



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización estructural del promotor del gen
Catsper2 murino”**

TESIS

Que presenta

ANDREA DEL PILAR CONTRERAS MARCIALES

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director

Dr. Javier Hernández Sánchez

Ciudad de México

AGOSTO, 2018

ASESORES

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dra. Maria de los Angeles Romero Tlalolini

Catedrática CONACYT

Facultad de Medicina y Cirugía

Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca

Agradecimiento a 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.

AGRADECIMIENTOS

- ♥ A mi director de tesis, *Dr. JAVIER HERNÁNDEZ SÁNCHEZ*, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto. Por su dedicación, paciencia, asesorías y todo el tiempo dedicado.
- ♥ A mis asesores, *Dres. LUIS KAMEYAMA* y *ANGELES ROMERO*, gracias por sus conocimientos, asesorías y tiempo dedicado al presente proyecto.
- ♥ A mis padres, *JACKELINE* y *MANUEL*, por ser mi ejemplo de lucha y perseverancia, por brindarme su apoyo y confianza cada vez que quiero volar más lejos.
- ♥ A mis hermanos, *JESÚS* y *FERNANDA*, por sus ocurrencias y locuras que me sacan mil sonrisas.
- ♥ A mi hijo, *DIEGO*, que es mi motivación y mi inspiración más grande para alcanzar mis metas. Este logro es dedicado a ti.
- ♥ A mi *ANGEL*, gracias por acompañarme en este camino, por animarme cada día, por soportar todos mis estados de ánimo, gracias por creer siempre en mí.
- ♥ A *KARINA*, *BRENDA* y *ESTEFANÍA*, por compartir conmigo durante estos dos años, por todos los ánimos y el apoyo que me brindaron durante los cursos de la maestría. Su amistad hizo que este proceso fuera más ameno.
- ♥ A los chicos del Lab6, *LIZ*, *JUAN*, *SALMA*, *CARLOS*, *SERGIO* y *DAVID*, gracias por aguantarme durante todo este tiempo, pero, sobre todo, gracias por sus consejos, sus correcciones y su tiempo en los seminarios.

- ♥ A *GABY*, *PATY* y *LUPITA*, muchas gracias por su amabilidad y por su ayuda, por realizar su trabajo siempre con la mejor disposición y una gran sonrisa.
- ♥ A *DULCE* de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM) del CINVESTAV, por los servicios de secuenciación.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Espermatogénesis	1
1.1.1	Fase mitótica o de proliferación de espermatogonias	2
1.1.2	Fase de Meiosis.....	3
1.1.3	Fase post-meiótica.....	3
1.2	Regulación genética durante la espermatogénesis	4
1.3	Maduración del espermatozoide	5
1.3.1	Capacitación e hiperactivación del espermatozoide.....	6
1.4	Canales iónicos de calcio en el espermatozoide.....	7
1.4.1	Canal CATSPER	7
2	ANTECEDENTES	8
2.1	<i>Catsper2</i>	8
2.1.1	<i>Catsper2</i> es específico de testículo.....	9
2.1.2	<i>Catsper2</i> es el gen de la familia <i>Catsper</i> que se expresa primero.....	10
2.1.3	<i>Catsper2</i> es esencial en la fertilidad masculina.....	11
2.1.4	<i>Catsper2</i> podría regular la expresión de las proteínas CATSPER.....	12
2.2	Regulación de la expresión génica: transcripción.....	12
2.2.1	Análisis de secuencias promotoras.....	13
2.3	Caracterización del promotor de <i>Catsper1</i>	15
2.4	Análisis <i>in silico</i> preliminar del promotor de <i>Catsper2</i> murino	16
3	JUSTIFICACIÓN	17
4	OBJETIVOS	18
4.1	Objetivo General	18
4.2	Objetivos Específicos.....	18
5	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
6	METODOLOGÍA.....	20
6.1	Material biológico	20

6.2	Construcción con la región de 800pb del promotor de <i>Catsper2</i> murino	21
6.3	Clonación en pJET 1.2 Blunt	23
6.3.1	Preparación de bacterias competentes.....	23
6.3.2	Transformación de bacterias	24
6.4	Extracción de DNA plasmídico	24
6.4.1	kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	24
6.4.2	QIAGEN Plasmid Midi Kit	25
6.5	Clonación en pGL4.10	26
6.6	Secuenciación de DNA	26
6.7	Cultivos celulares	27
6.7.1	Transfección de líneas celulares	27
6.7.2	Lisis celular y ensayos de luciferasa.....	29
6.8	Análisis bioinformático.....	30
6.9	Rápida amplificación de los extremos 5' de cDNA (RACE 5').....	30
6.10	Deleciones del promotor de <i>Catsper2</i> murino	32
6.11	Análisis estadístico	33
7	RESULTADOS.....	34
7.1	Obtención de las construcciones con las regiones del promotor de <i>Catsper2</i> murino.....	34
7.2	Análisis de la actividad transcripcional de los promotores putativos de <i>Catsper2</i> murino.....	38
7.3	Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>Catsper2</i> murino	39
7.4	Determinación de sitios alternos de inicio transcripcional.....	41
7.5	Construcciones con deleciones del promotor de <i>Catsper2</i>	43
7.6	Actividad transcripcional de las deleciones del promotor de <i>Catsper2</i> murino	
	45	
8	DISCUSIÓN	47
9	CONCLUSIONES.....	53
10	PERSPECTIVAS.....	54

11	REFERENCIAS.....	54
12	ANEXOS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fases de la espermatogénesis.	4
Figura 2.	Proceso de diferenciación y maduración del espermatozoide.....	6
Figura 3.	Secuencia de aminoácidos de CATSPER2.	9
Figura 4.	<i>Catsper2</i> se expresa únicamente en testículo.....	9
Figura 5.	<i>Catsper2</i> es el primer gen de la familia <i>Catsper</i> que se expresa durante la espermatogénesis.....	10
Figura 6.	Promotores putativos de <i>Catsper1</i> murino.	15
Figura 7.	Actividad promotora de las regiones de 798 pb y 1215pb del promotor de <i>Catsper1</i> murino.	16
Figura 8.	Delimitación del promotor basal de <i>Catsper1</i> murino.	16
Figura 9.	Promotores putativos de <i>Catsper2</i> murino.	17
Figura 10.	Representación gráfica del montaje de un ensayo de transfección de células con las construcciones del promotor de <i>Catsper2</i> por triplicado.	29
Figura 11.	Representación gráfica de un montaje del ensayo de transfección de las líneas celulares MSC-1 y GC-1 spg con las construcciones que contienen delecciones del promotor de <i>Catsper2</i> por triplicado.....	33
Figura 12.	Análisis de la construcción pCat2-1600.	35
Figura 13.	Selección de clonas candidatas con la construcción pCat2-1600AS.	35
Figura 14.	Amplificación de la región promotora de 784pb.....	36
Figura 15.	Análisis de bacterias candidatas transformadas con el plásmido pCat2-800/pJET.....	36
Figura 16.	Selección de bacterias candidatas con las construcciones pCat2-800 y pCat2-800AS.	37

Figura 17. Análisis de las secuenciaciones de las construcciones con la región de 1600pb y 800pb del promotor de <i>Catsper2</i>	38
Figura 18. Actividad transcripcional de los promotores putativos de <i>Catsper2</i>	39
Figura 19. Análisis <i>in silico</i> de las señales de transcripción en el promotor de <i>Catsper2</i> murino.....	40
Figura 20 Análisis <i>in silico</i> de los sitios de unión a factores de transcripción en el promotor de <i>Catsper2</i> murino.....	41
Figura 21. Análisis de RNA de testículo de ratón y síntesis del cDNA de <i>Catsper2</i>	42
Figura 22. Identificación de sitios alternativos de inicio de transcripción por RACE5' . ..	43
Figura 23. Esquema de las deleciones en el extremo 5' y/o 3' del promotor de <i>Catsper2</i> y amplificación de los fragmentos correspondientes.....	44
Figura 24. Selección de colonias candidatas transformadas con las construcciones derivadas de pJET conteniendo las deleciones del promotor de <i>Catsper2</i>	45
Figura 25. Liberación de los fragmentos conteniendo las deleciones del promotor de <i>Catsper2</i>	46
Figura 26. Selección de colonias candidatas transformadas con las construcciones derivadas de pGL4.10 conteniendo las deleciones del promotor de <i>Catsper2</i>	46
Figura 27. Determinación del promotor basal de <i>Catsper2</i> murino.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados en el proyecto	22
Tabla 2. Condiciones para amplificar la región de 800pb del promotor de <i>Catsper2</i>	23
Tabla 3. Componentes de la mezcla de transfección usada en la línea celular MSC-1...	28
Tabla 4. Componentes de la mezcla de transfección usada en la línea celular GC-1 spg28	
Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de PCR usados en la técnica RACE5'	32

RESUMEN

Catsper2 es un gen específico de la espermatogénesis que participa en la formación del canal de calcio CATSPER, el cual es indispensable para la fertilización de un ovocito. Aunque *Catsper2* es el gen de la familia *Catsper* que se expresa primero, se desconocen los mecanismos que regulan su expresión; por lo que este trabajo se enfocó a caracterizar estructuralmente el promotor de *Catsper2* murino. Tomando como referencia un análisis *in silico* previo de la región promotora del gen *Catsper2* murino en el que se encontraron dos promotores putativos, se obtuvieron construcciones con fragmentos de 1600pb y 800pb que contienen dichos promotores y se evaluó su actividad transcripcional mediante transfección en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1 y ensayos de luciferasa. La actividad transcripcional de la región de 800pb del promotor de *Catsper2* fue 11.7 y 100 veces superior que el vector vacío, en las células GC-1spg y MSC-1, respectivamente. En esta región, se realizó la predicción de elementos del promotor basal, encontrando posibles sitios INR (elemento iniciador), DPE (Elemento de promotor río abajo) y MTE (elemento motivo diez); sin embargo, no se encontraron cajas TATA ni CCAAT, por lo que se podría hipotetizar que el promotor de *Catsper2* murino es TATA-less. Asimismo, realizando un consenso de diferentes programas bioinformáticos se ubicaron cuatro posibles sitios de unión a factores de transcripción (TFs) de la familia CREB. Por otro lado, para determinar la presencia de sitios adicionales de inicio de la transcripción de este gen, se empleó la técnica RACE5' (Rápida amplificación de los extremos de cDNA en 5') y se encontró un inicio transcripcional alternativo que sugiere la existencia de un transcrito donde el exón 1 no traducible tiene una longitud de 62pb en lugar de 377pb de acuerdo con el inicio transcripcional reportado. Además, para determinar el promotor basal de *Catsper2*, se obtuvieron diferentes construcciones con deleciones del promotor de 800pb de *Catsper2* murino con base en los sitios putativos CRE predichos *in silico*. La deleción de 280pb en el extremo 5' resultó en un aumento de la actividad transcripcional mientras que la deleción de 440pb en el extremo 5' disminuyó la

actividad en ambas líneas celulares lo que indica la participación de factores represores o activadores en dichas regiones respectivamente. Por otro lado, la delección de 89pb en el extremo 3' ocasionó el aumento de la actividad transcripcional en las células GC-1spg y no tuvo diferencias significativas con el promotor completo en las células MSC-1. Con estos resultados se propone que el promotor mínimo de *Catsper2* murino se encuentra entre los nucleótido -69 a +284, con respecto al inicio transcripcional reportado en bases de datos.

ABSTRACT

Catsper2 is a gene specific for spermatogenesis which participates in the formation of CATSPER calcium channel. This channel is indispensable for spermatozoa hyperactivation and oocyte fecundation. Although *Catsper2* is the first gene expressed from the *Catsper* family, the mechanisms regulating its expression are unknown; therefore, this work focuses on characterizing the murine *Catsper2* promoter structure. Based in a previous *in silico* analysis of the promoter region from the murine *Catsper2* gene, where two putative promoters were predicted, the 1600 bp and 800 bp fragments containing these putative promoters were cloned upstream the luciferase reporter gene and their transcriptional activity was evaluated by transient transfection in GC-1spg and MSC-1 cell lines and luciferase assays. The transcriptional activity from the 800 bp *Catsper2* promoter region was 11.7 and 100 times higher than the empty vector, in GC-1spg and MSC-1 cells, respectively. *In silico* analysis of the 800 bp region indicated the presence of possible INR (initiator element), DPE (downstream promoter element) and MTE (element motif ten) sites; however, no TATA box or CCAAT box were found, so it could be hypothesized that the murine *Catsper2* promoter is TATA-less. In addition, four possible transcription factor (TF) binding sites of the CREB family were located through a consensus using different bioinformatics programs. On the other hand, one transcriptional start site (TSS) was found using the Rapid amplification of the cDNA ends that suggests the existence of a transcript where the non-translatable exon 1 has a length of 62 bp instead of 377 bp according to the reported transcription start site. In addition, the core promoter of *Catsper2* was analyzed, by 5' and 3' deletions of the 800 bp *Catsper2* promoter according to the putative CRE sites predicted *in silico*. Deletion of the first 5'-end 280pb increased the transcriptional activity while deletion of the 5' 440pb decreased this activity in both cell lines suggesting the activity of repressor or activating factors in these regions respectively. Furthermore, deletion of the 3'-end 89 bp increased the transcriptional activity in the GC-1spg cells and no changes were observed in MSC-1

cells compared with the complete promoter. Taken together, these results indicate that the murine *Catsper2* core promoter lies between nucleotides -69 to +284, with respect to the TSS reported in databases. In addition, an alternative transcription start site was found 316 bp downstream the reported TSS.

1 INTRODUCCIÓN

La fecundación es el objetivo biológico de la reproducción sexual en los mamíferos, siendo esta última, la oportunidad de un organismo de transmitir su material genético a sus descendientes y además, de perpetuar su especie (Velázquez, 2009). La fecundación se lleva a cabo cuando el gameto femenino (óvulo) y el masculino (espermatozoide) se fusionan para dar inicio al desarrollo de un nuevo individuo.

Sin embargo, para que dicha fusión pueda tener lugar, es necesario que las células sexuales hayan pasado por un proceso de diferenciación y maduración, que en el caso del espermatozoide se lleva a cabo en gran parte a través de la espermatogénesis, la cual, está altamente regulada e implica la expresión y función de diversos genes, algunos de ellos específicos de cada etapa.

Seguido de la espermatogénesis, los espermatozoides deben soportar cambios adicionales que finalmente llevarán a su maduración y posteriormente a la hiperactivación, la cual se logra gracias a los canales de calcio presentes en el flagelo. Uno de los canales con más importancia es el canal CATSPER, formado por 4 subunidades alfa (CATSPER1, CATSPER2, CATSPER3 y CATSPER4) y 3 subunidades auxiliares (β , γ y δ). Se ha reportado que la falta de alguna de las subunidades impide la formación del canal, ocasionando un fenotipo infértil; no obstante, es poco lo que se sabe acerca de la regulación transcripcional de los genes que codifican para estas proteínas.

1.1 Espermatogénesis

En la espermatogénesis se produce la transformación de las células germinales presentes en los testículos, en espermatidas, para dar lugar posteriormente a los espermatozoides. Se divide en tres fases y cada una de estas está asociada a células específicas (Hess, 1999). En la primera fase conocida como mitótica, se generan las espermatogonias y tiene una duración de aproximadamente 10 días en ratón. La

siguiente etapa es la fase meiótica, de 11 días de duración y donde se producen los espermátocitos. Finalmente, la fase post-meiótica, que se completa en cerca de 14 días, está relacionada con las espermátidas (Eddy, 1998).

Las tres fases de la espermatogénesis ocurren en los túbulos seminíferos, los cuales son túbulos complejos que se encuentran dentro de los testículos y están revestidos por epitelio seminífero. Estos túbulos se dividen en dos compartimentos a través de los cuales se desarrolla la espermatogénesis: el compartimento basal donde tiene lugar la fase mitótica y el compartimento adlumínario donde suceden las otras dos fases. Además de las células germinales, los túbulos seminíferos están formados por células somáticas conocidas como células de Sertoli (Eddy, 2002). Cuya función más importante en el proceso de espermatogénesis es el de proveer soporte metabólico, funcional y estructural a las células germinales (Sharma y Agarwal, 2011).

1.1.1 Fase mitótica o de proliferación de espermatogonias

Las células germinales exhiben diferentes estados de acuerdo con la fase en que se encuentran (figura 1). Durante la fase mitótica, las células troncales sufren diferentes divisiones en las que se producen las espermatogonias del tipo A, que en los ratones pueden ser no diferenciadas y comprenden las espermatogonias A_{simples} (A_s), $A_{\text{apareadas}}$ (A_{pr}) y $A_{\text{alineadas}}$ (A_{al}), de las que se cree, las A_s son las células troncales que tienen la capacidad de auto-renovarse. Por otro lado, las A_{pr} y las A_{al} son clonas que no se sincronizan con el epitelio seminífero, mientras que las espermatogonias diferenciadas que se derivan de ellas, las A_1 , A_2 , A_3 y A_4 se expanden de forma sincronizada con el ciclo del epitelio seminífero. Posteriormente, se producen las espermatogonias intermedias y, por último, las espermatogonias tipo B; la última división de esta fase produce los espermátocitos primarios en estado preleptoteno, que migran de la base del túbulo seminífero para que comience la segunda fase (Hess, 1999; Kolasa et al., 2012; Wistuba et al., 2007).

1.1.1 Fase de Meiosis

La meiosis comienza cuando el espermatocito primario preleptoteno entra en la fase S del ciclo celular y da lugar a espermatocitos leptotenos diploides, donde los cromosomas son arreglados como filamentos largos y posteriormente, en las células zigoteno ocurre el apareamiento de los cromosomas homólogos, formando el complejo sinaptonémico. Estos procesos dan lugar a los espermatocitos paquitenos, en los cuales ocurre la recombinación genética de los cromosomas apareados, también incrementa el contenido de RNA y de síntesis de proteínas y, finalmente, se forman los espermatocitos diplotenos con los que se termina la meiosis I, desintegrándose el complejo sinaptonémico y separándose las cromátidas hermanas. En esta primera meiosis los espermatocitos primarios se convierten en espermatocitos secundarios que rápidamente entran en la meiosis II para generar las espermátidas haploides (Hess, 1999; Kimmins et al., 2004).

1.1.1 Fase post-meiótica

Durante la fase post-meiótica, las espermátidas redondas pasan por diferentes cambios citogenéticos, incluyendo la condensación de la cromatina y localización del núcleo en la periferia celular; en este paso, las histonas son reemplazadas primero por las proteínas transitorias y finalmente por las protaminas que son proteínas básicas pequeñas que logran compactar el DNA aproximadamente 20 veces comparado con una célula somática (Eddy, 2002; Sharma y Agarwal, 2011). Otros cambios importantes incluyen la formación del sistema acrosómico que es el que contiene las enzimas necesarias para la fertilización, la pérdida de gran parte del citoplasma que es fagocitado por las células de Sertoli y el desarrollo de la cola (Kretser et al., 1998).

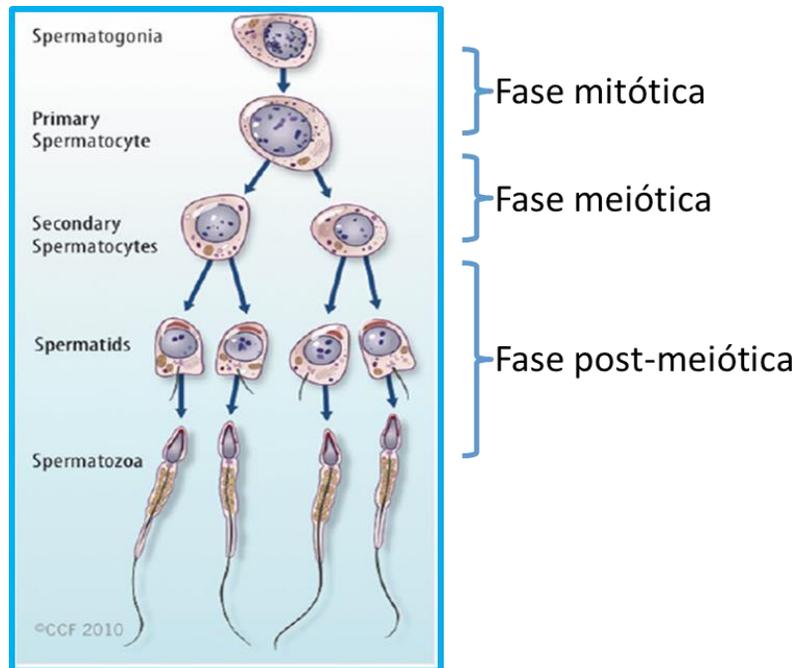


Figura 1. Fases de la espermatogénesis. Cada fase de la espermatogénesis está relacionada con un tipo de célula que a su vez, pasa por diferentes etapas (para más detalles ver el texto) (Modificado de Sharma and Agarwal, 2011).

La cola del espermatozoide es una estructura compleja que comienza a desarrollarse cuando el par de centriolos se ubica en la superficie de la célula y uno de ellos forma el axonema que se extiende hacia el lumen tubular y que además contiene los microtúbulos. Finalmente, se forman las piezas media, principal y final de la cola cuando se añaden componentes tardíos como las mitocondrias (Ventelä, 2003).

1.2 Regulación genética durante la espermatogénesis

Durante la espermatogénesis se expresan diversos genes que pueden agruparse en tres categorías: genes que se expresan solamente en las células germinales, que están relacionados con genes que se expresan en células somáticas; genes llamados únicos porque codifican para proteínas específicas de la espermatogénesis y no tienen relación con genes de células somáticas y genes que codifican transcritos que son únicos de las células germinales. De esta forma, la expresión de genes durante toda la espermatogénesis es un proceso que está altamente regulado y se debe a

diferentes factores que pueden clasificarse en intrínsecos y extrínsecos. Los primeros se relacionan al programa genético y se regulan a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, incluyendo regulación en la síntesis de proteínas en la fase post-meiótica, modificaciones post-traduccionales de dichas proteínas, probablemente por influencia de los factores extrínsecos y regulación en la transcripción de genes por factores de transcripción, en su mayoría, específicos de las células germinales. Un ejemplo claro de estas regulaciones es la compactación de la cromatina por las protaminas, ya que impiden la transcripción génica días antes de que se sinteticen las proteínas necesarias para el ensamble de los espermatozoides, indicando una inactivación de los mRNAs para traducirlos más adelante (Eddy, 1998, 2002).

