



**Cinvestav**

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PAPEL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL CREM $\tau$  EN LA  
REGULACIÓN DEL PROMOTOR *Catsper2* MURINO**

**Tesis que presenta:**

**Q.F.B. Sergio Federico López Guzmán**

**Para obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencias**

**En la Especialidad de:**

**Genética y Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Javier Hernández Sánchez**

**Ciudad de México**

**Agosto 2018**

# **ASESORES**

**Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe**

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

**Dr. Jesús Valdes Flores**

Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN

## **AGRADECIMIENTOS AL CONACyT**

Por medio del presente hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional 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 (CINVESTAV-IPN) en el laboratorio del Dr. Javier Hernández Sánchez.

# **AGRADECIMIENTOS**

## **A mis padres:**

Federico y Silvia, por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida, por sus valiosas enseñanzas que he recibido desde pequeño, por formarme de la mejor manera en el ámbito profesional y social, y sobre todo por todo el cariño y amor que me han brindado desde el día que nací, porque ustedes son los pilares de mi vida, quiero que sepan que cada logro mío es también suyo.

## **A mi hermano:**

Erick, por cuidarme desde pequeño, por aconsejarme y ser un gran hermano mayor, por darme el ejemplo cuando hace falta y por enseñarme a no darme por vencido.

## **A mi novia:**

Ingrid, por acompañarme en esta etapa de mi vida, por brindarme tu apoyo, tus consejos, por darme ánimos en los momentos difíciles, todo esto desde hace cinco maravillosos años. También por compartir el interés a la ciencia conmigo, porque debido a eso es que hemos logrado crecer juntos profesionalmente, por entender que el camino no es fácil y a veces hay que hacer sacrificios para sacar adelante el trabajo. Pero sobre todo gracias por todo el amor, la felicidad, las ganas de seguir adelante que me inyectas, porque sin ti, todo esto sería más difícil. Te amo mi química favorita.

## **A mi director de tesis:**

Dr. Javier Hernández Sánchez, primero por aceptarme para formar parte de su grupo de trabajo, por haber guiado este proyecto de la mejor manera, por hacerme crecer no sólo como estudiante, sino también como persona. También por ser un excelente coordinador académico y por no descuidar a su grupo de trabajo a pesar de este cargo.

**A mis asesores:**

Dr. Luis Kameyama y Dr. Jesus Valdes, por haber dedicado su tiempo en mejorar este proyecto, por sus críticas, sus consejos, sus opiniones y todo lo bueno que dieron para que este proyecto se llevara a cabo de la mejor manera, estoy muy agradecido con ustedes.

**A mis compañeros de laboratorio:**

Juan, Liz, Carlos, Andrea y David, por todos sus consejos, por el apoyo que me han brindado, por la sabiduría que han compartido conmigo y sobre todo por el excelente ambiente que hemos logrado alcanzar en el laboratorio, con su buen humor hacen que el trabajo sea menos pesado.

**A mis compañeros de la maestría:**

A toda la generación, por todas las risas y buenos momentos que pasamos durante los cursos, porque con sus elocuencias y buen humor los cursos se hicieron sintieron menos pesados. Sinceramente puedo decir que tuvimos una gran convivencia a través de toda la maestría y logramos conectar como buenos compañeros.

**A mis compañeros del baloncesto:**

Por ser grandes personas, por compartir el gusto por este deporte, por su buen humor, porque con los partidos y las retas desaparecía el estrés del trabajo del laboratorio y por la gran amistad que hemos logrado en este tiempo que he estado en CINVESTAV.

**A Gabriela Mora y Guadalupe Aguilar:**

Por ser unas excelentes personas, por su profesionalismo y entrega con este departamento, porque con su eficiencia y trabajo los estudiantes podemos concentrarnos en nuestro trabajo de mejor manera, por recibirme siempre con una sonrisa a pesar de todo el trabajo que tienen.

## DEDICATORIA

Para todas aquellas que se adelantaron en el camino, que formaron parte de mi vida y ahora ya no están, sin embargo, dejaron grandes enseñanzas y una huella en mí que será imborrable, gracias por todos los momentos que pasamos juntos, gracias por todas las risas, felicidad y consejos que me dieron a través de los años. Haciendo una dedicatoria especial para mis abuelas Amadea Salas y Teresa Vásquez, y mi tío Marco Antonio Guzmán.

Con todo mi amor, cariño y respeto para ustedes.

Algún día nos reencontraremos.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Espermatogénesis .....	1
Canal CATSPER .....	4
Arquitectura del canal CATSPER y localización .....	4
Expresión de los genes CATSPER .....	6
Función del canal CATSPER .....	7
Regulación y señalización del canal CATSPER.....	8
ANTECEDENTES .....	9
Análisis de la región promotora de los genes CATSPER .....	9
Análisis de la región promotora de <i>Catsper2</i> murino .....	10
Factores transcripcionales .....	11
CREM.....	11
JUSTIFICACIÓN .....	15
HIPÓTESIS .....	16
OBJETIVOS .....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos .....	16
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
METODOLOGÍA.....	18
Clonación del factor transcripcional <i>Crem<math>\tau</math></i> .....	19
Extracción de RNA a partir de testículos de ratón.....	19
Síntesis de cDNA.....	20
Amplificación del factor <i>Crem<math>\tau</math></i> .....	20
Clonación en pJET1.2 blunt .....	21

Preparación de células competentes .....	21
Transformación bacteriana .....	22
Subclonación del gen <i>Cre<math>\mu</math></i> murino en pcDNA3 .....	22
Restricción enzimática .....	22
Ligación de <i>Cre<math>\mu</math></i> a pcDNA3 .....	23
Mutagénesis sitio dirigida.....	23
Verificación de la identidad de los genes por secuenciación .....	24
Cultivos celulares.....	25
Pase celular .....	26
Transfección transitoria de las líneas celulares MSC1 y GC-1spg .....	26
Ensayo de luciferasa DUAL .....	30
Detección de la expresión de <i>Cre<math>\mu</math></i> en las líneas celulares .....	31
Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	31
Identificación de <i>Cre<math>\mu</math></i> en las líneas celulares.....	31
Análisis estadístico .....	32
RESULTADOS.....	33
Análisis <i>in silico</i> del promotor putativo de <i>Catsper2</i> .....	33
Clonación del gen del factor transcripcional <i>Cre<math>\mu</math></i> .....	34
Expresión endógena y sobreexpresión del factor transcripcional <i>Cre<math>\mu</math></i> .....	38
Efecto del factor transcripcional <i>CRE<math>\mu</math></i> en la actividad del promotor de <i>Catsper2</i> murino.....	38
Delección de sitios CRE .....	40
Análisis de la actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper2</i> conteniendo las delecciones de los sitios CRE .....	43
DISCUSIÓN .....	45
CONCLUSIONES.....	48

PERSPECTIVAS.....	48
REFERENCIAS.....	49
ANEXOS .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la espermatogénesis.....	2
Figura 2. Anatomía del espermatozoide.....	3
Figura 3. Canal CATSPER.....	6
Figura 4. Dominios e isoformas de CREM..	13
Figura 5. Activación por CREM $\tau$ en células germinales..	13
Figura 6. Diagrama Experimental.....	17
Figura 7. Análisis in silico de la región del 800 pb del promotor putativo de <i>Catsper2</i> murino .....	33
Figura 8. Amplificación del gen <i>Cre<math>m\tau</math></i> murino. ....	34
Figura 9. Análisis de bacterias candidatas transformadas con el plásmido pJET1.2-Crem $\tau$ . ....	34
Figura 10. Subclonación del gen <i>Cre<math>m\tau</math></i> murino en el vector pcDNA3. ....	35
Figura 11. Análisis de bacterias candidatas transformadas con el plásmido pcDNA3-Crem $\tau$ . ....	35
Figura 12. Análisis de la secuencia de la construcción pcDNA3-Crem $\tau$ .....	37
Figura 13. Análisis de la sobreexpresión del RNA mensajero de <i>Cre<math>m\tau</math></i> en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1.....	38
Figura 14. El factor transcripcional CREM $\tau$ incrementa la actividad transcripcional del promotor <i>Catsper2</i> murino en células GC-1spg y MSC-1.....	39

Figura 15. Análisis de las secuencias de las construcciones pCat2-800 $\Delta$ CRE1 y pCat2-800 $\Delta$ CRE2..... 42

Figura 16. La delección del sitio CRE2 río abajo del TSS ( $\Delta$ CRE2) aumenta la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1..... 43

