



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Efecto de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  en la  
regulación del promotor *CATSPER1* de humano”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**Q.F.B. LIZDY YARELI ORTIZ BORRAYO**

**Para obtener el Grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**Genética y Biología Molecular**

**Directores de la Tesis:**

**Dr. Javier Hernández Sánchez  
Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda**

**México, D.F.**

**Diciembre, 2015**

# ASESORES

Dra. Rosa Ma. Del Refugio Bermúdez Cruz

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Este trabajo fue realizado bajo la Dirección del Dr. Javier Hernández Sánchez del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y de Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda investigadora Asociada C en la Unidad de Investigación en Enfermedades Metabólicas del Laboratorio de Genética Molecular en el Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS, donde se realizaron los ensayos. Durante la realización de este trabajo la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de beca: 367592

**DEDICATORIA:**

*"A dos de los Ángeles que Dios puso en mi camino y  
que llamó por que los necesitaba a su lado.*

*Con todo mi amor y admiración para mis abuelitos:*

***Papá David y Papá José...***

*Siempre los recordaré".*

## AGRADECIMIENTOS

### **A Dios:**

Por tantas bendiciones recibidas a lo largo de toda mi vida y por rodearme de tanta gente linda. Gracias por mi familia!.

### **A mis padres:**

José Luis Ortiz Arias y Olga Borrayo Peña por siempre esforzarse y luchar día a día para darnos lo mejor a mi hermana y a mí, gracias por inculcarme buenos valores, enseñarme que puedo lograr lo que me proponga, por alentarme a seguir adelante y a luchar por mis sueños. Gracias por sus consejos, su guía y su amor!... Este trabajo y este éxito en mi vida siéntanlo como propio ya que por ustedes estoy aquí. Gracias por ser unos excelentes padres, LOS AMO!!!...

### **A mi esposo:**

Luis Alberto López Rosas por su comprensión y apoyo durante la realización de la maestría, por soportar mis desveladas y el estrés que esto implicaba. Gracias por sacrificar algunos de tus fines de semana acompañándome al laboratorio y apoyarme en lo que podías para que pudiera terminar temprano... Sobre todo gracias por "la mucha felicidad", por estar a mi lado desde hace más de 12 años cuidándome y amándome. TE AMO!!!...

### **A mi hermana:**

Priscila por todo su cariño, por levantarme el ánimo cuando me sentía triste, por escucharme y echarme porras siempre, por admirarme y tomarme como ejemplo, prometo no defraudarte manis, ya sabes que te iloviu!.

### **A las familias Ortiz Arias y Borrayo Peña:**

Por todo su apoyo y su amor demostrado a mi persona siempre. Gracias por hacerme parte de cada festejo o evento especial de la familia a pesar de la distancia, gracias por cada foto y video enviado de todo lo que me perdí, gracias a ustedes sentí que sí estuve ahí. Muchas gracias por recibirme en mis vacaciones con los brazos abiertos y hacer que disfrutara al máximo los pocos días que pasaba con ustedes, los quiero a todos!...

### **A mis directores de tesis:**

Dr. Javier Hernández y Dra. Norma Oviedo por haberme recibido en sus respectivos laboratorios y hacerme parte de este lindo proyecto, por su paciencia, sus consejos, sus enseñanzas y apoyo para poder realizar mi tesis. Muchas gracias por ser unos excelentes directores, gracias por su comprensión en los momentos difíciles y por brindarme una mano amiga cuando se necesitaba. Siempre los recordaré!.

### **A mis asesores:**

Dra. Bermúdez y Dr. Kameyama, por sus enseñanzas a lo largo de los cursos que impartieron, por su disposición, tiempo y por todas sus sugerencias para la realización de esta tesis. Gracias!.

**A mis compañeros del laboratorio 6:**

Nubia, Salma, Juan, Lizbeth, Ángeles (Dra. Galleta) y Mauricio. Muchas gracias muchachos por brindarme su amistad, por los momentos de risas y pláticas divertidas. Un agradecimiento especial a Juan y Galle por su apoyo, sus ideas, sus consejos, su asesoría, su paciencia, mil gracias por invertir un poco de su valioso tiempo en enseñarme y ser mis guías durante la realización de este trabajo. A todos los quiero mucho!!!

**A mis compañeros y amigos de Centro Médico Siglo XXI:**

Alberto, Stellita, Daniela, Alejandro, Luisito Grey, Ricardo y Libo. Gracias por todos los momentos divertidos chicos, por tantas pláticas y risas que hicieron ameno el trabajo en el laboratorio, en verdad todos son unas excelentes personas y fue para mí un placer trabajar con ustedes. Gracias por brindarme su amistad, los quiero!

**A la Dra Ángela:**

Por apoyarme al momento que ingresé al laboratorio, enseñarme las técnicas que eran nuevas para mí, pero sobre todo por brindarme su amistad. Gracias por tantas conversaciones y consejos, sobre todo las pláticas sobre esas novelas que nos tuvieron tan entretenidas, siempre la recordaré. La quiero mucho!

**A Gabriela Mora:**

Por ser una mujer muy trabajadora y eficiente que en todo momento nos brindó su apoyo, por siempre recibirnos con una gran sonrisa a pesar de tener mucho trabajo, mil gracias Gaby!.

**A mis compañeras y amigas:**

Saida, Cristina, Nelby, Denisse y Vanesa. Por ser las primeras en brindarme su amistad, por tantos momentos compartidos de estrés y risas durante el curso, por ser parte de un grandioso equipo de trabajo al cual nuestra generación nombró las Lizdys y que a pesar de distanciarnos un poco al entrar a los laboratorios siempre que nos topamos por los pasillos nos saludamos con una gran sonrisa en el rostro, las quiero niñas!

**A mis amigas de toda la vida:**

Gladys y Paulina gracias APS por todo su apoyo siempre, por sus consejos, por ser mis amigas por más de 20 años y que a pesar de que no nos vemos tan frecuentemente siempre sabemos que contamos la una con la otra!... Las quiero Nenas!

**A mis compañeros de generación y de Genética:**

China, Ariana, Eli, Ingrid, Anita, Diana, Elias, Victor, El guapo, Josué, Rodrigo, Eric, Miguel, Eneué, Rubí, Tere, Victor Flores y Armando. Por los muchos o pocos momentos compartidos, por su compañerismo y amistad.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. Generalidades .....	3
1.1.1. Espermatogénesis.....	3
1.1.1.1. Mitosis.....	4
1.1.1.2. Meiosis.....	5
1.1.1.3. Espermiogénesis .....	6
1.1.2. Espermatozoide.....	7
1.1.2.1. Maduración de los espermatozoides .....	7
1.1.2.2. Capacitación y reacción acrosomal .....	8
1.1.3. <i>CATSPER</i> .....	9
1.1.3.1. Organización genómica y expresión de las proteínas <i>CATSPER</i> .....	11
1.1.3.2. Infertilidad causada por la ausencia de <i>CATSPER1</i> .....	12
1.2. Antecedentes.....	13
1.2.1. Análisis de la región promotora de <i>CATSPER1</i> de humano .....	13
1.2.2. Factores de transcripción CREB y CREM.....	19
1.2.2.1. Isoformas de los factores transcripcionales CREB y CREM..	20
1.2.2.2. Activación de la transcripción por los factores CREB y CREM.....	23
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	26
4.1. Objetivos específicos.....	26
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	27
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	28
6.1. Construcciones del promotor de <i>CATSPER1</i> de humano y clonación de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ .....	28
6.2. Preparación de células competentes.....	30
6.3. Transformación bacteriana.....	30
6.4. Extracción de DNA plasmídico (midipreparaciones de DNA) .....	31
6.5. Mutagénesis sitio dirigida .....	32
6.6. Secuenciación del DNA.....	34
6.7. Cultivo celular .....	35

6.8. Transfección transitoria y cotransfecciones de líneas celulares HEK293 Y GC-1spg .....	36
6.9. Ensayo de luciferasa dual.....	38
6.10. Detección de la expresión de CREB-A y CREM $\tau$ .....	39
6.10.1. Extracción de RNA y RT-PCR.....	39
6.10.2. Extracción de proteína y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) .....	40
6.10.3. Inmunodetección de proteínas (Western-Blott) .....	41
6.11. Análisis estadístico. ....	42
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
7.1. Verificación de las construcciones plasmídicas del promotor de <i>CATSPER1</i> y de los factores CREB-A y CREM $\tau$ .....	43
7.2. Expresión endógena y sobreexpresión del transcrito de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ .....	45
7.3. Inmunodeteccion de las proteínas CREB-A y CREM $\tau$ .....	46
7.4. Actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> o sus deleciones en la línea celular HEK293 .....	49
7.4.1. Actividad transcripcional basal del promotor de <i>CATSPER1</i> o sus deleciones en células HEK293.....	49
7.4.2. La actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> es regulado por el factor transcripcional CREB-A en HEK293.....	51
7.4.3. La actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> no es regulado por el factor transcripcional CREM $\tau$ en HEK293. ....	52
7.5. Actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> o sus deleciones en la línea celular GC-1spg .....	54
7.5.1. Actividad transcripcional basal del promotor de <i>CATSPER1</i> o sus deleciones en células GC-1spg.....	54
7.5.2. La actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> no es regulada por los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ en GC-1spg.....	55
7.6. Efecto de las mutaciones en los sitios CRE en la actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> .....	56
7.6.1. Actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular HEK293.....	59
7.6.1.1. Los sitios CRE1 y CRE2 participan en la activación transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> en células HEK293. ....	59



7.6.1.2. CREB-A activa transcripcionalmente el promotor de <i>CATSPER1</i> a través del sitio CRE1 en células HEK293.....	60
7.6.1.3. Efecto del factor CREM $\tau$ en la actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> con mutaciones en los sitios CRE, en la línea celular HEK293. ....	62
7.6.2. Actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular GC-1spg.....	63
7.6.2.1. Los sitios CRE1 y CRE0 participan en la regulación transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> en células GC-1spg.....	63
7.6.2.2. Efecto de los factores CREB-A y CREM $\tau$ en la actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular GC-1spg. ....	64
7.7. Activación del promotor de <i>CATSPER1</i> al sobreexpresar simultáneamente los factores CREB-A y CREM $\tau$ en células HEK293 .....	67
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de la espermatogénesis.....	5
Figura 2. Estructura de un espermatozoide. ....	7
Figura 3. Perfil de expresión de Catsper 1-4.....	9
Figura 4. Topología de los canales CATSPER.. ....	10
Figura 5. Composición molecular del complejo de canal <i>CATSPER</i> . ....	11
Figura 6. Análisis del promotor de <i>CATSPER1</i> de humano y predicción de sus sitios de unión a factores de transcripción.. ....	13
Figura 7. Secuencia nucleotídica del promotor de <i>CATSPER1</i> y sitios de unión a factores de transcripción.. ....	15
Figura 8. Alineamiento de la región promotora del gen <i>CATSPER1</i> en distintas especies.....	16
Figura 9. Actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular HEK293.. ....	17
Figura 10. Análisis de las construcciones con regiones deletadas usando transfección in vitro en la línea celular HEK293.....	18
Figura 11. Estructura de las proteínas CREB y CREM.. ....	20
Figura 12. Estructura del gen <i>CREB</i> y de las isoformas producto del empalme alternativo.....	21
Figura 13. Estructura del gen <i>CREM</i> y de las isoformas producto del empalme alternativo.....	23
Figura 14. Activación transcripcional mediada por CREB y CREM.....	24
Figura 15. Construcción portadora del gen <i>CATSPER1</i> .. ....	30
Figura 16. Construcciones portadoras de los genes de CREB-A y CREM $\tau$ .....	34
Figura 17. Reacciones bioluminiscentes catalizadas por la luciferasa de luciérnaga (A) y luciferasa de Renilla (B). ....	39
Figura 18. Liberación del fragmento que tiene el promotor o delecciones a partir de las construcciones indicadas por restricción con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> . ....	44
Figura 19. Liberación de los fragmentos con los genes CREM $\tau$ y CREB-A a partir de los plásmidos indicados por restricción con las enzimas <i>HindIII</i> y <i>NotI</i> .. ....	45

Figura 20. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ .....	47
Figura 21. Expresión del RNA de CREB-A y CREM $\tau$ en células HEK293.....	48
Figura 22. Inmunodetección de los factores CREB-A y CREM $\tau$ en células HEK293.....	48
Figura 23. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular HEK293.....	51
Figura 24. El factor CREB-A incrementa la actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular HEK293.....	52
Figura 25. El factor CREM $\tau$ no afecta la actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular HEK293.....	53
Figura 26. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular GC-1spg.....	55
Figura 27. Los factores CREB-A y CREM $\tau$ no afectan la actividad transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular GC-1spg.....	57
Figura 28. Secuencia de las mutaciones en los sitios CRE del promotor de <i>CATSPER1</i> .....	58
Figura 29. Los sitios CRE1 y CRE2 activan la transcripción del gen <i>CATSPER1</i> en la línea celular HEK293.....	60
Figura 30. El sitio CRE1 es necesario para la activación transcripcional del promotor de <i>CATSPER1</i> por CREB-A en la línea celular HEK293.....	61
Figura 31. Actividad transcripcional de las construcciones con mutaciones en los sitios CRE del promotor de <i>CATSPER1</i> por el factor CREM $\tau$ en la línea celular HEK293.....	63
Figura 32. El sitio CRE1 es necesario para la activación transcripcional de <i>CATSPER1</i> mientras que el sitio CRE0 puede reprimir su transcripción en la línea celular GC-1spg. ....	65
Figura 33. Actividad transcripcional de las construcciones con mutaciones en los sitios CRE del promotor de <i>CATSPER1</i> por los factores CREB-A y CREM $\tau$ en la línea celular GC-1spg.....	66
Figura 34. Efecto de la co-transfección simultánea de CREB-A y CREM $\tau$ en la activación del promotor de <i>CATSPER1</i> en la línea celular HEK293.....	68

Figura 35. Efecto de la co-transfección simultánea de CREB-A y CREM $\tau$  en la activación del promotor de *CATSPER1* con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular HEK293. .... 69

## RESUMEN

El gen *CATSPER1* codifica para una de las proteínas del canal CATSPER, el cual permea selectivamente iones  $Ca^{2+}$  y su expresión en espermatozoides es esencial para la hiperactivación del flagelo y por lo tanto para la fertilidad masculina. Poco se conoce acerca de la regulación transcripcional del gen *CATSPER1*. El análisis *in silico* indica la presencia de sitios de unión a factores de transcripción, entre ellos tres sitios CRE, denominados del 0 al 2, siendo el sitio CRE0 el más cercano al sitio de inicio de la transcripción. Por lo tanto, si el gen *CATSPER1* se expresa durante la espermatogénesis, posiblemente los factores transcripcionales como CREB-A y CREM $\tau$ , expresados diferencialmente durante este proceso, regulen su expresión. En este trabajo mediante ensayos de luciferasa dual, se determinó la regulación transcripcional del gen *CATSPER1* por los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  en las líneas celulares HEK293 y GC-1spg, así como los sitios CRE importantes para su activación transcripcional.

Los resultados indicaron que en la activación transcripcional del promotor *CATSPER1* en las células HEK293 y GC-1spg participa el sitio CRE1.

El factor CREB-A reguló positivamente la expresión del gen *CATSPER1* en células HEK293, mientras que ambos factores (CREB-A y CREM $\tau$ ) transactivaron de manera sinérgica el promotor en esta línea celular. Por otro lado, los factores CREB-A y CREM $\tau$  no activaron transcripcionalmente el promotor *CATSPER1* en células GC-1spg, sin embargo faltaría evaluar si los factores actúan sinérgicamente o participan otros factores en esta línea celular.

## ABSTRACT

*CATSPER1* gene codes for a protein of CATSPER channel, which selectively permeates Ca<sup>2+</sup> ions and its expression in sperm is essential for flagellum hyperactivation and male fertility. Little is known about transcriptional regulation of *CATSPER1* gene. *In silico* analysis indicates the presence of binding sites for transcription factors, including three CRE sites, called 0 to 2, where the CRE0 site is closest to the transcription start site. Therefore, if the *CATSPER1* gene is expressed during spermatogenesis, CREB-A and CREM $\tau$  transcription factors, which are differentially expressed during this process, possibly regulate its expression.

In this study we determined by dual luciferase assays the transcriptional regulation of *CATSPER1* gene by CREB-A and CREM $\tau$  transcription factors in HEK293 and GC-1spg cells lines, and the participation of CRE sites in this activity.

Our results showed that CRE1 site is required for transcriptional activation of *CATSPER1* promoter in HEK293 and GC-1spg cells.

The CREB-A factor positively regulated *CATSPER1* gene expression in HEK293 cells, while both factors (CREB-A and CREM $\tau$ ) enhanced synergistically the activity of the promoter in these cells. Furthermore, CREB-A and CREM $\tau$  factors did not exhibit transcriptional activation on *CATSPER1* promoter in GC-1spg cells, however it is necessary to evaluate whether both factors act synergistically, or some other factors transactivate the CATSPER promoter in this cell line.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. GENERALIDADES

Los seres vivos que se reproducen sexualmente poseen dos tipos de células: las somáticas que forman la mayoría de los órganos del cuerpo, y las germinales, especializadas en la reproducción. La reproducción sexual tiene lugar cuando dos células germinales (también conocidas como gametos) procedentes de progenitores diferentes se unen mediante la fecundación para formar un nuevo individuo. Hay dos tipos de gametos: femeninos (óvulos) y masculinos (espermatozoides).

El presente estudio está enfocado a las células germinales masculinas, las cuáles alcanzan su diferenciación celular por medio del proceso conocido como espermatogénesis.

### 1.1.1. ESPERMATOGÉNESIS

El aparato reproductor masculino junto con el femenino son los encargados de la reproducción. Dentro de los principales órganos del aparato reproductor masculino se encuentran los testículos o gónadas masculinas, el epidídimo, los conductos eferentes, la uretra, las vesículas seminales, la próstata y el pene.

Los testículos son los órganos que producen los espermatozoides y las hormonas sexuales masculinas (andrógenos), en su interior se encuentran dos compartimientos: uno intersticial y uno tubular (túbulos seminíferos); en el compartimiento intersticial se encuentran las células de Leydig, células inmunes, células sanguíneas, nervios y fibroblastos mientras que dentro del compartimiento tubular se encuentran las células germinales y las células de Sertoli (Weinbauer *et al.*, 2010). En el compartimiento tubular se lleva a cabo la espermatogénesis, proceso que se caracteriza por la transformación de una célula diploide no diferenciada a un espermatozoide haploide altamente diferenciado.

La diferenciación de las células germinales en espermatozoides se produce en el epitelio del túbulo seminífero (Skinner *et al.*, 1991). Bajo la influencia de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FHS) las células de Leydig secretan la testosterona, ésta 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). Las células de Sertoli se extienden desde la lámina basal hasta la luz tubular rodeando a las células germinales y actúan como soporte migratorio y nutricional de diferentes tipos de células germinales. Antes de la pubertad en el epitelio de los túbulos seminíferos solo existen células de Sertoli y espermatogonias inmaduras.

Durante la espermatogénesis las espermatogonias se diferencian sucesivamente hasta espermatozoides, este proceso puede ser subdividido en tres pasos: multiplicación mitótica y propagación de las células madre espermatogoniales, recombinación meiótica de material genético y maduración de espermatozoides también conocido como espermiogénesis (Krester *et al.*, 1998, Wistuba *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.1. Mitosis**

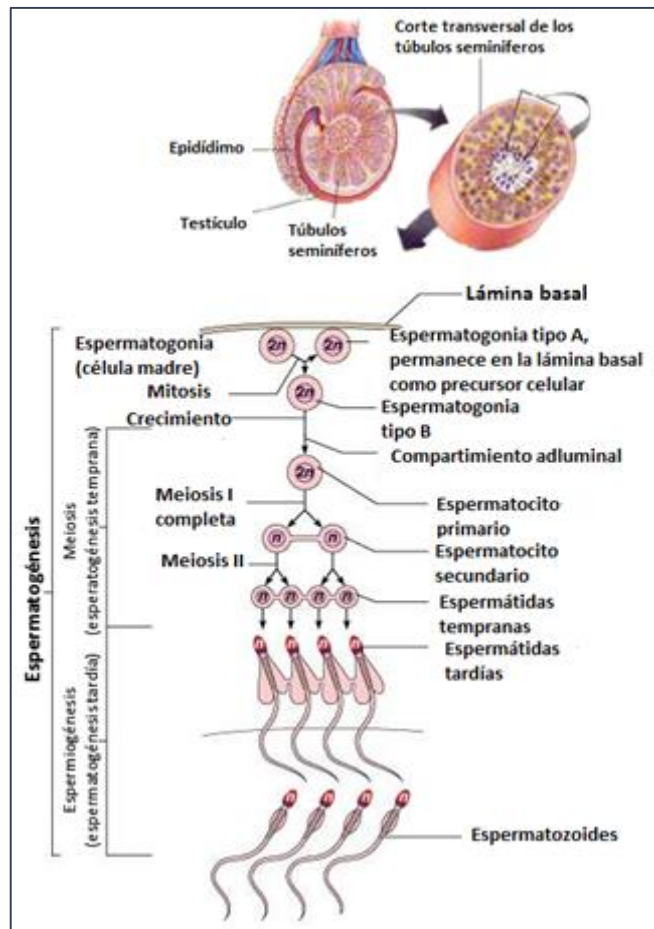
La mitosis es un proceso que ocurre en las células somáticas y que precede inmediatamente a la división celular, durante este proceso se producen dos células hijas idénticas con la misma información genética contenida en sus cromosomas.

Durante la espermatogénesis, las células madre o espermatogonias son células destinadas a diferenciarse a espermatozoides, se localizan muy cercanas a la lámina basal de los túbulos seminíferos y son sostenidas por las células de Sertoli. Los tipos de espermatogonias varían entre especies, pero en el ser humano, se pueden distinguir dos tipos A y B, dentro del tipo A se dividen en A pálido y A oscura.

Las espermatogonias de tipo A, a través de ciclos de mitosis repetidos producen nuevas espermatogonias y mantienen así la reserva celular; todas estas células son diploides. Las espermatogonias A oscuras, solo se dividen cuando tiene lugar una reducción drástica de espermatogonias y las espermatogonias A pálidas, dan lugar a más espermatogonias del mismo tipo que se mantienen unidas entre sí por puentes citoplasmáticos y al madurar se conocen como espermatogonias de tipo B (Kretser *et al.*, 1998).



Las espermatogonias de tipo B se dividen por mitosis produciendo más células de su tipo, al madurar producen los espermatocitos primarios que se sitúan a mayor distancia de la lámina basal (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de la espermatogénesis.** La imagen muestra el proceso de la espermatogénesis a partir de una célula madre y sus divisiones mitóticas y meióticas hasta la formación de espermatidas, que inician el proceso de la espermiogénesis para adquirir la morfología de un espermatozoide.

### 1.1.1.2. Meiosis

La meiosis es un proceso de división presente en las células que generan las células germinales femeninas y masculinas; en este proceso una célula diploide experimenta dos divisiones sucesivas (meiosis I y meiosis II), con la capacidad de generar cuatro células haploides. Durante la meiosis hay recombinación de la información genética, por lo tanto el nuevo individuo hereda información genética única y nueva. Otra característica importante es la

segregación al azar de los cromosomas recombinados, lo que contribuye al aumento de la diversidad genética.

En la espermatogénesis, los espermátocitos primarios son las células capaces de entrar a meiosis I en la que se divide su número normal de cromosomas en la mitad, el resultado de la división de estas células son los espermátocitos secundarios que se hallan transitoriamente (8 horas en humano), los cuales son células haploides que entran al proceso de la meiosis II (en la que se separan las cromátidas hermanas), resultando de esta división las espermátidas redondas (Figura 1) (Kretser *et al.*, 1998, Wistuba *et al.*, 2007).

Durante la meiosis, el genoma haploide experimenta una importante reorganización, las células meióticas tienen un alto nivel de transcripción promovido por la acetilación de histonas para hacer más accesible el DNA; se requiere una elevada transcripción para la recombinación y sinapsis de los cromosomas (Kretser *et al.*, 1998). En los últimos años se ha establecido la vía de señalización por AMPc como principal mecanismo regulador de la transcripción en las diferentes etapas de la espermatogénesis. Muchos de los genes que se activan durante la meiosis contienen secuencias de DNA llamadas "elementos de respuesta a AMPc" o CRE, por sus siglas en inglés (*cAMP Response Element*), dentro de los factores que se unen a estos sitios se encuentran CREB (*cAMP response element-binding*) y CREM (*cAMP response element modulator*) (Don *et al.*, 2002).

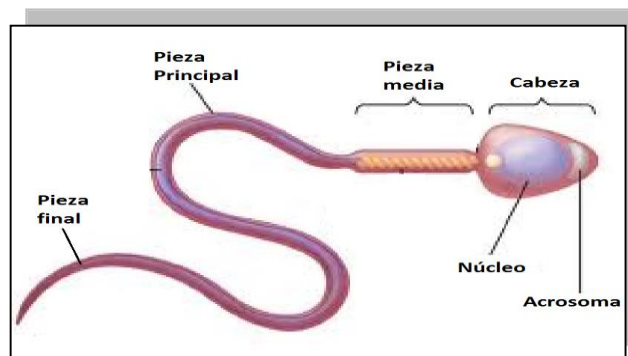
En la terminación de la meiosis II se producen las espermátidas redondas que se aproximan a la luz tubular, lo que marca el comienzo de la espermiogénesis

### **1.1.1.3. Espermiogénesis**

En esta etapa, las espermátidas tienen que alterar drásticamente su morfología y fisiología celular, en este proceso se disminuye el contenido citoplasmático y el DNA se condensa, se lleva a cabo una sustitución de histonas por protaminas. Las espermátidas forman el acrosoma, siendo este orgánulo esencial para la interacción posterior con la membrana del ovocito durante la fertilización. Además, la forma de las células germinales se transforma de relativamente redondeada en células en forma de husillo. Después de la elongación de los espermátides, se alcanza la forma típica de los espermatozoides (Wistuba *et al.*, 2007).

### 1.1.2. ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides son células altamente especializadas, compuestas por cabeza y flagelo, su principal función es fertilizar el óvulo. La cabeza contiene el núcleo haploide altamente compacto, una vesícula especializada en secretar enzimas hidrolíticas (acrosoma), y el flagelo que se puede dividir en tres partes: pieza media, la cual proporciona energía metabólica por las mitocondrias, pieza principal y pieza final. La motilidad del esperma es generado por una estructura basada en microtúbulos altamente organizados, conocido como axonema, localizado en la pieza media y principal del flagelo (Figura 2) (Garner y Hafez, 2002; Zhang y Gopalakrishnan, 2005).



**Figura 2. Estructura de un espermatozoide.** El espermatozoide se compone de cabeza y flagelo. En la cabeza se encuentra el núcleo haploide y el acrosoma. Mientras que el flagelo se divide en tres secciones que son la pieza media, la principal y la final.

#### 1.1.2.1. Maduración de los espermatozoides

Los espermatozoides diferenciados dentro de los túbulos seminíferos, se liberan como espermatozoides inmóviles en el fluido luminal y son transportados al epidídimo. En donde ocurre el desarrollo de la capacidad de movimiento del mismo, uno de los cambios más importantes del espermatozoide durante la maduración epididimaria. En los seres humanos, el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo toma 2-6 días, durante el cual se produce la interacción entre espermatozoides y el fluido epididimario que las rodea. Durante este periodo, los espermatozoides tienen una serie de cambios esenciales de maduración para alcanzar la capacidad de nadar y fertilizar el óvulo. Tras la maduración, los espermatozoides son almacenados en el epidídimo hasta la eyaculación, en donde son liberados junto con el

líquido que lo rodea y las secreciones de las glándulas sexuales accesorias (Zhang y Gopalakrishnan, 2005).

### 1.1.2.2. Capacitación y reacción acrosomal

Los espermatozoides maduros se encuentran en reposo en el tracto reproductor masculino. Posterior a la eyaculación y a medida que se mueve a través del tracto reproductor femenino, se convierten en competentes para fertilizar el óvulo, periodo conocido como capacitación.

