



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Regulación de la actividad transcripcional del
promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los
factores de transcripción Sox.”**

Tesis que presenta

CARLOS FERNANDO CHÁVEZ CABRERA

Para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la tesis:

Dr. Javier Hernández Sánchez

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

Ciudad de México

Agosto, 2017

Asesores

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de Maestría, los cuales fueron realizados en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Laboratorio del Dr. Javier Hernández Sánchez, en cotutoría con la Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda.

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre:

María, por siempre apoyarme y brindarme la oportunidad de estudiar y hacer lo que me gusta. Por siempre estar ahí cuando más necesitaba las palabras de apoyo de alguien para seguir. Por inculcarme los mejores valores, enseñarme que todo en la vida se puede lograr y apoyarme en mis sueños locos en este mundo. Lo más importante, por darme ese amor incondicional aún en los momentos más difíciles. TE AMOOO!!!

A mi novia:

Mayra, por siempre estar presente en los momentos más difíciles, por su comprensión, apoyo y amor a lo largo de la realización de la maestría y futuramente el doctorado. Por soportar mis desvelos, mi estrés, sacrificar algunos fines de semana de salida, o en los que podíamos estar juntos para acompañarme al laboratorio o en el escrito de esta tesis. Sobre todo gracias por todos los momentos de felicidad y de amor que me brindas todos los días. TE AMOOOO!!!

A mi hermana:

Diana, por todo el cariño, apoyo y momentos de risa que me ha dado a lo largo de la vida. Por echarme porras siempre y ayudarme a relajarme en los momentos de mayor estrés, así como a prepararme un café cuando más lo necesitaba jajaja te quiero!!

A la familia Cabrera Reyes:

Por estar presente a lo largo de toda mi vida, darme el amor que cualquier persona desearía como sobrino, primo, nieto ahijado, etc. Por ser una familia unida con todos los problemas que conlleva ser una familia y por hacerme parte de cada festejo, evento especial en el que estamos juntos a pesar de los caminos que ha tomado cada quién.

A mis directores de tesis:

Dr. Javier Hernández y Dra. Norma Oviedo por haberme recibido en sus laboratorios y dejarme ser parte de este proyecto, por su paciencia, apoyo, consejos y enseñanzas para poder realizar mi tesis. Muchas gracias por ser unos excelentes directores y brindar una mano amiga cuando se necesitaba. Nos vemos en el doctorado.

A mis asesores:

Dr. Marat Alvarez y Dr. Luis 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 amigos de generación:

Karla, Noé, Fer, Gerson, Aida, María, por todos los momentos divertidos que existieron a lo largo de los cursos, de la maestría. Por todas las fiestas en las que pudimos estar, las risas, los chistes, las pláticas que hicieron más ameno el trabajo a lo largo de este proyecto. Fue un verdadero placer conocer personas tan maravillosas a estas alturas de la vida. Gracias por brindarme su amistad.

A mis compañeros del laboratorio 6:

Juan, Liz, Krystal, Salma, Sergio y Andrea, por brindarme su apoyo y amistad a lo largo de la maestría. Gracias por su apoyo, sus consejos, asesoría y paciencia en los seminarios.

A Gabriela Mora y Lupita:

Por ser mujeres tan trabajadoras y eficientes en todo momento ya que nos brindaron todo su apoyo, siempre recibirme con una gran sonrisa a pesar de tener mucho trabajo. Muchas gracias a ambas.

Dedicatoria:

“A aquella persona que se adelantó en partir,
sin embargo, me apoyo y guió a este camino.

Con todo mi amor y admiración para mi abuelo:

Roberto Cabrera...

Nos veremos pronto”.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Actividad transcripcional de la región promotora de <i>Catsper1</i>	9
2.2 Promotores bidireccionales	11
2.3 RNA largos no codificantes (lncRNAs).....	15
2.4 Promotores bidireccionales lncRNA/mRNA	16
2.4.1 La expresión de <i>Catsper1</i> murino es regulada por factores de transcripción Sox	18
2.5 Familia de factores de transcripción Sox (Sry-related high-mobility-group box). 20	
2.5.1 Factor de transcripción Sox5	22
2.5.2 Factor de transcripción Sox9	23
2.5.3 Factor de transcripción Sox17	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	26
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
7. METODOLOGÍA	28
7.1 CONSTRUCCIONES DEL PROMOTOR DE <i>CATSPER1</i> MURINO	28
7.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	28

7.3	CLONACION DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN S-SOX5 Y SOX17 MURINOS.....	29
7.3.1	Extracción de RNA a partir de testículos de ratón	29
7.3.2	Síntesis de cDNA.....	30
7.3.3	PCR de los factores los genes S- <i>Sox5</i> y <i>Sox17</i> murinos	31
7.3.4	Clonación en pJET1.2 blunt.....	33
7.4	Preparación de células competentes	33
7.5	Transformación bacteriana.....	34
7.6	Subclonación de los genes S- <i>sox5</i> y <i>Sox17</i> murinos en pcDNA3	34
7.6.1	Restricción enzimática.....	34
7.6.2	Ligación de los genes en pcDNA3.....	35
7.7	Secuenciación del DNA.....	35
7.8	Cultivos celulares	36
7.9	Pase celular	37
7.10	Congelación de las líneas celulares.....	37
7.11	Transfección transitoria de líneas celulares MSC1 y GC1-spg.....	37
7.12	Ensayo de luciferasa DUAL	41
7.13	Detección de la expresión de S- <i>sox5</i> , <i>Sox9</i> y <i>Sox17</i>	42
7.13.1	Extracción de proteína y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	42
7.13.2	Inmunodetección de proteínas (Western Blot)	42
7.14	Análisis estadístico	43
8.	RESULTADOS.....	44
8.1	Análisis <i>in silico</i> del promotor bidireccional de <i>Catsper1</i> murino.....	44
8.2	Clonación de los genes S- <i>sox5</i> y <i>Sox17</i> murinos	45

8.3	Expresión endógena y sobreexpresión de los factores transcripcionales S-sox5 y Sox17	55
8.4	Actividad transcripcional bidireccional del promotor de <i>Catsper1</i> murino	56
8.4.1	Actividad transcripcional basal bidireccional del promotor de <i>Catsper1</i> murino en células MSC1 y GC1-spg.....	56
8.4.2	La actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper1</i> es inhibida en ambos sentidos por el factor transcripcional S-sox5 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg.....	59
8.4.3	La actividad transcripcional del promotor bidireccional de <i>Catsper1</i> es activada por el factor transcripcional Sox9 en la línea celular MSC1	61
8.4.4	Únicamente la actividad transcripcional del promotor en sentido (<i>Catsper1</i>) es activado por el factor transcripcional Sox9 en la línea celular GC1-spg	62
8.4.5	La actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper1</i> es activada en sentido mientras en antisentido (<i>Catsper1au</i>) es reprimida por el factor transcripcional Sox17 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg	64
9.	DISCUSIÓN.....	67
10.	CONCLUSIONES.....	72
11.	PERSPECTIVAS.....	73
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	74
13.	ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la espermatogénesis.	3
Figura 2. Localización de <i>Catsper1</i> y organización genómica.....	5
Figura 3. Activación y modulación del canal <i>Catsper</i>	6
Figura 4. Efecto de <i>Catsper1</i> en la fertilización <i>in vitro</i>	7
Figura 5. Actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper1</i> murino.	10
Figura 6. Promotor bidireccional de los genes GPAT/AIRC.....	12
Figura 7. Promotor bidireccional de <i>Catsper1</i>	13
Figura 8. Expresión de <i>Catsper1au</i> en diversos tejidos.	14
Figura 9. Diagrama del origen de los lncRNAs.....	16
Figura 10. Promotor bidireccional Smarcd2/lncRNA-Tcam1.	17
Figura 11. Identificación de los sitios de inicio de transcripción y sitios de unión a factores Sox.	19
Figura 12. Funciones de las proteínas Sox.	21
Figura 13. Estructura de la proteína Sox17.....	24
Figura 14. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>Catsper1</i> murino.....	44
Figura 15. PCR del gen S-sox5 murino.....	46
Figura 16. PCR del gen Sox17 murino.....	47
Figura 17. Colony PCR del gen S-sox5 murino.....	47
Figura 18. Colony PCR del gen Sox17 murino.....	48
Figura 19. Comprobación de la candidata pJET1.2-Sox17.....	49
Figura 20. Restricción enzimática del vector pcDNA3 y Pjet's.	50
Figura 21. Restricción enzimática de la construcción pcDNA3-S-sox5.....	51
Figura 22. Restricción enzimática de la construcción pcDNA3-Sox17.....	52

Figura 23. Comparación a nivel de aminoácidos del vector pcDNA3-Ssox5 con la secuencia del gen S-sox5 murino.	53
Figura 24. Comparación a nivel de aminoácidos del vector pcDNA3-Sox17 con la secuencia del gen Sox17 murino.	54
Figura 25. Sobreexpresión de los factores de transcripción S-sox5 y Sox17 en la línea celular MSC1.	55
Figura 26. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor <i>Catsper1</i> murino en la línea celular MSC1.	57
Figura 27. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor <i>Catsper1</i> murino en la línea celular GC1-spg.	58
Figura 28. El factor S-sox5 inhibe la actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper1</i> murino en ambos sentidos en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg.	61
Figura 29. El factor Sox9 incrementa la actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper1</i> murino en ambos sentidos en la línea celular MSC1.	62
Figura 30. El factor Sox9 incrementa la actividad transcripcional únicamente en sentido al gen <i>Catsper1</i> murino del promotor de dicho gen en la línea celular GC1-spg.	63
Figura 31. El factor Sox17 incrementa la actividad transcripcional del promotor en sentido (<i>Catsper1</i>) y la inhibe en antisentido (<i>Catsper1au</i>) en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg.	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación, localización cromosómica y dominios de la familia de proteínas Sox.	21
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR.	32
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para secuenciar.	36
Tabla 4. Plásmidos usados en los ensayos de transfección.	38
Tabla 5. Transfección con las construcciones problema del promotor de <i>Catsper1</i> murino y cotransfecciones con los plásmidos con los genes de los factores transcripcionales en células MSC1.	39
Tabla 6. Transfección con las construcciones problema del promotor de <i>Catsper1</i> murino y cotransfecciones con los plásmidos con los genes de los factores transcripcionales en células GC1-spg.	40
Tabla 7. Sitios de unión a factores Sox.	45

Resumen

El gen *Catsper1* codifica para una de las proteínas del canal CATSPER, el cual permea de forma selectiva 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 sabe acerca de la regulación transcripcional del gen *Catsper1* y de su recientemente descubierto RNA largo no codificante *Catsper1au*. El análisis *in silico* indica la presencia de varios sitios de unión a factores Sox tanto en dirección al gen *Catsper1* como al nuevo gen *Catsper1au*, de los cuales se han reportado previamente tres sitios que regulan la actividad de *Catsper1*. Si los genes *Catsper1* y *Catsper1au* se expresan durante la espermatogénesis, posiblemente los factores transcripcionales como S-sox5, Sox9 y Sox17, expresados diferencialmente durante este proceso, regulen su expresión.

En este trabajo mediante ensayos de luciferasa dual, se determinó la regulación transcripcional de los genes *Catsper1* y *Catsper1au* por los factores de transcripción S-sox5, Sox9 y Sox17 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg mediante ensayos de luciferasa dual. Los resultados indicaron que el factor S-sox5 regula de forma negativa la actividad transcripcional, disminuyéndola tanto para *Catsper1* como para *Catsper1au* en células MSC1 y GC1-spg. También se encontró que el factor Sox9 incrementa la actividad transcripcional tanto de *Catsper1* como de *Catsper1au* en células MSC1. Sorprendentemente se encontró que en células GC1-spg Sox9 aumentaba la actividad transcripcional únicamente de *Catsper1*. Por otro lado se encontró que el factor Sox17 regula de forma selectiva e incrementa la actividad transcripcional de *Catsper1* mientras que disminuye la actividad transcripcional de *Catsper1au*, tanto en células MSC1 como en GC1-spg. Sin embargo, se desconoce la ubicación precisa de los sitios de cada factor y si actúan sinérgicamente con otros factores de transcripción.

ABSTRACT

The *Catsper1* gene codes for one of the CATSPER channel proteins, which selectively permeates Ca^{2+} ions and its expression in spermatozoa and is essential for the hyperactivation of the flagellum and therefore, for male fertility. Little is known about the transcriptional regulation of the *Catsper1* gene and its recently discovered long non-coding RNA *Catsper1au*. *In silico* analysis suggests the presence of several Sox binding sites both towards the *Catsper1* gene and the new *Catsper1au* gene, which have previously been reported three sites that regulate the activity of *Catsper1*. Therefore, if *Catsper1* and *Catsper1au* genes are expressed during spermatogenesis, transcriptional factors such as S-sox5, Sox9 and Sox17, which are differentially expressed during this process, may regulate their expression.

In this work, the transcriptional regulation of the *Catsper1* and *Catsper1au* genes under the transcription factors S-sox5, Sox9 and Sox17 was determined in cell lines MSC1 and GC1-spg by dual luciferase assays. Our results showed that the S-sox5 factor negatively regulates transcriptional activity, decreasing both *Catsper1* and *Catsper1au* expression in MSC1 and GC1-spg cells. On the other hand, Sox9 factor was found to increase transcriptional activity of both *Catsper1* and *Catsper1au* in MSC1 cells. Transcriptional activity of *Catsper1* in GC1-spg cells was increased by Sox9. On the other hand Sox17 selectively regulates and increases the transcriptional activity of *Catsper1* while decreasing the transcriptional activity of *Catsper1au* in both MSC1 and GC1-spg cells. Further research will be required to locate the specific binding sites for each factor within the promoter/enhancer regions of *Catsper1* and *Catsper1au* and establish their functional relationship with other transcriptional factors.

1. INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual ocurre la formación de espermatozoides en mamíferos. Consta de tres etapas principales: proliferación de espermatogonias mediante divisiones mitóticas, meiosis y espermiogénesis en la cual ocurre el proceso de diferenciación a espermátidas (Kimmins, 2004) (Figura1).

Cambios hormonales inducen la expresión de ciertos genes que dirigen el proceso de diferenciación celular en el testículo para la producción de los espermatozoides maduros (Eddy, 2002).

Los espermatozoides maduros se dividen en dos regiones: la cabeza, conformada por un núcleo haploide compactado y un acrosoma, y el flagelo, constituido por una pieza media, una principal y una final (Jiménez González et al., 2006).

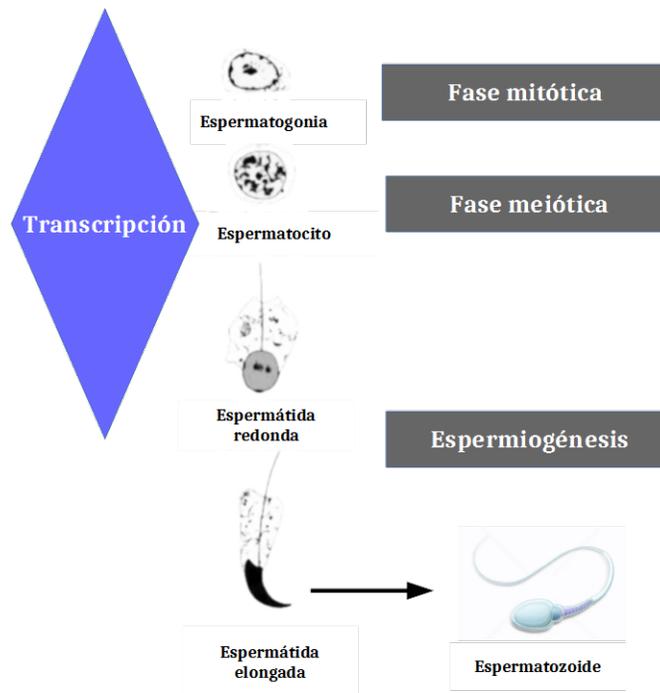


Figura 1. Etapas de la espermatogénesis. Durante el proceso de la espermatogénesis las células madre dan lugar a la espermatogonia la cual pasa por

varias divisiones mitóticas. Posteriormente las espermatogonias se diferencian a espermatocitos que por divisiones meióticas que dan lugar a cuatro células haploides llamadas espermátidas, las cuales se convierten finalmente en espermatozoides (Modificado de: Kimmins, 2004).

En 2001 se describió por primera vez el canal Catsper, un canal catiónico, que se expresa de forma exclusiva en células germinales masculinas (espermátidas y espermatozoides). Se localiza en la pieza principal del flagelo del espermatozoide y es el principal regulador de la motilidad (Jiménez-González, 2006).

Existen 4 proteínas que forman el canal de Catsper, las cuales se han denominado Catsper1, 2, 3 y 4 además de proteínas accesorias llamadas Catsper alfa, beta y gamma. Los miembros de esta familia contienen seis segmentos transmembranales y un dominio sensor de voltaje S4. En el caso específico de Catsper1, presenta un dominio rico en histidinas el cual le permite sensor el pH durante la capacitación para incrementar la actividad del canal, la entrada de calcio y la motilidad espermática (Lobley et al., 2003).

El gen *Catsper1* se localiza en el cromosoma 19 de ratón, y es compartido por otras especies. Por ejemplo, en rata se encuentra en el cromosoma 1q21 y en humano se localiza en el cromosoma 11q12.1. *CATSPER1* consta de 12 exones y tiene una longitud de 8,413 kb tanto en humano como en ratón. El transcrito consta de 2.6 kb y la proteína correspondiente de 686 a.a. El gen *Catsper1* murino tiene adyacentes el pseudogen Gm7074 y el gen de *Cst6* en la estructura cromosomal (Figura 2).

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

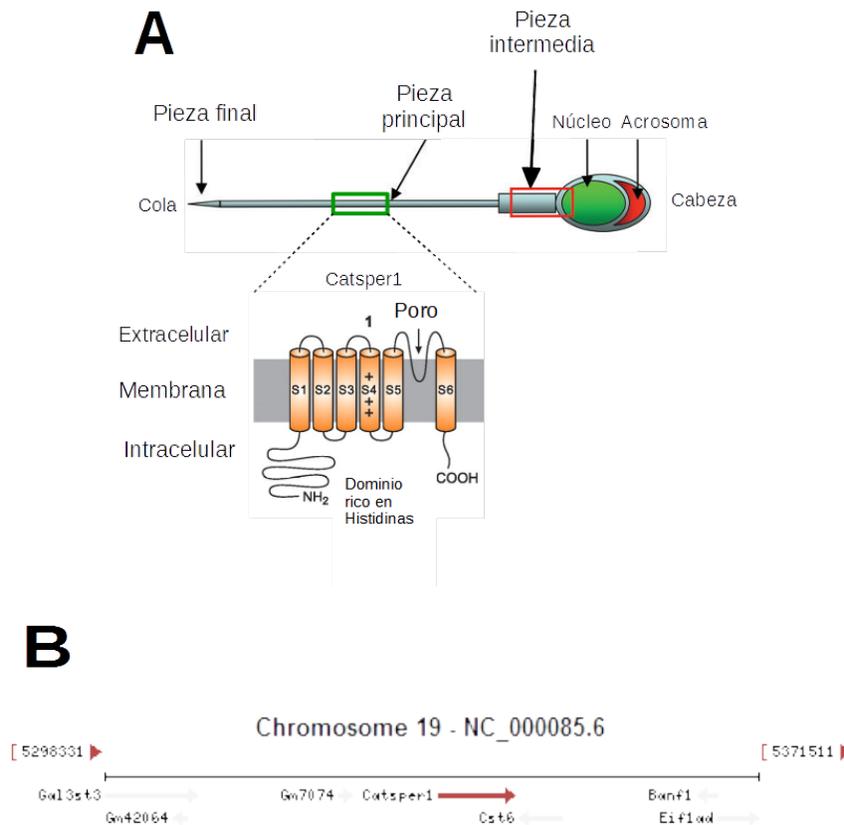


Figura 2. Localización de *Catsper1* y organización genómica. A) *Catsper1* se ubica en la pieza principal del flagelo del espermatozoide. B) Dentro del cromosoma 19 del ratón se ubica entre los genes *Cst6* y el pseudogen *Gm7074* (Modificado de Jiménez-González, 2006).

El canal catiónico *Catsper* es esencial para incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo cual conduce al proceso de hiperactivación del espermatozoide regulando el movimiento del axonema, el cual constituye la estructura interna radial del flagelo de los espermatozoides y constituyen el elemento esencial para la motilidad. (Zhang & Gopalakrishnan, 2005).

En términos moleculares, el canal *Catsper* es activado cuando los iones HCO^{-3} entran en el flagelo y activan la adenilato ciclasa, la cual incrementa la síntesis de AMPc. El AMPc a su vez activa el intercambiador Na^+/H^+ específico de testículo e

incrementa el pH intracelular. Este cambio de pH es sentido por el dominio de histidinas de Catsper1 lo cual hace que el canal Catsper permita la entrada de Ca^{2+} . El calcio entrante activa la Calmodulina (CaM) y la cinasa calmodulina (CaMK) lo cual incrementa la glicólisis y la producción de ATP induciendo la hiperactivación del flagelo (Navarro et al., 2008) (Figura 3).

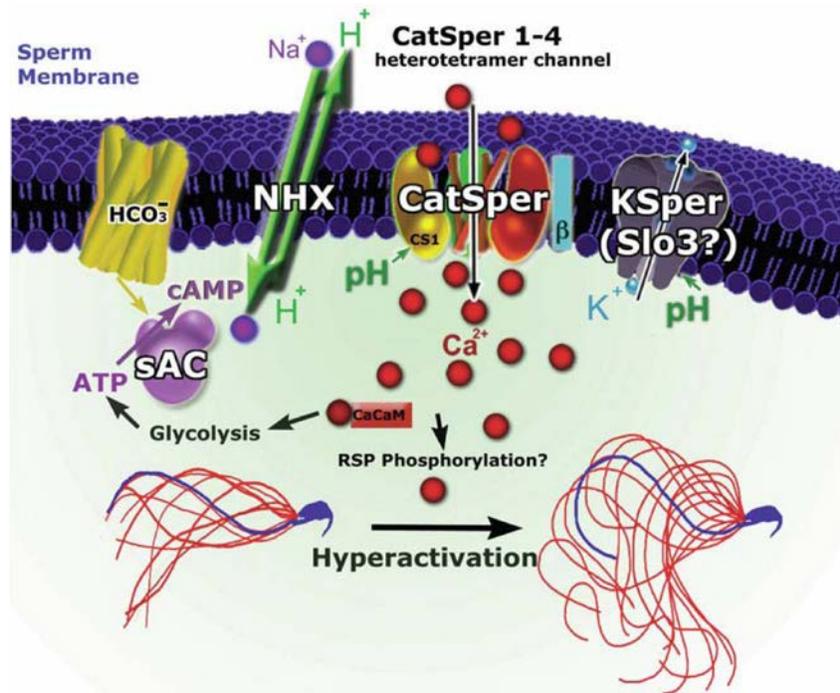


Figura 3. Activación y modulación del canal Catsper. La motilidad del espermatozoide así como la hiperactivación depende de diversos mecanismos moleculares entre los cuales el canal de Catsper es el principal.

La hiperactivación del espermatozoide ocurre durante el proceso denominado capacitación dentro del tracto reproductor femenino. En la hiperactivación el espermatozoide cambia su movimiento simétrico, rápido y de baja amplitud a un movimiento asimétrico, lento y de larga amplitud. Este cambio es necesario para el proceso de fertilización, ya que proporciona al espermatozoide la fuerza necesaria para penetrar en la zona pelúcida del ovocito (Zhang & Gopalakrishnan, 2005).

Con el fin de evaluar la participación del gen *Catsper1* en la fertilidad de los espermatozoides, se realizaron ensayos de fertilización *in vitro*. Para esto se

incubaron ovocitos silvestres maduros con espermatozoides capacitados silvestres (*Catsper1*^{+/+}) o nulos (*Catsper1*^{-/-}) durante 24 horas. Posteriormente, se observó que los ovocitos fertilizados por los espermatozoides silvestres desarrollaron blastómeros individuales. Sin embargo, los ovocitos incubados con espermatozoides mutantes permanecieron sin fecundar. Para evaluar si los espermatozoides nulos en *Catsper1* mantenían su capacidad de fusionarse con el ovocito y activar la fertilización, se incubaron espermatozoides capacitados (*Catsper1*^{+/+}) o nulos (*Catsper1*^{-/-}) con ovocitos cuya zona pelúcida fue removida enzimáticamente. Bajo estas condiciones, los espermatozoides de ambos ratones fueron capaces de fertilizar los ovocitos, concluyendo que el gen *Catsper1* es necesario para que los espermatozoides puedan atravesar la zona pelúcida de los ovocitos (Ren et al, 2001) (Figura 4).

