTTTTTTGTACCCGACCCGCGTC 5'

pCATΔSRY1

$$T_m = 81.5 + 0.41 (46.6\%) - 675/60 - 11.6\% = 78^\circ\text{C}$$

5' CGAGACTCCATCTCAAAAACGGCAAGGACACCCCAACAACAACAACAACAACCAAT 3'
 3' GCTCTGAGGTAGAGTTTTTGCCCGTTCCCTGTGGGTTGTTGTTGTTGTTGTTTTGGTA 5'

Reacción 1

Glicerol 50%	1µl
Amortiguador de unión 10X	2µl
Poly dl-dC	1µl
NP-40	1µl
Proteína de extracto total de HEK 293	3µl
Agua	10µl
Volumen total	18µl

Reacción 2

Glicerol 50%	1µl
Amortiguador de unión 10X	2µl
Poly dl-dC	1µl
NP-40	1µl
Proteína de extracto total de HEK 293-SRY	8µl
Agua	5µl
Volumen total	18µl

Reacción 3 (competidor específico)

Glicerol 50%	1µl
Amortiguador de unión 10X	2µl
Poly dl-dC	1µl
NP-40	1µl
Proteína de extracto total de HEK 293	3µl
Oligo competidor no marcado (2pmol)	4µl
Agua	6µl
Volumen total	18µl

Reacción 4 (competidor no específico)

Glicerol 50%	1µl
Amortiguador de unión 10X	2µl
Poly dl-dC	1µl
NP-40	1µl
Proteína de extracto total de HEK 293	3µl
Oligo no competidor sin marca (2pmol)	4µl
Agua	6µl
Volumen total	18µl

Reacción 5 (competidor específico)

Glicerol 50%	1µl
Amortiguador de unión 10X	2µl
Poly dl-dC	1µl
NP-40	1µl
Proteína de extracto total de HEK 293-SRY	5µl
Oligo competidor no marcado (2pmol)	4µl
Agua	4µl
Volumen total	18µl

Reacción 6 (competidor no específico)

Glicerol 50%	1µl
Amortiguador de unión 10X	2µl
Poly dl-dC	1µl
NP-40	1µl
Proteína de extracto total de HEK 293-SRY	5µl
Oligo no competidor sin marca (2pmol)	4µl
Agua	4µl
Volumen total	18µl

Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente por 10min., y posteriormente se adicionaron 2µl del oligonucleótido marcado con ^{32}P . Cada una de las reacciones (1 y 2) se hizo por triplicado. Así mismo, los ensayos de competencia (reacción 3-6) también se hicieron por triplicado tanto para el competidor específico y para el no específico ya que se analizaron los sitios SRY1, SRY2 y SRY3 dentro del promotor tanto para la proteína de extracto total de HEK 293 y para el extracto total de HEK 293 transfectado con pIRES-SRY. Para los EMSA se evaluaron los sitios mutados y silvestres no así para los ensayos de competencia ya que únicamente se consideraron los silvestres.

Una vez adicionadas las sondas marcadas con ^{32}P correspondientes para cada sitio se incubó por 20min a temperatura ambiente y se hizo una electroforesis no desnaturizante.

Previamente a la electroforesis, se pre-corrió un gel de acrilamida al 7% en TBE 0.5X por 20min. El gel de acrilamida se elaboró de la siguiente manera: 1ml de TBE 5X, 312.5µl de glicerol al 80%, 1.75ml de acrilamida al 40%, 10µl de TEMED, 100µl de persulfato de amonio (APS) y 6.9ml de agua desionizada. Se cargaron los 20µl de cada muestra y se corrió la electroforesis a 100V. Cabe señalar que no se agregó amortiguador de carga, sólo se le adicionó a un pozo libre para tomarlo como referencia y así evitar que la muestra saliera.

Una vez corrida la electroforesis se procedió a secar los geles por 1hr en un desecador de geles Gel Dryer de Bio-Rad. En seguida se colocaron los geles en el cassette con la radiografía y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. En seguida, se rebeló la radiografía en un cuarto oscuro con las soluciones de revelado y fijador por 1min para cada solución. Se lavó con abundante agua y se dejó secar, para posteriormente observar el resultado.

8.11 Análisis estadístico

Los resultados presentados en las transfecciones y co-transfecciones corresponden a la media \pm el error estándar (SEM) de tres experimentos realizados cada uno por triplicado. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de Bonferroni. Un valor de P menor de 0.05 fue considerado significativo.

9. RESULTADOS

9.1 Eliminación secuencial de los sitios de unión a FT en la región promotora del gen *CATSPER 1*

La construcción pCAT1 contiene la región genómica de DNA humano incluye al promotor *CATSPER 1*, su primer exón y secuencias adyacentes (como sitios a FT SRY y CREB), cuya longitud total es de 7022pb. En el laboratorio se generó la construcción pCAT Δ 3' en donde se eliminó parte del extremo 3' dejando una construcción de 5573pb. A partir de esta construcción se delimitó la región promotora de 739pb mediante la eliminación de la región adyacente al 5' para evaluar la actividad transcripcional del promotor, lo cual afectó la actividad transcripcional de manera notable. Sin embargo, se desconocen las regiones importantes para la transcripción del gen *CATSPER 1*. Con la finalidad de determinar la participación de estas secuencias adyacentes o sitios de reconocimiento a factores de transcripción en la regulación de la expresión del gen *CATSPER 1* se procedió a generar una serie de deleciones en donde se eliminaron los sitios de reconocimiento a factores de transcripción. Las deleciones se hicieron mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR. Cada una de las construcciones se denominó de acuerdo con el sitio de unión al FT y su localización respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT). De manera que los sitios SRY3 y CREB2 son los más alejados del SIT, y SRY1 y CREB1 son los más cercanos al SIT. La primera construcción se denominó pCAT Δ SRY3 en donde se eliminaron 630pb río arriba del promotor dejando una construcción con un tamaño de 4943pb; en seguida se eliminaron 832pb donde se encuentra el sitio de reconocimiento a CREB, deleción denominada pCAT Δ CREB2 con 4741pb; continuando con las regiones adyacentes se eliminó la secuencia de reconocimiento a SRY de 1215pb, denominada pCAT Δ SRY2 con 4358pb; en seguida, se eliminó otro sitio de reconocimiento a SRY denominado pCAT Δ SRY1, donde se deletaron 1536pb dejando una construcción total de 4037pb; posteriormente se eliminaron las secuencias que son reconocidas por la maquinaria transcripcional basal (caja ACAAT y elementos iniciadores) en donde se deletaron 189pb dejando una construcción con

3870pb, esta deleción se denominó pCAT Δ BASAL; por último se eliminó una secuencia de reconocimiento a CREB denominada pCAT Δ CREB1 donde se deletaron 1866pb dejando una construcción con 3707pb (Fig. 16). Cabe mencionar que la pCAT Δ BASAL se generó a partir de la construcción pCAT739 que presenta el promotor mínimo de 739pb y donde el tamaño de la construcción es de 4059pb.

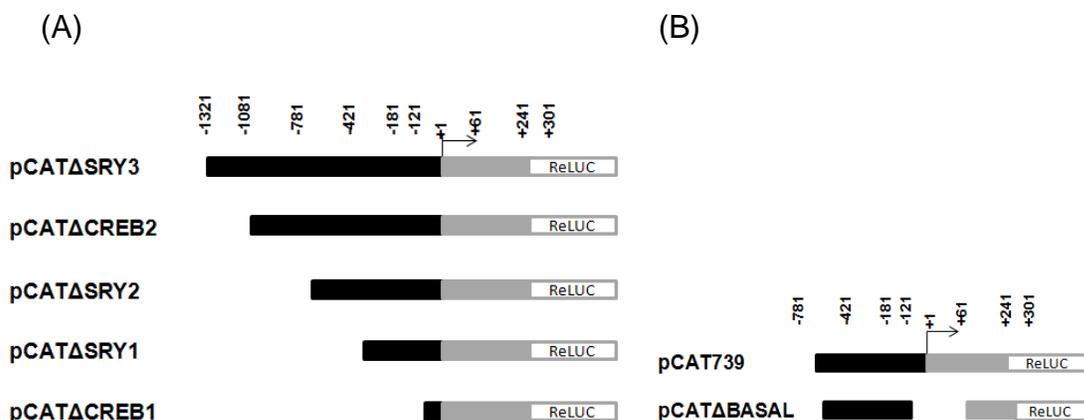


Fig. 16. Representación esquemática de las regiones deletadas. El esquema se muestra en dirección 5' a 3' de izquierda a derecha. (A) Deleciones obtenidas a partir de la construcción pCAT Δ 3', la deleción se denominó de acuerdo con la región que se deletó. pCAT Δ SRY3 con un inserto de 1623pb, pCAT Δ CREB2 con un inserto de 1313pb, pCAT Δ SRY2 con un inserto de 1032pb, pCAT Δ SRY1 con un inserto de 709pb, pCAT Δ CREB1 con un inserto de 381pb. (B) Esquema de la pCAT Δ BASAL con un inserto de 550pb, esta deleción se hizo a partir de la construcción pCAT739. El número asignado de cada deleción se asignó de acuerdo con la posición dentro del promotor que no involucra el primer exón.

Una vez obtenidos los productos de PCR con los posibles plásmidos portadores de alguna deleción, estos se transformaron en bacterias competentes de *E. coli* DH5 α y se procedió a seleccionar candidatos mediante una PCR de colonia que permitiera identificar aquellos que portaban una deleción en el promotor amplificado. La PCR a partir de colonias bacterianas permitió amplificar con los oligonucleótidos que flanquean el promotor de *CATSPER* 1 clonado, de manera que se amplifica el promotor completo (Fig. 17, carril 12) si en este no ocurrió deleción, o se pueden identificar amplicones de menor tamaño en los cuales ha sido eliminada una región

(Fig.17 carriles 1 y 3). Mediante esta selección se obtuvieron las clonas portadoras de cada una de las deleciones planeadas.



Fig. 17. Selección de candidatos que portan la deleción a partir de la PCR de colonia. Se observa un gel representativo de agarosa al 0.8% que muestra la selección de colonias candidatas, en este caso es para la pCATΔCREB2 que presenta un inserto de 1313pb indicando que sólo dos colonias son candidatas a portar la deleción (colonias 1 y 3).

Posteriormente, de las clonas seleccionadas se extrajeron los plásmidos portadores de las deleciones, los plásmidos se verificaron por restricción enzimática empleando una enzima que tuviera un sitio único de corte, para que permitiera linealizar el plásmido e identificar las construcciones portadoras de la deleción. Se seleccionó la enzima *EcoRI* para cortar y linealizar el plásmido, el cual por análisis electroforético permitió identificar el peso total de cada una de las construcciones (Fig. 18).

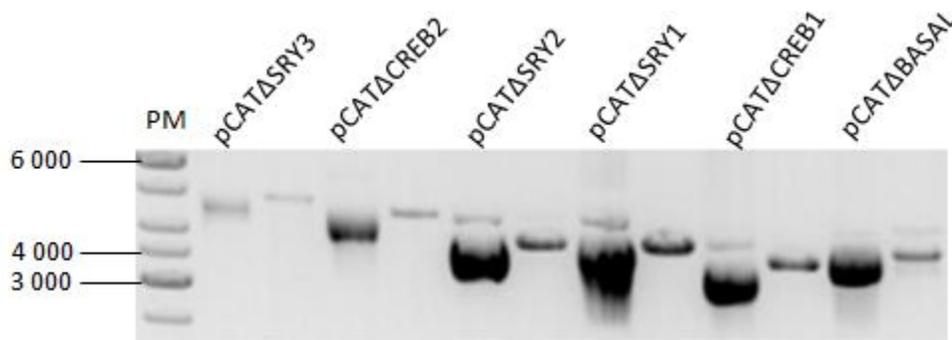


Fig. 18. Restricción enzimática de las deleciones con la enzima *EcoRI* en un gel de agarosa al 0.8%. A continuación se describen los carriles de izquierda a derecha: en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (P.M.) de 1Kb; carril 2, pCATΔSRY3; carril 3, pCATΔSRY3 digerido, se linealizó el plásmido, P.M. de 4943pb; carril 4, pCATΔCREB2; carril 5, pCATΔCREB2 digerido, P.M. de 4741pb; carril 6, pCATΔSRY2; carril 7, pCATΔSRY2 digerido, P.M. de 4358pb; carril 8, pCATΔSRY1; carril 9, pCATΔSRY1 digerido, P.M. de 4037pb; carril 10, pCATΔCREB1; carril 11, pCATΔCREB1 digerido, P.M. de 3707pb; carril 12, pCATΔBASAL; carril 13, pCATΔBASAL digerido, P.M. de 3870pb.

Las eliminaciones generaron plásmidos de diferente tamaño, cada uno de ellos contiene la región promotora con deleciones en su extremo 5', por lo que la longitud el promotor también se fue acortando (Tabla 1). La mayor de las deleciones obtenida eliminó un fragmento de 1866pb del plásmido, lo que indica que la deleción por PCR funciona para eliminaciones grandes en plásmidos.

Tabla 1. Longitud esperada de las deleciones obtenidas por PCR. Considerando que a partir de la construcción pCAT1 se obtuvo la pCAT Δ 3' y que de esta última se hicieron las deleciones: pCAT Δ SR3, pCAT Δ CREB2, pCAT Δ SR2, pCAT Δ SR1 y pCAT Δ CREB1, así como la construcción pCAT739. La pCAT739 fue molde para la elaboración de la pCAT Δ BASAL. Todas las regiones promotoras están clonadas en el vector pRL-null.

Plásmido	Longitud Total	Longitud del Inserto	Región deletada
pCAT1	7022pb	3702pb	Construcción completa
pCAT Δ 3'	5573pb	2253pb	1450pb
pCAT739	4059pb	739pb	1497pb
pCAT Δ SR3	4943pb	1623pb	630pb
pCAT Δ CREB2	4741pb	1313pb	832pb
pCAT Δ SR2	4358pb	1032pb	1215pb
pCAT Δ SR1	4037pb	709pb	1536pb
pCAT Δ CREB1	3707pb	381pb	1866pb
pCAT Δ BASAL	3870pb	550pb	189pb

Para verificar la precisión y fidelidad de la deleción planeada, se analizaron las secuencias nucleotídicas en el sitio de la deleción y la secuencia del promotor que persiste. Para esto, se seleccionaron algunas de las colonias candidatas de las deleciones y se realizaron reacciones de secuenciación que posteriormente se

mandaron analizar en un secuenciador automático ABI Prism 377 para verificar las bases nucleotídicas en el sitio de las deleciones.