Durante la capacitación hay cambios en la reorganización de la membrana espermática, una serie de eventos de fosforilación de proteínas, aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ , hiperpolarización de la membrana, aumento de la concentración de bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), pH intracelular y niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). El axonema se activa por factores intra y extracelulares para lograr un patrón de motilidad hiperactivada, el cual, es requerido para desplazarse por el oviducto, además el acrosoma adquiere la capacidad de reaccionar para penetrar la zona pelúcida (ZP) y así fertilizar al ovocito, (Navarro *et al.*, 2008; Ren y Xia, 2010; Visconti *et al.*, 2011; Ickowicz *et al.*, 2012).

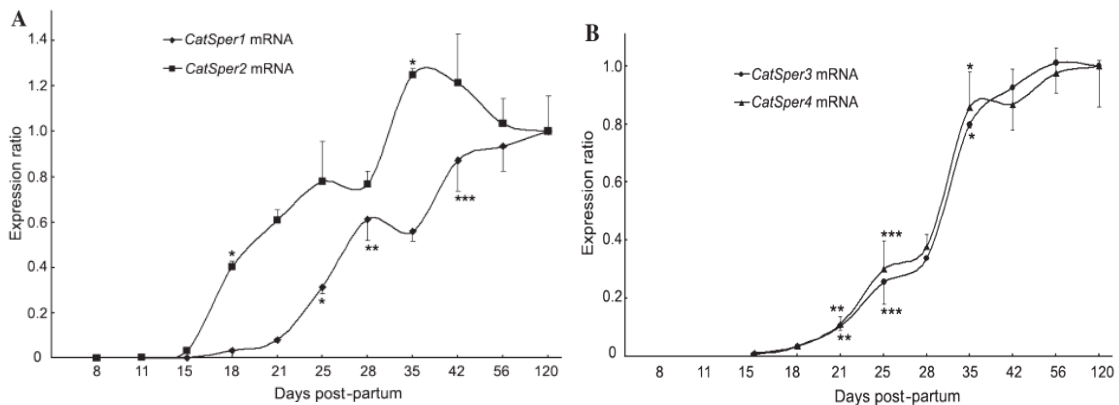
Los espermatozoides capacitados promueven el proceso de exocitosis del contenido de la vesícula acrosomal, lo que permite al espermatozoide penetrar las capas externas del óvulo y fecundarlo, este proceso es dependiente de  $Ca^{2+}$  y es conocido como reacción acrosomal (RA). La RA permite al espermatozoide maduro y capacitado, penetrar las capas externas del óvulo y fecundarlo. La ZP es una gruesa capa de glicoproteínas extracelulares (ZP3, ZP2, ZP1) que rodea al ovocito, la principal glicoproteína mediadora de la RA es ZP3. La presencia de  $Ca^{2+}$  externo y ZP3 son indispensables para que ocurra la RA y el incremento de  $Ca^{2+}$  es un paso esencial en la señalización intracelular que conduce al desarrollo de la RA.

Para que el espermatozoide penetre a través de la capa de zona pelúcida del ovocito requiere una movilidad hiperactivada, para esto el  $Ca^{2+}$  tiene un papel muy importante. La concentración de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma se incrementa durante la hiperactivación, y esto regula el movimiento del axonema (Zhang y Gopalakrishnan., 2005).

Uno de los canales iónicos potencialmente responsable de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular al espermatozoide es aquel codificado por el gen *CATSPER*.

### 1.1.3. CATSPER

En el espermatozoide se ha detectado la expresión de un grupo de genes específicos de testículo que codifican para las subunidades de los Canales Catiónicos del Espermatozoide (CATSPER por sus siglas en inglés Cation Channel of Sperm). Todos estos genes son esenciales para la hiperactivación del flagelo, los primeros genes Catsper fueron descubiertos *in silico* debido a sus características moleculares similares a dominio de canales iónicos. Las proteínas producidas por estos genes conforman un canal que permite la entrada de calcio y se localiza en la membrana plasmática de la pieza principal del flagelo lo que sugería su posible función en la movilidad flagelar. Su expresión es regulada durante la maduración sexual, durante la espermatogénesis en las etapas de la meiosis, presentando diferentes perfiles de expresión durante la maduración sexual en ratón (Figura 3) (Ren *et al.* 2001; Quill *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007).

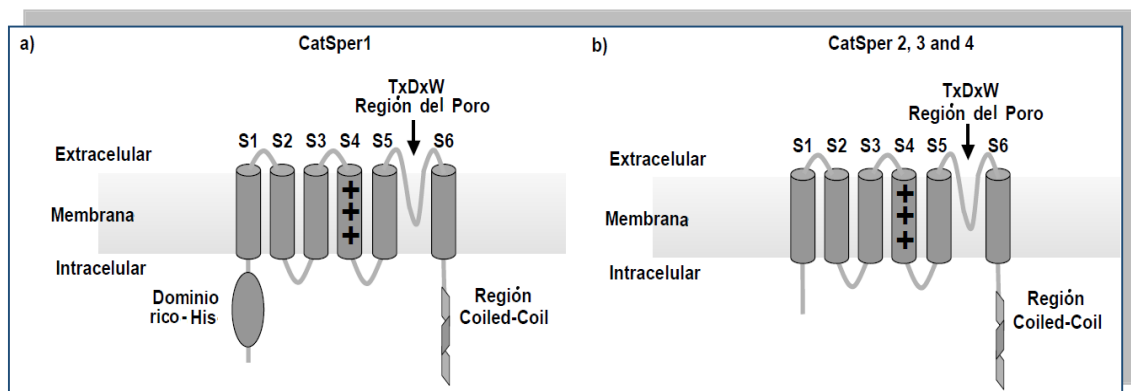


**Figura 3. Perfil de expresión de Catsper 1-4.** RNAm extraído de testículo de ratón durante su desarrollo testicular y cuantificado por RT-PCR tiempo real. Inciso A) Catsper 1 y 2, e inciso B) Catsper 3 y 4 (Hong-Gang, 2007).

El canal *CATSPER* es selectivo para  $Ca^{2+}$ , se conforma de cuatro proteínas *CATSPER* 1-4 que tienen analogía con las subunidades  $\alpha$  de los canales iónicos dependientes de voltaje.

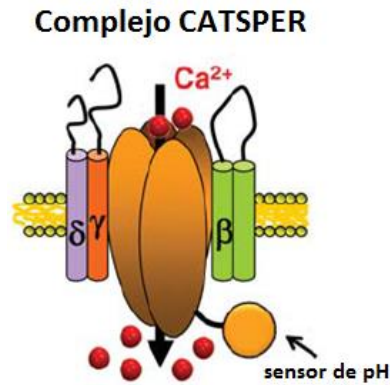
Cada proteína *CATSPER* 1-4 contiene seis regiones transmembranales denominadas S1-S6. Las regiones S1-S4 están muy cercanas ya que se encuentran separadas por bucles cortos, mientras que un bucle largo separa

S5 de S6, este contiene un tramo estrecho hidrofóbico conservado que forma el poro del canal, el cual es conservado entre canales de calcio sensible a voltaje. En la región transmembranal S4 se encuentran aminoácidos (aa) cargados positivamente (lisina/arginina), los cuales están intercalados cada 3 o 4 aa, éstos sensan el voltaje y activan el canal (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2001; Lobley *et al.*, 2003). La especificidad iónica del canal está determinada por la región consenso del poro [T/S] x [D/E] x W encontrada en los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. El dominio coiled-coil en su extremo C-terminal es similar a los dominios de interacción encontrados en complejos de multiproteínas como SNARE, lo que sugiere que estos dominios están implicados en heteromultimerización (en este caso forma tetrámeros). En el caso de *CATSPER1*, este presenta un dominio rico en histidinas que le confiere la capacidad de modular la actividad del canal por el cambio intracelular a un pH ligeramente alcalino. (Figura 4) (Lobley *et al.*, 2003).



**Figura 4. Topología de los canales CATSPER.** a) Muestra la topología de *CATSPER1*. b) Muestra la topología de *CATSPER2*, 3 y 4 (Modificado de Lobley *et al.*, 2003).

Además de las proteínas formadoras del poro, el canal contiene subunidades auxiliares, la expresión de estas es exclusiva de testículo y se localizan en la pieza principal del flagelo; las subunidades son: *CATSPER $\beta$* , *CATSPER $\gamma$*  y *CATSPER $\delta$* , las cuales son requeridas para ensamblar un canal funcional (Figura 5) (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011)



**Figura 5. Composición molecular del complejo de canal *CATSPER*.** El poro selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  está formado por las cuatro diferentes subunidades *CATSPERs*1-4. Las subunidades auxiliares *CATSPER* tienen uno (*CATSPER* $\delta$  y *CATSPER* $\gamma$ ) o dos (*CATSPER* $\beta$ ) hélices transmembranales y grandes dominios extracelulares que pueden estar implicados en la regulación del Canal *CATSPER* por las señales del aparato reproductor femenino (Modificada de Kirichok y Lishko 2011).

El canal *CATSPER* tiene la posición ideal para controlar la quimiotaxis de los espermatozoides, porque los giros quimiotácticos que guían los espermatozoides hacia el ovocito dependen del movimiento flagelar mediado por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo. En los espermatozoides, la progesterona estimula el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  por un mecanismo no genómico, teniendo un efecto similar al incremento de pH en el citoplasma.

Recientes investigaciones encontraron que la acción de la progesterona no involucra la presencia de AMPc ni de enzimas cinasas sino que ocurre directamente sobre el canal *CATSPER* (Lishko *et al.*, 2011; Strunker *et al.*, 2011).

### 1.1.3.1. Organización genómica y expresión de las proteínas *CATSPER*

El primer miembro de la familia *CATSPER* que fue detectado fue *CATSPER1*, en su región amino terminal contiene una marcada abundancia de residuos de histidina (49/250 aa), lo que sugiere que ésta proteína puede estar implicada en la modulación de la actividad del canal por el pH intracelular. En humanos el gen *CATSPER1* se localiza en el cromosoma 11, y contiene 12 exones. Su expresión es exclusiva de testículo y su gen predice una estructura primaria de 780 aa en el humano. El gen *CATSPER2* se encuentra en el cromosoma 2, su

gen predice una estructura primaria de 588 aa y al igual que *CATSPER1* su expresión es exclusiva en testículo (células germinales) (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2001).

El gen *CATSPER3* tiene 8 exones que abarcan una región de 43.7 Kb con un ORF de 398 codones y su expresión fue identificada principalmente en testículo pero también en otros tejidos como cerebro y muestras de cáncer de colon; en cuanto al gen *CATSPER4*, comprende una región de 12 kb con 10 exones y su expresión se detectó en testículo pero también en muy baja cantidad en placenta y pulmón (Lobley *et al.*, 2003).

### **1.1.3.2. Infertilidad causada por la ausencia de *CATSPER1***

Los genes *CATSPER* codifican las proteínas que conforman el canal de Ca<sup>2+</sup> en el flagelo del espermatozoide, donde juegan un importante papel en la movilidad y la RA.

Por la importancia de la expresión del gen *CATSPER1* en la fertilidad, se han realizado estudios en pacientes subfértiles con deficiencia en la movilidad de los espermatozoides, donde se encontró una reducción en los niveles de expresión del gen *CATSPER1* en comparación con los pacientes fértiles (Nikpoor *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Por otro lado la relación de *CATSPER1* con la infertilidad masculina fue demostrada por Avenarius *et al.*, (2009) que estudiaron a dos familias consanguíneas de Iraníes que segregan infertilidad masculina autosómica-recesiva y encontraron que el gen *CATSPER1* de individuos afectados tiene una mutación por inserción en el exón1, lo que cambia el marco de lectura y origina un codón de paro prematuro en el gen.

Debido a que la gran mayoría de los estudios publicados acerca del canal *CATSPER* se enfocan a la bioquímica y fisiología del canal en el espermatozoide, se considera de igual importancia conocer la regulación de la expresión del gen *CATSPER1* durante la espermatogénesis.

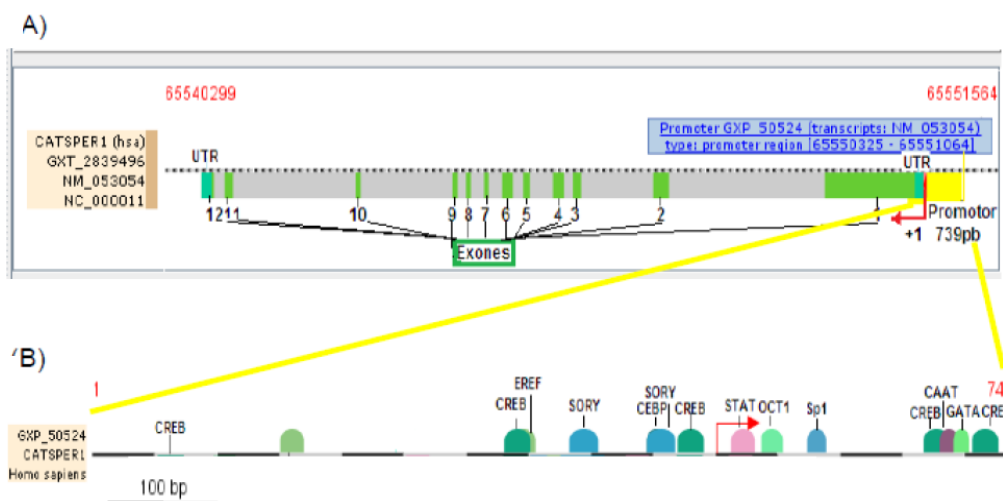


## 1.2. ANTECEDENTES

### 1.2.1. ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *CATSPER1* DE HUMANO

Dentro de nuestro grupo de investigación se ha clonado y caracterizado el promotor de *CatSper1* de ratón (Mata-Rocha *et al.*, 2013) y el de humano (*CATSPER1*). El análisis *in silico* de las regiones que preceden al gen *CATSPER1*, indicó la presencia de un promotor con un tamaño de 739 pb (Figura 6A); el promotor comprende parte del primer exón, lo que indica que dentro de él se encuentran secuencias que funcionan como sitios de unión a factores de transcripción y proteínas reguladoras específicas de la espermatogénesis para que se lleve a cabo la transcripción del gen. (Alvarado, 2010).

Mediante el uso del programa [www.genomatix.de](http://www.genomatix.de) se determinó que el promotor de *CATSPER1* comprende 236 pb del primer exón y 503 pb río arriba del inicio de la transcripción; por otro lado fueron identificados sitios de unión a distintos factores de transcripción, como CREB (o sitios CRE), sitios EREF, OCT-1, Sp1, SRY y SOX 5 (Figura 6B). Entre estos se encuentran factores importantes para el reclutamiento de la maquinaria basal y otros para la determinación de la diferenciación sexual masculina.



**Figura 6. Análisis del promotor de *CATSPER1* de humano y predicción de sus sitios de unión a factores de transcripción.** A) Promotor de 739 pb para *CATSPER1* humano localizado en la región 5' del gen *CATSPER1*, 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 factores de transcripción dentro del promotor. El inicio de la transcripción se indica en la flecha roja (Alvarado, 2010).

Por otro lado se encontraron tres sitios de inicio de la transcripción, una adenina (A) como principal sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés, Transcription Start Site) en la posición -135 pb, y dos sitios secundarios a -97 y -92 pb del codón de inicio y dentro del promotor (Figura 7), lo cual es característico de promotores independientes de caja TATA (TATAless).

El análisis *in silico* del promotor de *CATSPER1* reveló diversos sitios de unión a factores de transcripción, como sitios SRY analizados previamente (Hernández, 2012) y tres sitios CRE que se denominaron CRE0 CRE1 y CRE2, así también reveló una caja tipo TATA, dos cajas CAAT y una caja GC río arriba del TSS. Estudios realizados por Mata-Rocha *et al.*, (2013) descartaron la contribución de las cajas CAAT y tipo TATA como secuencias para la transcripción basal del gen *CATSPER1* por lo cual el promotor es considerado como promotor de tipo TATAless porque su actividad transcripcional no se vio afectada después de la eliminación de los sitios de caja TATA; sin embargo el análisis *in silico* mostró que otros sitios río abajo como Sp1, SRY, GATA1 pueden ser encontrados en el promotor de *CATSPER1*, así como un sitio de unión a CRE localizado previo al TSS que podría funcionar como un sustituto para las secuencias CAAT y TATA y reclutar la maquinaria basal de la transcripción (Figura 7).

-1416 TCAAAAAAAAA AAAAAGAAAG AAAGAAAACA AAATGTGTAT GAAGCAATCC TCAATAAATG  
**SRY**

-1356 ATGGCTGATA GTTTAATTTT GGTAATAACC CTAAGGGGGG GTTCCAAGAT CAAGAAGAGA  
-1296 ATAATAATGC CAATTAACAT GTATTGGCCA GGCATGGTGG CTCACACCTG AAATCCCAGC  
-1236 ACTTAGGGAG TCGGAGGTGG GTGGATCATT TGAGGTCAAG AGTTCAAGAG CAGCCTCGTC  
**CRE**

-1176 AACATGGTGA AACCCCGTCT CACTAAAAA TACAAAAATT AGCTGGGTGT GGTGTGCACC  
-1116 TGTAGTCGCA GCTACTAGGA AAGCTGAGGC AGGAGAATTG CCTGAACCCA GGAGGCAGAG  
-1056 ATTGCAGTGA GCCAAGATTG CACCCCGGCA CTCCAGCCTA GTGACAGAGT AAGACTCTGT  
-996 CTCAAAAAAAA AAAAAAAAAA AATTAGCCGG GGTGGGGTAT GGTGGTGGGT GGCTGTAATC  
-936 CCAGCTACTC AGGGGGCTAA GGCAGGAGGC TCACTTGAAC CTGGGAGGCA GAGATTGCCA  
-876 TGAGTGGAGA TCATGCCGCT GCACTCCAGC CTGGGTGACA GTGAGACTGT CTCAAAAAAC  
-816 AAAAACAAAA ACAAAAAAC ATGGGCTGGG CGCAGTGGCT CACACCTGTA ATCCCAACAC  
**SRY**

-756 TTTGGAAGGG CAAGGCAGGC GGATCACGAG GTCAGGAGAT CAAGACCATT CTGGCTAACA  
-696 TGGTGAACCC CCGTCTCTAC TAAAAATAGA AAAAGTTAGC CGGGCGTGGT GGTGGGCGCC  
-636 TGTAGTCCCA GCTACTTGGG AGGCTGAGGC AGGAAAATGG CATGAAGCTG GGAGGTGGAG  
-576 GTTGCAGTGA GTCAAGATCG TGCCACTGCA CTCCAGCCTG GGCACAGAG CGAGACTCCA  
-516 TCTCAAAAAC AAACAAGAA ACAAACAACA ACAACAACAA CAAAACCAT GTATTATGCT  
**SRY**

-456 GTTAATATAA GGCTTACATA TCTTAACTTT TTTGATCCTG TGGGCTAGGT ATTATTATTC  
**Oct-1**

-396 CCATTTTACA GAGGAAGAAA CTGAGGCACG GGAAAGTTCA GCAACAAGCC CAAGGTCCACA  
**ER-EF/SF1**

-336 CACCTACTTA TGAGGGAGTC AGGCAGTCTT CACCCAGAG CCAGCTGATC TCTAGATGGG  
-276 ACTGAAGACT GGACCACTTG GACCATTTTC TTTCCAACAA CAGGGCTAAA GTAGCTGATG  
**YY1**

-216 AAGCCATGGC GCCCCCATGG ACTTCTTTGT CCAGCTTTGC CAGTGACCTG TGAGGTCAAC  
**CAJA GC** **CRE**

-156 TTGGTCTAGT CCTTCCCTTT TCTTGACCTC GTTTCCTCA TTTCAATGA AGGAGTTTGA  
**CAJA CAAT**

-96 CACAATAATT CTTGATTCCG AACTATAGCC CAGGAAGAGG CATTTGGGAA TGAGGCCCTG  
**CAJA CAAT** **CAJA TATA** **+1**

-36 GCCTGCTGGT GACATCATAG AGGGGAGAGT TCCACGAGAA TAGTCAGGCC TTTCTGGAAG  
**CRE**

+24 CCCAGTGCCA CAGTCTGCAT TGAGCTTGGC TCAGGAAAGA AGGGAAATCC AGGCGGGGCC  
**Sp1**

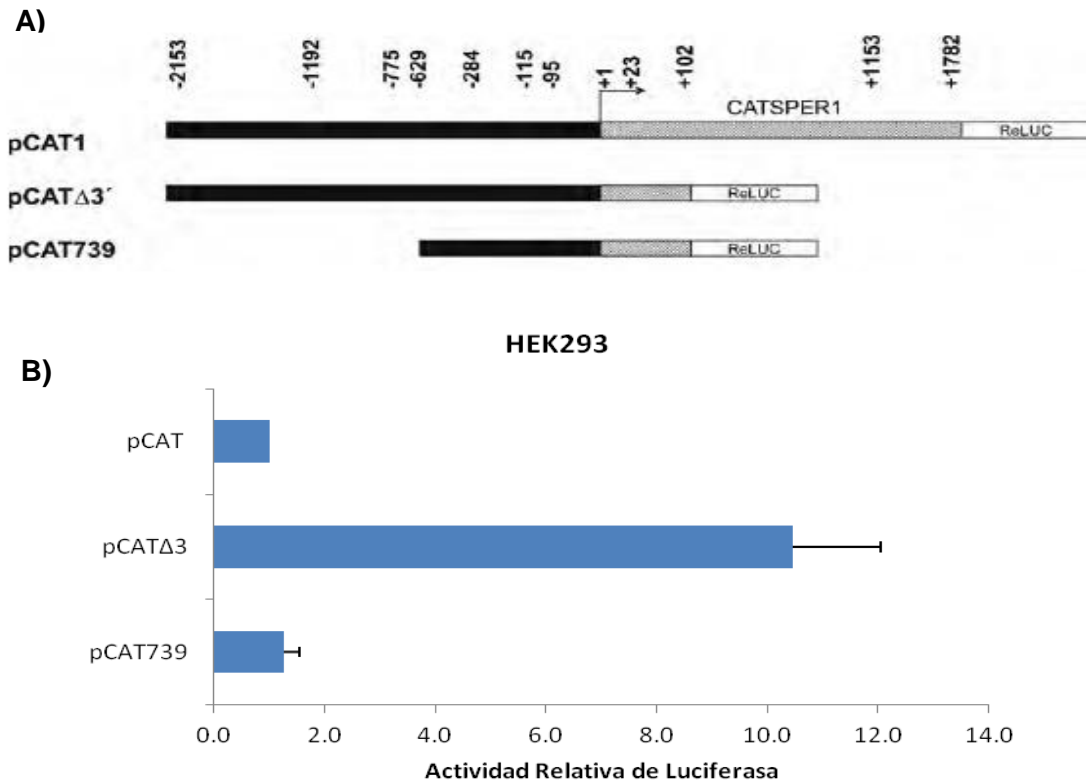
+84 TGTTGGGCCC AGGTCTTGAG CTCTTTTGGC TCCAGAGTTC CCAGCACAGT CATGGATCAA

+144 AACTCAGTGC CTGAAAAGGC TCAGAATGAG GCAGACACCA ATAACGCAGA TAGGTTCTTT  
**SRY** **CAAT-BF** **GATA1**

+204 CGCTCTCACT CATCACCCCC ACACCACAGG CCAGGCCACA GCAGAGCTCT CCACCATTAC  
+264 GAGTTGCACC ATCACGGCGT

Figura 7. Secuencia nucleotídica del promotor de *CATSPER1* y sitios de unión a factores de transcripción. El promotor de *CATSPER1* está delimitado por las bases C y A resaltadas en turquesa. El inicio de la traducción se encuentra resaltado en amarillo, los tres TSS se encuentran resaltados en rojo, en la posición -3 del inicio de la transcripción se encuentra el inicio del primer exón. Los sitios de unión a los factores SRY, Oct1, YY1, SF1, GCNF, ER, CRE, Sp1, CAAT-BF y GATA1 están subrayados así como las señales putativas para la maquinaria de transcripción basal como la caja TATA (Modificado de Mata-Rocha *et al.*, 2013).

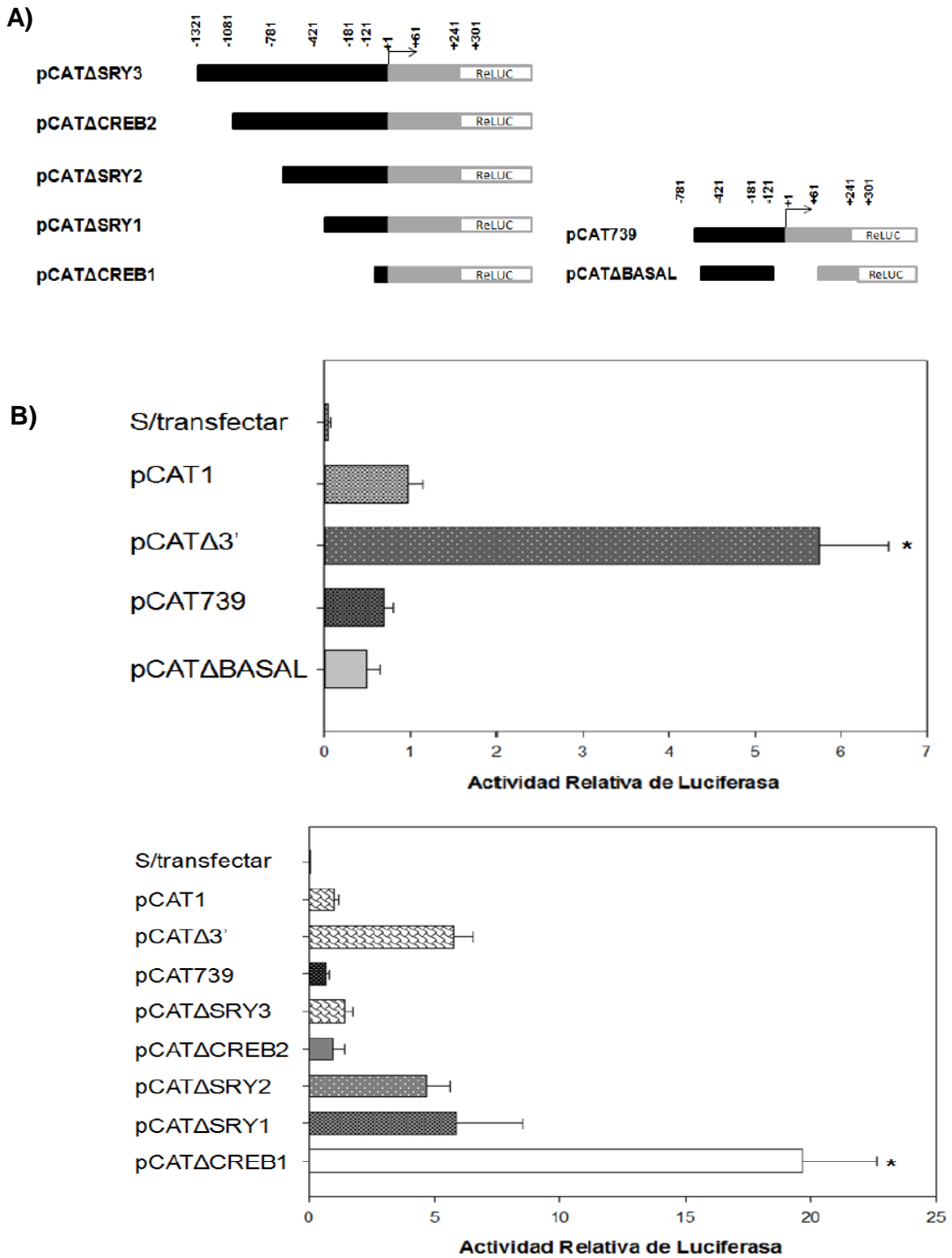




**Figura 9. Actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293.** A) Delecciones de la región promotora de *CATSPER1*. La construcción completa pCAT1 tiene una longitud de 7022 pb en donde el inserto es de 3702 pb. En la construcción pCAT $\Delta$ 3' se deletaron 1450 pb dejando una longitud de 5573 pb, en esta delección se eliminó parte del primer exón que no comprende el promotor. En pCAT739 se deletaron 1497 pb dejando una longitud de 4059 pb, en esta construcción se delimito el promotor de 739 pb. Los sitios de reconocimiento a los factores de transcripción SRY y CREB se localizan en la zona negra y en gris se muestra la región promotora de *CATSPER1*. B) En la gráfica se muestra que en la construcción completa (pCAT) hay menos actividad transcripcional comparada con las delecciones 3' y 5' en donde se eliminó parte del primer exón y algunos sitios de reconocimiento a factores de transcripción respectivamente. (Mata-Rocha *et al.*, 2013).