Por otro lado, las células que tienen un papel importante en la regulación de la espermatogénesis son las células de Leydig, estas últimas se localizan entre los túbulos seminíferos y son estimuladas cuando la hormona luteinizante (LH) que es parte de los reguladores extrínsecos, es liberada. Este estímulo desencadena la producción de testosterona que, a través de los receptores de andrógeno, participa en el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis e influye sobre la función de las células de Sertoli como soporte de las células germinales. Otro factor extrínseco es la hormona estimuladora folicular (FSH), que activa procesos de transducción de señales uniéndose a los receptores de la superficie de las células de Sertoli, contribuyendo al proceso de la espermatogénesis (Eddy, 2002).

1.3 Maduración del espermatozoide

Una vez formados los espermatozoides, dejan los testículos sin tener una motilidad progresiva y sin la capacidad de fertilizar un ovocito, por lo tanto, es necesario que atraviesen una serie de procesos para alcanzar su maduración (figura 2). Inmediatamente después de que el espermatozoide se ha formado, se transporta al epidídimo para su almacenamiento en donde, además, ocurren algunas alteraciones que involucran cambios en la carga superficial y en la composición de las proteínas de membrana, quedando listos para el proceso de eyaculación.

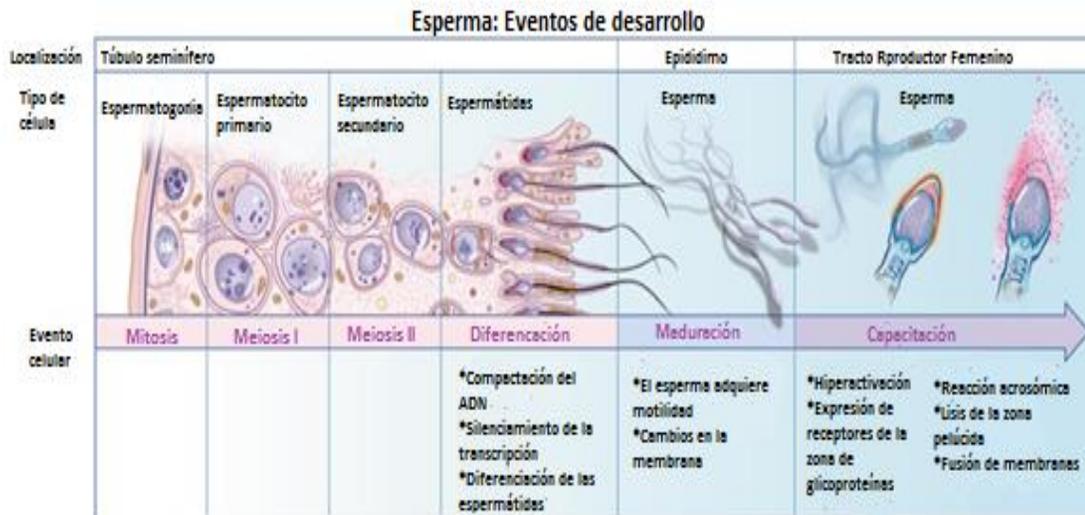


Figura 2. Proceso de diferenciación y maduración del espermatozoide. Las células germinales de testículo pasan por diferentes estadios hasta diferenciarse en espermatozoides que son células especializadas; sin embargo, el espermatozoide atraviesa cambios adicionales para alcanzar la maduración y capacidad de fertilización. (Modificado de Sharma y Agarwal, 2011).

1.3.1 Capacitación e hiperactivación del espermatozoide

La capacitación es el nombre que se le da a los cambios celulares o fisiológicos por los que atraviesan los espermatozoides cuando se encuentran en el tracto reproductor femenino y que le confieren la capacidad de fertilización (Sharma y Agarwal, 2011). Durante la capacitación, el espermatozoide experimenta un proceso conocido como reacción acrosomal en el que se activa la motilidad progresiva y se liberan las enzimas hidrolíticas almacenadas en el granulo acrosomal. Posteriormente, se logra la hiperactivación, alcanzando patrones de movilidad únicos que son necesarios para penetrar la zona pelúcida que recubre el ovocito (Pizzari, 2006). Zhang & Gopalakrishnan (2005), hicieron una revisión de numerosos estudios que demuestran que los iones de Ca^{2+} son determinantes en diferentes funciones celulares de los espermatozoides, incluidas la capacitación, reacción acrosomal, motilidad progresiva e hiperactivación.

1.4 Canales iónicos de calcio en el espermatozoide

Los canales iónicos son elementos esenciales en la señalización celular para los espermatozoides maduros y son importantes para el potencial de membrana que modula la actividad de unión membrana-enzimas. (Darszon et al., 1999). Los canales iónicos difieren unos de otros por la secuencia de sus aminoácidos, la composición de subunidades, la naturaleza de los iones que conducen, las propiedades de cierre y sus mecanismos regulatorios. Una de las formas en que se pueden clasificar estos canales, es según los iones específicos que conducen y entre los más importantes se encuentran los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Zhang y Gopalakrishnan, 2005). De estos canales iónicos, los que son específicos de Ca^{2+} son claves en el movimiento flagelar y en la fusión de la vesícula acrosomal, ya que estos procesos dependen de la concentración intracelular de Ca^{2+} . La motilidad del espermatozoide está controlada por iones Ca^{2+} y por nucleótidos cíclicos, por lo que se han descrito diferentes canales de Ca^{2+} presentes en el espermatozoide, sin embargo, es probable que no todos sean esenciales para la motilidad, ya que también se expresan en otros tejidos como el cerebro (Singh y Rajender, 2015; Zhang y Gopalakrishnan, 2005). Es por esta razón, que uno de los canales que representa mayor interés en este campo de estudio es el canal CATSPER, el cual es específico del espermatozoide, tiene una dependencia débil al voltaje y es sensible al pH; este canal permite la entrada de iones cargados positivamente, esenciales para la hiperactivación y la fertilidad masculina. Aunque permite el paso de cationes monovalentes como el sodio (Na^+) o el cesio (Cs^+) en ausencia de iones divalentes, el canal CATSPER tiene una mayor afinidad por los iones divalentes como el Ca^{2+} (Singh y Rajender, 2015).

1.4.1 Canal CATSPER

El canal CATSPER (Cation channel of Sperm) es un canal iónico selectivo para Ca^{2+} formado por cuatro subunidades alfa (α) denominadas CATSPER1, CATSPER2, CATSPER3 y CATSPER4 (Lobley et al., 2003; T A Quill et al., 2001; Ren et al., 2001), las

cuales, a diferencia de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Ca_v) son codificadas por genes distintos y se unen como un heterotetrámero para formar el poro del canal (Nishigaki et al., 2016). Asimismo, cuenta con subunidades accesorias conocidas como CATSPER β (Liu et al., 2007), CATSPER γ (Wang et al., 2009) y CATSPER δ (Chung et al., 2011), que intervienen en la estructura y estabilidad del canal.

Al igual que otros canales de calcio, las subunidades alfa del canal CATSPER cuentan con seis fragmentos transmembranales; sin embargo, este canal es mucho más complejo y tiene características distintas. Además de que cada subunidad que conforma el canal es codificada por un gen diferente, las subunidades alfa tienen un par de residuos de ácido aspártico, de los que se ha inferido, usan su carga negativa para unir los iones Ca^{2+} ; otra característica inusual es que CATSPER1 posee un dominio amino terminal rico en histidinas que probablemente sirve para la sensibilidad a protones o la unión de Zn^{2+}

2 ANTECEDENTES

2.1 *Catsper2*

En 2001, se reportó la existencia de un gen que codifica para una proteína con topología similar a las proteínas de los canales de potasio dependientes de voltaje, pero con la secuencia del dominio del poro parecida a los canales de calcio, a este gen se le llamó *Catsper2*. La proteína CATSPER2 tiene 588 aminoácidos (aa), forma seis fragmentos transmembranales, en donde los residuos ubicados entre los fragmentos cinco y seis, conocidos como región P, determinan la selectividad del canal (figura 3). CATSPER2 contiene en su dominio C-terminal un motivo de cierre de leucina que posiblemente media la interacción proteína-proteína para la formación del canal. La proteína CATSPER2 de humanos tiene una identidad de 63-67% con la proteína de ratón, en la que la región transmembrana está conservada con un 77% de identidad e incluye una región P idéntica (Quill et al., 2001).

2.1.1 *Catsper2* es específico de testículo

El perfil de expresión de los genes *Catsper* se ha evaluado en diferentes grupos de trabajo. El mRNA de estos genes, incluido *Catsper2* es detectado únicamente en testículo tanto de humano como de ratón (figura 4) (Quill et al., 2001). Por otro lado, la localización específica de la proteína CATSPER2, así como del canal funcional en la pieza principal del flagelo de los espermatozoides, se ha determinado mediante técnicas de inmunofluorescencia (Avidan et al., 2003; Navarro et al., 2008).

```

1  MAQEQQGHFQLLRADAIRSKLIDTFSLIEHLQGLSQAVPRHTLREILDPA
51  QQKLMGSDQEQLVRFSSIKPRRMGHIHRSRRLSRLRVRCSRMPPLSLWAG
101 WVLDSSVFSKFIISLIFLNTFVLMVEIELMESTNTALWPVKLALEVADWF
      S1
151 ILLSFIVEILLMWLASFSLFWKDAWNVDFDFVTLLSLLPELVLLGVPPAH
      S2                               S3
201 SVWLQLLRVCRVLRSLKLFARFRQIKVILLALVRALKSMTFLLMLLLIF
      S4                               S5
251 YIFAVTGVYFFREYSRSTIEGLEYNMFFSDLLNSLVTVFILFTLDHWYAV
      P
301 LQNIWKVPESRRVFSSIYVILWLLGSIIFRNIIAMMVTNFQNIRSELS
      S6
351 EEMSHLEVQYKADMFQQIIQRRQHSESLRGTSLGKVSIEDIIETSDASDD
401 DDDDDDDDDDDDDDDDDKSDATESDGEESDSENSESENSESEKIDPEKDY
451 AKKSYPEKSHPEKSYPEKSHPEKSYPEKSHPEKSYDEQAEAEKVKEESKE
501 KAYPVSHSISSHGSAADTAFLNLDWETLVHENLPGLMDMDQDDRIVWP
551 RDSLFRYFELLEKLQYNLEERKKLQFAVQALMSFEDK

```

Figura 3. Secuencia de aminoácidos de CATSPER2. Se muestran los fragmentos transmembranales (S1-S6) subrayados en negro y los residuos de la región P que determinan la selectividad del canal están subrayados en rojo. (Quill et al., 2001)

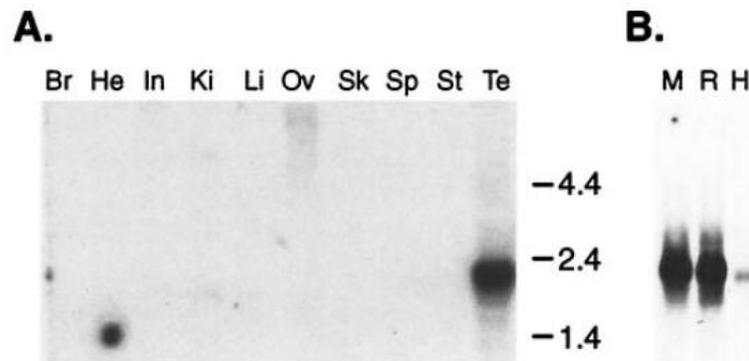


Figura 4. *Catsper2* se expresa únicamente en testículo. (A) Northern blot de RNA total de tejidos de ratón. Br: cerebro, He: corazón, In: intestino, Ki: riñón, Li: hígado, Ov: ovario, Sk: músculo esquelético, Sp: bazo, St: estómago, Te: testículos. (B) Northern

blot de RNA poli (A) de testículos de ratón (M), rata (R) y humano (H). En los dos experimentos se utilizó una sonda de cDNA de *Catsper2* murino marcada radioactivamente (Quill et al., 2001).

2.1.2 *Catsper2* es el gen de la familia *Catsper* que se expresa primero

A pesar de que todos los genes de la familia *Catsper* son específicos de testículo y que la falta de alguno impide la formación del canal (Qi et al., 2007), su transcripción es diferencial durante la espermatogénesis. Mientras que *Catsper1*, 3 y 4 se expresan en etapas tardías de la espermatogénesis, es decir, en las espermatidas (Jin et al., 2005; Qi et al., 2007; Schultz et al., 2003), *Catsper2* se expresa antes que cualquiera de los otros genes *Catsper* (en espermatoцитos paquitenos), según estudios de PCR cuantitativa (qPCR) e hibridación *in situ*, en los que se detecta a partir del día 8 después del parto (dpp), con una expresión significativa entre los días 15-18 y llegando a una expresión máxima a los 35 dpp, que supera la expresión de los otros genes, que es donde se completa la diferenciación de los espermatozoides en ratón (figura 5) (Li et al., 2007).

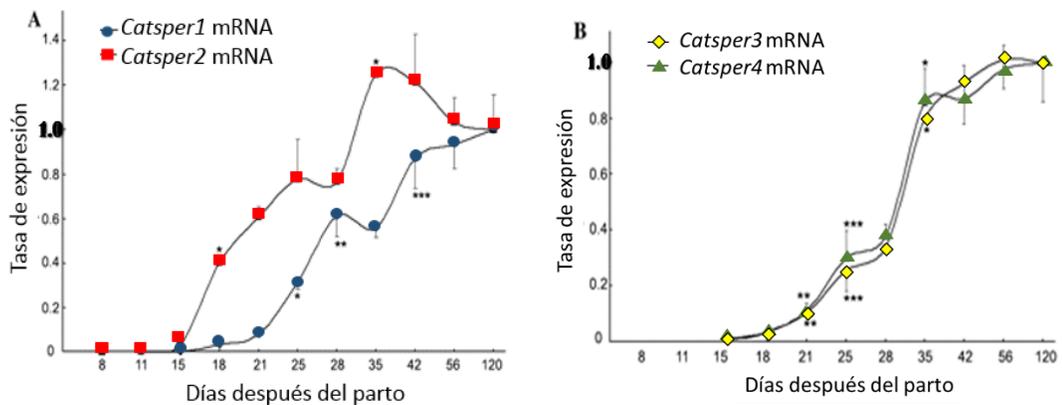


Figura 5. *Catsper2* es el primer gen de la familia *Catsper* que se expresa durante la espermatogénesis. Expresión temporal de los mRNA de *Catsper1*, *Catsper2* (A), *Catsper3* y *Catsper4* (B), en testículos de ratón desde el desarrollo postnatal hasta la adultez medidos por qPCR y normalizados a la expresión de β -Actina. Los niveles de los mRNAs se expresan en proporción relativa a los valores en testículo de adulto (120 días) (Modificado de Li et al., 2007).

2.1.3 *Catsper2* es esencial en la fertilidad masculina

Debido a la expresión específica del canal CATSPER en el espermatozoide y a su gran afinidad por el Ca^{2+} , que es un importante mensajero para el proceso de capacitación e hiperactivación del espermatozoide, se han realizado diferentes ensayos para determinar su función. Se produjeron ratones mutantes sin el gen *Catsper2* (*Catsper2*^{-/-}) y se hicieron ensayos de fertilización tanto *in vitro* como *in vivo*, enfrentándolos a ovocitos con o sin zona pelúcida (ZP). En el ensayo *in vitro* se observó que los espermatozoides *Catsper2*^{-/-} no pudieron fertilizar ovocitos normales, pero sí ovocitos sin ZP. Por otro lado, en el ensayo *in vivo* se observó que sólo los ratones machos *Catsper2*^{-/-} no tuvieron descendencia (Quill et al., 2003). Con estos resultados, se demostró que *Catsper2* es importante en la fertilidad masculina, concretamente en el proceso de hiperactivación, que es necesario para atravesar la ZP del ovocito y llevar a cabo la fertilización.

Asimismo, la infertilidad masculina humana no sindrómica sólo se ha vinculado a mutaciones en el gen *Catsper2* (Shukla et al., 2012). En una familia de origen francés en la que dos hermanos presentaban anemia diseritropoyética congénita tipo I y ambos sufrían de una reducción severa de la motilidad de sus espermatozoides; se encontró que tenían una deleción de aproximadamente 70 kb que removía parte del gen *Catsper2*, sugiriendo su papel en la astenoteratozoospermia (Avidan et al., 2003). Aunque se han detectado otros canales de Ca^{2+} en el esperma, mediante ensayos de interrupción de genes se ha concluido que canales como $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ no son importantes en la fertilidad masculina. Así mismo, mutaciones encontradas en los canales CNGA3, TRPC2 y TRPC3, tampoco ocasionan disminución de la fertilidad y finalmente, mutantes nulos para los canales $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v2.1$ ocasionan la muerte del embrión, por lo tanto, se descartan como causantes de infertilidad. De esta manera, se puede argumentar que sólo los genes *Catsper* son requeridos para la fertilidad masculina y los convierte en blancos para el desarrollo

de drogas anticonceptivas masculinas (Carlson et al., 2005; Navarro et al., 2008; Zhang y Gopalakrishnan, 2005).

2.1.4 *Catsper2* podría regular la expresión de las proteínas CATSPER

Además del fenotipo de infertilidad masculina, otro fenómeno que se ha observado en ratones *Catsper2*^{-/-} es que, si bien se encuentra el transcrito de *Catsper1*, falta su proteína; mismo evento que se observa en ratones *Catsper1*^{-/-} donde se encuentra el transcrito de *Catsper2*, pero no su proteína (Carlson et al., 2005). Aunque en ratones *Catsper1*^{-/-} no se ve afectada la expresión de CATSPER3 y 4 (Babcock, 2007; Navarro et al., 2008), es decir, se encuentran ambas proteínas y, en ratones *Catsper3*^{-/-} o *Catsper4*^{-/-}, se expresa la proteína CATSPER1 (Qi et al., 2007), no se han reportado resultados del efecto de *Catsper2*^{-/-} en la expresión del transcrito o las proteínas de los genes *Catsper3* y 4. No obstante, las diferencias en la expresión temporal de los genes *Catsper*, donde *Catsper2* se expresa tempranamente, sugieren que dicho gen regula a los demás genes *Catsper* y que es el gen más crítico en la reproducción masculina normal (Song et al., 2011).

2.2 Regulación de la expresión génica: transcripción

La expresión de genes se regula por mecanismos complejos que pueden ser específicos para cada gen; sin embargo, hay cinco etapas que son puntos de control potenciales: la activación de la estructura del gen, el inicio de la transcripción, el procesamiento del RNA, el transporte del RNA maduro al citoplasma y la traducción del mRNA (Kumar et al., 2014). El punto de control más crítico para la expresión génica es el inicio de la transcripción, que se da cuando la RNA polimerasa II reconoce y se une a una secuencia de DNA conocida como promotor (Pedersen et al., 1996). Para entender los mecanismos de regulación de la expresión genética, es necesario delimitar la región promotora del gen a estudiar, la cual está compuesta por diversos

elementos de DNA que rodean al sitio de inicio de la transcripción (Transcription Start Site, TSS) y que permiten que la maquinaria transcripcional basal se acople (Dikstein, 2011).

2.2.1 Análisis de secuencias promotoras

El promotor de un gen es la secuencia que se ubica río arriba de dicho gen, alrededor del inicio transcripcional y normalmente se compone de un promotor central (core promoter) que dirige la transcripción basal y un promotor proximal (proximal promoter) que aumenta la actividad transcripcional (de Vooght y van Solinge, 2009). Dentro del promotor se encuentran secuencias de DNA que pueden ser elementos del promotor central o secuencias activadoras río arriba (upstream activating sequences, USAs) (Kumar et al., 2014). Los elementos del promotor central incluyen el TSS, el INR o elemento iniciador, la caja TATA, la caja CAAT, el DPE o elemento río abajo del promotor y el MTE o elemento motivo diez.

- Elemento iniciador (INR): Este elemento se ubica sobre el inicio de la transcripción y tiene una secuencia consenso 5'Y(+1)N(T/A)YY3' donde Y es una pirimidina y N es cualquier nucleótido (Choudhuri, 2014).
- Caja TATA: La secuencia consenso de este elemento es 5'TATAAA3', se localiza entre los nucleótidos -25 a -35 con respecto al TSS y es reconocida por el factor TBP que hace parte del complejo TFIID (Choudhuri, 2014).
- Caja CAAT: Esta secuencia ayuda a incrementar la fuerza del promotor, se ubica entre los nucleótidos -75 a -85 respecto del TSS y tiene una secuencia consenso 5'GGCAATCT3' (Kumar et al., 2014).
- Elemento río abajo del promotor (DPE): Este elemento se ubica en las posiciones +28 a +32 río abajo del TSS, su secuencia consenso es 5'(A/G)G(A/T)(C/T)(G/A/C)3'. Es reconocido por los factores asociados (TAFs) del complejo TFIID (Choudhuri, 2014).

- Elemento motivo diez (MTE): La secuencia consenso de este elemento es 5'CGANC3' y su posición es de +18 a +22 con respecto del TSS. Es reconocido por los TAFs del complejo TFIID (Lim et al., 2004).

Los factores necesarios para la transcripción son aquellos que reconocen los elementos del promotor central y las secuencias activadoras río arriba. Estos factores se pueden clasificar en dos grupos (Pedersen et al., 1996):

- Los factores generales: son necesarios para una iniciación exitosa en todos los promotores y al unirse con la RNA polimerasa II forman un complejo que determina el inicio de la transcripción. Dentro de estos factores están TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH y TFIID y algunos de ellos reconocen y se unen a los elementos del promotor central.
- Los factores específicos: son proteínas de unión al DNA, conocidas como factores de transcripción, que reconocen secuencias cortas activadoras río arriba del TSS. Estos factores mejoran la eficiencia de inicio transcripcional debido a las interacciones proteína-proteína con la maquinaria transcripcional basal.