Para cada deleción se diseñaron oligonucleótidos específicos de las regiones adyacentes a la región que se pretende eliminar. La pCAT Δ SR3 se diseñó en la posición -1318 de la secuencia del promotor, es decir en esa posición se partió para la eliminación de la secuencia río arriba del promotor, dejando una construcción de 4943pb incluyendo el vector. La región eliminada fue de 630pb. El oligonucleótido para la pCAT Δ CREB2 se diseñó en la posición -1059 del promotor, dejando una construcción de 4741pb y la región eliminada fue de 832pb. La pCAT Δ SR2 se diseñó en la posición -737 de la secuencia del promotor, dejando una construcción de 4358pb, la región eliminada fue de 1215pb. El oligonucleótido para la pCAT Δ SR1 se diseñó en la posición -409 de la secuencia del promotor, comprendiendo parte del promotor de 739pb, en esa posición se partió para la eliminación de la secuencia río arriba del promotor, dejando una construcción de 4037pb, la región eliminada fue de 1536pb. Para la pCAT Δ BASAL, los oligonucleótidos se diseñaron dentro del promotor de 739pb, el oligonucleótido en sentido, se diseñó en la posición -113 y el antisentido en la posición +140 de la construcción completa (5573pb), para eliminar una región de 189pb, dejando una construcción de 3870pb. El oligonucleótido para la pCAT Δ CREB1 se diseñó en la posición -83 dentro de la secuencia del promotor, para eliminar la secuencia río arriba del promotor, dejando una construcción de 3707pb incluyendo el vector. La región deletada fue de 1866pb (Tabla 1 y Fig. 19). Cabe mencionar que para todas las construcciones excepto para la pCAT Δ BASAL, parte del extremo 5' del oligonucleótido en sentido contiene la secuencia del vector.

La secuenciación automática de las clonas permitió obtener la secuencia completa de los 2000 pb del promotor clonado, esta secuencia mostró algunos cambios que existen dentro de la secuencia del promotor clonado respecto al reportado en el GENBANK ID (ver tabla 1 y 2 del apartado de ANEXOS). Por otra parte, durante la construcción de la deleción pCAT Δ CREB2 nos percatamos de una región repetida

que producía una clona inesperada con una región más acortada que la prevista (1000pb) (Fig. 19). Fue necesario el nuevo diseño de oligonucleótidos en la pCAT Δ CREB2 para evitar esta delección no planeada.

```

-1741 TCTGTCAAAT GGGGATAAAC AATATCTACC ATGTGGGGCT ATTGTGAGGA TTAAATTTAA
          ----->SRY
-1681 TGTGTATGGG CCGGGCACGG TGGCGCATGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG GTTGTGAGG
-1621 CGGGCAGATC GTTTGAGATC AGGAGTTCGA GACCAGCCTG ACCAACAGGG TGAAACCCCA
-1561 TGAAACCCCA TCTCTACTAA AATACAAAAG AAGTTAGCTG GCGGTAGTGG TGCACGCCTG
          ----->SRY
-1501 TACTTTCAGC TACTTGGGAG ACTGAGGCAG GAGAATTGCT TGAATTCAGG AGGTGGAGGT
-1441 TGCTGTGAGC TGAGACCATG CCACTGCACT CCACCCTAGG TGACAGAGCA AGACTGTGTC
-1381 TCAAAAAAAAA AAAAAGAAAG AAAGAAAACA AAATGTGTAT GAAGCAATCC TCAATAAATG
          ----->SRY
-1321 ATGGCTGATA GTTTAATTTT GGTAATAACC CTAAAGGGGG GTTCCAAGAT CAAGAAGAGA
-1261 ATAATAATGC CAATTAACAT GTATTGGCCA GGCATGGTGG CTCACACCTG AAATCCCAGC
-1201 ACTTAGGGAG TCGGAGGTGG GTGGATCATT TGAGGTCAGG AGTTCAAGAG CAGCCTCGTC
          ----->CREB
-1141 AACATGGTGA AACCCCGTCT CTAATAAAAA TACAAAAATT AGCTGGGTGT GGTGTGCACG
-1081 TGTAGTCGCA GCTACTAGGA AAGCTGAGGC AGGAGAAATTG CCTGAACCCA GGAGGCAGAG
-1021 ATTGCAGTGA GCCAAGATTG CACCCCGGCA CTCCAGCCTA GTGACAGAGT AAGACTCTGT
-961 CTCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AATTAGCCGG GGTGGGGTAT GGTGGTGGGT GGCTGTAATC
-901 CCAGCTACTC AGGGGGCTAA GGCAGGAGGC TCACTTGAAC CTGGGAGGCA GAGATTGCCA
-841 TGAGTGGAGA TCATGCCGCT GCACTCCAGC CTGGGTGACA GTGAGACTGT CTCAAAAAAC
          ----- SRY
-781 AAAAAACAAA ACAAAAAAAC ATGGGCTGGG CGCAGTGGCT CACACCTGTA ATCCCAACAC
          ----->SRY
-721 TTTGGAAGGG CAAGGCAGGC GGATCACGAG GTCAGGAGAT CAAGACCATT CTGGCTAACA
-661 TGGTGAAACC CCGTCTCTAC TAAAAATAGA AAAAGTTAGC CGGCGTGGT GGTGGGCGCC
-601 TGTAGTCCCA GCTACTTGGG AGGCTGAGGC AGGAAAATGG CATGAAGCTG GGAGGTGGAG
-541 GTTGCAGTGA GTCAAGATCG TGCCACTGCA CTCCAGCCTG GCGACAGAG CGAGACTCCA
-481 TCTCAAAAAAC AAACAAAGAA ACAACAACA ACAACAACA CAAAAACCAT GTATTATGCT
          ----->SRY
-421 GTTAATATAA GGCCTTACATA TCTTAACTTT TTTGATCCTG TGGGCTAGGT ATTATTATTC
-361 CCATTTTACA GAGGAAGAAA CTGAGGCACG GGAAAGTTCA GCAACAAGCC CAAGGTCACA

```

SRY3
CREB2
SRY2
CREB2 de 1000pb
SRY1

```

-301 CACCTACTTA TGAGGGAGTC AGGCAGTCTT CACCCAGAG CCAGCTGATC TCTAGATGGG
-241 ACTGAAGACT GGACCACTTG GACCAATTTT TTTCCAACAA CAGGGCTAAA GTAGCTGATG
-181 AAGCCATGGC GCCCCATGG ACTTCTTTGT CCAGCTTTGC CAGTGA CCTG TGAGGTCACC
----->CREB CREB1
-121 TTGGTCTAGT CCTTCCCTTT TCTTGACCTC GGTTTCCTCA TTTACAATGA AGGAGTTTGA
-61 CACAATAATT CTTGATTCCG AACTATAGCC CAGGAAGAGG CATTGGGGAA TGAGGCCCTG

+1 GCCTGCTGGT GACATCATAG AGGGGAGAGT TCCACGGGAA TAGTCAGGCC TTTCTGGAAG
----->CREB CREB0
+61 CCCAGTGCCA CAGTCTGCAT TGAGCTTGGC TCAGGAAAGA AGGAAATCC AGGCGGGGCC
+121 TGTGGGGCCC AGGTCTTGAG CTCTTTTGGC TCCAGAGTTC CCAGCACAGT CATGGATCAA
-
+181 AACTCAGTGC CTGAAAAGGC TCAGAATGAG GCAGACACCA ATAACGCAGA TAGGTTCTTT
----->SRY SRY0
+241 CGCTCTCACT CATCACCCCC ACACCACAGG CCAGGCCACA GCAGAGCTCT CCACCATTAC
+301 GAGTTGCACC ATCACGGCGT

```

Fig. 19. Secuencia de promotor, donde se señala la posición del oligonucleótido correspondiente a cada una de las deleciones realizadas.

Por otra parte, para verificar la deleción además de hacer una restricción enzimática también se realizó una reacción de secuenciación automática para corroborar que cada deleción se haya realizado en la posición correcta. En las secuencias obtenidas se realizó la búsqueda de la secuencia del oligonucleótido específico para producir la deleción, de manera que estas secuencias se encuentran en cada construcción (Fig. 20).

(A)

	Vector	Promotor
pCATΔCREB2	5' CGAGCTCTAAGCTT 3' 14nt	5' ACTGGGAACCCTGTAGTCGCAGCTACTAGGAAAG 3' 34nt

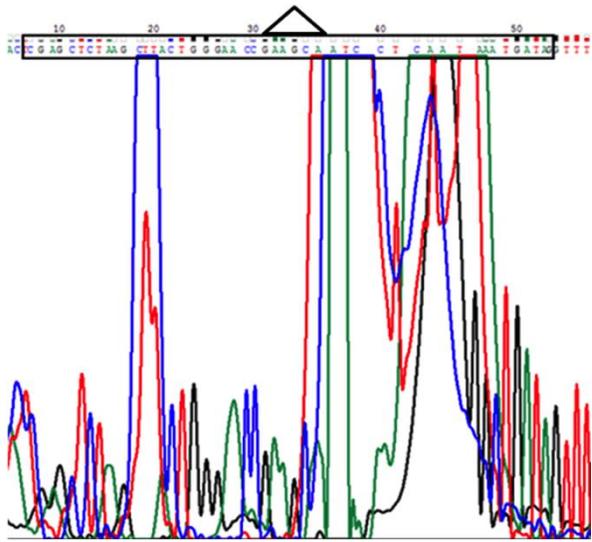
```

AGATCTCGAGCTCTAAGCTTACTGGGAACCCGAGAGAGCTGCGCTGTGCACATATGAATTCAGCATAACAGGGCAAGCTCTGCAGTGGATTCCAGGAGGAGACAG
GGACAGCATGAAGGTACAGATACAGACTTGGAGTGGATAGCAGCTGACGGTAAAGTTTCAITCATCRAAGCAACTCATTATATTTCTGAGCCATAGCACCTTT
GTCTGTCAAATGGGGATAAACAAATCTACCAATGTGGGCTATTGTGAGGATTAATTTTAAATGTGTATGGGCCGGGCACGGTGGCCGATGCTGTAATCCAGCA
CTTTGGGTTGTGAGGGGGGAGATCGTITGAGATCAGGAGTTCGAGACAGCCTGACCAACAGGGTGAACCCCACTCTACTAAAAATACAAAAGAAGTGTAGCT
GGCGTAGTGGTGCACGCCCTGTACTTTCAGTACTTGGGAGACTGAGGCAGGAGAAATGCTTGAATTCAGGAGGTGGAGGTTGCTGTGAGCTGAGACCATGCCAC
TGCACCTCCACCCTAGGTGACAGAGCAAGACTGTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAACAAAATGTGTATGAAGCAATCTCAATAAATGATGGCTGAT
AGTTTAAATTTGGTAATAACCCATAAGGGGGTTCRAAGATCARGAAGAGAAATAATGCCAAITAACATGTATTGGCCAGGCATGGTGGCTCACACCTGAAAT
CCCAGCACITAGGGAGTGCAGGTGGGTGGATCAITTTGAGGTGAGGAGTTCAGAGCAGCCTCGTCAACATGGTGAACCCGCTCTACTAAAAATACAAAAT
TAGCTGGGTGGTGGTGGCACCTGTAGTTCGAGCTACTAGGAAAGCTGAGGCAGGAGAAATGCTGAAACCAGGAGGCAGAGATTCAGTGTAGCCAAAGATTGCACC
CCGGCACTCCAGCCTAGTGACAGAGTAAAGACTCTGT

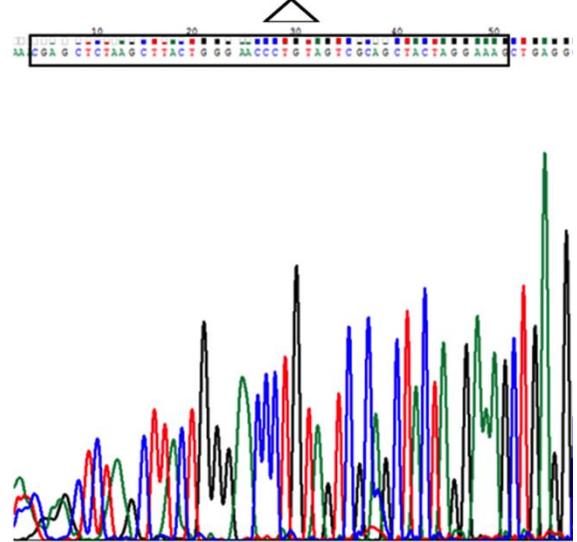
```

(B)

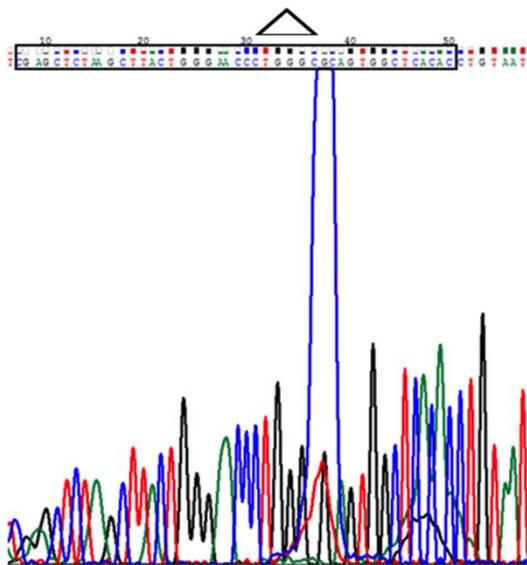
pCATΔSR3



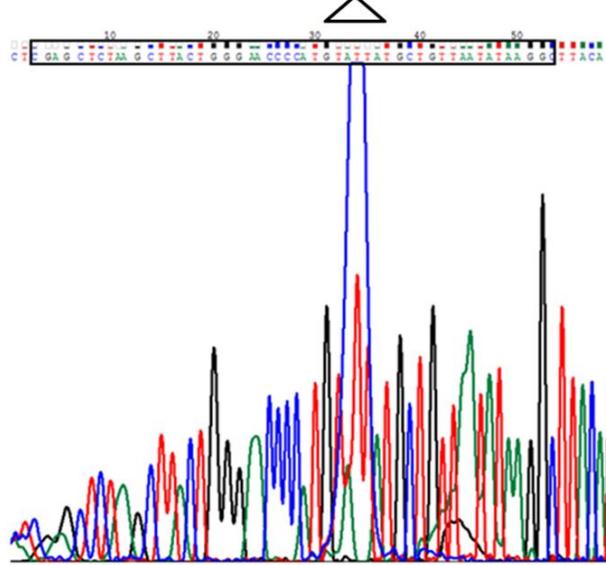
pCATΔCREB2



pCATΔSR2



pCATΔSR1



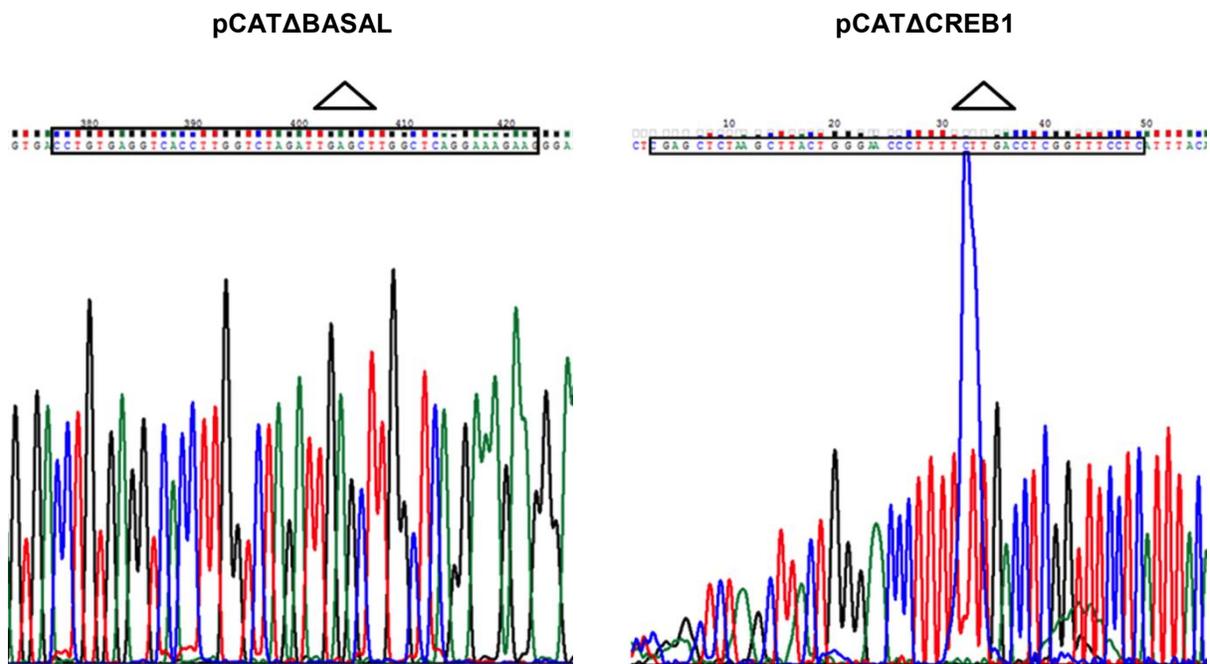


Fig. 20. Verificación de las deleciones por secuenciación automática. (A) Construcción pCATΔCREB2 que representa la ubicación del oligonucleótido en el vector y dentro de la secuencia del promotor. La región sombreada marca la deleción que al llevarse a cabo de manera correcta se elimina permitiendo que el oligonucleótido del vector se empalme con el resto del promotor. (B) Representación de los electroferogramas de secuenciación indicando la unión del oligonucleótido que confirmar la deleción.