Figura 17. La sobreexpresión de CREM $\tau$  promueve la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino en líneas celulares GC-1spg y MSC-1..... 44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Posición de los genes <i>Catsper</i> en ratón.....	7
Tabla 2. Valores de astringencia utilizados en las bases de datos para la detección de sitios de unión a factores de transcripción.....	18
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>Crem<math>\tau</math></i> .....	21
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida.....	24
Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación automática de las construcciones .....	25
Tabla 6. Construcciones utilizadas en los ensayos de transfección transitoria en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1. ....	27
Tabla 7. Transfección con las construcciones pCat2-800, pCat2-800 $\Delta$ CRE1 y pCat2-800 $\Delta$ CRE2 conteniendo el promotor putativo de <i>Catsper2</i> murino y co-transfecciones con el plásmido con el gen del factor <i>Crem<math>\tau</math></i> en células MSC-1. ....	28
Tabla 8. Transfección con las construcciones pCat2-800, pCat2-800 $\Delta$ CRE1 y pCat2-800 $\Delta$ CRE2 conteniendo el promotor putativo de <i>Catsper2</i> murino y co-transfecciones con el plásmido con el gen del factor <i>Crem<math>\tau</math></i> en células GC-1spg. ....	29
Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR. ....	32

## RESUMEN

El gen *Catsper2* codifica para una de las 4 alfa proteínas que integran el canal CATSPER del espermatozoide, el cual es relevante en la fertilidad masculina porque permite que los espermatozoides fecunden al óvulo. Asimismo, se ha visto que deleciones en dicho gen provocan infertilidad masculina. *Catsper2* es el primero en expresarse, y la expresión de las proteínas alfa CATSPER2 y CATSPER1 es codependiente. Estas observaciones sugieren una posible regulación de los genes *Catsper1*, 3 y 4 por *Catsper2*, sin embargo, la regulación transcripcional de estos genes es poco conocida. En este sentido, un análisis *in silico* indicó que el promotor de *Catsper2* murino tiene sitios de unión para factores de transcripción responsivos a cAMP (CRE). Un miembro importante de esta familia que es capaz de activar a 12 genes durante la fase post-meiótica de la espermatogénesis es el factor CREM $\tau$ . Con el fin de entender la regulación a nivel transcripcional del gen *Catsper2* murino, en este trabajo se analiza si dicho factor transcripcional es capaz de activar al promotor de *Catsper2* murino. Para esto, el promotor del gen *Catsper2* se clonó arriba del gen reportero de luciferasa y se cotransfectó en las líneas celulares de células germinales de ratón (GC-1spg) y de células de Sertoli de ratón (MSC-1) junto con el factor CREM $\tau$ . Los resultados indicaron que al sobreexpresar el factor CREM $\tau$ , aumenta la actividad del promotor *Catsper2* en ambas líneas celulares. Posteriormente se deletaron los sitios CRE cercanos al sitio de inicio de la transcripción (TSS) para ver si estos eran funcionales. Los resultados indicaron que el sitio encontrado consenso CRE2, cuya 1er base se encuentra ubicada a +152 pb río abajo del TSS podría ser funcional, ya que su deleción provocó un aumento en la actividad del promotor, lo que sugiere que una isoforma represora de CREM pudiera estar ocupando ese sitio y regulando negativamente al promotor de *Catsper2* murino. Sin embargo, la deleción del sitio CRE1 localizado a -76 bases del TSS no produjo ningún cambio en la actividad transcripcional aún sobreexpresando a CREM $\tau$  lo que sugiere que no es funcional.

## ABSTRACT

The *Catsper2* gene encodes for one of the four alpha proteins of the sperm CATSPER channel, which is important for male fertility because it allows the sperm to fertilize the ovocyte. In addition, it has been shown that deletions of *Catsper2* gene produce male infertility. *Catsper2* is the first member of the *Catsper* family to be expressed, and the expression of this protein and CATSPER2 is codependent. These observations suggest the regulation of *Catsper* 1, 3 and 4 by *Catsper2*. Nevertheless, little is known about the transcriptional regulation of their genes. An *in silico* analysis shows several CRE (cAMP Responsive Elements) binding sites on the murine *Catsper2* promoter. An important member of the family, known as CREM $\tau$ , is capable of turning on 12 genes during the postmeiotic phase of spermatogenesis. To understand the transcriptional regulation of the murine *Catsper2* gene, in this work we analyzed whether CREM $\tau$  is capable of turning on the murine *Catsper2* promoter. With this purpose, the murine *Catsper2* promoter was cloned upstream of the luciferase reporter gene, and this construct was co-transfected into mouse GC1-spg germ cells, and MSC-1 somatic Sertoli cells, with the construction for overexpressing CREM $\tau$ . Our results showed that CREM $\tau$  activated murine *Catsper2* promoter in both cell lines. The CRE sites nearby the transcription starting site (TSS) were deleted to investigate whether they are functional. The results showed that the deletion of CRE2 consensus site, whose first base is +152 downstream of the TSS, could be functional because the transcriptional activity increased. However, this activity was irrespective of CREM $\tau$  overexpression suggesting that a repressor isoform of CREM could bind to this site and negatively regulate the murine *Catsper2* promoter. The transcriptional activity did not change upon the deletion of the CRE1 site located at -76 bases regarding the TSS even under CREM $\tau$  overexpression suggesting that this site may not be functional.

# INTRODUCCIÓN

## Espermatogénesis

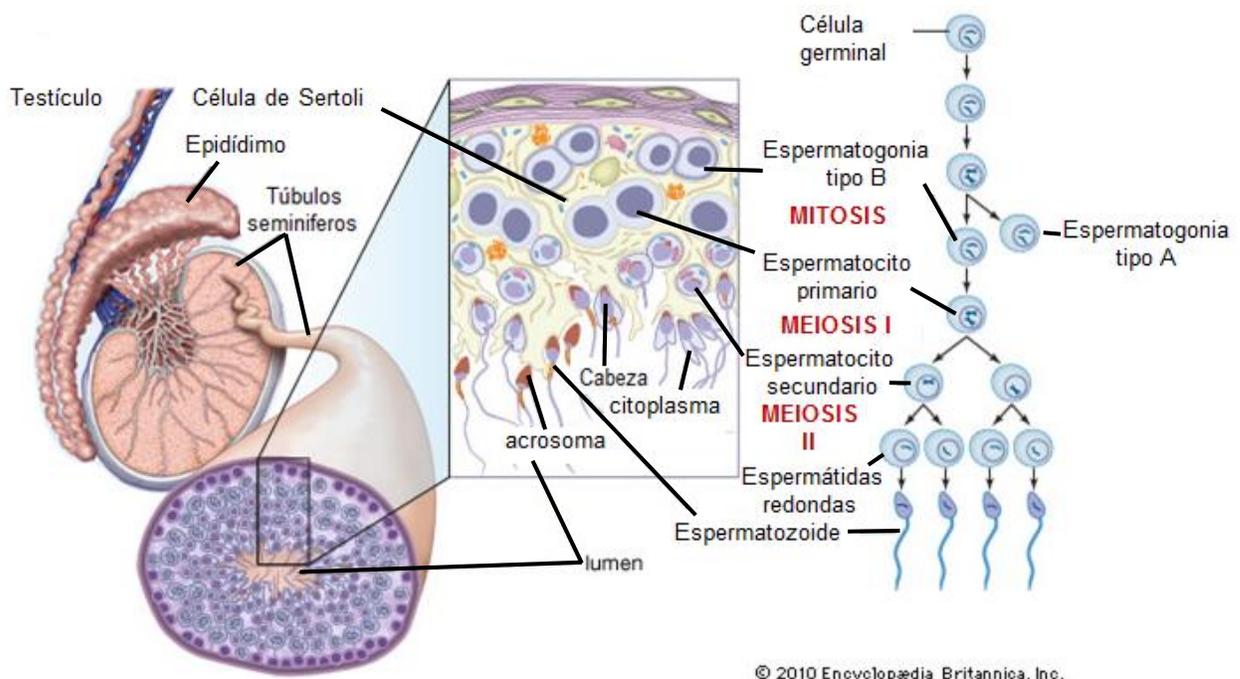
La espermatogénesis es un proceso complejo en el cual se diferencian las células reproductoras masculinas, desde una célula madre diploide hasta una célula haploide altamente especializada conocida como espermatozoide. Dicho proceso comprende la diferenciación y autorenovamiento de las células madres progenitoras, meiosis y espermiogénesis bajo la influencia de las células de Sertoli (Guraya, 1987). La espermatogénesis se lleva a cabo dentro del compartimento tubular de los testículos, donde se encuentran las células germinales y dos tipos de células somáticas, las células de Leydig y las células de Sertoli. Las células somáticas son las encargadas de regular el proceso, puesto que las células de Leydig bajo la influencia de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) producen testosterona, la cual estimula la transcripción de genes en células de Sertoli y esto promueve la diferenciación germinal (Jakobsen & Pelham, 1988; Griswold, 1998; Zhang & Gopalakrishnan, 2005; Weinbauer, Gerhard F. *et al.*, 2010).