Por otro lado, hay dos grandes tipos de promotores dependiente de la RNA pol II, los promotores que contienen la caja TATA, que tienden a ser específicos de tejido y los que tienen islas CpG (contenido de GC mayor del 50%), que presentan perfiles de expresión constitutiva; además, se ha revelado que el tipo de promotor no sólo influye en las características transcripcionales, sino también en las tasas de mutación y en la estructura del gen (Yamamoto et al., 2011).

Cabe mencionar que, aunque haya elementos característicos de los promotores, no se ha podido determinar la estructura definitiva de una secuencia promotora. Sólo un análisis minucioso de un promotor específico puede revelar su estructura y elementos regulatorios.

2.3 Caracterización del promotor de *Catsper1*

Debido a la importancia de los genes *Catsper* en la fertilidad masculina, nuestro grupo de trabajo ha tenido especial interés en analizar la región promotora de estos genes para dilucidar sus mecanismos regulatorios. Por esta razón, se realizó la caracterización del promotor del gen *Catsper1* murino. Por medio de la técnica de amplificación rápida de los extremos 5' de cDNA (5' RACE), se logró identificar el sitio de inicio de la transcripción de este gen, 84 pb río arriba del inicio de la traducción (Mata-Rocha et al., 2013). Asimismo, se encontró mediante análisis *in silico* una región promotora de 798 pb y otra de 1215 pb (figura 6), cuyas secuencias fueron clonadas río arriba del gen reportero de luciferasa en el vector de expresión pGL3 Basic y se cuantificó la actividad promotora de ambas secuencias (figura 7).

Además, se delimitó el promotor basal a una secuencia de 261 pb, mediante deleciones en las que se eliminaron sitios de unión a factores de transcripción SOX encontrados en el análisis *in silico* (Mata-Rocha et al., 2013).

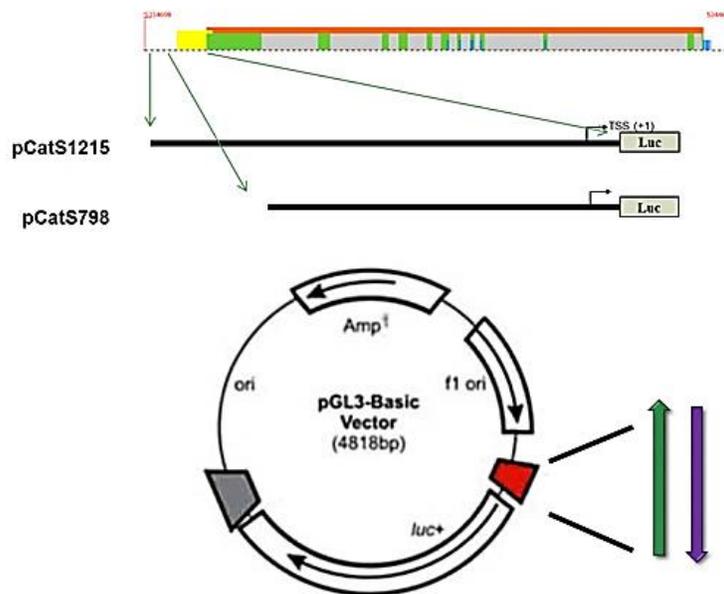


Figura 6. Promotores putativos de *Catsper1* murino. Las secuencias de dos posibles promotores se clonaron en el vector de expresión pGL3 Basic. (Modificado de Mata-Rocha et al., 2013).

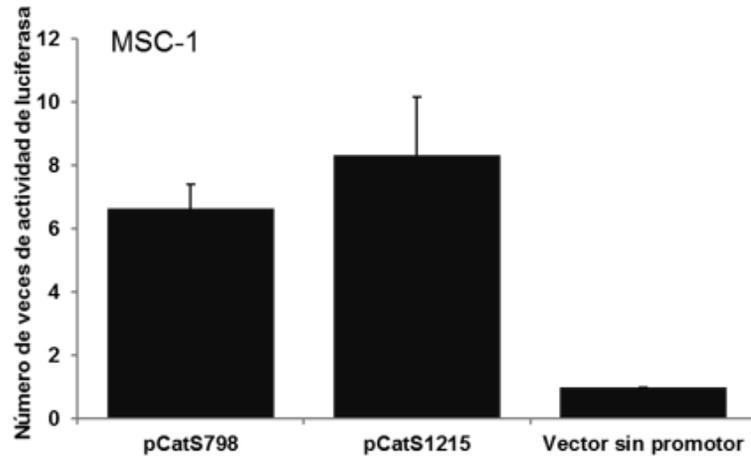


Figura 7. Actividad promotora de las regiones de 798 pb y 1215pb del promotor de *Catsper1* murino. La actividad promotora de cada secuencia se determinó mediante ensayos de luciferasa. La actividad indica las veces que aumentó respecto al vector sin promotor. (Mata-Rocha et al., 2013).

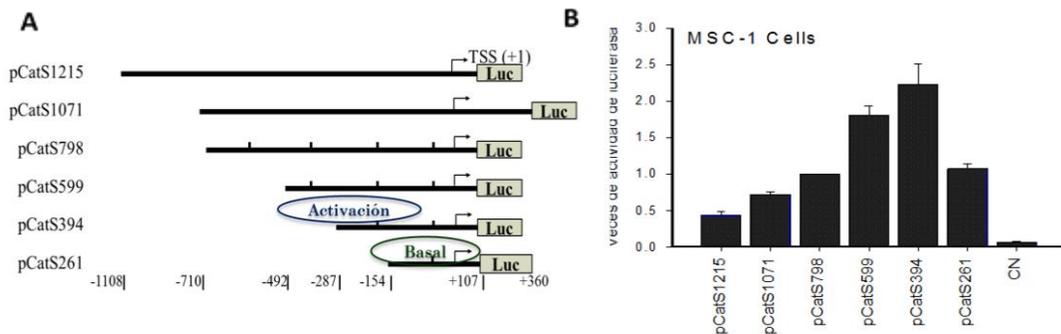


Figura 8. Delimitación del promotor basal de *Catsper1* murino. (A) Se realizaron deleciones en las que se eliminaron los sitios de unión a factores de transcripción SOX (líneas cortas verticales) y (B) se midió la actividad promotora mediante ensayos de luciferasa. La actividad indica la variación respecto a la secuencia de 798 pb (Mata-Rocha et al., 2013).

2.4 Análisis *in silico* preliminar del promotor de *Catsper2* murino

Para el gen *Catsper2* murino se realizó un análisis *in silico* preliminar en el que se encontraron 2 posibles promotores, uno de 784 pb que abarca el TSS del gen y otro de 601 pb, río arriba del primer promotor putativo. Estas dos secuencias se amplificaron en un fragmento de aproximadamente 1600 pb el cual fue clonado río

arriba del gen reportero luciferasa en el vector pGL4.10 (Romero-Tlalolini, datos no publicados).

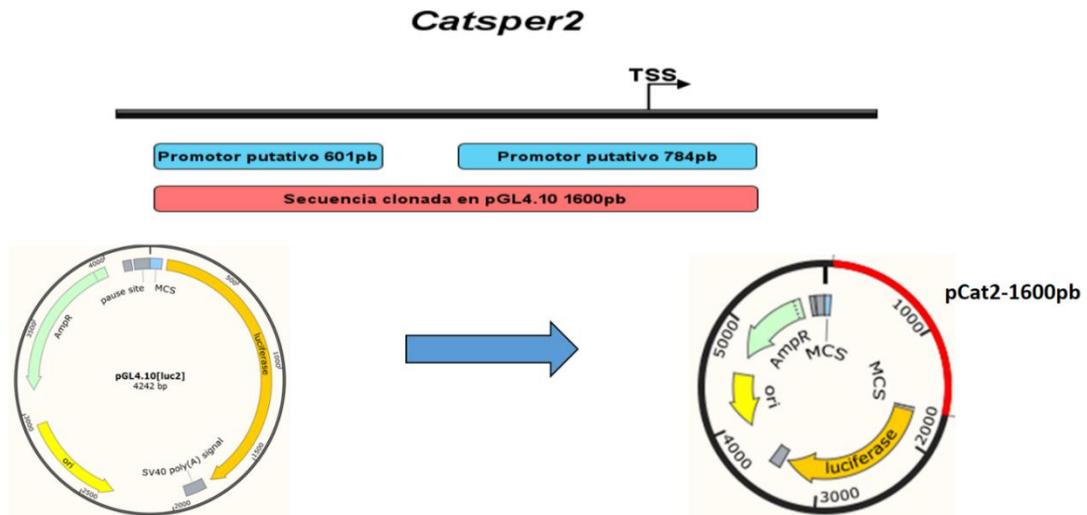


Figura 9. Promotores putativos de *Catsper2* murino. Con un análisis *in silico* se encontraron 2 posibles promotores para *Catsper2* murino (rectángulos azules). La región de 1600 pb indicada en el rectángulo rojo que comprende los posibles promotores se clonó río arriba del gen de luciferasa en el vector pGL4.10 (pCat2-1600pb).

3 JUSTIFICACIÓN

Desde el descubrimiento de los genes del canal de calcio CATSPER se ha dado mayor importancia al estudio de la estructura y función del canal proteico, dejando de lado el análisis de la regulación transcripcional de estos genes. De la familia de genes del canal CATSPER, *Catsper2* es el primero en expresarse y desempeña un papel fundamental en la fertilidad masculina; debido a esto y a los resultados que sugieren una posible regulación de este gen sobre la expresión de CATSPER1, es necesario realizar la caracterización de su promotor como el paso inicial para entender la regulación de los genes que codifican las proteínas que conforman este canal e identificar posibles blancos terapéuticos para generar métodos anticonceptivos.

4 OBJETIVOS

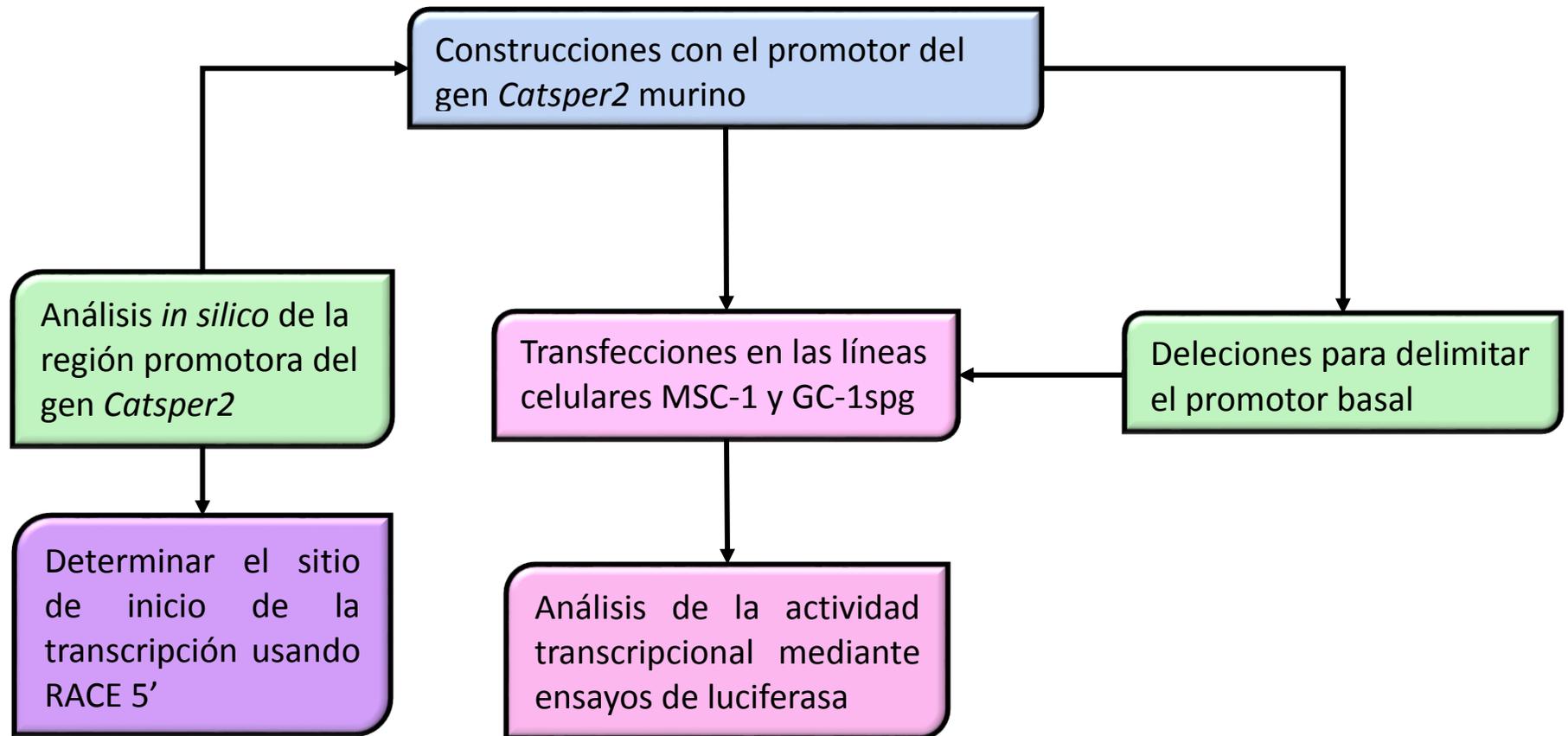
4.1 Objetivo General

Caracterizar estructuralmente la región promotora del gen *Catsper2* murino

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad transcripcional de los promotores putativos del gen *Catsper2* murino
- Analizar *in silico* la región promotora del gen *Catsper2* murino
- Determinar el sitio de inicio de la transcripción del gen *Catsper2* murino.
- Delimitar el promotor basal del gen *Catsper2* murino.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL



6 METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

En este trabajo se emplearon las líneas celulares MSC-1 (mouse Sertoli cell 1, RRID:CVCL_U446) que corresponde a células somáticas de Sertoli de testículo de ratón y GC-1 spg (ATCC® CRL-2053™) que son células germinales de ratón con características de un estado entre espermatogonias tipo B y espermatocitos primarios. Las células se manipularon en campana de flujo vertical, se cultivaron en medio Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM) de SIGMA suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) de GIBCO y 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.

Por otro lado, el RNA utilizado en este proyecto se obtuvo a partir de testículos de ratones adultos (6-8 semanas de nacidos) de la cepa CD1, los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los testículos fueron obtenidos inmediatamente y colocados en buffer de fosfatos (PBS 1X) pH=7.3, se lavaron 2 veces y se colocaron en un mortero frío (-20°C) con nitrógeno líquido, se maceraron hasta convertirlos en un polvo fino y se agregaron 2 mL de TRIzol® para recolectar todo el tejido en tubos eppendorf; se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad por 12 min. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo y se agregaron 500 µL de TRIzol® y 100 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad por 12 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 700 µL de isopropanol para precipitar el RNA, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad por 30 min; se decantó el isopropanol, se agregaron 100 µL de etanol 70% para limpiar el pellet, se centrifugó a máxima velocidad por 10 min, se descartó el sobrenadante y se secó el RNA a TA por >15 min. El RNA se resuspendió en 21.5 µL de agua mili-Q estéril y se agregaron 1 µL de DNasa I (NEB) y 2.5 µL del buffer de la enzima y se incubó a 37°C por 20 min para

eliminar residuos de DNA genómico. Posteriormente, se agregaron 175 μ L de agua mili-Q estéril y 200 μ L de fenol ácido, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad por 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se repitió el proceso con 200 μ L de fenol ácido. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 200 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión, se centrifugó a máxima velocidad por 30 min y se eliminó el sobrenadante. Se limpió el pellet con 100 μ L de etanol 70%, se centrifugó a máxima velocidad por 15 min, se decantó el sobrenadante y se secó el RNA a TA. Finalmente, el RNA se resuspendió en 30 μ L de agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a -70°C .

6.2 Construcción con la región de 800pb del promotor de *Catsper2* murino

A partir del plásmido pGL4.10/1600pb que contiene una región de 1600pb con 2 promotores putativos de 601pb y 784pb predichos, se obtuvieron las demás construcciones. Inicialmente se realizó el análisis de restricción con las enzimas XhoI y XbaI para comprobar el sentido de la secuencia clonada previamente. El fragmento, se liberó haciendo una restricción con HindIII y se observó en un gel de agarosa 1.2%. Las bandas correspondientes al fragmento de 1600pb y al plásmido pGL4.10 lineal se purificaron mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System de PROMEGA. A continuación, se realizó una ligación en una relación 3:1 de inserto y plásmido, respectivamente, usando 1U de T4 DNA ligasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó a Temperatura ambiente (TA) toda la noche y al día siguiente se transformaron bacterias DH5 α competentes como se describe más adelante.

Para amplificar un fragmento de aproximadamente 800 pb que contiene el promotor putativo de 784 pb a partir de la construcción pGL4.10/1600pb, se diseñó un oligonucleótido forward con el sitio de restricción para la enzima HindIII y el oligonucleótido Cat2 Prom Rev (Tabla 1). El fragmento esperado se obtuvo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con concentraciones finales de buffer GC 1x, dNTPs 200 μ M, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) 0.2U y 0.2 μ M de

cada oligonucleótido. Se utilizó un termociclador Axygene Maxygene y el programa empleado se especifica en la tabla 2.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados en el proyecto

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Ensayo en que fueron usados
Actina Fw	AAGATCAAGATCATTGCTCCTCC	Verificación del cDNA
Actina Rev	TAACAGTCCGCCTAGAAGCA	
Ex1Cat2 Fw	GTGAAGTCAGGGCTGAGTG	
Ex5Cat2 Rev	AAAGTCAAAGACATTCCAGGCA	
Cat2-800 Fw	<u>TGAAGCTT</u> GGCCTGCTAGATAGTGGAG	Promotor de 800pb
Cat2Prom Rev	<u>TGAAGCTT</u> CTGACATTTGGAAAACGTGTC	
GSP-RT Rev	GCTGTCACCCACTGTACC	RACE5'
GSP1 Rev	GGAGAGTGTGCCTTGGTAC	
GSP2 Rev	GATACGAGGTAGGGCAGC	
Qt Fw	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCT CAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
Qo Fw	CCAGTGAGCAGAGTGACG	
Qi Fw	GAGGACTCGAGCTCAAGC	
Rvprimer3 [†]	CTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAG	
Luc2Rev	GTCCCGTCTTCGAGTGGGTAG	
pJET Fw [†]	CRACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Secuenciación en pJET
pJET Rev [†]	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
pCat2-520 Fw	<u>TGCTCGAGG</u> GAGAAATGAGATGGGAGAG	Deleciones del promotor
pCat2-358 Fw	<u>TGCTCGAGA</u> ACAGCTGGTAACTGCC	
pCat2-711 Fw	<u>TGCTCGAGG</u> GCCTGCTAGATAGTGGAG	
pCat2-711 Rev	<u>TGAAGCTT</u> TCGCGGGCCTCACTCC	

[†]La secuencia de los oligonucleótidos se encuentra de forma libre en la web

Tabla 2. Condiciones para amplificar la región de 800pb del promotor de *Catsper2*

Paso y número de ciclos	Temperaturas y tiempos
Desnaturalización inicial, 1 ciclo	98°C por 5 min
30 ciclos de Desnaturalización, alineamiento y extensión	98°C/30 s Gradiente: 67.3°C, 69.7°C, 71.7°C y 72°C/30s 72°C/3 min
Extensión final, 1 ciclo	72°C por 10 min

6.3 Clonación en pJET 1.2 Blunt

Para la clonación en el vector de transición pJET 1.2 Blunt se usó el kit CLONEJET™ PCR cloning de Thermo Fisher Scientific. Para ello, 1 µL del producto de PCR conteniendo el amplicón se mezcló con 1 µL de pJET, 1 µL de ligasa, 10 µL de buffer de reacción y 7 µL de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 22°C por 15 min. Para obtener colonias con el plásmido de interés se transformaron bacterias quimio competentes con el producto de ligación.

6.3.1 Preparación de bacterias competentes

Para obtener células competentes se empleó la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5α (genotipo: F– Φ80*lacZ*ΔM15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–, mK+) *phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1*). Con este fin se inoculó una colonia en 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente, se tomó 1 mL de ese cultivo para inocular 100 mL de caldo LB nuevo y se incubó a 37°C en agitación constante hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD) de 0.6 a 600 nm. Seguido de esto, se centrifugó en tubo falcon estéril a 7000 rpm por 10 min a 4°C; posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 25 mL de CaCl₂ 0.1 M frío; nuevamente se centrifugó a 7000 rpm por 10 min a 4°C y se repitió el proceso con 20 mL, 15 mL, 10 mL y 5mL de

CaCl₂ 0.1 M frío. Finalmente, las células se resuspendieron en 2.5 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y se agregaron 250 µL de glicerol estéril. Las células competentes se dividieron en alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf estériles y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para luego ser almacenadas a -70°C hasta su uso.

6.3.2 Transformación de bacterias

Se colocaron 20-50 ng de plásmido o 10 µL de mezcla de ligación en un tubo de bacterias competentes (100 µL) y se mantuvo en hielo por 30 min; a continuación, se realizó un choque térmico, incubando a 42°C por 1-2 min y nuevamente en hielo por 1 min. Posteriormente se agregó 1 mL de caldo LB a las células y se incubó a 37°C por 1h en agitación constante. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las células a 5000 rpm por 3 min a TA y se descartó 1 mL de medio. Las células se resuspendieron en los 100 µL restantes y se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (0.1 mg/mL) para seleccionar las colonias transformadas. Las placas se incubaron a 37°C por 18h aproximadamente. Las candidatas seleccionadas se aislaron en placas de agar LB con ampicilina.