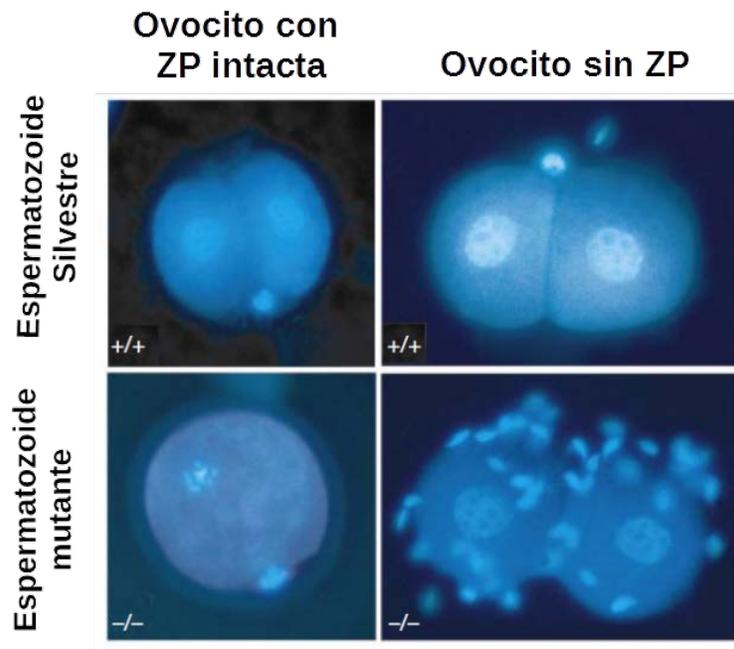


Figura 4. Efecto de *Catsper1* en la fertilización *in vitro*. Se incubaron ovocitos con y sin la zona pelúcida (ZP) con espermatozoides que son *Catsper1*^{+/+} o *Catsper1*^{-/-} (Modificado de: Ren et al., 2001).

Debido a la importancia que tiene *Catsper1* en la fertilidad masculina, se ha estudiado la regulación de la expresión génica del mismo. Se ha determinado que los individuos que tienen una baja expresión de *CATSPER1* tienen un conteo bajo de espermatozoides, además de una baja fertilidad (Avenarius *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la expresión de este gen hasta hace poco eran totalmente desconocidos.

2. ANTECEDENTES

Con la finalidad de analizar la actividad transcripcional de la región promotora de *Catsper1* se realizó un análisis bioinformático de la región promotora de *Catsper1* se delimitaron dos regiones: una región de 800 pb y otra región de 1200 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción. Ambas regiones fueron analizadas por los programas Mat-inspector y Mapper (Mata-Rocha *et al.*, 2013) para la predicción de regiones promotoras y sitios de unión a factores de transcripción y se encontraron sitios de unión a factores Sox (5,9 y 17) y SRY, los cuales se tomaron para su posterior análisis (Mata-Rocha *et al.*, 2013).

Se realizó una amplificación por PCR de la región promotora de 800 y 1200 pb a partir de DNA de riñón murino. La región de 800 pb se clonó en el vector de transición pCR-II TOPO para su posterior subclonación en el vector pGL3-Basic el cual carece de promotor y contiene un gen reportero de luciferasa (*Photinus pyralis*) para cuantificar la actividad transcripcional de la región promotora. La región de 800 pb se clonó tanto en sentido como en antisentido, mediante el uso de enzimas de restricción específicas, (*KpnI-XhoI* y *HindIII-XhoI* respectivamente) para darle direccionalidad. El producto de 1200 pb a su vez fue clonado en el vector pGEM-T Easy el cual le proporcionó dos sitios *EcoRI* y posteriormente se subclonó en el vector pGL3-Basic que contenía la secuencia promotora de 800 pb flanqueada por dos sitios *EcoRI*, la cual se eliminó para poder subclonar en su lugar la secuencia

de 1200 pb tanto en sentido como en antisentido. La direccionalidad del promotor de 1200 pb fue verificada mediante secuenciación (Mata-Rocha *et al*, 2013).

2.1 Actividad transcripcional de la región promotora de *Catsper1*

Las construcciones de 800 y 1200 pb con el gen de luciferasa fueron transfectadas en las líneas celulares HEK-293 de células embrionarias de riñón humano y MSC1 de células de Sertoli de ratón. En ambas líneas celulares se observó que cuando el promotor se encontraba en sentido con respecto a *Catsper1* había una actividad transcripcional baja en comparación con el vector pGL3-Basic sin promotor. Se esperaba que cuando las regiones promotoras de 800 y 1200 pb se clonaran en antisentido no hubiese actividad transcripcional; sin embargo, tuvieron una actividad transcripcional 5 y 17 veces mayor respectivamente, que la secuencia en sentido. (Jiménez-Badillo. Tesis de maestría 2012) (Figura 5).

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

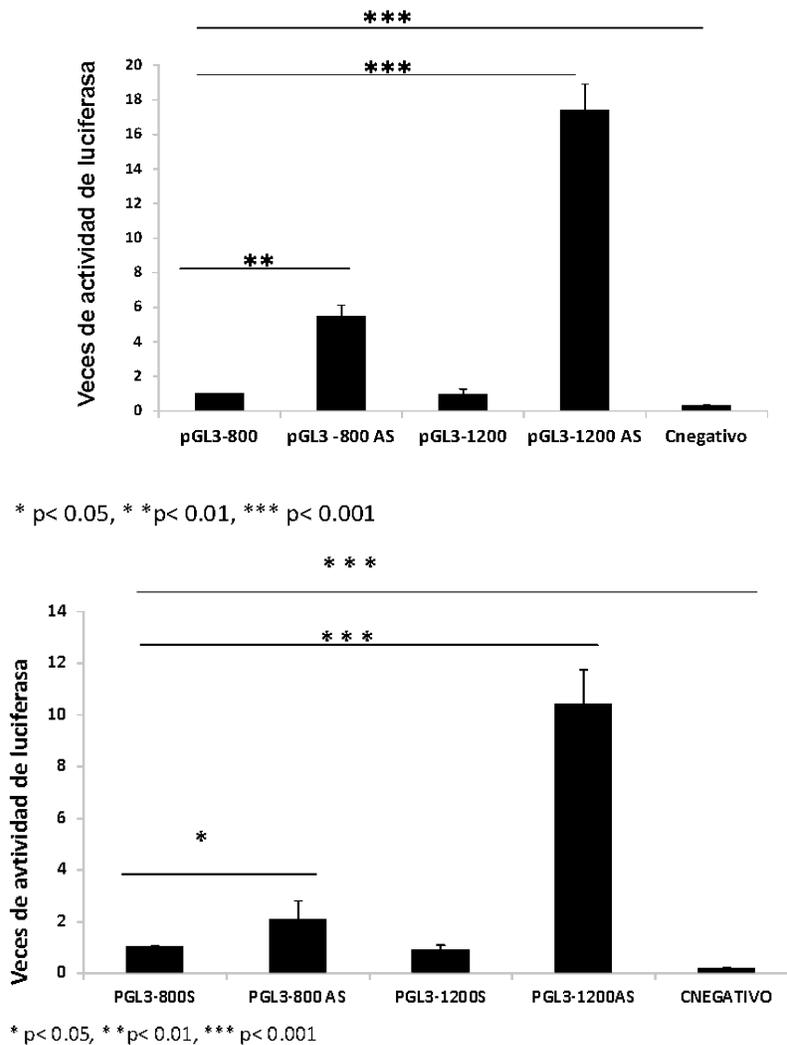


Figura 5. Actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* murino. Células HEK-293 (superior) o MSC1 (inferior) se transfectaron con las construcciones que contienen las regiones de 800 y 1200 pb del promotor de *Catsper1* río arriba del gen de luciferasa de *Photinus*. La actividad transcripcional del promotor se expresa en número de veces de la actividad de luciferasa. (Jiménez-Badillo. Tesis de maestría 2012).

Estos resultados demuestran que la región promotora del gen *Catsper1* murino tiene actividad transcripcional tanto en sentido como en antisentido. Al momento de realizar una “primer extensión” para determinar al sitio de inicio de la transcripción del gen *Catsper1* se encontró un sitio de inicio transcripcional y un transcrito no

identificado en el RNA de testículo de ratón. Los experimentos anteriores sugieren que la región promotora del gen *Catsper1* es un promotor bidireccional.

2.2 Promotores bidireccionales

Los promotores son segmentos de DNA localizados normalmente río arriba del sitio de inicio de la transcripción que regulan la transcripción de genes. Existe un tipo especial de promotores denominados promotores bidireccionales, los cuales regulan la expresión de dos genes, tanto en sentido como en antisentido. Los promotores bidireccionales se definen como una región reguladora que es compartida por dos genes, los cuales se transcriben en sentidos opuestos. De acuerdo a la definición de un promotor bidireccional, la distancia intergénica de los genes que regula la expresión en general no es mayor a 1000 pb. La distancia es considerada a partir del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de un gen al TSS del otro gen. Otra característica de los promotores bidireccionales es que cuentan con un contenido de GC del 66%, en cambio los promotores no bidireccionales tienen un contenido de GC del 53% (Trinklein *et al.*, 2004).

Algunos ejemplos de genes que tienen un promotor bidireccional son los genes homólogos de colágeno humano *COL α 1 (IV)/COL α 2 (IV)* (Burbelo, 1988), los genes de pollo *GPAT/AIRC*, los cuales se encuentran involucrados en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina (Zalkin and Gavalas, 1995) (Figura 6), y los genes de casete de unión al ATP *ABCG5* y *ABCG8*. Estos son ejemplos de genes que se encuentran correlacionados positivamente y funcionan en la misma ruta; sin embargo, también existen algunos ejemplos donde hay una correlación negativa entre los genes bidireccionales, como por ejemplo, los genes TK/KF los cuales codifican para una cinasa de timidina (TK) y una formamidasa de kinurenina (KF) relacionadas con el metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos respectivamente (Schuettengruber, 2003).

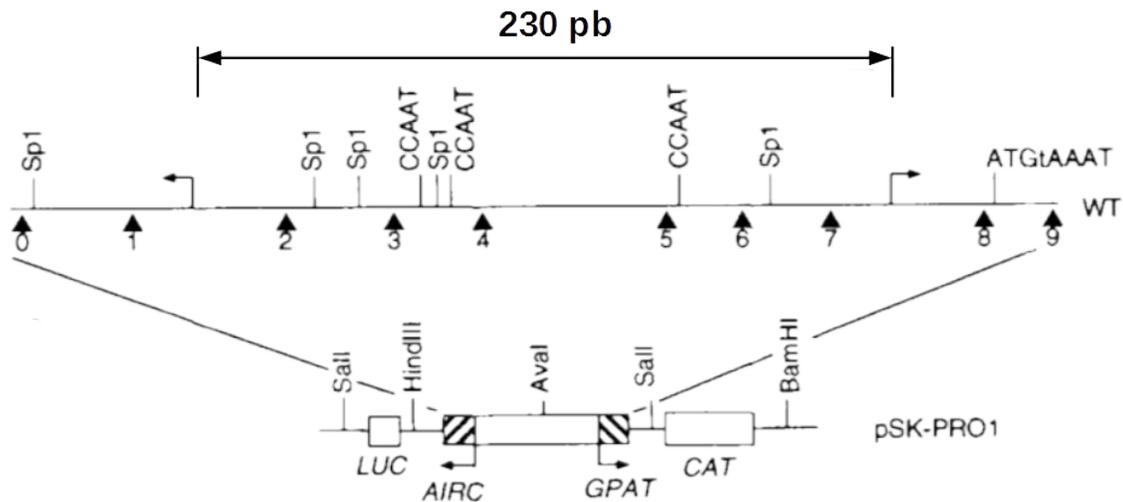


Figura 6. Promotor bidireccional de los genes GPAT/AIRC. Los genes *GPAT/AIRC* de pollo codifican dos enzimas que participan en la vía de síntesis *de novo* de purinas. La distancia intergénica entre estos dos genes es de 230 pb y la expresión de ambos es regulada de forma positiva por varios sitios de unión a factores Sp1 (Zalkin and Gavalas, 1995).

Dado el antecedente de que el promotor del gen *Catsper1* murino pudiera ser bidireccional, se comenzó a buscar un posible nuevo gen divergente a *Catsper1* ya que no existe ninguno reportado en la base de datos del NCBI. Se encontró que el nuevo gen denominado *Catsper antisense upstream (Catsper1au)* al igual que *Catsper1* se expresa en testículo, y el análisis por RACE5' determinó que este nuevo gen contiene dos TSSs, uno a 244 y otro a 291 pb río arriba del sitio de inicio transcripcional del gen *Catsper1*, lo cual es congruente con los promotores bidireccionales (Jiménez-Badillo, datos no publicados) (Figura 7).

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

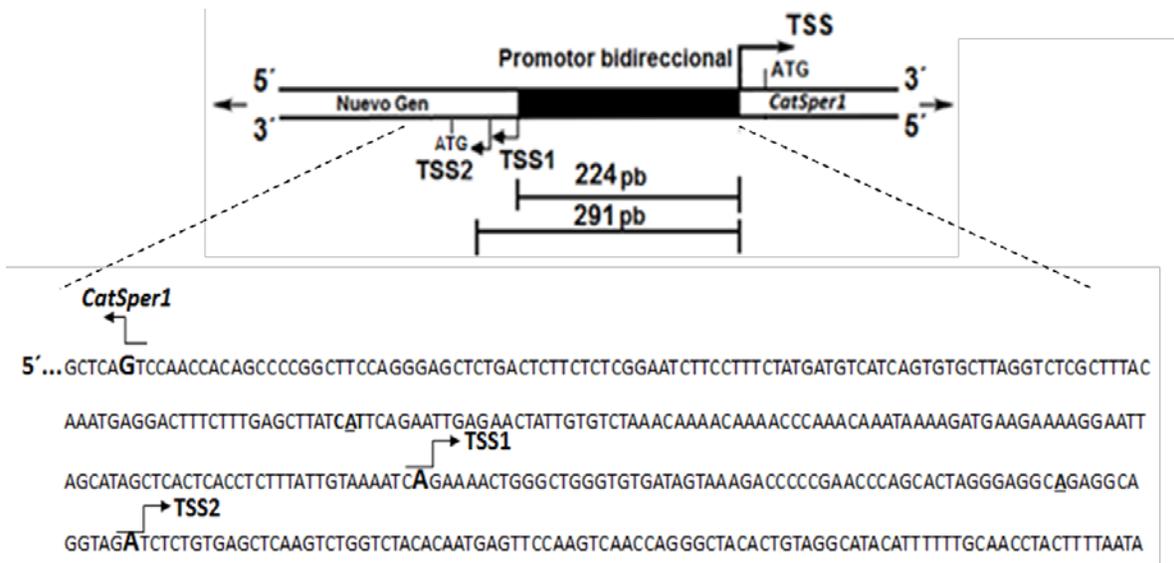


Figura 7. Promotor bidireccional de *Catsper1*. La región intergénica entre el TSS de *Catsper1* murino y el TSS1 y TSS2 del nuevo gen es de 224 y 291 pb respectivamente. (Jiménez-Badillo, datos no publicados).

Para estudiar la naturaleza del nuevo gen se utilizó la técnica de RT-PCR para observar el perfil de expresión del nuevo gen utilizando cDNA de diferentes tejidos (cerebro, corazón, pulmón, hígado, testículo, timo, bazo, intestino delgado y músculo esquelético) en ratones adultos.

Los resultados mostraron que se obtenía un amplificado de 496 pb únicamente en testículo e hígado de ratón macho ya que sólo un “primer extension” de RNA de los órganos definiría si se expresan los dos transcritos (Figura 8).

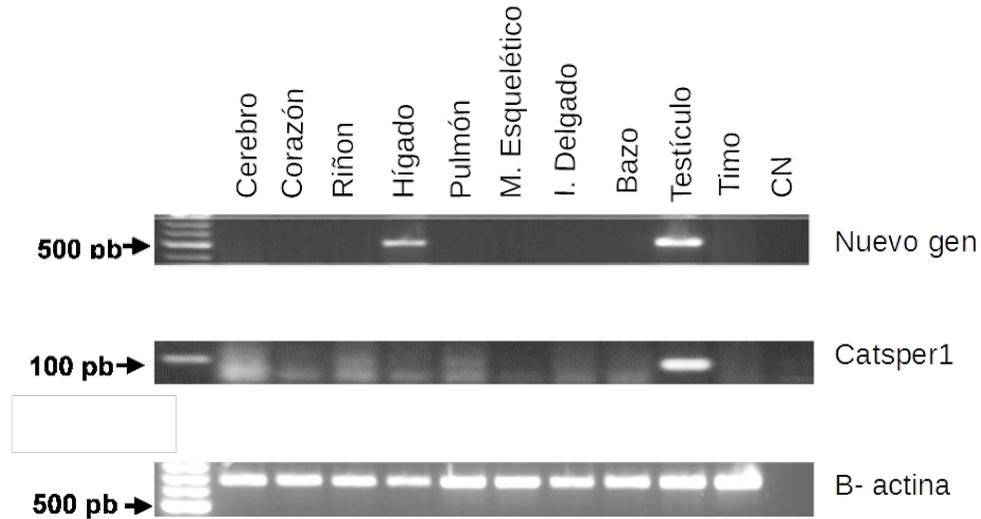


Figura 8. Expresión de *Catsper1au* en diversos tejidos. Se realizó un panel de expresión con diferentes tejidos obtenidos de ratón para amplificar por PCR un producto de 496 pb correspondiente al transcrito del nuevo gen. La beta-actina se muestra como un control de normalización (Jiménez-Badillo. Tesis de maestría 2012).

Se analizó si el transcrito codificaba para alguna proteína mediante un análisis bioinformático para ver si traduce para una proteína y se encontró que no contiene un marco abierto de lectura extenso, solo pequeños. Se utilizó un sistema de transcripción-traducción acoplado a partir de cDNA obtenido de *Catsper1au* y se encontró que no traduce ninguna proteína. Por lo cual se analizó la estructura del transcrito y se encontró que es un RNA altamente estructurado que no permite el acceso a los ribosomas.

Los resultados anteriores demuestran que *Catsper1au* posiblemente sea un RNA largo no codificante.

2.3 RNA largos no codificantes (lncRNAs)

Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) son un tipo especial de transcritos de RNA mayores a 200 pb que no codifican para ninguna proteína debido a que no tienen un marco abierto de lectura (ORF). La cantidad de lncRNAs que se han identificado ha ido incrementado en los últimos años, y la diversidad de los mismos es muy grande ya que se han identificado en muchos organismos complejos.

Los lncRNAs se encuentran involucrados en muchos procesos biológicos importantes como lo son la impronta genómica, cambiar la forma del cromosoma, como en el caso del RNA Xist, y regulación alostérica de la actividad enzimática (Rinn *et al.*, 2012; Ponting *et al.*, 2009).

La sobreexpresión, deficiencia y mutaciones en la expresión de los lncRNAs se ha asociado con numerosas enfermedades humanas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Wu *et al.*, 2013). Sin embargo, la función de la mayoría de los lncRNAs es desconocidas y otros no tienen una función aparente. Otro de los factores que no ha permitido conocer la función de los lncRNAs es que no se pueden agrupar en familias ya que no existen secuencias compartidas entre ellos, sin embargo se han podido agrupar con base en la región a partir de la cual se crea el lncRNA (Figura 9).

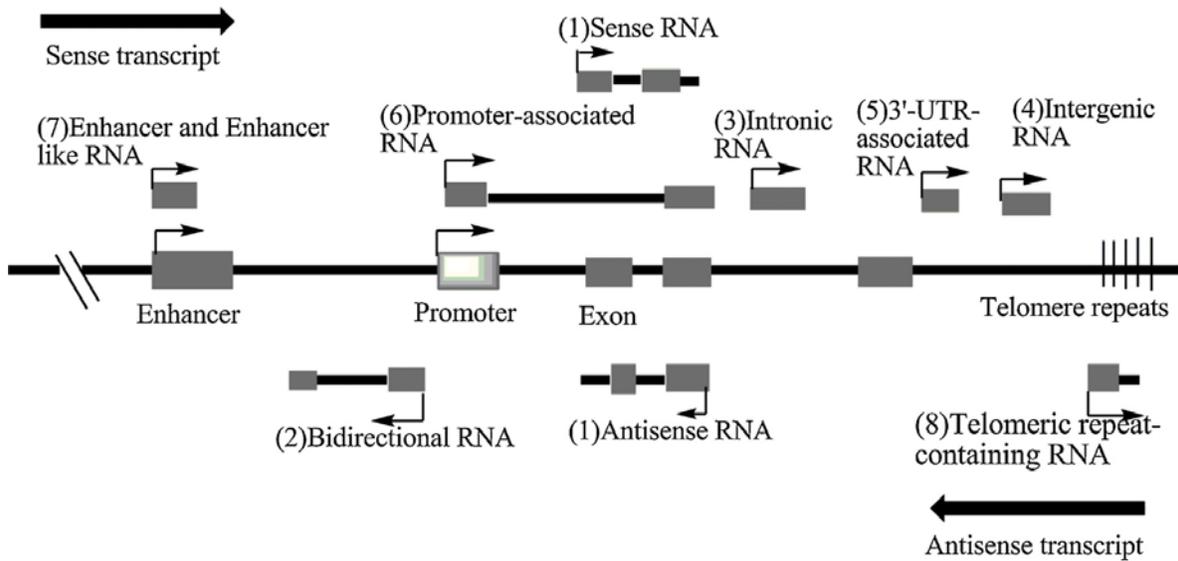


Figura 9. Diagrama del origen de los lncRNAs. Los lncRNAs se dividen en tres grandes grupos: I) los que se transcriben a partir del gen que codifica para una proteína dentro de los cuales se encuentran los RNAs sentido o antisentido (1), los RNAs bidireccionales (2), los RNAs intrónicos (3) y los RNAs intergénicos (4) II) los que se transcriben a partir de regiones regulatorias de genes, en los cuales se encuentran los RNAs asociados al extremo 3'-UTR (5), los RNAs asociados a promotores (6) y los RNAs tipo activadores (7) III) los lncRNAs transcritos de regiones cromosomales específicas, en el que se encuentra los RNAs con repeticiones teloméricas (8) (Wu et al., 2013).

Dentro de esta gama de posibilidades existen promotores bidireccionales que regulan la expresión de un gen que codifica para proteínas y al mismo tiempo la expresión de RNAs no codificantes llamados promotores bidireccionales lncRNA/mRNA.

2.4 Promotores bidireccionales lncRNA/mRNA

Específicamente aquellos promotores bidireccionales que contienen codifican un lncRNA y un mRNA se han asociado a genes que regulan la transcripción y el desarrollo (Lepoivre et al., 2013). Estos lncRNAs pueden tener actividad en *cis*, con

la cual regulan genes que se encuentran cercanos o adyacentes, como actividad en *trans*, regulando otros cromosomas diferentes de donde se transcriben, como es el caso del RNA *Xist* el cual es esencial para la inactivación de uno de los cromosomas X en las mujeres.

Se ha observado que la expresión tejido específico de ciertos genes se encuentra estrechamente relacionada con promotores, activadores y lncRNAs. La existencia de promotores bidireccionales lncRNA/mRNA es muy importante para la expresión de este tipo de genes, como es el caso de una región denominada CNS1 la cual funciona como un activador para iniciar la transcripción del gen *Tcam1*, el cual es una proteína de adhesión celular específica de testículo que se encuentra a 3.4 kb de distancia de CNS1. Sin embargo, se ha observado que la región CNS1 también funciona como un promotor bidireccional para el gen *Smarcd2* el cual es un regulador de la cromatina, y el lncRNA-*Tcam1* denominado así porque se encuentra en el mismo sentido que el gen *Tcam1*. El lncRNA-*Tcam1* solo se expresa en testículo y el gen *Smarcd2* se expresa de forma ubicua (Kurihara et al., 2014) (Figura 10).