La espermatogénesis consta de tres etapas:

1. Mitosis de células madre germinales.
2. Meiosis.
3. Espermiogénesis (maduración de espermatozoides).

Al inicio de la espermatogénesis, las células madre germinales llamadas espermatogonias toman tres posibles rutas: 1) pasar por mitosis para auto renovarse y mantener la población, 2) ir a apoptosis o 3) diferenciarse para continuar con el proceso y convertirse en espermatozoides. Las espermatogonias se encuentran ubicadas en la lámina basal del tubo seminífero y de estas pueden distinguirse dos tipos, la A y la B, donde la primera se queda en la lámina basal para servir como precursor celular y la B entra al proceso de diferenciación para convertirse en espermatozoide. Posteriormente en la profase meiótica (meiosis I) la

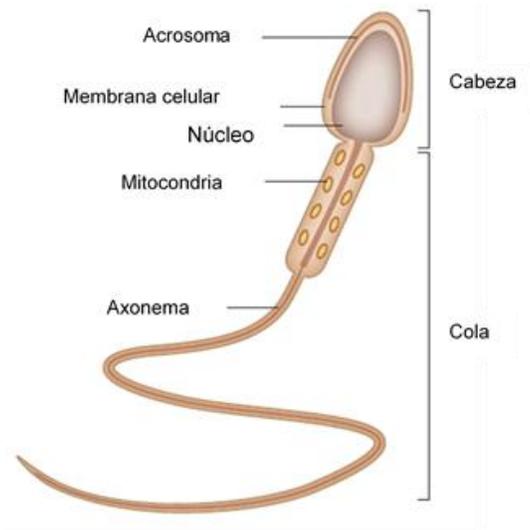
espermatogonia tipo B se divide para dar origen al espermatocito preleptoteno, el cual prepara su material genético para entrar en la fase meiótica. Durante la fase meiótica II el espermatocito secundario se divide en espermátidas tempranas, las cuales son haploides. Durante la meiosis hay dos rondas sucesivas de división celular, sin embargo, sólo existe una ronda de duplicación cromosomal, por dicha razón la espermátida temprana es haploide. En la etapa final, conocida como espermiogénesis, las espermátidas se diferencian a espermatozoides a través de una serie de procesos morfogenéticos complejos, donde las espermátidas se alargan, se compacta el material genético, se expulsa el citoplasma y se sustituyen las histonas por protaminas para dar origen al espermatozoide maduro. Dichos cambios se dan mientras la célula se desplaza hacia el epidídimo, donde finalmente se asienta hasta la eyaculación (Fig.1) (Guraya, 1987; Zhang & Gopalakrishnan, 2005).



**Figura 1. Etapas de la espermatogénesis.** Modificado de Britannica (2010).

Una vez diferenciados, los espermatozoides constan de dos partes principales, la cabeza y la cola, a su vez, ésta última se divide en el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final (Fig.2). La cabeza contiene el núcleo haploide compactado

y el acrosoma, una vesícula secretoria especializada llena de enzimas hidrolíticas que le ayudará para la fecundación del óvulo. Por su parte en la cola se encuentran todos los elementos necesarios para la motilidad del espermatozoide, la cual es sumamente importante para la fertilización (Guraya, 1987; Zhang & Gopalakrishnan, 2005).



**Figura 2. Anatomía del espermatozoide. Modificado de Lishko *et al.* (2012)**

A pesar de todo este proceso de diferenciación, un espermatozoide todavía no es capaz de fertilizar un óvulo por sí mismo, sino que necesita pasar por un proceso conocido como capacitación, que se da mientras el espermatozoide viaja a través del tracto reproductor femenino. Durante la capacitación el espermatozoide pasa por cambios tanto bioquímicos como morfológicos, entre los que destacan la reorganización de la membrana espermática, cambios en su fluidez, esto último debido a un eflujo de colesterol de la membrana, permitiendo mayor permeabilidad por bicarbonato [ $\text{HCO}^{-3}$ ] y  $\text{Ca}^{+2}$  (Zhang & Gopalakrishnan, 2005; Ickowicz *et al.*, 2012). Además, el espermatozoide sufre cambios en la fosforilación de sus proteínas, en la actividad de proteincinasas, cambios de pH intracelular y un aumento de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) (Ickowicz *et al.*, 2012). Todos estos eventos le confieren la motilidad necesaria al espermatozoide para llegar al óvulo. Una vez entrando en contacto con las glicoproteínas de la zona pelúcida, el espermatozoide lleva a cabo la reacción acrosomal, en la cual, se

promueve la exocitosis del contenido vesicular, lo que permite al espermatozoide atravesar las capas externas del ovocito y fecundarlo. Se ha observado que para que se lleve a cabo la reacción acrosomal, es necesario el influjo de  $Ca^{+2}$  y la presencia de la glicoproteína de la zona pelúcida ZP3. De igual manera es necesario que el espermatozoide se hiperactive para que pueda penetrar el ovocito, lo cual también es regulado por la entrada de  $Ca^{+2}$  al espermatozoide a través de los canales de Calcio (Zhang & Gopalakrishnan, 2005).

Los canales de calcio son esenciales para la maduración y la capacitación del espermatozoide y dentro de los canales de calcio que se encuentran en el espermatozoide encontramos a CATSPER, un canal que se expresa únicamente en testículo y se ha visto que tiene relevancia en la fertilidad del espermatozoide.

### **Canal CATSPER**

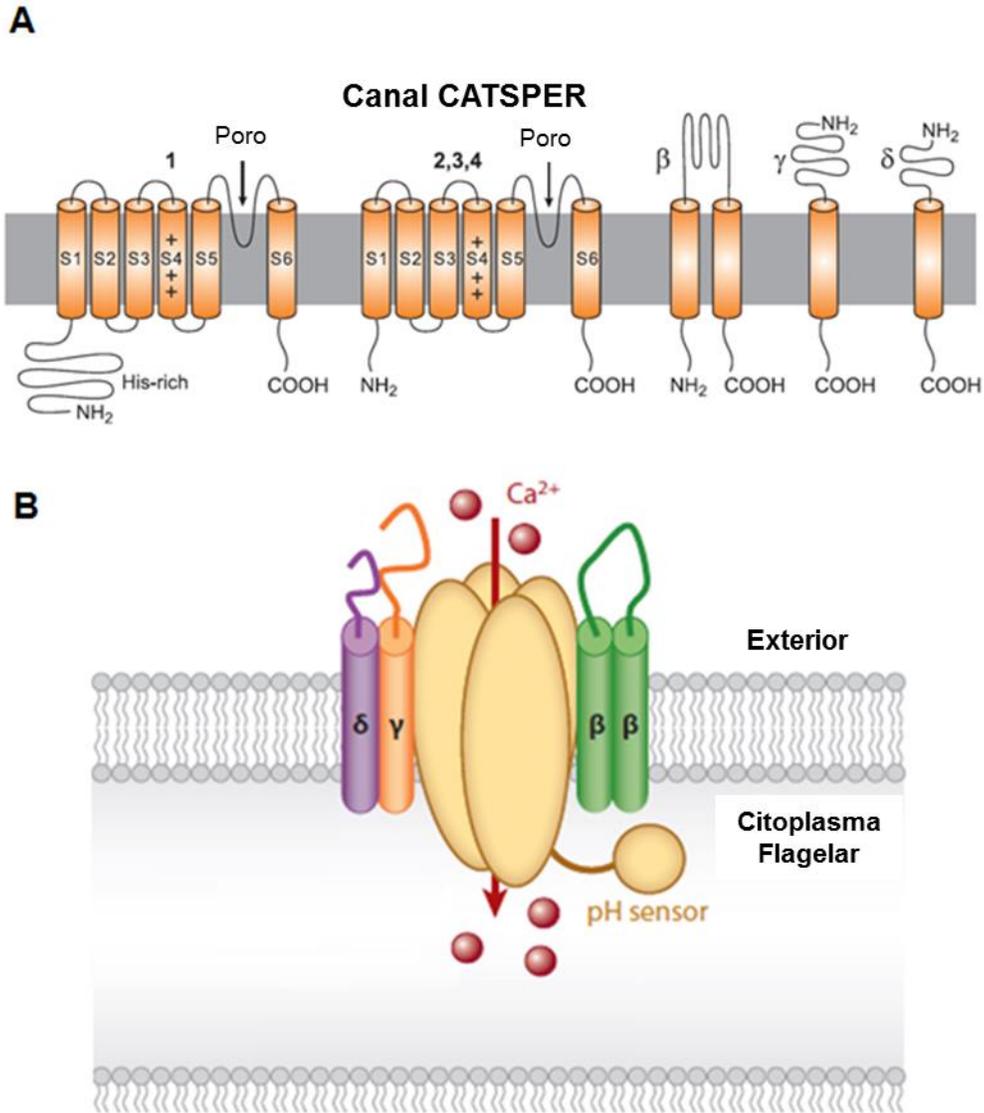
El canal CATSPER (por sus siglas en inglés “Cation Channel of Sperm”) es un canal catiónico que permite el influjo de iones  $Ca^{+2}$  que se encuentra únicamente en espermatozoide. El primer gen que codifica para una subunidad del canal fue descubierto en 2001 por *Ren et al.*, y a partir de esa fecha se han descubierto 7 genes que codifican para las proteínas que forman el canal CATSPER. Asimismo, se ha descrito que el canal es vital para la fertilidad, por lo que se ha propuesto que el canal puede ser un blanco terapéutico para tratar la infertilidad humana o, contrariamente, como anticonceptivo masculino.