6.4 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System y el kit QIAGEN Plasmid Midi, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El contenido de cada buffer se especifica en el anexo 1. Los protocolos son los siguientes:

6.4.1 kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Se inoculó una colonia transformada con el plásmido de interés en 15 mL de caldo LB-ampicilina y se incubó a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente,

las bacterias se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min y se descartó el medio. Las bacterias se resuspendieron en 250 μ L de solución de Resuspensión celular, se agregaron 250 μ L de solución de Lisis celular y se mezcló por inversión 4 veces; se adicionaron 10 μ L de solución de proteasa alcalina, se mezcló por inversión 4 veces y se incubó a TA por 5 min. Posteriormente, se detuvo la reacción con 350 μ L de solución de neutralización y se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a TA. El sobrenadante se transfirió a una columna del kit y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min a TA, se descartó el “flow through” y se realizaron dos lavados con 750 μ L y 250 μ L de Solución de lavado y finalmente se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 50 μ L de agua estéril libre de nucleasas y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min a TA. El DNA se almacenó a -20°C.

6.4.2 QIAGEN Plasmid Midi Kit

Se inocularon bacterias transformadas con el plásmido de interés en 100 mL de caldo LB-ampicilina (0.1 mg/mL) y se incubaron a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células en un tubo falcon estéril a 7000 rpm por 15 min a 4°C y se desechó el medio. Las células se resuspendieron en 10 mL de la solución P1 del kit con 0.1 mg/mL de RNasa y luego se agregaron 10 mL de buffer P2 (buffer de lisis), se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó a TA por 5 min. Después de la incubación, se neutralizó la reacción añadiendo 10 mL del buffer P3 frío, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó en hielo por 15 min. Posteriormente, se centrifugó a \geq 12500 rpm por 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se repitió el paso anterior para eliminar cualquier residuo; luego, el sobrenadante se pasó por una columna de purificación, previamente equilibrada con 10 mL de buffer QBT. Seguidamente, se lavó la columna 2 veces con 30 mL de buffer QC y se transfirió a un tubo nuevo, en donde se eluyó el DNA con 15 mL de buffer QF. Se utilizaron 10.5 mL de isopropanol a TA y se centrifugó a \geq 12500 rpm por 30 min para precipitar el DNA. El pellet se limpió con 5 mL de etanol 70% y se centrifugó a

≥12500 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el DNA. Por último, se resuspendió en 100 µL de agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a -20°C.

6.5 Clonación en pGL4.10

Para evaluar la actividad transcripcional de las regiones del promotor de *Catsper2* se utilizó el plásmido pGL4.10, el cual carece de regiones promotoras, tiene el gen reportero de la luciferasa de *Photinus pyralis* adyacente al sitio de clonación múltiple y además cuenta con el gen de resistencia a ampicilina para la selección de colonias (Anexo 2).

Para la subclonación en este vector, se cortaron las construcciones pJET que contienen la región del promotor de 800pb de *Catsper2* y pGL4.10 (5 µg) con la enzima HindIII (promotor 800pb) o con las enzimas HindIII y XhoI para pJET conteniendo las deleciones, en un volumen final de 20 µL con concentración final de buffer CutSmart (NEB) de 1X. La reacción se incubó a 37°C por 2h y el patrón de corte se verificó en geles de agarosa 1.5%. Las bandas de interés fueron purificadas mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System de PROMEGA y se realizó la ligación de los fragmentos en pGL4.10 y la transformación de bacterias competentes según la metodología previamente explicada.

6.6 Secuenciación de DNA

Para verificar la secuencia de las construcciones en el plásmido pGL4.10 se utilizó el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL que contenía 4 µL de Buffer de secuenciación 5X, 2 µL de mix de reacción, 10 pM de oligonucleótido (Tabla 1) y 1 µg de DNA plasmídico. La reacción se llevó a cabo en termociclador con un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C por 4 min, 30 ciclos a 96°C/30 s, 54°C o 59°C/30 s (para los

oligonucleótidos RVPrimer3 y Luc2Rev, respectivamente) y 60°C/4 min y un ciclo de extensión final a 60°C por 5 min.

6.7 Cultivos celulares

Para el pase de las células, se eliminó por completo el medio de cultivo y se agregaron 2 mL de tripsina-verseno (Invitrogen) (sólo para las células GC-1 spg) y se incubó a 37°C por 2 min para permitir que las células se despegaran; seguido de esto, se agregaron 2 mL de medio DMEM suplementado y se transfirieron las células a un tubo falcon para centrifugar a 2500 rpm por 5 min. El pellet de células se resuspendió en 1 mL de DMEM suplementado y se usaron 10 μ L para contarlas en cámara de Neubauer. Se sembró la cantidad apropiada de células en cajas de Petri para cultivo celular.

Para conservar las líneas celulares se congelaron células siguiendo el procedimiento descrito en el pase celular, pero en este caso se resuspendieron en 900 μ L de SFB + 100 μ L de DMSO estéril, finalmente se transfirieron a criotubos para ser conservadas en nitrógeno líquido.

6.7.1 Transfección de líneas celulares

Siguiendo el procedimiento descrito en el pase celular y se sembraron 1×10^5 células en 500 μ L de medio DMEM suplementado en placas de 24 pozos. Las células se incubaron a 37°C por 24h hasta una confluencia de 70-80%. Después de 24h se prepararon las mezclas de transfección con el reactivo DharmaFECT Transfection Reagent para las células MSC-1 (Tabla 3) y el reactivo K2[®] Transfection System para las células GC-1 spg (Tabla 4). Cada mezcla se incubó a TA por 15 min y luego se depositaron en los pozos (placas de 24 pozos). En el caso de las células GC-1 spg se prepararon 2h antes de transfectar agregando 5 μ L del reactivo K2 multiplier en cada pozo. En ambos casos se usó el plásmido pGL4.10 con el promotor de Citomegalovirus (pGL4.10-CMV) como control positivo de transfección, el plásmido pGL4.10 vacío

como actividad basal de referencia y un plásmido con la luciferasa de *Renilla reniformis* y el promotor de CMV (pRL-CMV) como control interno de transfección (figura 10) con el que se hizo la normalización de los datos obtenidos. Además, se dejó un pozo de células sin transfectar.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de transfección usada en la línea celular MSC-1

	Componentes de la mezcla de transfección	Cantidad para 1 pozo de la placa
Construcciones pCat2- y pGL4.10	DNA	1000 ng
	pRL-CMV	0.8 ng
	Dharmafect	3 μ L
	DMEM no suplementado	μ L necesarios para aforar a 100 μ L
pGL4.10-CMV	DNA	25 ng
	pRL-CMV	0.8 ng
	Dharmafect	3 μ L
	DMEM no suplementado	μ L necesarios para aforar a 100 μ L

Tabla 4. Componentes de la mezcla de transfección usada en la línea celular GC-1 spg

	Componentes de la mezcla de transfección	Cantidad para 1 pozo de la placa
Construcciones pCat2- y pGL4.10	DNA	500 ng
	pRL-CMV	0.4 ng
	K2 Transfection Reagent	2 μ L
	DMEM no suplementado	μ L necesarios para aforar a 60 μ L
pGL4.10-CMV	DNA	25 ng

	pRL-CMV	0.4 ng
	K2 Transfection Reagent	2 μ L
	DMEM no suplementado	μ L necesarios para aforar a 60 μ L

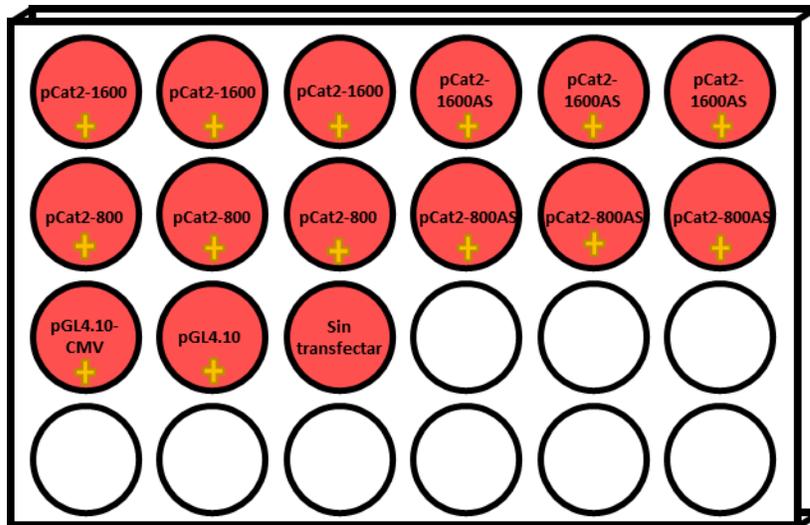


Figura 10. Representación gráfica del montaje de un ensayo de transfección de células con las construcciones del promotor de *Catsper2*. Cada una de las construcciones se transfectó en las líneas celulares MSC-1 y GC-1 spg en tres ensayos independientes cada uno con tres repeticiones; se utilizó pGL4.10-CMV como control positivo, el vector vacío pGL4.10 para calcular la actividad basal y un pozo de células sin transfectar para restar la actividad generada por las células. La cruz amarilla representa los ensayos en que se usó la construcción pRL-CMV como control de transfección.

6.7.2 Lisis celular y ensayos de luciferasa

Para cuantificar la actividad de luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System de Promega. A las 48h pos-transfección se realizó la lisis de las células, para lo cual, se eliminó cuidadosamente todo el medio de cultivo, se lavaron las células con 100 μ L de PBS 1X, se agregaron 100 μ L de buffer de lisis pasiva 1X a cada pozo y se incubó a TA por 15 min en agitación constante; finalmente, se disgregaron bien las células con micropipeta y el contenido celular se transfirió a un

tubo eppendorf, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se almacenó a -20°C por un máximo de 30 días.

Para la cuantificación de las actividades de las luciferasas se agregaron 20 µL de la muestra y 20 µL del Reactivo para el ensayo de luciferasa (LARII), el cual contiene el sustrato para la luciferasa de *Photinus pyralis*, en placas negras de 96 pozos y la lectura se realizó en el equipo Fluoroskan Ascent® FL de Thermo Scientific. Posteriormente, se agregó 20 µL del reactivo Stop & Glo® para detener la primera reacción e iniciar la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis* en el mismo pozo y realizar la lectura en el equipo.

La lectura de la muestra de las células sin transfectar y de un pozo sin muestra se usaron para restar los fondos, la lectura de la actividad de *Renilla reniformis* se usó para normalizar los valores de *Photinus pyralis* y el valor obtenido para PGL4.10 fue tomado como una unidad relativa de luciferasa para escalar los valores obtenidos en las diferentes construcciones.

6.8 Análisis bioinformático

Se realizó análisis *in silico* de una secuencia de nucleótidos de aproximadamente 800pb que contiene la región de -500 a +284 con respecto del inicio de transcripción de *Catsper2* murino. La predicción de elementos de un promotor basal se hizo con el programa YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor (<http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp.cgi>) y la localización de posibles sitios de unión a TFs se llevó a cabo con los programas MatInspector (<https://www.genomatix.de/matinspector.html>), PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) y TFBind (<http://tfbind.hgc.jp/>).

6.9 Rápida amplificación de los extremos 5' de cDNA (RACE 5')

Para identificar sitios de inicio de transcripción, se empleó la técnica de rápida amplificación de los extremos 5' de cDNA. Para esto, se realizó extracción de RNA de testículo de ratón adulto (6-8 semanas) con el reactivo Trizol. La cantidad e integridad se verificó en nanodrop y gel de agarosa 1.2%, respectivamente. A partir del RNA se sintetizó cDNA con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems usando 2 μ L de buffer RT 10X, 0.8 μ L de dNTPs, 2 μ L de random primers, 1 μ L de la enzima MultiScribe, 2 μ g de RNA total y agua libre de nucleasas hasta 20 μ L. La reacción se incubó en termociclador 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y finalmente, 5 min a 85°C. Se descartó posible contaminación con DNA genómico, con oligonucleótidos para amplificar *β -Actina* y *Catsper2*, diseñados para hibridar en exones diferentes (Tabla 1). Además, se eliminó el RNA molde al tratarlo con 1 μ L (5U) de RNase H (NEB) con 1X de buffer de reacción, a 37°C por 20min.

Posteriormente, se añadió una cola de adeninas en el extremo 3' del cDNA para usarla como adaptador utilizando 20U (1 μ L) de la enzima Terminal transferase (NEB), 1X de buffer de reacción, 1X de CoCl_2 y 100 μ M de dATP e incubando la reacción en *thermoblock* a 37°C por 30min. Seguido de esto, la reacción se detuvo con 30 μ L de buffer TE.

Se empleó el oligonucleótido Qt (Tabla 1) para sintetizar la segunda cadena del cDNA y los oligonucleótidos Qo-GSP1 Rev y Qi-GSP2 Rev (Tabla 1) para hacer rondas de amplificaciones con 1X de buffer de reacción, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 200 μ M de dNTPs y 0.25U de *Taq* DNA Polymerase (NEB) con las condiciones que se muestran en la tabla 5.

El producto de PCR fue clonado en el vector pJET y secuenciado siguiendo las metodologías anteriormente descritas con oligonucleótidos que alinean con pJET (T_m = 60°C).

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de PCR usados en la técnica RACES'

Oligonucleótidos empleados	Experimento realizado	Programa del termociclador
Qt	Síntesis segunda cadena del cDNA	95°C/5min 45°C/40min
Qo – GSP1 Rev	Primera ronda de amplificación	95°C/5min 95°C/30s } 45°C/30s } 30 ciclos 68°C/3min } 68°C/10min
Qi – GSP2 Rev	Segunda ronda de amplificación	95°C/5min 95°C/30s } 48°C/30s } 30 ciclos 68°C/3min } 68°C/10min

6.10 Deleciones del promotor de *Catsper2* murino

Se diseñaron 2 oligonucleótidos forward con el sitio de restricción para la enzima XhoI, un oligonucleótido reverse con el sitio de restricción para HindIII y se combinaron para obtener 3 deleciones de la secuencia de 800 pb. Los fragmentos se obtuvieron por PCR a partir de la construcción pCat2-800/pGL4.10 con concentraciones finales de buffer HF 1X, dNTPs 200 µM, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) 0.2U y 0.2 µM de cada oligonucleótido; se usó el programa de termociclador descrito en la tabla 2 con una temperatura de alineamiento de 72°C.

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR se siguió la metodología detallada en los numerales 6.3 a 6.9 para clonar las deleciones del promotor de *Catsper2* en pJET, subclonar en PGL4.10 (para estas construcciones se usaron las enzimas de restricción

XhoI y HindIII) y realizar los ensayos de transfección de las líneas celulares MSC-1 y GC-1 spg y la lectura de las actividades de las luciferasas.

En la figura 11 se observa un montaje de un ensayo de transfección. En este caso las diferencias significativas se determinaron al comparar las actividades transcripcionales de las construcciones que contienen las deleciones con la construcción pCat2-800/pGL4.10.

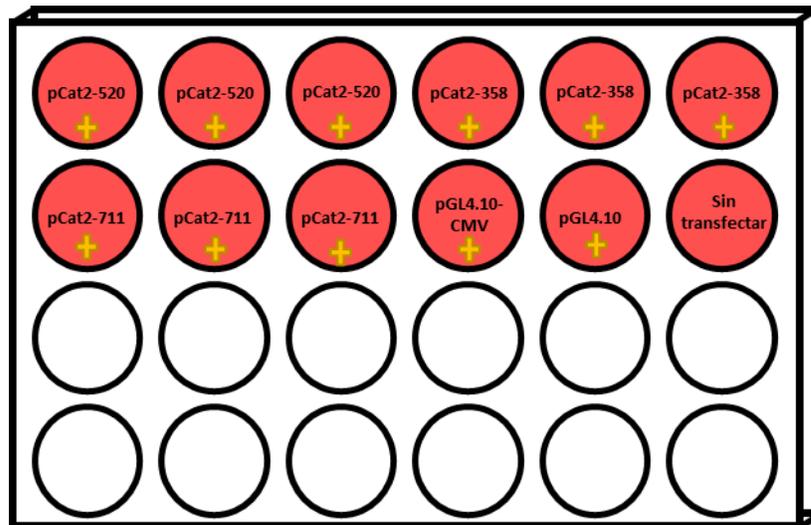


Figura 11. Representación gráfica de un montaje del ensayo de transfección de las líneas celulares MSC-1 y GC-1 spg con las construcciones que contienen deleciones del promotor de *Catsper2*. Cada una de las construcciones se transfectó en ambas líneas celulares en tres ensayos independientes cada uno con tres repeticiones; pGL4.10-CMV se utilizó como control positivo, pGL4.10 vacío se usó para calcular la actividad basal y un pozo de células sin transfectar para restar la actividad generada por las células. La cruz amarilla representa los ensayos en que se usó la construcción pRL-CMV como control de transfección.

6.11 Análisis estadístico

Para graficar las actividades transcripcionales de las diferentes construcciones se empleó el programa GraphPad Prism 6 y se calculó las diferencias significativas realizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba t-student. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como sigue: $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$ y $p < 0.001 = ***$.

7 RESULTADOS

7.1 Obtención de las construcciones con las regiones del promotor de *Catsper2* murino

En un análisis *in silico* previo se encontraron dos promotores putativos para el gen de *Catsper2* murino, uno de ellos de 784pb se ubica sobre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y otro de 601pb río arriba de este; Un fragmento de 1600pb conteniendo ambos promotores fue clonado previamente río arriba del gen de la luciferasa del vector pGL4.10 y a esa construcción se le denominó pCat2-1600. A partir de esta se derivaron las diferentes construcciones del promotor de *Catsper2*. Inicialmente, se realizó una predicción del patrón de corte del plásmido con las enzimas XbaI y XhoI (figura 12A) y posteriormente se determinó que pCat2-1600pb/pGL4.10 tenía el fragmento de 1600pb clonado en sentido a *Catsper2* mediante restricción enzimática con dichas enzimas (figura 12B). Al mismo tiempo, se liberó dicho fragmento y se linealizó el plásmido vector pGL4.10 mediante restricción con la enzima HindIII (figura 12B), para realizar la subclonación del promotor putativo en antisentido y usarlo como control negativo.

Las bacterias candidatas de la subclonación del fragmento de 1600pb en pGL4.10 se analizaron por restricción enzimática con XbaI y XhoI para determinar en cuáles se insertó el fragmento en antisentido, a esta construcción se le denominó pCat2-1600AS (figura 13).

Para subclonar la región del promotor putativo de 784pb que incluye el TSS a partir de pCat2-1600, se utilizaron los oligonucleótidos Cat2-800Fw y Cat2PromRev (Tabla 1). La amplificación se realizó en un gradiente de temperaturas de alineamiento (figura 14) y el producto de PCR fue clonado en el vector de transición pJET, obteniéndose la construcción llamada pCat2-800/pJET. Las bacterias transformadas se analizaron mediante PCR de colonia (figura 15A) y restricción enzimática con HindIII

para liberar el fragmento de pJET. Asimismo, se linealizó pGL4.10 para realizar la subclonación (Figura 15B).

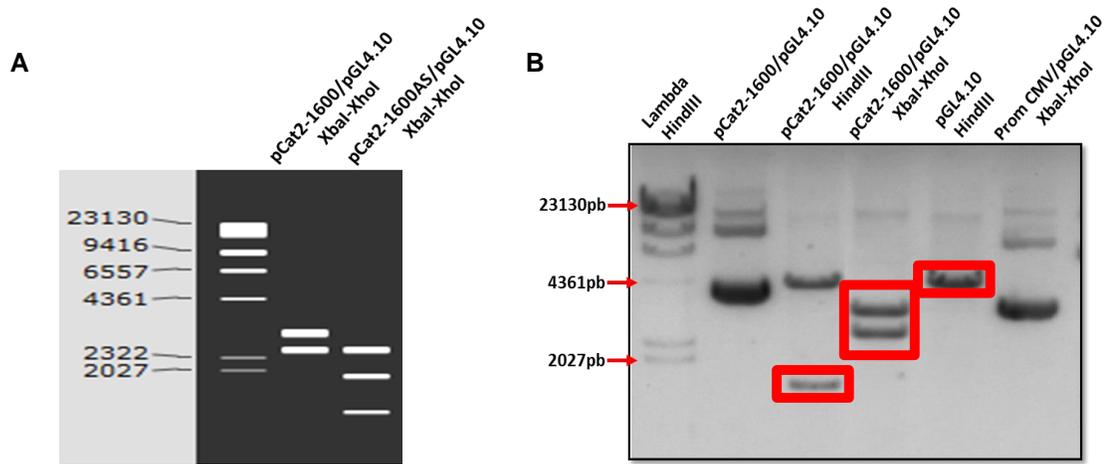


Figura 12. Análisis de la construcción pCat2-1600. Análisis *in silico* del patrón de corte con las enzimas de restricción XbaI y XhoI de la construcción pCat2-1600 que contiene una región de 1600pb del promotor de *Catsper2* en el vector pGL4.10 mediante el programa SnapGene (A). Restricción enzimática de pCat2-1600 con XbaI-XhoI (carril 4) para determinar el sentido del fragmento clonado y restricción con HindIII (carril 3) para liberar el fragmento, así como linealización del vector pGL4.10 con HindIII (carril 5) para realizar una nueva subclonación.

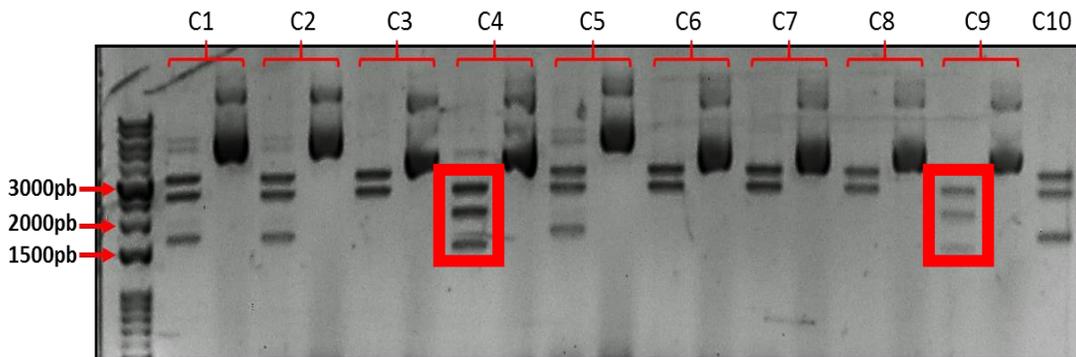


Figura 13. Selección de clonas candidatas con el fragmento de 1600pb clonado en antisentido. DNA plasmídico de las bacterias candidatas transformadas con la construcción de pCat2-1600 derivada de la clonación del fragmento de 1600pb en pGL4.10 (C1-C10) fue analizado por restricción enzimática con las enzimas XbaI y XhoI. Se señalan las colonias que presentaron el fragmento de 1600pb clonado en antisentido a *Catsper2*.