Debido a que Mata-Rocha *et al.*, (2013) encontraron que la construcción que contiene el promotor predicho y una región río arriba presentó mayor actividad transcripcional, y en esta región se encuentran sitios consenso para SRY y CRE, se realizaron una serie de delecciones para ver cómo se afecta la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1*. Se hicieron 6 delecciones de manera secuencial de las regiones que posiblemente estén regulando la actividad del promotor, así mismo se eliminaron los sitios de reconocimiento de la maquinaria transcripcional basal (cajas ACAAT, TATAG, CRE0 y el TSS), a esta última construcción se le denominó pCAT $\Delta$ BASAL (Figura 10) (Hernández, 2012).





**Figura 10. Análisis de las construcciones con regiones deletadas usando transfección in vitro en la línea celular HEK293.** La construcción se denominó de acuerdo con la región que se eliminó. pCATΔSRY3 con un inserto de 1623pb, pCATΔCREB2 con un inserto de 1313 pb, pCATΔSRY2 con un inserto de 1032 pb, pCATΔSRY1 con un inserto de 709 pb, pCATΔCREB1 con un inserto de 381 pb, pCATΔBASAL con un inserto de 550 pb, esta delección se hizo a partir de la construcción pCAT739. A) Evaluación de la actividad transcripcional de la construcción pCATΔBASAL comparada con la construcción pCAT1, pCATΔ3' y el promotor de 739 pb. \*P<0.05 comparada con pCAT1, pCAT739 y pCATΔBASAL. 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) (Hernández, 2012, resultados sin publicar).

El análisis con pCAT $\Delta$ BASAL demuestra que el gen se sigue transcribiendo en condiciones basales de manera similar al vector pCAT739 (Figura 10A), indicando con esto que las cajas CCATTTT, GGCGCCC, CREB1, SRY1 y SRY0 pueden ser suficientes para la transcripción basal del gen *CATSPER1*.

En cuanto al análisis de las deleciones del promotor, los resultados indican que la eliminación de los sitios de unión a factores de transcripción producen una disminución mientras más alejados del TSS estén, pero el efecto se revierte al eliminar los sitios cercanos TSS y aumenta en los más próximos (Figura 10B), lo cual sugiere que estos últimos actúan como represores de la transcripción. Por otra parte cuando comparamos la actividad transcripcional de pCAT $\Delta$ 3' (que incluye los tres sitios CRE) esta incrementa de manera importante, sugiriendo con esto que los sitios CRE pudieran regular la actividad transcripcional de *CATSPER1* (Figura 10A).

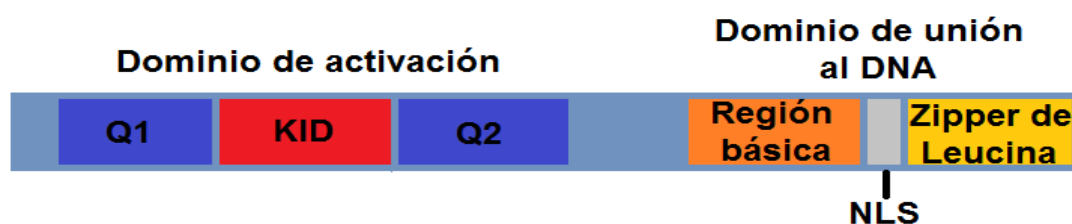
### 1.2.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CREB Y CREM

Durante la diferenciación de las células germinales masculinas ocurren cambios importantes en la expresión de genes (Wistuba *et al.*, 2007).

La vía de transducción de señales dependiente de AMPc es un mecanismo regulador importante que opera en diferentes etapas de la espermatogénesis; especialmente durante la meiosis hay un alto nivel transcripcional y muchos de los genes expresados en esta etapa (que es cuando se expresan los miembros de la familia *CATSPER*) contienen elementos de respuesta a AMPc (CRE), que son elementos en *cis* específicos del DNA, cuya secuencia consenso es 5'-TGACGTCA-3'. La regulación de la expresión de estos genes se ejerce a través de una familia de factores de transcripción que contienen un dominio básico/dominio de zipper de leucina (bZIP) que permite la homo o heterodimerización y la unión a sitios CRE (Don *et al.* 2002). Los dos miembros predominantes de esta familia que se encuentran presentes durante la espermatogénesis son CREB (proteína de unión a CRE) y CREM (Modulador CRE) (Tramer *et al.*, 2004).

La región N-terminal de los factores CREB y CREM contiene un dominio de activación que es dividido en dos regiones independientes. La primer región, el P box o dominio inducible por cinasas (KID por sus siglas en inglés) contiene un grupo de sitios susceptibles a fosforilación por la proteína cinasa A (PKA)

que regula la transactivación de estas proteínas. La segunda región comprende dos dominios ricos en glutamina Q1 y Q2, los cuales flanquean el P box, estos dominios interaccionan con componentes de la maquinaria basal de la transcripción. P box y al menos una región rica en glutaminas son necesarios para la activación de CREB y CREM (De Cesare *et al.*, 1999). Además de estos dominios los factores CREB y CREM contienen un dominio de unión a DNA que se compone de una región básica que medía la unión a sitios CRE, el zipper de leucina que medía su dimerización y una señal de localización nuclear (NLS) (Figura 11) (Don *et al.*, 2002).



**Figura 11. Estructura de las proteínas CREB y CREM.** Se muestran el dominio de activación que contiene los dominios ricos en Glutamina (Q1 y Q2) y el dominio inducible por cinasas (KID) así como el dominio de unión al DNA (Modificado de Don *et al.*, 2002).

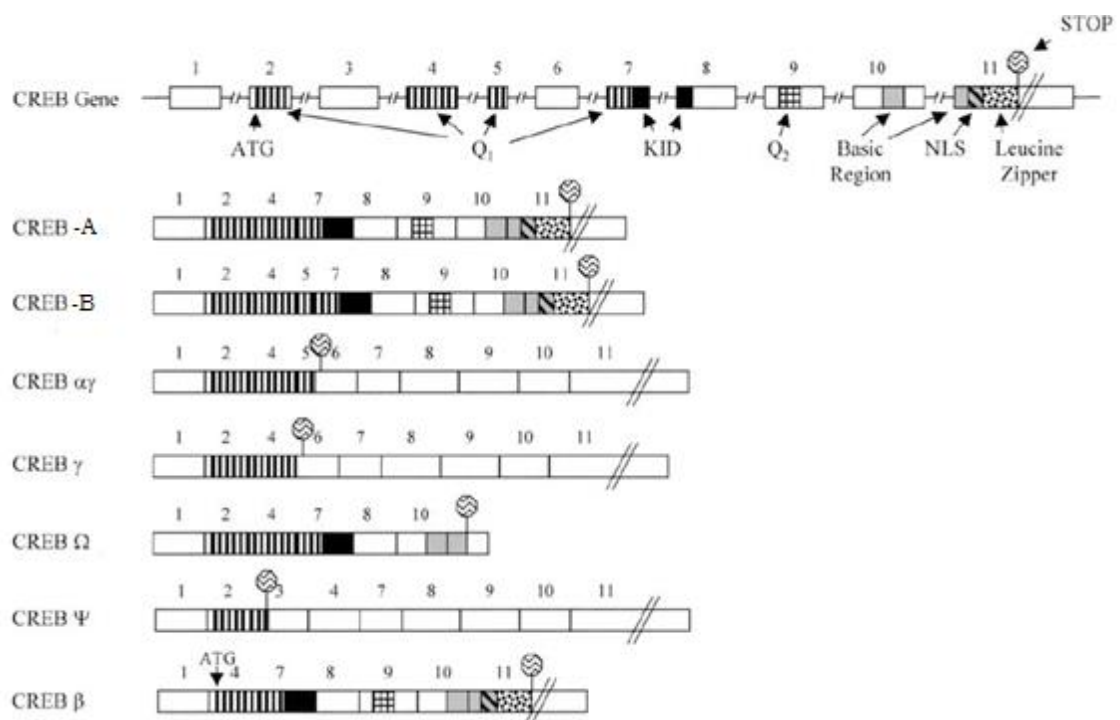
Un estudio realizado con diferentes especies (ratón, rata, hámster, mono y hombre) reveló que las proteínas CREB/CREM son altamente conservadas y juegan el mismo papel en la misma etapa de diferenciación en las diferentes especies. CREB junto con CREM responden a la señalización por AMPc y se unen a sitios CRE en los promotores de distintos genes (Kim *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.1. Isoformas de los factores transcripcionales CREB y CREM

El factor CREB fue el primer factor identificado que reconoce sitios CRE; es predominantemente un modulador positivo de genes responsivos a AMPc. Durante la espermatogénesis la expresión de CREB y su activación se observa principalmente en estadíos tempranos (espermatogonias) y varía durante el ciclo espermatogénico, siendo escaso durante la meiosis, sugiriendo que CREB tiene un importante papel en etapas tempranas de la espermatogénesis (Kim *et al.*, 2009). Ruppert *et al.*, (1992) describen seis transcritos de CREB producto del empalme alternativo ( $\Delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\psi$  y  $\Omega$ ), los más abundantes son



$\Delta$  y  $\alpha$  también llamadas isoformas A y B respectivamente. Estas variantes se encuentran predominantemente en todos los tejidos, siendo el transcrito más abundante el A, el cual carece de 14 aminoácidos dentro del marco de lectura en el dominio Q1 a diferencia de la variante B, las otras isoformas generan péptidos CREB truncados. A pesar de que CREB es un modulador positivo de genes, algunos estudios demuestran que el resultado del corte y empalme alternativo en testículo es la expresión de isoformas con actividad represora durante la espermatogénesis (Walker *et al.* 1996, Huang *et al.*, 2004).



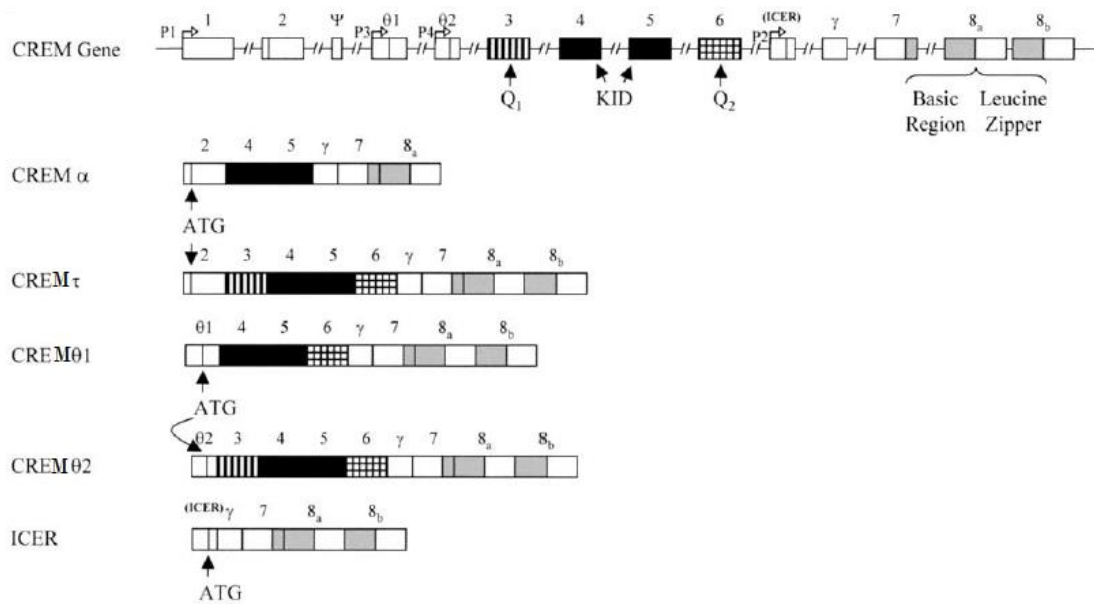
**Figura 12. Estructura del gen *CREB* y de las isoformas producto del empalme alternativo.** Se indican los exones correspondientes a los dominios funcionales de la proteína. Todas las isoformas se originan del mismo codón de inicio en el exón 2, excepto CREB $\beta$  que se origina de un promotor y un codón de inicio alternativo. Los codones de paro son indicados por la señal de paro (Modificado de Don *et al.*, 2002).

El factor de transcripción CREM es un modulador negativo para la transcripción y en testículo se encuentra mayormente expresado en meiosis y etapas postmeióticas. Este factor está involucrado en la regulación de la expresión de genes que son necesarios para la espermiogénesis (Wistuba *et al.*, 2007). Por otro lado, durante la espermatogénesis la expresión de isoformas represoras CREM en células premeióticas cambia hacia isoformas activadoras CREM

después de la meiosis por mecanismos de empalme alternativo, poliadenilación alternativa e iniciación de la traducción alternativa.

En general, de las isoformas generadas por el empalme alternativo del gen *crem*, las primeras tres caracterizadas son  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  que se originan del mismo promotor; otra isoforma caracterizada es la represora temprana inducible por AMPc, ICER por sus siglas en inglés, la cual dirige la expresión de una proteína truncada a partir de un promotor alternativo formada solo por la región básica y el zipper de leucinas.

Las proteínas CREM tienen la misma eficiencia y especificidad que CREB en la unión a elementos CRE, pero actúan como supresores de la actividad inducida por AMPc; sin embargo también existen formas activadoras de CREM, como las isoformas CREM $\theta$ 1, CREM $\theta$ 2 y CREM $\tau$ . Las primeras se originan de promotores y de sitios de inicio de traducción alternativos, mientras que CREM $\tau$  se origina del mismo promotor que las formas supresoras pero debido al empalme alternativo contiene regiones ricas en glutamina (Figura 13). CREM $\tau$  participa en la regulación positiva de genes haploides, esenciales para la diferenciación a lo largo de la espermiogénesis. En esta clase de genes se han identificado sitios de unión CRE o elementos tipo CRE, además hay altos niveles de esta isoforma activadora en las espermátidas redondas, lo que sugiere que esta isoforma está involucrada en la activación transcripcional de genes expresados en esas fases de la espermatogénesis (Foulkes *et al.*, 1992; Don *et al.*, 2002 y Kosir *et al.*, 2012).



**Figura 13. Estructura del gen *CREM* y de las isoformas producto del empalme alternativo.** La isoforma antagonista CREM $\alpha$  (representa también CREM $\beta$  y  $\gamma$ ) y la isoforma activadora CREM $\tau$  se originan del mismo promotor P1. Las isoformas activadoras CREM $\theta$ 1 y  $\theta$ 2, así como la isoforma represora ICER se originan de promotores alternativos. Pueden ser usados dominios alternativos de bZIP (Modificado de Don *et al.*, 2002).

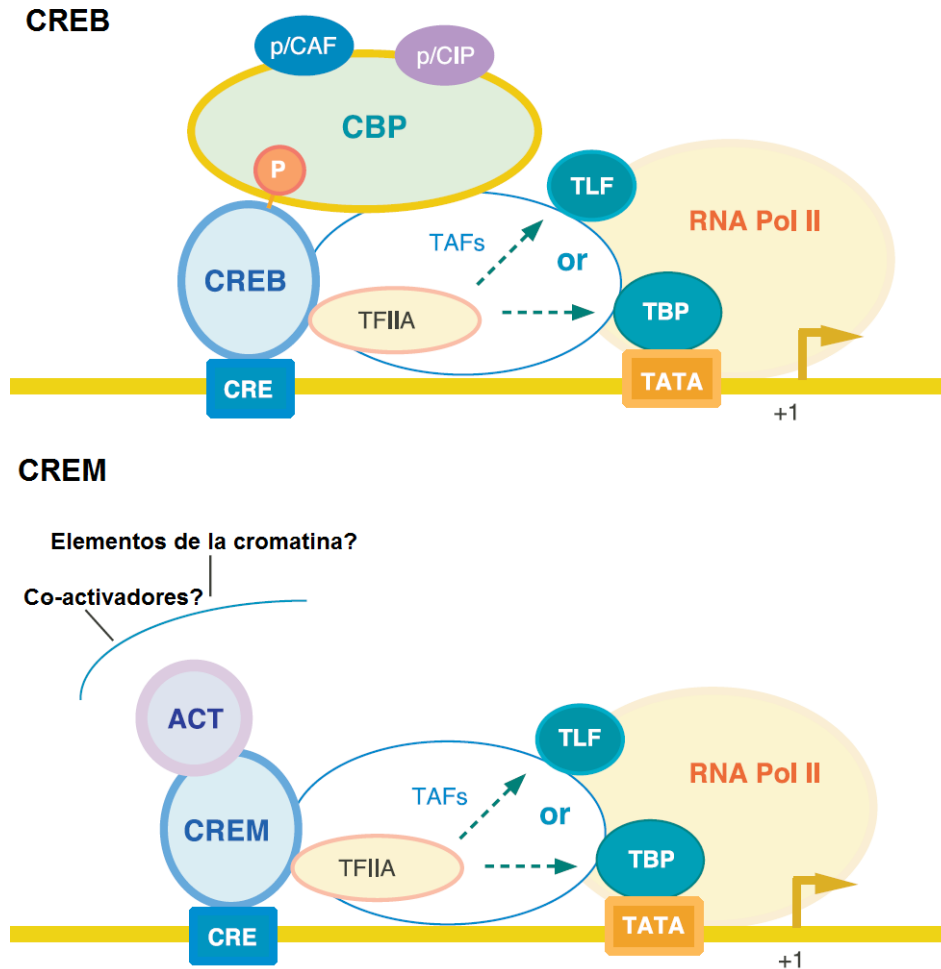
### 1.2.2.2. Activación de la transcripción por los factores CREB y CREM

Al llegar una señal a la superficie celular y activar el receptor acoplado a proteína G se desencadena la señalización. La proteína G activa la adenilato ciclasa que hidroliza el ATP en pirofosfato inorgánico (PPi) y AMPc. El aumento de AMPc intracelular activa a la PKA mediante la liberación de su subunidad reguladora y se transporta al núcleo.

En el caso de la activación del factor CREB la PKA fosforila la Serina 133 (Ser-133), dentro del dominio KID. CREB fosforilado puede unirse a la proteína de unión a CREB (CBP, por sus siglas en inglés), un co-activador con actividad de histona acetiltransferasa (HAT) necesario para reclutar la maquinaria basal de la transcripción y así llevar a cabo la activación transcripcional (De Cesare *et al.*, 1999; Don *et al.*, 2002).

Por otro lado la activación del factor CREM por PKA se lleva a cabo por la fosforilación de la Ser-117, aunque en células germinales no es necesaria la fosforilación para su activación (Fimia *et al.*, 1999). El mecanismo molecular por el cual CREM regula la actividad transcripcional es a través de un activador de CREM en testículo (ACT), un co-activador constituido por cuatro dominios

LIM (cada dominio constituido por dos dedos de zinc continuos) y medio motivo LIM en la región amino terminal. La expresión de ACT está restringida a células germinales masculinas, sin embargo han sido descritas otras moléculas tipo ACT en otros tejidos (Fimia *et al.*, 2000), este co-activador presenta actividad transcripcional intrínseca (Fimia *et al.*, 2001) sin embargo el mecanismo por el cual estos factores ejercen su función de activación todavía no es claro.



**Figura 14. Activación transcripcional mediada por CREB y CREM.** Arriba, representación esquemática de la activación por el factor CREB, una clave importante es la fosforilación del factor que promueve el reclutamiento de CBP un co-activador con actividad HAT. Abajo, activación por el factor CREM en células germinales, el cual no es fosforilado y su actividad se debe a su asociación con el co-activador específico de testículo, ACT, que no tiene actividad HAT. En ambos casos la activación involucra contactos con factores de la maquinaria basal de la transcripción tal como TBP (proteína de unión a TATA) o en caso de promotores TATA-less con TLF (factor tipo TBP) (Sassone-Corsi 2002).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Dado que *CATSPER1* es un gen expresado durante la fase meiótica de la espermatogénesis y que los factores CREB-A y CREM $\tau$  se expresan diferencialmente durante este proceso; sería relevante determinar si estos factores transcripcionales regulan este gen, debido a que en su promotor y en la región río arriba se encuentran sitios CRE.

### **3. HIPÓTESIS**

Los factores de transcripción CREB-A y CREM $\tau$  intervienen en la regulación del promotor del gen *CATSPER1* de humano.

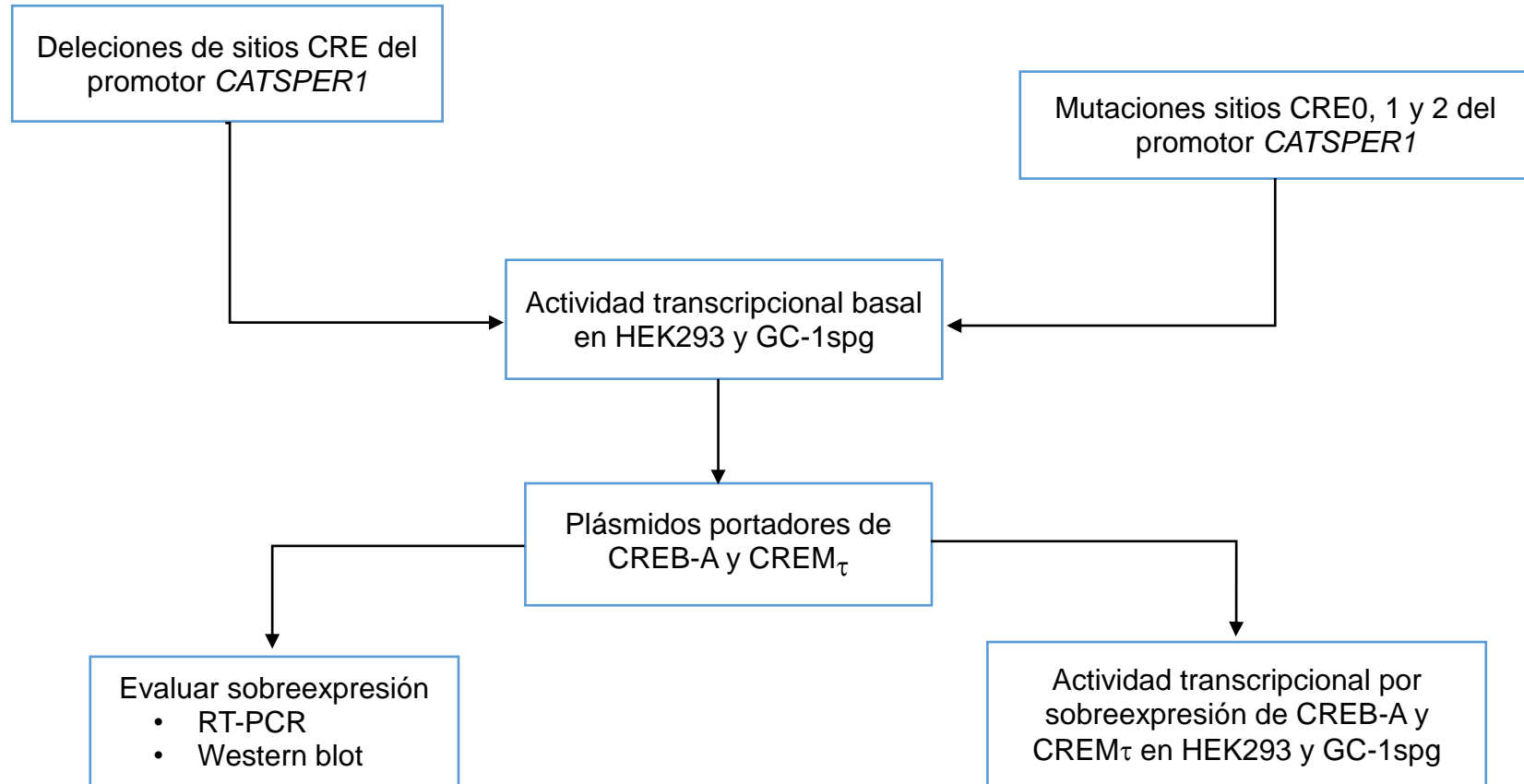
### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la regulación transcripcional del gen *CATSPER1* de humano por los factores de transcripción CREB-A y CREM $\tau$

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto de los factores de transcripción CREB-A y CREM $\tau$  en la actividad transcripcional del gen *CATSPER1*.
- Analizar la participación de los sitios CRE en la actividad transcripcional del gen *CATSPER1*.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. CONSTRUCCIONES DEL PROMOTOR DE *CATSPER1* DE HUMANO Y CLONACIÓN DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES CREB-A Y CREM $\tau$

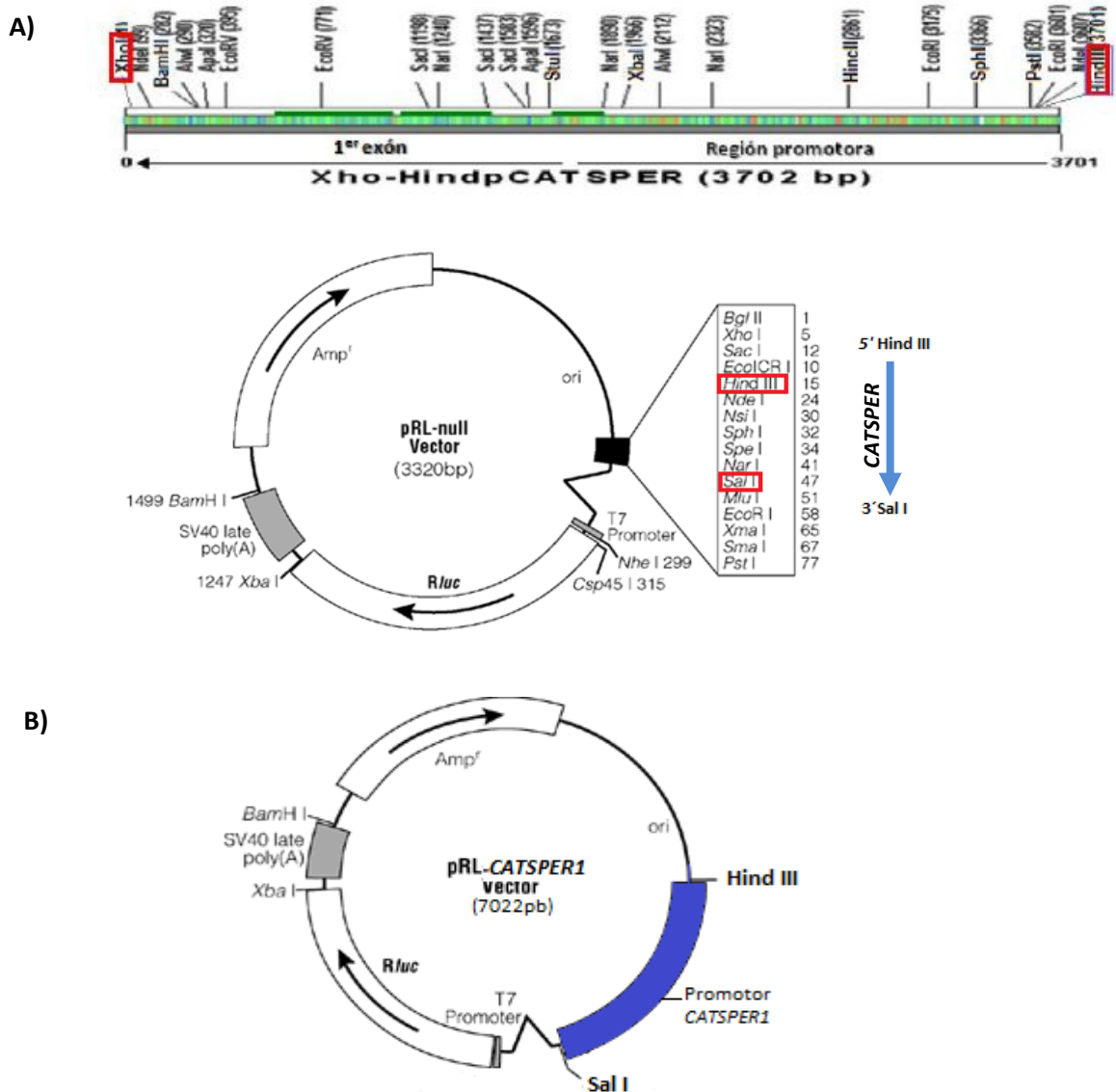
En estudios anteriores se clonó el promotor de *CATSPER1* humano a partir de la clona pBAC genómico RPCIB753F22692QC en bacterias *E. coli* DH10B con un fragmento de 174 kb (RZPD, IMAGE Consortium) de la cual se obtuvo un fragmento de 3702 pb que contiene la región río arriba y el primer exón de dicho gen, este se clonó en el vector pRL-null quedando con un tamaño total de 7022 pb, a esta construcción se le denominó pRL-*CATSPER1* (pCAT1) (Alvarado, 2010). El vector pRL-null carece de promotor y contiene el gen reportero para la luciferasa (*Renilla reniformis*), cuya expresión indica la actividad transcripcional de la región clonada (Figura 15).