#### *Arquitectura del canal CATSPER y localización*

El canal se encuentra formado por cuatro subunidades  $\alpha$  o principales (CATSPER-1-4) y tres subunidades auxiliares (CATSPER  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) que son esenciales para la función del canal, puesto que cuando se hace knock out de alguna subunidad, es prácticamente imposible detectar alguna otra, por lo que se ha sugerido que la falta de alguna subunidad puede llevar a la degradación de las otras (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Lobleby *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011).

Cada subunidad  $\alpha$  cuenta con seis regiones transmembranales (S1-S6), que forman dos sitios activos, el primero le sirve como dominio sensor de voltaje (S1-S4) y el

segundo como dominio formador del poro (S1 P-loop-S6). En el cuarto segmento transmembranal las subunidades cuentan con varios residuos de aminoácidos cargados positivamente (Arg/Lys), los cuales se cree que sirven como sensores de voltaje, además, cuenta con la secuencia consenso [T/S] x [D/E] x W, compartida entre los canales de CaV que le confiere la especificidad por el ion calcio (Lobley *et al.*, 2003). Las subunidades auxiliares poseen ya sea dos regiones transmembranales ( $\beta$ ) o solamente una ( $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Fig. 3a) (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011). Se cree que el canal se ensambla en forma de tetrámero con las subunidades auxiliares alrededor (Fig. 3b) (Lobley *et al.*, 2003) y que su acción puede estar regulada por la interacción con otros canales. El canal se encuentra localizado en la pieza principal del flagelo, donde se ha demostrado que permea calcio para la hiperactivación del espermatozoido (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Lobley *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011).



**Figura 3. Canal CATSPER. A) Estructura de las subunidades CATSPER. B) Estructura del Canal CATSPER.** Modificado de Darszon *et al.* (2011) y Lishko *et al.* (2012).

#### *Expresión de los genes CATSPER*

La expresión de los genes *Catsper* es específica de testículo, sin embargo, la expresión de *Catsper-4* también ha sido detectada en pulmón y placenta (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Lobley *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011). Los genes *Catsper* en ratón se encuentran ubicados en diferentes cromosomas y tienen diferentes tamaños (Tabla 1).

**Tabla 1. Posición de los genes *Catsper* en ratón. Modificado de Sun, XH *et al.* (2017).**

Nombre	Cromosoma (ratón)	Exones	Aminoácidos
<b><i>Catsper1</i></b>	19 <sup>a</sup>	13	686
<b><i>Catsper2</i></b>	2E5	16	588
<b><i>Catsper3</i></b>	13B1	9	395
<b><i>Catsper4</i></b>	4D3	12	442
<b><i>Catsperβ</i></b>	12E	27	1109
<b><i>Catsperγ</i></b>	7B1	30	1145
<b><i>Catsperδ</i></b>	17D	28	805

Los genes *Catsper* son transcritos en diferentes tiempos durante la espermatogénesis, encontrándose la presencia de *Catsper1*, 3 y 4 en etapas tardías (espermátidas), mientras que *Catsper2* ha sido encontrado en etapas más tempranas (espermatocono primario), en tanto que las subunidades son expresadas tanto en espermatoconos como en espermátidas (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011).

De manera interesante, *Catsper2* es el primer gen en expresarse (día 8) durante el desarrollo postnatal de los ratones, seguido de una expresión casi idéntica de *Catsper1,3* y 4 (Li *et al.*, 2007); además se ha observado que en ratones nulos en *Catsper2*, no existe presencia de proteína de *Catsper1* y viceversa, por lo cual se dice que la expresión de *Catsper1* y 2 es codependiente. Estos resultados podrían sugerir una posible regulación de los genes *Catsper* por el transcrito de *Catsper2*.

#### *Función del canal CATSPER*

Estudios de knock out en los genes *Catsper* han demostrado que la pérdida de cualquier subunidad del canal es esencial, puesto que al hacer knock out de *Catsper1* no era posible detectar cualquier otra subunidad del canal en la membrana del espermatozoide, por lo tanto, el canal no se formaba y esto afectaba su función.

Se ha demostrado que el knock out de cualquier gen de *Catsper* produce infertilidad sin producir cambios morfológicos en los testículos o los espermatozoides, sin embargo, la permeabilidad de  $Ca^{2+}$  se ve afectada, por lo que los espermatozoides no pueden ser hiperactivados para poder penetrar las capas protectoras del ovocito y fecundarlo (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011).

De igual manera, se ha observado una relación en pacientes infértiles con anomalías en *Catsper1* y pacientes con astenozoospermia con la falta del gen *Catsper2* (Avidan *et al.*, 2003; Avenarius *et al.*, 2009).

#### *Regulación y señalización del canal CATSPER*

CATSPER es un canal que es regulado a través de diferentes vías, entre las que se destacan la alcalinización intracelular y moléculas como hormonas. Se ha visto que CATSPER responde a una regulación intracelular del pH y, se sugiere que esto lo hace a través de su zona rica de histidinas en el extremo amino terminal de la subunidad *Catsper1*, puesto que dichas histidinas podrían servirle para sensar el pH intracelular (Ren *et al.*, 2001).

También se ha descrito que la activación del canal CATSPER es influenciada por el tracto genital femenino, ya que el canal responde a estímulos por progesterona, prostaglandinas y proteínas de la zona pelúcida (ZP3), lo cual incrementa el influjo de calcio a través del canal para que el espermatozoide pueda ser hiperactivado y fecunde al ovocito (Xia & Ren, 2009; Lishko *et al.*, 2011)

Se sabe que los nucleótidos cíclicos como cAMP, pueden incrementar el influjo de  $Ca^{+2}$  en los espermatozoides, sin embargo, esto no sucede en aquellos nulos en *Catsper1*, aunque, se ha demostrado que no lo activan directamente, pero, podrían estimular su activación de manera indirecta al incrementar el pH intracelular (Ren *et al.*, 2001; Ren & Xia, 2010).

Como se ha visto, la regulación de *Catsper* se ha enfocado más en la forma de activación del canal, sin embargo, la regulación genética no ha sido descrita, por lo que sería importante tratar de elucidar el mecanismo de regulación génica de los

componentes del canal, para poder así encontrar tratamientos para la infertilidad humana o para el desarrollo de anticonceptivos masculinos.

## **ANTECEDENTES**

### **Análisis de la región promotora de los genes CATSPER**

Uno de los mecanismos que regula transcripcionalmente la expresión génica es a través de secuencias que rodean al gen cercanas al inicio de la transcripción, dichas secuencias son conocidas como secuencias promotoras. Al promotor pueden unírsele proteínas conocidas como factores de transcripción, que al tener contacto con el DNA pueden activar el gen reclutando la maquinaria de transcripción, o, por el contrario, pueden unirse al DNA evitando el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y así reprimir el gen.

A pesar de que los mecanismos de regulación transcripcional se han estudiado mucho, la regulación de la región promotora de muchos genes no se ha analizado. Tal es el caso de los genes que codifican para el canal CATSPER. Pocos estudios se han llevado a cabo para entender la regulación transcripcional de dichos genes, por lo que nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de tratar de caracterizar dichos promotores.

Mediante análisis bioinformáticos se determinó un promotor para *Catsper1* humano de ~739 pb incluía el exón 1 del gen. Además, mediante análisis in silico, se determinaron secuencias consenso de unión a factores de transcripción, entre los que se destacan la familia SOX, CRE, SRY y Sp1. Mediante ensayos de protección de DNasa se observó que efectivamente existía unión de proteínas al DNA en estas regiones, sugiriendo una posible regulación transcripcional por dichos factores. Asimismo, se encontraron sitios TATA y CAAT, sin embargo, el promotor de *Catsper1* es TATAless ya que se conserva la actividad transcripcional al deletar dichas secuencias del promotor. De manera interesante, se observó que el promotor murino de *Catsper1* murino tenía actividad en antisentido, es decir, en dirección

contraria hacia *Catsper1*, sugiriendo que el promotor murino de *Catsper1* pudiera tener actividad bidireccional (Mata-Rocha *et al.*, 2013).