En cada una de estas se encontró la secuencia íntegra del oligonucleótido diseñado para cada deleción, sin pérdida ni ganancia de nucleótidos en el sitio de la deleción. Asimismo en los electroferogramas se puede observar que la lectura de esta región coincide con señales legibles para cada nucleótido y por arriba del fondo (señales no específicas). Una vez confirmada las deleciones por restricción y secuenciación automática (Fig. 20) se procedieron a realizar los ensayos de transfección en la línea celular HEK 293 con los plásmidos obtenidos.

9.2 Actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1* y sus deleciones en la línea celular HEK 293

Con base en las deleciones obtenidas se realizaron los ensayos de transfección *in vitro* mediante la técnica de lípidos catiónicos en la línea celular HEK 293, con la finalidad de evaluar la actividad transcripcional de la región promotora del gen *CATSPER 1* en cada una de las construcciones.

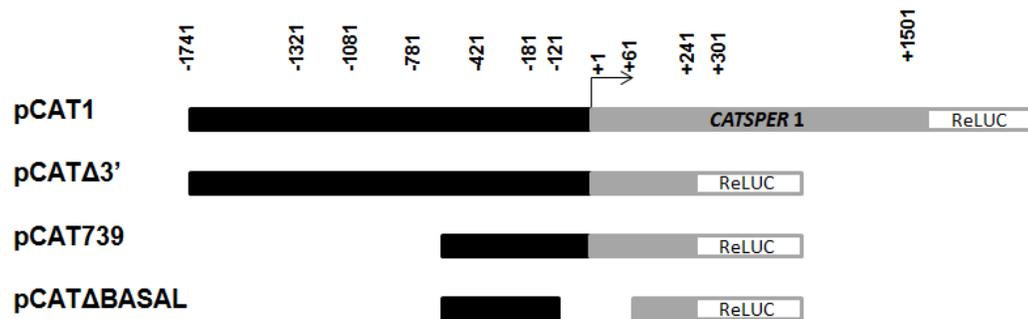
Para evaluar la actividad transcripcional de las construcciones que portan las deleciones se considero lo siguiente: El plásmido pRL-null, en el cual se clonaron los insertos que presentan las deleciones, porta el gen de luciferasa de *Renilla reniformes* (*Rluc*). El vector pGL3-CMV se empleó como control interno, ya que contiene luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) para monitorear la actividad transcripcional de las células transfectadas y además el promotor de CMV (CitoMegaloVirus) que proporcionan un alto nivel de expresión de luciferasas de *Renilla reniformes* y *Photinus pyralis* respectivamente. También se emplearon los vectores sin promotor como controles negativos y los vectores con el promotor de CMV como controles positivos.

Por otra parte, en todos los ensayos de transfección se empleó el sistema de ensayo de luciferasa dual para la determinación de actividad de las luciferasas descrito previamente en la metodología. La actividad transcripcional se determinó mediante la actividad de luciferasa de *Renilla reniformes* obtenida de cada una de las construcciones empleadas y fue normalizada con el control interno de luciferasa de *Photinus*. La actividad transcripcional observada en la construcción pCAT1, fue considerada como expresión basal asignándole el valor de 1. Lo anterior se realizó con el objetivo de observar el efecto en la transcripción al retirar las secuencias de los sitios de reconocimiento a los FT SRY y CREB en el promotor.

La actividad transcripcional observada en cada una de las construcciones resulto positiva y por arriba del fondo observado en el control negativo. Se evaluó en primera instancia la pérdida de las señales putativas para la maquinaria basal de la

transcripción. La figura 21 muestra la actividad transcripcional de la pCAT Δ BASAL comparada con la pCAT Δ 3' y la construcción completa pCAT1. La pCAT Δ BASAL fue normalizada con la actividad de luciferasa de *Photinus* y se considero la pCAT739 como expresión basal. Se empleo un control negativo en cual consistió en colocar las células en las mismas condiciones pero sin transfectar.

(A)



(B)

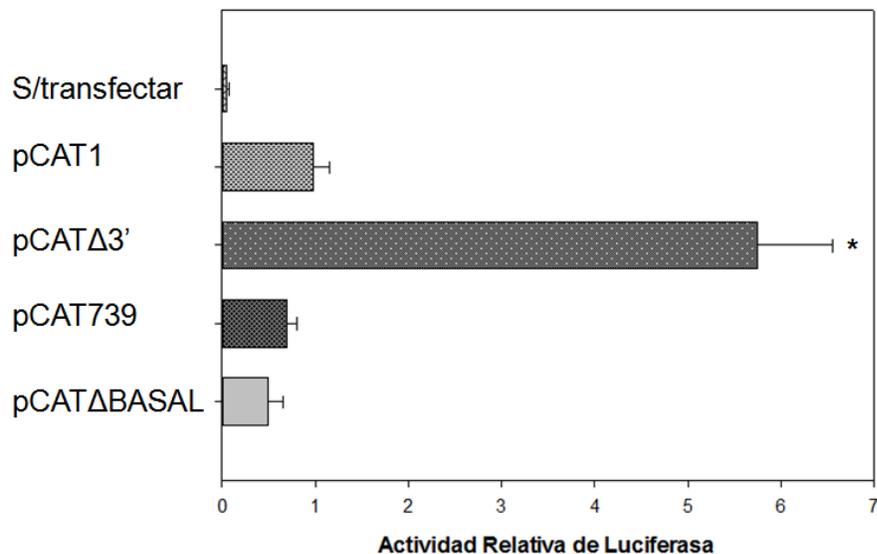


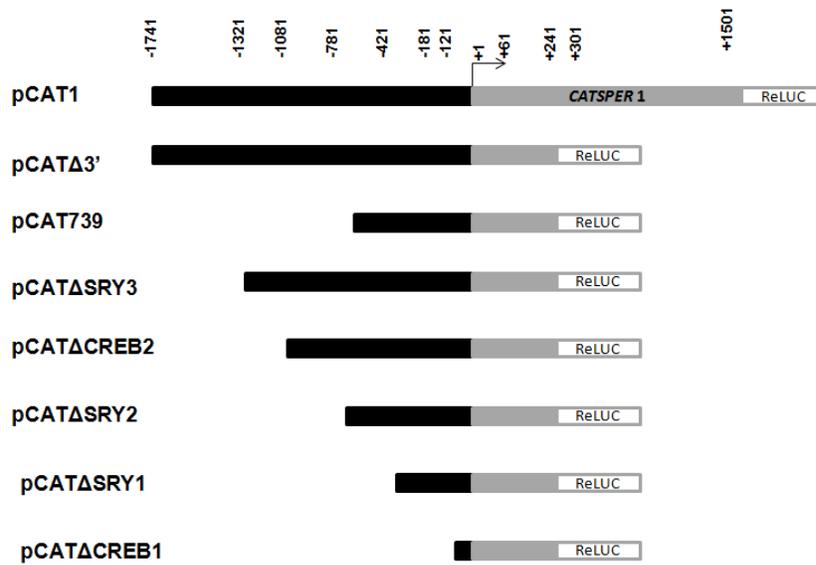
Fig. 21. Análisis de la construcción pCAT Δ BASAL usando transfección *in vitro* en la línea celular HEK 293. (A) Esquemas representativos de las construcciones que indican la posición en la que se encuentran dentro del promotor. (B) Evaluación de la actividad transcripcional de la

construcción pCAT Δ BASAL comparada con la construcción pCAT1, pCAT Δ 3', y el promotor de 739pb. En la construcción pCAT Δ BASAL se eliminaron las cajas ACAAT, TATAG y dos sitios CREB. * $P < 0.05$ comparada con pCAT1, pCAT739 y pCAT Δ BASAL (ANOVA seguido de un análisis de Bonferroni).

Como se puede observar, el análisis de la construcción pCAT Δ BASAL muestra una similitud con los antecedentes que se tenían referentes a la actividad transcripcional de la construcción pCAT1 respecto a la construcción pCAT Δ 3' ya que al deletar el extremo 3' del primer exón que no correspondía al promotor hay un incremento de la actividad transcripcional pero al delimitar al promotor a 739pb hay una disminución considerable en la actividad transcripcional del promotor del gen. Sin embargo al eliminar secuencias como cajas ACAAT, TATAG, el sitio de inicio de la transcripción y el sitio denominado CREB0 (debido que se encuentra muy cerca del sitio de inicio de la transcripción), no se afecta de manera considerable la actividad transcripcional ya que en la ausencia de estas cajas y sitios que pudieran ser importantes para la transcripción del gen, el gen se sigue transcribiendo en condiciones basales de manera similar al vector pCAT739. Por lo tanto, las cajas CCATTTT, cajas GGCGCCC, CREB1 y el sitio de reconocimiento al FT SRY1 así como el sitio al FT SRY0 (debido a que se encuentra río abajo del sitio de inicio de la traducción y porque comprende al promotor) podrían ser suficientes para la transcripción basal del gen *CATSPER 1* humano (Fig. 19).

En cuanto al análisis de las regiones de unión a factores de transcripción que se localizan río arriba del promotor fue medida la actividad transcripcional de todas las construcciones. Las deleciones en las que se eliminaron los sitios de reconocimiento a los FT SRY y CREB fueron comparadas con la construcción pCAT1, pCAT Δ 3' y la pCAT739. Todas las construcciones fueron normalizadas con la actividad de luciferasa de *Photinus* y se considero la construcción pCAT1 como expresión basal.

(A)



(B)

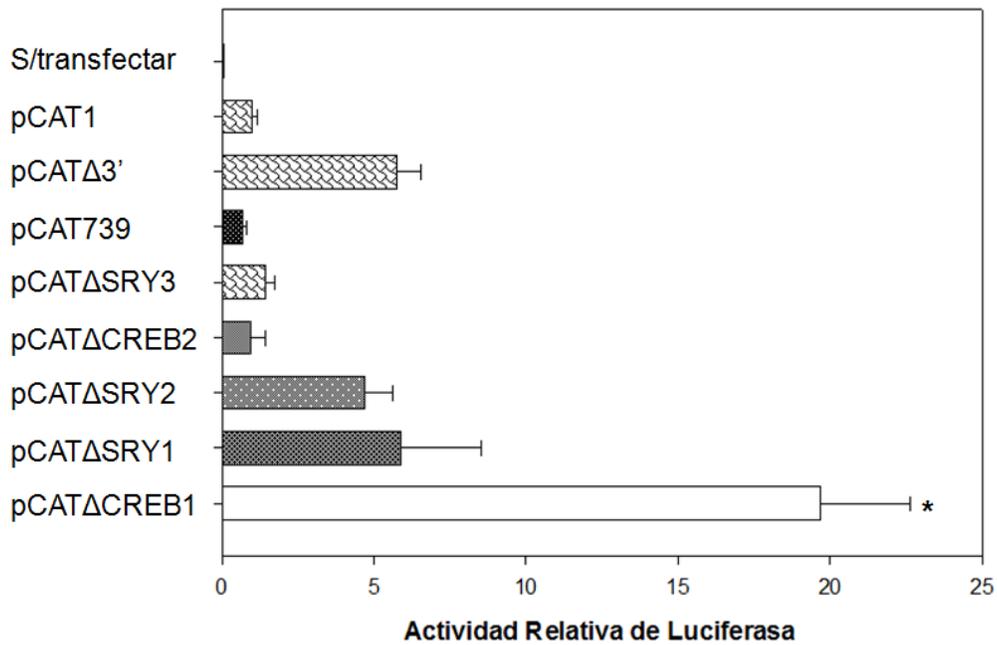


Fig. 22. Análisis de las construcciones pCATΔSRY3, pCATΔCREB2, pCATΔSRY2, pCATΔSRY1 y pCATΔCREB1 usando transfección *in vitro* en la línea celular HEK 293. (A) Esquemas representativos de las construcciones que indican la posición en la que se encuentran dentro del promotor. (B) Evaluación de la actividad transcripcional de las construcciones pCATΔSRY3, pCATΔCREB2, pCATΔSRY2, pCATΔSRY1 y pCATΔCREB1. * $P < 0.05$ comparadas con las construcciones pCATΔ3', pCATΔSRY2 y pCATΔSRY3 (ANOVA seguido de un análisis de Bonferroni).

Los resultados obtenidos del análisis de las deleciones del promotor conducen a que la eliminación de los sitios de unión a FT producen una disminución en la actividad transcripcional cuando estos están alejados del sitio de inicio de la transcripción, pero este efecto se revierte al eliminar los sitios cercanos al sitio de inicio de la transcripción y aumenta en los sitios más próximos. Ya que al eliminar el sitio SRY3 y CREB2 se disminuye significativamente la actividad transcripcional del gen indicando que estos FT podrían estar actuando como activadores de la transcripción. En contraste, al eliminar los sitios SRY2, SRY1 así como el sitio CREB1 se observa un incremento en la actividad transcripcional señalando que estos sitios están actuando como represores de la actividad transcripcional del gen cuando estos están presentes en el promotor.

Para determinar si el FT SRY está actuando como activador o represor de la actividad transcripcional de *CATSPER 1* se procedió a realizar ensayos de co-transfección con dicho factor.

9.3 Efecto de la sobreexpresión del factor transcripcional SRY en la actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1*

Con la finalidad de evaluar el efecto de la sobreexpresión del FT SRY sobre el promotor de *CATSPER 1* se realizaron ensayos de co-transfección.