Se obtuvieron también construcciones portadoras de deleciones del promotor de secuencias que posiblemente estén regulando su actividad transcripcional. La primera deleción realizada fue la eliminación de la parte del primer exón que no corresponde al promotor, denominada pCAT $\Delta$ 3', la cual se realizó a partir de la construcción pCAT1. Así mismo, se hicieron deleciones a partir del plásmido pCAT $\Delta$ 3' mediante deleción sitio dirigida por PCR (Quick-Change site directed mutagenesis) utilizando pares de oligonucleótidos duplex. Estos plásmidos fueron nombrados en base al sitio o región deletada (Tabla 1) (Hernández, 2012).

La obtención de los factores transcripcionales se realizó a partir de RNA de testículo humano (AMBION) y se obtuvieron los productos de amplificación para CREB-A y CREM $\tau$ , 985 y 901 pb respectivamente con los oligonucleótidos correspondientes mediante RT-PCR (Tabla1, Anexo) para lo cual se utilizó la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. El protocolo que se siguió fue el siguiente: 35 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 98°C, 30 seg de alineamiento a 54.8°C para CREB-A y a 60°C para CREM $\tau$  y 1:40 min de extensión de las cadenas a 72°C, los productos se analizaron mediante



electroforesis, se purificaron las bandas, se clonaron en pJET 1.2/blunt y se propagaron en bacterias competentes *E.coli* DH5 $\alpha$ . Se realizó una PCR de colonia para determinar si las bacterias transformantes tenían el plásmido con el inserto utilizando los oligonucleótidos “forward” y “reverse” de pJET provistos por el kit. pJET es un vector de tránsito por lo cual posteriormente se subclonaron los genes de los factores transcripcionales en el plásmido pcDNA3, el cual permite la expresión de los genes bajo el promotor de CMV y contiene una señal de polidenilación río debajo de donde fueron clonados los factores transcripcionales. El plásmido pcDNA3 se cortó en los sitios *Hind*III y *Not*I donde fueron ligados CREB-A y CREM $\tau$ , estas construcciones se denominaron pCREB-A y pCREM $\tau$  (Figura 16). Las clonaciones fueron verificadas mediante secuenciación automática con el oligonucleótido de T7.



**Figura 15. Construcción portadora del gen *CATSPER1*.** Contrucción previamente realizada (Hernández, 2012). A) La región genómica de *CATSPER1* se ligó en pRL-null (entre los sitios Hind III y Sal I). B) El promotor de *CATSPER1* fue clonado en dirección hacia el gen de luciferasa de *Renilla reniformis* quedando con un tamaño total de 7022 pb, la cual se nombró pRL-*CATSPER1* (pCAT1).

## 6.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para las células competentes se utilizó la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que presenta el siguiente genotipo: **F-  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*.** La cepa fue cultivada a 37°C durante toda la noche en 5 ml de medio LB. Al día siguiente se inoculó 1 ml de estas bacterias en 100 ml de medio LB fresco (50 ml producen 1 ml de células competentes aproximadamente). Se incubó a 37°C con agitación vigorosa en un matraz adecuado para facilitar la ventilación hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a 550 nm. Se colocó en hielo por 10 min. Las células se centrifugaron en tubos estériles a 5,000 rpm/10 min/4° C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 25 ml de una solución TFB1 fría y se incubó por 10 min/4°C. Se centrifugó y el pellet se resuspendió en 5 ml de una solución TFBII. Las bacterias competentes se alicuotaron, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

## 6.3. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.

Para la transformación se utilizaron de 20 a 50 ng de plásmido para transformar 100  $\mu$ l de bacterias competentes.

Las bacterias se mezclaron con el plásmido, se les dio un choque térmico mediante un pulso de calor de 42°C por 2 min y rápidamente se transfirió a hielo por 10 min. Se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C por 1 hora, posterior a la incubación se centrifugó a 3000 rpm/3 min, se descartó el sobrenadante dejando aproximadamente 100  $\mu$ l de medio; el paquete celular se resuspendió para posteriormente sembrar sobre placas de agar que contienen el antibiótico apropiado para el plásmido (LB-ampicilina) y fueron incubadas toda la noche a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron colonias candidatas portadoras del plásmido, se sembraron por

aislamiento en placas de agar LB-ampicilina y se incubaron 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.

**Tabla 1. Deleciones del promotor de *CATSPER1* de humano.** A partir de la construcción pCAT1 (denominada pCAT en adelante) se obtuvo el plásmido pCAT $\Delta$ 3' y de esta última se hicieron las deleciones. La construcción pCAT5' fue molde para la elaboración de la pCAT $\Delta$ BASAL. Todas las regiones promotoras están clonadas en el vector pRL-null.

Plásmido	Longitud total (pb)	Longitud del inserto (pb)	Región deletada
pCAT1	7022	3702	
pCAT $\Delta$ 3'	5573	2253	Parte del primer exón que no corresponde al promotor. (1450 pb)
pCAT739	4059	739	Región río arriba del promotor que no corresponde a éste. (1497 pb)
pCAT $\Delta$ BASAL	3870	550	Región donde se encuentran cajas TATA, CAAG y sitio CRE0. (189 pb)
pCAT $\Delta$ CRE1	3707	381	Sitio CRE1 y CRE2. (1866 pb)
pCAT $\Delta$ CRE2	4741	1313	Sitio CRE2. (832 pb)

#### 6.4. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO (MIDIPREPARACIONES DE DNA)

Los plásmidos portadores del promotor de *CATSPER1*, de las deleciones, mutaciones, los factores transcripcionales, los plásmidos pRL-null y pGL3-null que carecen de promotor (controles negativos) así como los plásmidos pRL-CMV y pGL3-CMV (controles positivos) fueron purificados por columnas. La purificación de los plásmidos se realizó con el Kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen); para ello se crecieron bacterias transformadas con el plásmido de interés inoculando una colonia aislada en medio de cultivo LB-ampicilina

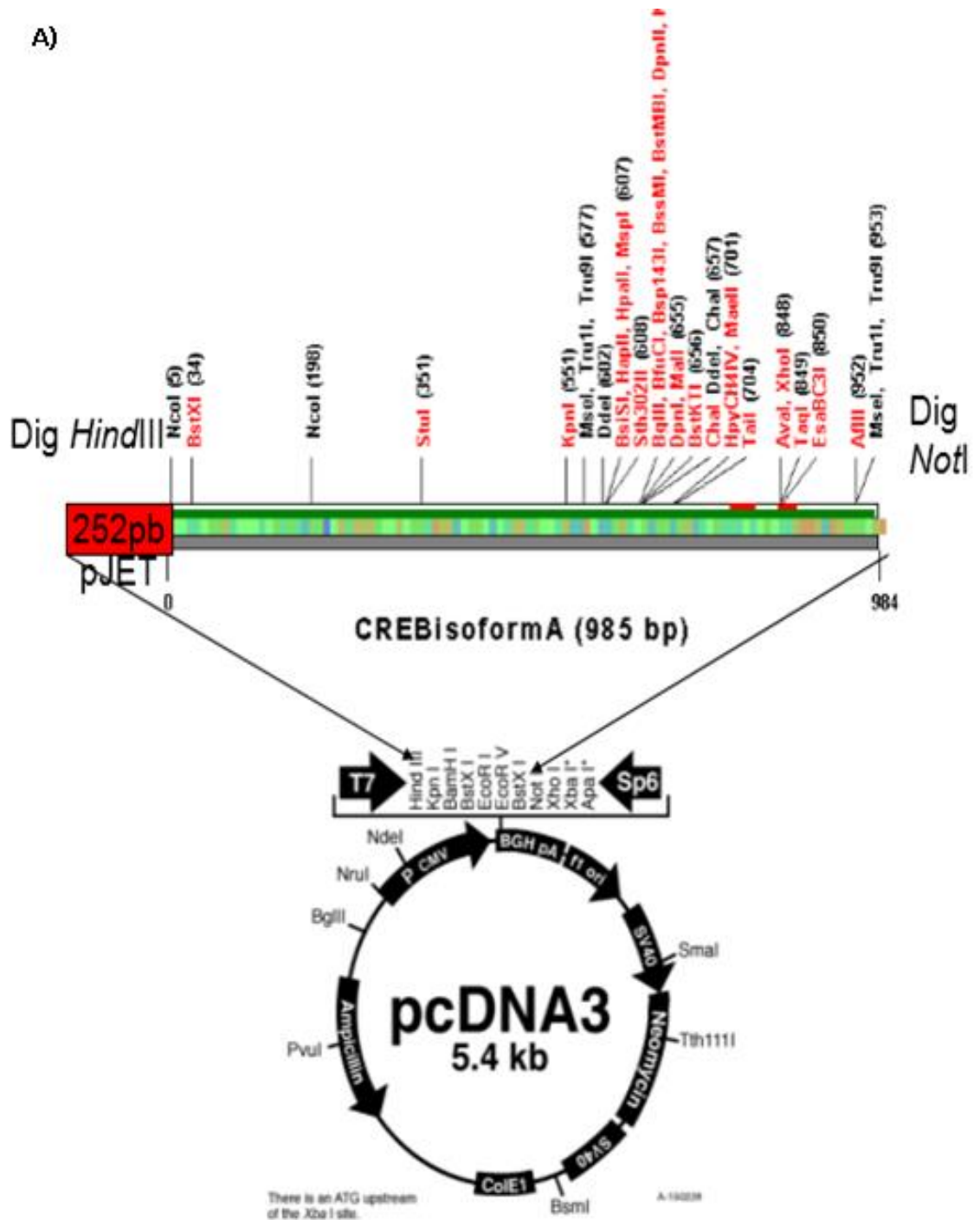
(concentración final de ampicilina 0.1 mg/ml) y se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche. Se obtuvo el pellet celular centrifugando en el rotor JA-14 a 6500 rpm/4°C/15 min. El pellet se resuspendió en 10 ml de Solución P1 con 40 µg/µl de RNasa, posteriormente se añadieron 10 ml de solución P2 (buffer de lisis) se mezcló por inversión 5–6 veces e incubó a temperatura ambiente (T.A.) 5 min. La reacción se neutralizó añadiendo 10 ml de solución P3, se mezcló por inversión y se incubó en hielo 20 min. Para obtener el sobrenadante se centrifugó en el rotor JA-14 a 12000 rpm/30 min /4°C. La columna se equilibró con 10 ml de buffer de equilibrio (QBT), y se dejó que el buffer cayera por gravedad, sin dejar que la columna se secase. Una vez equilibrada la columna se pasó por ella el sobrenadante, y la columna se lavó con 60 ml de buffer de lavado. Se eluyó el plásmido de la columna con 15 ml de buffer de elución, lo cual se colectó en tubos Corning y se añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol, se mezcló y se centrifugó en el rotor JA-20 a 12000 rpm/30 min /4°C. Se añadió 5 ml de etanol al 70% a la pastilla del plásmido obtenido y se centrifugó en el rotor JA-20 a 12000 rpm/10 min /4°C. Se secó 10 min. a T.A. y se resuspendió con 200 µl de agua Mili Q. El plásmido se alicuotó y se guardó a -20°C.

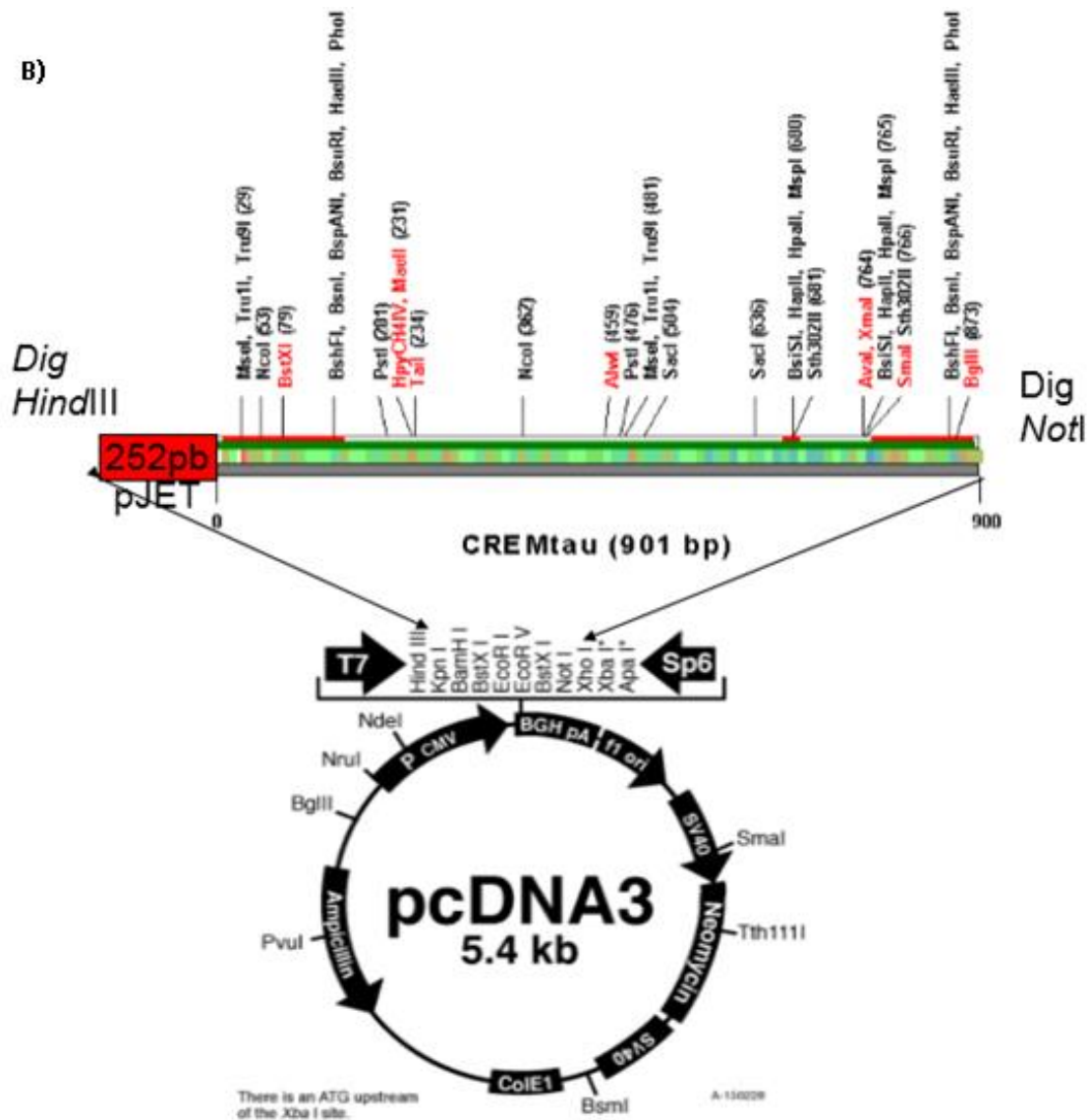
## 6.5. MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA

La mutagénesis se realizó mediante una reacción de PCR, la polimerasa replica ambas cadenas del plásmido con alta fidelidad sin desplazar el oligonucleótido que contiene la mutación. El oligonucleótido complementario se extiende durante los ciclos generando el plásmido mutado. Los oligonucleótidos usados fueron CRE2mut, CRE1mut y CRE0mut (Tabla 2, Anexo). La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 µl la mezcla contiene 10 µl de buffer de amplificación 10X, 120 ng de plásmido templado (pCAT Δ3'), 15 µM de cada oligonucleótido mutado, 6 µl de la mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs) y 1 µl de DNA Platinum Pfx polimerasa (2,5 U/ml). El protocolo que se siguió fue el siguiente: 30 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 65°C y 6 min de extensión de las cadenas a 68°C. Una vez finalizado el PCR se adicionaron 10 U/µl de la endonucleasa *DpnI*, incubándose a 37°C/1 hora. La *DpnI* degrada específicamente el DNA metilado

y hemimetilado del plásmido parental no mutado. El producto de PCR obtenido se transformó en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las colonias candidatas fueron verificadas por secuenciación automática posterior a su purificación para confirmar la incorporación de las mutaciones en los sitios de unión a factores de transcripción.

A)





**Figura 16. Construcciones portadoras de los genes de CREB-A y CREM $\tau$ .** Construcciones previamente realizadas, los transcritos de los factores transcripcionales fueron clonados en un vector transitorio pJET y posteriormente se cortaron en los sitios HindIII y NotI y se ligaron en un vector que permitiera su sobreexpresión, pCDNA3. A) Clonación del gen CREB-A en pCDNA3 denominada pCREB-A, donde se muestra el tamaño del inserto en el vector. B) Clonación del gen CREM $\tau$  en pCDNA3 denominada pCREM $\tau$ , donde se muestra el tamaño del inserto en el vector.

## 6.6. SECUENCIACIÓN DEL DNA

Del producto de mutagénesis y de los plásmidos portadores de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  se realizaron transformaciones en *E. coli* DH5 $\alpha$  para tener colonias candidatas de cada una de las construcciones, fueron purificadas y por último fueron verificados mediante secuenciación

automática. Para la secuenciación se utilizó el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems. Se mezclaron 500 ng del plásmido, 4  $\mu$ l de Buffer de secuenciación 5X, 4  $\mu$ l del Mix de reacción, 20 pM del oligonucleótido y se llevó a un volumen final de 20  $\mu$ l. Se emplearon diferentes oligonucleótidos para cada secuenciación (tabla anexo). El protocolo que se siguió para la secuenciación de las mutaciones fue el siguiente: 25 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 96°C, 40 seg de alineamiento a 55°C y 4 min de extensión de las cadenas a 60°C. El protocolo que se siguió para los factores transcripcionales fue: 25 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 96°C, 40 seg de alineamiento a 60°C y 2 min de extensión de las cadenas a 60°C.

## 6.7. CULTIVO CELULAR

Dado que no se cuenta con una línea celular de humano donde se exprese *CATSPER1* las líneas celulares empleadas fueron: HEK293 la cual es derivada de células de riñón fetal humano transformadas con el gen E1a de adenovirus (homóloga por ser de humano) y GC-1spg derivada de ratones machos BALB/c, son células espermatogénicas tipo B inmortalizadas por transfección con pSV3-neo, la cual pertenece al mismo linaje celular de los gametos masculinos.

El manejo de las células se realizó dentro de una campana de flujo vertical esterilizada con luz UV durante 15 min., todas las soluciones empleadas fueron previamente esterilizadas por filtración con filtros de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro o por autoclave. El medio para el cultivo celular (DMEM) se manipula en condiciones de esterilidad en la campana y se atempera a 37°C antes de ser usado. Las células se mantienen en la incubadora a 37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las líneas celulares HEK-293 y GC-1spg se cultivaron en botellas y placas respectivamente con medio DMEM hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80-90%. Para la realización de pase celular de las células HEK293, el medio de cultivo se retiró mediante aspiración, se agregó 1 ml de medio suplementado nuevo y las células se comenzaron a despegar en forma mecánica, se transfirieron a una nueva placa en una dilución 1:100 para el mantenimiento del cultivo o en el caso de células para transfectar se realizó

conteo celular en la cámara de Neubauer y se inocularon en placas de 24 pozos con 0.5 ml de medio de cultivo DMEM. Para las células GC-1spg el procedimiento para despegar las células es distinto, para ello se aspiró el medio, se lavó la placa con 1ml de PBS 1X por tres veces para eliminar células muertas, se adicionó 1 ml de tripsina al 0.25%, se dejó que actuara incubando la placa a 37°C hasta que se observó que las células se despegaron de la superficie (entre 3-5 min), se arrastraron las células en 1 ml de medio DMEM. Para el mantenimiento de las células se transfirió una dilución 1:100 o en caso de células para transfectar se realizó conteo celular y se inocularon en placas de 24 pozos con 0.5 ml de medio DMEM.

#### **6.8. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA Y COTRANSFECCIONES DE LÍNEAS CELULARES HEK293 Y GC-1spg**

La transfección de las construcciones del promotor del gen *CATSPER1*, co-transfección con factores de transcripción y deleciones así como la co-transfección de factores de transcripción con construcciones con el sitio CRE mutado se realizaron usando el compuesto TurboFect (Fermentas). Se utilizaron los plásmidos pRL-null y pRL-CMV como controles negativo y positivo de los experimentos, respectivamente. Se utilizó como control interno el plásmido pGL3-CMV que posee como gen reportero la luciferasa de *Photinus pyralis*, este se adicionó en cada ensayo de transfección. Debido a que los plásmidos con las construcciones y/o factores transcripcionales así como el control endógeno se introducen en las mismas células, la actividad de luciferasa de *Renilla reniformis* medida para las construcciones pRL fue normalizada en función de la actividad de la luciferasa de *Photinus pyralis* del plásmido pGL3-CMV, minimizando así la variabilidad experimental causada por diferencias en viabilidad celular o eficiencia de transfección. Se sembraron células HEK293 ( $1.35 \times 10^5$  c/pozo) y GC-1spg ( $2.5 \times 10^4$  c/pozo) en placas de 24 pozos. Las transfecciones y cotransfecciones se realizaron 24 horas después, asegurándose de que cada pozo tuviera una confluencia celular entre 70-80%. El complejo de DNA-TurboFect se preparó en un tubo estéril utilizando 1  $\mu$ g de DNA (Tablas 2 y 3).



**Tabla 2. Transfección con las deleciones o mutaciones y co-transfección con los factores transcripcionales en células HEK293 ó GC-1spg**

	Transfección	Control positivo	Control negativo	Co-transfección	Control positivo	Control negativo
Plásmido con deleción o mutación	500 ng	-	-	500 ng	-	-
pCREB-A o pCREM $\tau$	-	-	-	485 ng	485 ng	485 ng
DNA degradado de salmón	485 ng	981 ng	981 ng	-	496 ng	496 ng
Control Endógeno pGL3-CMV	15 ng	15 ng	-	15 ng	15 ng	-
pRL-CMV	-	4 ng	-	-	4 ng	-
pGL3-Basic	-	-	15 ng	-	-	15 ng
pRL-null	-	-	4 ng	-	-	4 ng
Turbofect	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Medio DMEM sin suplementar	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l

**Tabla 3. Transfección con las deleciones o mutaciones y co-transfección con ambos factores transcripcionales en células HEK293.**

	Transfección	Control positivo	Control negativo	Co-transfección simultánea	Control positivo	Control negativo
Plásmido con deleción o mutación	300 ng	-	-	300 ng	-	-
pCREB-A y pCREM $\tau$	-	-	-	600 ng (300 ng de cada factor)	600 ng (300 ng de cada factor)	600 ng (300 ng de cada factor)
DNA degradado de salmón	685 ng	981 ng	981 ng	85 ng	381 ng	381 ng
Control Endógeno pGL3-CMV	15 ng	15 ng	-	15 ng	15 ng	-
pRL-CMV	-	4 ng	-	-	4 ng	-
pGL3-Basic	-	-	15 ng	-	-	15 ng
pRL-null	-	-	4 ng	-	-	4 ng
Turbofect	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Medio DMEM sin suplementar	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l	Llevar a 50 $\mu$ l

La mezcla DNA-turbofect se dejó incubando 15 min a T.A. y se adicionó lentamente a cada pozo, se agitó suavemente e incubó durante 48 horas, para posteriormente obtener los extractos proteicos.

## 6.9. ENSAYO DE LUCIFERASA DUAL

En los extractos proteicos se monitoreó la actividad de luciferasa de los genes reporteros en una sistema de ensayo Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) para producir quimioluminiscencia cuantificable con el Wallac 1420 VICTOR3™ luminometer. El término de reportero dual se refiere a la expresión simultánea y medición de dos enzimas reporteras individuales dentro de un mismo sistema.

Transcurridas las 48 horas de transfección se aspiró el medio de los pozos y se lavaron con 200  $\mu$ l de PBS 1X, por último se aspiró por completo el PBS 1X y se incubaron durante 15 min en agitación con 100  $\mu$ l de Passive Lysis Buffer 1X. Se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 14000 rpm/3 min, con el fin separar los restos celulares.

Se cuantificaron secuencialmente las actividades de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y luciferasa del *cnidario* Pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) en la misma muestra.

Las muestras se leyeron en el multidetector Victor 3, Perkin Elmer. Primero se colocaron 20  $\mu$ l del lisado celular dentro de la placa negra con fondo transparente de 96 pozos. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ l de reactivo LAR II a cada pozo que midió la actividad de la luciferasa de *Photinus pyralis* y generó una señal luminiscente que se cuantificó en cuentas por segundo, por último se añadieron 20  $\mu$ l del reactivo Stop and Glo a cada pozo el cual detuvo la reacción de la luciferasa de *Photinus* e inició la reacción para luciferasa *Renilla reniformis* en el mismo pozo, también se cuantificó para detectar la actividad. Se imprimieron los datos obtenidos y se analizaron (Figura 17).

Las actividades de las construcciones analizadas fueron normalizadas con la actividad del control endógeno pGL3-CMV y se consideró la actividad total de pCAT1 como una unidad relativa de luciferasa.

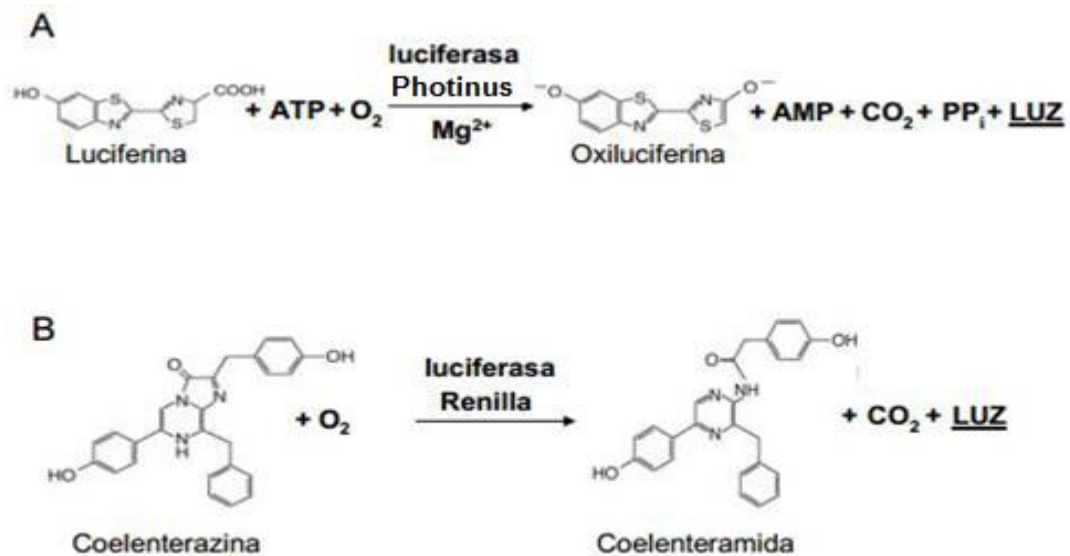


Figura 17. Reacciones bioluminiscentes catalizadas por la luciferasa de luciérnaga (A) y luciferasa de Renilla (B).