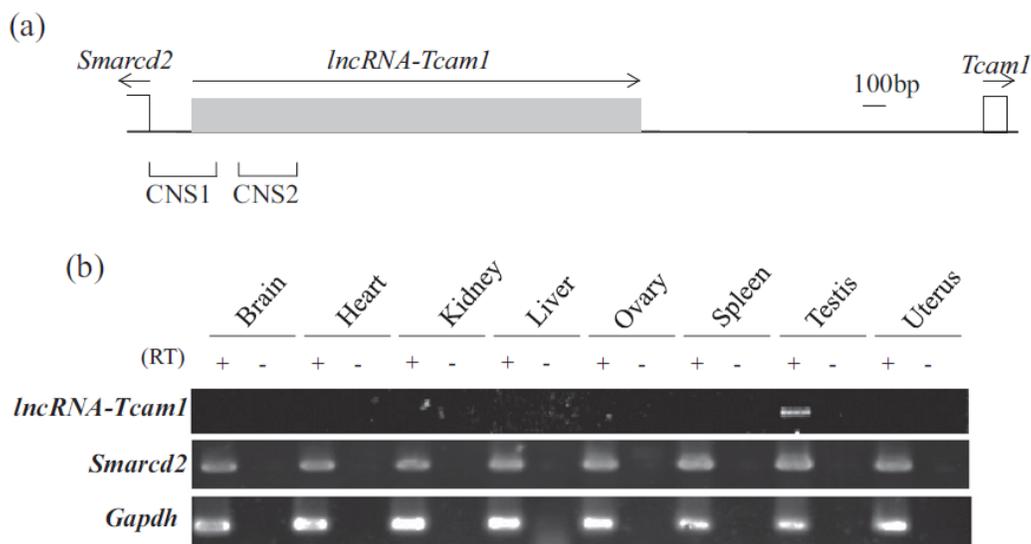


Figura 10. Promotor bidireccional *Smarcd2*/lncRNA-*Tcam1*. (a) La región promotora CNS1 regula la expresión del gen *Tcam1* el cual se encuentra a 3.4 kb

de distancia; también actúa como promotor bidireccional y regula la expresión del gen *Smarcd2* y del lncRNA-*Tcam1*. (b) Perfil de expresión en diversos tejidos del lncRNA-*Tcam1* y el gen *Smarcd2* (Kurihara *et al.*, 2014).

A pesar de que el lncRNA-*Tcam1* se expresa únicamente en testículo, aún no existe una función reportada. Se realizaron experimentos donde se sobreexpresó dicho transcrito para ver si aumentaba la cantidad de mRNA para el gen *Tcam1* o el gen *Smarcd2* mediante una RT-PCR y se encontró que ninguno de los dos genes se sobreexpresaba, por lo que se piensa que dicho lncRNA actúa en *trans* regulando la expresión de genes ubicados en otros loci.

La regulación transcripcional del promotor bidireccional *Smarcd2/lncRNA-Tcam1* es regulada por los factores de transcripción Sp1, y se ha observado que la expresión de estos genes tiene una participación muy importante durante la espermatogénesis ya que regulan el acomodamiento de la cromatina durante este proceso (Kurihara *et al.*, 2014).

Por lo anterior sería interesante estudiar cual es el mecanismo de regulación génica a nivel transcripcional así como los factores transcripcionales que regulan la expresión del gen *Catsper1* y el lncRNA *Catsper1au* en testículo de ratón.

2.4.1 La expresión de *Catsper1* murino es regulada por factores de transcripción Sox

Nuestro grupo de trabajo encontró que el promotor en sentido para *Catsper1* carece de una caja TATA y contiene sitios de unión a factores transcripcionales Sox5, Sox9, Sry y CREB. Se ha encontrado que su sitio de inicio de la transcripción (TSS) se encuentra 84 pb río arriba con respecto al codón de inicio traduccional. A pesar de que se han identificado tres sitios de unión a factores de transcripción Sox en el promotor de *Catsper1*, el gen *Catsper1* es transactivado y controlado principalmente por un sitio de unión similar a Sox5 y Sox9 145 pb río arriba del TSS, ya que se ha observado que mutaciones puntuales en este sitio de unión disminuyen fuertemente

la expresión de *Catsper1* (Mata-Rocha, 2012) (Figura 11). Lo anterior indica los factores de transcripción Sox tienen un papel muy importante en la expresión del gen *Catsper1*.

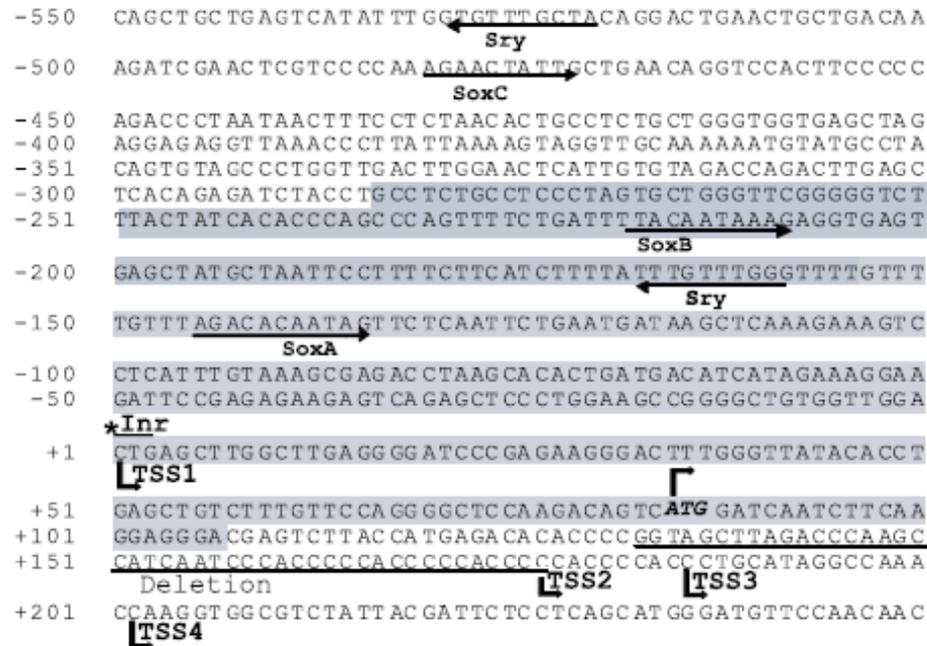


Figura 11. Identificación de los sitios de inicio de transcripción y sitios de unión a factores Sox. Se analizó la región promotora del gen *Catsper1* murino y se observó que contenía un TSS río arriba y tres TSSs río abajo del sitio de inicio de la traducción, por lo cual el TSS1 fue el considerado para la expresión del gen *Catsper1*. También se encontraron tres sitios de unión a factores Sox (A, B, C) siendo el sitio SoxA el que regulaba principalmente la expresión de *Catsper1* (Mata-Rocha, 2012).

Aún no se conoce la regulación a nivel molecular de *Catsper1au* por lo que se espera que esta misma familia de factores de transcripción Sox participen en la regulación de la actividad transcripcional tanto de *Catsper1* como del lncRNA

2.5 Familia de factores de transcripción Sox (Sry-related high-mobility-group box).

La familia Sox se encuentra conformada por proteínas que pertenecen a la categoría de factores transcripcionales y son muy importantes durante el desarrollo embrionario. Esta familia posee un dominio HMG (High Mobility Group box) el cual les permite unirse al DNA en el surco menor. Actualmente existen 20 genes tanto en humano como en ratón con base en su secuencia proteica, y se agrupan en 8 grupos (A-H) (Tabla1). Las proteínas que conforman esta familia comparten homología a lo largo de diferentes especies y se han conservado evolutivamente, por lo que se sugiere que las funciones pueden ser similares en los individuos de diferentes especies (Coriat *et al.*, 1993).

Los factores de transcripción Sox son considerados *proteínas arquitectónicas* ya que interactúan con otros cofactores para formar complejos nucleoproteicos para regular de forma positiva o negativa la transcripción de un gen. Los grupos A, B1, C, E, F y H participan en la transactivación, ya que poseen un dominio de transactivación (TA) que recluta proteínas coactivadoras para posteriormente interactuar con proteínas TBP (proteínas de unión a caja TATA) y TAFs (factores asociados a TBP). Los grupos B2, G y D poseen un dominio de transrepresión (TR) el cual recluta proteínas co-represoras e inhiben la transcripción (Figura 12).

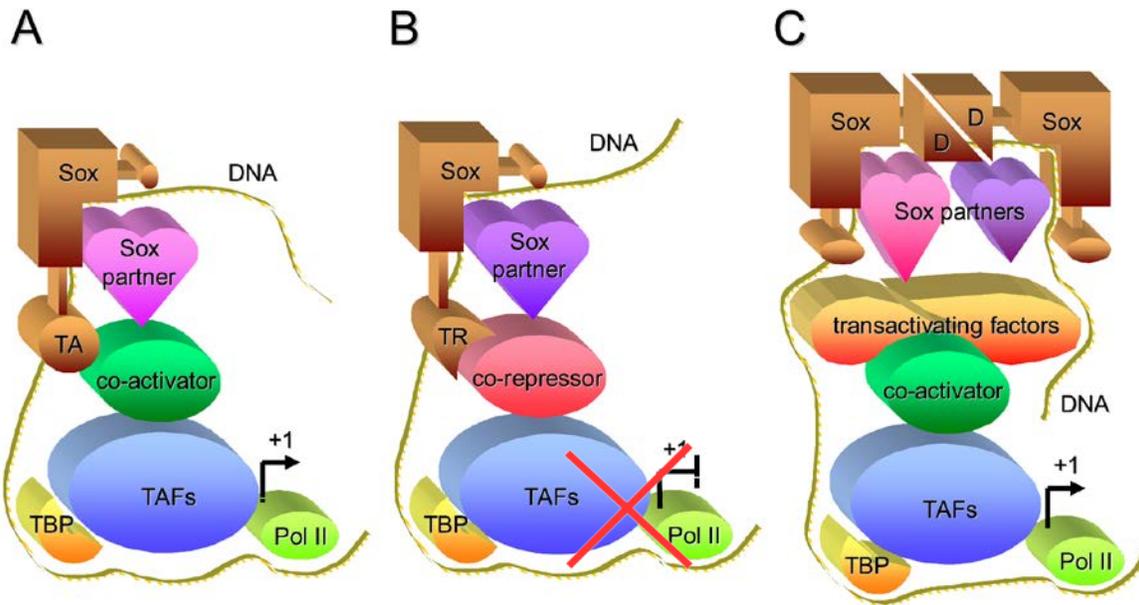


Figura 12. Funciones de las proteínas Sox. Los miembros de la familia de proteínas Sox tienen forma de L en su estructura terciaria y pueden contener dominios de transactivación (TA), represión (TR) y de dimerización (D) en los extremos amino y carboxilo terminal, los cuales permiten que interactúen con otros factores regulando la actividad transcripcional de los genes. Las proteínas Sox pueden unirse a coactivadores y activar la transcripción (A), unirse a corepresores y reprimir la transcripción (B) o formar dímero y de esta forma unirse a factores de transactivación para iniciar la actividad transcripcional (Lefebvre,2007).

Tabla 1. Clasificación, localización cromosómica y dominios de la familia de proteínas Sox. Los dominios de las proteínas Sox se encuentran representados en la siguiente forma: HMG: High Mobility Group Box; TA: dominio de transactivación; TR: dominio de represión; D: dominio de dimerización (Modificado de: Lefebvre et al., 2007).

Grupo	Gen	Locus	Dominios
A	Sry	YC3	HMG, TA
B1	Sox1	B A1-A2	HMG, TA
	Sox2	3 A2-B	HMG, TA
	Sox3	X A7.3-B	HMG, TA
B2	Sox14	9E3.3	HMG, TR
	Sox21	13 E4	HMG, TR
C	Sox4	13 A3-A5	HMG, TA
	Sox11	12 A3	HMG, TA
	Sox12	2 G3	HMG
D	Sox5	B G3	HMG, D
	L-Sox5	6 G3	HMG, 2 D
	Sox6	7 F1	HMG, 2 D
	Sox13	1 E4	HMG, D
E	Sox8	17 A3	HMG, TA, D
	Sox9	11 E2	HMG, TA, D
	Sox10	15 E1	HMG, TA, D
F	Sox7	14 C3	HMG, TA
	Sox17	1 A1	HMG, TA
	Sox18	2 H4	HMG, TA
G	Sox15	11 B3	HMG, TR
H	Sox30	11 B1.1	HMG, TA

2.5.1 Factor de transcripción Sox5

La proteína Sox5 se encuentra en el cromosoma 6 del ratón, consta de 7079 pb y tiene 2 isoformas importantes, la isoforma larga L-Sox5 está compuesta por 18 exones y se expresa en múltiples órganos con una fuerte expresión en condrocitos y músculo estriado, lo cual indica un papel importante en el desarrollo de músculo y

cartílago (Ikeda *et al.*, 2002). Por otra parte, la isoforma corta S-Sox5 se expresa específicamente en testículo y regula genes como el gen de antígeno 6 asociado a espermatozoide (SPAG6), el cual es esencial para la motilidad del flagelo (Kiselak *et al.*, 2010).

Sox5 y Sox6 pertenecen al grupo D de la familia de los factores Sox, y se distinguen porque ambos tienen un dominio de cremallera de leucina, un dominio super-enrollado y una caja Q. Los dominios super-enrollados son los que permiten la homodimerización en ausencia o presencia de DNA, por lo cual se pueden unir a proteínas adyacentes. Otro proceso en el que participa Sox5 es en la neurogénesis, donde controla la vía de señalización proliferativa Wnt, regulando la salida prematura del ciclo celular de los precursores neurales de la médula espinal en desarrollo (Martínez-Morales, 2010).

2.5.2 Factor de transcripción Sox9

Sox9 se encuentra en el cromosoma 11 del ratón, consta de 4135 pb y tiene un importante papel en la diferenciación de la gónada masculina, en el desarrollo de varios órganos del sistema genito-urinario, el desarrollo de la próstata, los testículos (Wertz *et al.*, 2000) y en el mantenimiento de la fertilidad masculina.

Sox9 tiene dominios de dimerización, por lo que se piensa que puede formar homodímeros e incluso heterodímeros con otras proteínas de la familia Sox para la activación de genes. La interacción de Sox9 con el DNA se lleva a cabo a través del dominio HMG, además tiene un dominio de transactivación en el extremo C-terminal, el cual permite la unión con proteínas activadoras para iniciar la transcripción. Este dominio es altamente conservado en prolina, glutamina y serina, que son necesarios para la transactivación de genes blanco de Sox9 durante el desarrollo de la gónada y el esqueleto (Südbeck *et al.*, 1996).

2.5.3 Factor de transcripción Sox17

La proteína Sox17 consta de 3288 pb y codifica para una proteína de 419 aminoácidos. Existen dos isoformas de Sox17 en testículo adulto de ratón, de las cuales la isoforma A es específica de testículo. Esta isoforma contiene un dominio SOX-TCF_HMG box en el extremo N-terminal, el cual es específico de proteínas SRY y homólogas, a través de la cual se une de forma específica al DNA en el surco menor. Posee un dominio de transactivación el cual le permite unirse a otras proteínas para activar la transcripción de ciertos genes (Figura 13).

La segunda isoforma t-Sox17 tiene una delección parcial en la caja HMG, lo cual lleva a la pérdida de su función como activador transcripcional de genes y en células germinales premeióticas, se expresa en el espermatocono y se acumula en la espermátida redonda (Kanai *et al.*, 1996).

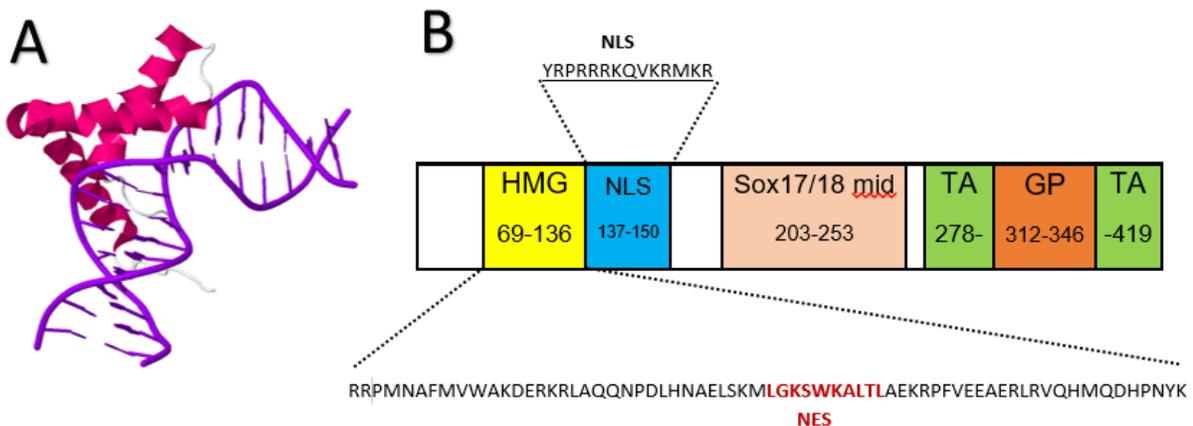


Figura 13. Estructura de la proteína Sox17. A) Estructura terciaria de la proteína Sox17 interactuando con el surco menor del DNA. El dominio HMG consta de tres alfa-hélices arregladas en una estructura L y que generan un centro hidrofóbico el cual es capaz de unirse al DNA. B) Los dominios que conforman la proteína son HMG: caja de alta movilidad; Sox17/18 mid: dominio central de Sox17 y Sox18; TA:

de transactivación; GP: dominio rico en glicina y prolina. También contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES) en el dominio HMG.

Hasta el momento solo se conoce la regulación a nivel molecular del gen *Catsper1*, pero debido a su importancia en la fertilidad masculina y la importante participación de los lncRNA en el desarrollo y control de genes tejido específico, se espera que esta misma familia de factores de transcripción Sox participen en la regulación de la actividad transcripcional tanto de *Catsper1* como del lncRNA.

3. JUSTIFICACIÓN

El gen *Catsper1* murino es muy importante durante el proceso de la espermatogénesis para la formación del canal de Catsper. El gen *Catsper1* es regulado transcripcionalmente por un promotor bidireccional que también promueve la transcripción de un gen divergente a *Catsper1* (*Catsper1au*). Se ha demostrado que existe una regulación del gen *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox, por lo que se espera que esa misma familia de factores regule la expresión del gen divergente a *Catsper1*. Al mismo tiempo se desconoce si la expresión del nuevo gen se encuentra relacionada directamente con la expresión de *Catsper1*. Por lo anterior, es necesario determinar el papel de los factores Sox5, Sox9 y Sox17 en la actividad transcripcional del promotor bidireccional.

4. HIPÓTESIS

La familia de factores de transcripción Sox regula la expresión de *Catsper1* y de su gen divergente (*Catsper1au*).

5. OBJETIVOS

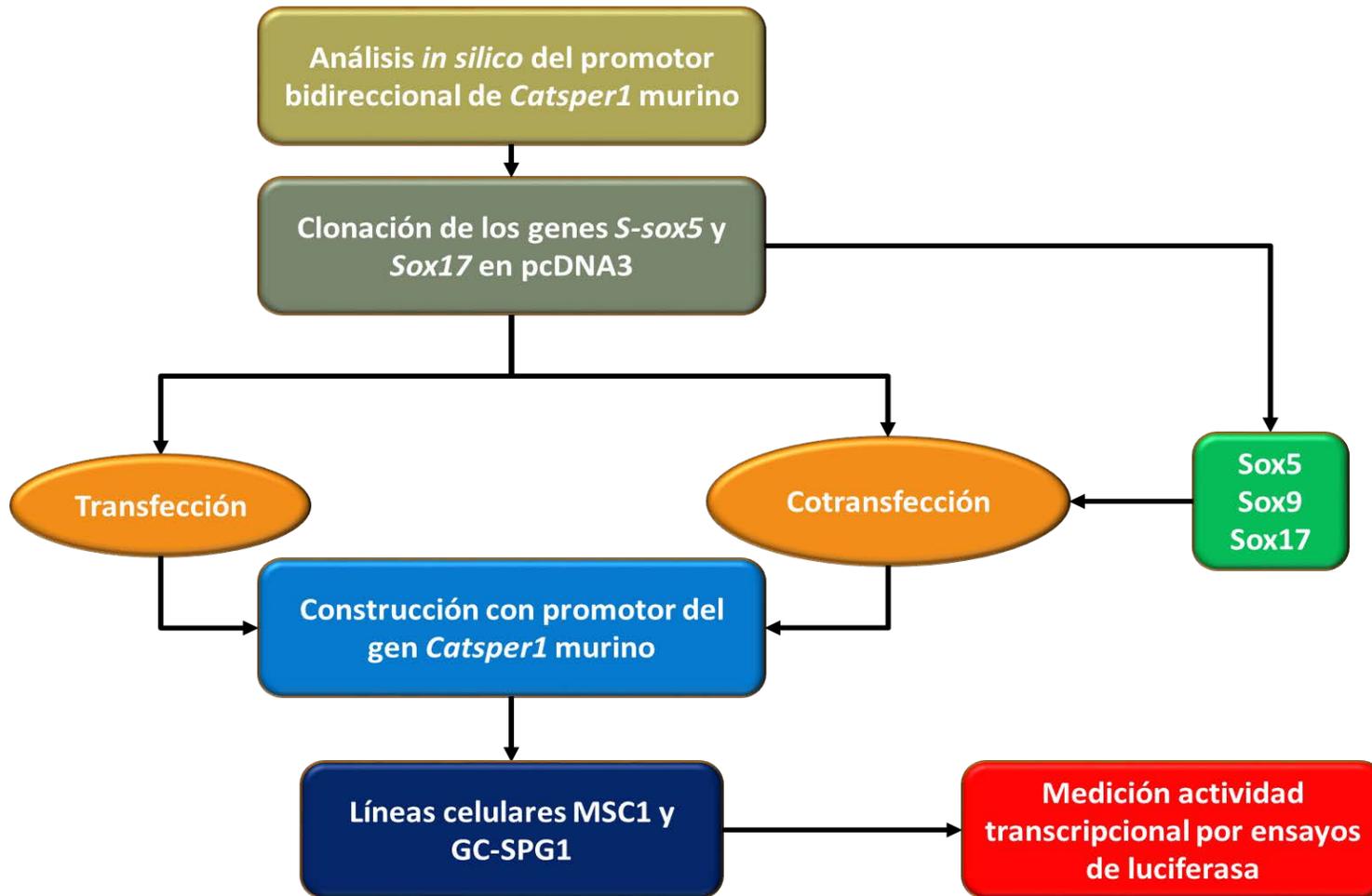
5.1 Objetivo general

Determinar la función de los sitios Sox del promotor bidireccional de *Castper1* murino sobre la actividad transcripcional en antisentido.

5.2 Objetivos específicos

- ❖ Analizar *in silico* el promotor bidireccional de *Catsper1* murino.
- ❖ Clonar los genes *Sox5* y *Sox17* murino.
- ❖ Analizar la actividad transcripcional en ambos sentidos del promotor bidireccional de *Catsper1* murino.
- ❖ Determinar el efecto de los factores de transcripción Sox en la regulación del promotor de *Catsper1*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA

7.1 CONSTRUCCIONES DEL PROMOTOR DE *CATSPER1* MURINO

En estudios anteriores se clonó el promotor del gen *Catsper1* murino a partir de DNA de riñón murino, y de esta construcción se realizó amplificación por PCR de la región promotora de 800 pb y 1200 pb. El producto de PCR se clonó en el vector pCR-II TOPO para su posterior subclonación tanto en sentido como en antisentido en el vector pGL3-Basic mediante una estrategia de restricción con endonucleasas específicas (KpnI-XhoI) y (HindIII-XhoI) respectivamente. Este vector carece de promotor y contiene al gen reportero de luciferasa (*Photinus pyralis*) para medir la actividad transcripcional de la región promotora.

El producto de PCR de 1200 pb se clonó en el vector pGEM-T Easy el cual le proporciona 2 sitios EcoRI y posteriormente se subclonó en el vector pGL3-Basic. Se utilizó el vector pGL3-Basic, en el cual se encontraba la secuencia promotora de 800 pb flanqueada por dos sitios EcoRI, y se eliminó el promotor de 800 pb para poder subclonar en su lugar la secuencia de 1200 pb tanto en sentido como en antisentido.

La secuencia de estos plásmidos fue verificada y las construcciones se muestran en la parte de anexos (Anexo 1).