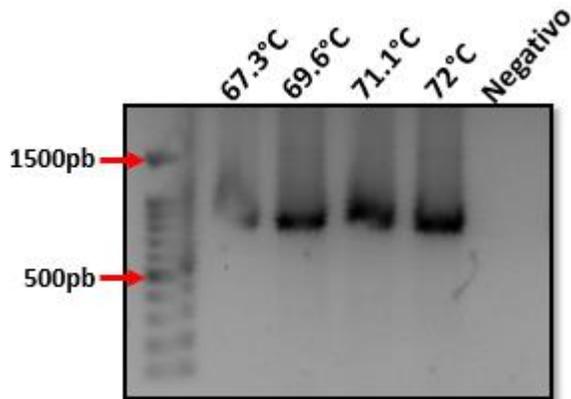


Figura 14. Amplificación de la región promotora de 784pb. Se amplificó un fragmento de 800pb que contiene el promotor putativo de 784pb a partir de la construcción pCat2-1600 usando oligonucleótidos específicos y un gradiente de temperaturas de alineamiento. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa 1.5%.

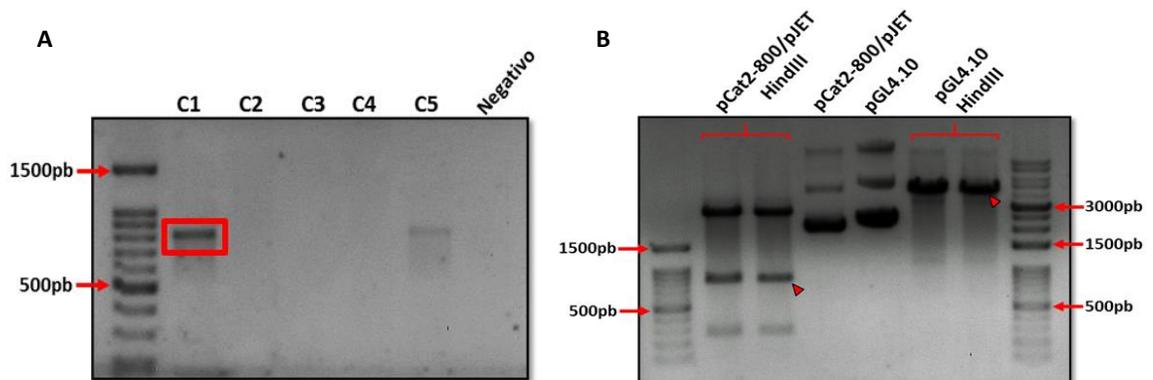


Figura 15. Análisis de bacterias candidatas transformadas con el plásmido pCat2-800/pJET. El fragmento con el promotor putativo de 784pb fue clonado en el vector pJET. Las bacterias transformadas con esta construcción (C1-C5) fueron analizadas por PCR de colonia con los oligonucleótidos que se usaron para amplificar el fragmento con el promotor (A). El fragmento de 800pb se liberó por restricción enzimática con HindIII (carriles 1 y 2) y el vector pGL4.10 se linealizó (carriles 5 y 6) para realizar la subclonación (B).

La construcción derivada de la subclonación del fragmento de 800pb en pGL4.10 fue transformada en bacterias competentes que fueron seleccionadas en placas de agar LB con ampicilina. Las colonias candidatas fueron analizadas mediante PCR de colonia y restricción enzimática con DpnI para determinar las colonias con el fragmento en

sentido y en antisentido (figura 16), construcciones que fueron denominadas pCat2-800 y pCat2-800AS, respectivamente.

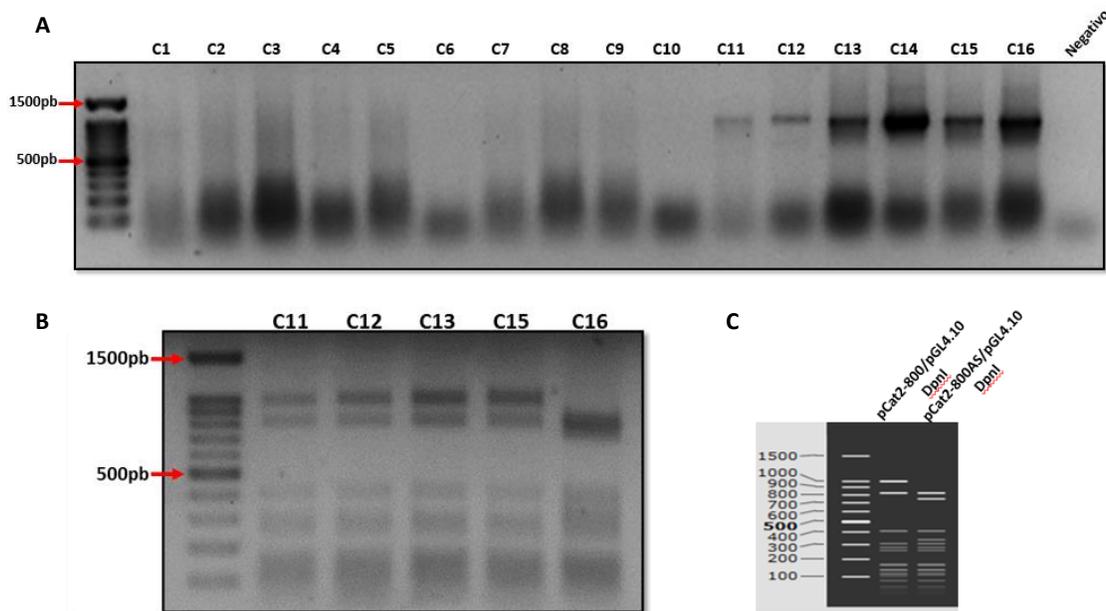


Figura 16. Selección de bacterias candidatas con las construcciones pCat2-800 y pCat2-800AS. Las bacterias transformadas con la construcción de pCat2-800 (C1-C16) se analizaron por PCR de colonia con oligonucleótidos dirigidos a pGL4.10 para observar el fragmento esperado de 1018pb (A) y las colonias positivas se analizaron por restricción enzimática con la enzima DpnI (B) para determinar el sentido en que se clonó el fragmento de 800pb (C).

Finalmente, cada una de las construcciones en el vector pGL4.10 fue secuenciada para descartar mutaciones (Anexo 4). Al analizar las secuencias, se encontraron 2 cambios puntuales que corresponden a polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) reportados en bases de datos (figura 17), por lo tanto, dichos cambios no interfieren en la actividad transcripcional del promotor.



Figura 17. Análisis de las secuenciaciones de las construcciones con la región de 1600pb y 800pb del promotor de *Catsper2*. Se realizó la secuenciación de las construcciones pCat2-1600, pCat2-1600AS, pCat2-800 y pCat2-800AS, en cada una se encontraron 2 cambios de una sola base (imagen representativa en A); sin embargo, estos dos cambios están reportados en bases de datos (NCBI) como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (B).

7.2 Análisis de la actividad transcripcional de los promotores putativos de *Catsper2* murino.

Para analizar la actividad transcripcional de las regiones del promotor de *Catsper2* clonadas en pGL4.10, se transfectaron las líneas celulares MSC-1 y GC-1 spg con las 4 construcciones obtenidas y se realizaron ensayos de luciferasa. Al analizar los datos obtenidos se observó que la construcción pCat2-1600 tuvo una actividad transcripcional en las líneas celulares GC-1 spg y MSC-1, 6 y 84 veces mayor respectivamente, con respecto al control (pGL4.10) y que la construcción pCat2-800 tuvo una actividad transcripcional en GC-1 spg y MSC-1, 11.7 y 100 veces mayor con respecto al control (figura 18). De la misma forma, se observaron actividades transcripcionales de los controles pCat2-1600AS y pCat2-800AS, 7 y 17.2 veces mayor

en las células GC-1 spg y 71 y 103 veces superior en las células MSC-1, respectivamente.

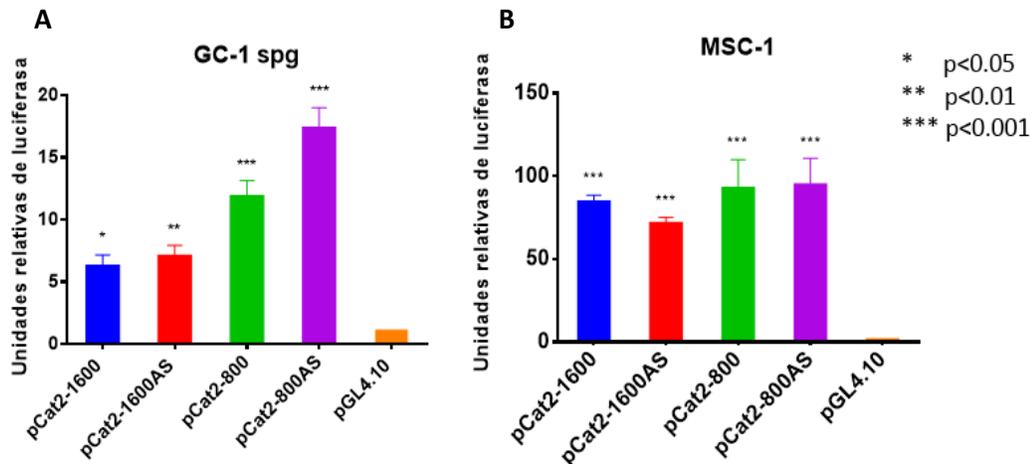


Figura 18. Actividad transcripcional de los promotores putativos de *Catsper2*. Las construcciones con las regiones de 1600pb y 800pb clonadas en sentido o antisentido río arriba del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* fueron co-transfectadas con el plásmido pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus) para normalización de los datos, a las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de las luciferasas. La actividad transcripcional de los promotores putativos de *Catsper2* en las líneas celulares GC-1 spg (A) y MSC-1 (B) se calculó como veces de incremento respecto de la actividad del vector pGL4.10 la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos indican la media \pm SEM, n=3 y los asteriscos las diferencias significativas.

7.3 Análisis *in silico* de la región promotora del gen *Catsper2* murino

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos de luciferasa, se puede decir que la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* se encuentra dentro de la región de 800pb, por lo que se realizó un análisis *in silico* de esta región. Esta región incluye el TSS del gen y coincide con la predicción de una isla CpG (figura 19A). Con el programa YAPP “Eukaryotic Core Promoter Predictor”, se realizó la predicción de los elementos de un promotor basal y se encontró un posible elemento iniciador o INR,

282pb río abajo del TSS reportado, dos posibles elementos río abajo de un promotor o DPE, indicando que los TSS estarían 13pb y 21pb río abajo del TSS reportado y un posible elemento de motivo diez o MTE con el que el inicio transcripcional se ubicaría 32pb río arriba del inicio reportado; en la figura 19B se indican resaltados estos elementos y en negrita se señala el nucleótido que serviría como inicio transcripcional para cada uno de ellos. No se encontraron caja TATA ni caja CAAT en la secuencia analizada.

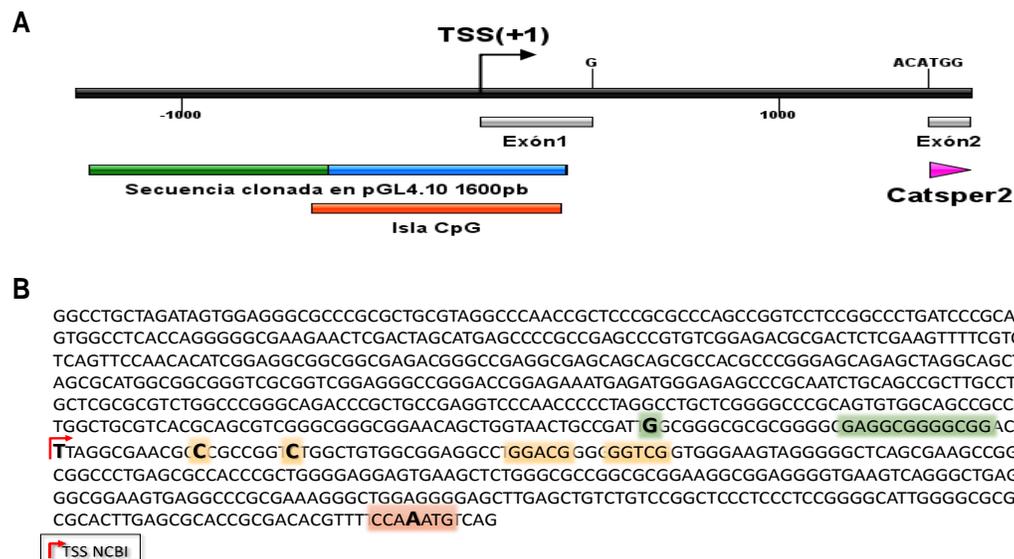


Figura 19. Análisis *in silico* de las señales de transcripción en el promotor de *Catsper2* murino. Análisis *in silico* de la región promotora de 800pb (azul) que coincide con la predicción de una isla CpG (naranja); se muestra la ubicación del promotor con respecto al inicio transcripcional (TSS) de *Catsper2* y se señalan los 2 primeros exones, así como el comienzo de la traducción (fucsia) y la secuencia Kozak (A). En (B) se observa la predicción de elementos de un promotor basal de la secuencia de 800pb con el programa YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor; se ubicó un posible elemento iniciador o INR (color naranja), dos posibles elementos río abajo de un promotor o DPE (color amarillo) y un posible elemento de motivo diez o MTE (color verde). Los inicios transcripcionales de acuerdo con los elementos predichos se encuentran resaltados en negrita y con el color que corresponde a su elemento.

Además de los elementos de un promotor basal, se realizó la predicción de posibles sitios de unión para factores de transcripción con el programa MatInspector de Genomatix. Se observó que en esta región existen secuencias consenso para la unión

de diversos TFs (figura 20A), por lo que también se realizó un análisis con los programas TFBind y PROMO; al comparar los resultados de estos tres programas, resaltó la presencia de 4 sitios consenso para unión de TFs de la familia CREB, denominados sitios CRE (figura 20B).

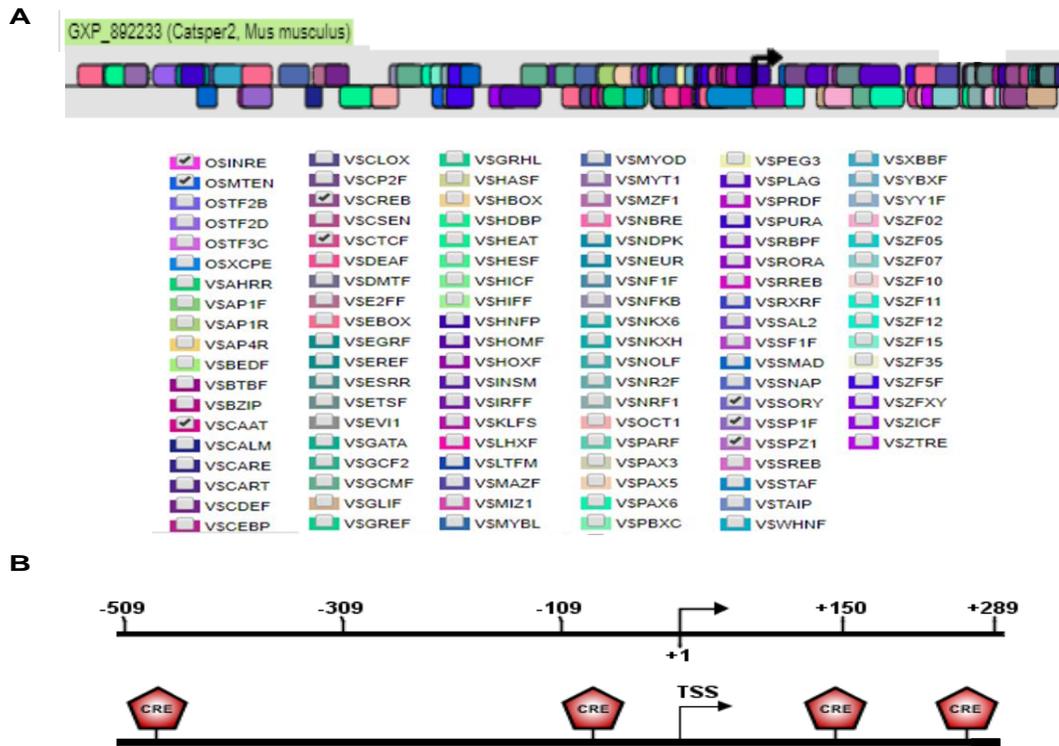


Figura 20 Análisis *in silico* de los sitios de unión a factores de transcripción en el promotor de *Catsper2* murino. Se ubicaron diferentes sitios de unión para gran variedad de factores de transcripción en el promotor de *Catsper2* con el programa MathInspector de Genomatix, (A). Se hallaron cuatro secuencias consenso CRE, que sirven para la unión de factores de transcripción de la familia CREB usando los programas MathInspector, Promo y TFBind (B).

7.4 Determinación de sitios alternos de inicio transcripcional

Las señales de transcripción encontradas en el promotor de 800pb mediante el análisis *in silico* sugieren la presencia de sitios alternativos de inicio de la transcripción para el gen *Catsper2* murino; para identificar dichos sitios se empleó la técnica Rápida

amplificación de los extremos 5' de cDNA (RACE5'). Con este propósito, se obtuvo el RNA de testículos de ratón de 6 a 8 semanas y se verificó en gel de agarosa 1.2% (figura 21A). La pureza del RNA se comprobó al obtener cDNA usando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription y al amplificar un fragmento de 164pb de β -Actina (figura 21B) y un fragmento de 772pb de *Catsper2* (figura 21C), usando oligonucleótidos que alinean en exones diferentes.

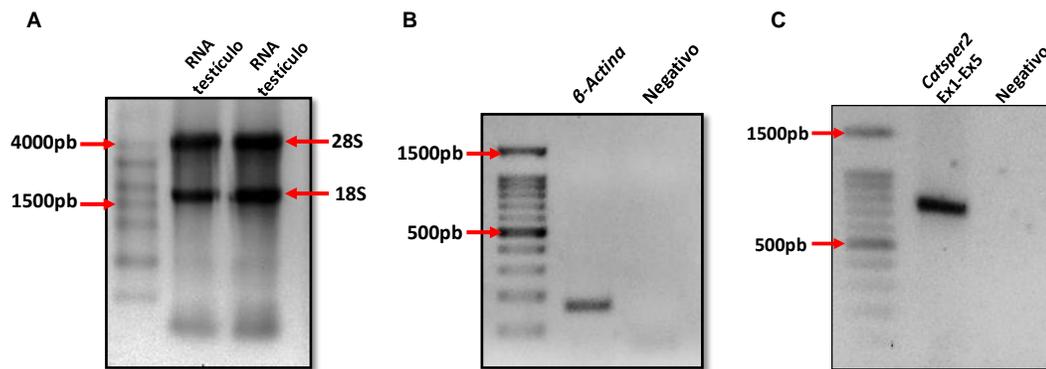


Figura 21. Análisis de RNA de testículo de ratón y síntesis del cDNA de *Catsper2*. Se extrajo RNA total a partir de testículos de ratones CD1 de 6 a 8 semanas de edad y se verificó su integridad en gel de agarosa 1.2% (A), se señalan las bandas que corresponden a RNA ribosomales. Se sintetizó cDNA con un kit comercial y se comprobó su pureza mediante amplificación de fragmentos de β -Actina (B) y *Catsper2* (C) usando oligonucleótidos que hibridan en exones diferentes. Fragmentos esperados: 164pb (B) y 772pb (C).

Al cDNA se le unió el adaptador (cola de poli adeninas) y se realizó una ronda de amplificación usando un oligonucleótido Qt dirigido al adaptador y un oligonucleótido específico de *Catsper2*. El producto de PCR se observó como un barrido en un gel de agarosa 1.2% (figura 22A), por lo que se usó como templado para realizar una segunda ronda de PCR con oligonucleótidos internos. El amplicón obtenido se observó como un fragmento de aproximadamente 250pb (figura 22B), el cual fue clonado en el vector pJET para analizar su secuencia. La secuencia indicó que corresponde al primer exón de *Catsper2*, donde el inicio de la transcripción es una guanina ubicada 316pb río abajo del inicio de transcripción reportado (figura 22C).