## 6.10. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CREB-A Y CREM $\tau$

### 6.10.1. Extracción de RNA y RT-PCR

Se crecieron células HEK293 (4X10<sup>5</sup> células) y células GC-1spg (1.4X10<sup>5</sup> células) en placa de 6 pozos, solo fueron transfectadas las células HEK293 a las 24 horas con 4  $\mu$ g de plásmido CREB-A o CREM $\tau$ , las células GC-1spg no se transfectaron para utilizarse como control de que en esta línea celular no se expresa el factor CREM $\tau$ .

A las 48 horas se extrajo RNA de las células transfectadas así como de células sin transfectar. Las células se lavaron con PBS 1X y se colectaron en un tubo estéril, se centrifugaron a 3000 rpm/10 min/4°C, el sobrenadante se desechó y al pellet celular se añadió 1 ml de TRIZOL, se incubó 3 min a T.A. y posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 14000 rpm/5 min/4°C. La fase acuosa se separó y se le añadieron dos volúmenes de isopropanol frío, se agitó y se incubó 5 min a T.A, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 14000 rpm/30 min/4°C, se decantó el sobrenadante, se añadió medio volumen de etanol frío al 70% y se centrifugó a 14000 rpm/10 min/4°C. El sobrenadante se decantó y el tubo se dejó secar al

aire (boca abajo), se resuspendió la pastilla con 25  $\mu$ l de agua estéril y por último se le dio tratamiento con DNasa, se purificó con fenol y se cuantificó.

La síntesis del cDNA se realizó con el Kit High Capacity Reverse Transcription de Applied Biosystems a partir de 2  $\mu$ g de RNA total. Se mezclaron: 2  $\mu$ l de Buffer 10X RT, 0.8  $\mu$ l de dNTPs 100mM, 2  $\mu$ l de RT Random primers 10X, 1  $\mu$ l de la enzima reverso transcriptasa, 4.2  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, a este mix se añadió la mezcla de los 2  $\mu$ g de RNA en agua libre de nucleasas en un volumen de 10  $\mu$ l, quedando así un volumen final de 20  $\mu$ l. Se incubó en el termociclador a 25°C por 10 min., 37°C por 120 min. y se paró la reacción a 85°C por 5 min.

Para la reacción de PCR se emplearon 1  $\mu$ l de cDNA y los oligonucleótidos específicos para CREB-A o CREM $\tau$  (Tabla 1, Anexo), para la reacción se utilizó la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Se amplificó el gen 18S como control.

#### **6.10.2. Extracción de proteína y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

Se crecieron células HEK293 (2X10<sup>6</sup> células) en placa de 100 x 20 mm y fueron transfectadas a las 24 horas con 10  $\mu$ g de plásmido CREB-A o CREM $\tau$ .

A las 48 horas de la transfección se extrajo proteína total, para esto se aspiró el medio, se dieron 3 lavados con PBS1X, se recolectaron las células y se obtuvo el pellet por centrifugación a 3000 rpm/10 min/4°C, al pellet se le añadieron 300  $\mu$ l de Buffer RIPA con PMSF 1 mM y se incubó 15 min. en frío, por último se centrifugó a 14000 rpm/20 min/4°C, se recolectó en un tubo estéril el sobrenadante (proteína) y se cuantificó por el método de Bradford.

Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS al 8.5% (ver Anexo 1), se calentaron las muestras a 95°C con Buffer Laemmli por 5 minutos e inmediatamente se pusieron en hielo, se cargaron en el gel de acrilamida lo correspondiente a 30 $\mu$ g de proteína. Se corrió a 85 V para el gel concentrador y a 100 V constantes (aproximadamente 40mA/gel) para el gel separador.

### **6.10.3. Inmunodetección de proteínas (Western-Blott)**

Se realizó la transferencia de proteínas de un gel SDS-PAGE en frío en un sistema semi-húmedo. Se utilizó una membrana de PVDF de 6x8 cm., la cual se trató con metanol durante 1 min y posteriormente se hidrató con el buffer de transferencia durante 15 min. En un recipiente limpio y liso, se colocaron hojas de papel Whatman 3MM y esponjas empapadas con tampón de transferencia, se colocó la membrana PVDF y sobre ésta se colocó el gel de acrilamida teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire entre la membrana y el gel. Posteriormente se cubrió el gel con unas hojas de papel Whatman 3MM y unas esponjas humedecidas con tampón de transferencia. Se pasó un rodillo para asegurarse que no queden burbujas de aire en el sándwich. Se colocó sobre el soporte de transferencia el “sándwich” y la transferencia se realizó a voltaje constante de 25 V por 35 min. Una vez finalizada, se desmontó el sándwich y se comprobó con rojo de Ponceau la transferencia de las proteínas a la membrana, comprobado esto se lavó la membrana con agua para quitar los restos del colorante.

Se bloqueó la membrana con Buffer TBS al 5% de leche durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Se lavó la membrana 3 veces con TBS 0.05% durante 10 min. para retirar el exceso de leche. Se añadió el anticuerpo primario diluido en TBS: CREB-A dilución 1:500, CREM $\tau$  dilución 1:250, dilución 1:500 y GADPH dilución 1:5000. Se incubó 1 hora en agitación. Se lavó la membrana 3 veces con Buffer TBS 0.05% durante 10 min., cada vez en agitación. Se incubó la membrana con el segundo anticuerpo diluido en TBS: CREB-A rabbit IgG-HRP dilución 1:4000, CREM $\tau$  mouse IgG-HRP dilución 1:3000 y GADPH rabbit IgG-HRP dilución 1:25000. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces la membrana con Buffer TBS 0.05% durante 10 min cada una. Se realizó el revelado por quimioluminiscencia.

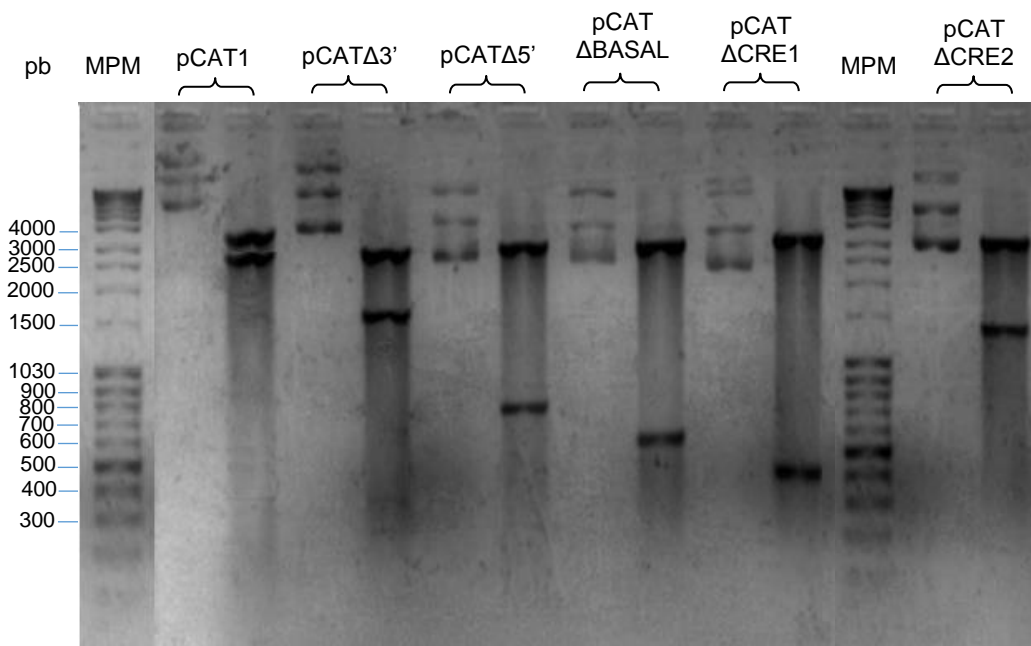
## **6.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaPlot versión 12.0 para Windows. Para encontrar diferencias estadísticas en cada experimento se usaron las pruebas t de student. Se consideró como diferencias estadísticamente significativas una  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. VERIFICACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS DEL PROMOTOR DE *CATSPER1* Y DE LOS FACTORES CREB-A Y CREM $\tau$

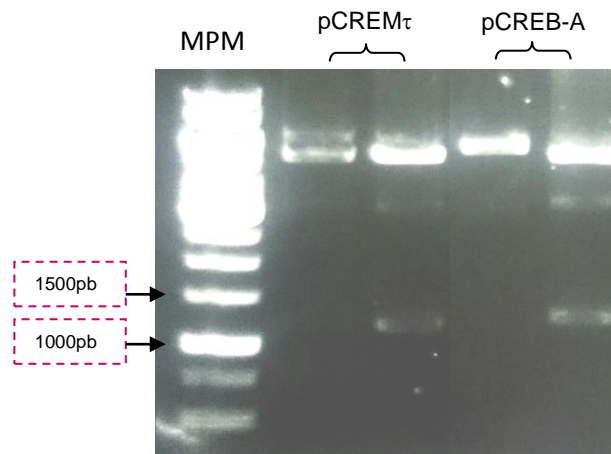
**Restricción enzimática de las construcciones plasmídicas del promotor de *CATSPER1*.** Las construcciones utilizadas en este estudio fueron obtenidas en estudios anteriores (Alvarado, 2010 y Hernández, 2012). Por lo tanto, al momento de recibir las construcciones que portan el promotor o sus delecciones lo primero que se realizó fue comprobar mediante restricción enzimática que fueran las correctas para poder usarlas en los ensayos de transfección y co-transfección. El promotor de *CATSPER1* así como las delecciones de este promotor están clonados en el vector pRL-null entre los sitios *HindIII* y *Sall*. Para la restricción de las construcciones se emplearon las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (el sitio *EcoRI*, se encuentra muy cercano al sitio *Sall* del vector), con lo cual se liberó el fragmento esperado para cada una de ellas (Figura 18). Después de comprobar que las construcciones están bien se procedió a la transformación bacteriana con las mismas y a la purificación de plásmido para los ensayos posteriores.



**Figura 18. Liberación del fragmento que tiene el promotor o deleciones a partir de las construcciones indicadas por restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.** Gel de agarosa al 1.2 %. Carril 1 MPM: marcador de peso molecular de 10 Kb; en los siguientes carriles se muestran los plásmidos que presentan el promotor (pCAT1) o sus deleciones, el primer carril de cada plásmido es el plásmido sin restringir y el segundo carril el plásmido restringido. Los fragmentos liberados para cada una de las construcciones son: pCAT1 3702 pb, pCAT $\Delta$ 3' 2252 pb, pCAT $\Delta$ 5' 739 pb, pCAT $\Delta$ BASAL 550 pb, pCAT $\Delta$ CRE1 381 pb y pCAT $\Delta$ CRE2 1313 pb

**Restricción enzimática y secuenciación automática de las construcciones plasmídicas de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ .** En estudios previos (Alvarado, 2010) se realizó la búsqueda *in silico* de elementos que actúan en *cis* putativos en el promotor del gen *CATSPER1* con el software MatInspector y se encontraron tres sitios CRE cuya secuencia consenso es 5'-TGACGTCA-3'. Estos sitios pueden ser reconocidos por los factores CREB y CREM; en este estudio se analizaron las isoformas CREB-A y CREM $\tau$ , ya que la primera es la isoforma del factor CREB más abundante en todos los tejidos y la isoforma CREM $\tau$  se expresa en etapas postmeióticas, etapas en las que se expresan las proteínas *CATSPER*.

Las construcciones que portan los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  (pCREB-A y pCREM $\tau$ ) utilizadas en este estudio fueron obtenidas con anterioridad y se verificaron por restricción enzimática y por secuenciación automática. Los genes CREB-A, y CREM $\tau$  están clonados en el vector pcDNA3, entre los sitios *HindIII* y *NotI*, para la restricción enzimática de estas construcciones se utilizaron las enzimas *HindIII* y *NotI* para lograr liberar el fragmento correspondiente en cada clonación, se confirmaron las dos construcciones por el tamaño del fragmento liberado (Figura 19).





**Figura 19. Liberación de los fragmentos con los genes CREM $\tau$  y CREB-A a partir de los plásmidos indicados por restricción con las enzimas *HindIII* y *NotI*.** Gel de agarosa al 1.2%. Carril 1 MPM: marcador de peso molecular de 10 Kb; en los siguientes carriles se muestran los plásmidos que tienen clonados los genes de CREM $\tau$  y CREB-A, el primer carril de cada plásmido es el plásmido sin restringir y el segundo carril el plásmido restringido. Los fragmentos liberados para cada una de las construcciones son: pCREM $\tau$  1153 pb y pCREB-A 1237 pb.

Los fragmentos liberados de los factores transcripcionales CREB-A Y CREM $\tau$  tienen un tamaño que difiere en menos de 100 pb; por lo tanto para tener la seguridad de cual construcción pertenece a cada factor se verificaron por secuenciación automática, de la cual se realizó un alineamiento (BLAST-N) con las secuencias genómicas de humano del GenBank corroborando la identidad del gen clonado en cada construcción. Por último, se realizó un alineamiento usando el programa Multialin “Multiple sequence alignment by Florence Corpet” de la secuencia de cada factor transcripcional registrado en GeneBank con la secuencia obtenida en la secuenciación automática (Figura 20). Una vez verificada cada construcción se procedió a la transformación bacteriana y a la purificación de los plásmidos para los ensayos posteriores.

## **7.2. EXPRESIÓN ENDÓGENA Y SOBREENPRESIÓN DEL TRANSCRITO DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES CREB-A Y CREM $\tau$**

Antes de realizar los ensayos de transfección y co-transfección fue necesario el análisis de la expresión de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  endógenos o células sin transfectar, así como su expresión en células transfectadas con los plásmidos pCREB-A y pCREM $\tau$  mediante la técnica de RT-PCR. El análisis se hizo en células HEK293 y se usó como control negativo de la expresión del factor CREM $\tau$  una RT-PCR de RNA total de células GC-1spg, ya que en el estadio de esta línea celular es sabido que el factor no se expresa. La calidad del RNA total se verificó por el RT-PCR del RNA ribosomal 18S el cual produjo un fragmento de 350 pb (Figura 21). En todas las extracciones de RNA se amplificó 18S, indicándonos la buena calidad del RNA extraído, con lo cual se ajustaron las cantidades de cDNA utilizado en cada muestra. Se confirmó la expresión de los transcritos de CREB-A y

CREM $\tau$  endógenos y la sobreexpresión de estos factores en las células que fueron transfectadas.

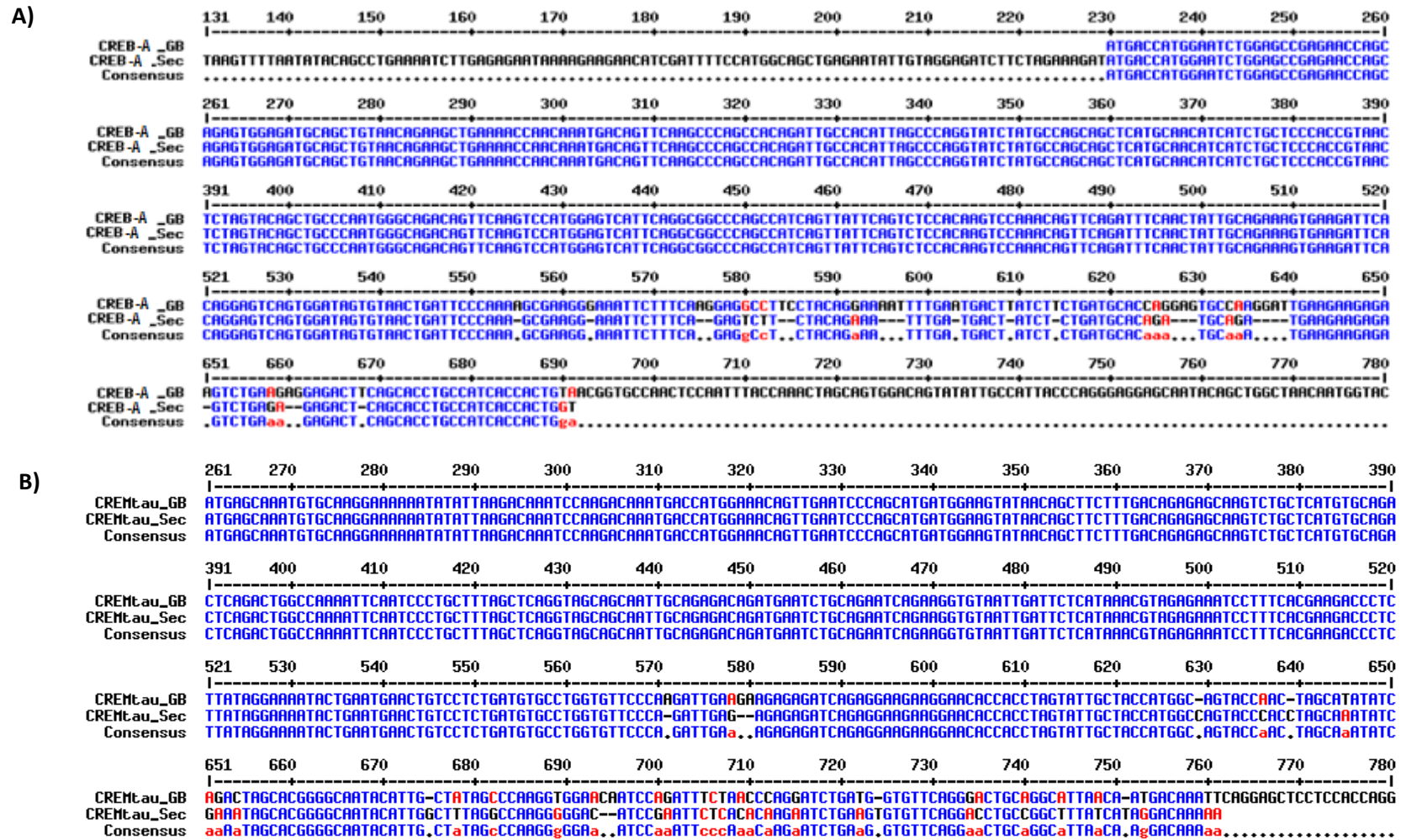
### **7.3. INMUNODETECCION DE LAS PROTEÍNAS CREB-A Y CREM $\tau$**

Una vez comprobada la sobreexpresión de los factores CREB-A y CREM $\tau$  por RT-PCR se realizó la extracción de proteína total de células HEK293 sin transfectar y transfectadas con los plásmidos pCREB-A y pCREM $\tau$ . La proteína total se utilizó para detectar la presencia de las proteínas CREB-A y CREM $\tau$  mediante Western blot. Se utilizó proteína total de testículo de ratón como control positivo y la proteína GADPH con un peso de 37 KDa se detectó en ambos extractos celulares como control de carga.

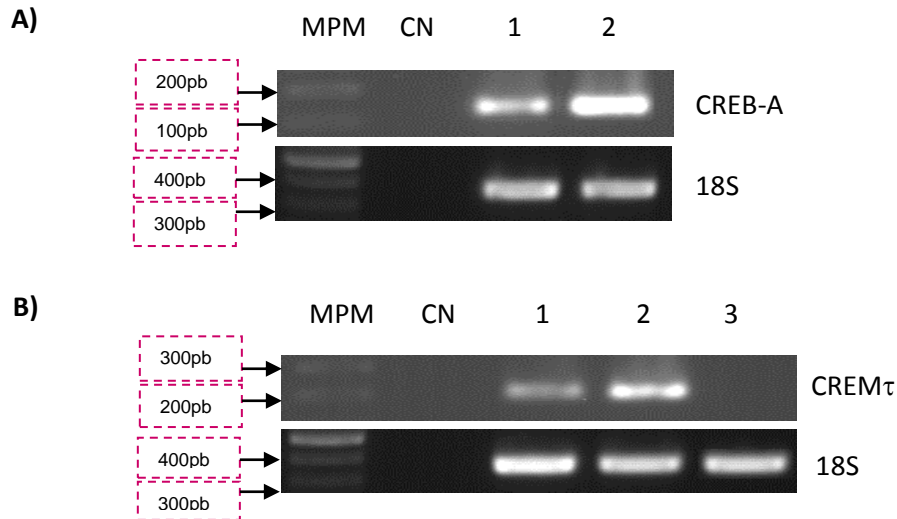
Se confirmó la sobreexpresión de los factores CREB-A y CREM $\tau$  al ser detectados en los extractos de proteína total y verificar sus pesos. En el Western blot del factor CREB-A se detectaron dos bandas (Figura 22A), esto se debe a que este factor puede dimerizar, por lo tanto, la banda más pesada corresponde a la del factor formando dímeros, este evento no ocurre en la detección del factor CREM $\tau$  (Figura 22B).

Una vez comprobada la sobreexpresión de los factores CREB-A y CREM $\tau$  se procedió a realizar los ensayos de co-transfección para analizar la transactivación del promotor de *CATSPER1* y sus delecciones.

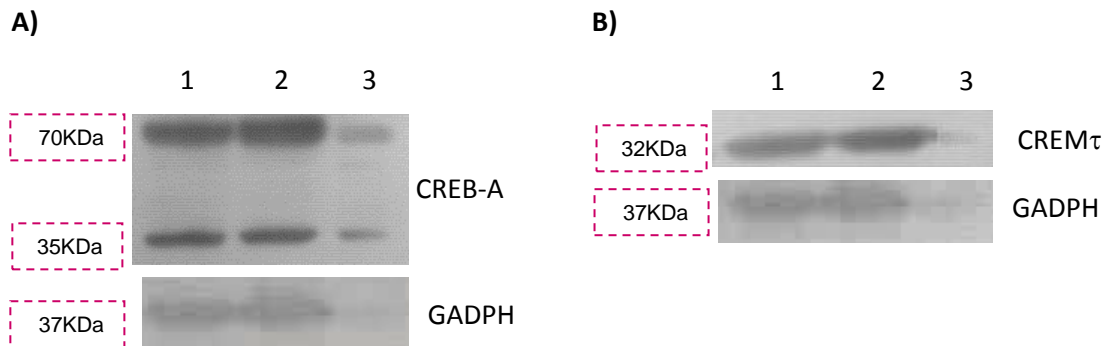
“EFECTO DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES CREB-A Y CREM $\tau$  EN LA REGULACIÓN DEL PROMOTOR *CATSPER1* DE HUMANO”



**Figura 20.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ . En el inciso A) se muestran las secuencias del factor CREB-A y en el inciso B) las secuencias del factor CREM $\tau$ . En la primera línea para cada uno de los factores se muestra la secuencia de esa isoforma encontrada en el GeneBank, mientras que la segunda línea muestra la secuencia producto de la secuenciación automática de los factores clonados en el vector pcDNA3. El alineamiento se realizó en el programa Multialin, disponible en internet: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>



**Figura 21. Expresión del RNA de CREB-A y CREM $\tau$  en células HEK293.** Se realizó la síntesis de cDNA a partir de RNA total de células HEK293 sin transfectar y transfectadas con las construcciones que portan los genes de CREB-A y CREM $\tau$  para la amplificación de sus fragmentos específicos, de 144pb y 199 pb respectivamente. Como control de carga se amplificó 18S. A) MPM: Marcador de peso molecular 100 pb, CN: control negativo, 1: células sin transfectar (CREB-A endógeno), 2: células transfectadas (pCREB-A). B) MPM: Marcador de peso molecular 100 pb, CN: control negativo, 1: células sin transfectar (CREM $\tau$  endógeno), 2: células transfectadas (pCREM $\tau$ ), 3: células GC-1spg sin transfectar.



**Figura 22. Inmunodetección de los factores CREB-A y CREM $\tau$  en células HEK293.** Se obtuvieron extractos totales de proteína de células HEK293 sin transfectar y transfectadas con las construcciones que portan los genes de CREB-A y CREM $\tau$ . Estos se separaron en geles de poliacrilamida al 8.5% y se transfirieron a membranas de PVDF e hibridaron con un anticuerpo primario anti- CREB-A ó anti-CREM $\tau$  y un anticuerpo secundario Anti-conejo y Anti-Ratón respectivamente. La proteína GADPH se empleó como control de carga. A) 1: células sin transfectar (CREB-A endógeno), 2: células transfectadas (pCREB-A), 3: proteína de testículo de ratón. B) 1: células sin transfectar (CREM $\tau$  endógeno), 2: células transfectadas (pCREM $\tau$ ), 3: proteína de testículo de ratón.

## 7.4. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE *CATSPER1* O SUS DELECCIONES EN LA LÍNEA CELULAR HEK293

### 7.4.1. Actividad transcripcional basal del promotor de *CATSPER1* o sus deleciones en células HEK293.

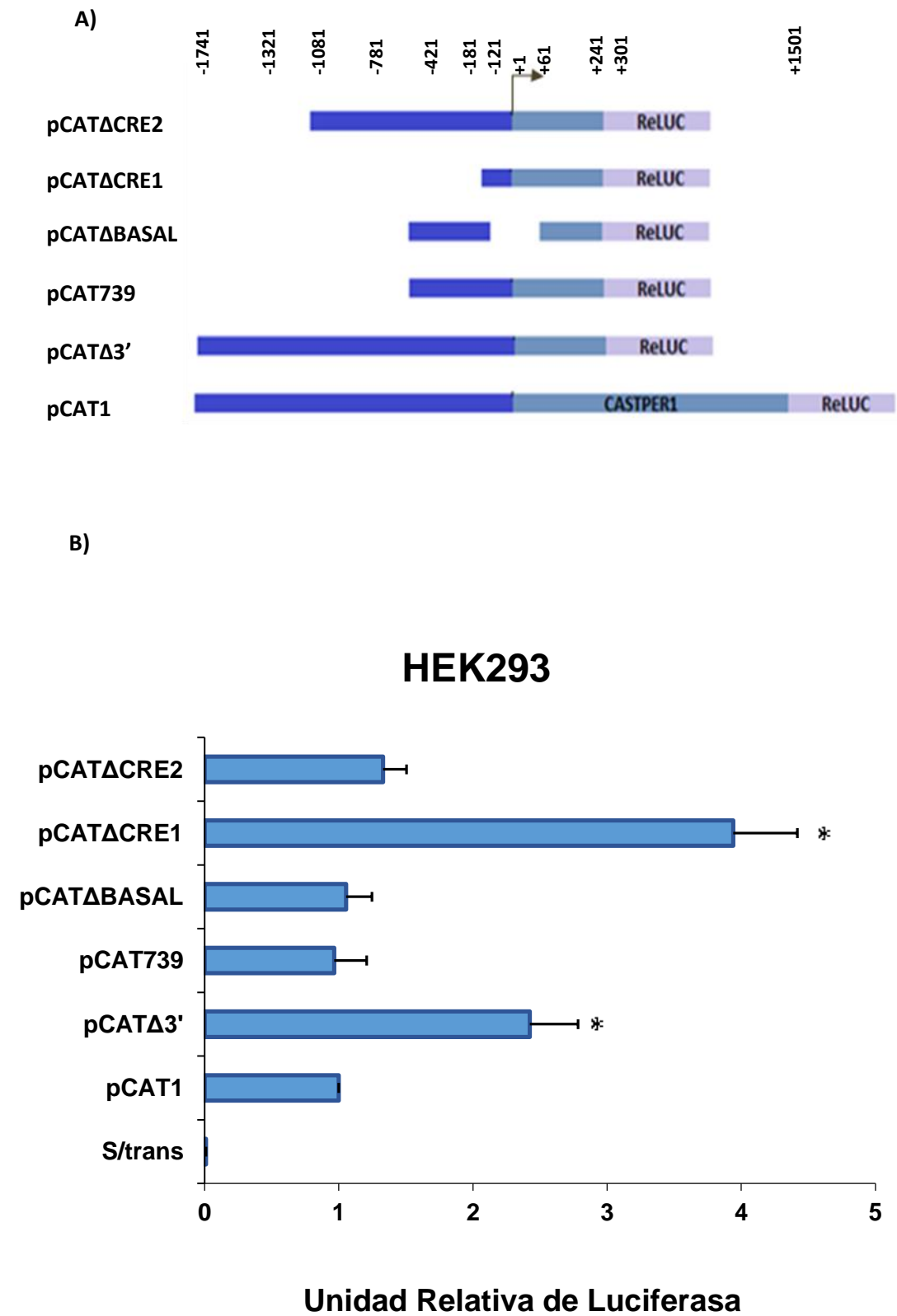
La actividad basal de las construcciones portadoras del promotor de *CATSPER1* ó sus deleciones que carecen de secuencias que posiblemente regulen su actividad transcripcional se determinó mediante ensayos de transfección transitoria en células HEK293 y el ensayo de luciferasa dual descrito en la metodología.