7.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se realizó el análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica de aproximadamente 1200 pb río arriba del promotor del gen de *Catsper1* murino, empleando los programas:

MatInspector (<https://www.genomatix.de/matinspector.html>)

TRANSFAC (<http://genexplain.com/transfac/>)

TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp/>)

7.3 CLONACION DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN S-SOX5 Y SOX17 MURINOS

7.3.1 Extracción de RNA a partir de testículos de ratón

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 de 6 a 8 semanas de nacimiento (adultos), los cuales se sacrificaron y se obtuvieron los testículos. Posteriormente, el RNA total fue aislado mediante la técnica del TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) y se precipitó con el método de isopropanol-cloroformo-alcohol isoamílico como se describe a continuación: Se pulverizaron los testículos en un mortero agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se adicionó 1 ml de TRIZOL. El tejido se transfirió a un microtubo de 1.5 ml, se incubó 5 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 200 µl de cloroformo frío, se agitó vigorosamente hasta obtener un color rosa uniforme. Se centrifugó a 13,500 rpm 5 min. a 4°C. Se separó la fase acuosa, la cual contiene el RNA y se le añadió 1 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA. Se centrifugó la muestra a 13,500 rpm 30 min a 4°C. Una vez obtenido el pellet de RNA se lavó con 200 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 13,500 rpm 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de RNA durante 15 minutos aproximadamente. Se resuspendió la pastilla en 89 µl de agua MiliQ libre de RNasas. Se agregaron 10 µl de Buffer de DNasa 10X y 1 µl de enzima DNasa (PROMEGA) y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Se agregaron 100 µl de agua libre de RNasa y se purificó agregando 200 µl de fenol ácido pH 4.5 y se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregaron 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó a 13,500 rpm 5 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de

etanol absoluto. Se centrifugó a 13,500 rpm 45 min a 4°C. En seguida se lavó la pastilla de RNA con 200 µl de etanol al 70%. Luego se centrifugó a 13,500 rpm 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua libre de RNasas y se almacenó a -70°C para posteriores ensayos.

Se cuantificó su concentración mediante el Nanodrop 2000 (Thermo Fischer) y se observó su pureza mediante el análisis de la relación 260/280 la cual era de 1.8 y la relación 230/280 de 2. Se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1.2%. La muestra se preparó con 3 µg de RNA, 1 µl de buffer de carga (50% glicerol, 1mM EDTA, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% Xileno-cianol) y 1 µl de bromuro de etidio. Finalmente se incubó a 85°C por 1 min y se puso en hielo 5 min. La integridad del RNA se verificó al observar las bandas de RNA ribosomal 28S, 18S y 5S.

7.3.2 Síntesis de cDNA

Se realizó una síntesis de cDNA a partir del RNA total de testículo de ratón con un kit comercial (Applied Biosystems) empleando 2 µl de Buffer RT 10X, 0.8 µl de dNTP's 25X (100mM), 2 µl de Random Primers RT 10X, 1 µl de la enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µg de RNA total (1 µl) y 13.2 µl de agua libre de RNasa para tener un volumen final de 20 µl. El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	25°C	10 min
30	37°C	120 min
1	85°C	5 min
1	4°C	∞

7.3.3 PCR de los factores los genes S-Sox5 y Sox17 murinos

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como molde el cDNA obtenido previamente para amplificar los genes de los factores de transcripción S-sox5 y Sox17 murinos.

Para ello se preparó una mezcla compuesta por: 0.4 µl de oligo Forward (10 µM), 0.4 µl de oligo Reverse (10 µM), 4 µl de Buffer HF 5X, 0.4 µl de dNTP's 25X (100mM), 0.6 µl de DMSO, 0.2 µL de enzima polimerasa Phusion, 12 µl de agua miliQ estéril y 2 µl de cDNA o agua (control negativo) para completar un volumen final de 20 µl. Como control de cantidad e integridad del RNA, se amplificó el gen constitutivo de β-actina. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la tabla 2. Las condiciones del programa de PCR para actina fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 min
30	94°C	30 seg
	60°C	30 seg
	72°C	50 seg
1	72°C	5 min
1	4°C	∞

Las condiciones del programa de PCR fueron, tanto para el gen S-sox5 como para Sox17 las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	98°C	5 min

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

40	98°C	50 seg
	72°C	2:50 min
1	72°C	10 min
1	4°C	∞

Por otra parte, se evaluó la expresión del gen *Catsper1* murino, como un control para verificar la ausencia de DNA genómico en el cDNA. Las condiciones del programa fueron:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 min
35	95°C	30 seg
	60°C	30 seg
	72°C	50 seg
1	72°C	5 min
1	4°C	∞

Para visualizar los productos de PCR correspondientes a la expresión de β -actina, *Catsper1*, *S-sox5* y *Sox17* se realizaron análisis electroforéticos en geles de agarosa (SIGMA) al 1.2%, 2% y 1.2% respectivamente.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR. En rojo se encuentran marcados los sitios de restricción.

Oligonucleótidos	Secuencia del Oligonucleótido (5'→3')
ActinaForw	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
ActinaRev	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG
CatSper1Forw	CTGAGCTAGAGATCCGAGGTG
CatSper1Rev	CAATTAGCTTGAGGACTGCTTCT

Sox5AltFwd	CCC AAGCTT ATGGCAGCTGCTGCTGCAGCAACAC
Sox5Rev	CGC GGATCC TCAGTTGGCTTGTCCCGCAATG
Sox17Fwd	CCC AAGCTT ATGAGCAGCCCGGATGCG
Sox17Rev	CCG CTCGAG TCAAATGTCGGGGTAGTTGCAATAG

7.3.4 Clonación en pJET1.2 blunt

Para realizar la clonación de los productos de PCR de S-sox5 y Sox17 murino se utilizó un kit comercial (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el siguiente protocolo: se incubó 1 µl de la reacción de PCR, 10 µl del Buffer de reacción, 1 µl del plásmido pJET1.2 Blunt, 1 µl de T4 DNA ligasa y 7 µl de agua miliQ libre de nucleasas para tener un volumen final de 20 µl. Posteriormente se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hr y se transformó en células DH5α competentes.

7.4 Preparación de células competentes

Se cultivaron bacterias *E. Coli* DH5α (Genotipo: F- Φ80/*lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*) a 37°C durante toda la noche en 5 ml de medio LB. Al día siguiente se inoculó 1 ml del cultivo en 100 ml de medio LB fresco. Se incubó a 37°C con agitación vigorosa en un matraz hasta alcanzar una absorbancia de 0.6-0.9 a 600 nm. Posteriormente se centrifugaron las bacterias a 7000 rpm 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de una solución de CaCl₂ 0.1 M recién preparada, luego se centrifugó bajo las mismas condiciones y se fue llevando a un volumen menor cada vez de 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml y finalmente cuando se resuspendió en 2.5 ml se agregó 250 µl de glicerol estéril manteniendo las bacterias en hielo, se realizaron alícuotas de 100 µl de bacterias y se mantuvieron en hielo seco, posteriormente se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.5 Transformación bacteriana

Se utilizaron de 20 a 50 ng de plásmido para transformar 100 µl de bacterias competentes, Las bacterias se mezclaron con el plásmido e incubaron por 30 min en hielo, se les dio un choque térmico sometiendo la mezcla a un pulso de calor de 42°C por 1 min y rápidamente se transfirieron a hielo por 1 min. Posteriormente se agregó 1 ml de medio LB precalentado a 37°C durante 1 hora con agitación constante de 200 rpm. Se sembraron 100 µl de la reacción de transformación sobre placas de agar LB con el antibiótico apropiado para el plásmido (ampicilina ó kanamicina) y se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente se seleccionaron ciertas candidatas y se aislaron en placas de agar LB con el antibiótico necesario.

7.6 Subclonación de los genes *S-sox5* y *Sox17* murinos en pcDNA3

7.6.1 Restricción enzimática

Para subclonar el gen *S-sox5* se restringió el vector pJET1.2-*Sox5* y el vector pcDNA3 con las enzimas HindIII y BamHI de la siguiente manera: se incubaron 5 µg de plásmido (5 µl), 2 µl del Buffer 2 10X (NEB), 1 µl de la enzima HindIII (NEB), 1 µl de la enzima BamHI (NEB) y 11 µl de agua miliQ libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 20 µl. En el caso del gen *Sox 17* se siguió la misma metodología cambiando la enzima BamHI por XhoI. Posteriormente se incubó durante 2 h a 37°C y finalmente se inactivaron las enzimas llevando la reacción a una temperatura de 80°C durante 15 min. Una vez inactivado se corrió la reacción en un gel de agarosa de 1.5%. En seguida se seleccionaron las bandas de interés *S-sox5* (~1200 pb), *Sox17* (~1300 pb) y pcDNA3 (~5400 pb) y se purificaron mediante el kit comercial *Wizard*® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA).

7.6.2 Ligación de los genes en pcDNA3

Una vez obtenidos los fragmentos de interés se ligaron en una relación de 1:3 del vector pcDNA3 contra el inserto de la siguiente forma: 3 μ l de Buffer de ligasa 10X, 1 μ l de enzima T4 DNA ligasa (NEB), 5 μ l de plásmido pcDNA3, 15 μ l de inserto y 6 μ l de agua miliQ libre de nucleasas para llevarlo a un volumen final de 30 μ l. Posteriormente se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se transformó el producto de la reacción en bacterias DH5 α competentes y se sembraron en una placa de agar LB con kanamicina. Al día siguiente se resembraron las candidatas obtenidas en una nueva placa de agar LB con kanamicina.

7.7 Secuenciación del DNA

Para la secuenciación se utilizó el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems. Se mezcló 1 μ g del plásmido a secuenciar, 4 μ l de Buffer de Secuenciación 5X, 4 μ l del Mix de reacción, 20 pM de oligonucleótidos y se llevó a un volumen final de 20 μ l. Se emplearon diferentes oligonucleótidos para cada secuenciación (Tabla 3). Las condiciones del programa que se siguieron fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	2 min
30	96°C	30 seg
	55°C	40 seg
	60°C	4 min
1	60°C	2 min
1	4°C	∞

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para secuenciar.

Oligonucleótidos	Secuencia del Oligonucleótido (5'→3')
Sox5AltFwd	CCCAAGCTTATGGCAGCTGCTGCTGCAGCAACAC
Sox5Rev	CGCGGATCCTCAGTTGGCTTGTCCCGCAATG
Sox5intern	CAACACTGGAGAGCCTGACTCAG
Sox17Fwd	CCCAAGCTTATGAGCAGCCCGGATGCG
Sox17Rev	CCGCTCGAGTCAAATGTCGGGGTAGTTGCAATAG
Sox17intern	CAAGCAGGTGAAGCGCATGAAG
CMVforward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGHreverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

7.8 Cultivos celulares

Dado que no existe una línea celular que se encuentre en el estadio de espermátidas a partir del cual se expresa el gen *Catsper1*, se utilizaron la línea celulares MSC1 (Células de Sertoli de ratón) las cuales son células somáticas de testículo de la cepa de ratón BALB/c que han sido inmortalizadas por transfección con el antígeno T pequeño y largo del virus SV40 y la línea celular GC1-spg las cuales son células espermátogénicas tipo B inmortalizadas por transfección con el vector pSV3-neo (un plásmido que contiene la secuencia del antígeno T largo del virus SV40), la cual pertenece al 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 utilizadas fueron previamente esterilizadas por filtración con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro o por autoclave. El medio para el cultivo celular fue el Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) que se manipula en condiciones de esterilidad dentro de la campana, y se suplementa con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y antibióticos Penicilina-Estreptomicina al 1%. Las células se mantienen en la incubadora a 37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂.

7.9 Pase celular

Se eliminó el medio de cultivo de las cajas con células de cultivos adherentes y se lavó con PBS. Se adicionaron 2 ml de tripsina y se incubó 2 min a 37°C hasta que se observó que las células se despegaron. Posteriormente se adicionaron 2 ml de medio DMEM suplementado, se cosecharon las células, se pusieron en un tubo falcon y se centrifugaron 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM suplementado y se tomaron 10 µl de la suspensión de células para cuantificarlas en la cámara de Neubauer. Un pequeño número de las células se sembraron en una nueva caja.

7.10 Congelación de las líneas celulares

Para congelar las líneas celulares, primero se despegaron siguiendo el procedimiento previamente mencionado, se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min y se decantó todo el medio posible. Posteriormente se resuspendieron en 1 ml de suero fetal bovino (SFB) y se tomaron 100 µl para dar un pase celular, mientras que al resto de las células se les agregó 100 µl de DMSO, se resuspendieron y se guardaron en criotubos. Se congelaron las células lentamente, primero poniéndolas en hielo, posteriormente en hielo seco (-20°C), luego se llevaron al Revco (-70°C) y finalmente se conservaron en nitrógeno líquido.

7.11 Transfección transitoria de líneas celulares MSC1 y GC1-spg

La transfección de las construcciones del promotor del gen *Catsper1* murino y la cotransfección de los plásmidos con los genes de los factores de transcripción se realizaron con el compuesto Turbofect (Fermentas) para la línea celular MSC1 y el compuesto K2 transfection reagent (Biontex) para la línea celular GC1-spg. Se utilizaron los plásmidos pGL3-Basic y pGL3-CMV como control de expresión transcripcional basal y positivo de los experimentos, respectivamente. Adicionalmente, se utilizó como control interno el plásmido pRL-CMV que posee

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

como gen reportero la luciferasa de *Renilla reniformis*, en cada ensayo de transfección. Los plásmidos fueron introducidos en las células, y la actividad observada para las construcciones pGL3 fue normalizada en función de la actividad de la luciferasa de *Renilla*, minimizando la variabilidad experimental causada por diferencias en viabilidad celular o eficiencia de transfección (Tabla 4).

Tabla 4. Plásmidos usados en los ensayos de transfección.

Plásmido	Origen del inserto	Gen reportero
pCatsper800	Amplificación, promotor <i>Catsper1</i> murino	<i>Photinius pyralis</i> (luciferasa)
pCatsper800AS	Amplificación, promotor <i>Catsper1</i> murino	
pCatsper1200	Amplificación, promotor <i>Catsper1</i> murino	
pCatsper1200AS	Amplificación, promotor <i>Catsper1</i> murino	
pGL3-Basic (Control de expresión basal)	Sin promotor	
pGL3-CMV (Control positivo)	Amplificación, promotor de CMV	
pRL-CMV (Control-Eficiencia de transfección)	Amplificación, promotor de CMV	<i>Renilla reniformis</i> (Luciferasa)

Se sembraron células MSC1 y GC1-spg (1×10^5 células/pozo) en placas de 24 pozos. La transfección se realizó 24 horas después, asegurándose de que cada pozo tuviese una confluencia celular entre 70-80%. Se preparó el complejo DNA-Turbofect (MSC1) o DNA-K2 (GC1) en un tubo estéril usando la máxima cantidad de DNA permitida por los reactivos, 1 μ g y 500 ng, respectivamente (Tablas 5 y 6). En el caso del sistema K2 las células fueron sensibilizadas 2 horas antes de la transfección con el reactivo K2 Multiplier (2 μ l/pozo).

Tabla 5. Transfección con las construcciones problema del promotor de *Catsper1* murino y cotransfecciones con los plásmidos con los genes de los factores transcripcionales en células MSC1.

	Transfección	Control positivo	Control basal	Cotransfección	Control positivo	Control basal
Plásmido con promotor de <i>Catsper1</i>	500 ng	-	-	500 ng	-	-
Factor S-sox5, Sox9 ó Sox17	-	-	-	500 ng	500 ng	500 ng
DNA degradado de salmón	500 ng	975 ng	500 ng	-	475 ng	-
Control interno (pRL-CMV)	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng
pGL3-CMV	-	25 ng	-	-	25 ng	-
pGL3-Basic	-	-	500 ng	-	-	500 ng
Turbofect	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Medio DMEM sin suplementar	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl
Total DNA	1µg	1µg	1µg	1µg	1µg	1µg

Tabla 6. Transfección con las construcciones problema del promotor de *Catsper1* murino y cotransfecciones con los plásmidos con los genes de los factores transcripcionales en células GC1-spg.

	Transfección	Control positivo	Control basal	Cotransfección	Control positivo	Control basal
Plásmido con promotor de <i>Catsper1</i>	250 ng	-	-	250 ng	-	-
Factor S-sox5, Sox9 ó Sox17	-	-	-	250 ng	250 ng	250 ng
DNA degradado de salmón	250 ng	475 ng	250 ng	-	225 ng	-
Control interno (pRL-CMV)	0.2 ng	0.2 ng	0.2 ng	0.2 ng	0.2 ng	0.2 ng
pGL3-CMV	-	25 ng	-	-	25 ng	-
pGL3-Basic	-	-	250 ng	-	-	250 ng
K2 Transfection reagent	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Medio DMEM sin suplementar	Llevar a 60 µl	Llevar a 60 µl	Llevar a 60 µl	Llevar a 60 µl	Llevar a 60 µl	Llevar a 60 µl
Total DNA	0.5 µg	0.5 µg	0.5 µg	0.5 µg	0.5 µg	0.5 µg

Las mezclas se dejaron reposando 20 min a temperatura ambiente y se adicionaron lentamente en cada pozo, y agitaron suavemente. Las placas se incubaron durante 48 h, para posteriormente obtener los extractos proteicos.

7.12 Ensayo de luciferasa DUAL

La actividad de luciferasa de los genes reporteros se cuantificó en los extractos proteicos en un sistema de ensayo Dual-Luciferase Reporter Assay (PROMEGA) para producir quimioluminiscencia la cual fue cuantificada en el luminómetro Fluoroskan Ascent FL. El término 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 100 µl de PBS 1X, en seguida se aspiró el PBS y se incubaron las células con 100 µl de Passive Lysis Buffer durante 15 min a temperatura ambiente. Se recolectaron los sobrenadantes, se terminaron de lisar mediante lisis mecánica con la pipeta y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min para separar los restos celulares.

Las actividades de luciferasa se cuantificaron secuencialmente debido a la naturaleza del protocolo; primero se cuantificó la luciferasa de *Photinus pyralis* (luciérnaga) y posteriormente la de *Renilla reniformis* (pensamiento del mar) en la misma muestra.

Las muestras se leyeron en el luminómetro Fluoroskan Ascent de la siguiente forma: Se adicionaron 20 µl del reactivo LARII en los pozos (placas de 96 pozos) donde se fuese a cuantificar. Posteriormente, se añadieron 20 µl del lisado celular y se midió la actividad de la luciferasa *Photinus* para lo cual se colocó la placa en el luminómetro y se realizó una cinética de la reacción tomando el punto más alto. En seguida se añadió el reactivo Stop and Glo el cual detuvo la reacción de la luciferasa de *Photinus* e inició la reacción para la luciferasa de *Renilla* en el mismo pozo, la cual también se cuantificó.

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

7.13 Detección de la expresión de S-sox5, Sox9 y Sox17

7.13.1 Extracción de proteína y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Se crecieron las células MSC1 (4×10^5 células/pozo) en placas de 6 pozos y fueron transfectadas a las 24 horas con 4 μ g del factor de transcripción problema. A las 48 horas se extrajo la proteína total aspirando el medio del pozo, se lavaron 3 veces con PBS 1X. Las células y se recolectaron centrifugando a 2500 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente se le añadió al pellet 100 μ l de RIPA con PSMF 1mM y se incubó 30 min en hielo. A continuación se lisaron las células haciéndolas pasar por una aguja de insulina estéril, se centrifugó a 13,500 rpm 30 min 4°C, se recolectó el sobrenadante en un tubo estéril y la proteína se cuantificó por el método de Bradford.

Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, se calentaron las muestras a 95°C con Buffer Laemmli por 10 minutos e inmediatamente se pusieron en hielo, se cargaron en el gel de acrilamida 5 μ g de proteína por pozo. Se corrió el gel a 0.02 Amperes constantes tanto para el gel separador como para el concentrador.

7.13.2 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

La transferencia de proteínas de un gel SDS-PAGE se realizó en un sistema semi húmedo. Se utilizó una membrana de PVDF, la cual se trató con metanol durante 1 min, en seguida se hidrató con el buffer de transferencia durante 30 min. En la cámara de transferencia se colocaron papeles Whatman 3MM y esponjas húmedas con buffer de transferencia, se colocó la membrana de 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 otra esponja humedecida con buffer de transferencia. Se colocó el soporte de transferencia y la transferencia se realizó a voltaje constante (25V)

durante 1 hora. Una vez finalizada, se desmontó el “sándwich” y la transferencia de las proteínas a la membrana se comprobó con rojo de Ponceau; una vez comprobado esto, se lavó la membrana con TBST 1X para quitar los restos de colorante.

La membrana se bloqueó con Buffer TBST 1X al 5% de leche durante 2 h en agitación constante. En seguida se lavó la membrana 5 veces con TBST 1X durante 5 min por cada lavado para retirar el exceso de leche. Se añadió el anticuerpo primario diluido en TBST 1X: S-sox5 (Genetex) dilución 1:1,000; Sox9 (Santa Cruz) dilución 1:1,000; Sox17 (Santa Cruz) 1:1,000 al 2% de leche y β -actina (Santa Cruz) 1:1,000 al 2% de leche. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente se lavó la membrana 5 veces con Buffer TBST 1X por 5 minutos cada vez en agitación constante. En seguida se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en TBST 1X: S-sox5 anti rabbit IgG-HRP dilución 1:25,000; Sox9 anti rabbit IgG-HRP dilución 1:25000; Sox17 anti goat IgG-HRP 1:10,000 en 2% de leche y β -actina anti rabbit 1:25,000. Se incubó toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó 6 veces la membrana con Buffer TBST 1X durante 5 min cada una. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

7.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6 para Windows. Para encontrar diferencias estadísticas en cada experimento se usaron las pruebas *t-student* tomando una desviación estándar no homogénea. Se consideró como diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al siguiente código: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$

8. RESULTADOS

8.1 Análisis *in silico* del promotor bidireccional de *Catsper1* murino

Para realizar el análisis *in silico* del promotor del gen *Catsper1* murino se seleccionó la secuencia del plásmido pCatsper1215 que había sido clonada previamente (Mata Rocha, 2013) y contiene el promotor putativo de mayor longitud (Figura 14).

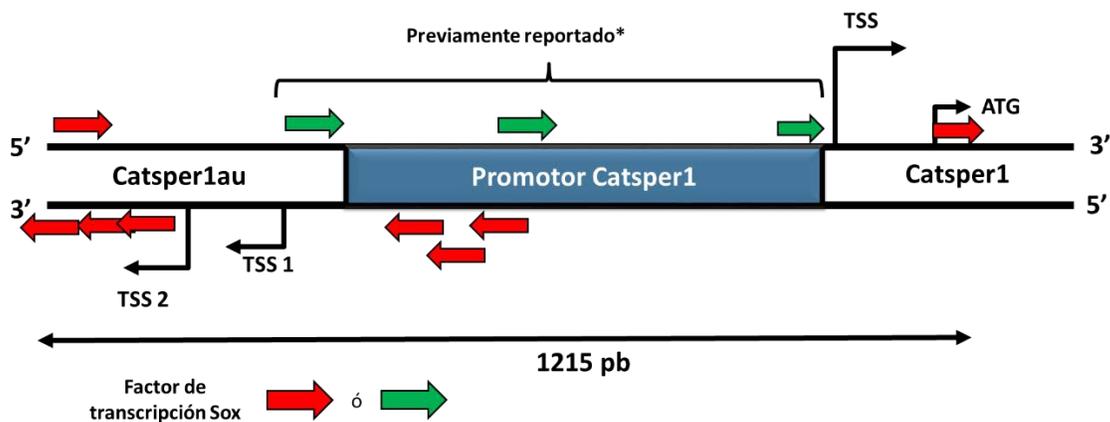


Figura 14. Análisis *in silico* del promotor de *Catsper1* murino. Se tomaron 1215 pb río arriba del gen *Catsper1* murino y se analizaron con los programas descritos en la metodología. Posteriormente se determinaron por consenso los sitios de unión a factores transcripcionales con mayor score. En verde se encuentran los sitios Sox previamente reportados, en rojo se encuentran nuevos sitios Sox ya sea en dirección a *Catsper1* o a *Catsper1au*. También se muestran los sitios de inicio transcripcional del gen *Catsper1au*.

Se encontraron 5 sitios de unión a los factores de transcripción Sox en dirección al gen *Catsper1* murino, de los cuales 3 ya se encontraban previamente reportados (Mata, Rocha *et al*, 2013) mientras que en la cadena antisentido, en dirección al lncRNA *Catsper1au* se encontraron 6 sitios de unión a los factores de transcripción Sox (Tabla 7).