En otro estudio se encontró que el promotor mínimo de *Catsper1* es de 394 pb (-287 a +107). De igual manera, mediante análisis *in silico* se identificaron tres sitios de unión de factores SOX, y se comprobó que los factores SOX5 y SOX9 funcionan como reguladores transcripcionales del promotor, pues la actividad transcripcional del promotor de *Catsper1* se incrementa cuando se sobreexpresan cada uno de estos factores (Mata-Rocha *et al.*, 2014).

A pesar de estos descubrimientos, hacen falta diversas investigaciones para poder elucidar la regulación del promotor de *Catsper1*. Así mismo, no existen estudios en sobre la regulación transcripcional de los otros genes *Catsper*.

### **Análisis de la región promotora de *Catsper2* murino**

De los genes *Catsper*, *Catsper2* es el primero que se expresa durante la espermatogénesis, lo que podría sugerir que tenga una posible actividad regulatoria. Sin embargo, sobre la regulación transcripcional de *Catsper2* no se conoce nada, es por eso, que sería de interés caracterizar su promotor.

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se aislaron dos regiones que contenían los promotores putativos del gen *Catsper2* murino y se clonaron en el vector pGL 4.10. La primera región contiene el promotor putativo de aproximadamente 800 pb, la segunda región es de aproximadamente 1600 pb y ambas contienen parte del primer exón (datos no publicados). De este modo, la región larga de 1600 pb contiene el primer promotor putativo de 800 pb, más otra región promotora de aproximadamente 600 pb, separada del primero por 200 pb aproximadamente. Ambas construcciones fueron sometidas a análisis *in silico* para determinar qué sitios de unión a factores de transcripción contenían. Se encontraron sitios de unión CRE en sentido a *Catsper2*, al igual que lo reportado previamente para *Catsper1* (Mata-Rocha *et al.*, 2012), además, la expresión de factores, como CREM $\tau$ , se ha detectado en testículo en concordancia con la expresión del transcrito de *Catsper2* murino.

## Factores transcripcionales

Los factores de transcripción son proteínas que se encargan de activar o reprimir genes y esto lo hacen mediante su unión al DNA. Estas proteínas se unen al DNA mediante el reconocimiento de secuencias consenso y, cuando se unen al DNA pueden reclutar a la maquinaria transcripcional para así activar el gen, o de manera contraria, pueden unirse a sitios importantes para evitar que la maquinaria transcripcional reconozca el sitio de inicio de la transcripción y así reprimir la expresión del gen.

Como se describió anteriormente, el cAMP juega un papel muy importante durante la espermatogénesis, y existen factores transcripcionales que responden a la cantidad de cAMP presente, tal es el caso de los elementos responsivos a cAMP (CRE, por sus siglas en inglés). Dichos factores juegan un papel muy importante tanto en la activación como en la represión de muchos genes.

### *CREM*

Los niveles de cAMP cambian en respuesta a señales extracelulares, lo que conlleva a la expresión de muchos genes. Esto lo hace a través de la activación transcripcional a través de los elementos responsivos a cAMP (CRE), los cuales son reconocidos por una familia de factores que tiene capacidad de unirse al DNA conocida como CRE (Comb *et al.*, 1986; Montminy *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1988).

Estos factores pertenecen a la familia Bzip (basic region/leucine zipper protein (Kerppola & Curran, 1991). La región básica y el zipper de leucinas, permiten la unión de la proteína al DNA (Dwarki *et al.*, 1990). Estos factores reconocen sitios en el DNA denominados sitios CRE, cuya secuencia consenso es 5'-TGACGTCA-3' (Bokar *et al.*, 1988). Los principales dominios que conforman a la familia son los dominios de unión al DNA y de transactivación (Q1, Q2 y KID) (Foulkes *et al.*, 1991; Ruppert *et al.*, 1992; Don & Stelzer, 2002) (Fig. 6a). Las primeras isoformas de CREM caracterizadas (CREM $\alpha$ , CREM $\beta$  y CREB $\gamma$ ) tenían un dominio básico y de zipper de leucinas, y una región KID, pero no regiones ricas en glutaminas (Q1 y Q2), por lo cual se identificaron a estas isoformas como represoras, puesto que

bloqueaban la acción de otros factores transcripcionales (Foulkes *et al.*, 1991). Posteriormente se identificaron isoformas activadoras, las cuales se denominaron CREM $\tau$  ( $\tau$ 1,  $\tau$ 2 y  $\tau$ 3) (Fig. 6b) (Foulkes *et al.*, 1992; Sanborn, 2000). Una característica importante de CREM, es que puede utilizar promotores alternativos (P3 y P4), los cuales codifican otras isoformas denominadas CREM $\theta$ 1 y CREM $\theta$ 2 (Daniel *et al.*, 2000). Otro promotor alternativo es P2, el cual se encuentra cerca del 3', del cual surge una isoforma represora denominada ICER (inducible cAMP early repressor) (Fig. 6b) (Molina *et al.*, 1993).

El mecanismo por el cual CREM $\tau$  es capaz de activar la expresión génica en células germinales sigue siendo un misterio, sin embargo, se sabe que CREM $\tau$  no necesita fosforilarse como en células somáticas, en cambio, interactúa con una chaperona denominada ACT (activator of CREM in testis) (Fig7), y mediante un mecanismo no elucidado recluta a la maquinaria de transcripción basal (Fimia *et al.*, 1999).

A)



B)

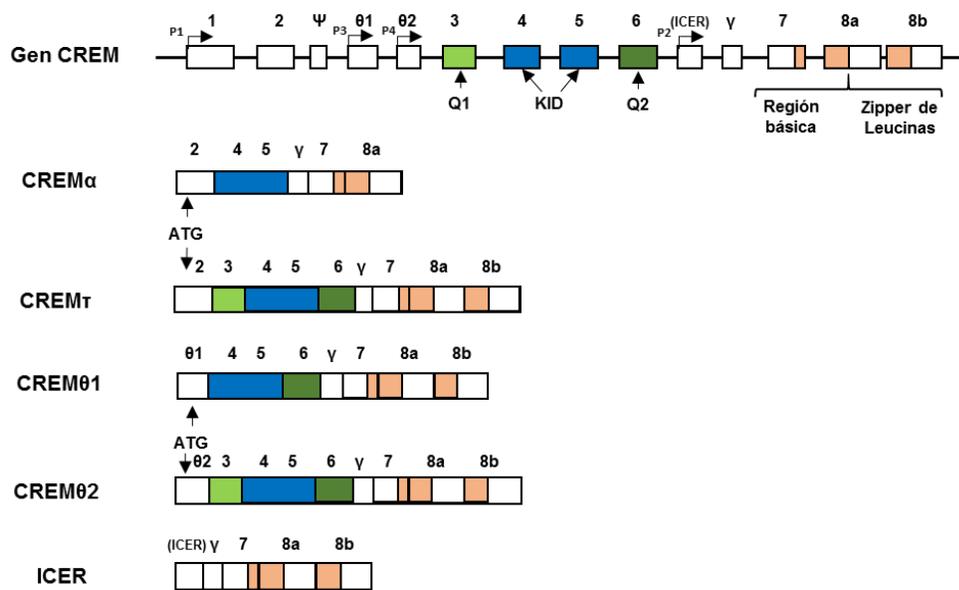


Figura 4. Dominios e isoformas de CREM. Modificado de (Don & Stelzer, 2002).

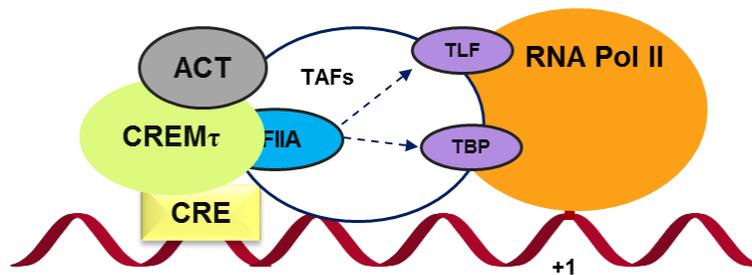


Figura 5. Activación por CREMτ en células germinales. Modificado de Sassone-Corsi (2002).