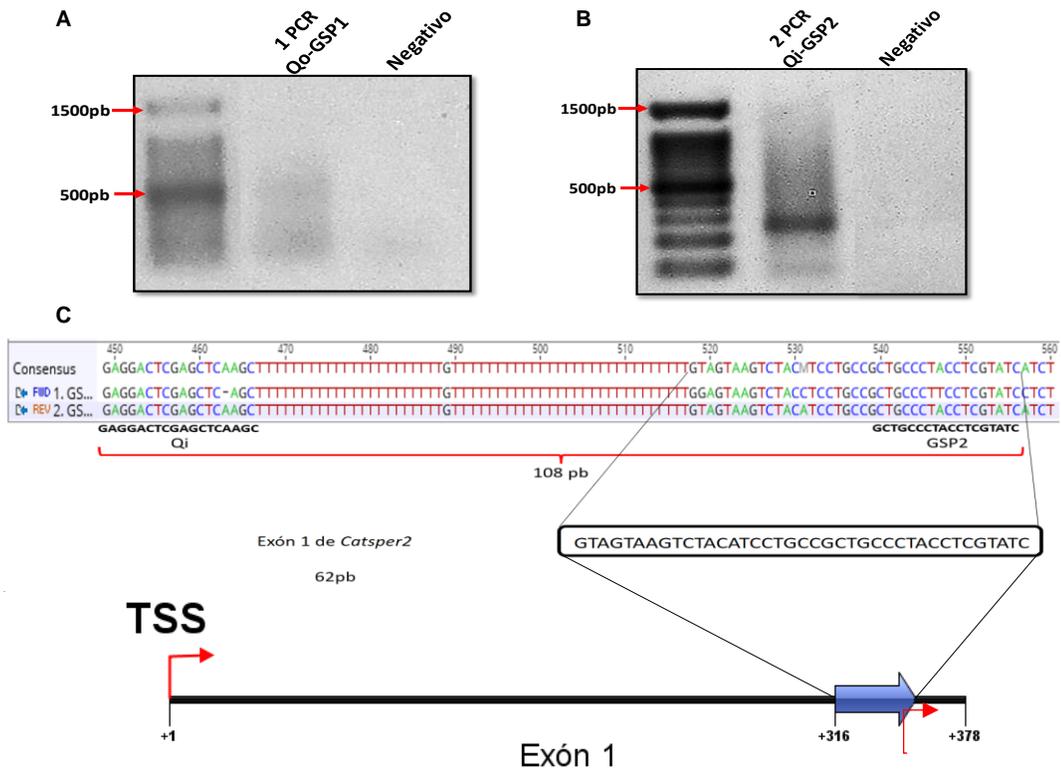


Figura 22. Identificación de sitios alternativos de inicio de transcripción por RACE5'. Se sintetizó cDNA de una cadena a partir del RNA total de testículos de ratón y se le unió una cola de poli adeninas en 3' que sirvió como adaptador para generar la segunda cadena del cDNA y realizar una primera ronda de amplificación con un oligonucleótido dirigido al adaptador y otro específico de *Catsper2* (A); este producto fue usado como templado en una segunda ronda de amplificación con oligonucleótidos internos y se observó en un gel de agarosa 1.2% (B). El producto final fue clonado en pJET y secuenciado; se encontró un sitio alternativo de inicio de la transcripción 316pb río abajo del inicio transcripcional (TSS) reportado en bases de datos (C).

7.5 Construcciones con deleciones del promotor de *Catsper2*

Para determinar la región promotora mínima necesaria para la transcripción de *Catsper2* se realizaron tres deleciones teniendo en cuenta los sitios CRE encontrados *in silico* (figura 23A), las cuales fueron nombradas de acuerdo con el tamaño de su secuencia. En las deleciones denominadas pCat2-520 y pCat2-358 se eliminaron 278pb y 440pb del extremo 5', respectivamente; mientras que en la deleción pCat2-

711 se eliminaron 77pb del extremo 3'. Se amplificaron los fragmentos correspondientes a las deleciones resultantes y se confirmaron los tamaños de los fragmentos esperados de 520pb para pCat2-520, 358pb para pCat2-358 y 711pb para pCat2-711 en un gel de agarosa 1.5% (figura 23B) antes de ser clonadas en el vector pJET.

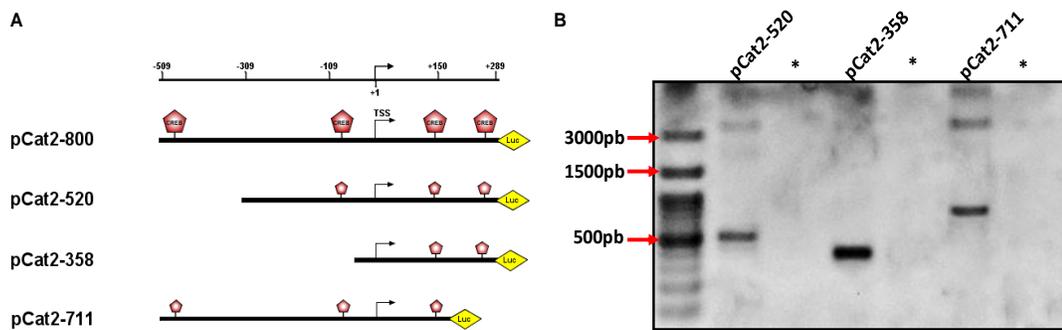


Figura 23. Esquema de las deleciones en el extremo 5' y/o 3' del promotor de *Catsper2* y amplificación de los fragmentos correspondientes. Tomando como referencia los sitios CRE encontrados *in silico*, se plantearon tres deleciones en el extremo 5' y/o 3' y se les nombró de acuerdo con la cantidad de bases que contienen (A). Los fragmentos que contienen las diferentes deleciones se amplificaron a partir de la construcción pCat2-800/pGL4.10 usando oligonucleótidos que agregaron los sitios de restricción para XhoI en 5' y para HindIII en 3' para ser clonados en sentido (B).

Células competentes DH5 α fueron transformadas con las construcciones derivadas de la clonación de los fragmentos del promotor de *Catsper2* con las deleciones en el vector pJET y mediante PCR de colonia se seleccionaron aquellas que expresaron los fragmentos de interés (figura 24). Posteriormente, se extrajo DNA de las candidatas seleccionadas y se realizaron ensayos de restricción enzimática con XhoI y HindIII para liberar los fragmentos con las deleciones y se linealizó el vector pGL4.10 para realizar las subclonaciones (figura 25).

Las bacterias competentes transformadas con las construcciones derivadas de pGL4.10 conteniendo las deleciones del promotor se sembraron en cajas de LB más ampicilina. Finalmente, las candidatas fueron verificadas con ensayos de restricción enzimática para observar la liberación del fragmento con la deleción y por PCR con

oligonucleótidos específicos para pGL4.10 para observar los fragmentos de los tamaños esperados (figura 26). Asimismo, las tres construcciones en pGL4.10 fueron secuenciadas para descartar mutaciones (Anexo 4).

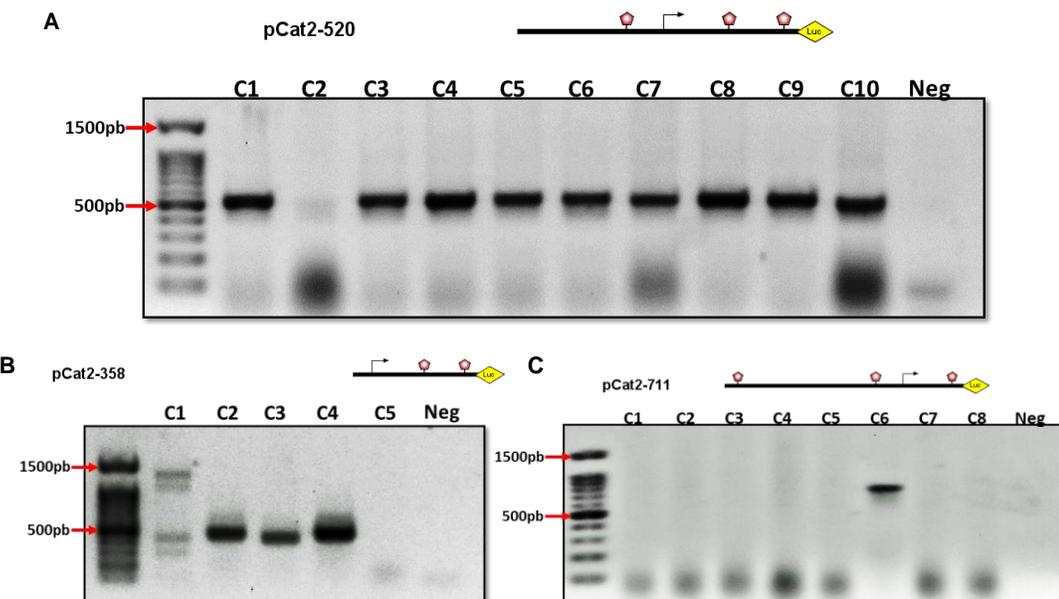


Figura 24. Selección de colonias candidatas transformadas con las construcciones derivadas de pJET conteniendo las deleciones del promotor de *Catsper2*. Las bacterias transformadas con las construcciones derivadas de la clonación de las deleciones del promotor de *Catsper2* en pJET (C1-C10, C1-C5 y C1-C8) fueron analizadas por PCR de colonia usando oligonucleótidos que hibridan al vector pJET y se seleccionaron aquellas candidatas que amplificaron los fragmentos esperados para cada deleción: 520pb para pCat2-520 (A), 478pb para pCat2-358 (B) y 831pb para pCat2-711(C).

7.6 Actividad transcripcional de las deleciones del promotor de *Catsper2* murino

Para analizar la actividad de las construcciones con las diferentes deleciones del promotor de *Catsper2*, se transfectaron las líneas celulares MSC-1 y GC-1 spg y se analizaron las actividades de luciferasa. Se observó en la línea celular GC-1 spg (figura 27A) que la deleción de 278pb en el extremo 5' (pCat2-520/pGL4.10) generó una actividad transcripcional 20.4 veces mayor con respecto al vector pGL4.10 vacío, la deleción 5' de las siguientes 160pb (440pb en total) ocasionó una actividad

transcripcional 10.2 veces mayor que el control y la delección de 77pb en el extremo 3' resultó en una actividad de 26.5 veces mayor.

Por otro lado, en la línea celular MSC-1 (figura 27B), la actividad promotora de pCat2-520, pCat2-358 y pCat2-711 fue 211.9, 50 y 101.6 veces superior que el vector vacío.

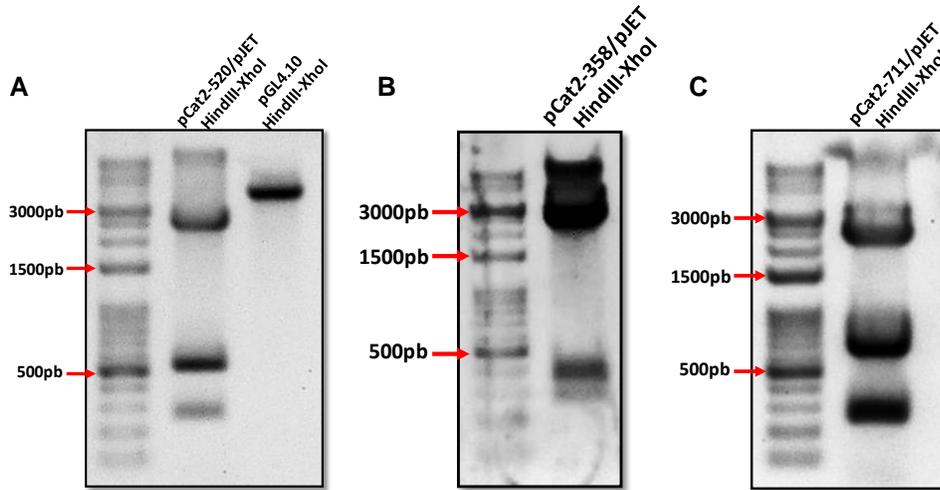


Figura 25. Liberación de los fragmentos conteniendo las delecciones del promotor de *Catsper2*. Los fragmentos que contienen las delecciones: 520pb para pCat2-520 (A), 358pb para pCat2-358(B) y 711pb para pCat2-711(C) fueron liberados con restricción enzimática usando las enzimas XhoI y HindIII. Con las mismas enzimas se cortó el plásmido pGL4.10 (A). Cada banda fue cortada del gel y purificada para ser subclonada en pGL4.10.

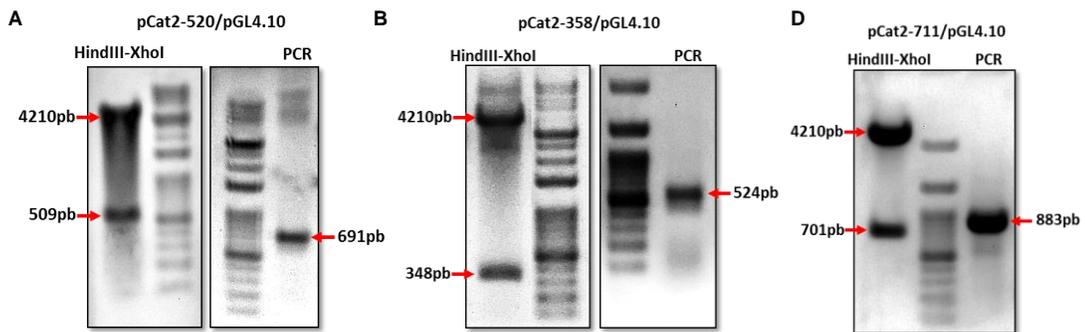


Figura 26. Selección de colonias candidatas transformadas con las construcciones derivadas de pGL4.10 conteniendo las delecciones del promotor de *Catsper2*. Las bacterias transformadas con las construcciones derivadas de la clonación de las delecciones del promotor de *Catsper2* en pGL4.10, pCat2-520 (A), pCat2-358 (B) y pCat2-711 (C) fueron analizadas mediante restricción con las enzimas XhoI y HindIII para verificar el

tamaño del fragmento liberado y por PCR con oligonucleótidos específicos para pGL4.10 para comprobar el tamaño de los fragmentos amplificados.

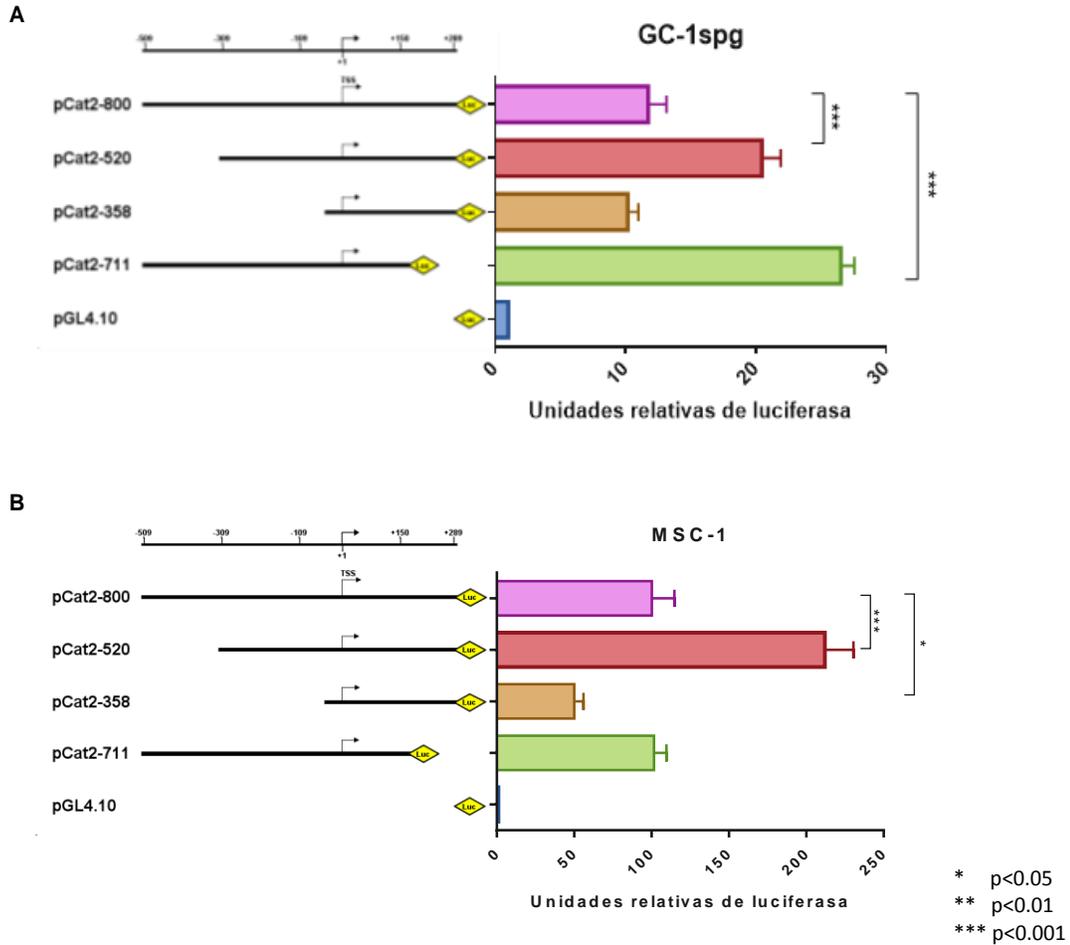


Figura 27. Determinación del promotor basal de *Catsper2* murino. Para delimitar el promotor mínimo de *Catsper2*, las construcciones con las deleciones del promotor de *Catsper2* clonadas río arriba del gen de luciferasa de *Photinus pyralis* fueron co-transfectadas con el plásmido pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con promotor de citomegalovirus) para normalización de los datos; a las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de luciferasa. La actividad transcripcional de las construcciones con las deleciones del promotor de *Catsper2* en las líneas celulares GC-1 spg (A) y MSC-1 (B).se calculó como número de veces de incremento con respecto a la actividad del vector pGL4.10, la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados en triplicado. Los datos indican la media \pm SEM, n=3 y los asteriscos las diferencias significativas con la actividad del promotor completo (pCat2-800).

8 DISCUSIÓN

Catsper2 es un gen de expresión restringida a las células germinales de testículo, específicamente a partir de espermatoцитos paquitenos (Li et al., 2007); su proteína participa en la formación del canal de calcio CATSPER que se ubica en la pieza principal del flagelo del espermatozoide y lo convierte en un gen esencial para la fertilidad masculina (Timothy A Quill et al., 2003b; Shukla et al., 2012). Hasta el momento, es poco lo que se sabe acerca de la regulación que tienen los genes *Catsper*, aunque un mejor entendimiento de dicha regulación extiende la posibilidad de volver a estos genes, blancos terapéuticos en el control de la natalidad. En este sentido, nuestro grupo de trabajo es pionero en la investigación sobre la regulación transcripcional de estos genes y en el presente trabajo se realizó la caracterización estructural del promotor del gen *Catsper2* murino.

Así, fue interesante encontrar actividad transcripcional en las células GC-1 spg y MSC-1 a partir de una región de 1600pb que contiene dos promotores putativos encontrados en un análisis *in silico* previo. Esto indica que a pesar de que *Catsper2* es un gen de expresión específica en células germinales, su promotor también presenta actividad transcripcional en células somáticas; mismo hecho que reportan Mata-Rocha et al., (2013) para el promotor de *Catsper1* murino que presentó actividad transcripcional en células MSC-1 así como en células HEK293 (human embryonic kidney 293).

Sin embargo, las diferencias entre las actividades observadas se pueden atribuir a un perfil transcripcional distinto de cada línea celular (Kim et al., 2003), ya que mientras las células MSC-1 son células somáticas, las células GC-1 spg son células germinales. También, la actividad más baja de esta región observada en las células germinales indica que esta secuencia está regulada negativamente por factores de transcripción que son específicos de las células GC-1 spg, las cuales representan células en etapas de espermatogonia tipo B y espermatoцитos primarios, etapas tempranas de la espermatogénesis donde aún no comienza la expresión de *Catsper2*.

En la región más corta, de 800pb, que contiene sólo el promotor que está sobre el inicio transcripcional, la actividad transcripcional es superior en las células GC-1 spg,

respecto a la región de 1600pb y la actividad en las células MSC-1 no presentó diferencias significativas. Esto sugiere que es en esta región donde se encuentra el promotor de *Catsper2* y que la región río arriba no presenta señales relevantes para la transcripción. Además, por las coordenadas de esta región (-500 a +284 respecto al TSS), es probable que la actividad transcripcional observada se deba a la presencia de los promotores proximal y central de *Catsper2*.

Un resultado interesante obtenido en el presente trabajo es el de la actividad transcripcional de las regiones del promotor clonadas en antisentido. Este fenómeno también es observado en el promotor de *Catsper1* (Mata-Rocha et al., 2013), ya que un nuevo gen divergente a *Catsper1* que codifica para un RNA largo no codificante, cuya función aún es desconocida se expresa a partir del promotor de *Catsper1* (Jiménez-Badillo et al., 2017). Sin embargo, La actividad transcripcional de los promotores putativos de *Catsper2* tanto en sentido como en antisentido podría deberse a que esta región se encuentra entre los genes *Catsper2* y *Pdia3*. Los promotores de ambos genes pueden estar traslapados o bien expresarse a partir de un promotor divergente.

Los promotores divergentes o bidireccionales son más comunes de lo que antes se pensaba (Engström et al., 2006) y presentan algunas características que sirven para su identificación, entre las que se encuentran: 1) La secuencia promotora se ubica entre el inicio transcripcional de dos genes divergentes, 2) el TSS de ambos genes está separado por menos de 1000pb y 3) estos promotores se encuentran sobre islas CpG en más del 70% de los casos (Trinklein et al., 2004). De manera interesante, en el caso del promotor de *Catsper2* se cumplen estas tres características, ya que el inicio de transcripción de *Catsper2* y *Pdia3* está separado sólo por 18pb; además, en el análisis *in silico* preliminar se encontró una isla CpG sobre la región de 800pb del promotor (figura 19).

Otro aspecto importante de estos promotores, es que la mayoría de ellos regulan genes que tienen funciones relacionadas y que se expresan de forma coordinada o simétrica (Orekhova y Rubtsov, 2013); sin embargo, también hay reportes de genes

divergentes cuyo promotor bidireccional actúa de forma asimétrica (Chen et al., 2007). En este sentido, aunque *Catsper2* se expresa de forma específica en testículo, *Pdia3* codifica para una proteína disulfuro isomerasa que se expresa de forma ubicua y que se ha asociado a múltiples funciones (Coe y Michalak, 2010; G. Zhao et al., 2015), pero también se ha evaluado su distribución en las diferentes células del proceso de espermatogénesis y su papel en la unión entre el espermatozoide y el óvulo, ya que se ha observado que la inhibición de esta proteína impide la unión de ambos gametos (Ellerman et al., 2006; Tokuhiko et al., 2012; Zhao et al., 2013), indicando que ambos genes participan en el proceso de fecundación.