Tabla 7. Sitios de unión a factores Sox. Se muestran los sitios de unión a factores Sox encontrados mediante el análisis *in silico*.

Familia de factor de transcripción	Sentido	Secuencia reconocida	Cadena
Sox5/9	AACAAT	CTATTGCTGA	Antisentido
Sox5/9	AACAAT	CTAACACTGC	Sentido
Sox5/9	AACAAT	CAAAAAATGT	Sentido
Sox5/9	AACAAT	TCATTGTGTA	Antisentido
Sox5/9	AACAAT	TTTACAATAA	Sentido
Sox5/9	AACAAT	TATTTGTTTG	Antisentido
Sox5/9	AACAAT	GTTTTGTTTT	Antisentido
Sox5/9	AACAAT	CAATAGTTCT	Antisentido
Sox5/9	AACAAT	GACACAATAG	Sentido
Sox17	AACAAAG	AACAAAG	Antisentido

8.2 Clonación de los genes *S-sox5* y *Sox17* murinos

La estrategia para clonar los factores de transcripción Sox fue obtener el RNA total de testículo de ratón, ya que en este tejido es donde se encuentran las isoformas específicas de estos factores (Kiselak *et al.*, 2010; Kanai *et al.*, 2010), y a partir del RNA total se sintetizó cDNA. Posteriormente se realizó una PCR de los genes con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) (Figuras 15 y 16), los cuales tenían sitios de restricción específicos para darle direccionalidad a los genes. En el caso del gen *S-sox5* se utilizaron los sitios de restricción HindIII y BamHI, mientras que en el caso del gen *Sox17* se utilizaron los sitios de restricción HindIII y XhoI. (Tabla 2).

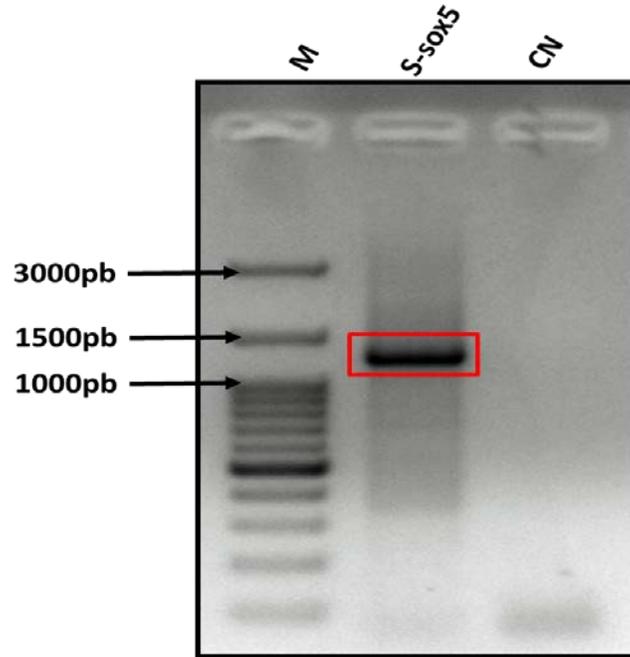


Figura 15. PCR del gen S-sox5 murino. Se observó el producto de PCR del gen S-sox5 murino en un gel de agarosa al 1.5%. La banda esperada del gen tiene un tamaño de 1197 pares de bases.

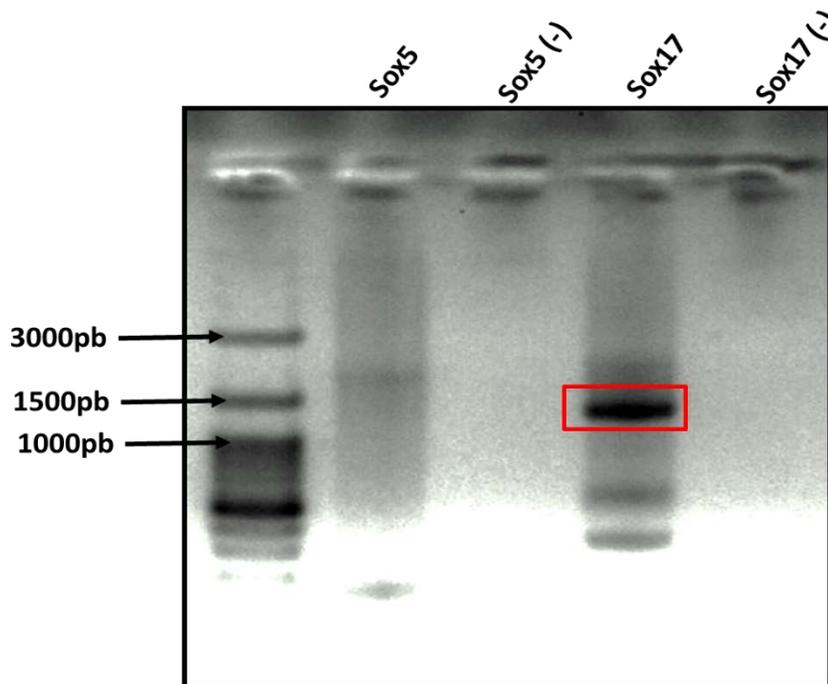


Figura 16. PCR del gen Sox17 murino. Se observó el producto de PCR del gen Sox17 murino en un gel de agarosa al 1.5%. La banda esperada del gen tiene un tamaño de 1278 pares de bases.

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR de ambos genes, se clonaron en el vector de transición pJET1.2 blunt, se transformaron en bacterias DH5 α competentes y se comprobó su clonación mediante una Colony PCR. (Figura 17 y 18)

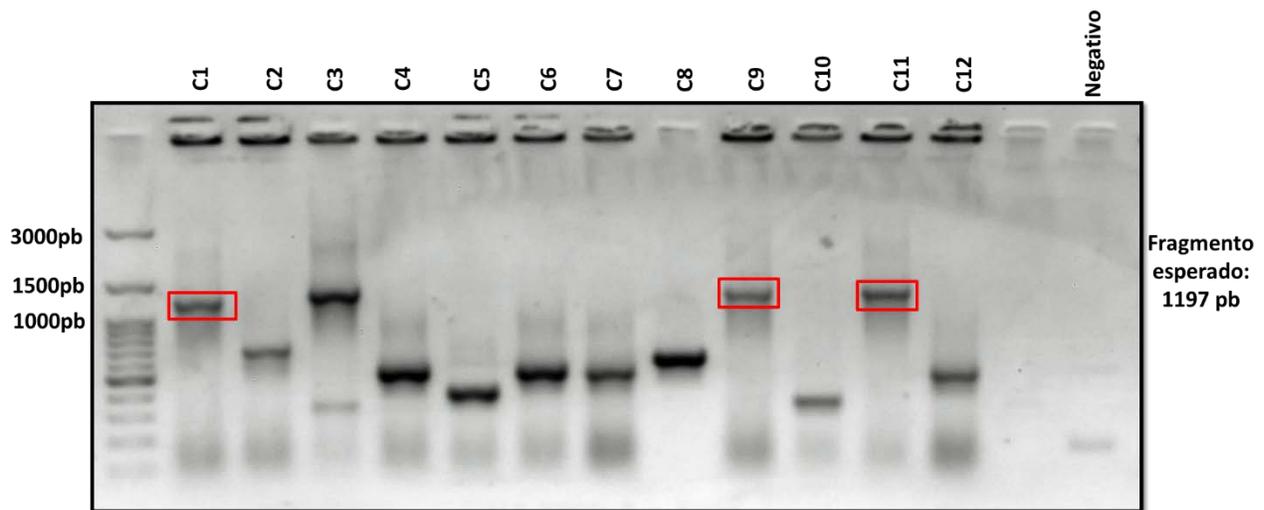


Figura 17. Colony PCR del gen S-sox5 murino. Se tomaron 12 colonias candidatas a partir de las cuales se realizó una Colony PCR y se seleccionaron aquellas que tenían el fragmento esperado de 1197 pb, en este caso las candidatas 1, 9 y 11.

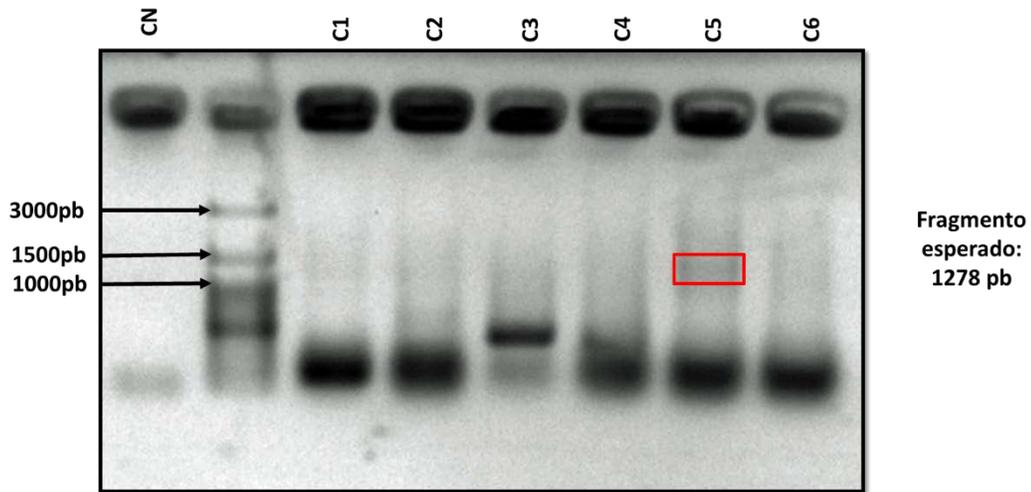


Figura 18. Colony PCR del gen Sox17 murino. Se tomaron 6 colonias candidatas a partir de las cuales se realizó una Colony PCR y se seleccionó aquella que tenía el fragmento esperado de 1278 pb, en este caso únicamente la candidata 5 contenía ese fragmento.

Debido a la dificultad que se tuvo para amplificar el gen *Sox17* mediante Colony PCR, también se comprobó que el producto de PCR estuviese clonado mediante una restricción del fragmento con las enzimas *HindIII* y *XhoI* para ver que liberara el fragmento de 1278 pb y una PCR con los oligos específicos del gen *Sox17*. (Figura 19)

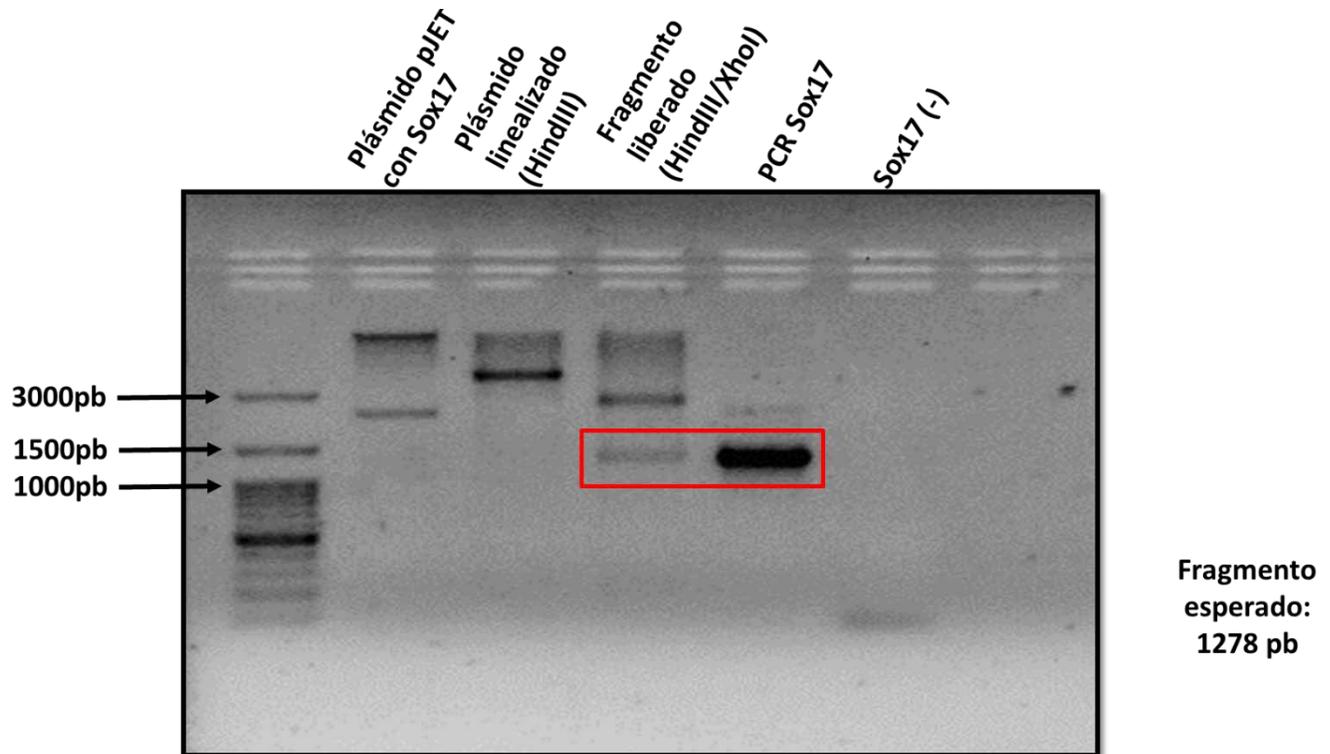


Figura 19. Comprobación de la candidata pJET1.2-Sox17. El fragmento de 1278 pb con el gen *Sox17* se liberó mediante restricción enzimática con las enzimas HindIII y XhoI (Carril 4). Al mismo tiempo se verificó que el gen estuviese clonado mediante PCR utilizando los oligos específicos del gen *Sox17*. (Carril 5)

Posteriormente se realizó una Miniprep con un kit comercial (PROMEGA) y se realizó la subclonación de los genes *S-sox5* y *Sox17* murinos en el vector de expresión pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific) mediante la restricción del vector y los genes con las enzimas de restricción específicas, en el caso de *S-sox5* con las enzimas HindIII-BamHI y en el caso del gen *Sox17* con las enzimas HindIII-XhoI. (Figura 20)

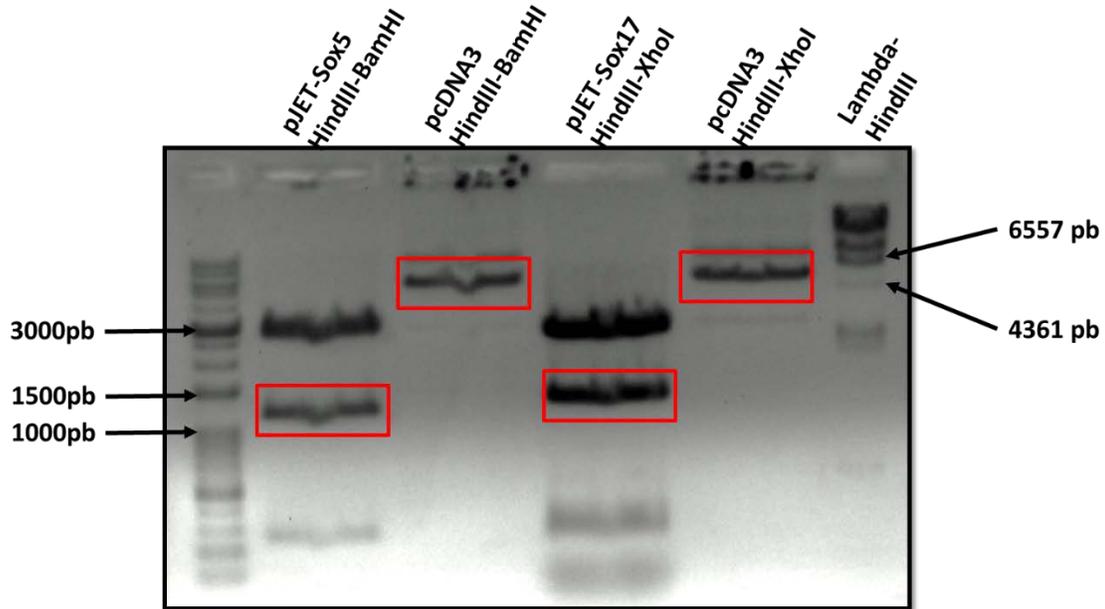


Figura 20. Restricción enzimática del vector pcDNA3 y Pjet's. Se observa en el carril 2 el fragmento del gen *S-sox5* encerrado en un rectángulo rojo de 1197 pb, los fragmentos del vector pcDNA3 de un tamaño de ~5400 pb (carriles 3 y 5) restringidos con las enzimas apropiadas y el fragmento del gen *Sox17* en el carril 4 encerrado en un rectángulo del tamaño de 1278 pb en un gel de agarosa de 0.8%.

Posteriormente se seleccionaron las bandas y se purificaron mediante el kit comercial de purificación de bandas (PROMEGA) y se realizó una ligación con la enzima T4 DNA ligasa en una relación de 1:3 del plásmido pcDNA3 con respecto al inserto. En seguida se transformó el producto de la ligación en bacterias DH5 α competentes y se comprobó la construcción mediante restricción enzimática (Figura 21 y 22) y secuenciación automática (Figura 23 y 24)

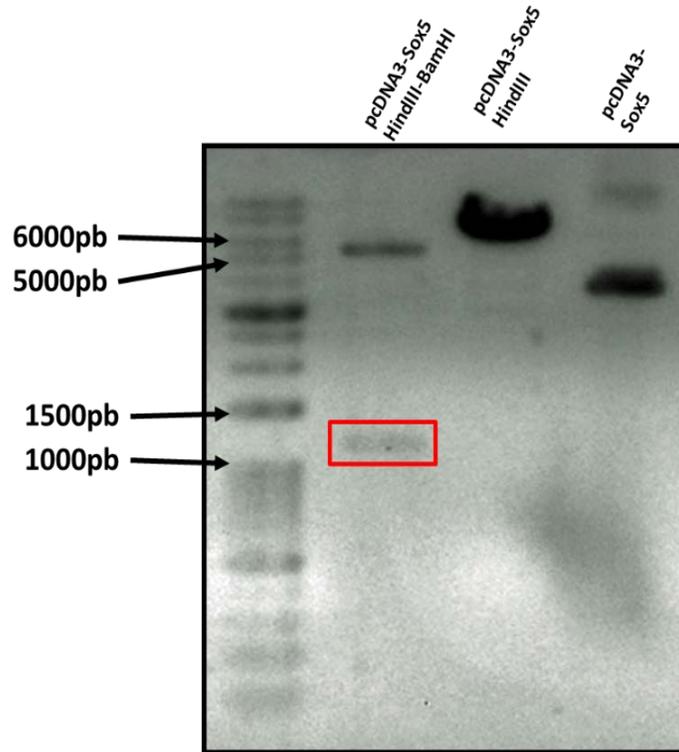


Figura 21. Restricción enzimática de la construcción pcDNA3-S-sox5. Se comprobó la construcción mediante la liberación del fragmento de 1197 pb (marcado en un rectángulo rojo) con las enzimas HindIII-BamHI (carril 2), así como mediante la linealización de la construcción con la enzima HindIII (carril 3) de aproximadamente 6600 pb.

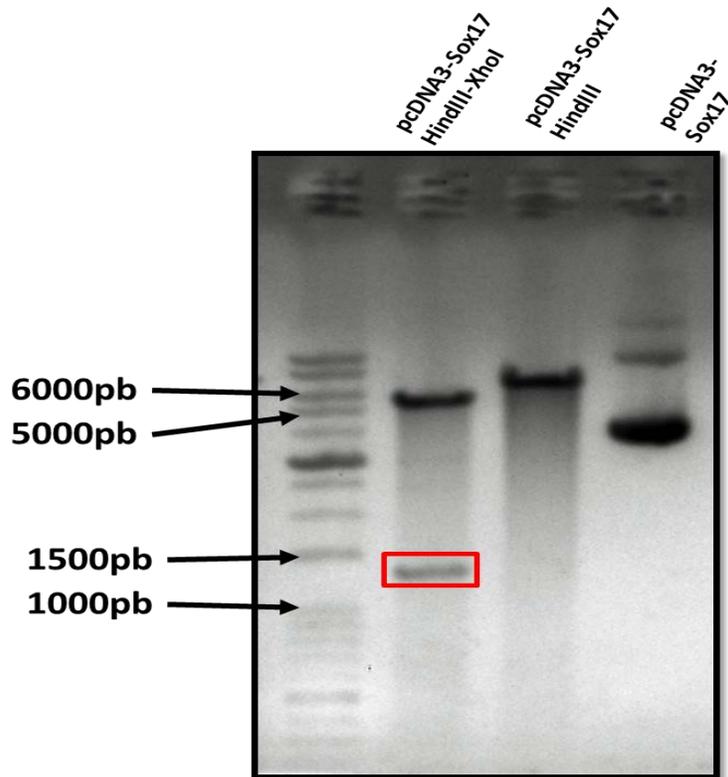


Figura 22. Restricción enzimática de la construcción pcDNA3-Sox17. Se comprobó la construcción mediante la liberación del fragmento de 1278 pb (marcado en un rectángulo rojo) con las enzimas HindIII-XhoI (carril 2), así como mediante la linealización de la construcción con la enzima HindIII (carril 3) de aproximadamente 6700 pb.

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

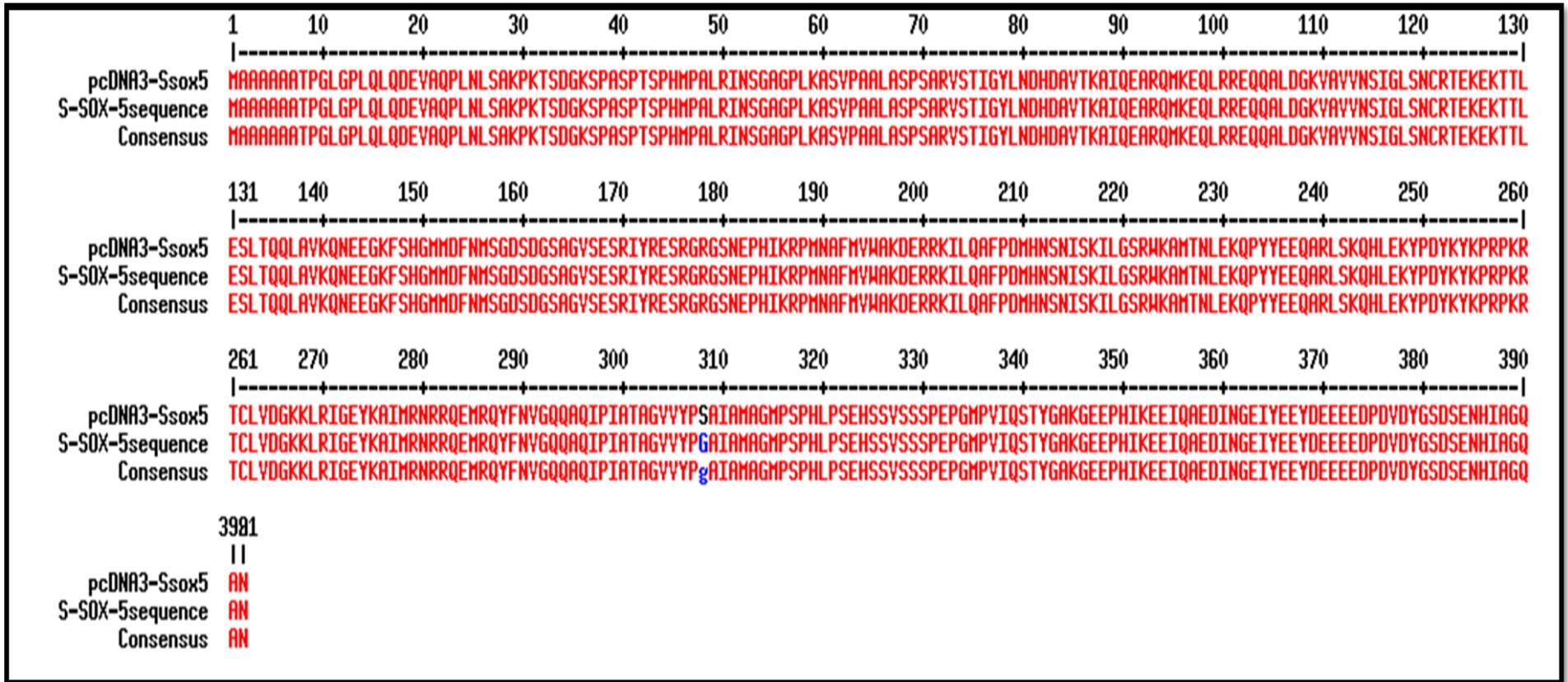


Figura 23. Comparación a nivel de aminoácidos del vector pcDNA3-Ssox5 con la secuencia del gen S-sox5 murino. Se realizó una secuenciación automática del vector pcDNA3-Ssox5, y se alinearon las secuencias aminoacídicas para ver las diferencias existentes entre la secuencia del gen y la de la construcción. Se puede observar que sólo existe una única diferencia en el aminoácido 308 (G→S) el cual es reportado como un conflicto en la secuencia debido a la cepa del ratón (CD1).