Los ensayos de co-transfección se realizaron con la construcción pIRES-SRY, el mensajero de SRY se clonó en el vector de expresión pIRES-hrGFP este vector contiene el sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) entre el sitio de clonación múltiple (MCS) y la EGFP de la región codificante, esto permite que tanto el gen de interés (SRY) clonado en el MCS y el gen EGFP se traduzcan de manera independiente a partir de un RNAm bicistronico (Fig. 23).

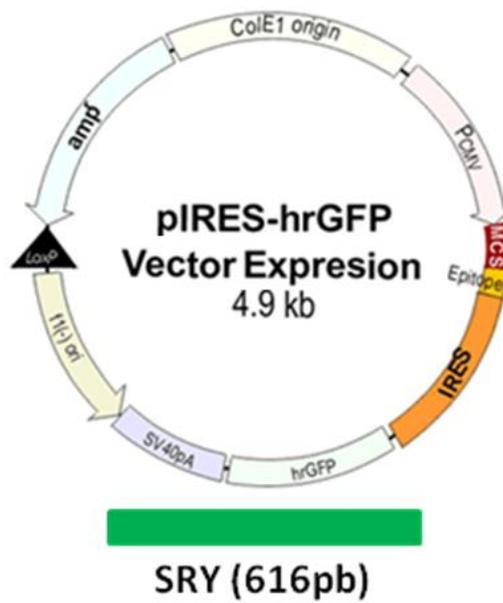


Fig. 23. Construcción pIRES-SRY en la cual el gen SRY se traduce de manera independiente respecto al gen de EGFP.

Previo a la co-transfección se hizo una transfección con la construcción pIRES-SRY en la línea celular HEK 293 con el objetivo de evaluar la expresión endógena de SRY en dicha línea (Fig. 24).

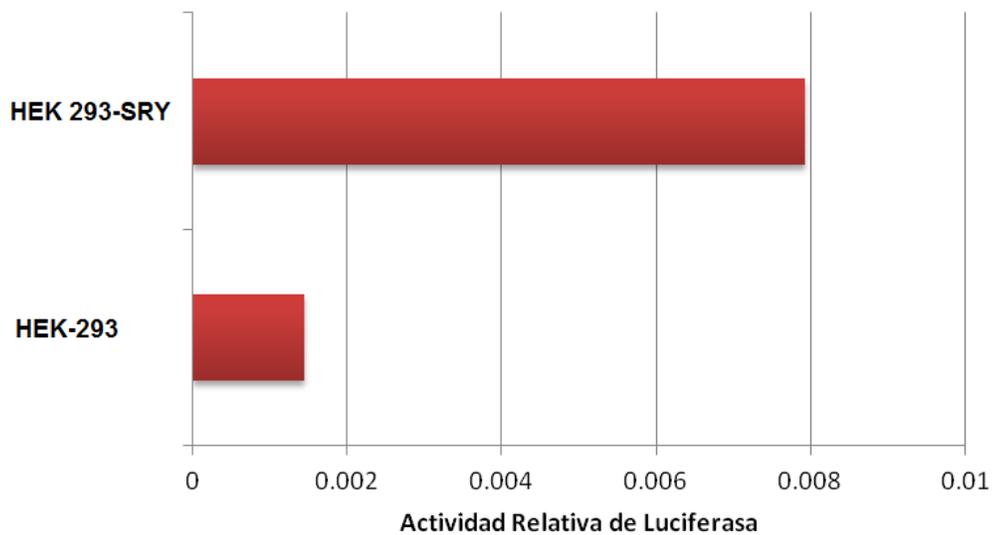


Fig. 24. Eficiencia de la transfección con el plásmido pIRES-SRY. Las células HEK 293 fueron transfectadas con y sin pIRES-SRY así como con el control endógeno pGL-CMV, del cual se evalúa la

expresión de luciferasa por su actividad como parámetro de eficiencia de transfección de ambos plásmidos.

La transfección en la línea celular HEK 293 con la construcción pIRES-SRY se hizo mediante las condiciones mencionadas en la metodología, en el apartado de co-transfección con TurboFect. Se empleó como control interno de transfección el plásmido pGL3-CMV para evaluar las células transfectadas. Los datos obtenidos de la transfección en la línea celular HEK 293 con la construcción pIRES-SRY demuestran buena eficiencia de la transfección, aunque en la figura 24 se observa una ligera señal de la línea celular sin transfectar comparada con la transfección con pIRES-SRY en donde denota un incremento de la actividad transcripcional sugiriendo que la mayoría de las células si fueron transfectadas con la construcción pIRES-SRY y pGL3-CMV.

Después de verificar que si fue transfectado el plásmido en células HEK 293, de estas células se obtuvieron el RNA total y la proteína para verificar la expresión y traducción de SRY. Posteriormente, a partir del RNA total se realizó la retrotranscripción del mensajero de SRY para la síntesis de cDNA y confirmar mediante un RT-PCR la presencia del transcrito en la línea celular transfectada y en células sin transfectar. Se confirmó la expresión de SRY en las células transfectadas y muy baja expresión de SRY endógeno en la línea celular sin transfectar (Fig. 25, carriles 6 y 4). Asimismo fue amplificado el transcripto proveniente de espermatozoides de humano (Fig. 25 carril 5). Por otra parte, la proteína total de células transfectadas y sin transfectar se utilizó para determinar la presencia de la proteína SRY mediante Western blot (Fig. 26).

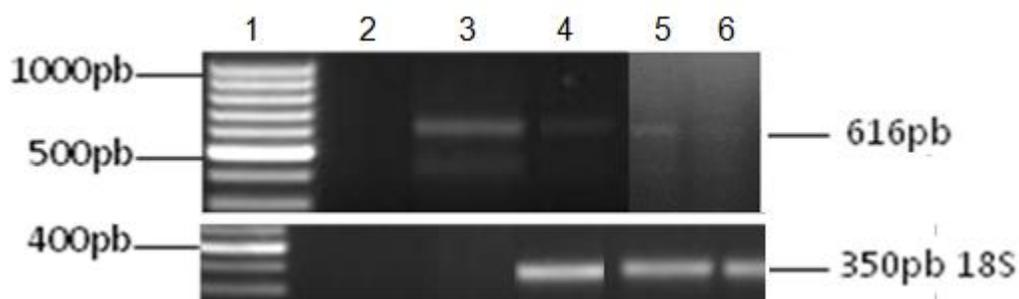


Fig. 25. Identificación del transcrito SRY en la línea celular HEK 293. De izquierda a derecha se muestra: 1) Peso molecular de 1Kb; 2) PCR del control negativo; 3) PCR del control positivo; 4) RT-PCR del cultivo celular de HEK 293; 5) RT-PCR de espermatozoides humanos; 6) RT-PCR de la transfección del FT SRY en la línea celular HEK 293, donde se observa un fragmento de amplificación de 616pb correspondiente al transcrito de SRY. También se muestra la amplificación del gen constitutivo 18S de 350pb que se empleó como control.

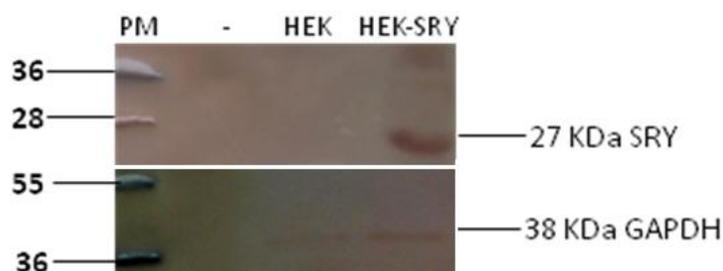


Fig. 26. Identificación de la proteína SRY en la línea celular HEK 293. De izquierda a derecha se muestra: PM (Peso molecular de 250KDa), Western Blot de: Control negativo, HEK 293 sin transfectar y HEK 293 transfectada con el FT SRY, donde se observa la proteína de SRY con un peso de 27KDa. La proteína GAPDH con un peso de 38KDa se empleó como control.

La proteína SRY pudo ser detectada en el extracto de HEK 293 transfectada y no así en las células sin transfectar, en tanto que se detectó la enzima GAPDH en ambos extractos celulares. El peso de SRY esperado es de 27kDa y este coincide con la detección observada en la proteína de HEK 293 transfectada (Fig. 26)

Con lo anterior se demostró mediante RT-PCR que sí hay expresión del RNAm endógeno del FT SRY en espermatozoide de humano y la línea celular HEK 293 sin transfectar. Asimismo, SRY se expresa en la línea celular HEK 293 transfectada con el plásmido pIRES-SRY, del cual fue posible detectar al FT SRY en la proteína total y

verificar su tamaño por western blot. Una vez comprobada la expresión del FT SRY y producción de su proteína en la línea celular HEK 293 transfectada se procedió a realizar los ensayos de co-transfección para evaluar su efecto sobre el promotor.

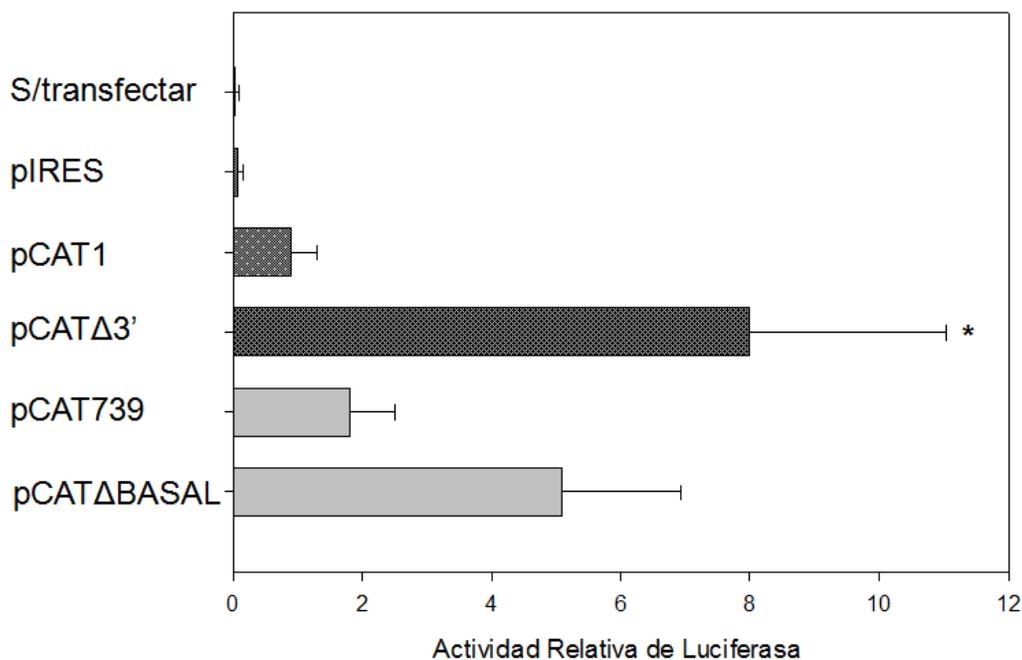


Fig. 27. Efecto de la sobreexpresión de SRY en la actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1*. La línea celular HEK 293 transfectada con las construcciones pCATΔ3', pCATΔ5', pCATΔBASAL, normalizada con la actividad del control endógeno pGL-CMV y se considera la actividad total de pCAT1 como una unidad de actividad relativa. Se empleó el plásmido pIRES como control negativo. * $P < 0.05$ comparada con pCAT1 y pCAT739 (ANOVA seguida por un análisis de Bonferroni).

En primera instancia, fueron analizadas las primeras construcciones obtenidas junto a la portadora de la delección de elementos de unión para la maquinaria de la transcripción basal. Los resultados obtenidos conducen a que la sobreexpresión del FT SRY en las construcciones pCATΔ3', pCAT739 y la pCATΔBASAL afecta de manera positiva en la actividad transcripcional al deletar las regiones 3' y 5' que flanquean al promotor, excepto para la construcción pCAT1 que se mantuvo igual que la transfección mostrada en la figura 21. A pesar de que la construcción pCATΔ3' parece comportarse de la misma manera, se observa que hay un ligero

incremento en la actividad transcripcional. Por otra parte, en las construcciones pCAT739 y pCAT Δ BASAL sí se observaron diferencias ya que la construcción pCAT739 tuvo un incremento de la actividad transcripcional casi al doble mientras que la construcción pCAT Δ BASAL se disparó aproximadamente cinco veces más de su actividad normal mostrada en la figura 21, sugiriendo que este factor podría estar actuando como activador transcripcional.

Por otra parte, también se evaluó la sobreexpresión del FT SRY con las deleciones generadas en el promotor de *CATSPER 1*.

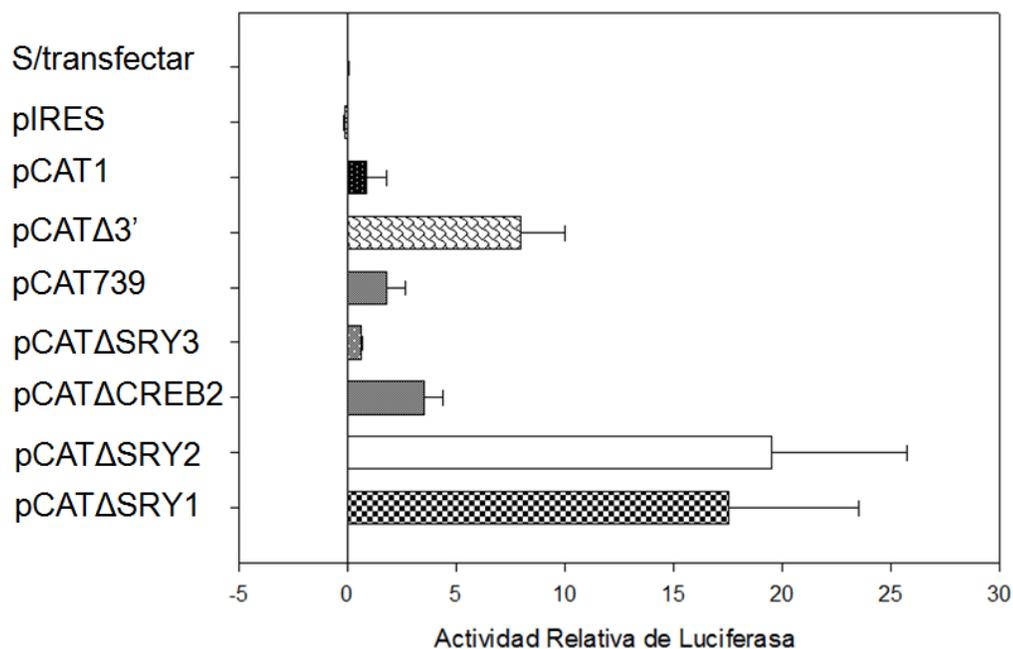


Fig. 28. Efecto de la sobreexpresión de SRY en la actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1*. La línea celular HEK 293 transfectada con las construcciones pCAT Δ 3', pCAT739, pCAT Δ SRY3, pCAT Δ CREB2, pCAT Δ SRY2 y pCAT Δ SRY1, normalizada con la actividad del control endógeno pGL-CMV y se considera la actividad total de pCAT1 como una unidad de actividad relativa. Se empleo el plásmido pIRES como control negativo.