Las isoformas represoras de CREM son encontradas en la fase pre-meiótica durante la espermatogénesis, mientras que durante la etapa de espermatozoides hay un cambio que hace que se expresen las formas activadoras, principalmente CREMτ (Ruppert *et al.*, 1992; Daniel *et al.*, 2000), sin embargo, la proteína de las formas activadoras no ha sido detectada sino hasta fases post

meióticas, en espermatidas (Behr & Weinbauer, 1999). El cambio de las formas represoras a activadoras es debido a una modificación en la estabilidad del mRNA de CREM $\tau$ , debido al uso de otro sitio 5' de poliadenilación (Foulkes *et al.*, 1993).

Se ha visto que CREM puede regular la actividad de algunos genes en células germinales, entre los que se encuentran RT7, la proteína de transición 1, la enzima convertidora de angiotensina y calispermina (Delmas *et al.*, 1993; Kistler *et al.*, 1994; Sun, Z *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). En cuanto a su función en la reproducción, se ha visto que ratones knock out para CREM $\tau$  producen infertilidad en los ratones macho, debido al arresto en la fase post meiótica de la espermatogénesis, además de un aumento de apoptosis en células germinales (Blendy *et al.*, 1996). De igual manera, se encuentran bajos niveles de CREM $\tau$  en personas que padecen de arresto en la maduración de espermatidas redondas (Weinbauer, G. F. *et al.*, 1998). La expresión de las formas activadoras de CREM durante la fase post meiótica sugiere que pudieran estar regulando a genes expresados en fases haploides de las células germinales, además, se han encontrado diversos sitios CRE en genes que codifican para proteínas estructurales del espermatozoide (Don & Stelzer, 2002).

## JUSTIFICACIÓN

Durante la espermatogénesis se activan genes propios de este proceso, entre ellos se encuentran los que codifican para el canal CATSPER, el cual es un canal catiónico que permea  $\text{Ca}^{+2}$  al espermatozoide, lo que ayuda a la hiperactivación de este y así, a la fertilización del óvulo. Por lo cual, los genes *Catsper* son de gran importancia para la fertilidad masculina. Se sabe que la activación del canal CATSPER está regulado por diversas moléculas, sin embargo, poco es lo que se sabe de la regulación transcripcional de los genes que lo codifican. *Catsper2* es el primer transcrito expresado durante la espermatogénesis, por lo cual podría fungir como regulador de los demás genes *Catsper*. Durante la espermatogénesis se encuentran elevados los niveles de cAMP, pudiendo activar a factores de transcripción que responden a este factor. Asimismo, se ha demostrado que  $\text{CREM}\tau$ , una isoforma específica de testículo es capaz de activar a 12 genes de la espermatogénesis. Por último, un análisis in silico de la región promotora de *Catsper2* ubicó sitios de unión para factores CRE.

Por estas razones, sería de interés investigar si  $\text{CREM}\tau$  podría regular la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino.

# HIPÓTESIS

El factor transcripcional CREM $\tau$  regula al promotor de *Catsper2* murino.

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Determinar el efecto del factor transcripcional CREM $\tau$  en la regulación del promotor de *Catsper2* murino.

## Objetivos Específicos

- Analizar in silico el promotor putativo de *Catsper2* murino.
- Obtener la construcción para la sobreexpresión del factor transcripcional CREM $\tau$ .
- Determinar el efecto del factor transcripcional CREM $\tau$  en la regulación del promotor *Catsper2* murino.
- Detectar los sitios CRE funcionales dentro del promotor de *Catsper2* murino.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

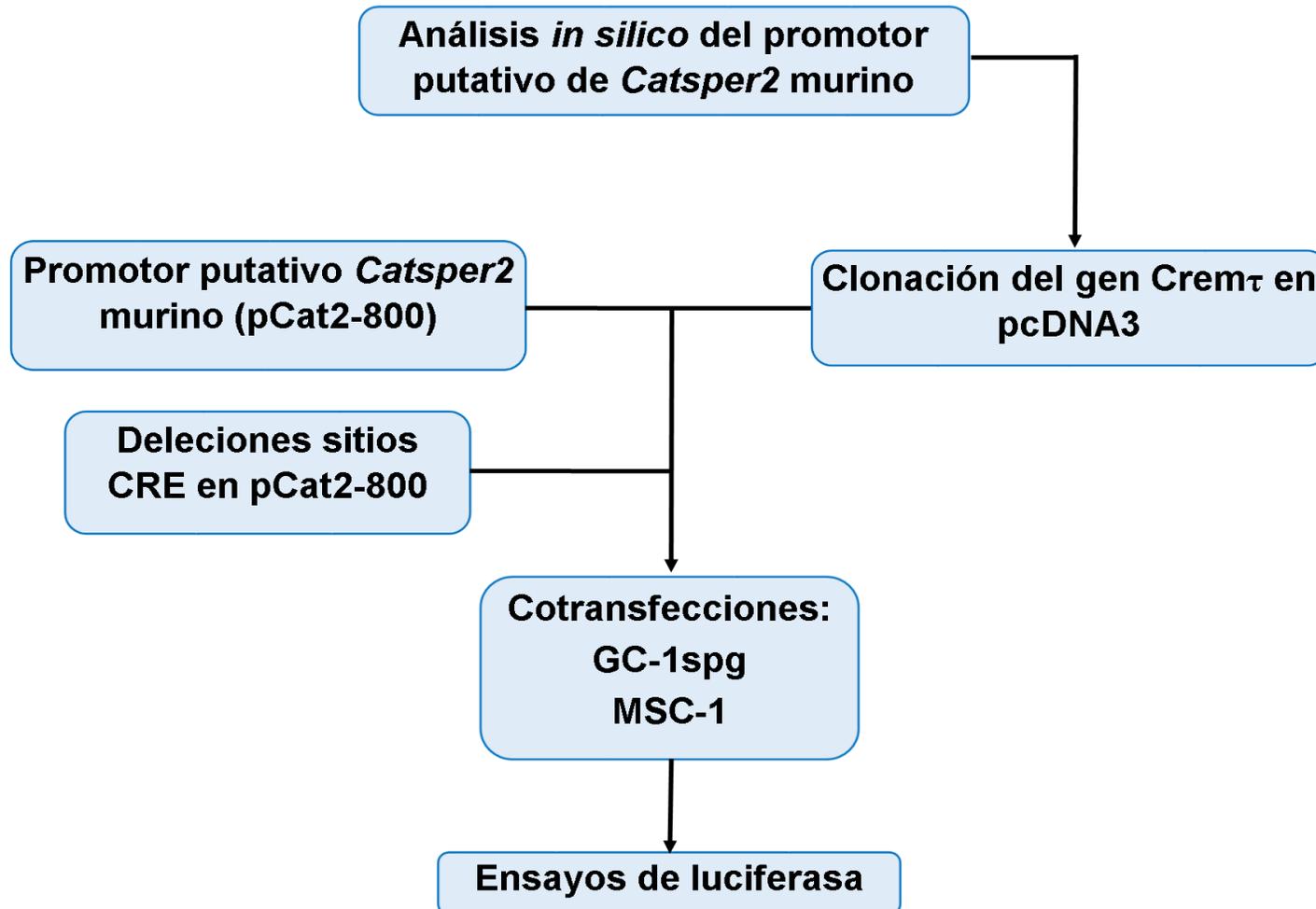


Figura 6. Diagrama Experimental.

## METODOLOGÍA

### Construcción del promotor de 800 pb de *Catsper2* murino

El promotor de 800pb de *Catsper2* murino fue clonado anteriormente en el grupo de trabajo a partir de la construcción de 1600 pb denominada pCat2-1600pb en el vector pGL4.10.

### Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica de aproximadamente 800 pb río arriba del promotor del gen *Catsper2* murino fue realizado utilizando los siguientes programas:

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

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

Promo

([http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3))

Se usaron valores de astringencia altos para obtener mejores predicciones (Tabla 2) y se tomaron en cuanto los sitios con mayor Score.

**Tabla 2. Valores de astringencia utilizados en las bases de datos para la detección de sitios de unión a factores de transcripción.**

Base de datos	Valor de astringencia
<b>MatInspector</b>	Core similarity $\geq 0.9$ Matrix similarity $\geq 0.85$
<b>TFBIND</b>	Core similarity $\geq 0.9$
<b>PROMO</b>	Matrix similarity $\geq 0.85$

## **Clonación del factor transcripcional Crem $\tau$**

### *Extracción de RNA a partir de testículos de ratón*

Se utilizaron ratones machos de 6 a 8 semanas de nacimiento (adulto) de la cepa CD1, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los testículos.