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

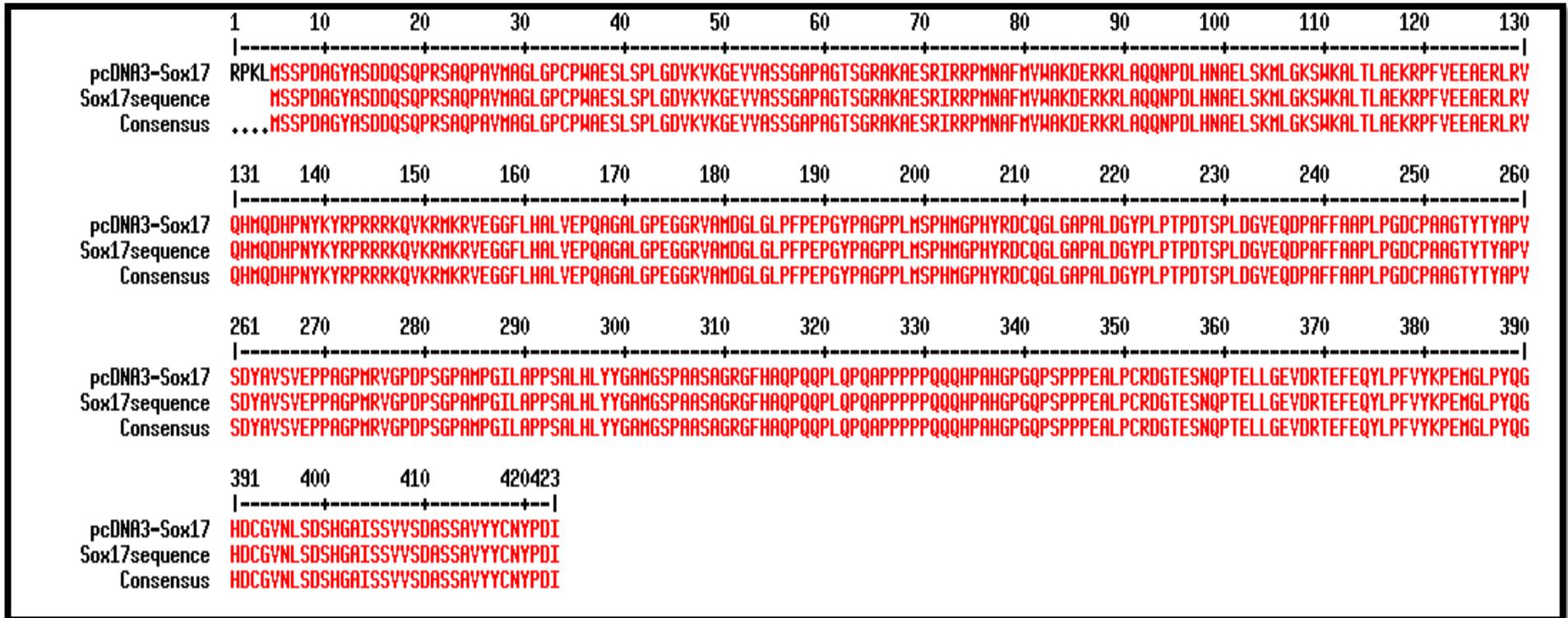


Figura 24. Comparación a nivel de aminoácidos del vector pcDNA3-Sox17 con la secuencia del gen Sox17 murino. Se realizó una secuenciación automática del vector pcDNA3-Sox17, se alineó y se comparó a nivel de aminoácidos las diferencias existentes entre la secuencia del gen y la de la construcción. Se puede observar que no existen cambios.

8.3 Expresión endógena y sobreexpresión de los factores transcripcionales S-sox5 y Sox17

Antes de realizar los ensayos de transfección y cotransfección fue necesario hacer el análisis de la expresión de los factores transcripcionales S-sox5 y Sox17 murinos endógenos, así como su expresión en células transfectadas con las construcciones pcDNA3-S-sox5 y pcDNA3-Sox17. El análisis se hizo en células MSC1 sin transfectar y transfectadas con los plásmidos previamente mencionados. Se realizó la extracción de proteína total, la cual se utilizó para ver la presencia de los factores de transcripción mediante Western blot. Se utilizó la proteína β -actina con un peso de 42 kDa como un control de carga. Se pudo observar que los factores Sox5 y Sox7 se sobreexpresan en las células transfectadas con las construcciones correspondientes (Figura 25).

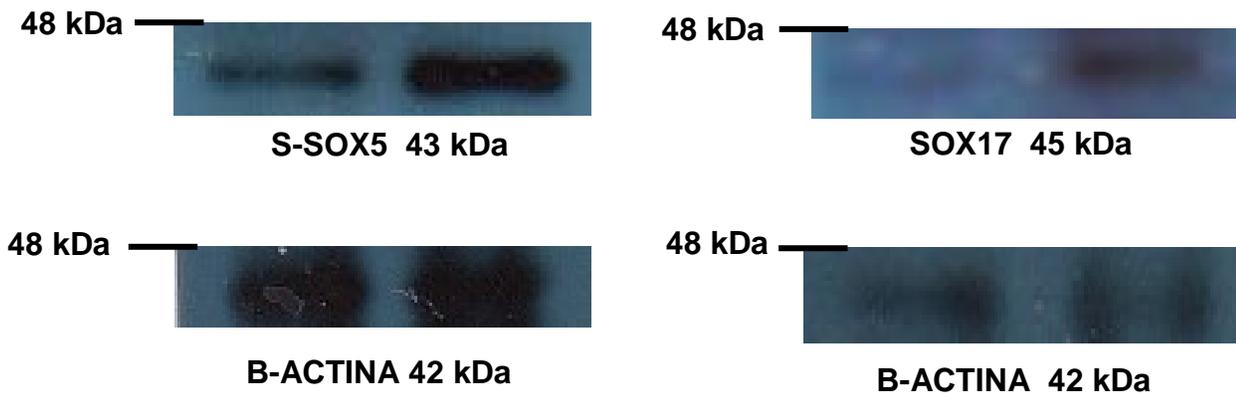


Figura 25. Sobreexpresión de los factores de transcripción S-sox5 y Sox17 en la línea celular MSC1.

8.4 Actividad transcripcional bidireccional del promotor de *Catsper1* murino

8.4.1 Actividad transcripcional basal bidireccional del promotor de *Catsper1* murino en células MSC1 y GC1-spg

La actividad basal de las construcciones portadoras del promotor de 800 y 1200 pb tanto en sentido (hacia el gen *Catsper1* murino) como en antisentido (hacia el nuevo gen *Catsper1au*) se determinaron mediante el ensayo de luciferasa dual descrito en la metodología en células MSC1 y GC1-spg transfectadas transitoriamente con las construcciones mencionadas.

La actividad transcripcional de la luciferasa de *Photinus pyralis* obtenida para cada una de las construcciones empleadas fue normalizada con el control interno de luciferasa de *Renilla reniformis*. La actividad transcripcional basal del plásmido pGL3-Basic fue considerada como una unidad relativa de luciferasa.

En el caso de la línea celular MSC1 se observó un incremento en la actividad transcripcional de aproximadamente 2 veces tanto en la construcción de 800 pb en sentido como en antisentido, sin embargo donde hubo una mayor actividad transcripcional fue en la construcción de 1200 pb en sentido, lo cual sugiere que en esa región de 400 pb existe una secuencia a la cual se está uniendo un factor de transcripción expresado en la línea MSC1 el cual incrementa la actividad transcripcional hasta 7 veces más. Por otra parte, en la construcción de 1200 pb en antisentido se observa que en esa misma región de 400 pb existe una zona de represión para la actividad transcripcional hacia el gen *Catsper1au* ya que su actividad disminuye a la mitad en comparación con el vector pGL3-Basic (Figura 26).

En el caso de la línea celular GC1-spg el comportamiento cambió un poco en las construcciones en sentido, ya que la construcción de 800 pb en sentido presentó

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

una disminución de la actividad transcripcional de más de la mitad. Mientras que la construcción de 1200 pb en sentido disminuyó su actividad en comparación con las MSC1 a una actividad estadísticamente nula. En cambio, las construcciones en antisentido (tanto la de 800 como la de 1200 pb) tuvieron una actividad muy similar en ambas líneas celulares (Figura 27).

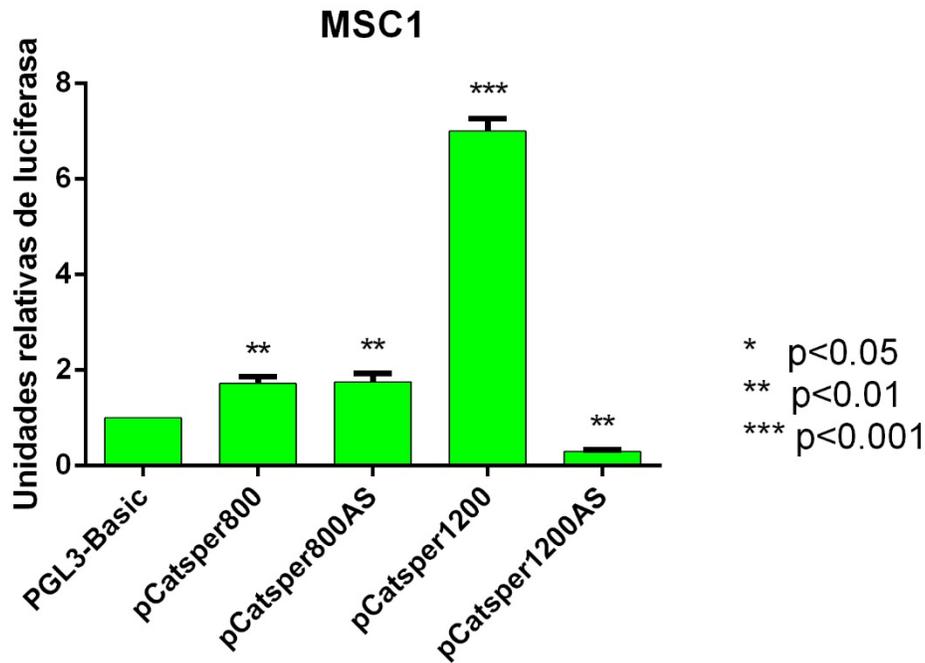


Figura 26. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor *Catsper1* murino en la línea celular MSC1. Las células MSC1 se transfectaron con las construcciones con el promotor de *Catsper1* murino. Los valores indican la media \pm S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (*, p<0.05; **, p<0.01 y ***, p<0.001).

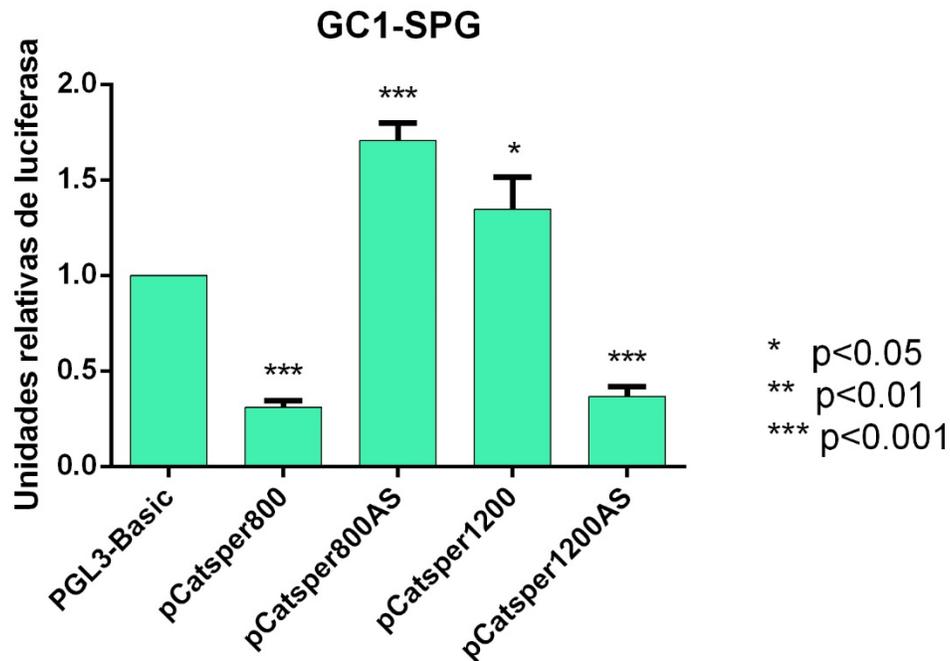


Figura 27. Actividad transcripcional basal de las construcciones del promotor *Catsper1* murino en la línea celular GC1-spg. Las células GC1-spg se transfectaron con las construcciones con el promotor de *Catsper1* murino. Los valores indican la media \pm S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ y ***, $p<0.001$).

Para determinar si los factores transcripcionales S-sox5, Sox9 y Sox17, regulan los genes *Catsper1* o *Catsper1au* murinos, las construcciones con los genes de estos factores se cotransfectaron en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg.

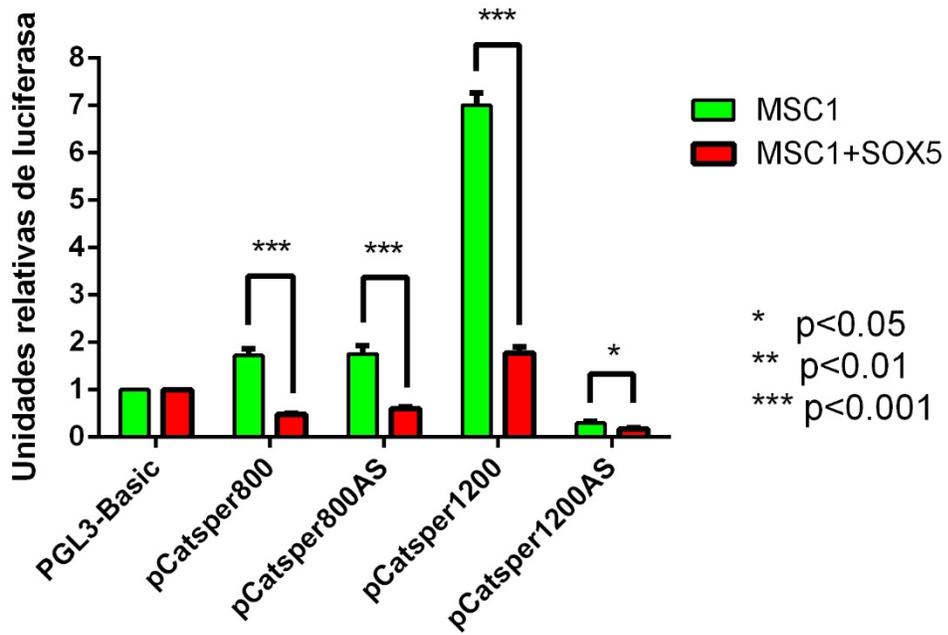
8.4.2 La actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* es inhibida en ambos sentidos por el factor transcripcional S-sox5 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg

Una vez comprobado que los vectores donde se clonaron los factores transcripcionales permiten su sobreexpresión, se procedió a realizar los ensayos de cotransfección de la construcción pcDNA3-Ssox5 con las construcciones del promotor de *Catsper1* murino para analizar si el factor de transcripción S-sox5 es capaz de regular la expresión del mismo.

Se observó que en la línea celular MSC1 el factor transcripcional S-sox5 es capaz de regular de forma negativa la actividad transcripcional, ya que la actividad de luciferasa se redujo drásticamente en todas las construcciones del promotor de *Catsper1* mucho más de la mitad, dejando a las construcciones de 800 en sentido y antisentido en aproximadamente 0.5 veces comparado con el control pGL3-Basic, mientras que la construcción de 1200 pb en sentido la cual tenía una actividad basal 7 veces mayor que el control, se redujo a aproximadamente 2 veces en presencia de S-sox5.

Por otra parte, en la línea celular GC1-spg el factor S-sox5 inhibía únicamente las construcciones de 800 pb en antisentido y la de 1200 pb de sentido, sin embargo, ésta última podría no tener algún cambio notable debido a la desviación estándar tan gran que tiene su expresión basal. Las construcciones de 800 pb en sentido y 1200 pb en antisentido no sufrieron algún cambio considerable (Figura 28).

A)



B)

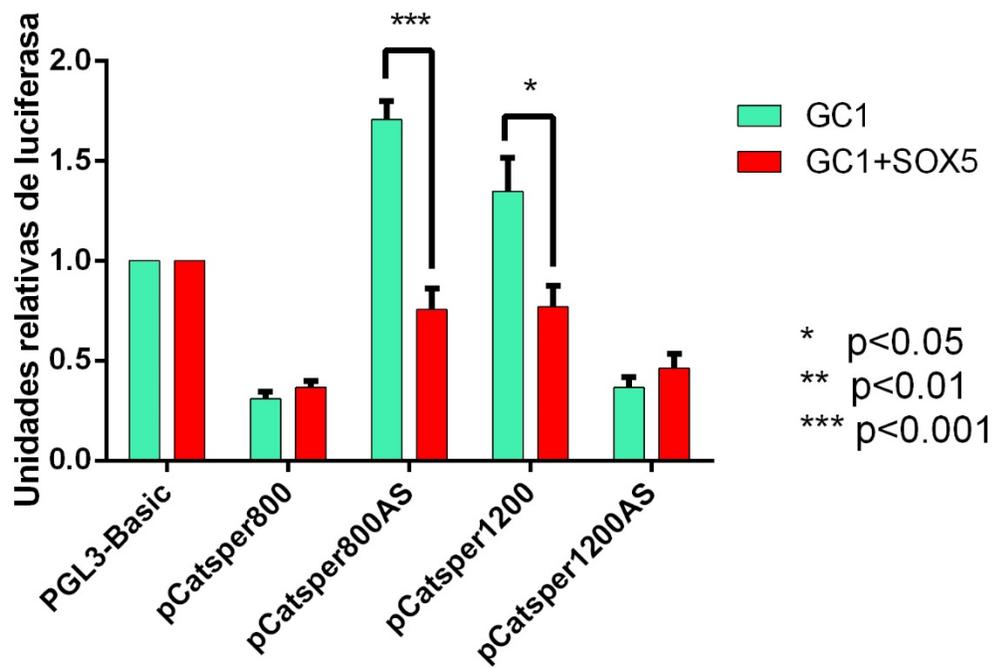


Figura 28. El factor S-sox5 inhibe la actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* murino en ambos sentidos en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg.

Se realizó una cotransfección de las construcciones pCatsper y con la construcción pcDNA3-S-sox5 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg. Los resultados fueron graficados como número de veces la actividad de luciferasa de pGL3-Basic basal. **A)** Línea celular MSC1. **B)** Línea celular GC1-spg. Los valores indican la media \pm S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas comparando la actividad basal de cada construcción contra las cotransfecciones con el factor transcripcional S-sox5.

8.4.3 La actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* es activada por el factor transcripcional Sox9 en la línea celular MSC1

La sobreexpresión del factor Sox9 ya había sido comprobada previamente (Mata Rocha, tesis de doctorado) por lo que se procedió a realizar los ensayos de cotransfección del vector pCMV-Sport6-Sox9 (Invitrogen) con las construcciones del promotor de *Catsper1* murino para analizar si el factor Sox9 es capaz de regular la expresión del mismo.

Se observó que la sobreexpresión de Sox9 incrementó de gran manera la actividad transcripcional de las 4 construcciones utilizadas en la línea celular MSC1, siendo las más importantes la construcción de 800 pb en antisentido donde se incrementó hasta 7 veces más en comparación con la expresión basal de dicha construcción. Así mismo la construcción de 1200 pb en sentido incrementó hasta 3.7 veces más que la actividad basal de esa misma construcción. Las construcciones de 800 pb y 1200 pb en antisentido tuvieron un incremento menor de aproximadamente 3 veces en comparación con su respectiva actividad basal (Figura 29).

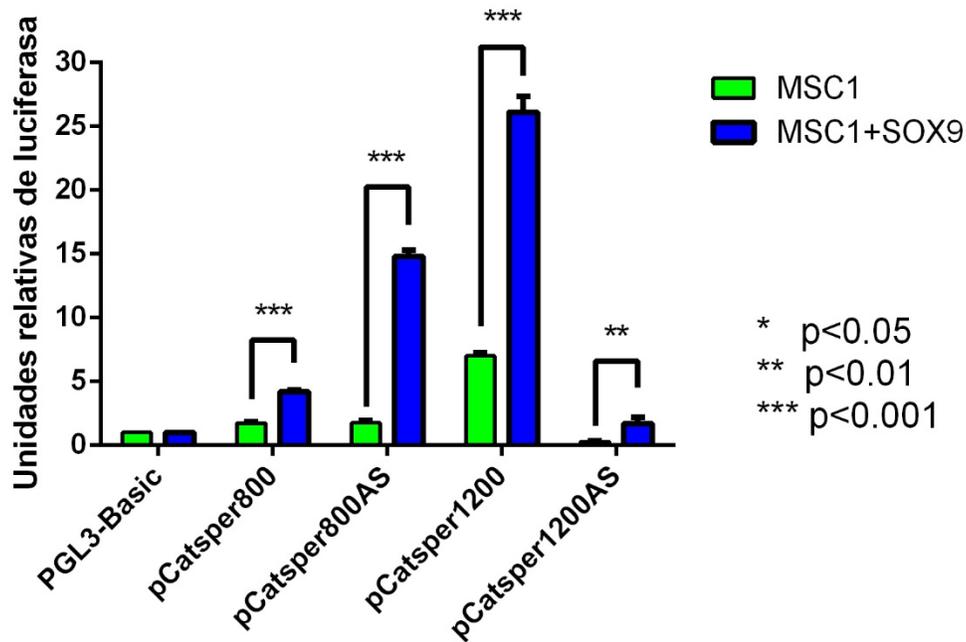


Figura 29. El factor Sox9 incrementa la actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* murino en ambos sentidos en la línea celular MSC1. Se realizó una cotransfección de las construcciones pCatsper y con la construcción pCMV-Sport6-Sox9 en la línea celular MSC1. Los resultados fueron graficados como número de veces la actividad de luciferasa de pGL3-Basic basal. Los valores indican la media \pm S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas comparando la actividad basal de cada construcción contra las cotransfecciones con el factor transcripcional Sox9.

8.4.4 Únicamente la actividad transcripcional del promotor en sentido (*Catsper1*) es activado por el factor transcripcional Sox9 en la línea celular GC1-spg

Al igual que en la línea celular MSC1, se realizaron ensayo de cotransfección con las 4 construcciones pCatsper y la construcción pCMV-Sport6-Sox9 para sobreexpresar el factor transcripcional Sox9 en la línea celular GC1-spg.

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

En esta línea se observó que Sox9 sólo incrementaba la actividad transcripcional de las construcciones en sentido, siendo la más importante la construcción de 1200 pb en sentido donde se incrementó 2 veces más en comparación con la expresión basal de dicha construcción. De igual forma la construcción de 800 pb en sentido tuvo un incremento casi imperceptible de 1.2 veces más que la actividad basal de esa misma construcción. Las construcciones de 800 y 1200 pb en antisentido no tuvieron ningún cambio significativo con la sobreexpresión del factor Sox9 (Figura 30).