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 28, las co-transfecciones con el FT SRY y el promotor con sus deleciones, sí tiene un efecto positivo en cuanto a la actividad transcripcional en comparación a la transcripción basal observada con las

mismas construcciones (Fig. 22) en ausencia del FT SRY. La mayoría de las construcciones tuvieron un incremento en la actividad transcripcional, en relación a la actividad de la construcción pCAT1 que se mantiene con la actividad transcripcional baja, a excepción de la construcción pCAT Δ SRY3 que tuvo una menor actividad relativa. Por otra parte, la construcción pCAT739 incrementó su actividad al doble, pCAT Δ CREB2 lo incrementó tres veces más, mientras que la construcción pCAT Δ 3' lo hizo hasta siete veces más en actividad. Sin embargo, las construcciones pCAT Δ SRY2 y pCAT Δ SRY1 fueron las que más dispararon su actividad casi veinte veces más que la construcción pCAT1. Contradictoriamente, a pesar de que estas construcciones han perdido los sitios de unión para el FT SRY, se observó un incremento en la actividad. Las construcciones mantienen el sitio SRY0, sugiriendo un papel importante en regulación para el sitio SRY0 localizado río abajo del sitio de inicio de la transcripción.

De acuerdo con lo anterior, la sobreexpresión del FT SRY también genera un aumento en la actividad transcripcional del promotor en las construcciones que conservan al promotor mínimo y no así cuando están presentes todos los sitios de unión. Por tanto, inducir la sobreexpresión del FT SRY sí favorece la actividad transcripcional del promotor *CATSPER 1* en ausencia de los sitios SRY 1 y 2, lo que indica que SRY 0 río abajo puede ser reconocido y activar la transcripción.

9.4 Análisis de la interacción *in vitro* de los sitios de unión a SRY del promotor *CATSPER 1* y el factor de transcripción SRY

La unión a los sitios de reconocimiento por el FT SRY se determinó *in vitro* usando sondas de DNA marcadas con ³²P y extracto total de proteína de la línea celular HEK 293 y proteína total de HEK 293 transfectada con la construcción pIRES-SRY. La unión de DNA-proteína se determinó mediante ensayos EMSA, descrito en el apartado de la metodología. Las sondas de DNA se diseñaron basadas en la presencia de los sitios de unión predichos en el promotor y se analizó en el programa bioinformático: TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3). Así mismo, se generaron mutaciones en los sitios de unión en otro par de

oligonucleótidos para verificar la especificidad por el sitio. Los oligonucleótidos con mutaciones fueron analizados por el programa para corroborar que las mutaciones eliminan el sitio de reconocimiento al FT SRY.

Las secuencias de las sondas empleadas para cada sitio se enlistan a continuación:

SRY3MUT

5'CTGTGTCTCAAAAAAAAAAAG**CCG**GAAAGA**GGG**CAAATGTGTATGAAGCAATCCTC 3'

SRY3WT

5'CTGTGTCTCAAAAAAAAAAAG**AA**GAAAGA**AA**CAAATGTGTATGAAGCAATCCTC 3'

SRY2MUT

5'GACAGTGAGACTGTCTCAAA**GGG**CA**GGG**CAAAAC**GGG**AAACATGGGCTGGGCGCAG3'

SRY2WT

5'GACAGTGAGACTGTCTCAAA**AA**CAA**AA**CAAAACA**AA**AAACATGGGCTGGGCGCAG 3'

SRY1MUT

5'CGAGACTCCATCTCAAAAAC**GGG**CAAAG**GG**AC**CC**CAACAACAACAACAACAAAACCAT 3'

SRY1WT

5'CGAGACTCCATCTCAAAAAC**AA**CAAAG**AA**ACA**AA**CAACAACAACAACAACAAAACCAT 3'

DHHT485C

5' CCTTGAGACTCTGCACGCGCTAGG 3'

Las bases nucleotídicas marcadas en rojo, indican donde se llevó a cabo la mutación. La longitud de los oligonucleótidos es larga debido a que serán utilizados para introducir las mutaciones en los plásmidos.

Los ensayos de unión fueron analizados en presencia de un exceso de competidor específico no marcado con ³²P (sondas silvestres) y un exceso de un competidor inespecífico (DHHT485C). En cada caso se esperaba que la unión correspondiente para cada sitio SRY de la sonda silvestre se viera afectada eficientemente debido a

la competencia con la sonda no marcada silvestre puesto que esta última se encuentra en exceso. En contraste, con la sonda inespecífica que mostrará la especificidad de la interacción en la que se continúa formando el complejo (Fig. 29).

SRY1WT	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SRY2WT	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SRY3WT	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SRY1WT*	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SRY2WT*	-	-	-	+	+	+	-	-	-
SRY3WT*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
T485C	-	+	-	-	+	-	-	+	-
(*Marcado con ³² P)									

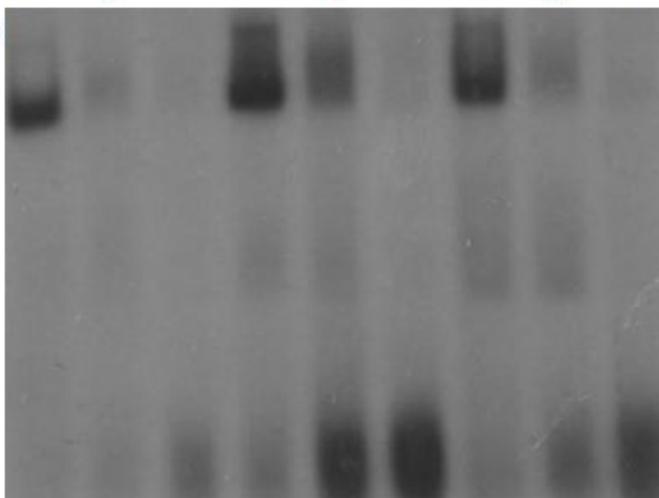


Fig. 29. Ensayo de competencia y retardamiento electroforético de los sitios de unión SRY del promotor de *CATSPER 1*. Los oligonucleótidos silvestres (1 pico mola) con los sitios de unión a SRY fueron incubados con extracto de proteína de HEK 293 transfectada con pIRES-SRY. Para determinar la especificidad de unión, se adicionó un exceso de sonda específica sin marcar o un exceso de sonda inespecífica (DHHT485C). Se emplearon 2pmolas de sondas específicas e inespecíficas que fueron incubadas con 10µg de extracto total de proteína.

Los ensayos de competencia demostraron la interacción DNA-proteína de manera específica para los sitios de unión a SRY del promotor *CATSPER 1* y el FT SRY. El exceso de oligonucleótido específico para cada uno de los sitios SRY desplaza la sonda marcada y no se forma el complejo DNA-proteína. El exceso de sonda específica sin marca tiene mayor posibilidad de interactuar con las proteínas

presentes en el extracto. En comparación, la sonda marcada, en ausencia de oligonucleótido competidor, forma el complejo y se aprecia en un peso mayor al de la sonda libre (Fig. 29). En cambio, con el exceso de sonda inespecífica se demuestra que la interacción de la sonda marcada con la proteína es específica, y que esta no es desplazada por el DNA sin sitio de unión a SRY2. Sin embargo se observó que los sitios SRY1 y SRY3 son desplazadas parcialmente por la sonda inespecífica. Lo anterior demuestra que existe interacción física entre el FT SRY sobreexpresado en células HEK 293 con los oligonucleótidos que portan los sitios SRY del promotor de *CATSPER 1*, con los que formó complejos DNA-proteína.

Para verificar si la unión corresponde al reconocimiento de los sitios dentro del oligonucleótido, se espera observar que el complejo DNA-proteína se forme sólo en los oligonucleótidos portadores del sitio SRY silvestre en tanto que los oligonucleótidos con sitios SRY mutantes no formen el complejo con SRY (Fig. 30 y 31). Los ensayos de retardo en la movilidad electroforética realizados con el extracto total de proteína de la línea celular HEK 293 mostraron interacción para los sitios silvestres que era como se esperaba ya que en ellos se encuentran los sitios de unión al FT SRY. Sin embargo, para los mutantes también apareció la formación del complejo DNA-proteína pero en una menor cantidad a los silvestres (Fig. 30 carriles 4 y 6). Solo en el sitio SRY2, las mutaciones introducidas evitan la formación del complejo con el SRY endógeno (Fig. 30, carril 5). El sitio SRY2 mutante generó la formación de un complejo muy por debajo del esperado, esto posiblemente se deba a la interacción inespecífica que pudo haber ocurrido con el extracto total de la proteína. Además, el extracto total de HEK 293 generó la formación de nuevos complejos además del complejo esperado de los sitios silvestres. Cabe señalar que la expresión endógena de SRY en las células HEK es baja y esto permitiría que otras proteínas se unieran al DNA.

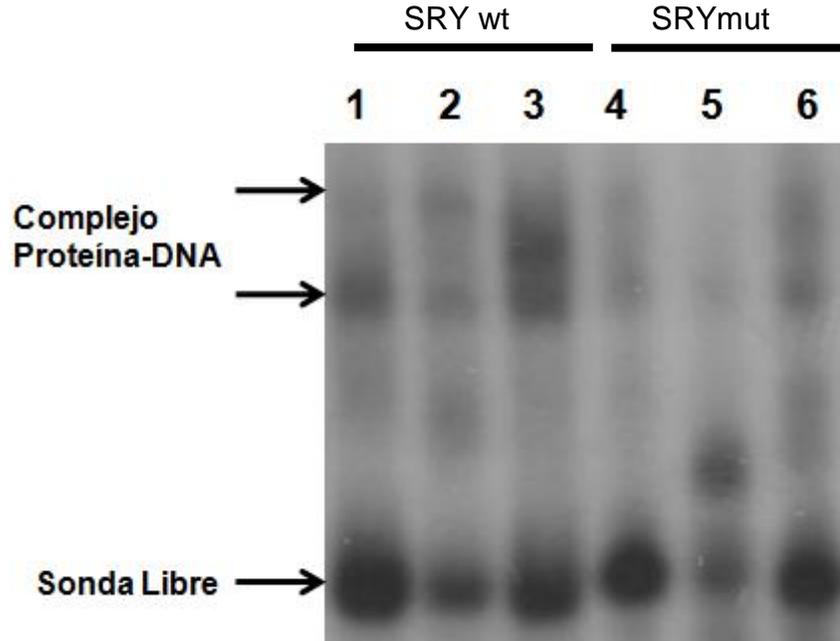


Fig. 30. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética para identificar la unión de SRY a sitios identificados dentro del promotor de *CATSPER 1*. Los EMSAs se usaron para determinar si ocurre interacción directa entre SRY y las regiones del promotor del gen *CATSPER 1*. Se empleó 1pmol de sonda marcada radioactivamente y se incubó con 10µg de extracto total de proteína de la línea celular HEK 293. Los carriles 1, 2 y 3 muestran la interacción de los sitios SRY 1, SRY2 y SRY3 silvestres, respectivamente dentro del promotor de *CATSPER 1*. Mientras que los carriles 4, 5 y 6 muestran la interacción de los sitios SRY1, SRY2 y SRY3 mutantes, respectivamente.

Lo anterior quizá se deba a que dentro del promotor de *CATSPER 1* hay varios sitios de reconocimiento al FT SRY en secuencias tándem (secuencia que se repite consecutivamente, una tras otra) y que posiblemente puedan estar interfiriendo en la interacción. Además de que SRY también presenta una secuencia consenso, **AACAAT** ó **AAGAAA**. Esta secuencia consenso presenta varias adeninas que posiblemente estén interfiriendo al momento de generar las mutaciones ocasionando que aún con las mutaciones generadas se permita la unión del FT SRY a la secuencia del promotor de *CATSPER 1*.

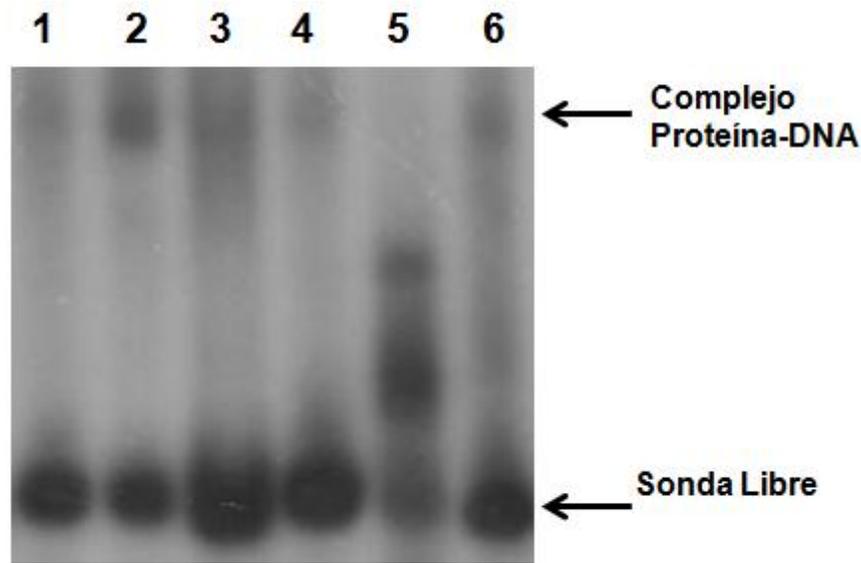


Fig. 31. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética para identificar si SRY se une directamente a sitios identificados dentro del promotor de *CATSPER 1*. Los EMSAs se usaron para determinar si ocurre interacción directa entre SRY y las regiones del promotor del gen *CATSPER 1*. Se empleó 1pmol de sonda marcada radioactivamente y se incubó con 10µg de extracto total de proteína de la línea celular HEK 293 transfectada con la construcción pIRES-SRY. Los carriles 1, 2 y 3 muestran la interacción de los sitios SRY 1, SRY2 y SRY3 silvestres, respectivamente dentro del promotor de *CATSPER 1*. Mientras que los carriles 4, 5 y 6 muestran la interacción de los sitios SRY1, SRY2 y SRY3 mutantes, respectivamente.

Por otra parte, los ensayos de retardo de la movilidad electroforética realizados con el extracto total de proteína de la línea celular HEK 293 transfectada con la construcción pIRES-SRY mostraron interacción con los sitios silvestres ya que en ellos se encuentran los sitios de unión al FT SRY. A diferencia del extracto de HEK293 sin transfectar, la sobreexpresión de SRY genera un solo complejo ADN-proteína en los tres sitios silvestres. Sin embargo, para los sitios mutados también apareció la formación del complejo DNA-proteína excepto para el sitio SRY2. El sitio SRY2 mutante al parecer generó la formación de un complejo muy por debajo del esperado, descartando que sea el complejo DNA-proteína para el FT SRY, dado el peso molecular de la proteína SRY. Posiblemente se deba a la interacción inespecífica que pudo haber ocurrido con el extracto total de la proteína. Sin embargo, comparado con la fig. 30 donde muestra el EMSA en la línea celular HEK

293 sin transfectar, la formación de los complejos se hacen aún más específicos para las sondas silvestres incluso para las mismas sondas mutadas puesto que ya no aparecen los complejos que se formaban por debajo del esperado. Lo anterior indica que posiblemente los complejos que estamos observado en la fig. 31, tanto para las sondas silvestres y para las mutantes corresponda al complejo promotor *CATSPER* 1-SRY.