No obstante, sería necesario realizar otros experimentos, como el análisis de la actividad transcripcional de la región de 800pb en ambos sentidos de forma simultánea, usando una construcción donde se clone esta secuencia en medio de dos genes reporteros y determinar si los mismos factores de transcripción activan el promotor en ambas direcciones. Asimismo, es necesario realizar la secuenciación por bisulfito para determinar los patrones de metilación del promotor de *Catsper2* para comprobar o descartar que la metilación de su isla CpG juega un papel importante en la regulación de este promotor y la expresión de *Pdia3* y *Catsper2*.

El análisis *in silico* de la región de 800pb que conserva la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2*, revela la ausencia de caja TATA, característica de promotores que contienen islas CpG, denominados TATA-less (Carninci et al., 2006). Asimismo, no se encontró la caja CAAT pero se encontraron posibles elementos de un promotor basal, entre ellos un posible sitio INR, dos posibles sitios DPE y un posible sitio MTE, señales que son reconocidas por diferentes subunidades de la maquinaria transcripcional basal (Kumar et al., 2014). Sin embargo, todos estos elementos se ubican en coordenadas diferentes y ninguno de ellos coincide con el TSS reportado en bases de datos; este hecho aunado a que el primer exón de *Catsper2* no se traduce, genera incertidumbre sobre la existencia de sitios alternativos de inicio de la transcripción para *Catsper2*.

Con respecto a los sitios de unión para factores de transcripción, destacan ZF5F (factor de transcripción con dominio POZ), AP1 (proteína activadora 1), E2F (factor de transcripción E2F), SP1 (proteína de especificidad 1), CTCF (factor de unión a CCCTC) y CREBP (proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP). De estos factores, SP1 es conocido por reclutar a la proteína de unión a caja TATA (TATA binding protein, TBP) en promotores TATA-less (Butler y Kadonaga, 2002; Carninci et al., 2006), lo que podría ser el caso del promotor de *Catsper2*, ya que los sitios de unión para este factor se encontraron en las posiciones -34 y -20 con respecto del TSS, región en la que se ubica la caja TATA en los promotores que la contienen.

Otras dos familias de TFs que sobresalen, son CTCF y CREBP, ya que se ha llegado a la conclusión de que ratones machos knockout para CTCF y para la isoforma CREM τ (elemento modulador en respuesta a cAMP) de la familia CREBP, son estériles (Hernández-Hernández et al., 2016; Nantel et al., 1996); por lo que estos factores podrían estar regulando el promotor de *Catsper2*. De todos estos sitios encontrados, destacan los cuatro sitios CRE que son reconocidos por los factores de la familia CREBP (figura 20) destacaron debido a que, para su activación necesitan de la vía del cAMP (Walker y Habener, 1996), que también interviene en la activación del canal CATSPER (Navarro et al., 2008). Sin embargo, es necesario verificar la participación de estos factores y su efecto sobre la actividad transcripcional de la región de 800pb mediante ensayos de co-transfección sobre-expresando los factores; así como verificar la importancia de los sitios consenso para estos factores por medio de ensayos de mutagénesis sitio dirigida y de cambio en la movilidad electroforética (EMSAs) e *in vivo* a través de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

La presencia de varios TSS también es una característica propia de los promotores que contienen islas CpG (Carninci et al., 2006) y está asociada a la generación de transcritos con diferentes 5'UTRs (regiones no traducidas) que participan en la estabilidad del mRNA y en la regulación de la traducción (Choudhuri, 2014). Así, el análisis mediante la técnica de RACE5' indicó la presencia de un sitio de inicio de transcripción alternativo 316pb río abajo del TSS reportado (figura 22), con lo que se

transcribiría un primer exón de 62pb en lugar de 377pb. La existencia de 5'UTRs diferentes y su papel en la regulación postranscripcional de los genes, podrían estar relacionados con el hecho de que el transcrito de *Catsper2* es el primero de la familia de genes *Catsper* que se expresa, en espermatoцитos paquitenos, mientras que su proteína se expresa en la etapa final de la espermatogénesis cuando se da la formación de la cola del espermatozoide.

En una secuencia promotora, el promotor central o basal, es la secuencia mínima necesaria para que haya transcripción basal de un gen. El análisis delecional de la región de 800pb tomando como referencia los 4 sitios CRE encontrados *in silico* indica que la deleción de 280pb del extremo 5' origina un aumento de la actividad transcripcional en las líneas celulares GC-1 spg y MSC-1, indicando que en esa región se encuentra una zona de represión que posiblemente está regulada por factores de transcripción que se expresan de forma ubicua, como por ejemplo CTCF que es un factor represor y tomando en cuenta que el análisis *in silico* indica la presencia de un sitio de unión para este factor en la región deletada.

La eliminación de 440pb del extremo 5', produce se observó una disminución de la actividad transcripcional en las células GC-1 spg y en las células MSC-1, por lo que, en este caso, la región deletada representa una zona de activación que probablemente también está regulada por factores de transcripción ubicuos como por ejemplo AP1, que actúa como un dímero de dos proteínas de las familias de factores de transcripción Fos, Jun y/o ATF/CREB y estimula a la RNA pol II para realizar la transcripción (Clark y Pazdernik, 2016).

Finalmente, la deleción de 89pb del extremo 3' causa en un aumento de la actividad transcripcional en la línea celular GC-1 spg mientras que en la línea celular MSC-1 no hay diferencias significativas con la actividad transcripcional de la región de 800pb completa. Estos resultados indican que en la región eliminada existe regulación por factores de transcripción represores que son específicos del cambio entre Mitosis y Meiosis I de la espermatogénesis y, que es la etapa en que se encuentran las células GC-1 spg. Algunos de los factores que pueden estar participando en dicha regulación

negativa son CREM α , CREM β y CREM γ , que son isoformas represoras del factor CREM de la familia CREBP, específicos de la etapa en que se encuentran las células GC-1 spg (Behr y Weinbauer, 2000; Walker y Habener, 1996).

Con estos resultados se puede deducir que el promotor mínimo de *Catsper2* se encuentra en la región comprendida entre los nucleótidos -69 y +289 con respecto del TSS reportado en bases de datos, puesto que fue la región más pequeña en la que se observó actividad transcripcional. Sin embargo, sería interesante analizar la actividad transcripcional de otra construcción más corta en donde se elimine la región 3' de 89pb, ya que se observó que esa región representa una zona de represión en las células germinales. Asimismo, los datos indican la existencia de un sitio alternativo de inicio transcripcional 316pb río abajo del TSS reportado.

9 CONCLUSIONES

- El promotor de *Catsper2* se encuentra dentro de la región de 800pb, la cual tiene una actividad promotora de aproximadamente 12 y 100 veces más que el control en las líneas celulares GC-1 spg y MSC-1, respectivamente.
- El promotor de *Catsper2* tiene posibles sitios de unión para diversos factores de transcripción ubicuos y específicos de testículo (CRE).
- Se encontró un posible sitio de inicio de transcripción alternativo de *Catsper2* que sugiere la existencia de un transcrito donde el primer exón no traducible tendría una longitud de 62pb.
- El promotor mínimo de *Catsper2* se encuentra dentro de la región entre los nucleótidos -69 y +289 respecto del TSS reportado en bases de datos.

10 PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad transcripcional de una construcción derivada de pCat2-358 que no tenga las 89pb del extremo 3' (pCat2-256) para determinar si el promotor mínimo se encuentra en una región más corta.
- Determinar los patrones de metilación del promotor de *Catsper2* murino mediante secuenciación por bisulfito.
- Analizar el efecto de la co-transfección de la construcción con el promotor de *Catsper2* y construcciones que sobre-expresen factores de transcripción relevantes para este promotor, como por ejemplo factores de la familia CREB.

Realizar ensayos de protección a DNAsa para verificar cuáles de las señales encontradas en el análisis *in silico* son funcionales.

11 REFERENCIAS

- Avidan, N., Tamary, H., Dgany, O., Cattan, D., Pariente, A., Thulliez, M., ... Beckmann, J. S. (2003). CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *European journal of human genetics : EJHG*, 11(7), 497–502.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200991>
- Babcock, D. F. (2007). Wrath of the wraiths of *CatSper3* and *CatSper4*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1107–8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0610909104>
- Behr, R. y Weinbauer, G. (2000). CREM activator and repressor isoforms in human testis: sequence variations and inaccurate splicing during impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 6(11), 967–972.
<https://doi.org/10.1093/molehr/6.11.967>

- Butler, J. E. F. y Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*, 16(20), 2583–2592. <https://doi.org/10.1101/gad.1026202>.The
- Carlson, A. E., Quill, T. A., Westenbroek, R. E., Schuh, S. M., Hille, B. y Babcock, D. F. (2005). Identical phenotypes of *CatSper1* and *CatSper2* null sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32238–32244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501430200>
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., ... Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, 38(6), 626–635. <https://doi.org/10.1038/ng1789>
- Chen, P. Y., Chang, W. S. W., Chou, R. H., Lai, Y. K., Lin, S. C., Chi, C. Y. y Wu, C. W. (2007). Two non-homologous brain diseases-related genes, SERPINI1 and PDCD10, are tightly linked by an asymmetric bidirectional promoter in an evolutionarily conserved manner. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-2>
- Choudhuri, S. (2014). Fundamentals of Genes and Genomes. En *Bioinformatics for Beginners* (pp. 1–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00001-3>
- Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. y Clapham, D. E. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nature Communications*, 2(1), 153. <https://doi.org/10.1038/ncomms1153>
- Clark, D. P. y Pazdernik, N. J. (2016). DNA, RNA, and Protein. En *Biotechnology* (2a ed., pp. 33–61). Science Direct. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00002-8>
- Coe, H. y Michalak, M. (2010). ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(6), 796–799. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.01.009>
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. y Espinosa, F. (1999). Ion channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews*, 79(2), 481–510.
- de Vooght, K. M. K. y van Solinge, W. W. (2009). Gene promoter analysis in molecular diagnostics: do or don't? *Expert review of molecular diagnostics*, 9(5), 403–405. <https://doi.org/10.1586/erm.09.28>
- Dikstein, R. (2011). The unexpected traits associated with core promoter elements. *Transcription*, 2(5), 201–206. <https://doi.org/10.4161/trns.2.5.17271>
- Eddy, E. M. (1998). Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Cell & Developmental Biology*, 9(sr980201), 451–457.

- Eddy, E. M. (2002). Male Germ Cell Gene Expression. *Recent Progress in Hormone research*, 57, 103–128.
- Ellerman, D. A., Myles, D. G. y Primakoff, P. (2006). A Role for Sperm Surface Protein Disulfide Isomerase Activity in Gamete Fusion: Evidence for the Participation of ERp57. *Developmental Cell*, 10(6), 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.011>
- Engström, P. G., Suzuki, H., Ninomiya, N., Akalin, A., Sessa, L., Lavorgna, G., ... Lipovich, L. (2006). Complex loci in human and mouse genomes. *PLoS Genetics*, 2(4), 564–577. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020047>
- Hernández-Hernández, A., Lilienthal, I., Fukuda, N., Galjart, N. y Höög, C. (2016). CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep28355>
- Hess, R. (1999). Spermatogenesis, Overview. En *Encyclopedia of Reproduction* 4 (pp. 539–545).
- Jiménez-Badillo, S. E., Oviedo, N., Hernández-Guzmán, C., González-Mariscal, L. y Hernández-Sánchez, J. (2017). *Catsper1* promoter is bidirectional and regulates the expression of a novel lncRNA. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13867-2>
- Jin, J.-L., O'Doherty, A., Wang, S., Zheng, H., Sanders, K. y Yan, W. (2005). *Catsper3* and *Catsper4* Encode Two Cation Channel-Like Proteins Exclusively Expressed in the Testis. *Biology of Reproduction*, 73(6), 1235–1242. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045468>
- Kim, S. Y., Choi, S. Y., Chao, W. y Volsky, D. J. (2003). Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1): Cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 87(6), 1485–1498. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02128.x>
- Kimmins, S., Kotaja, N., Davidson, I. y Sassone-Corsi, P. (2004). Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 128(1), 5–12. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00170>
- Kolasa, A., Misiakiewicz, K., Marchlewicz, M. y Wiszniewska, B. (2012). The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reproductive Biology*, 12(1), 5–23. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60074-6](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60074-6)
- Kretser, D. M. De, Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. y Wreford, N. (1998).

- Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13, 1–8.
- Kumar, A., Garg, S. y Garg, N. (2014). *Regulation of Gene Expression. Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine* (Segunda).
- Li, H. G., Ding, X. F., Liao, A. H., Kong, X. B. y Xiong, C. L. (2007). Expression of *CatSper* family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: Relationship to sperm motility. *Molecular Human Reproduction*, 13(5), 299–306. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam009>
- Lim, C. Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U. y Kadonaga, J. T. (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes and Development*, 32(18), 1606–1617. <https://doi.org/10.1101/gad.1193404.interactions>
- Liu, J., Xia, J., Cho, K. H., Clapham, D. E. y Ren, D. (2007). CATSPER β , a novel transmembrane protein in the CATSPER channel complex. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 18945–18952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701083200>
- Lobley, A., Pierron, V., Reynolds, L., Allen, L. y 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. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-53>
- 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. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat003>
- Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N., Masquiller, D., LeMeur, M., Henriksen, K., ... Sassone-Corsi, P. (1996). Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*, 380, 159–162.
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J. J. y Clapham, D. E. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 607–613. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072554bn>
- Nishigaki, T., Romero, F. y Sánchez-Guevara, Y. (2016). CATSPER , el canal de Ca²⁺ que regula el batido flagelar del espermatozoide en eucariontes. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 28–35.
- Orekhova, A. S. y Rubtsov, P. M. (2013). Bidirectional promoters in the transcription of mammalian genomes. *Biochemistry (Moscow)*, 78(4), 335–341.

<https://doi.org/10.1134/S0006297913040020>

- Pedersen, A. G., Baldi, P., Brunak, S. y Chauvin, Y. (1996). Characterization of Prokaryotic and Eukaryotic Promoters Using Hidden Markov Models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 4, 182–191.
- Pizzari, T. (2006). Of mice and sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(41), 14983–14984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607091103>
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., ... Clapham, D. E. (2007). All four CATSPER ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1219–1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610286104>
- Quill, T. A., Ren, D., Clapham, D. E. y Garbers, D. L. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12527–12531. <https://doi.org/10.1073/pnas.221454998>
- Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E. y Garbers, D. L. (2003a). Hyperactivated sperm motility driven by *CatSper2* is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14869–14874. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136654100>
- 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. <https://doi.org/10.1038/35098027>
- Schultz, N., Hamra, F. K. y Garbers, D. L. (2003). A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12201–12206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635054100>
- Sharma, R. y Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: An Overview. En A. Zini & A. Agarwal (Eds.), *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction* (pp. 19–44). <https://doi.org/10.100/978-1-4419-6857-9>
- Shukla, K. K., Mahdi, A. A. y Rajender, S. (2012). Ion Channels in Sperm Physiology and Male Fertility and Infertility. *Journal of Andrology*, 33(5), 777–788. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.015552>
- Singh, A. P. y Rajender, S. (2015). CATSPER channel, sperm function and male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(1), 28–38.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.014>

- Song, C., Gao, B., Wu, H., Xie, Y., Wang, X., Li, B., ... Mao, J. (2011). Molecular cloning, spatial and temporal expression analysis of *CatSper* genes in the Chinese Meishan pigs. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *9*(1), 132–143.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-132>
- Tokuhiro, K., Ikawa, M., Benham, A. M. y Okabe, M. (2012). Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(10), 3850–3855.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1117963109>
- Trinklein, N. T., Force Aldred, S., Hartman, S. J., Schroeder, D. I., Otilar, R. P. y Myers, R. M. (2004). An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Research*, *14*(1), 62–66. <https://doi.org/10.1101/gr.1982804>
- Velázquez, G. (2009). Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, *1*(4), 115–130. Recuperado a partir de <http://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2009/mr094b.pdf>
- Ventelä, S. (2003). *REGULATION OF SPERMATOGENESIS : Differentiation of GFP-labeled Stem Cells and the Function of cytoplasmatic bridges*. University of Turku, Finland and Turku Graduate School of Biomedical Sciences.
- Walker, W. H. y Habener, J. F. (1996). Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *7*(4), 133–138. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(96\)00035-5](https://doi.org/10.1016/1043-2760(96)00035-5)
- Wang, H., Liu, J., Cho, K.-H. y Ren, D. (2009). A Novel, Single, Transmembrane Protein CATSPERG Is Associated with CATSPER1 Channel Protein. *Biology of Reproduction*, *81*(3), 539–544. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077107>
- Wistuba, J., Stukenborg, J.-B. y Luetjens, C. M. (2007). Mammalian Spermatogenesis. *Functional Development and Embryology*, *1*(2), 99–117.
[https://doi.org/10.1016/S1067-5701\(96\)80011-8](https://doi.org/10.1016/S1067-5701(96)80011-8)
- Yamamoto, Y. Y., Yoshioka, Y., Hyakumachi, M. y Obokata, J. (2011). Characteristics of Core Promoter Types with respect to Gene Structure and Expression in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, *18*(5), 333–342. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsr020>
- Zhang, D. y Gopalakrishnan, M. (2005). Sperm Ion Channels: Molecular Targets for the Next Generation of Contraceptive Medicines? *Journal of Andrology*, *26*(6), 643–653.

<https://doi.org/10.2164/jandrol.05009>

Zhao, G., Lu, H. y Li, C. (2015). Proapoptotic activities of Protein Disulfide Isomerase (PDI) and PDIA3 protein, a role of the Bcl-2 protein Bak. *Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 8949–8963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619353>

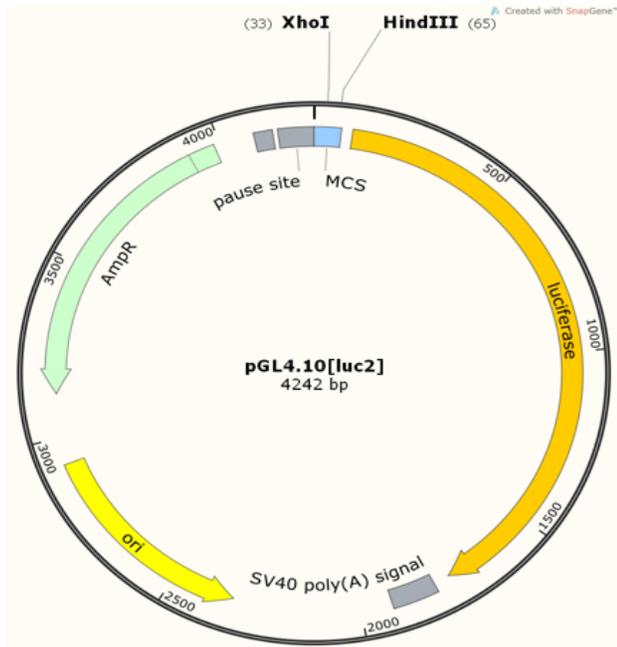
Zhao, X. J., Tang, R. Z., Wang, M. L., Guo, W. L., Liu, J., Li, L. y Xing, W. J. (2013). Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), 59–63. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02024.x>

12 ANEXOS

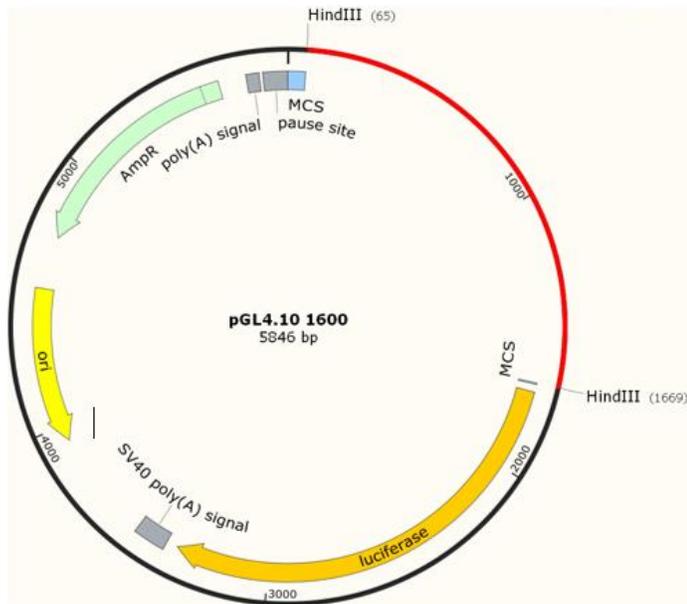
Anexo 1. Composición de los buffers del kit QIAGEN Plasmid Midi

Buffer	Composición
Buffer P1 (buffer de resuspensión)	50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Buffer P2 (buffer de lisis)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)
Buffer P3 (buffer de neutralización)	3.0 M potassium acetate, pH 5.5
Buffer QBT (buffer para equilibrar)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)
Buffer QC (buffer de lavado)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)
Buffer QF (buffer de elución)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris·Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)

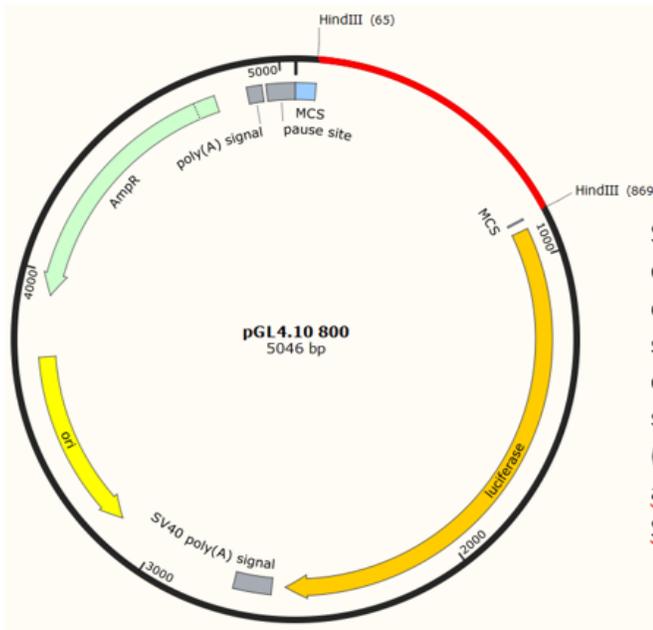
Anexo 2. Mapas de las construcciones usadas en los ensayos de transfección



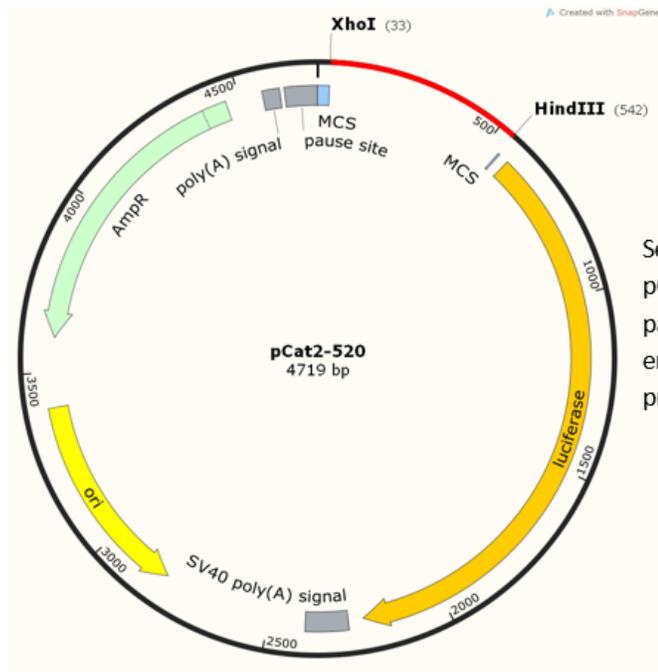
Se observa el mapa del plásmido pGL4.10 con sus características más importantes y se encuentran señalados los sitios de restricción para las enzimas XhoI y HindIII usados en este trabajo. Tomado del programa SnapGene.