La actividad transcripcional de luciferasa de *Renilla reniformis* obtenida para cada una de las construcciones empleadas fue normalizada con el control interno de luciferasa de *Photinus pyralis*. La actividad transcripcional basal observada en la construcción pCAT1 fue considerada como una unidad relativa de luciferasa.

Se confirmaron los resultados presentados en los antecedentes (Hernández, 2012). La construcción pCAT $\Delta$ 3' a la que se le deletó el extremo 3' del primer exón que no corresponde al promotor presentó un incremento en la actividad transcripcional al compararla con la construcción pCAT1, sugiriendo con esto que en la región deletada se encuentran secuencias consenso para el reconocimiento de factores de transcripción que pudieran estar reprimiendo la actividad transcripcional del gen *CATSPER1*. Al delimitar al promotor predicho eliminando la región 5' en la construcción pCAT739 la actividad disminuyó, lo cual sugiere que río arriba del promotor se encuentran secuencias consenso para factores transcripcionales que activan la transcripción del gen. Así mismo la actividad de la construcción pCAT $\Delta$ BASAL fue similar a pCAT739, indicando con esto que el sitio CRE1 presente en esta construcción puede ser suficiente para la transcripción basal del gen *CATSPER1*.

Por otro lado, los resultados de la actividad transcripcional de las deleciones de los sitios CRE del promotor indican que la eliminación del sitio CRE más alejado del TSS produce una disminución de la actividad transcripcional, pero el efecto se revierte al eliminar el segundo sitio CRE más cercano al TSS ya que la actividad transcripcional se ve aumentada (Figura 23B) esto nos sugiere

la importancia de los factores transcripcionales que reconocen la secuencia consenso de los sitios CRE en la actividad transcripcional del gen.



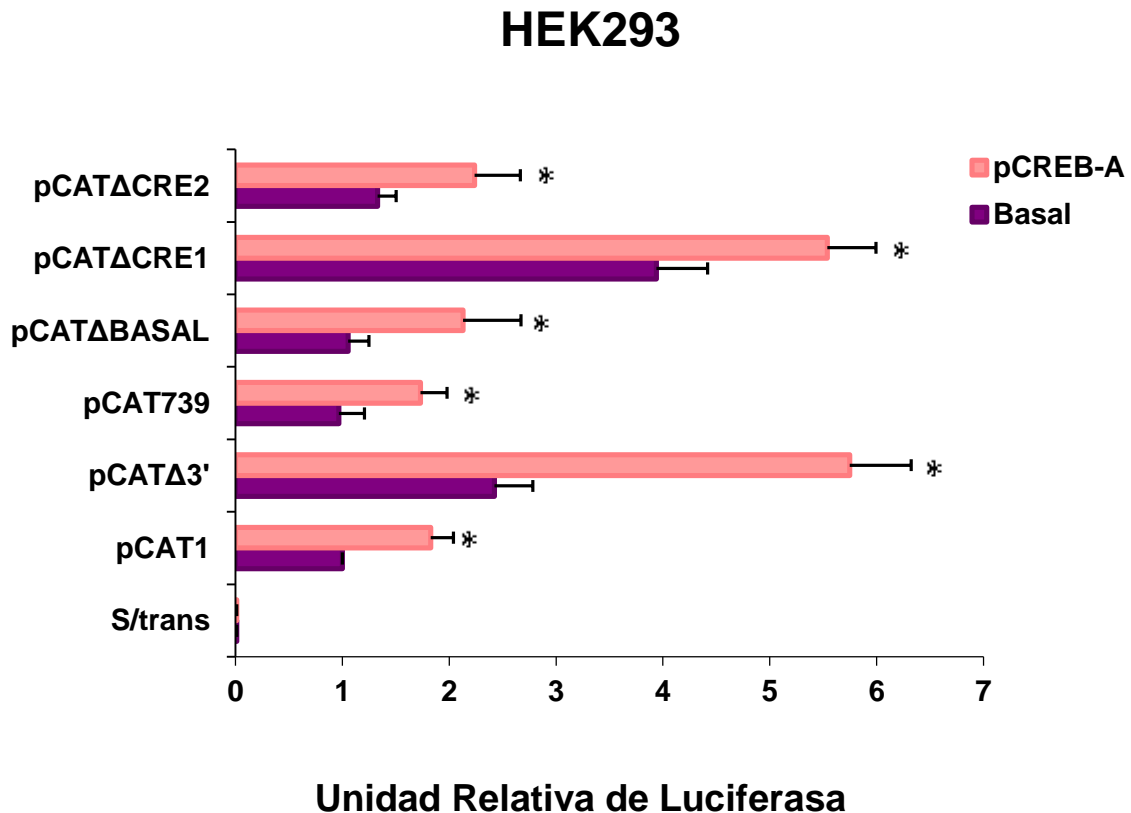
**Figura 23. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293.** A) Esquemas representativos de las construcciones con deleciones en el promotor que se encuentra río arriba del gen de luciferasa de *Renilla reniformis*, se indican la posición en la que se encuentran los nucleótidos que limitan la deleción y con flecha el inicio transcripcional. B) Se transfectaron las construcciones mostradas en el inciso A en la línea celular HEK293 para estudiar su actividad transcripcional basal después de 48 horas, se analizó la actividad de luciferasa de *Renilla* la cual fue normalizada con respecto a la actividad de luciferasa de *Photinus*. Se muestran las actividades relativas de luciferasa con respecto a pCAT1. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\*, p $\leq$  0,05).

Para determinar si los factores transcripcionales CREB y CREM, específicamente las isoformas CREB-A y CREM $\tau$ , regulan transcripcionalmente el gen de *CATSPER1* se realizaron ensayos de co-transfección en las líneas celulares HEK293 y GC-1spg

#### **7.4.2. La actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* es regulado por el factor transcripcional CREB-A en HEK293.**

Una vez comprobado que el vector en el que se clonó el factor sí permite su sobreexpresión se procedió a realizar los ensayos de co-transfección de la construcción pCREB-A con las construcciones del promotor de *CATSPER1* que presentan las deleciones para analizar si el factor CREB-A es capaz de regular la expresión del mismo. Interesantemente, la sobreexpresión de CREB-A incrementó la transcripción en todas las construcciones con deleciones en el promotor de *CATSPER1* (Figura 24) en comparación con la transcripción basal observada en las mismas construcciones con el factor CREB-A endógeno. Se observó una menor actividad transcripcional en las construcciones pCAT1, pCAT739 y pCAT $\Delta$ CRE2 siendo el incremento menor a una unidad relativa, seguido de pCAT $\Delta$ BASAL que incrementó de 1.05 a 2.13 unidades y la construcción pCAT $\Delta$ CRE1' de 3.94 a 5.54 unidades. La actividad de la construcción pCAT $\Delta$ 3' que contiene los tres sitios CRE presentes en el promotor y que carece de la región que podría actuar como reguladora negativa de la transcripción tuvo el mayor incremento en la actividad transcripcional, de 2.42 a 5.76 unidades relativas de luciferasa, sugiriendo con esto que la principal regulación transcripcional por el factor CREB-A se

encuentra entre los residuos de aminoácidos que comprende esta construcción.



**Figura 24.** El factor CREB-A incrementa la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293. Las células HEK293 fueron transfectadas con cada una de las construcciones del promotor de *CATSPER1* y con la construcción pCREB-A. Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 23. Los resultados se graficaron como número de veces la actividad de luciferasa de pCAT1 basal. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, compárese la actividad de la construcción pCREB-A con la actividad basal (\*,  $p \leq 0.05$ ).

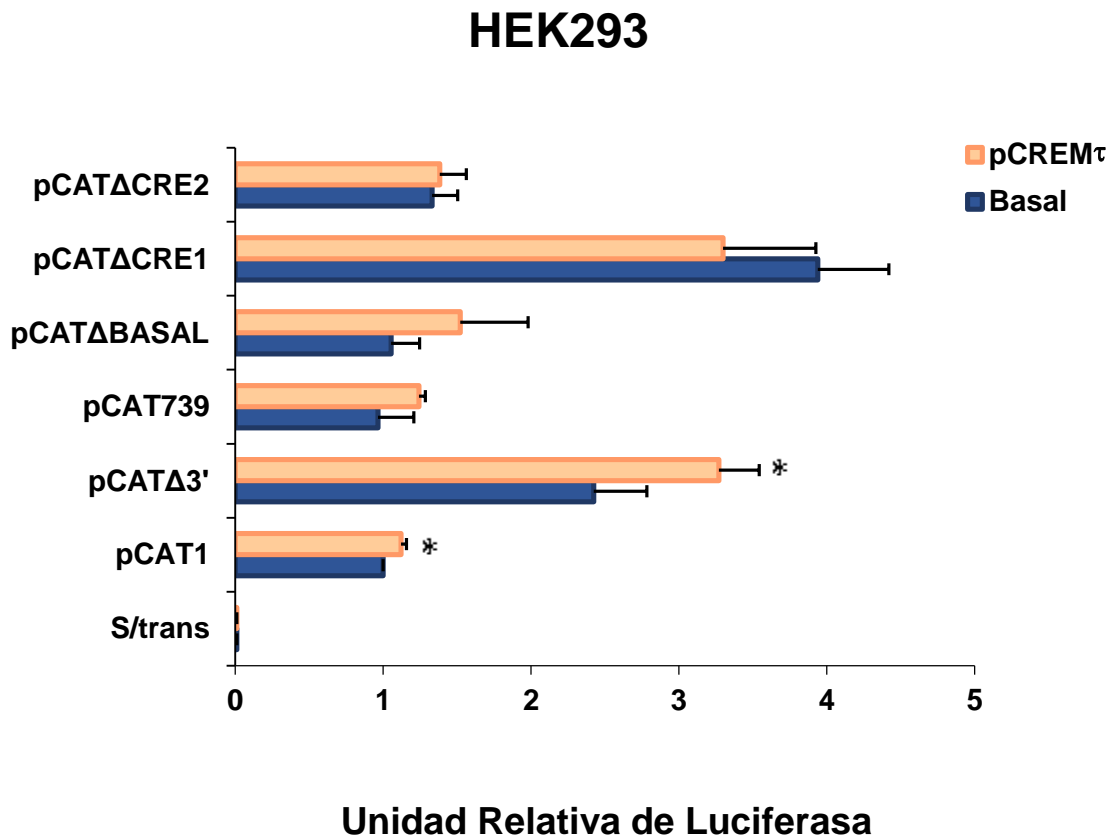
#### 7.4.3. La actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* no es regulado por el factor transcripcional CREM $\tau$ en HEK293.

Habiendo comprobado la sobreexpresión del factor CREM $\tau$  se procedió a realizar los ensayos de co-transfección de pCREM $\tau$  con las construcciones que presentan deleciones para analizar si el factor CREM $\tau$  es capaz de regular la expresión del promotor de *CATSPER1*.

La sobreexpresión de CREM $\tau$  solo incrementó la actividad transcripcional de las construcciones pCAT1 y pCATΔ3' (Figura 25), siendo el incremento menor



a una unidad relativa, de 1 a 1.12 unidades y de 2.42 a 3.27 unidades respectivamente. Sin embargo, en las construcciones que tienen deletados los sitios CRE no se presentó ningún incremento en la actividad transcripcional. Sugiriendo con esto que el factor CREM $\tau$ , no afecta la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293, a pesar de haber un ligero incremento en la construcción que tiene presente los tres sitios CRE.



**Figura 25. El factor CREM $\tau$  no afecta la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293.** Las células HEK293 fueron transfectadas con cada una de las construcciones del promotor de *CATSPER1* y con la construcción pCREM $\tau$ . Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 23. Los resultados se graficaron como número de veces la actividad de luciferasa de pCAT1 basal. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, compárese la actividad con la construcción pCREM $\tau$  con la actividad basal (\*, p $\leq$  0.05).

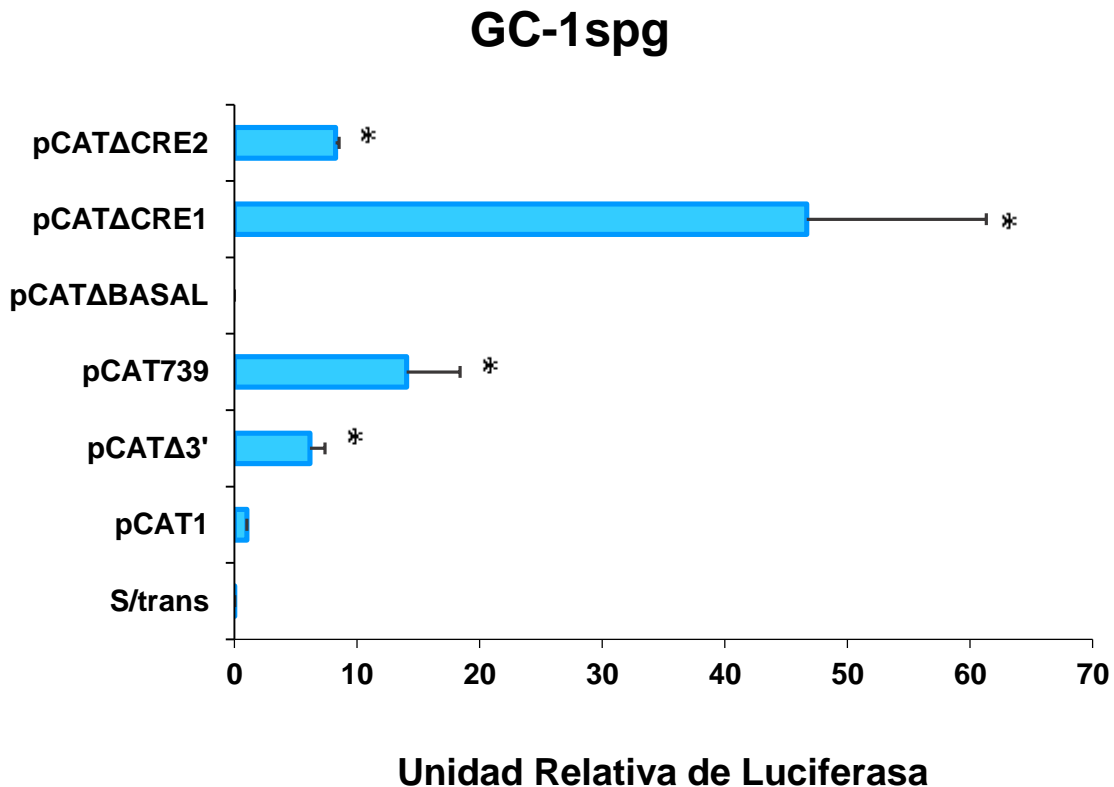
## **7.5. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE *CATSPER1* O SUS DELECCIONES EN LA LÍNEA CELULAR GC-1spg**

### **7.5.1. Actividad transcripcional basal del promotor de *CATSPER1* o sus deleciones en células GC-1spg**

Al igual que en la línea celular HEK293, se realizaron ensayos de transfección transitoria de las construcciones del promotor de *CATSPER1* o sus deleciones, para determinar su actividad basal en la línea celular GC-1spg, mediante el ensayo de luciferasa dual. La actividad transcripcional fue normalizada de la misma manera que en la línea celular HEK293. La actividad transcripcional basal observada en la construcción pCAT1 fue considerada como una unidad relativa de luciferasa.

La actividad transcripcional de todas las construcciones con deleciones en el promotor incrementó con respecto a la construcción pCAT1. Se observó un incremento en la construcción pCAT739, interesantemente la pérdida del primer exón que no corresponde al promotor (construcción pCAT $\Delta$ 3') resultó en un incremento de la actividad transcripcional con respecto a pCAT1, sugiriendo con esto que río abajo del primer exón se encuentran represores de la actividad transcripcional, lo cual ya había sido reportado con anterioridad para esta línea celular (Mata-Rocha *et al.*, 2013). No fue posible observar actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la construcción pCAT $\Delta$ BASAL, lo cual no se debió a problemas con la transfección ya que el control endógeno pGL-CMV si mostró eficiencia de transfección, lo que indica que en esta línea celular probablemente no existen factores transcripcionales que activen la transcripción de esta construcción o que ésta no tenga las señales necesarias para que sea activada.

La actividad transcripcional de las deleciones de los sitios CRE del promotor al igual que en la línea celular HEK293 indican que la eliminación del sitio CRE más alejado del TSS produce una disminución de la actividad, pero el efecto se revierte al eliminar el segundo sitio CRE más cercano al TSS ya que la actividad transcripcional se ve aumentada (Figura 26) sugiriendo con ello la importancia de los factores transcripcionales que reconocen la secuencia de los sitios CRE en la actividad transcripcional de *CATSPER1*.



**Figura 27. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor de *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg.** Se transfectaron las construcciones mostradas en el inciso A de la Figura 23 en la línea celular GC-1spg para estudiar su actividad transcripcional basal después de 48 horas. Se analizó la actividad de luciferasa de *Renilla* la cual fue normalizada con respecto a la actividad de luciferasa de *Photinus*. Se muestran las actividades relativas de luciferasa con respecto a pCAT1. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\*,  $p \leq 0.05$ ).

### 7.5.2. La actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* no es regulada por los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$ en GC-1spg.

Para analizar si los factores CREB-A y CREM $\tau$  son capaces de regular la expresión del promotor de *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg se hicieron ensayos de co-transfección con las construcciones del promotor de *CATSPER1* y CREB-A ó CREM $\tau$ . La sobreexpresión de CREB-A aumentó moderadamente la actividad transcripcional con las construcciones pCAT1 y pCAT $\Delta$ CRE2, 1.44 y 2 unidades respectivamente, sin embargo no se observó un incremento en la construcción pCAT $\Delta$ 3 (Figura 27 panel izquierdo). La sobreexpresión de CREM $\tau$  solo incrementó la actividad transcripcional de las construcciones

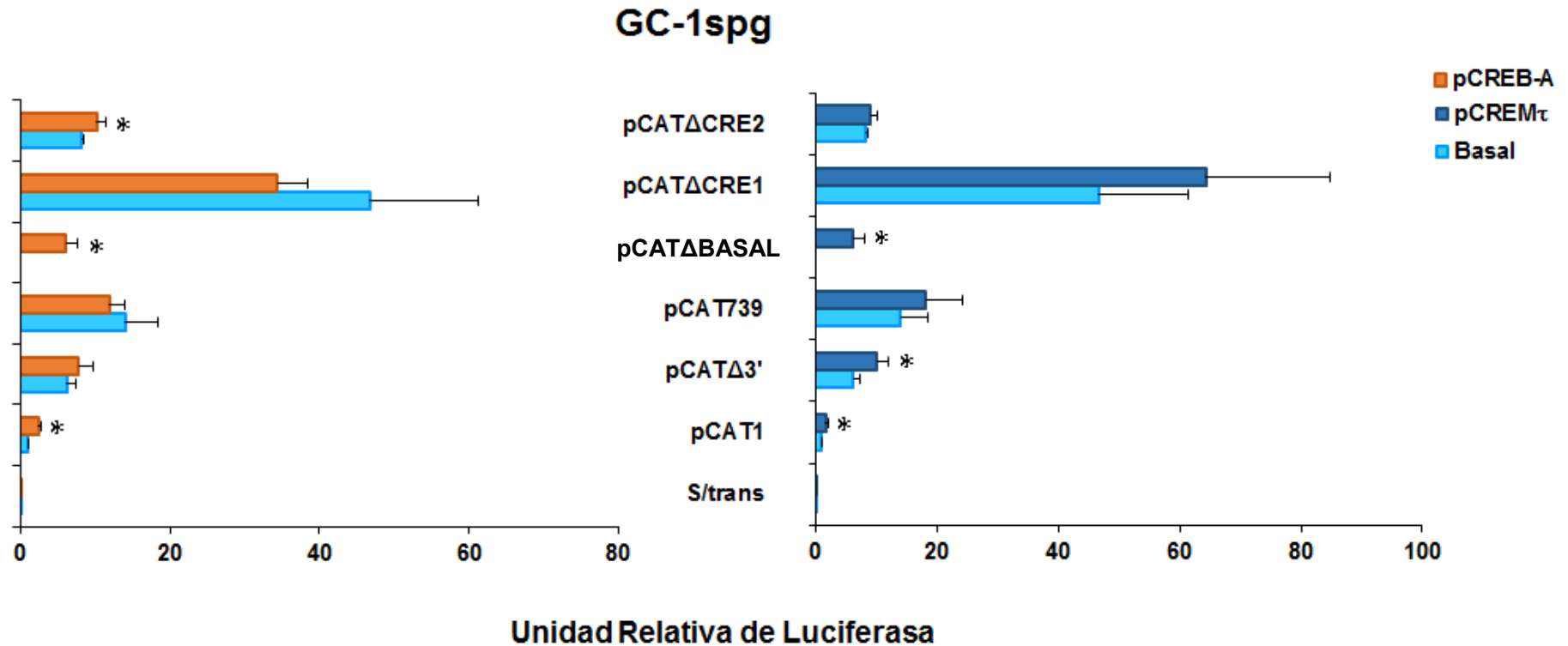
pCAT1 y pCAT $\Delta$ 3', de 1 a 1.70 y de 6.16 a 10.05 unidades respectivamente. Sin embargo en las otras construcciones que tienen deletados los sitios CRE no se presentó ningún incremento en la actividad transcripcional (Figura 27 panel derecho).

Por otro lado, la actividad transcripcional se vió aumentada 6 unidades tanto con la co-transfección del factor CREB-A como del factor CREM $\tau$  con la construcción pCAT $\Delta$ BASAL, sugiriendo que probablemente el sitio CRE1 que se encuentra en esta construcción active la transcripción del promotor de *CATSPER1*, a pesar de que la actividad de la co-transfección de CREB-A con la construcción pCAT $\Delta$ 3' no se vio aumentada (Figura 27). Las construcciones que presentan un incremento en la actividad transcripcional fueron de menos de 2 unidades a diferencia de la pCAT $\Delta$ BASAL y con barras de error muy cercanas entre sí, por lo anterior se sugiere que los factores CREB-A y CREM $\tau$ , no afectan la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg.

## **7.6. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LOS SITIOS CRE EN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE *CATSPER1***

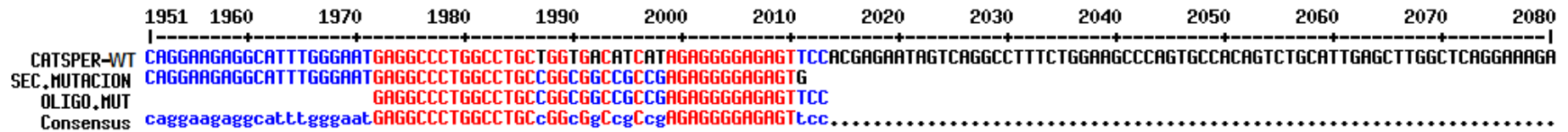
Mediante los ensayos de co-transfección del factor CREB-A en la línea celular HEK293 se comprobó que la sobreexpresión de este factor tiene un efecto positivo en la transactivación del promotor de *CATSPER1*, por lo tanto se sugiere que este factor pueda unirse a los sitios CRE presentes en el promotor y activar la transcripción. Para comprobar esto se realizaron mutaciones puntuales mediante mutagénesis sitio dirigida en la construcción pCAT $\Delta$ 3' (que presenta los tres sitios CRE) para cambiar los sitios consenso y no puedan ser reconocidos por la proteína CREB-A (Figura 28).

A las construcciones que tienen mutados los sitios CRE0, CRE1 y CRE2 se les denominó pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2, respectivamente.

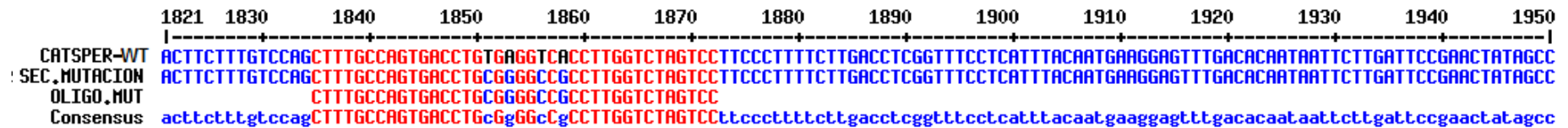


**Figura 28. Los factores CREB-A y CREM $\tau$  no afectan la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg.** Las células GC-1spg fueron transfectadas con cada una de las construcciones del promotor de *CATSPER1* y con las construcciones pCREB-A ó pCREM $\tau$ . Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 26. Los resultados se graficaron como número de veces la actividad de luciferasa de pCAT1 basal. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, compárese la actividad de las construcciones pCREB-A ó pCREM $\tau$  con respecto a la actividad basal (\*, p $\leq$ 0.05).

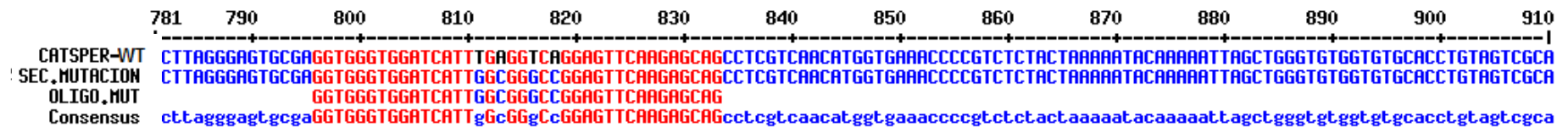
### Mutación sitio CRE0



### Mutación sitio CRE1



### Mutación sitio CRE2



**Figura 29. Secuencia de las mutaciones en los sitios CRE del promotor de *CATSPER1*.** En la imagen se muestra para cada uno de los sitios CRE el alineamiento de la secuencia silvestre del promotor de *CATSPER1* (CATSPER-WT por sus siglas en inglés) con el resultado de la mutagénesis sitio dirigida realizada en la construcción pCATΔ3', así mismo en la tercera línea se muestran los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis. Los nucleótidos marcados en negro son los nucleótidos mutados para que estos sitios no sean reconocidos como sitios CRE de acuerdo al análisis in silico.

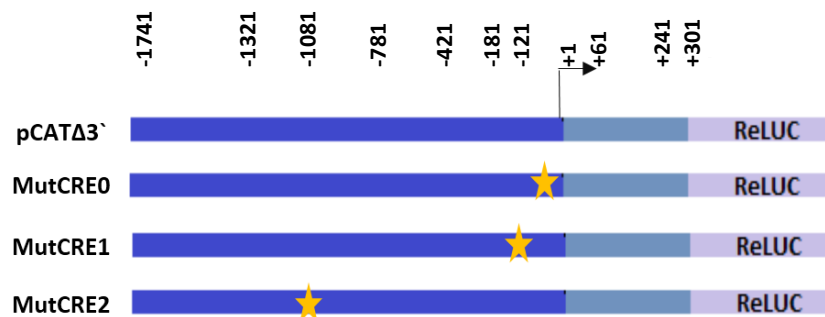
### 7.6.1. Actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular HEK293.