Se observó que solo el sitio SRY2 mutado evita la formación del complejo DNA-proteína, a diferencia de SRY1 y SRY3 que continúan formando complejos a pesar de sus mutaciones. Para estos dos sitios SRY, es posible la formación de complejos debido al alto contenido de adeninas que proporcionan otros sitios parecidos al SRY aunque no sean consenso. Por otra parte, la adición de un anticuerpo contra el FT SRY causaría un super-retardo para cada caso y confirmaría la identidad de que la proteína que causa el retardo en el gel es precisamente SRY.

10. DISCUSIÓN

El equipo de trabajo determinó, mediante un análisis bioinformático y la técnica de rápida amplificación de extremos de cDNA (RACE) el sitio de inicio de la transcripción así como la delimitación del promotor a 739pb, -500pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y +239pb que correspondían a parte del primer exón. Para ello se obtuvieron construcciones, donde se tenía clonado la región genómica de *CATSPER 1* (pCAT1) que posteriormente fue acortada en el extremo 3' mediante delección sitio dirigida por PCR, generando una construcción denominada pCAT Δ 3' donde se eliminó parte del primer exón que no correspondía al promotor y de esta última se delimitó el promotor a 739pb (pCAT739). Se evaluó la actividad transcripcional de cada construcción mediante transfección *in vitro* en la línea celular HEK 293 observando un incremento en actividad transcripcional al eliminar parte del primer exón que no corresponde al promotor. Sin embargo, al delimitar al promotor la actividad transcripcional disminuye, esto podría deberse a que en esta región se encuentran sitios de reconocimiento a FT importantes para la regulación del gen *CATSPER 1*.

Es por ello que en el presente estudio se analizó la secuencia del promotor del gen *CATSPER 1* para identificar los sitios de unión a FT por medio de los programas: Mat-inspector (<http://www.genomatix.de>) y Mapper (<http://bio.chip.org/mapper>). Dentro de la secuencia del promotor se identificaron varios de sitios de unión a FT tales como CREB, EREF, OCT-1, SRY, Sp1, SOX5 (Fig. 9). Sin embargo, la mayor parte de la secuencia del promotor contiene varios sitios de reconocimiento a los FT SRY y CREB (Fig. 19). A pesar de no mostrar la posición de los sitios de unión de los FT mencionados anteriormente, se sabe que algunos son importantes para reclutar la maquinaria transcripcional basal, tal es el caso de OCT1 el cual pertenece a la familia de proteínas con homeodominios. Esta proteína se une a una secuencia específica octamérica (ATGCAAAT) y puede también regular negativamente a ciertos genes (Zhao *et al.* 2000). Sp1 es otro factor transcripcional que se expresa de forma

ubicua, contiene un motivo de dedos de zinc mediante el cual se une directamente al DNA, específicamente a elementos ricos en GC (cajas GC) y favorece la transcripción. Estudios recientes muestran que Sp1 no solo interacciona de forma directa con factores transcripcionales basales incluyendo TFIID, también se asocia físicamente y coopera funcionalmente con otros factores como OCT1 y GATA (Yuan *et al.* 2005).

Por otra parte, dentro de la secuencia del promotor también se encontraron sitios de reconocimiento a FT importantes para el desarrollo sexual masculino, tal es el caso de SRY quien funciona como switch genético en la cresta gonadal durante el inicio de la determinación testicular (Dubin y Ostrer 1994). Sin embargo, se desconoce su función durante la fase adulta. Por su parte, SOX 5 no ha mostrado participación en el desarrollo testicular comparado con SOX9, el cual se expresa durante el desarrollo testicular de mamíferos y SOX8 el cual muestra un fenotipo de esterilidad masculina en mutantes (Barrionuevo y Scherer 2010). Así mismo, fueron identificados sitios de unión a CREB en el promotor de *CATSPER 1*, la cual es una proteína de unión al elemento de respuesta cAMP y por tanto dependiendo de los niveles de este hace que se aumente o disminuya la transcripción. Un aumento en el cAMP por la adenilato ciclasa hace que se active la PKA (Proteína cinasa A), la cual atraviesa el citosol hasta llegar al núcleo y fosforilar el KID (Dominio inducible por cinasa) de CREB, este a su vez genera la unión de CBP, que es la proteína de unión a CREB, favoreciendo de esta manera la unión de la burbuja transcripcional (Don *et al.* 2002). Por último, el factor de receptor de estrógenos, presenta un motivo de unión al DNA (TGACCT) presente en dos sitios dentro del promotor de *CATSPER 1*, y dos isoformas ER α y ER β están presentes en el espermatozoide. El estrógeno es el producto final obtenido de la transformación irreversible de los andrógenos por la aromatasa, por lo tanto cuando se da la unión de esta hormona esteroidea al receptor se convierte en un factor competente transcripcionalmente regulando de esta manera un balance entre andrógenos y estrógenos que permiten el desarrollo sexual normal (Carreau *et al.* 2007).

Por otro lado, se analizó la secuencia del promotor de *CATSPER 1* y se demostró que no presenta caja TATA, el elemento TATA es el principal responsable del posicionamiento de la maquinaria transcripcional basal sobre el promotor. Sin embargo están presentes otras secuencias importantes que le ayudan a reclutar la maquinaria transcripcional basal como son: la caja CAAT, la cual juega un papel importante en la determinación de la eficiencia del promotor y es reconocida en distintos promotores por factores diferentes, como los C/EBP y Sp1. Estos factores tienen la capacidad de interactuar con otros mediante interacciones proteína-proteína y atraen a los factores unidos a la proximidad del complejo de iniciación de la transcripción, para dar comienzo a esta. Por otra parte, el promotor también contiene elementos iniciadores (Inr), de los cuales existe evidencia de su capacidad para formar complejos de transcripción, incluyendo componentes del complejo TFIID ó un específico activador (Sp1) río arriba comúnmente encontrado en muchos promotores sin caja TATA (Weis *et al.* 1997). Recientemente se ha demostrado que los elementos iniciadores (Inr) juegan un papel central como core de promotores, en combinación con elementos río abajo y sitios CRE localizados río arriba que también contribuyen a la actividad del promotor, característica de la regulación de genes haploides específico de células germinales de testículo (Ike *et al.* 2004; Somboonthum *et al.* 2005).

El análisis de estos resultados preliminares son indicativos de que el promotor de *CATSPER 1* contiene diferentes sitios de unión a factores de transcripción importantes para reclutar la maquinaria transcripcional basal: OCT-1 y Sp1 al igual que para factores relacionados con la determinación sexual masculina, regulados por cAMP y estrógenos, SRY, Sox5, CREB y EREF, respectivamente. A pesar de carecer de caja TATA, posee otras secuencias esenciales que ayudan al reclutamiento de la maquinaria transcripcional basal para establecer la burbuja transcripcional, como la caja CAAT, elementos Inr (CCATTTT) y secuencias ricas en GC, de tal forma que estos elementos le confieren su capacidad como región promotora del gen *CATSPER 1* de humano.

10.1 Identificación de regiones importantes en la construcción pCATΔBASAL para dar inicio a la transcripción del gen *CATSPER 1*

La evaluación de elementos iniciadores de la transcripción se realizó por la eliminación de dichas señales en el promotor. Se hizo una construcción denominada pCATΔBASAL donde se deletaron las cajas ACAAT, TATAG, dos sitios CREB (CREB1 y CREB0) y el sitio de inicio de la transcripción; las cajas que se mantuvieron fueron las siguientes: CCATTTT (elementos iniciadores, Inr), GGCGCCC, el sitio de unión a SRY1 y SRY0 (localizado río abajo del sitio de inicio de la traducción). Lo anterior se hizo con la finalidad de evaluar si estos elementos son importantes para dar inicio a la transcripción basal.

La construcción pCAT1 muestra un comportamiento similar a los datos mostrados en los antecedentes, donde se observa actividad transcripcional. Sin embargo, con la construcción pCATΔ3' hay un incremento en actividad superando la construcción pCAT1 mientras que la construcción pCAT739 disminuye drásticamente sugiriendo que posiblemente se debe a la falta de sitios de unión a factores de transcripción que estén regulando la expresión del gen *CATSPER 1* (Fig. 21B). Por otra parte, la comparación de la actividad transcripcional de la construcción pCAT739 con la construcción pCATΔBASAL indica que no hay diferencia significativa, ya que a pesar de haber eliminado cajas que pudieran estar involucradas en la actividad transcripcional basal, los resultados muestran que la ausencia de ésta no impide el inicio a la transcripción del gen puesto que sí hay una actividad transcripcional basal. A pesar de haber eliminado el SIT principal, es probable que el inicio de la transcripción ocurra en el otro SIT secundario, detectado por RACE5', que se conserva en la construcción.

Además, el promotor de *CATSPER 1* contiene elementos iniciadores o secuencias CCATTTT, las cuales son similares a la secuencia consenso Inr PyPyANA/TPyPy que envuelve el sitio de inicio de la transcripción en promotores con ausencia de caja TATA (Smale y Baltimore 1989). Asimismo, se ha reportado que las funciones de varios iniciadores que se encuentran en promotores sin caja TATA han sido

apoyados por secuencias río abajo (Ike *et al.* 2004). Por lo que en la construcción pCATΔBASAL la única secuencia que se mantiene río abajo y que posiblemente pudieran estar ayudando a los elementos iniciadores localizados río arriba, son las cajas GC (Fig. 19). Adicionalmente, las cajas GC interaccionan con el factor transcripcional Sp1 para favorecer la transcripción (Yuan *et al.* 2005). Por otra parte en la construcción pCATΔBASAL también se mantienen dos sitios de reconocimiento al factor transcripcional SRY (SRY1 y SRY0) el cual se ha sido propuesto para actuar como activador (Cohen D., *et al.* 1994; Dubin RA, Ostrer H. 1994) y como represor de la transcripción (McElreavey *et al.* 1993; Desclozeaux *et al.* 1998; Oh, Li, Lau, 2005). Lo que observamos al co-transfectar la construcción pCATΔBASAL fue la activación de la transcripción bajo la sobreexpresión de SRY (Fig. 27). Estos resultados indican que este factor podría estar actuando como activador transcripcional ya que al permanecer intacto y a pesar de eliminar el sitio de inicio de la transcripción así como cajas ACAAT, TATAG y dos sitios CREB (CREB1 y CREB0) la transcripción es activada. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la región denominada como BASAL (Fig. 21), la cual presenta cajas CCATTTT (elementos iniciadores, Inr), GGCGCCC, un núcleo (core) dentro del promotor y el sitio de unión a SRY1 y SRY0, son suficientes para dirigir la transcripción del gen.

10.2 La delección secuencial del promotor favorece la actividad transcripcional de CATSPER 1

Al delimitar el promotor a 739pb y evaluar su actividad transcripcional se observó que hay una disminución en la actividad transcripcional y que, posiblemente, se deba a la falta de regiones importantes de reconocimiento a factores de transcripción que estén regulando la expresión del gen. Al analizar la secuencia del promotor se observó que se encontraban sitios de unión para los factores de transcripción SRY y CREB río arriba.

El gen de SRY (Región determinante de sexo del cromosoma Y) se localiza en el brazo corto del cromosoma Y, el cual cumple con el requisito genético y conceptual del factor determinante de testículo (TDF). SRY se expresa en la cresta genital al

inicio de la diferenciación gonadal tanto en ratones y hombre (Hacker *et al.* 1995; Hanley *et al.* 2000). Aunque SRY ha sido inequívocamente designado como el TDF en los mamíferos, sus funciones van más allá de la determinación del sexo, pero no están claros. Como factor de transcripción, se ha demostrado que SRY se une y dobla al DNA para iniciar la transcripción (Haqq *et al.* 1994; Haqq y Donahoe, 1998; Harley *et al.* 2003). También se ha reportado que juega un rol importante en el splicing del RNAm (Ohe *et al.* 2002), indicando que este podría tener múltiples funciones.

Recientemente se han encontrado evidencias de los roles adicionales de SRY en el testículo humano. A diferencia del ratón, la expresión temporal de SRY en el hombre no está limitada al periodo de organogénesis testicular. Se han realizado estudios a un número limitado de fetos humanos y muestras de testículo adulto en donde se ha demostrado la presencia de transcritos de SRY (Clepet *et al.* 1993; Hanley *et al.* 2000; Olesen *et al.* 2001). Sin embargo, la localización celular del RNAm, particularmente en testículo adulto, es desconocida. Aunque la expresión de la proteína SRY ha sido reportada en células de Sertoli y en células germinales de fetos y testículo adulto (Salas-Cortes *et al.* 1999, 2001).

Por otra parte, en respuesta a señales extracelulares, como estimulación hormonal o cambios en los niveles de AMPc conducen a una variedad de respuestas incluyendo la alteración de la transcripción de algunos genes eucarióticos. Esta activación transcripcional es mediada a través de elementos responsivos a AMPc (CRE, Comb *et al.*, 1986; Weih *et al.*, 1990). El CRE es reconocido por una familia de proteínas de unión al DNA, la familia CREB/ATF, entre las cuales la proteína de unión a CRE (CREB) es la más caracterizada (Montminy y Bilezikjian, 1987; Yamamoto *et al.* 1988). En 1988 Hoeffler y colaboradores aislaron ADNc's que codifican para CREB en placenta de humano y González en 1989 los obtuvo de cerebro de rata, identificando a CREB como una proteína bZIP (proteína con una región básica y un zipper de leucina). Ambos dominios de dimerización la región básica y el zipper de leucina son esenciales para la unión del DNA y la activación de la transcripción

(Dwarki *et al.* 1990). Sin embargo, a CREB y CREM (Modulador del Elemento Respuesta a AMPc) son expresados en una variedad de isoformas, algunos de las cuales son inhibitorias a la transcripción inducida por AMPc. CREB es predominantemente un modulador positivo de genes responsivos a AMPc. No obstante, en el testículo, el resultado del corte y empalme alternativo es la expresión de isoformas represoras de CREB (Girardet *et al.* 1996; Walker *et al.* 1996).

De acuerdo con lo anterior y con la importancia que tienen los factores de transcripción SRY y CREB en la regulación de ciertos genes. En este estudio se evaluó la actividad transcripcional del gen *CATSPER* 1 mediante la eliminación de sitios de reconocimiento a los FT anteriormente mencionados con la finalidad de determinar la participación de estos factores de la transcripción de dicho gen.

Se realizaron deleciones mediante PCR sitio-dirigida y posteriormente se hizo transfección *in vitro* en la línea celular HEK 293. La gráfica mostrada en la figura 22B determina la actividad de la región promotora con cada una de las deleciones empleadas (pCATΔSRY3, pCATΔCREB2, pCATΔSRY2, pCATΔSRY1, pCATΔCREB1). Así mismo, se comparo con las construcciones pCAT1, pCATΔ3' y el promotor de 739pb.

Los resultados obtenidos demuestran que al eliminar los sitios de unión a los factores de transcripción SRY y CREB alejados del SIT, la expresión de la actividad transcripcional del gen *CATSPER* 1 se regula de manera positiva. La eliminación de estos sitios disminuye la actividad transcripcional. A su vez, al eliminar los sitios SRY2, SRY1 así como el sitio CREB1 cercanos al SIT, se observa un incremento en la actividad transcripcional señalando que estos sitios actúan como represores de la transcripción del gen cuando estos están presentes en el promotor.