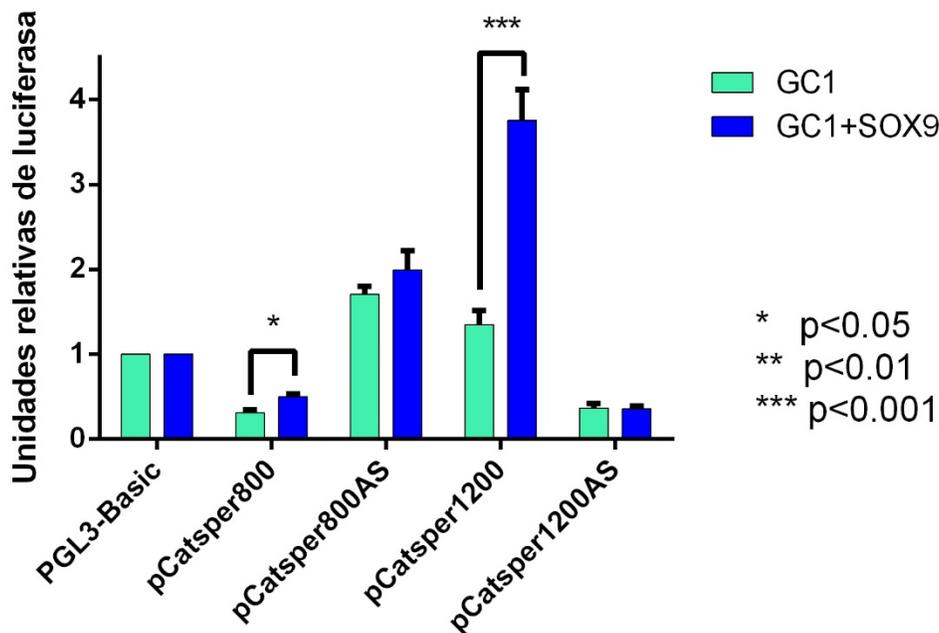


Figura 30. El factor Sox9 incrementa la actividad transcripcional únicamente en sentido al gen *Catsper1* murino del promotor de dicho gen en la línea celular GC1-spg. Se realizó una cotransfección de las construcciones pCatsper y con la construcción pCMV-Sport6-Sox9 en la línea celular GC1-spg. Los resultados fueron graficados como número de veces la actividad de luciferasa de pGL3-Basic basal. Los valores indican la media \pm S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas comparando la actividad basal de cada construcción contra las cotransfecciones con el factor transcripcional Sox9.

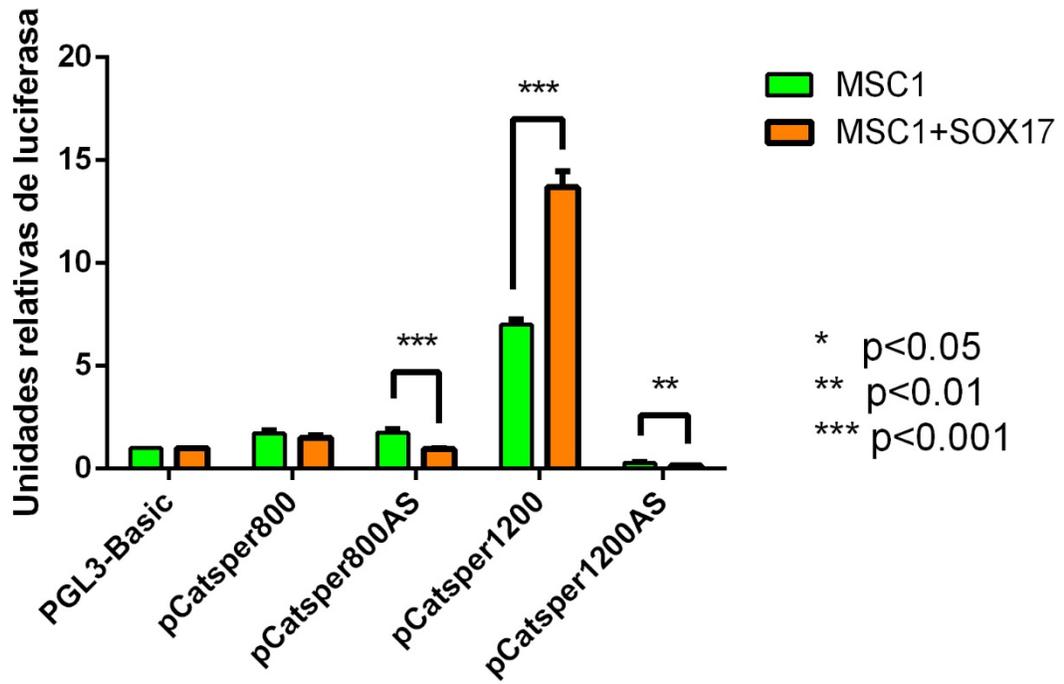
8.4.5 La actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* es activada en sentido mientras en antisentido (*Catsper1au*) es reprimida por el factor transcripcional Sox17 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg

Se realizaron ensayos de cotransfección de la construcción pcDNA3-Sox17 junto con las 4 construcciones pCatsper para analizar si el factor Sox17 es capaz de regular la expresión del promotor de *Catsper1* murino.

De forma interesante la sobreexpresión del factor Sox17 incrementó la actividad transcripcional de las construcciones de 800 y 1200 pb en sentido siendo mayor el incremento en la línea celular MSC1 (de 6 a 14 unidades relativas de luciferasa) mientras que en la línea celular GC1-spg el incremento fue de 1.5 a 3.2 unidades relativas de luciferasa. Sorprendentemente, hubo una disminución de aproximadamente la mitad en la actividad transcripcional de las construcciones de 800 y 1200 pb en antisentido en ambas líneas celulares (Figura 31).

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”

A)



B)

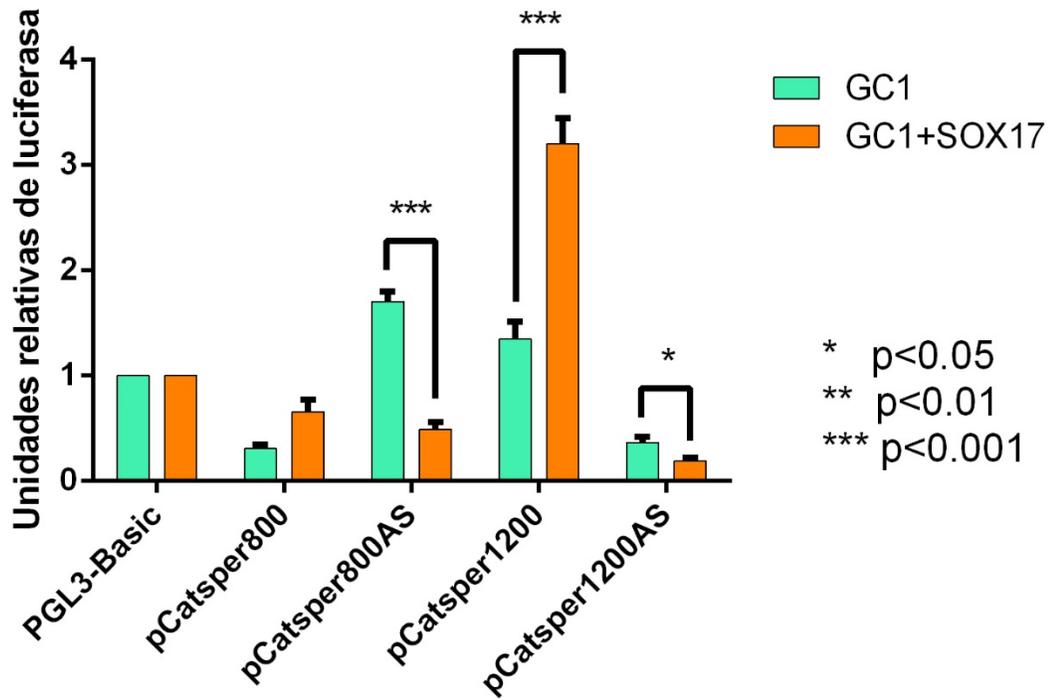


Figura 31. El factor Sox17 incrementa la actividad transcripcional del promotor en sentido (*Catsper1*) y la inhibe en antisentido (*Catsper1au*) en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg. Se realizó una cotransfección de las construcciones pCatsper y con la construcción pcDNA3-Sox17 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg. Los resultados fueron graficados como número de veces la actividad de luciferasa de pGL3-Basic basal. **A)** Línea celular MSC1. **B)** Línea celular GC1-spg. Los valores indican la media \pm S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n=3) y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas comparando la actividad basal de cada construcción contra las cotransfecciones con el factor transcripcional Sox17.

9. DISCUSIÓN

Catsper1 es un gen que se expresa exclusivamente en el espermatozoide y codifica una proteína perteneciente a un canal de calcio. Este gen se localiza en la pieza principal del flagelo del espermatozoide y es requerido para la hiperactivación de la motilidad del espermatozoide (Ren *et al.*, 2001). Mutaciones en este gen se han relacionado con la infertilidad masculina (Avenarius *et al.*, 2009) y para comprender mejor su regulación transcripcional se ha realizado el análisis *in silico* del promotor del gen *Catsper1* murino, así como estudios experimentales para determinar sitios importantes para su regulación transcripcional, encontrándose que es regulado por los factores de transcripción Sox5 y Sox9 (Mata Rocha *et al.*, 2013). Estudios recientes también encontraron que el gen tenía una actividad bidireccional y regulaba la expresión de un nuevo gen que codifica para un RNA largo no codificante denominado *Catsper1au* (Jiménez Badillo, tesis de maestría). Sin embargo, se desconocen los factores que regulan a este nuevo gen y si los factores Sox podrían estar implicados regulando de forma activa tanto a *Catsper1* como a *Catsper1au*.

Para contribuir al entendimiento de la regulación transcripcional de estos genes, en este trabajo, se analizó *in vitro* la actividad transcripcional del promotor bidireccional y se demostró que los factores Sox (específicamente S-sox5, Sox9 y Sox17) contribuyen a la regulación transcripcional de ambos genes. Para ello se realizó la clonación de los factores de transcripción en un plásmido de expresión en eucariontes con el promotor del virus citomegalovirus (CMV). Posteriormente se utilizó un sistema lo más parecido al ambiente celular en donde se expresa *Catsper1* ya que su expresión es exclusiva en testículo durante la meiosis de la espermatogénesis, sin embargo, no se cuenta con una línea celular que alcance los estadios de espermátidas redondas que es donde comienza la expresión de este gen. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la expresión de *Catsper1au* existe tanto en células somáticas de testículo (células de Sertoli) como en células germinales (espermatogonias), por lo que los ensayos de este trabajo se

realizaron en las líneas celulares MSC1 (derivadas de células de Sertoli de ratón) y GC1-spg (derivadas de espermatogonias de ratón), que corresponde a un estado de célula diploide entre espermatogonias tipo B y espermatocito primario de ratón (Hofmann *et al.*, 1992). Estudios previos realizados en GC1-spg con el promotor de *Catsper1* murino mostraron que no había actividad transcripcional hacia el gen *Catsper1* en células GC1-spg además de demostrar que el factor de transcripción Sox9 no se expresaba en esta línea celular (Mata Rocha *et al.*, 2013) debido a que la expresión de este gen se da principalmente en un estado haploide y que probablemente en estas células existan factores aún no reportados que repriman su expresión.

Nuestros estudios sobre la actividad basal de las diversas construcciones del promotor de *Catsper1* murino en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg, indicaron que la activación del promotor se puede estar llevando a cabo por los sitios SOX. Estos sitios tienen como secuencia 5'-AACAAAT-3' y pueden ser reconocidos por múltiples factores Sox, sin embargo existen factores Sox que expresan isoformas específicas de testículo como es el caso de los factores S-sox5 (Li *et al.*, 1998) y Sox17 (Kanai *et al.*, 1996) que podrían tener un papel en dicha regulación. También se ha demostrado la transactivación por el factor Sox9 ya que este factor se expresa en células de Sertoli (MSC1), donde se observa una elevada actividad transcripcional en sentido del promotor *Catsper1* mientras que en las células GC1-spg no hay una expresión del factor Sox9 por lo que no se observa una actividad del mismo promotor. Por otro lado, en ambas líneas celulares (MSC1 y GC1-spg) se observa que la actividad transcripcional en antisentido del promotor del gen *Catsper1* se mantiene activa en la construcción pCatsper800AS a pesar de las diferencias en la expresión del factor Sox9 de las líneas celulares. Sin embargo, en la construcción pCatsper1200AS se observa que la actividad transcripcional en antisentido (*Catsper1au*) se inhibe por completo, lo que podría significar que en ese fragmento de 400 pb existe una secuencia o una zona de represión a la cual se pudiera estar uniendo un factor de represión que inhiba la actividad transcripcional.

Los factores Sox se unen al DNA en la secuencia consenso 5'-AACAAAT-3', sin embargo existen diferentes variantes las cuales le permiten tener una mayor o menor afinidad. En el caso del factor S-sox5, éste tiene preferencia en el extremo 5' por los nucleótidos T (T/A) y en el extremo 3' por A, mientras que Sox9 tiene preferencia en el extremo 5' por los nucleótidos AG y en el 3' por GG. En el caso de Sox17 es muy similar a la secuencia de Sox9 ya que tiene preferencia en el 5' por los nucleótidos AG y en el 3' por el nucleótido G (Mertin *et al.*, 1999) siendo la única diferencia las células donde se expresan estos factores, ya que el factor Sox17 se expresa en estadios tempranos de la espermatogénesis como lo son las espermatogonias, mientras que el factor Sox9 se expresa en células de Sertoli.

Los experimentos *in vitro* donde se sobreexpresa el factor transcripcional S-sox5 demuestran que es un factor que reconoce y se une a los sitios SOX presentes en el promotor bidireccional de *Catsper1* tanto en la cadena sentido como en la cadena antisentido ya que en ambas líneas celulares la actividad transcripcional de los genes reporteros disminuye hasta casi ser nula. Esto es de esperarse ya que el factor S-sox5 no cuenta con un dominio de transactivación que pueda reclutar a la maquinaria transcripcional, sino que cuenta con el dominio HMG (caja de alta movilidad) el cual le permite unirse al DNA y dos dominios de dimerización, los cuales le permiten unirse a los factores Sox6 y Sox9. Una vez que el factor S-sox5 se une al factor Sox9 tienen un efecto sinérgico en el incremento de la actividad transcripcional del gen *Catsper1* (Mata Rocha *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el factor S-sox5 se encuentra en las gónadas masculinas de ratón encontrando su punto máximo de expresión en espermátidas redondas (Denny *et al.*, 1992) que es también el pico de expresión del gen *Catsper1* por lo que podría tener un papel muy importante realizando un efecto sinérgico con el factor Sox9 uniéndose a los sitios Sox y reclutando al factor Sox9, el cual a su vez se uniría a otros sitios Sox y podría reclutar la maquinaria transcripcional a través de su dominio de transactivación.

En lo que respecta al factor Sox9 se observó que era capaz de unirse a algunos sitios SOX del promotor bidireccional en la cadena sentido (Mata-Rocha *et al.*, 2014)

por lo que es probable que se una a otro sitio SOX en la cadena antisentido. En la línea celular MSC1 Sox9 promovió la actividad transcripcional tanto en sentido (*Catsper1*) como en antisentido (*Catsper1au*) mientras que en la línea GC1-spg la regulación sólo se dio en dirección a *Catsper1* incrementando su actividad transcripcional, lo que concuerda con estudios previos realizados (Mata Rocha *et al.*, 2013). La diferencia en la regulación de la actividad transcripcional entre una línea y otra podría ser debido a la unión de otros factores como es el factor de transcripción ICER (*inducible AMPc early repressor*) en el sitio CRE del promotor de *Catsper1*, el cual es un potente represor de los genes inducibles por AMPc. Sin embargo, la importancia de este factor transcripcional deberá ser estudiada con mayor detalle.

Previamente se ha detectado el factor de transcripción Sox9 en la gónada masculina de ratón adulto, donde se observó su presencia en núcleo de células germinales que se encuentran en división meiótica (espermatocono primario y secundario) y espermátidas redondas (Mata Rocha, tesis de doctorado). La localización nuclear de este factor junto con S-sox5 en los mismos estadios celulares de la espermatogénesis es indispensable para que se ejerza un efecto sinérgico en la regulación de la expresión de *Catsper1* y *Catsper1au*, sin embargo, aún se requieren más estudios que verifiquen la presencia de ambos factores presentes al mismo tiempo en el núcleo de espermátidas, así como del efecto de su regulación en el nuevo gen *Catsper1au*.

Finalmente, se encontró que tanto en las células MSC1 como en las GC1-spg Sox17 incrementaba la actividad transcripcional del gen *Catsper1* mientras que al mismo tiempo inhibe la actividad transcripcional del gen *Catsper1au*. Este factor no contiene dominios de dimerización, por lo que no puede interactuar con otros factores como es el caso del factor S-sox5 y Sox9, sin embargo, contiene la caja HMG la cual le permite unirse al DNA y también contiene un dominio de transactivación el cual le permite reclutar la maquinaria transcripcional y de esta forma iniciar la transcripción. Existen dos isoformas conocidas del factor Sox17, la primera de ellas nombrada solamente Sox17 es la utilizada para este proyecto y

contiene su caja HMG intacta; esta isoforma se ha encontrado expresada en mayor cantidad en espermatogonias, por lo que podría ser que regule la transcripción del mensajero del gen *Catsper1* en esta etapa, sin embargo, aún no se exprese la proteína. Conforme avanza la espermatogénesis la isoforma Sox17 deja de expresarse hasta los espermatocitos y comienza la producción de la segunda isoforma denominada t-Sox17. Esta isoforma contiene una delección parcial de la caja HMG lo cual no le permite funcionar como factor de transcripción. A pesar de que hoy en día aún se desconoce su función, se ha encontrado que la isoforma t-Sox17 se expresa en células de etapas más avanzadas de la espermatogénesis como es el caso de las espermátidas redondas. Sin embargo, t-sox17 no se encuentra en el núcleo sino en el citoplasma de la célula, más específicamente en la periferia donde podría ayudar en los cambios estructurales de las células ya que puede interactuar con la proteína beta catenina (Kanai *et al.*, 1996).

Con base en lo anterior descrito se ha demostrado que los factores de transcripción Sox tienen un papel muy importante no solo en la actividad transcripcional del gen *Catsper1*, sino también en la regulación del nuevo gen *Catsper1au* ya que tienen la capacidad de unirse a los sitios Sox del promotor bidireccional y regular la expresión de dichos genes. Debido a las diferencias de los estadios donde se expresan los diferentes factores Sox puede ser que la expresión de estos genes pueda ser regulada por diferentes factores Sox utilizando los mismos sitios de unión, como es el caso del factor Sox9, cuya secuencia de reconocimiento de mayor afinidad varía solo por un nucleótido con el factor Sox17. Sin embargo, es improbable que estos factores compitan por el sitio de unión ya que se expresan en diferentes estadios de la espermatogénesis. Lo anterior no aplica para los factores S-sox5 y Sox9 que coexisten en el núcleo de las células en el mismo estadio de la espermatogénesis (espermátidas redondas) y se ha demostrado su efecto sinérgico en la regulación del gen *Catsper1* por lo que sería interesante estudiar su cotransfección en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg y observar si de la misma forma se obtiene un efecto sinérgico en la expresión del gen *Catsper1au*.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Los sitios de unión Sox participan en la regulación transcripcional del promotor del gen *Catsper1* tanto en sentido (*Catsper1*) como en antisentido (*Catsper1au*).
- ❖ El factor de transcripción S-sox5 inhibe la actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* murino en ambos sentidos.
- ❖ El factor de transcripción Sox9 incrementa la actividad transcripcional de mayor forma en la construcción de 1200pb en sentido y la construcción de 800pb en antisentido en la línea celular MSC1 mientras que en la línea celular GC1-spg únicamente la construcción de 1200 pb en sentido tuvo un incremento en la actividad transcripcional.
- ❖ El factor de transcripción Sox17 incrementa la actividad transcripcional únicamente en sentido al gen *Catsper1* en la construcción de 1200 pb mientras que inhibe la actividad transcripcional en sentido al gen *Catsper1au* en la construcción de 800 y 1200 pb.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar deleciones del promotor de *Catsper1* murino para encontrar el promotor basal que regula la actividad del gen *Catsper1au*.
- Evaluar la interacción física de los factores transcripcionales S-sox5, Sox9 y Sox17 con los sitios de unión Sox presentes en el promotor bidireccional del gen *Catsper1* murino.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión simultánea de los factores transcripcionales S-sox5, Sox9 y Sox17 en las líneas celulares MSC1 y GC1-spg.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Smith, L. L. H., Kahrizi, K., Smith, R. J. H. (2009). Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *American Journal of Human Genetics*, 84(4), 505–510.
- Batista, P. J., & Chang, H. Y. (2013). Long noncoding RNAs: Cellular address codes in development and disease. *Cell*.
- Burbelo, P. D., Martin, G. R., & Yamada, Y. (1988). Alpha 1(IV) and alpha 2(IV) collagen genes are regulated by a bidirectional promoter and a shared enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9679–82.
- Coriat, A. M., Müller, U., Harry, J. L., Uwanogho, D., & Sharpe, P. T. (1993). PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif. *Genome Research*, 2(3), 218–222.
- Denny, P., Swift, S., Connor, F., & Ashworth, A. (1992). An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein, 1(10), 3705–3712.
- Di Zhang, Zhang, D. I., & Gopalakrishnan, M. (2005). Sperm Ion Channels: Molecular Targets for the Next Generation of Contraceptive Medicines? *Journal of Andrology*, 26(6), 643–653.
- Eddy, E. M., & Recent Prog Horm, R. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Prog. Horm. Res.*, 57, 103–128.
- Fonslow, B. R., Stein, B. D., Webb, K. J., Xu, T., Choi, J., Kyu, S., & Iii, J. R. Y. (2013). NIH Public Access, 10(1), 54–56.
- Hofmann MC, Narisawa S, Hess RA, Millán JL. (1992). Immortalization of Germ Cells and Somatic Testicular Cells Using the SV40 Large T Antigen. *Exp Cell Res* 201 (2):417-35.

- Ikeda, T., Zhang, J., Chano, T., Mabuchi, A., Fukuda, A., Kawaguchi, H., Nakamura, K. and Ikegawa, S. (2002). Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene*, 298(1), pp.59-68.
- Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C. V., Barratt, C. L. R., & Publicover, S. J. (2006). Calcium signalling in human spermatozoa: A specialized “toolkit” of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update*.
- Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Noce, T., Saido, T. C., Shiroishi, T., Hayashi, Y., & Yazaki, K. (1996). Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *Journal of Cell Biology*, 133(3), 667–681.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Davidson, I., & Sassone-Corsi, P. (2004). Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 128(1), 5–12.
- Kiselak, E. A., Shen, X., Song, J., Gude, D. R., Wang, J., Brody, S. L., Zhang, Z. (2010). Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene, sperm-associated antigen 6, by a SRY-related high mobility group transcription factor, S-SOX5. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), 30496–30505.
- Kurihara, M., Shiraishi, A., Satake, H., & Kimura, A. P. (2014). A conserved noncoding sequence can function as a spermatocyte-specific enhancer and a bidirectional promoter for a ubiquitously expressed gene and a testis-specific long noncoding RNA. *Journal of Molecular Biology*, 426(17), 3069–3093.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Méndez, A., Han, Y. and Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(12), pp.2195-2214.
- Lepoivre, C., Belhocine, M., Bergon, A., Griffon, A., Yammine, M., Vanhille, L., Spicuglia, S. (2013). Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators. *BMC Genomics*, 14, 914.
- Li, P., & Crombrughe, B. De. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene, 17(19), 5718–5733.

- Lobley, A., Pierron, V., Reynolds, L., Allen, L., & Michalovich, D. (2003). Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 1, 53.
- Martínez-Morales, P. L., Quiroga, A. C., Barbas, J. a., & Morales, A. V. (2010). SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT-beta-catenin pathway. *EMBO Reports*, 11(6), 466–472.
- Mata-rocha, M., Alvarado-cuevas, E., Hernández-Sánchez, J., Cerecedo, D., Felix, R., Hernández-Reyes, A. Oviedo, N. (2013). Molecular cloning and analysis of the catsper1 gene promoter. *Molecular Human Reproduction*, 19(5), 336–347.
- Mertin, S., Mcdowall, S. G., & Harley, V. R. (1999). The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins, 27(5), 1359–1364.
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell*.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, a C., Hsu, S., Shi, Q. Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603–609.
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 145–166.
- Schuettengruber, B., Doetzlhofer, A., Kroboth, K., Wintersberger, E., & Seiser, C. (2003). Alternate activation of two divergently transcribed mouse genes from a bidirectional promoter is linked to changes in histone modification. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1784–1793.
- Südbek, P., Schmitz, M. L., Baeuerle, P. a., & Scherer, G. (1996). Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nature Genetics*, 13(2), 230–232.
- Trinklein, N. T., Force Aldred, S., Hartman, S. J., Schroeder, D. I., Otilar, R. P., & Myers, R. M. (2004). An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Research*, 14(1), 62–66.