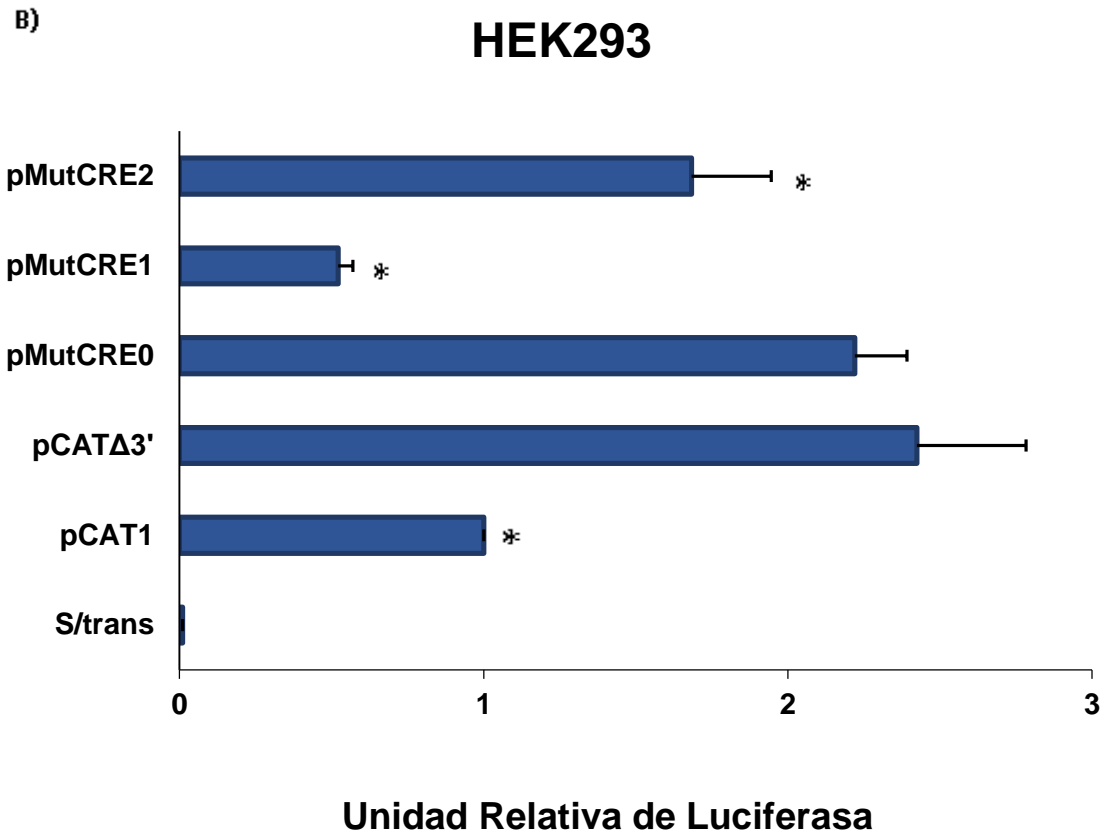
#### 7.6.1.1. Los sitios CRE1 y CRE2 participan en la activación transcripcional del promotor de *CATSPER1* en células HEK293.

Se determinó la actividad basal de las construcciones que presentan mutaciones en los sitios CRE en la línea celular HEK293 mediante el ensayo de luciferasa dual, descrito en la metodología, para determinar el sitio o los sitios CRE importantes para la actividad transcripcional del gen *CATSPER1*. La actividad transcripcional fue normalizada de la misma manera que en los ensayos descritos anteriormente.

La actividad de las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2 fue comparada con la actividad de la construcción pCAT $\Delta$ 3' ya que esta construcción presenta los tres sitios CRE silvestres. La actividad transcripcional se redujo significativamente, en las construcciones pMutCRE1 y pMutCRE2; la reducción de la actividad fue mayor al mutar el sitio CRE1 de 2.52 a 0.52 unidades (78.42%), mientras que al mutar el sitio CRE2 la reducción fue sólo de 2.52 a 1.68 (30.58%) (Figura 29). Por lo anterior se sugiere que el principal sitio para la activación de la transcripción del gen *CATSPER1* es el sitio CRE1.

A)





**Figura 30. Los sitios CRE1 y CRE2 activan la transcripción del gen *CATSPER1* en la línea celular HEK293.** A) Esquemas representativos de las construcciones con mutaciones en los sitios CRE del promotor que se encuentra río arriba del gen de luciferasa de *Renilla reniformis*, se indican la posición en la que se encuentran las mutaciones con la estrella y con flecha el inicio transcripcional. B) Se transfectaron las construcciones mostradas en el inciso A en la línea celular HEK293 para estudiar su actividad transcripcional basal después de 48 horas. Se analizó la actividad de luciferasa de *Renilla* la cual fue normalizada con respecto a la actividad de luciferasa de *Photinus*. Se muestran las actividades relativas de luciferasa con respecto a pCAT1. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas para lo cual se comparó la actividad de la transfección en pCATΔ3' con la actividad de la transfección con las construcciones con mutaciones en los sitios CRE (\*,  $p \leq 0.05$ ).

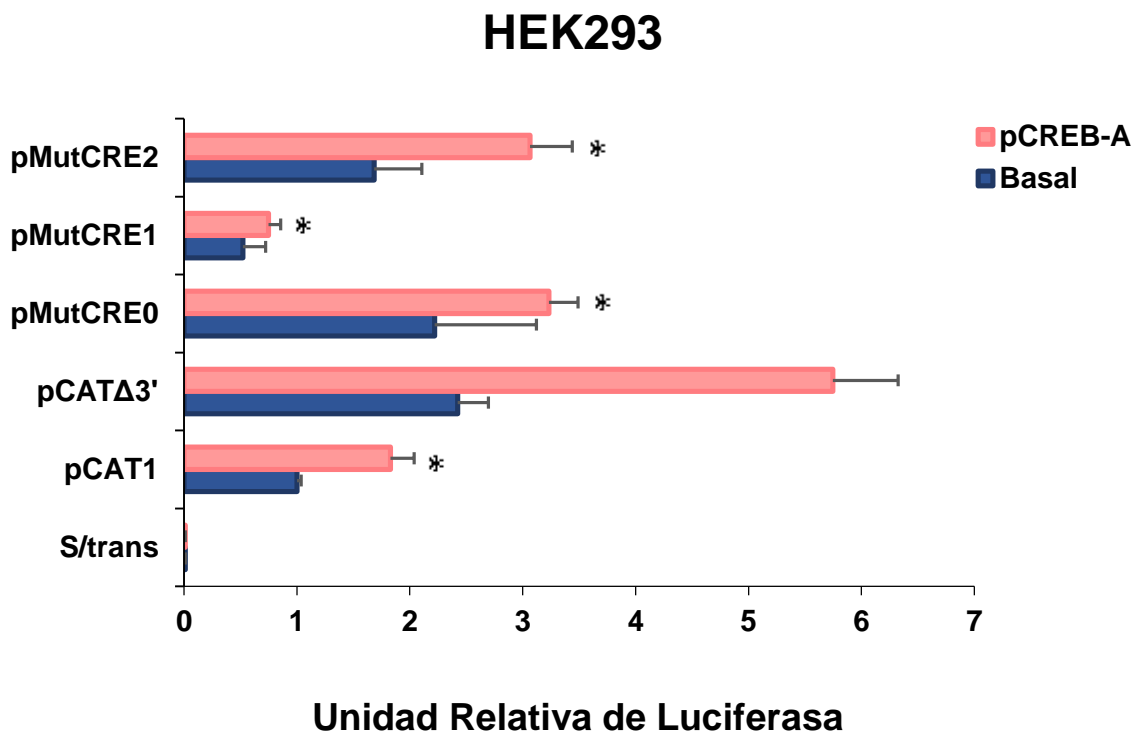
### 7.6.1.2. CREB-A activa transcripcionalmente el promotor de *CATSPER1* a través del sitio CRE1 en células HEK293.

Anteriormente se demostró que el factor CREB-A fue capaz de activar la transcripción del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293 (Figura 24), para comprobar a través de qué sitio CRE activa la transcripción se realizó una co-transfección de las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2 con la construcción pCREB-A.

Al comparar la actividad transcripcional basal con la actividad de la co-transfección con pCREB-A la actividad se ve aumentada, como ya se había



demostrado (Figura 24); sin embargo al comparar la actividad transcripcional de la co-transfección con pCREB-A en la construcción pCAT $\Delta$ 3' con la actividad de la co-transfección en las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2 ésta se ve reducida en las mutaciones de los tres sitios CRE. La mutación en el sitio CRE0 redujo la actividad de 5.75 a 3.23 unidades (43.83%), la mutación en el sitio CRE2 de 5.75 a 3.06 unidades (46.79%), mientras que la mutación que más afectó la actividad transcripcional fue la del sitio CRE1 que redujo la actividad de 5.75 a 0.75 unidades (86.96%) (Figura 30). Con lo anterior se sugiere que el factor transcripcional CREB-A activa la transcripción del promotor de *CATSPER1* a través del sitio CRE1 en la línea celular HEK293.

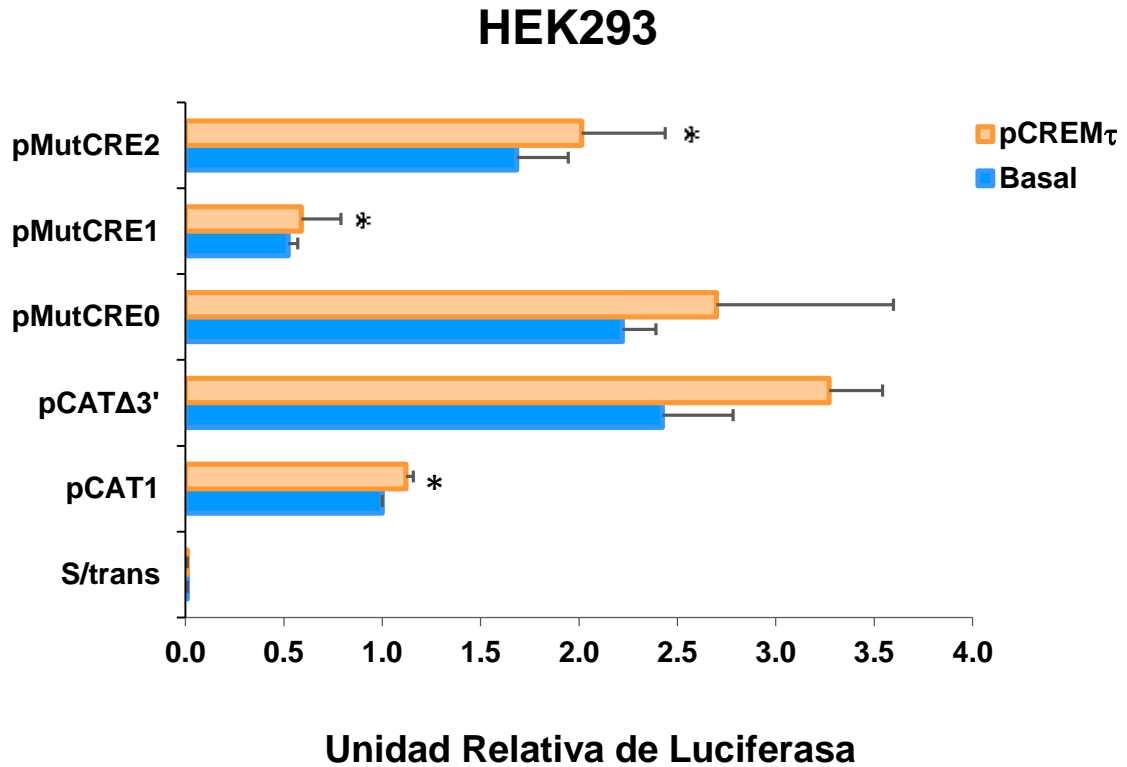


**Figura 31. El sitio CRE1 es necesario para la activación transcripcional del promotor de *CATSPER1* por CREB-A en la línea celular HEK293.** Las células HEK293 fueron cotransfectadas con las construcciones que presentan mutaciones en los sitios CRE del promotor del gen *CATSPER1* y con la construcción pCREB-A. Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 29. Los resultados se graficaron como número de veces la actividad de luciferasa de pCAT1 basal. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, para lo cual se comparó la actividad de la co-transfección en pCAT $\Delta$ 3' con la actividad de la co-transfección con las construcciones con mutaciones en los sitios CRE. (\*  $p \leq 0.05$ ).

### **7.6.1.3. Efecto del factor CREM $\tau$ en la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* con mutaciones en los sitios CRE, en la línea celular HEK293.**

A pesar de que en la co-transfección de pCREM $\tau$  con las construcciones con deleciones en los sitios CRE silvestres no demostró ningún incremento en la actividad transcripcional del gen *CATSPER1* (Figura 25), se evaluó sí el factor podría activar la transcripción en las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2, ya que en estas construcciones no se tienen deletados otros sitios de reconocimiento a factores de transcripción, pero sí mutados los sitios CRE que indica cada construcción.

Al comparar la actividad transcripcional de la co-transfección de pCREM $\tau$  en la construcción pCAT $\Delta$ 3' con la actividad de la co-transfección en las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2, aparentemente ésta se ve reducida en las mutaciones CRE1 y CRE2; sin embargo, al comparar estas actividades con las actividades basales la actividad transcripcional no se ve aumentada, por lo tanto la actividad que se muestra en la co-transfección de pCREM $\tau$  con las construcciones pMUTCRE1 y pMUTCRE2 es la propia actividad basal (Figura 31). Comprobándose con esto que el factor CREM $\tau$  no regula la actividad transcripcional del gen *CATSPER1* en HEK293.



**Figura 32. Actividad transcripcional de las construcciones con mutaciones en los sitios CRE del promotor de *CATSPER1* por el factor CREM $\tau$  en la línea celular HEK293.** Las células HEK293 fueron cotransfectadas con las construcciones que presentan mutaciones en los sitios CRE del promotor del gen *CATSPER1* y con la construcción pCREM $\tau$ . Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 29. Los resultados se graficaron como número de veces la actividad de luciferasa de pCAT1 basal. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, para lo cual se comparó la actividad de la co-transfección en pCAT $\Delta$ 3' con la actividad de la co-transfección con las construcciones con mutaciones en los sitios CRE. (\*  $p \leq 0.05$ ).

## 7.6.2. Actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular GC-1spg

### 7.6.2.1. Los sitios CRE1 y CRE0 participan en la regulación transcripcional del promotor de *CATSPER1* en células GC-1spg.

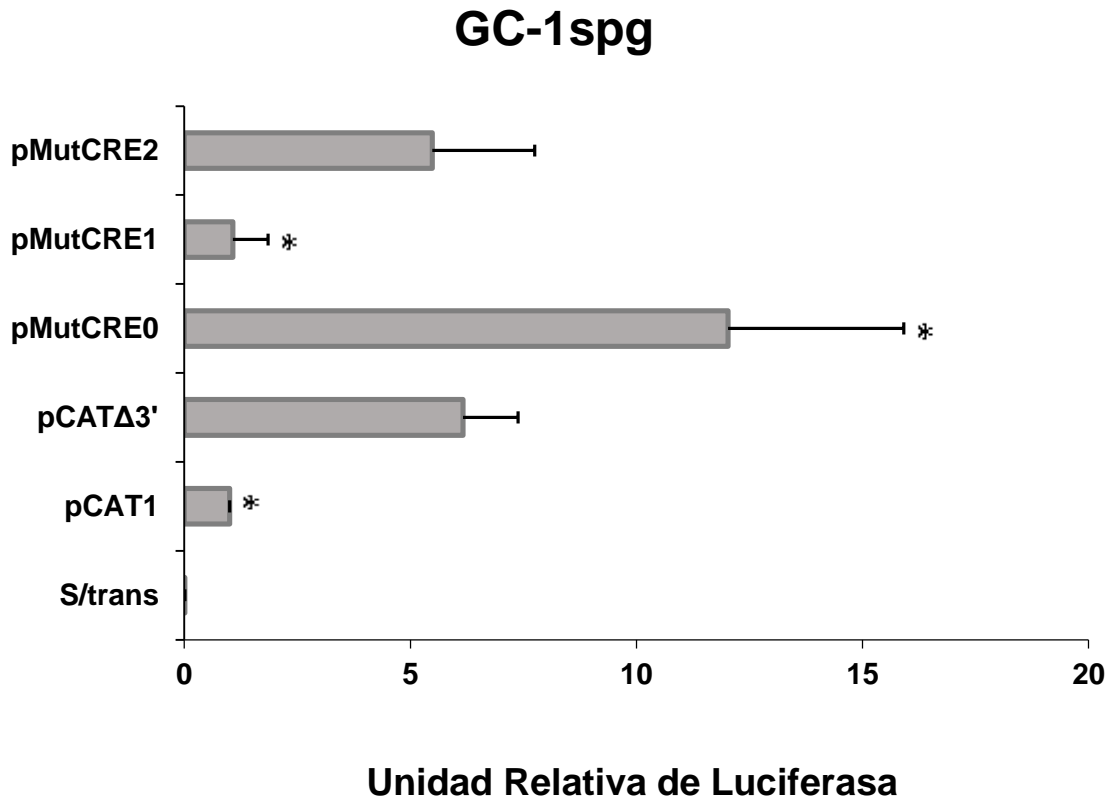
La actividad basal de las construcciones que presentan mutaciones en los sitios CRE fue determinada también en la línea celular GC-1spg mediante el ensayo de luciferasa dual, descrito en la metodología, para establecer el sitio o los sitios CRE importantes en la actividad transcripcional del gen *CATSPER1* en esta línea celular. La actividad transcripcional fue normalizada de la misma manera que en los ensayos descritos anteriormente.

La actividad de las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2 se comparó con la actividad de la construcción pCAT $\Delta$ 3' ya que esta construcción presenta los tres sitios CRE silvestres. La actividad transcripcional se redujo significativamente cuando se mutó el sitio CRE1 de 6.16 a 1.07 unidades (82.63%), y aumentó cuando se mutó el sitio CRE0 de 6.16 a 12.02 unidades (95.12%) (Figura 32). Por lo anterior se sugiere que el principal sitio para la activación de la transcripción del gen *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg es el sitio CRE1 y que el sitio CRE0 puede estar reprimiendo la actividad transcripcional en esta línea celular.

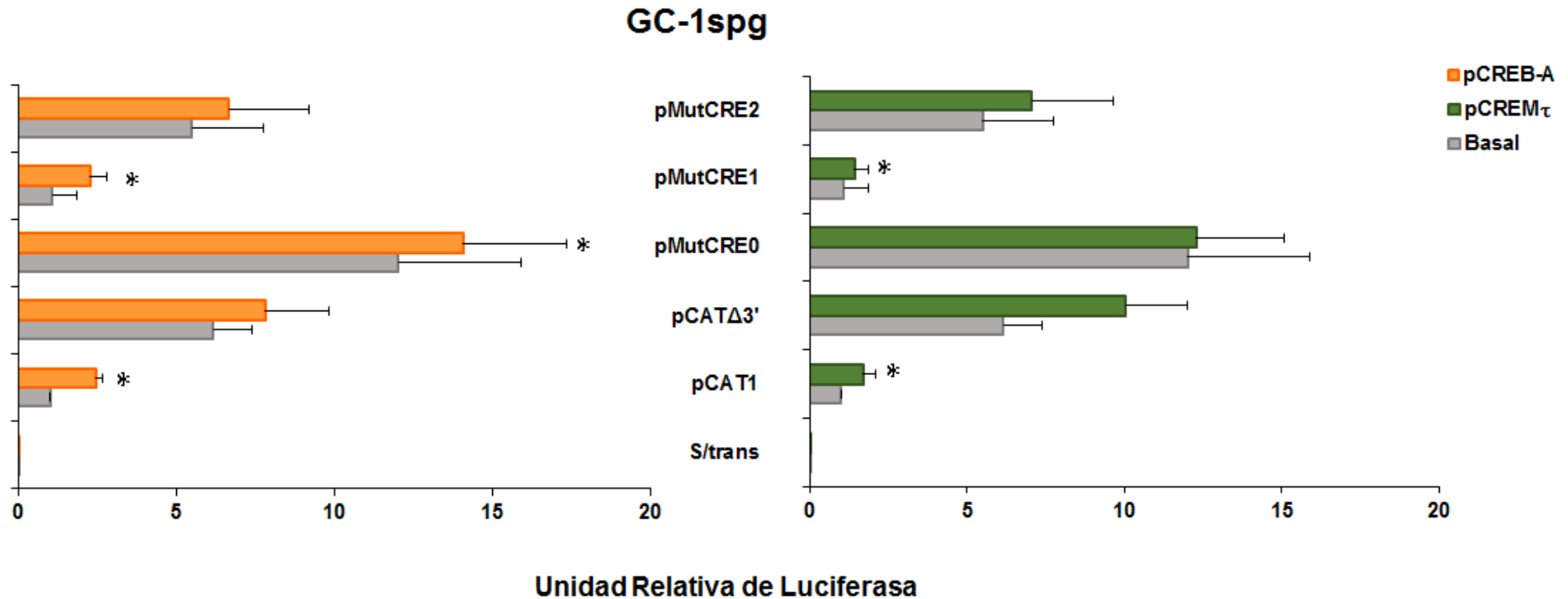
#### **7.6.2.2. Efecto de los factores CREB-A y CREM $\tau$ en la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular GC-1spg.**

Para comprobar que los factores CREB-A y CREM $\tau$  no regulan la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg, las construcciones pCREB-A y pCREM $\tau$  se cotransfectaron con las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2.

Al comparar la actividad transcripcional de la co-transfección de pCREB-A en pCAT $\Delta$ 3' con la co-transfección en pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2, aparentemente se observó una disminución en la actividad cuando esta mutado el sitio CRE1 y un aumento cuando esta mutado el sitio CRE0, sin embargo al comparar estas actividades con las actividades basales no se observó ningún incremento en la actividad transcripcional, por lo tanto la actividad transcripcional observada es la misma actividad basal (Figura 33 izquierda). Lo mismo ocurre en la co-transfección de pCREM $\tau$ , al comparar la actividad transcripcional de la co-transfección de pCAT $\Delta$ 3' con la co-transfección en pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2, se observa una aparente disminución en la actividad al encontrarse mutado el sitio CRE1, pero al comparar esta actividad con la actividad basal de pMutCRE1, no se observa cambio en la actividad indicando que la actividad observada en la co-transfección de pCREM $\tau$ , es la propia actividad basal (Figura 33 derecha), esto nos comprueba lo observado en la Figura 28, los factores CREB-A y CREM $\tau$  no activan transcripcionalmente el gen *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg.



**Figura 33.** El sitio CRE1 es necesario para la activación transcripcional de *CATSPER1* mientras que el sitio CRE0 puede reprimir su transcripción en la línea celular GC-1spg. Se transfectaron las construcciones mostradas en el inciso A de la figura 29 en la línea celular GC-1spg para estudiar su actividad transcripcional basal después de 48 horas. Se analizó la actividad de luciferasa de *Renilla* la cual fue normalizada con respecto a la actividad de luciferasa de *Photinus*. Se muestran las actividades relativas de luciferasa con respecto a pCAT1. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas para lo cual se comparó la actividad de la transfección en pCATΔ3' con la actividad de la transfección con las construcciones con mutaciones en los sitios CRE (\*  $p \leq 0.05$ ).

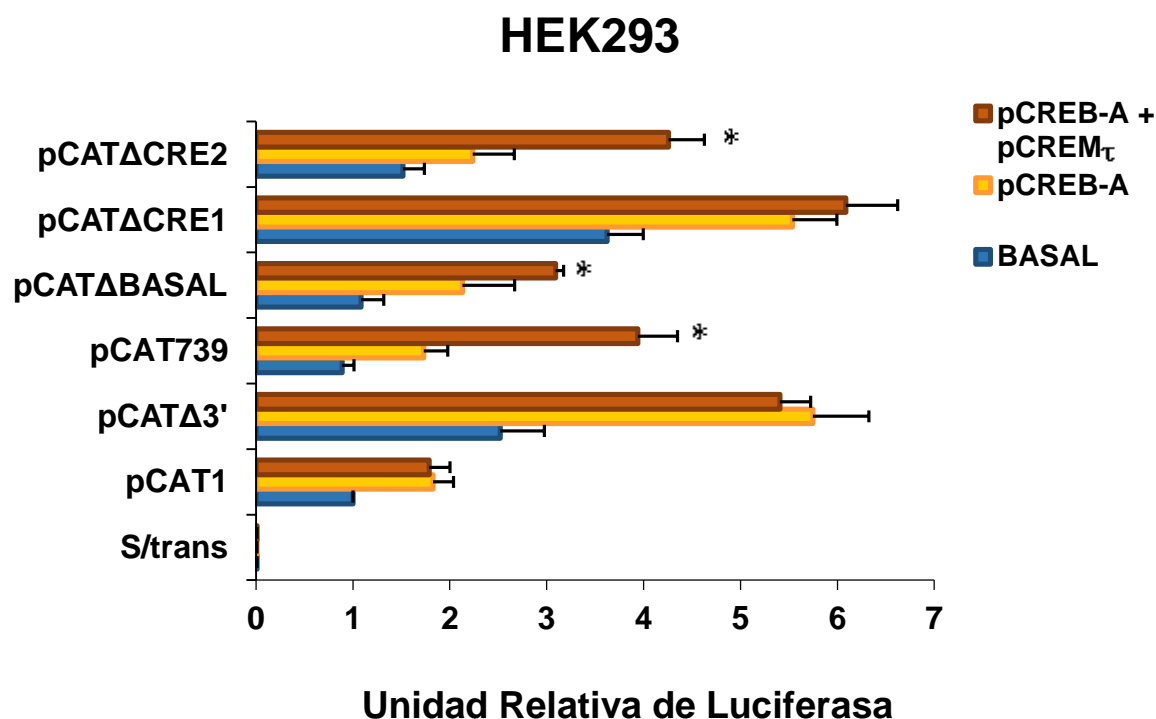


**Figura 34. Actividad transcripcional de las construcciones con mutaciones en los sitios CRE del promotor de *CATSPER1* por los factores CREB-A y CREM $\tau$  en la línea celular GC-1spg.** Las células GC-1spg fueron cotransfectadas con las construcciones que presentan mutaciones en los sitios CRE del promotor del gen *CATSPER1* y con las construcciones pCREB-A y pCREM $\tau$ . Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 32. Los resultados se graficaron como número de veces la actividad de luciferasa de pCAT1 basal. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas, para lo cual se comparó la actividad de la co-transfección en pCAT $\Delta$ 3' con la actividad de la co-transfección con las construcciones con mutaciones en los sitios CRE. (\*  $p \leq 0.05$ ).

## 7.7. ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR DE *CATSPER1* AL SOBREEXPRESAR SIMULTANEAMENTE LOS FACTORES CREB-A Y CREM $\tau$ EN CÉLULAS HEK293

Los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  son miembros de una familia con dominios bZIP que permite la homo o heterodimerización y la unión a sitios CRE. Para investigar si existe un efecto cooperativo de activación transcripcional por CREB-A y CREM se realizaron ensayos de co-transfección con los plásmidos que sobreexpresan estas proteínas y con las construcciones con deleciones.

Al comparar la actividad transcripcional que presentan las construcciones en la co-transfección con pCREB-A con la actividad de la co-transfección simultánea de pCREB-A y pCREM $\tau$  se observó un incremento en la actividad transcripcional de pCAT739 de 1.73 a 3.94 unidades, pCAT $\Delta$ BASAL de 2.13 a 3.09 unidades y pCAT $\Delta$ CRE2 de 2.24 a 4.26 unidades (Figura 34). Lo que sugiere que los factores CREB-A y CREM $\tau$  pudieran actuar sinérgicamente transactivando el promotor de *CATSPER1* al unirse a uno de los sitios CRE presentes en estas construcciones.