De acuerdo con lo anterior, SRY se le ha vinculado con múltiples funciones pero se desconoce la función que desempeña en el testículo en la fase adulta. Con este estudio se demuestra que se encuentra regulando la expresión del gen *CATSPER* 1 ya sea de manera positiva o negativa de acuerdo con la posición respecto al sitio de

inicio de la transcripción. Además se ha demostrado que SRY puede actuar como activador (Cohen *et al.* 1994; Dubin y Ostrer 1994) y como represor de la transcripción (McElreavey *et al.* 1993; Desclozeaux *et al.* 1998; Oh, Li, Lau, 2005). El dominio de unión de la caja de HMG (Grupo de Alta Movilidad) de Sry de ratón se une selectivamente a la secuencia NACAAT *in vitro* pero con mayor afinidad a la secuencia AACAAT para activar la transcripción (Dubin y Ostrer 1994). Dentro del promotor de *CATSPER 1* se encuentran las secuencias AAACAAA y AAAGAAA como sitios de unión al factor de transcripción SRY, las cuales son muy similares al dominio de unión de la caja HMG de Sry de ratón. Estas secuencias se encuentran en repeticiones tándem y posiblemente puedan estar atrayendo varios factores de transcripción para actuar de manera positiva o negativa en la regulación del gen *CATSPER 1*. Además, en 1998, Desclozeaux y colaboradores demostraron que la fosforilación es un mecanismo pos-traducciona que afecta la regulación del gen SRY ya que este evento de fosforilación regula positivamente la unión de SRY al DNA. Además de la capacidad de SRY fosforilado como inhibidor de la actividad basal ante múltiples sitios de unión de SRY al DNA. De acuerdo con lo anterior, este efecto pos-traducciona podría ser la respuesta al mecanismo de regulación que este generando SRY sobre el promotor *CATSPER 1*.

Por otra parte, el factor de transcripción de la proteína de unión al elemento respuesta al AMPc (CREB) pertenece a una familia de genes blanco con elementos responsivos a AMPc (CREs) constituidos por una secuencia consenso TGACGTCA (Sassone-Corsi *et al.*, 1998). La secuencia del promotor presenta una secuencia de unión a CREB muy similar al consenso, TGACATCA. Los resultados mostrados en la figura 22B indican que el sitio CREB2 actúa como activador mientras que el sitio CREB1 como represor de la actividad transcripcional. Por otra parte, CREB y CREM son conocidos por ser expresados en una variedad de isoformas, algunos de los cuales son inhibitorios para la transcripción inducida por AMPc. CREB es predominantemente un modulador positivo de genes responsivos a AMPc. Sin embargo, en el testículo, el resultado del corte y empalme alternativo es la expresión

de isoformas represoras de CREB ((Girardet C. *et al.* 1996; Walker WH. *et al.* 1996). Así mismo, se sabe que la transcripción del gen CREM es bajo el control de cuatro promotores, P1-P4. La activación del promotor P1 genera un ARNm codificante para isoformas activadoras y represoras de CREM. La regulación negativa de la transcripción mediada por CRE se logra por el promotor P2 el cual codifica para la represión temprana por AMPc inducido (ICER) (Molina *et al.* 1993; Stehle *et al.* 1993; Monaco *et al.* 1995).

Debido a que ambos factores de transcripción CREB y CREM se unen a la misma secuencia consenso y, además, la secuencia encontrada dentro del promotor de *CATSPER 1* es muy parecida al consenso, posiblemente los dos factores de transcripción puedan estar participando en la unión a dicha secuencia para regular la actividad transcripcional del gen *CATSPER 1*. Además, se han demostrado que CREM participa en la espermatogénesis ya que ratones knock-out para CREM son estériles debido al arresto de la espermatogénesis en la etapa de espermátida redonda (Blendy *et al.* 1996). Con este trabajo podemos postular que, posiblemente ambos factores podrían intervenir en la regulación del gen *CATSPER 1* a través de sus isoformas, tanto activadoras como represoras. Aún faltan estudios por hacer para determinar la participación de ambos o descartar alguno.

10.3 La sobreexpresión del factor transcripcional SRY favorece la actividad transcripcional del gen *CATSPER 1*.

Como hemos venido discutiendo acerca de la participación de SRY en la regulación del gen *CATSPER 1*, que posiblemente active la transcripción de dicho gen, se procedió a evaluar la sobreexpresión de SRY sobre el promotor.

La figura 27 muestra el resultado obtenidos de las co-transfecciones con el factor transcripcional SRY para las construcciones pCAT1, pCAT Δ 3', pCAT739 y pCAT Δ BASAL. En el cual podemos observar que hay incremento de la actividad transcripcional incluso más del doble para todas las construcciones excepto para la construcción pCAT1, comparada con la figura 21B. El incremento de la actividad

transcripcional posiblemente se deba a que río arriba del sitio de inicio de la traducción se encuentra un sitio SRY denominado SRY0, el cual puede estar actuando como activador transcripcional ya que si se observa detalladamente en la construcción pCAT Δ 3' el incremento es mucho mayor y a pesar de que contenga los sitios SRY3, SRY2 y SRY1, sólo el sitio SRY3 y SRY0 son los activadores que favorecen la actividad transcripcional del gen *CATSPER 1*. El mismo comportamiento muestra el resultado de la figura 29.

10.4 Interacción del factor transcripcional SRY y el promotor del gen *CATSPER 1*

El gen SRY codifica para el factor transcripcional el cual contiene el dominio HMG (grupo de alta movilidad) que se une a la secuencia consenso A/TA/TCAA/T en el promotor del DNA, causando el plegamiento de este (Miyata *et al.* 1996) y la formación del complejos con proteínas co-represoras/enhancers que alteran la expresión de genes (Wilson y Koopman, 2002).

A través de los EMSAs se pudo determinar la unión del factor transcripcional SRY a la secuencia consenso del promotor *CATSPER 1*, **AACAAT** ó **AAGAAA**. Se identificaron tres sitios de unión al factor de transcripción SRY dentro del promotor del gen *CATSPER 1*: SRY3, SRY2 y SRY1. Se empleo proteína total extraída de la línea celular HEK 293 y transfectada con el plásmido pIRES-SRY. En ambos casos se observó que únicamente el sitio SRY2 mostraba diferencia al ser mutado (Fig. 29 y 30, respectivamente) ya que al no encontrarse el sitio no se formaba el complejo DNA-proteína comparado con las mutantes de los sitio SRY3 y SRY1, los cuales seguían mostrando la formación del complejo en menor concentración que los silvestres. Estos resultados se obtuvieron tanto para las muestras con proteína total de HEK 293 sin transfectar y transfectada. Sin embargo, en los EMSA donde sólo había proteína total de HEK 293 se observa la presencia otras bandas de menor tamaño que la esperada para SRY, debido posiblemente a la presencia de co-proteínas (Fig. 29). Respecto al EMSA para HEK 293 transfectada la bandas son más específicas y únicamente muestra diferencia en el sitio SRY2 mutado. También

se realizaron ensayos de competencia para identificar la especificidad de cada sitio (Fig. 31).

Con base en lo anterior, se esperaba que los sitios mutados no formen complejos DNA-proteína. Sin embargo, sólo en el sitio SRY2 no se formó indicando que quizá este sitio fuera el más importante para la regulación del gen *CATSPER 1*. Debido a la nula información que se tiene en cuanto a la regulación de este gen y a la participación del factor transcripcional SRY en su regulación, consideramos que la formación de estos complejos se deba posiblemente a que como hay secuencias en tándem que reconocen al factor transcripcional SRY, las mutaciones generadas no son suficientes para eliminar el sitio de unión dentro del promotor.

11. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permitieron identificar varios sitios de reconocimiento a los factores de transcripción SRY y CREB, los cuales regulan al gen *CATSPER 1* de manera positiva o negativa de acuerdo con la posición respecto al sitio de inicio de la transcripción. Al parecer SRY no solo es importante durante el desarrollo embrionario, con este estudio se demuestra que en la fase adulta tiene una participación importante en la regulación del gen *CATSPER 1* ya que ambos se expresan específicamente en testículo. Lo relevante del proyecto es que se ha demostrado un papel regulador de SRY en la fase adulta de testículo, aun no reportada. Por otra parte, CREB y CREM también parecen tener una participación en la regulación de *CATSPER 1*. Sin embargo, estudios futuros podrían determinar si ambos participan o sólo CREB es el encargado de regular la transcripción de *CATSPER 1*.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado E., Caracterización del promotor *CATSPER 1* determinante de la movilidad del espermatozoide. México D.F, 2010. Tesis de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular. IPN, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. 113p.
- Arnoult C., Cardullo R., Lemos J. & Florman H. 1996 Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. PNAS; 93:13004–13009.
- Arnoult C., Kazam I., Visconti P., Kopf G., Villaz M. & Florman H. 1999 Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. PNAS; 96:6757–6762.
- Avidan N., Tamary H., Dgany O., Cattan D., Pariente A., Thulliez M. & Borot N. 2003 *CATSPER2* a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. European Journal of Human Genetics; 11:497-502.
- Barrionuevo F. & Scherer G. 2010 SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. Int J Biochem Cell Biol. 42(3):433-6.
- Blendy JA., Kaestner KH., Weinbauer GF., Nieschlag E. & Schutz G. 1996 Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. Nature; 380:62–165.
- Capel B., Swain A., Hacker A. & Walter M. 1993 Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. Cell; 73(5):1019-1030.
- Carlson E., Westenbroek E., Quill T., Ren D., Clapham D., Hille B., Garbers D. & Babcock D. 2003 CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. PNAS; 100:25:14864–14868.

- Carpenter AT. 1987 Gene conversion, recombination nodules, and the initiation of meiotic synapsis. *Bioessays*; 6:232–236.
- Carreau S., Silandre D., Bois C., Bouraima H., Galeraud I. & Delalande C. 2007 Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochemica et Cytobiológica*; 45:5-10.
- Chung J., Navarro B., Krapivinsky G., Krapivinsky L. & Clapham DE. 2011 A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun*; 2:153.
- Clepet C., Schafer A., Sinclair A., Palmer MS., Lovell-Badge R. & Goodfellow PN. 1993 The human SRY transcript. *Human Molecular Genetics*; 2:2007–2012.
- Cohen D., Sinclair A. & McGovern J. 1994 Sry protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:4372–4376
- Comb M., Birnberg N., Seasholtz A., Herbert E. & Goodman, H. 1986 A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*; 323:353-356.
- Darszon A., Lopez P., Acevedo J., Hernández A. & Treviño C. 2006 T-type Ca^{+2} channels in sperm function. *Cell Calcium*; 40:241–252.
- de Rooij DG. 2001 Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*; 121:347–354.
- Desclozeaux M., Poulat F., Barbara P., Capony J., Turowski P., Jay P., Mejean C., Moniot B., Boizet B. & Berta P. 1998 Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem*; 273:7988–7995

- Don J. & Stelzer G. 2002 The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*; 187:115-124.
- Dubin R. & Ostrer H. 1994 Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol*; 8:1182–1192
- Dwarki, V., Montminy M. & Verma, I. 1990 Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J.* 9:225-232.
- Garner D. & Hafez E. 2002 Capítulo 7 Espermatozoides y plasma seminal, Reproducción e Inseminación Artificial en Animales, 7ed, editorial. Mc Graw Hill Interamericana,
- Giguère V. 1991 Application of the firefly luciferase reporter gene, in *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols.*, U.S.A., Human Press; 237-241.
- Girardet C., Walker W. & Habener J. 1996 An alternatively spliced polycistronic mRNA encoding cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-responsive transcription factor CREB (cAMP response element-binding protein) in human testis extinguishes expression of an internally translated inhibitor CREB isoform. *Mol Endocrinol*; 10:879–891
- Gonzalez G. & Montminy M. 1989 Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 59:675-680.
- Griswold M. 1998 The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*; 9:411–416.
- Guardavaccaro D., Kudo Y., Boulaire J., Barchi M., Busino L., Donzelli M., Margottin-Goguet F., Jackson P., Yamasaki L & Pagano M. 2003 Control of

meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Developmental Cell*; 4:799–812.

- Gur Y. & Breitbart H. 2006 Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes & Dev*; 20:411-416.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P. & Lovell-Badge R. 1995 Expression of SRY, the mouse sex determining gene. *Development*; 121:1603–1614.
- Hanley N., Hagan D., Clement-Jones M., Ball S., Strachan T., Salsa-Cortes L., McElreavey K., Lindsay S., Robson S., Bullen P., Ostrer H. & Wilson D. 2000 SRY, SOX9 and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanism of Development*; 91:403–407.
- Haqq C. & Donahoe P. 1998 Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiological Reviews*; 78:1–33.
- Haqq C., King C., Ukiyama E., Falsafi S., Haqq T., Donahoe P. & Weiss M. 1994 Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science*; 266:1494–1500.
- Harley V., Clarkson M. & 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]. *Endocrine Reviews*; 24:466–487.
- Hernández, A., Determinación de la expresión e inmunolocalización del canal de calcio CATSPER en espermatozoides de pacientes diagnosticados con astenozoospermia. México D.F. 2009. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. 46p.
- Ho H. & Suarez S. 2001 Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*; 122:519–526.

- Hoeffler J., Meyer T., Yun Y., Jameson J. & Habener J. 1988 Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science*; 242:1430-1433.
- Hong-Gang L., Xiao-Fang D., Ai-Hua L., Xiang-Bing K. & Cheng-Liang X., 2007 Expression of CatSper family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: relationship to sperm motility. *Mol Hum Reprod*; 13:299-306.
- Ike A., Ohta H., Onishi M., Iguchi N., Nishimune Y. & Nozaki M. 2004 Transient expression analysis of the mouse ornithine decarboxylase antizyme haploid-specific promoter using *in vivo* electroporation. *FEBS Lett.* ; 559:159–164.
- Jin J., O'Doherty A., Wang S., Zheng H., Sanders K. & Yan W. 2005 CatSper3 and CatSper4 encode two cation channel-like proteins exclusively expressed in the testis. *Biol Reprod*; 73:1235–42.
- Kashimada K. & Koopman P., 2010 *Sry*: the master switch in mammalian sex determination. *Development*; 137:3921-3930.
- Kent J., Wheatley S., Andrews J. & Sinclair A. 1996 A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*; 122:2813-2822.
- Kimmins S., Kotaja N., Davidson I. & Sassone-Corsi P. 2004 Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Society for Reproduction and Fertility*; 1741–7899.
- Kirichok Y., Navarro B. & Clapham D. 2006 Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*; 439:737-740.
- Lahr G., Maxson S., Mayer A. & Pilgrim C. 1995 Transcription of the Y chromosomal gene, *Sry*, in adult mouse brain. *Mol Brain Research*; 33:179-182.