El RNA total fue obtenido mediante la técnica del TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) y se precipitó con la técnica de fenol-cloroformo-álcool isoamílico como se describe a continuación: se pulverizaron los testículos, en un mortero previamente enfriado (toda la noche a -70°C), agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se adicionó 1 ml de TRIZOL y se mezcló con el tejido. Se trasasó a un microtubo de 1.5 ml, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo frío y se agitó vigorosamente hasta obtener un color rosa uniforme. Se centrifugó a 13500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se trasvasó la fase acuosa, la cual contiene el RNA, a un nuevo microtubo y se le adicionaron 700  $\mu$ l de isopropanol frío para precipitar el RNA. Se centrifugó la muestra a 13500 rpm por 45 minutos a 4°C. Una vez obtenido el pellet, se lavó con 300  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y se dejó secar el pellet por 15 minutos aproximadamente. Posteriormente se resuspendió el pellet en 89  $\mu$ l de agua libre de RNasa y se purificó agregando 200  $\mu$ l de fenol ácido pH 4.5 y se centrifugó a 13500 rpm por 5 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro microtubo, se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo-álcool isoamílico 24:1 y se centrifugó a 13500 rpm por 5 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro microtubo y se le agregó 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M pH 5.2, 2 volúmenes de etanol absoluto y se centrifugó a 13500 rpm por 45 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, el pellet de RNA se lavó inmediatamente con 200  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 30 minutos aproximadamente. Finalmente, se resuspendió el pellet en 40  $\mu$ l de agua libre de RNasas. La concentración del RNA se cuantificó utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fischer) y se observó su

pureza mediante el análisis de la relación 260/280 y de la 260/230. Se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1.5%. La muestra se preparó con 1 µg de RNA y 1 µl de buffer de carga 2X RNA Loading Dye (Fermentas). Por último, se incubó a 70°C por 10 minutos y se puso en hielo 5 minutos. La integridad se verificó al observar las bandas del RNA ribosomal 28S, 18S y 5S.

#### *Síntesis de cDNA*

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

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

#### *Amplificación del factor *Cremt**

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como molde el cDNA obtenido previamente para amplificar el gen del factor *Cremt* utilizando el kit comercial Elongase Enzyme Mix (Invitrogen). Para ello se preparó una mezcla compuesta por 0.4 µl de oligo Forward (10 µM), 0.4 µl de oligo Reverse (10 µM), 1.6 µl de dNTP's 2.5 mM, 2 µl de 5X Buffer A, 2 µl de 5X Buffer B, 0.2 µl de enzima DNA polimerasa Elongase, 11.4 µl de agua y 1 µl de cDNA o agua (control negativo) para completar un volumen de 20 µl.

Las condiciones del programa de PCR para *Crem $\tau$*  fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
30	94°C	30 seg
	55°C	30 seg
	68°C	3 min
1	68°C	10 min
1	4°C	infinito

Para visualizar los productos de PCR correspondientes a la expresión de *Crem $\tau$*  se realizaron análisis electroforéticos en geles de agarosa (SIGMA) al 1.5%.

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *Crem $\tau$* . En rojo se observa el sitio de restricción añadido en los oligonucleótidos.**

Nombre	Secuencia (5'→3')
<b>Crem<math>\tau</math> Fw</b>	<b>GGATCC</b> AATAATGAGCAAATGTGGCAGG
<b>Crem<math>\tau</math> Rv</b>	<b>CTCGAG</b> GCAACTGTACATGCTGTAATCAG

#### *Clonación en pJET1.2 blunt*

Para realizar la clonación del producto de la amplificación de *Crem $\tau$*  murino se utilizó el kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) llevando a cabo el siguiente protocolo: se mezcló 1  $\mu$ l de la reacción de PCR con 10  $\mu$ l de Buffer de reacción 10X, 1  $\mu$ l de plásmido pJET1.2 Blunt, 1  $\mu$ l de T4 DNA ligasa y 7  $\mu$ l de agua miliQ libre de nucleasas para obtener un volumen final de 20  $\mu$ l. Finalmente se incubó la reacción a 24°C durante 30 minutos y se transformó con 10  $\mu$ l en las células competentes DH5a

#### **Preparación de células competentes**

Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5a (Genotipo: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r $\kappa$ <sup>-</sup>, m $\kappa$ <sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ <sup>-</sup> *thi-1 gyrA96 relA1*) a 37°C durante toda la noche en 5 ml de medio LB. Al día siguiente se inocularon 500

µl en 50 ml de medio LB fresco. Se incubó a 37°C con agitación vigorosa en un matraz hasta alcanzar una D.O. de 0.6-0.9 a 600 nm. Posteriormente se centrifugaron las bacterias a 7000 rpm por 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 25 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1M recién preparada, luego se centrifugaron las bacterias bajo las mismas condiciones y se fueron resuspendiendo en un volumen menor cada vez de 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml, finalmente cuando se suspendió en 2.5 ml se les agregó 250 µl de glicerol estéril. Todo el proceso se realiza en frío, manteniendo las bacterias en hielo. Finalmente se hicieron alícuotas de 100 µl de bacterias y se mantuvieron en hielo seco hasta su almacenamiento a -70°C.

### **Transformación bacteriana**

Se utilizaron de 80-120 ng de plásmido para transformar 100 µl de bacterias competentes. Las bacterias se mezclaron con el plásmido e incubaron por 30 min en hielo. Posteriormente se les dio un choque térmico sometiendo la mezcla a un pulso de calor de 42°C por 1 min y rápidamente se incubaron en hielo por 1 min. Luego se agregó 1 ml de medio LB precalentado y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Se centrifugaron las bacterias y se decantó el medio, dejando 100 µl aproximadamente, las bacterias se resuspendieron y se sembraron sobre placas de agar LB con el antibiótico apropiado para el plásmido (ampicilina). Finalmente se incubaron toda la noche a 37°C y las candidatas seleccionadas se aislaron en placas de agar LB con el antibiótico apropiado.

### **Subclonación del gen *Cremτ* murino en pcDNA3**

Para llevar a cabo la subclonación de los genes en el vector de expresión pcDNA3 se utilizaron enzimas de restricción para liberar el fragmento deseado y hacer lineal el plásmido de interés.

#### *Restricción enzimática*

Para subclonar el gen *Cremτ*, se restringió el vector *Cremτ*-pJET1.2 y el vector pcDNA3 con las enzimas BamHI y XhoI de la siguiente manera: se incubaron 5 µg (5 µl) de plásmido para el gen de interés 1.5 µg (1.5 µl) para el vector pcDNA3 con

2 µl del Buffer CutSmart 10X (NEB), 1 µl de cada enzima (NEB) y 11 µl (para el plásmido con el gen de interés) o 15.5 µl (para pcDNA3) de agua miliQ libre de nucleasas. Posteriormente se incubó por 1:30 horas a 37°C y se inactivaron las enzimas llevando la reacción a una temperatura de 80°C por 15 min. Una vez inactivadas, se llevó a cabo una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5%. En seguida se seleccionaron las bandas de interés para *Cre $\pi$*  (~1100 pb), pcDNA3 (~5400 pb) y se purificaron utilizando el kit comercial Wizard R SV Gel and PCR Clean-up System (PROMEGA).

#### *Ligación de Cre $\pi$ a pcDNA3*

Una vez purificados los fragmentos de interés y el vector pcDNA3, se ligaron en una relación 3:1 (inserto:vector:) de la siguiente manera: 6 µl de Buffer de ligasa 5X (Invitrogen), 1 µl de enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), 5 µl de plásmido de pcDNA3, 15 µl de inserto y 6 µl de agua miliQ libre de nucleasas para llevarlo a un volumen final de 30 µl. Posteriormente se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se transformó con 10 µl del producto de la reacción en bacterias DH5a competentes y se sembraron en una placa de agar LB con ampicilina/kanamicina. Al día siguiente se seleccionaron candidatas y se resembraron en una placa nueva de agar LB con ampicilina/kanamicina.

#### **Mutagénesis sitio dirigida**

La mutagénesis sitio dirigida se realizó mediante una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos que contuviera la delección deseada (Tabla 4) de los sitios CRE a partir del plásmido pCat2-800 obtenido por Contreras-Marciales (datos no publicados) y que contiene la región de 800pb del promotor de *Catsper2* murino clonado en el vector pGL4.10.

**Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida.**

Nombre	Secuencia (5'→3')
<b>ΔCRE1 Fw</b>	GCAGTGTGGCAGCCGCCGATTGTCGGGCGGGCGGAACAGCTG
<b>ΔCRE1 Rv</b>	CAGCTGTTCCGCCCGCCCGACAATCGGCGGCTGCCACACTGC
<b>ΔCRE2 Fw</b>	GCCGGCGCGGAAGGCGGAGGTGAGTGGGCGGAAGTGAGGC
<b>ΔCRE2 Rv</b>	GCCTCACTTCCGCCCACTCACCTCCGCCTTCCGCGCCGCGC

La reacción de amplificación se realizó en una mezcla de reacción de 25 µl conteniendo 0.75 µl de oligo Forward (10 µM), 0.75 µl de oligo Reverse (10 µM), 3 µl de dNTP's 2.5 mM, 2.5 µl de Buffer de Amplificación 10X, 2.5 µl de Buffer Enhancer 10X, 1 µl de MgSO<sub>4</sub> 50 Mm, 0.5 µl de enzima Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen), 50 ng de DNA (0.1 µl) y se completó la reacción con 15 µl de agua.