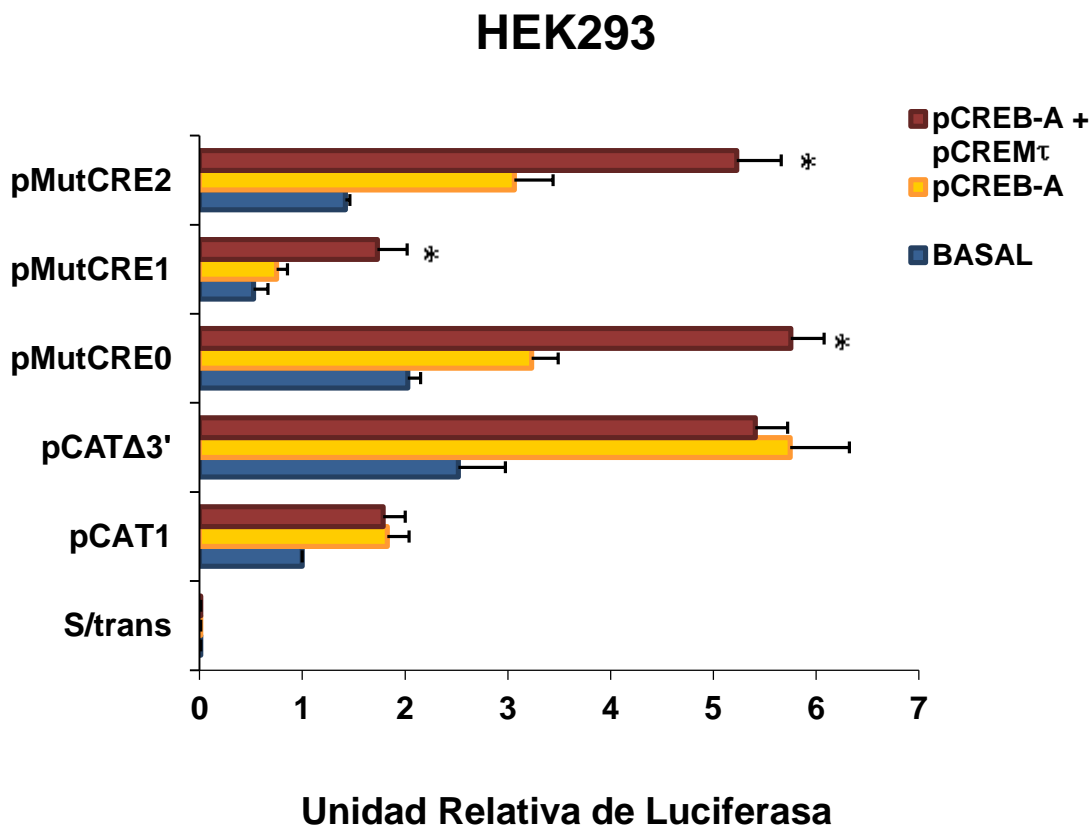
**Figura 35. Efecto de la co-transfección simultánea de CREB-A y CREM $\tau$  en la activación del promotor de *CATSPER1* en la línea celular HEK293.** Se co-transfectaron simultáneamente las construcciones pCREB-A y pCREM $\tau$  con las construcciones mostradas en el inciso A de la figura 23, para estudiar su actividad transcripcional después de 48 horas. Se analizó la actividad de luciferasa de *Renilla* la cual fue normalizada con respecto a la actividad de luciferasa de *Photinus*. Se muestran las actividades relativas de luciferasa con respecto a pCAT1. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas para lo cual se comparó la actividad de la co-transfección de pCREB-A con la actividad de la co-transfección simultánea de pCREB-A y pCREM $\tau$  (\*  $p \leq 0.05$ ).

Para demostrar en cuál de los sitios CRE ejercen su efecto sinérgico los factores CREB-A y CREM $\tau$  se co-transfectaron simultáneamente con las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2.

Cuando comparamos la actividad de la co-transfección en simultánea de las construcciones pCREB-A y pCREM $\tau$  con la actividad de la co-transfección de pCREB-A, se observa el aumento de la actividad en las construcciones pMutCRE0, pMutCRE1 y pMutCRE2, lo cual comprueba que estos factores juntos ejercen un aparente efecto sinérgico en la activación de la transcripción del gen *CATSPER1*. Sin embargo la transactivación por ambos factores se reduce cuando el sitio CRE1 es mutado (compárese pCAT $\Delta 3'$  y los mutantes CRE1, de 5.41 a 1.73 unidades (68.09%), lo que indica que el efecto de CREB-A y CREM $\tau$  depende de la unión a este sitio (Figura 35).

Estos resultados demuestran que la activación del gen *CATSPER1* es inducida por el sitio CRE1, a donde se une la proteína CREB-A, la cual puede interactuar a su vez con CREM $\tau$  provocando un incremento en la activación al reclutar la RNA polimerasa y dar inicio a la transcripción.





**Figura 36. Efecto de la co-transfección simultánea de CREB-A y CREM $\tau$  en la activación del promotor de *CATSPER1* con mutaciones en los sitios CRE en la línea celular HEK293.** Se co-transfectaron simultáneamente las construcciones pCREB-A y pCREM $\tau$  con las construcciones mostradas en el inciso A de la figura 29 en la línea celular HEK293. Las actividades de luciferasa se calcularon como en la Figura 35. Se muestran las actividades relativas de luciferasa con respecto a pCAT1. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas para lo cual se comparó la actividad de la co-transfección de pCREB-A con la actividad de la co-transfección simultánea de pCREB-A y pCREM $\tau$  (\*  $p \leq 0.05$ )

## 8. DISCUSIÓN

*CATSPER1* se ha relacionado con la infertilidad masculina (Nikpoor *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Avenarius *et al.*, 2009) y para comprender mejor su regulación transcripcional se ha realizado tanto el análisis *in silico* del promotor del gen (Alvarado, 2010), como estudios experimentales para determinar sitios importantes para su regulación transcripcional, encontrándose que su promotor es tipo TATA-less (Hernández, 2012) como muchos de los genes que son expresados durante la espermatogénesis. En los promotores tipo TATA-less comúnmente se encuentran elementos iniciadores (Inr) que en ausencia de caja TATA pueden ser reconocidos por la RNA polimerasa II (Javahery *et al.*, 1994) y dentro del promotor de *CATSPER1* se encuentra el Inr con la secuencia CCATTTT. Se ha demostrado que una característica de la regulación de genes haploides específicos de células germinales de testículo es que los Inr juegan un papel importante como core de promotores y contribuyen a la actividad del promotor en combinación con elementos río abajo y sitios CRE localizados río arriba (Ike *et al.*, 2004; Somboonthum *et al.*, 2005). En el promotor de *CATSPER1* se identificaron tres sitios CRE que podrían ser reconocidos por los factores transcripcionales CREB y CREM y ser activados mediante la vía del AMPc, siendo esta vía una de las principales vías de señalización durante las diferentes etapas de la espermatogénesis (Don *et al.*, 2002).

El gen *CATSPER1* se expresa exclusivamente en testículo durante la meiosis de la espermatogénesis, sin embargo, no se cuenta con una línea celular homóloga de humano, por lo que los ensayos de este trabajo se realizaron en la línea celular HEK293 (derivadas de riñón embrionario humano), misma que ha sido utilizada para el estudio de genes específicos de testículo en humano como *hOR17-4* (Spehr *et al.*, 2003), *sAC* (FL-hsAC) (Jaiswal *et al.*, 2003) y *GABA* (Blackmore, *et al.*, 1994). En éstas células las construcciones pCAT $\Delta$ 3' y pCAT $\Delta$ CRE1, las cuales contienen sitios CRE (Figura 23B) mostraron una actividad transcripcional mayor, lo cual nos sugiere que estos sitios favorecen el reclutamiento de la maquinaria de la transcripción y por lo tanto la activación del promotor *CATSPER1*.

Para hacer el análisis transcripcional del promotor de *CATSPER1* en un sistema homólogo se realizaron los ensayos en la línea celular GC-1spg, que corresponde a un estado de célula diploide entre espermatogonia tipo B y espermatocito primario de ratón (Hofmann, Narisawa *et al.*, 1992), esta línea celular nos da un fondo libre del factor transcripcional CREM $\tau$  ya que no se expresa durante este estadio (Foulkes *et al.*, 1992), lo cual se pudo comprobar mediante RT-PCR (Figura 21B) y además pertenece al mismo linaje celular de células germinales donde se expresa *CATSPER1*. Estudios previos realizados con el promotor *CatSper1* de ratón no mostraron actividad en esta línea celular (Mata-Rocha *et al.*, 2013) debido a que la expresión de este gen se da principalmente en estado haploide y que probablemente en éstas células se encuentren presentes factores que repriman su expresión, como ICER, el cual reconoce la secuencia consenso de los sitios CRE; sin embargo, esto parece no afectar la actividad transcripcional del promotor de humano ya que de las diversas construcciones del promotor *CATSPER1* mostraron actividad, sólo pCAT $\Delta$ BASAL no mostró actividad a pesar de haber tenido una buena eficiencia de transfección, lo que nos indica que esta línea celular no cuenta con las proteínas o factores transcripcionales necesarios para que se lleve cabo la transcripción basal en esta construcción, o que algún factor está reprimiendo su expresión; sin embargo, el resto de las construcciones si mostraron una actividad basal, siendo mayor con las construcciones pCAT $\Delta$ CRE1 y pCAT739, las cuales tienen presentes sitios CRE (Figura 26).

Nuestros estudios de la actividad basal de las diversas construcciones del promotor de *CATSPER1* en las líneas celulares HEK293 y GC-1spg, indicaron que la activación del promotor se puede estar llevando a cabo por los sitios CRE los cuales tienen la secuencia consenso 5'-TGACGTCA-3' y pueden ser reconocidos por los factores transcripcionales CREB y CREM (Figuras 23B y 26). La mayoría de los estudios reportados sobre genes blancos de estos factores durante la espermatogénesis están dirigidos a genes haploides, por lo que se enfocan al factor CREM ya que se encuentra mayormente expresado en etapas postmeioticas. Sin embargo, otro estudio sugiere que la supervivencia de las

células germinales depende del factor CREB producido por las células de Sertoli (Scobey *et al.*, 2001). Algunos de los genes inducidos por AMPc en éstas células son *c-fos* y *jun-B*, inhibina, proencefalina y *Dmrt1* (Don *et al.*, 2002). Por otro lado, dentro de los genes involucrados en la fertilidad masculina regulados por el factor CREM se encuentran *Prm 1 y 2*, *Tnp 1 y 2*, *Ace*, *Tssk6*, *Pvrl2* y *Tekt5*, (Kosir *et al.*, 2012; Martianov *et al.*, 2010; Beissbarth *et al.*, 2003). Además, existen reportes de la presencia de sitios CRE en las regiones reguladoras de genes específicos de espermatidas como *TP1* y *TP2*, *Tact1*, *Tact2*, *Oazt*, *ACE $\tau$*  y *RT7* (Heidaran *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 1993; Hisano *et al.*, 2003; Ike *et al.*, 2004; Kistler *et al.*, 1994; Van der Hoorn *et al.*, 1992), que podrían ser activados por los factores CREM o CREB. Debido a la importancia de estos factores transcripcionales durante la espermatogénesis, este estudio provee información sobre la participación de las isoformas CREB-A y CREM $\tau$  en la regulación transcripcional del gen *CATSPER1*, la primera es la más abundante en todos los tejidos y la segunda es una isoforma específica de testículo.

La presencia endógena así como sobreexpresión de los factores CREB-A y CREM $\tau$  fue determinada mediante Western blot (Figura 22A y B) en células HEK293.

Los experimentos *in vitro* donde se sobreexpresa CREB-A indican que es un factor necesario para activar el promotor *CATSPER1* en células HEK293, sin embargo, este factor en la línea celular GC-1spg no fue suficiente para su activación (Figuras 24 y 27). CREB-A se expresa en etapas tempranas de la espermatogénesis (Kim *et al.*, 2009) y se ha relacionado con la supervivencia de las células germinales (Scobey *et al.*, 2001). Nuestro estudio en las células HEK293 sugiere que la activación del promotor de *CATSPER1* se está llevando a cabo por la unión del factor al sitio CRE1 presente en el promotor ya que la expresión basal del gen fue drásticamente disminuida por mutaciones puntuales en este sitio, lo que concuerda con estudios donde se reporta que los sitios CRE en genes blanco están preferentemente localizados a -150 pb con respecto al TSS y en este caso el sitio CRE1 está localizado a -160 pb aprox. (Martianov *et al.*, 2010). En lo que respecta al factor CREM $\tau$ , su sobreexpresión no activó el

promotor *CATSPER1* en HEK293 ni en GC-1spg. Se conoce que otras isoformas de CREM son moduladoras negativas de la transcripción, pero la isoforma CREM $\tau$  encontrada en testículo que es abundante en meiosis y postmeiosis se ha reportado como una isoforma activadora ya que debido al empalme alternativo tiene la inserción de dos dominios ricos en glutamina (Foulkes *et al.*, 1992). Este factor en células germinales no es fosforilado (De Cesare *et al.*, 1999), pero se asocia con un activador de CREM en testículo (ACT) que posee dominios LIM y presenta actividad transcripcional intrínseca (Fimia *et al.*, 2001). También ha sido reportado que una kinesina específica de testículo (KIF17b) es fosforilada por la PKA y controla la localización intracelular de la proteína ACT (Kotaja *et al.*, 2005); sin embargo, aún no se ha descrito la participación de co-activadores, ni la cascada de señalización para la activación de genes mediada por factor transcripcional CREM $\tau$ , por lo que se sugiere que probablemente este factor no activó la transcripción de *CATSPER1* en las líneas celulares empleadas ya que de manera normal el gen no es expresado en estas células, y éstas pueden carecer de proteínas o factores que *in vivo* pueden llevar a cabo la activación de la transcripción mediada por CREM $\tau$ .

A pesar de que en las células GC-1spg no se vio activada la transcripción del promotor de *CATSPER1* por ninguno de los dos factores transcripcionales estudiados, la actividad basal fue disminuida al encontrarse mutado el sitio CRE1, por lo que se considera importante analizar si otras de las isoformas pudieran activar la transcripción en estas células.

Los factores CREB-A y CREM $\tau$  coexisten en la espermatogénesis durante la etapa en la que se expresa el gen *CATSPER1*; estos factores pertenecen a una familia de proteínas con dominios de zipper de leucina (bZip), los cuales permiten su homo o heterodimerización. Los ensayos *in vitro* en la línea celular HEK293 en la que fueron sobreexpresados simultáneamente los factores CREB-A y CREM $\tau$  mostró tener un efecto sinérgico en la actividad transcripcional de *CATSPER1*. Se ha reportado que el factor CREB-A puede interactuar con otros factores transcripcionales que pueden potenciar su actividad, entre estos factores se encuentran Sp1 y Oct1 (Manna *et al.*, 2003; Boulon *et al.*, 2002). Además,

varias proteínas con dominios transactivadores fuertes pueden interaccionar con el factor CREB-A y a su vez pueden interactuar con el co-activador CBP/p300; se ha descrito que tales complejos pueden potenciar la transcripción mediada por CREB-A. Proteínas que presentan dominios LIM poseen dominios de activación intrínsecos e interactúan directamente con el dominio KID de CREB-A, de manera independiente a la fosforilación de la serina 133 (Fimia *et al.*, 2000), estos complejos mejoran la actividad transcripcional de promotores con sitios CRE (Johannessen *et al.*, 2004). Por lo anterior el efecto sinérgico de ambos factores en la actividad transcripcional de *CATSPER1* podría deberse a la presencia de proteínas con dominios LIM, como el caso de la proteína ACT o una homóloga en esta línea celular, o bien, a una heterodimerización entre los factores, aunque referente a esto no se encontró información de posibles interacciones de estos factores en la regulación transcripcional de genes. Por lo anterior, se considera no dar por hecho que en la línea celular GC-1spg no se pueda observar actividad transcripcional de *CATSPER1*, debido a que faltaría evaluar el efecto simultáneo de los factores CREB-A y CREM $\tau$  en estas células, la participación de otras isoformas así como también comprobar la unión de los factores transcripcionales a los sitios CRE, y la realización de ensayos de interacción entre las proteínas para poder comprender mejor como es que se está activando la transcripción de *CATSPER1*.

## 9. CONCLUSIONES

- Los sitios CRE1 y CRE2 participan en la activación transcripcional del gen *CATSPER1* en células HEK293.
- El factor CREB-A activa transcripcionalmente el promotor de *CATSPER1* a través del sitio CRE1 en células HEK293.
- El sitio CRE1 participa en la transcripción del gen *CATSPER1* en la línea celular GC-1spg, sin embargo ni el factor CREB-A ni CREM $\tau$  lo activan transcripcionalmente.
- Los factores CREB-A y CREM $\tau$  ejercen un efecto sinérgico en la activación transcripcional del gen *CATSPER1* en la línea celular HEK293 a través del sitio CRE1.

## 10.PERSPECTIVAS

- Evaluar la interacción física de los factores transcripcionales CREB-A y CREM $\tau$  con los sitios de unión a CRE presentes río arriba del promotor y en el promotor del gen *CATSPER1*.
- Analizar la participación de otras isoformas de los factores CREB y CREM en la actividad transcripcional del promotor de *CATSPER1* humano.
- Realizar ensayos *in vivo* en ratón con un agonista de la vía del AMPc para evaluar la expresión del gen *CATSPER1*.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión simultánea de CREB-A y CREM $\tau$  en la línea celular GC-1spg.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de otras isoformas de CREB y CREM en la línea celular GC-1spg.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

Alvarado E. (2010). “Caracterización del promotor *CATSPER 1* determinante de la movilidad del espermatozoide”. Tesis de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular. IPN, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. México D.F. 113p.

Avenarius M., Hildebrand M., Zhang Y., Meyer N., Smith L., Kahrizi K., Najmabadi H., Smith R. (2009). “Human male infertility caused by mutations in the *CATSPER1* channel protein”. *Am J Hum Genet.* 84(4):505-10.

Beissbarth T., Borisevich I., Hörlein A., Kenzelmann M., Hergenbahn M., Klewe-Nebenius A., Klären R., Korn B., Schmid W., Vingron M., Schütz G. (2003). “Analysis of CREM-dependent gene expression during mouse spermatogenesis”. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Dec 30;212(1-2):29-39.

Blackmore P., Im W., Bleasdale J. (1994). "The cell surface progesterone receptor which stimulates calcium influx in human sperm is unlike the A ring reduced steroid site on the GABAA receptor/chloride channel." *Mol Cell Endocrinol* 104(2): 237-43.

Boulon S., Dantonel J. , Binet V., Vié A., Blanchard J., Hipskind R., Philips A. (2002). “Oct-1 potentiates CREB-driven cyclin D1 promoter activation via a phospho-CREB- and CREB binding protein-independent mechanism”. *Mol Cell Biol.* 22(22):7769-79.

Chung J., Navarro B., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Clapham D. (2011). “ A novel gene required for male fertility and functional *CATSPER* channel formation in spermatozoa”. *Nat Commun*; 2:153.

De Cesare D., Fimia G., Sassone-Corsi P. (1999). “Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation”. *Trends Biochem Sci.* 24(7):281-5.

Don J. and Stelzer G. (2002). "The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis." *Mol Cell Endocrinol* 187(1-2):115-24.

Fimia G., De Cesare D., Sassone-Corsi P. (1999). "CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT". *Nature*. 1999 Mar 11;398(6723):165-9.

Fimia G., De Cesare D., Sassone-Corsi P. (2000). "A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM". *Mol Cell Biol*. 20(22):8613-22.

Fimia G., Morlon A., Macho B., De Cesare D., Sassone-Corsi P. (2001). "Transcriptional cascades during spermatogenesis: pivotal role of CREM and ACT". *Mol Cell Endocrinol*. 20;179(1-2):17-23.

Foulkes N., Mellström B., Benusiglio E., Sassone-Corsi P. (1992). "Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator". *Nature* 355(6355):80-4.

Garner D. & Hafez E. (2002). "Capítulo 7 Espermatozoides y plasma seminal". *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*, 7ed, editorial. Mc Graw Hill Interamericana.

Griswold M. (1998) "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis". *Semin Cell Dev Biol*. 9(4):411-6.

Heidaran M., Kozak C., Kistler W. (1989). "Nucleotide sequence of the Stp-1 gene coding for rat spermatid nuclear transition protein 1 (TP1): homology with protamine P1 and assignment of the mouse Stp-1 gene to chromosome 1". *Gene*. 75(1):39-46.

Hernández A. (2012). "Efecto de los factores de transcripción SRY y CREB en la regulación del promotor *CATSPER1* de humano". Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental. UAM, México D.F. 93p.

Hisano M., Yamada S., Tanaka H., Nishimune Y., Nozaki M. (2003). "Genomic structure and promoter activity of the testis haploid germ cell-specific intronless genes, *Tact1* and *Tact2*". *Mol Reprod Dev.* 65(2):148-56.

Hofmann, M. Narisawa S., Hess R., Millán J. (1992). "Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen." *Exp Cell Res* 201(2): 417-35.

Howard T., Balogh R., Overbeek P., Bernstein K. (1993). "Sperm-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) is mediated by a 91-base-pair promoter containing a CRE-like element". *Mol Cell Biol.* 13(1):18-27.

Huang X., Zhang J., Lu L., Yin L., Xu M., Wang Y., Zhou Z., Sha J. (2004). "Cloning and expression of a novel CREB mRNA splice variant in human testis". *Reproduction.* 128(6):775-82.

Ickowicz D., Finkelstein M., Breitbart H. (2012). "Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases". *Asian J Androl.* 14(6):816-21.

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.

Jaiswal, B., Conti M. (2003). "Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10676-81.

Javahery R., Khachi A., Lo K., Zenzie-Gregory B., Smale S. (1994). “DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells”. *Mol Cell Biol.* 14(1):116-27.

Johannessen M., Delghandi M., Moens U. (2004). “What turns CREB on?”. *Cell Signal.* 16(11):1211-27.

Kim J.S., Song M., Seo H., Yang M., Kim S., Kim J.C., Kim H., Saito T., Shin T., Moon C. (2009). “Immunohistochemical analysis of cAMP response element-binding protein in mouse testis during postnatal development and spermatogenesis”. *Histochem Cell Biol.* 131(4):501-7.

Kirichok Y., Lishko P. (2011). “Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique”. *Mol Hum Reprod.* 17(8):478-99.

Kistler M., Sassone-Corsi P., Kistler WS. (1994). “Identification of a functional cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the 5'-flanking region of the gene for transition protein 1 (TP1), a basic chromosomal protein of mammalian spermatids”. *Biol Reprod.* 51(6):1322-9.

Kosir R., Juvan P., Perse M., Budefeld T., Majdic G., Fink M., Sassone-Corsi P., Rozman D. (2012). “Novel insights into the downstream pathways and targets controlled by transcription factors CREM in the testis”. *Plos one* 7(2): e31798.

Kotaja N., Macho B., Sassone-Corsi P. (2005). “Microtubule-independent and protein kinase A-mediated function of kinesin KIF17b controls the intracellular transport of activator of CREM in testis (ACT)”. *J Biol Chem.* 280(36):31739-45.

Kretser D., Loveland K., Meinhardt A., Simorangkir D., Wreford N. (1998). “Spermatogenesis”. *Hum Reprod.* 13 Suppl 1:1-8.

Li H. G., Liao A.H., Ding X.F., Zhou H., Xiong C.L. (2006). "The expression and significance of *CATSPER1* in human testis and ejaculated spermatozoa." *Asian J Androl* 8(3): 301-6.

Li H.G., Ding X. F., Liao A.H., Kong X.B., Xiong C. L. (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(5):299-306.

Lishko P., Botchkina I., Kirichok Y. (2011). "Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm". *Nature.* 17; 471(7338):387-91.

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.

Manna P., Eubank D., Lalli E., Sassone-Corsi P., Stocco D. (2003). "Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1". *J Mol Endocrinol.*30(3):381-97.

Martianov I., Choukrallah M., Krebs A., Ye T., Legras S., Rijkers E., Van Ijcken W., Jost B., Sassone-Corsi P., Davidson I. (2010). "Cell-specific occupancy of an extended repertoire of CREM and CREB binding loci in male germ cells". *BMC Genomics.* 29;11:530.

Mata-Rocha M., Alvarado-Cuevas E., Hernández-Sánchez J., Cerecedo D., Felix R., Hernández-Reyes A., Tesoro-Cruz E., Oviedo N. (2013). "Molecular cloning and analysis of the *CATSPER1* gene promoter". *Molecular Human Reproduction* 19(5):336–47.

Navarro B., Kirichok Y., Chung J., Clapham D. (2008). "Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa". *Int J Dev Biol.* 52(5-6):607-13.

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". *Hum Reprod* 19(1):124-8.

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(6856):603-9.

Ren D., Xia J. (2010). "Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization". *Physiology (Bethesda)*. 25(3):165-75.

Ruppert S., Cole T., Boshart M., Schmid E., Schütz G. (1992). "Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes". *EMBO J.* 1(4):1503-12.

Sassone-Corsi P. (2002). "Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis". *Science*. 296(5576):2176-8.

Scobey M., Bertera S., Somers J., Watkins S., Zeleznik A., Walker W. (2001). "Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding

protein (creb) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis". *Endocrinology*. 142(2):948-54.

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.

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* 33(10):3401-11.

Spehr, M., Gisselmann G., Poplawski A., Riffell J., Wetzel C., Zimmer R., Hatt H. (2003). "Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis." *Science* 299(5615): 2054-8.

Strünker T., Goodwin N., Brenker C., Kashikar N., Weyand I., Seifert R., Kaupp U. (2011). "The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm". *Nature*. 2011 Mar 17; 471(7338):382-6.

Tramer F., Vetere A., Martinelli M., Paroni F., Marsich E., Boitani C., Sandri G., Panfili E. (2004). "cAMP-response element modulator- $\tau$  activates a distinct promoter element for the expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene". *Biochem. J.* 383:179-85.

Van der Hoorn F., Tarnasky H. (1992). "Factors involved in regulation of the RT7 promoter in a male germ cell-derived in vitro transcription system". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 15;89(2):703-7.

Visconti P., Krapf D., De la Vega-Beltrán J., Acevedo J., Darszon A. (2011). “Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation”. *Asian J Androl.* 13(3):395-405.

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(33):20145-1050.

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.

Weinbauer G., Luetjens C., Simoni M., Nieschlag E. (2010). “Physiology of Testicular Function”. *Andrology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 11-59

Wistuba J., Stukenborg J.B., Luetjens C. (2007). “Mammalian spermatogenesis”. *Functional Development and Embryology* 1(2):99-117.

Zhang D. & Gopalakrishnan M. (2005). “Sperm Ion Channels: Molecular Targets for the Next Generation of Contraceptive Medicines?”. *Journal of Andrology*; 26:6:643-653.



## 12.ANEXOS

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para realizar la RT-PCR de los factores CREB-A y CREM $\tau$**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')
RTCREB-AF	GCCCAGCCACAGATTGCCACA
RTCREB-AR	GTCATTCAGGCGGCCAGCC
RTCREM $\tau$ F	GTCCCAGGCAGCCAGGTTGT
RTCREM $\tau$ R	AAACAGGGAAGCTGCCCGGG

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para realizar las mutaciones en los sitios CRE del promotor *CATSPER1***

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')
CRE0MUTFOR	5'GAGGCCCTGGCCTGCCGGCGGCCGCCGAGAGGGGAGAGTTCC3'
CRE0MUTREV	5'GGA ACTCTCCCCTCTCGGCGGCCGCCGGCAGGCCAGGGCCTC3'
CRE1MUTFOR	5' CTTTGCCAGTGACCTGCGGGGCCGCCTTGGTCTAGTCC 3'
CRE1MUTREV	5' GGACTAGACCAAGGCGGCCCGCAGGTCACTGGCAAAG 3'
CRE2MUTFOR	5' GGTGGGTGGATCATTGGCGGGCCGGAGTTCAAGAGCAG 3'
CRE2MUTREV	5' CTGCTCTTGA ACTCCGGCCCGCCAATGATCCACCCACC 3'