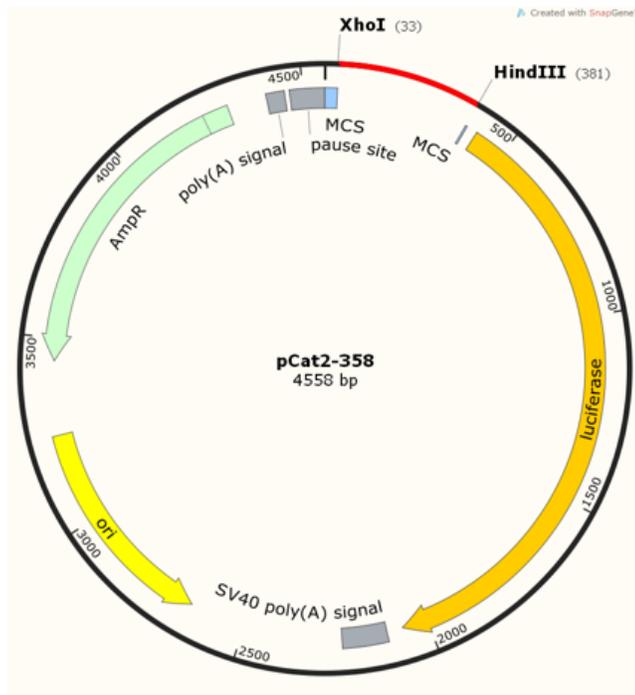
Se observa el mapa de la construcción pCat2-1600 y los sitios de restricción para la enzima HindIII se encuentran señalados. La construcción pCat2-1600AS es similar, pero con la región de 1600pb (señalada en rojo) clonada en antisentido. Tomado del programa SnapGene.



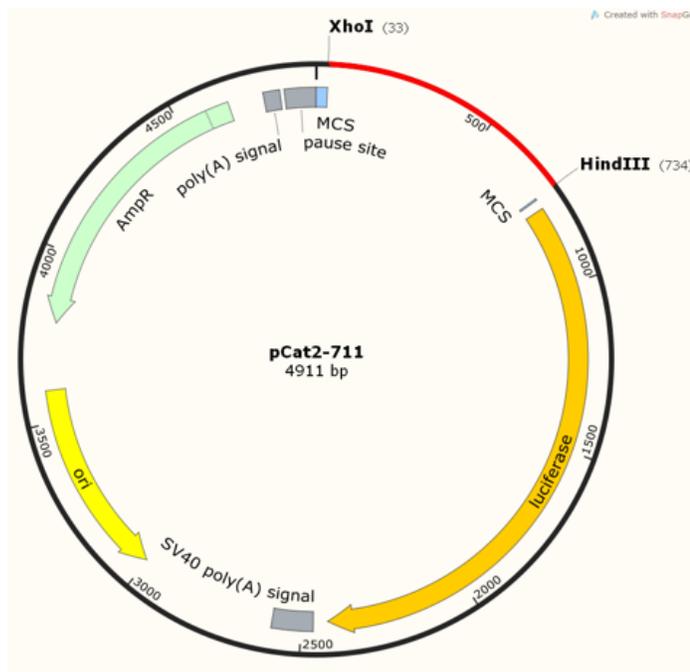
Se observa el mapa de la construcción pCat2-800 y los sitios de restricción para la enzima HindIII se encuentran señalados. La construcción pCat2-800AS es similar, pero con la región de 800pb (señalada en rojo) clonada en antisentido. Tomado del programa SnapGene.



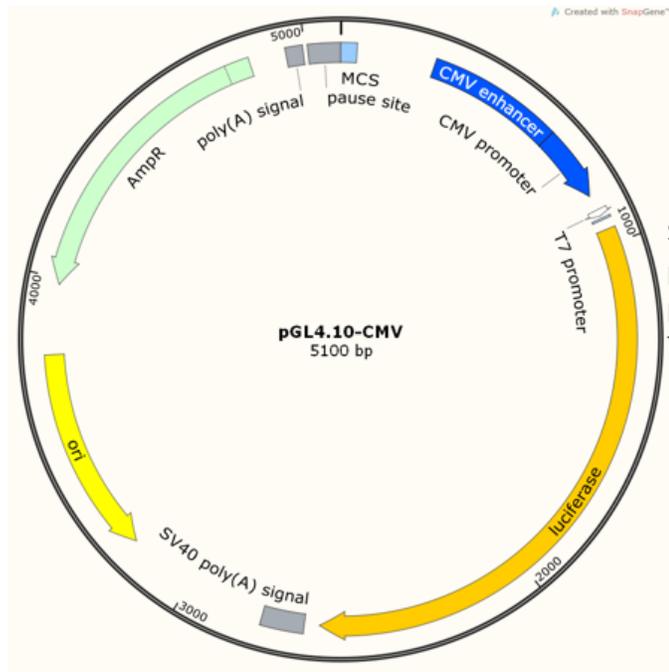
Se observa el mapa de la construcción pCat2-520 y los sitios de restricción para las enzimas XhoI y HindIII se encuentran señalados. Tomado del programa SnapGene.



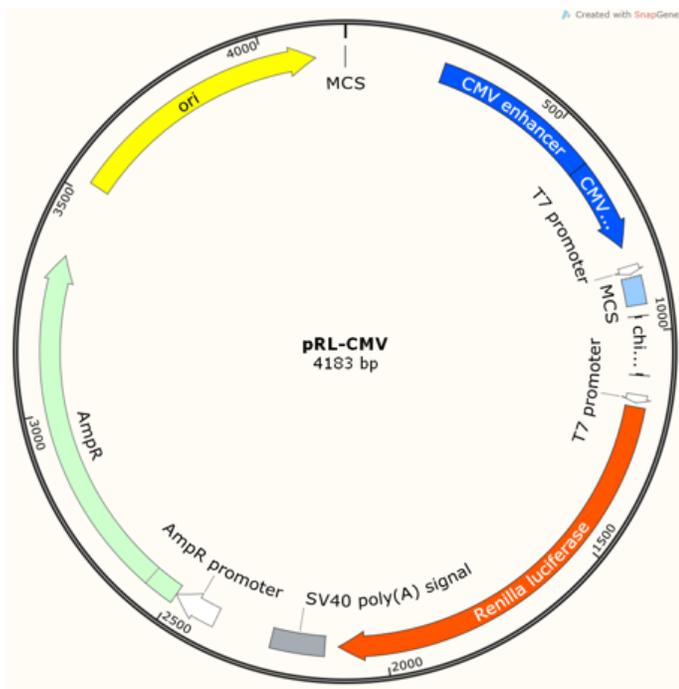
Se observa el mapa de la construcción pCat2-358 y los sitios de restricción para las enzimas XhoI y HindIII se encuentran señalados. Tomado del programa SnapGene.



Se observa el mapa de la construcción pCat2-711 y los sitios de restricción para las enzimas XhoI y HindIII se encuentran señalados. Tomado del programa SnapGene.



Se observa el mapa del plásmido pGL4.10-CMV usado como control positivo en las lecturas de luciferasa. Tomado del programa [SnapGene](#).

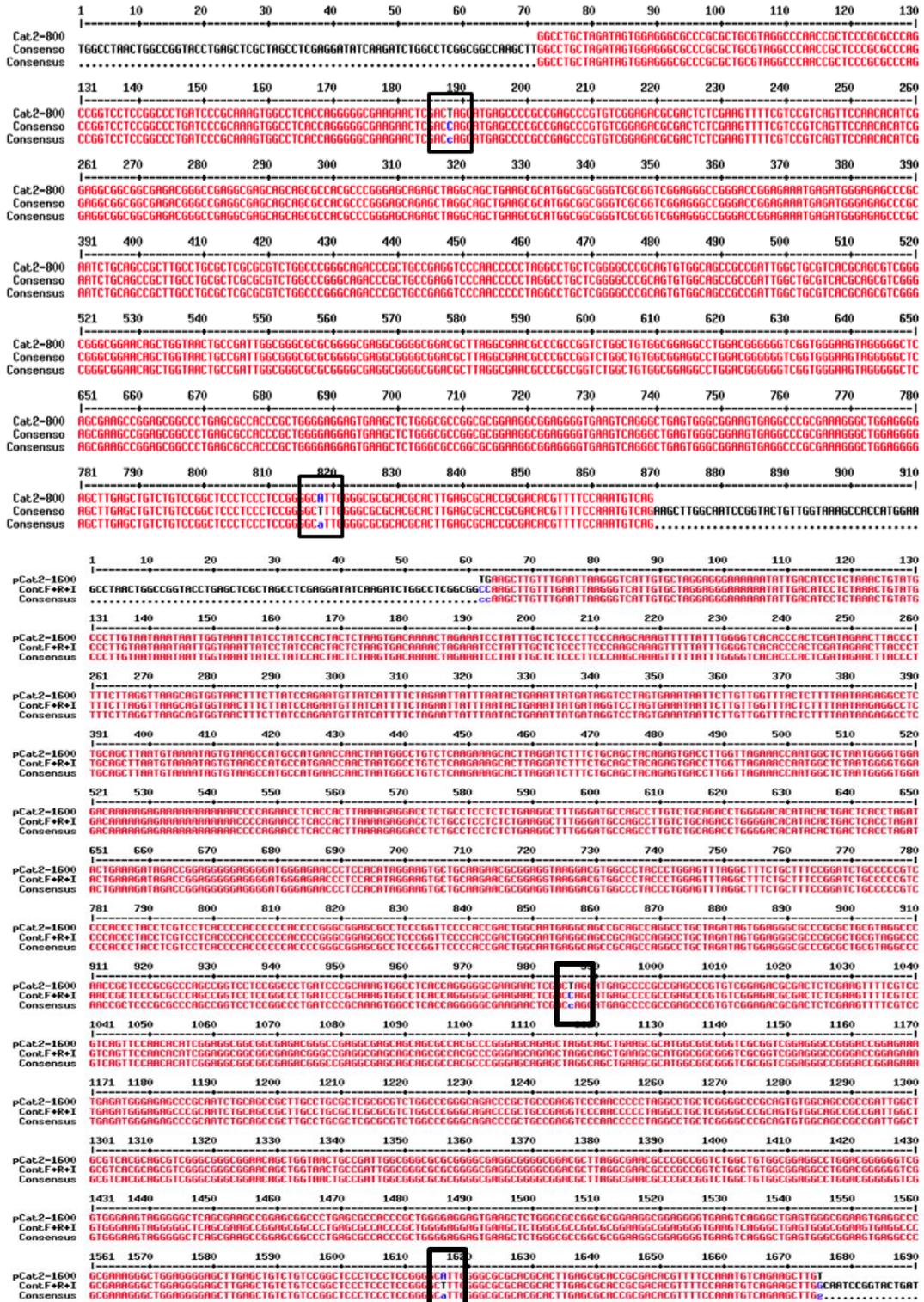


Se observa el mapa del plásmido pRL-CMV usado como control interno de transfección para normalizar los valores de las actividades de luciferasa. Tomado del programa [SnapGene](#).

Anexo 4. Secuenciación de las construcciones en el vector pGL4.10.

Se muestran las secuenciaciones de las construcciones obtenidas en el presente trabajo: pCat2-800, pcat2-1600, pCat2-800AS, pCat2-1600AS, pCat2-520, pCat2-358 y

pCat2-711. Con un recuadro negro se señalan los cambios presentes en las secuencias que corresponden a SNPs.



1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 pCat2-520 Cont.Fu+Rev Consensus
 TGCTCGAGGAAATGAGATGGGAGGCGCCGCAATCTGACGCGCTTGCCCTGCGCTCGCCGCTTGCCCGGGGAGACCCGCTGCCAGGTCCTCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGGAGTGGCA
 CGAGGAGAAATGAGATGGGAGGCGCCGCAATCTGACGCGCTTGCCCTGCGCTCGCCGCTTGCCCGGGGAGACCCGCTGCCAGGTCCTCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGGAGTGGCA
 ...CGAGGAGAAATGAGATGGGAGGCGCCGCAATCTGACGCGCTTGCCCTGCGCTCGCCGCTTGCCCGGGGAGACCCGCTGCCAGGTCCTCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGGAGTGGCA

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
 pCat2-520 Cont.Fu+Rev Consensus
 GCGCCGATTGGCTGCTCACGACGCTCGGGGCGGACAGCTGGTAACTGCGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGAGCGTTAGCGAACCAGCCCGGCTGGCTGTGGCGAGGCG
 GCGCCGATTGGCTGCTCACGACGCTCGGGGCGGACAGCTGGTAACTGCGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGAGCGTTAGCGAACCAGCCCGGCTGGCTGTGGCGAGGCG
 GCGCCGATTGGCTGCTCACGACGCTCGGGGCGGACAGCTGGTAACTGCGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGAGCGTTAGCGAACCAGCCCGGCTGGCTGTGGCGAGGCG

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
 pCat2-520 Cont.Fu+Rev Consensus
 TGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGAGGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGGGCGGAGGCGGAGGGTGAAGTCAGGGCTGAGTGGG
 TGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGAGGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGGGCGGAGGCGGAGGGTGAAGTCAGGGCTGAGTGGG
 TGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGAGGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGGGCGGAGGCGGAGGGTGAAGTCAGGGCTGAGTGGG

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
 pCat2-520 Cont.Fu+Rev Consensus
 CGGAGTGGGCGCGGAGGAGGCTGGAGGGAGCTGAGCTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCGGGGCTTTGGGCGCGCACGACTTGAGCGACCCGACACGTTTCCAAATGTCAGAGGCTTCA
 CGGAGTGGGCGCGGAGGAGGCTGGAGGGAGCTGAGCTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCGGGGCTTTGGGCGCGCACGACTTGAGCGACCCGACACGTTTCCAAATGTCAGAGGCTTGGC
 CGGAGTGGGCGCGGAGGAGGCTGGAGGGAGCTGAGCTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCGGGGCTTTGGGCGCGCACGACTTGAGCGACCCGACACGTTTCCAAATGTCAGAGGCTTca.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 pCat2-358 Cont.Fu+Rev Consensus
 AGTGCAGGTCGACGACATTTCTGCGCTACTGGCCGATACCTGAGCTCGCTAGCTCGAGACAGCTGGTAACTGCGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGAGCGTTAGCGAACCAGCCCG
gcCTCGAGACAGCTGGTAACTGCGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGAGCGTTAGCGAACCAGCCCG

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
 pCat2-358 Cont.Fu+Rev Consensus
 CGGTCTGGCTGTGGCGAGGCTGGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGAGGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGGGCGGAGGCGGAGG
 CGGTCTGGCTGTGGCGAGGCTGGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGAGGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGGGCGGAGGCGGAGG
 CGGTCTGGCTGTGGCGAGGCTGGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGAGGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGGGCGGAGGCGGAGG

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
 pCat2-358 Cont.Fu+Rev Consensus
 GGTGAGTCAAGGCTGAGTGGGCGGAGTGGGCGCGGAGGAGGCTGGAGGGAGCTTGAGCTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCGGGGCTTTGGGCGCGCACGACTTGAGCGACCCGACACGTT
 GGTGAGTCAAGGCTGAGTGGGCGGAGTGGGCGCGGAGGAGGCTGGAGGGAGCTTGAGCTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCGGGGCTTTGGGCGCGCACGACTTGAGCGACCCGACACGTT
 GGTGAGTCAAGGCTGAGTGGGCGGAGTGGGCGCGGAGGAGGCTGGAGGGAGCTTGAGCTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCGGGGCTTTGGGCGCGCACGACTTGAGCGACCCGACACGTT

391 400 410 420 430 440 450 460 470 476
 pCat2-358 Cont.Fu+Rev Consensus
 TTCCAAATGTCAGAGGCTTca
 TTCCAAATGTCAGAGGCTTca
 TTCCAAATGTCAGAGGCTTca.....

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 pCat2-711 Cont.Fu+Rev Consensus
 GCATGTTGACAGTGCAGAACATTTCTGCGCTACTGGCCGATACCTGAGCTCGCTAGCTCGAGGAGGCTGGTAACTGCGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGAGCGTTAGCGAACCAGCCCG
 CTGAGGGGCTGCTAGTATGTTGGAGGCGCCCGGCTGGCTAGGTCCTCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGGAGTGGCA
 CTGAGGGGCTGCTAGTATGTTGGAGGCGCCCGGCTGGCTAGGTCCTCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGGAGTGGCA

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
 pCat2-711 Cont.Fu+Rev Consensus
 CCTCCGGCTGATCCCGAAGTGGCTCACAGGGGCGAGGAGCTGACTGAGATGAGCCCGCGAGCCGCTGTCGAGACGCGACTCTGAGGTTTCTGCTCGTCAAGTCCAGACATCGAGGCG
 CCTCCGGCTGATCCCGAAGTGGCTCACAGGGGCGAGGAGCTGACTGAGATGAGCCCGCGAGCCGCTGTCGAGACGCGACTCTGAGGTTTCTGCTCGTCAAGTCCAGACATCGAGGCG
 CCTCCGGCTGATCCCGAAGTGGCTCACAGGGGCGAGGAGCTGACTGAGATGAGCCCGCGAGCCGCTGTCGAGACGCGACTCTGAGGTTTCTGCTCGTCAAGTCCAGACATCGAGGCG

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
 pCat2-711 Cont.Fu+Rev Consensus
 GCGCGGAGAGCGGGCGGAGCGAGCAGCGCCAGCCCGGGAGCAGAGCTAGGACGCTGAGCGCATGGCGGGGCTGCGGCTGGAGGGCGGGAGCCGGAGAAATGAGTGGGAGGCGCCGCAATCT
 GCGCGGAGAGCGGGCGGAGCGAGCAGCGCCAGCCCGGGAGCAGAGCTAGGACGCTGAGCGCATGGCGGGGCTGCGGCTGGAGGGCGGGAGCCGGAGAAATGAGTGGGAGGCGCCGCAATCT
 GCGCGGAGAGCGGGCGGAGCGAGCAGCGCCAGCCCGGGAGCAGAGCTAGGACGCTGAGCGCATGGCGGGGCTGCGGCTGGAGGGCGGGAGCCGGAGAAATGAGTGGGAGGCGCCGCAATCT

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
 pCat2-711 Cont.Fu+Rev Consensus
 GAGCGCGCTGCTGCTGCGCTGCGCGCTTGCCCGGGGAGACCCGCTGCCAGGTTCCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGCGAGTGGGAGCGCGGATTGGCTGCTCAGCGACGCTCGGGGCGG
 GAGCGCGCTGCTGCTGCGCTGCGCGCTTGCCCGGGGAGACCCGCTGCCAGGTTCCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGCGAGTGGGAGCGCGGATTGGCTGCTCAGCGACGCTCGGGGCGG
 GAGCGCGCTGCTGCTGCGCTGCGCGCTTGCCCGGGGAGACCCGCTGCCAGGTTCCAGCCCTAGGCTGCTCGGGGCGCGAGTGGGAGCGCGGATTGGCTGCTCAGCGACGCTCGGGGCGG

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
 pCat2-711 Cont.Fu+Rev Consensus
 GGACACGCTGGTAACTGCGGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGGACGCTTGGCGAACCAGCCCGGCTGCTGGCTGGCGGAGGCTGGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGA
 GGACACGCTGGTAACTGCGGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGGACGCTTGGCGAACCAGCCCGGCTGCTGGCTGGCGGAGGCTGGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGA
 GGACACGCTGGTAACTGCGGATTGGCGGGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGGACGCTTGGCGAACCAGCCCGGCTGCTGGCTGGCGGAGGCTGGAGCGGGGCTGGTGGGAGTGGGAGGCTCAGCGA

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780
 pCat2-711 Cont.Fu+Rev Consensus
 AGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGCGCGGAGGCGGAGGGGTTGAGTCAAGGCTGAGTGGCGGAGTGGGCGCGGAA
 AGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGCGCGGAGGCGGAGGGGTTGAGTCAAGGCTGAGTGGCGGAGTGGGCGCGGAA
 AGCGGAGCGGCTTGAGCGCCAGCCGCTGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCGCGCGGAGGCGGAGGGGTTGAGTCAAGGCTGAGTGGCGGAGTGGGCGCGGAA.....