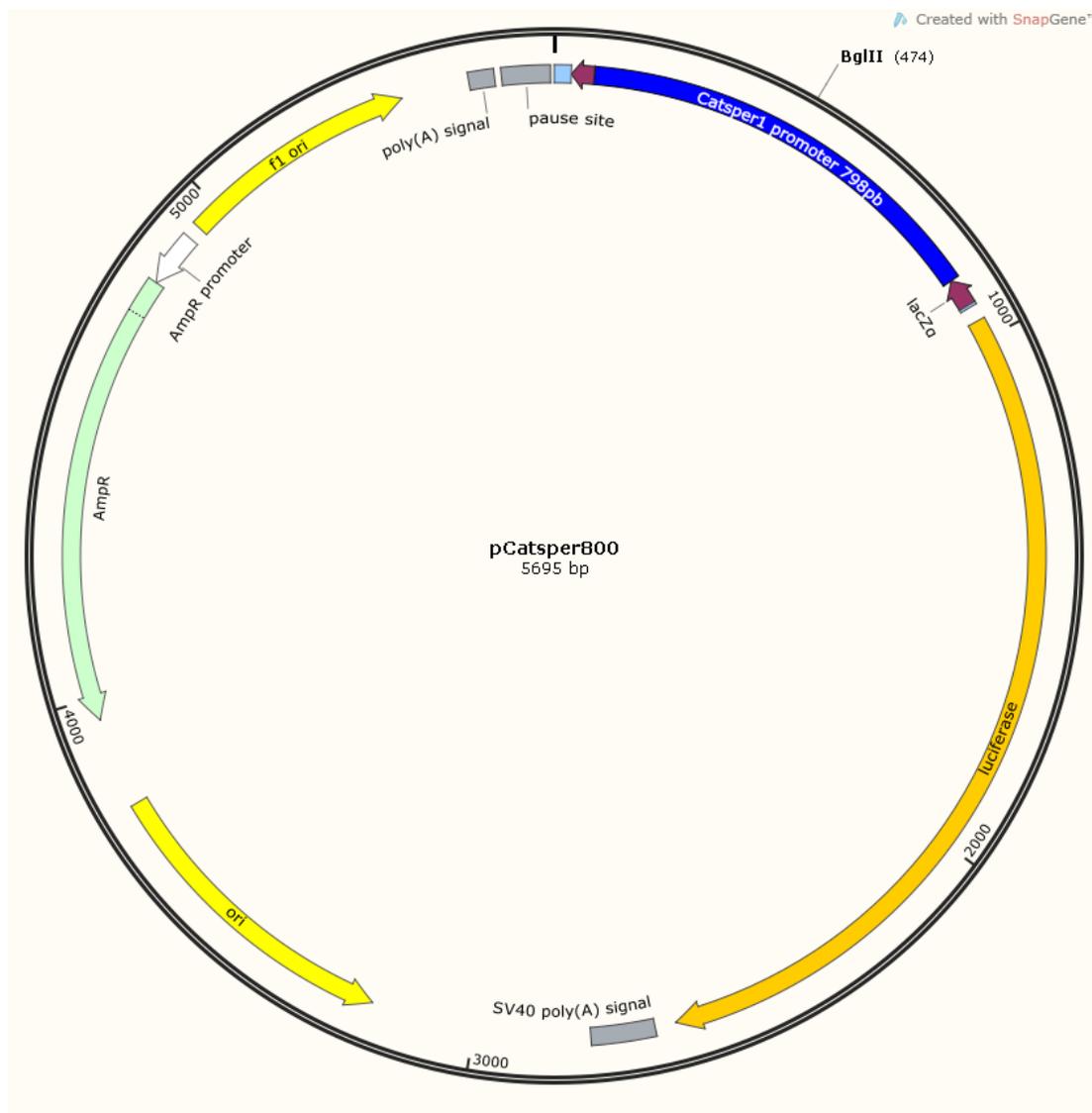
- Wertz, K., & Herrmann, B. G. (2000). Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mechanisms of Development*, 98(1-2), 51–70.
- Wu, P., Zuo, X., Deng, H., Liu, X., Liu, L., & Ji, A. (2013). Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*, 97, 69–80.
- Zalkin, H. and Gavalas, A. (1995). Analysis of the Chicken GPAT/AIRC Bidirectional Promoter for de Novo Purine Nucleotide Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), pp.2403-2410.

13. ANEXOS

Anexo 1. Verificación de las construcciones pCatsper.

Representaciones de las construcciones pCatsper de 800 y 1200 pb en sentido y antisentido realizadas en el programa SnapGene de acuerdo a la descripción de su clonación. Se encuentran señalados los sitios de restricción utilizados para verificar la construcción. En color azul se encuentran las construcciones en sentido y en rojo las antisentido.

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



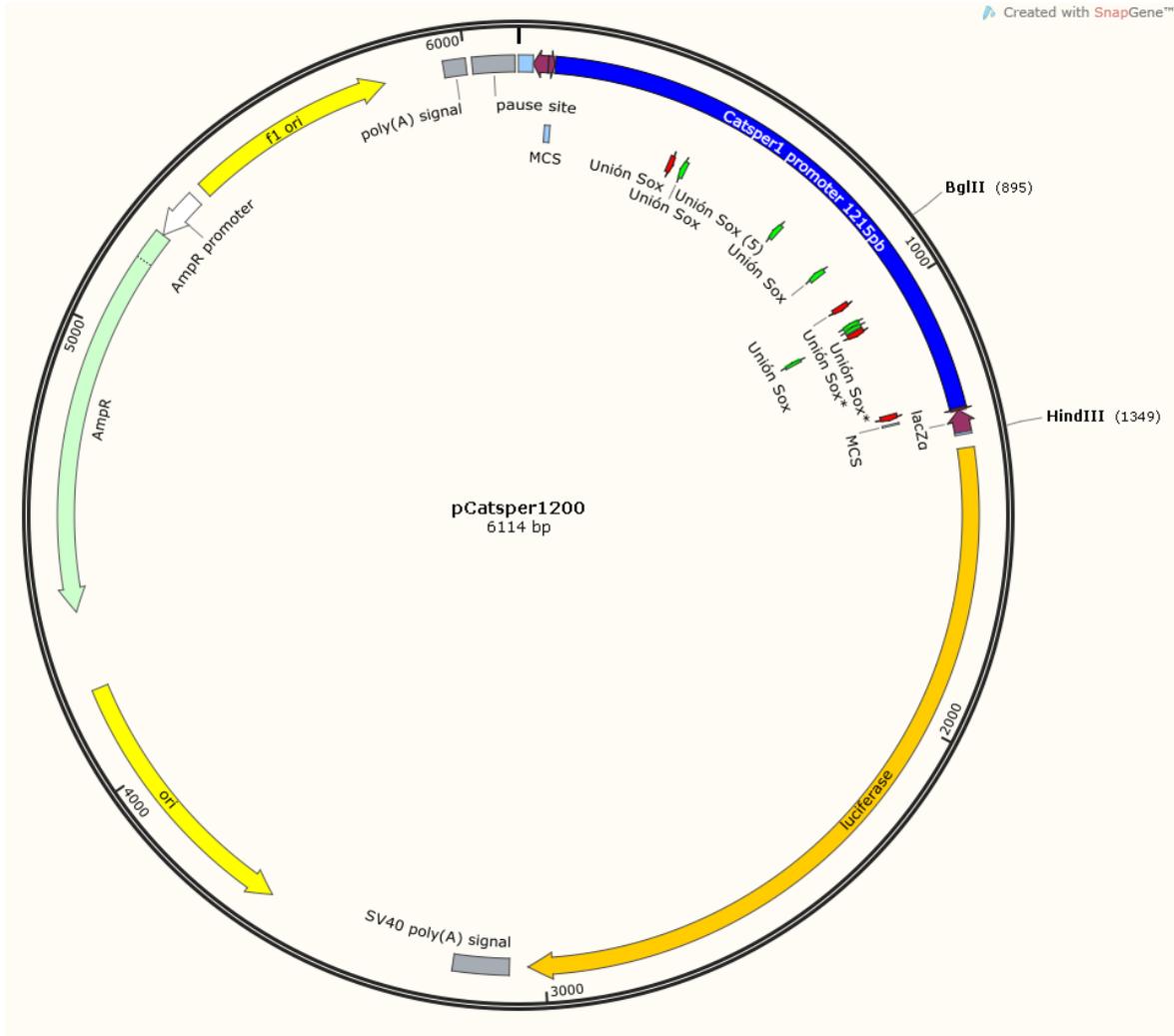
Construcción pCatsper800

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



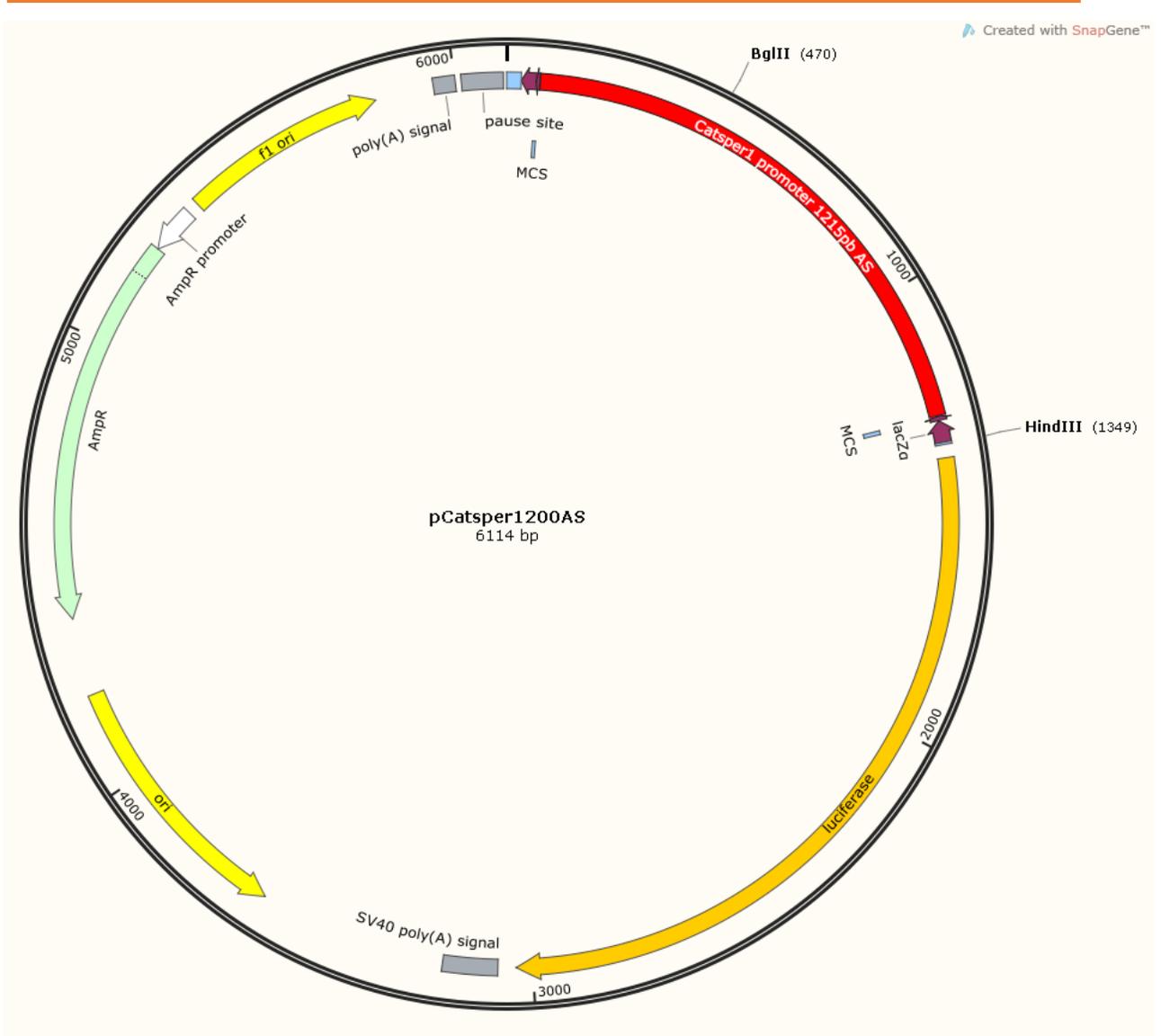
Construcción pCatsper800 AS (antisentido)

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



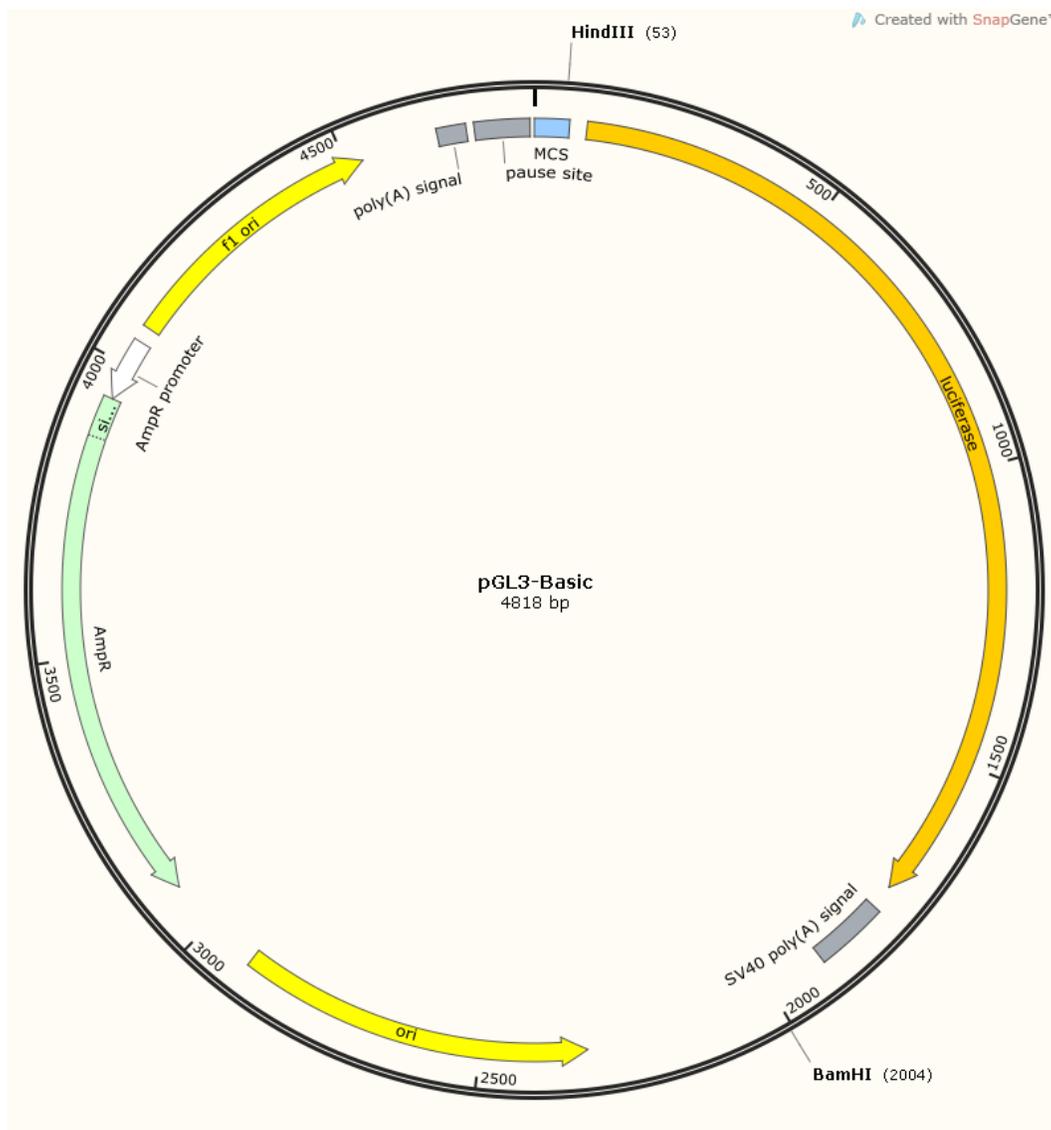
Construcción pCatsper1200

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



Construcción pCatsper1200 AS (antisentido)

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



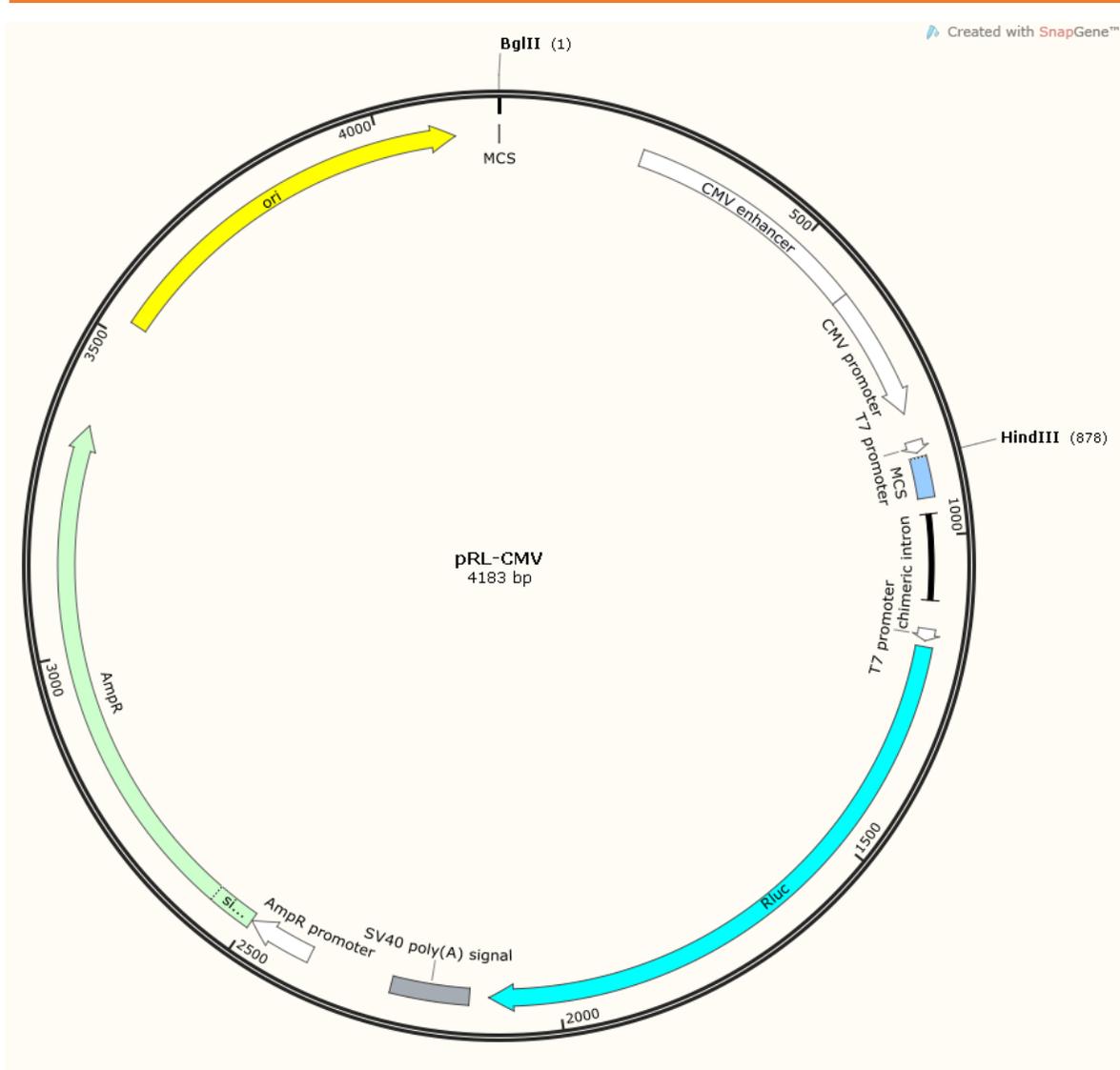
Vector pGL3-Basic

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



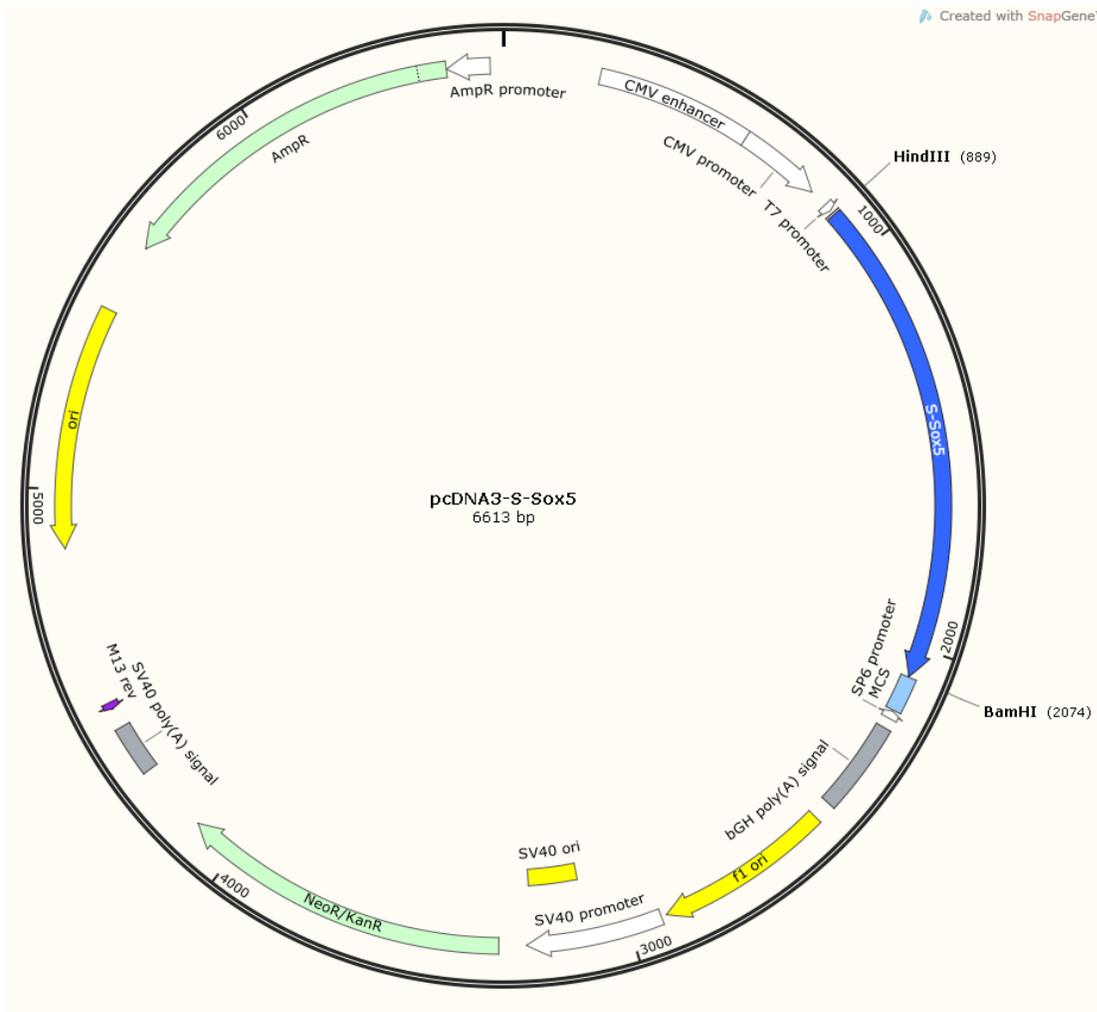
Construcción pGL3-CMV

“Regulación de la actividad transcripcional del promotor bidireccional de *Catsper1* murino por los factores de transcripción Sox.”



Construcción pRL-CMV

Anexo 2. Construcción portadora del gen S-sox5. Se observa el plásmido pcDNA3 con el gen S-sox5 clonado en una representación realizada en el programa SnapGene. Se encuentran marcados los sitios HindIII y BamHI los cuales fueron utilizados para clonar el gen previamente mencionado. El gen S-sox5 y su direccionalidad están representados por la flecha azul.



Anexo 3. Construcción portadora del gen Sox17. Se observa el plásmido pcDNA3 con el gen Sox17 clonado en una representación realizada en el programa SnapGene. Se encuentran marcados los sitios HindIII y XhoI los cuales fueron utilizados para clonar el gen previamente mencionado. El gen Sox17 y su direccionalidad se encuentran representados por la flecha verde.