- Lardenois A., Chalmel F., Barrionuevo F., Demougin P., Scherer G. & Primig M. 2010 Profiling spermatogenic failure in adult testes bearing Sox9-deficient Sertoli cells identifies genes involved in feminization, inflammation and stress. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 8:154
- Liu J., Xia J., Cho K., Clapham D. & Ren D. 2007 CatSper beta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem*; 282:18945–52.
- Lobley A., Pierron V., Reynolds L., Allen L. & Michalovich D. 2003 Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterization of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1:53.
- Masquillier D., Foulkes N., Mattei M. & Sassone-Corsi P. 1993 Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization and inducibility of the transcript. *Cell Growth and Differentiation*; 4:931–937.
- McElreavey K., Vilain E., Cotinot C., Payen E. & Fellous M. 1993 Control of sex determination in animals. *Eur J Biochem*; 218:769–783
- Miyata S., Miyashita K. & Hosoyama Y. 1996 SRY related genes in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta*; 1308: 23–27
- Molina C., Foulkes N., Lalli E. & Sassone-Corsi P. 1993 Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*; 75:875–886.
- Monaco L., Foulkes N. & Sassone-Corsi P. 1995 Pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) induces CREM gene expression in Sertoli cells: involvement in long-term desensitization of the FSH receptor. *PNAS*; 92:10673–10677.
- Montminy M. & Bilezikjian L. 1987 Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*; 328:175-178.

- Nikpoor P., Mowla S., Movahedin M., Ziaee S. & Tiraihi T. 2004 *CatSper* gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Human Reproduction*; 19:124-128.
- Oh H., Li Y. & Lau Y. 2005 Sry associates with the heterochromatin protein 1 complex by interacting with a KRAB domain protein. *Biol Reprod*; 72:407–415
- Ohe K., Lalli E. & Sassone-Corsi P. 2002 A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *PNAS*; 99:1146–1151.
- Olesen C., Hansen C., Bendtsen E., Byskov A., Schwinger E., Lopez- Pajares I., Jensen P., Kristoffersson U., Schubert R., Van Assche E., Wahlstroem J., Lespinasse J. & Tommerup N. 2001 Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Molecular Human Reproduction*; 7:11–20.
- Ortega S., Prieto I., Odajima J., Martin A., Dubus P., Sotillo R., Barbero J., Malumbres M. & Barbacid M. 2003 Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature Genetics*; 35:25–31.
- O'Toole C., Arnoult C., Darszon A., Steinhardt R. & Florman H., 2000 Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell*; 5:1571-1584.
- Parra M., Viera A., Gomez R., Page J., Carmena M., Earnshaw W., Rufas J. & Suja J. 2003 Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *Journal of Cell Science*; 116:961–974.
- Quill T., Ren D., Clapham D. & Garbers D. 2001 A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *PNAS*; 98:12527–12531.

- Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A., Hsu S., Shi Q., Tilly J. & Clapham D. 2001 A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*; 413:603-609.
- Rosenberg M., Aversa C., Wallace R. & Propst F. 1995 Expression of the v-Mos oncogene in male meiotic germ cells of transgenic mice results in metaphase arrest. *Cell Growth and Differentiation*; 6:325–336.
- Salas-Cortes L., Jaubert F., Barboux S., Nessmann C., Bono M., Fellous M., McElreavy K. & Roseblatt M. 1999 The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *International Journal of Developmental Biology*; 43:135–140.
- Salas-Cortes L., Jaubert F., Bono M., Fellous M. & Roseblatt M. 2001 Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. *Journal of Experimental Zoology*; 290:607–615.
- Sassone-Corsi P. 2002 Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*; 296:2176–2178.
- Sekido R. & Lovell R. 2008 Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*; 453:930-934.
- Skinner M., Norton J., Mullaney B., Rosselli M., Whaley P. & Anthony C. 1991 Cell–cell interactions and the regulation of testis function. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 637:354–363.
- Smale S. & Baltimore D. 1989 The ‘initiator’ as a transcription control element. *Cell*. 57:103–113.
- Somboonthum P., Ohta H., Yamada S., Onishi M., Ike A., Nishimune Y. & Nozaki M. 2005 cAMP-responsive element in TATA-less core promoter is

essential for haploid-specific gene expression in mouse testis. *Nucleic Acids Res.* 10;33(10):3401-11.

- Stehle J., Foulkes N., Molina C., Simonneaux V., Pe´vet P. & Sassone Corsi P. 1993 Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*; 365:314–320.
- Walker W., Girardet C. & Habener J. 1996 Alternative exon splicing controls a translational switch from activator to repressor isoforms of transcription factor CREB during spermatogenesis. *J Biol Chem*; 271:20145–20158
- Wang H., Liu J., Cho K. & Ren D. 2009 A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod*; 81:539–44.
- Wang W. & Malcolm B.A. 2002 Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using quick change site directed mutagenesis. *Method in Molecular Biology*; 182:37-43
- Wassarman P., Jovine L. & Litscher E. 2001 A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol*; 2:E59-E64.
- Weih F., Stewart F., Boshart M., Nitsch D. & Schutz G. 1990 In vivo monitoring of a cAMP-stimulated DNA-binding activity. *Genes Dev.* 4: 1437-1449.
- Weis L. & Reinberg D. 1997 Accurate Positioning of RNA Polymerase II on a Natural TATA-Less Promoter Is Independent of TATA-Binding-Protein-Associated Factors and Initiator-Binding Proteins. *Molecular and cellular Biology*; 17(6):2973-2984.
- Wilson M. & Koopman P. 2002 Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcription regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 441–446

- Wouters-Tyrou D., Martinage A., Chevaillier P. & Sautiere P. 1998 Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80:117–128.
- Yamamoto K., Gonzalez G., Biggs W. & Montminy M. 1988 Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*; 334:494-498.
- Yanagimachi, R., 1994 Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*; 4:371-372.
- Yuan L., Liu J., Zhao J., Brundell E., Daneholt B. & Hoog C. 2000 The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell*; 5:73–83.
- Zhang D. & Gopalakrishnan M. 2005 Sperm Ion Channels: Molecular Targets for the Next Generation of Contraceptive Medicines? *Journal of Andrology*; 26:6:643-653.

13. ANEXOS

Alineamientos de la secuencias nucleotídicas del mRNA de las deleciones del promotor de *CATSPER* 1 humano. Los alineamientos se realizaron con el programa *Multalin* "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890. Disponible en internet:

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
CATSPER-GB	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCATDSRY3	TGGTGAARCCCGCTCTACTAARAAATACAAAATTAGCTGGGTGTGGTGTGCACCTGTAGTCGCAGCTACTAGGAARAGCTGAGGCAGGAGARTTGCCTGAARCCAGGAGGCAGAGATTGCAGTGAAGCCA													
pCATDCREB2	TGGTGAARCCCGCTCTACTAARAAATACAAAATTAGCTGGGTGTGGTGTGCACCTGTAGTCGCAGCTACTAGGAARAGCTGAGGCAGGAGARTTGCCTGAARCCAGGAGGCAGAGATTGCAGTGAAGCCA													
Consensus	tggTgaaaccccgctctactaataaaatcaaaaaatagCTGGGTgtgggtgtgcaCCTGTAGTCGCAGCTACTAGGAARAGCTGAGGCAGGAGARTTGCCTGAARCCAGGAGGCAGAGATTGCAGTGAAGCCA													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
CATSPER-GB	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCATDSRY3	AGATTGCACCCCGGCACCTCCAGCCTAGTGACAGAGTAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----TTAGCCGGGGTGGGGTATGGTGGTGGTGGCTGTATCCAGCTACTCAGGGGGC													
pCATDCREB2	AGATTGCACCCCGGCACCTCCAGCCTAGTGACAGAGTAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAATAGCCGGGGTGGGGTATGGTGGTGGTGGCTGTATCCAGCTACTCAGGGGGC													
Consensus	AGATTGCACCCCGGCACCTCCAGCCTAGTGACAGAGTAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAaAAAAATAGCCGGGGTGGGGTATGGTGGTGGTGGCTGTATCCAGCTACTCAGGGGGC													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
CATSPER-GB	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCATDSRY3	TARAGGCAGGAGGCTCAGTGAARCTGGGAGGCAGAGATTGCCATGAGTGGAGATCATGCCGTGCACCTCCAGCCTGGGTGACAGTGAGACTGTCTCAAAAAACAARACAAAAACAAAAACATGGGCT													
pCATDCREB2	TARAGGCAGGAGGCTCAGTGAARCTGGGAGGCAGAGATTGCCATGAGTGGAGATCATGCCGTGCACCTCCAGCCTGGGTGACAGTGAGACTGTCTCAAAAAACAARACAAAAACAAAAACATGGGCT													
Consensus	TARAGGCAGGAGGCTCAGTGAARCTGGGAGGCAGAGATTGCCATGAGTGGAGATCATGCCGTGCACCTCCAGCCTGGGTGACAGTGAGACTGTCTCAAAAAACAARACAAAAACAAAAACATGGGCT													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
CATSPER-GB	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCATDSRY3	GGGGCAGTGGCTCACACCTGTATCCCAACACTTTGGARAGGCGAGGCGAGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCAGGACCATTTGGCTAACATGGTGAARCCCGCTCTCTACTAARAAATAGAAAAGT													
pCATDCREB2	GGGGCAGTGGCTCACACCTGTATCCCAACACTTTGGARAGGCGAGGCGAGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCAGGACCATTTGGCTAACATGGTGAARCCCGCTCTCTACTAARAAATAGAAAAGT													
Consensus	GGGGCAGTGGCTCACACCTGTATCCCAACACTTTGGARAGGCGAGGCGAGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCAGGACCATTTGGCTAACATGGTGAARCCCGCTCTCTACTAARAAATAGAAAAGT													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
CATSPER-GB	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCATDSRY3	TAGCCGGGGCTGGTGGTGGGCGCCTGTAGTCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCGAGAAAATGGCATGAGCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGTCAGATCGTGCCACTGCACCTCCAGCCTGGGCGA													
pCATDCREB2	TAGCCGGGGCTGGTGGTGGGCGCCTGTAGTCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCGAGAAAATGGCATGAGCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGTCAGATCGTGCCACTGCACCTCCAGCCTGGGCGA													
Consensus	tagCCGGGGCTGGTGGTGGGCGCCTGTAGTCCAGCTcCTTGGGAGGCTGAGGCGAGAAAATGGCATGAGCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGTCAGATCGTGCCaCTGCACCTCCAGCCTGGGCGA													
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
CATSPER-GB	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCATDSRY3	CAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAACAARACAAAGAACAAACACACACACACACAAARACCATGTATTGTCTGTTAATATAGGCTTACATATCTTAACCTTTTGTATCCTGTGGGTAGGTTAT													
pCATDCREB2	CAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAACAARACAAAGAACAAACACACACACACACAAARACCATGTATTGTCTGTTAATATAGGCTTACATATCTTAACCTTTTGTATCCTGTGGGTAGGTTAT													
Consensus	CAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAACAARACAAAGAACAAACACAcaCaCAcaaaAAARACCATGTATTGTCTGTTAATatAAGGcTTACATATCTTAaCTTTTGTATCCTGTGGGCTAGGtaTTAT													

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 CATSPER-GB |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 pCATDCREB1 ACTGGGACCCCTTTCTTGACCTCGGTTTCTCATTTACATGAGGGAGTTTGACACARATTTCTTGATTCCGACTATAGCCAGGAGAGGCATTTGGGAATGAGGCCCTGGCCCTGCTGGTGACATC
 ConsensusTTGGGAATGAGGCCCTGGCCCTGCTGGTGACATC
 131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
 CATSPER-GB |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 pCATDCREB1 ATAGAGGGGAGAGTTCCACGAGAATAGTCAGGCCCTTCTGGAGGCCAGTGCCACAGCTCGCATTGAGCTTGGCTCAGGAAAGAGGGGAATCCAGGCAGGGCCCTGTTGGGCCAGGCTTTGAGCTCTTT
 Consensus ATAGAGGGGAGAGTTCCACGAGAATAGTCAGGCCCTTCTGGAGGCCAGTGCCACAGCTCGCAcTGAGCTTGGCTCAGGAAAGAGGGGAATCCAGGCAGGGCCCTGTTGGGCCAGGCTTTGAGCTCTTT
 261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
 CATSPER-GB |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 pCATDCREB1 TGGCTCCAGAGTCCCAGCACAGTCATGGATCAAACTCAGTGCCCGAAAGGCTCAGAATGAGGCAGACACCATAACGCAGATAGGTTCTTTGCTCTCACTCATCCCCACACCCACAGGCCA
 Consensus TGGCTCCAGAGTCCCAGCACAGTCATGGATCAAACTCAGTGCCCGAAAGGCTCAGAATGAGGCAGACACCATAACGCAGATAGGTTCTTTGCTCTCACTCATCCCCACACCCACAGGCCA...

Tabla 1. Polimorfismos del promotor del gen CATSPER 1 humano reportados en el GeneBank. Se indica la posición del SNP en la secuencia del promotor.

Posición	Secuencia	SNP
2060	T	A/G
1814	C	A/G
1765	A	C/T
1542-44	AAA	-/TTG
1532-33	CA	-/TGT
1523-24	AA	-/GTT
1463	C	A/G
1394	A	G/T
1210-12	AAC	-/G (A), G/T (C),
1206	C	G/T
1199	A	G/T
1065-67	GTG	-/A
1023-26	CAAA	-/TTTTTTTT
930	C	A/G
882	G	C/T
637	G	C/T
615-16	AG	-/T
609	A	-/T
601-7	TCAAAAA	-/T, G/T (C)
338	T	A/G
272	A	A/T

Tabla 2. Nuevos polimorfismos encontrados en nuestra construcción.

Posición	Secuencia	SNP	Posición	Secuencia	SNP
679-80	TT	C-	1609-10	DELECIÓN	GT
1024	INSERCIÓN	AAAAAAA	1611	A	T
1053	INSERCIÓN	AAAAAAA	1617	DELECIÓN	A
1212	C	A	1620	C	T
1232	G	C	1666	DELECIÓN	A
1336	INSERCIÓN	T	1680	DELECIÓN	A
1350	DELECIÓN	A	1702	DELECIÓN	G
1360	INSERCIÓN	C	1745	DELECIÓN	G
1369-70	GT	TG	1748	DELECIÓN	G
1394	A	C	1755-56	DELECIÓN	A
1396	INSERCIÓN	T	1764-65	DELECIÓN	CA
1414	DELECIÓN	A	1766	T	A
1430	DELECIÓN	G	1773-77	DELECIÓN	TCCAA
1465	A	C	1779	A	C
1509-10	DELECIÓN	AC	1783-84	GG	CA
1517-18	DELECIÓN	AG	1788	DELECIÓN	A
1519	A	G	1794	DELECIÓN	G
1533	A	C	1802-03	DELECIÓN	AG
1538-39	DELECIÓN	AC	1808-10	DELECIÓN	GGC
1540-42	ACA	CAC	1819	DELECIÓN	G
1543	A	C	1826	DELECIÓN	T
1544	A	C	1831	DELECIÓN	C
1547	A	C	1910	INSERCIÓN	A
1550	A	C	2002	DELECIÓN	G
1553	A	C	2041	DELECIÓN	C
1557	DELECIÓN	T	2060	T	C
1565-66	DELECIÓN	AT	2075-76	DELECIÓN	GA
1573	DELECIÓN	C	2082	DELECIÓN	G
1586	A	C	2089	DELECIÓN	C
1601	DELECIÓN	T	2144	G	A