Las condiciones del programa utilizado para las mutagénesis sitio dirigidas fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
40	94°C	30 seg
	68°C	6 min
1	68°C	10 min
1	4°C	In finito

### **Verificación de la identidad de los genes por secuenciación**

Para verificar la identidad de los genes clonados se realizó una reacción de secuenciación, para la cual se utilizó el kit comercial Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Para la reacción se mezcló 1 µg de plásmido, 4 µl de Buffer de secuenciación 5X, 2 µl de mix de reacción, 10 pM de

oligonucleótidos, 1 µl de DMSO, 1 µl de betaína y se llevó a un volumen total de 20 µl con agua miliQ libre de nucleasas. Se emplearon 3 oligonucleótidos diferentes para la comprobación del vector pcDNA3-Cremt (CMV Fw, BGH Rev y CremSecFw) y 2 oligonucleótidos para las deleciones de los sitios CRE (tabla 5).

**Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación automática de las construcciones**

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm
<b>CMV Fw</b>	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	60°C
<b>BGH Rev</b>	CTATAGTGTCACCTAAAT	44°C
<b>Crem<math>\tau</math> Sec Fw</b>	CTGAATGAACTTTCCTCTGATGTGCC	60°C
<b>RvPrimer3</b>	CTAGCAAATAGGCTGTCCC	54°C
<b>Luc2 Rev</b>	GTCCCGTCTTCGAGTGGGTAG	59°C

Las condiciones del programa variaron dependiendo de la Tm de los oligos utilizados, pero en general se utilizaron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	2 min
35	96°C	30 seg
	Dependiendo el oligo	30 seg
	60°C	4 min
1	60°C	5 min
1	4°C	infinito

### **Cultivos celulares**

Dado que no existe una línea celular que se encuentre en el estadio de espermatocito primario, en el cual se expresa el gen Catsper2, se utilizaron las líneas celulares GC-1spg y MSC-1. Las primeras son el modelo más parecido, puesto que son células espermatogénicas tipo B perteneces al linaje celular de los gametos masculinos inmortalizadas por transfección con el vector pSV3-neo (un

plásmido que contiene la secuencia del antígeno T largo del virus SV40). Las segundas son células de Sertoli de ratón, las cuales son células somáticas de testículo de la cepa de ratón BALB/c que han sido inmortalizadas por transfección con el antígeno T pequeño y largo del virus SV40.

El manejo de las células se realizó dentro de una campana de flujo vertical previamente esterilizada con luz UV por 15 minutos. Todas las soluciones utilizadas fueron previamente esterilizadas con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro o por autoclave. Se utilizó el medio Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB GIBCO) al 10% y antibióticos Penicilina (5000 u/ml) Estreptomina (5 mg/ml) (SIGMA) al 1%. Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C, 90% humedad y 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Pase celular*

Se eliminó el medio de cultivo de las cajas con células adherentes y se lavó con PBS estéril. Para despegar las células se adicionaron 2 ml de tripsina-verseno (0.25%-0,02%) (Invitrogen), se incubó por 2 min a 37°C y se neutralizó con 2 ml de medio DMEM suplementado. En el caso de las MSC-1 se despegaron mecánicamente utilizando 4 ml de medio DMEM suplementado. En ambos casos, se cosecharon las células, se pusieron en un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente se decantó el medio y se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM suplementado nuevo. Se tomaron 10  $\mu\text{l}$  y se mezclaron con 80  $\mu\text{l}$  de medio DMEM suplementado y 10  $\mu\text{l}$  de azul de tripano para cuantificarlas en la cámara de Neubauer. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en una nueva caja.

#### **Transfección transitoria de las líneas celulares MSC1 y GC-1spg**

La transfección de las construcciones con el promotor de 800pb de *Catsper2* murino (pCat2-800), las construcciones con los sitios CRE deletados (CRE1 y CRE2) y la co-transfección del plásmido con el gen del factor transcripcional Crem $\tau$  (pcDNA3-Crem $\tau$ ) se realizaron con los compuestos Dharmafect (Dharmacon) para la línea celular MSC-1 y K2 transfection reagent (Biontexas) para la línea celular GC-1spg. Se utilizaron los plásmidos pGL4.10 como control de expresión transcripcional basal y

pGL4.10-CMV como control positivo de los experimentos. En los ensayos de co-transfección, se utilizaron el plásmido pGL4.10 más el plásmido del factor transcripcional como control de expresión transcripcional basal. Adicionalmente, se utilizó como control interno el plásmido pRL-CMV que posee como gen reportero a la luciferasa de *Renilla reniformis*, en cada ensayo de transfección. Los plásmidos fueron introducidos en las células, y la actividad observada para las construcciones fue normalizada en función de la actividad de la luciferasa de *Renilla*, minimizando la variabilidad experimental causada por diferencias en viabilidad celular o eficiencia de transfección (Tabla 4)

**Tabla 6. Construcciones utilizadas en los ensayos de transfección transitoria en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1.**

Plásmido	Origen del inserto	Gen reportero
<b>pCat2-800</b>	Promotor Catsper2 murino	
<b>pCat2-800<math>\Delta</math>CRE1</b>	Promotor Catsper2 murino	
<b>pCat2-800<math>\Delta</math>CRE2</b>	Promotor Catsper2 murino	
<b>pGL4.10</b>	Sin promotor	<i>Photinus pyralis</i> (Luciferasa)
<b>pGL4.10-CMV</b>	Promotor de CMV	
<b>pRL-CMV</b>	Promotor de CMV	<i>Renilla reniformis</i> (Luciferasa)
<b>Crem<math>\tau</math>-pcDNA3</b>	Amplificación, gen <i>Crem<math>\tau</math></i>	No aplica

Los ensayos de transfección se realizaron en placas de 24 pozos, para lo cual se sembraron células MSC-1 o GC-1spg a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pozo. La transfección se realizó a las 24 horas, asegurándose de que cada pozo tuviese una confluencia celular de entre 70-80%. Se preparó el complejo DNA-Dharmafect para células MSC-1 o DNA-K2 para las células GC-1spg en un tubo estéril usando la cantidad de DNA sugerida por el fabricante (Tabla 5 y 6). En el caso del sistema K2

las células fueron sensibilizadas 2 horas antes de la transfección con el reactivo K2 Multiplier (2µl/pozo).

**Tabla 7. Transfección con las construcciones pCat2-800, pCat2-800ΔCRE1 y pCat2-800ΔCRE2 conteniendo el promotor putativo de *Catsper2* murino y co-transfecciones con el plásmido con el gen del factor *Cremτ* en células MSC-1.**

	Transfección	Control positivo	Control basal	Co-transfección	Control positivo	Control basal
<b>pCat2-800</b>	500 ng	-	-	500 ng	-	-
<b>pCat2-800ΔCRE1</b>	500 ng	-	-	500 ng	-	-
<b>pCat2-800ΔCRE2</b>	500 ng	-	-	500 ng	-	-
<b>pcDNA3-Cremτ</b>	-	-	-	500 ng	500 ng	-
<b>DNA degradado de salmón</b>	500 ng	975 ng	500 ng	-	475 ng	-
<b>Control interno (pRL-CMV)</b>	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng	0.4 ng
<b>pGL4.10-CMV</b>	-	25 ng	-	-	25 ng	-
<b>pGL4.10</b>	-	-	500 ng	-	-	500 ng
<b>Dharmafect</b>	3	3	3	3	3	3
<b>Medio DMEM sin suplementar</b>	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl	Llevar a 100 µl
<b>DNA total</b>	1 µg	1µg	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg

**Tabla 8. Transfección con las construcciones pCat2-800, pCat2-800 $\Delta$ CRE1 y pCat2-800 $\Delta$ CRE2 conteniendo el promotor putativo de *Catsper2* murino y co-transfecciones con el plásmido con el gen del factor *Cremx* en células GC-1spg.**

	Transfección	Control positivo	Control basal	Co-transfección	Control positivo	Control basal
<b>pCat2-800</b>	250 ng	-	-	250 ng		
<b>pCat2-800<math>\Delta</math>CRE1</b>	500 ng	-	-	500 ng	-	-
<b>pCat2-800<math>\Delta</math>CRE2</b>	500 ng	-	-	500 ng	-	-
<b>DNA degradado de salmón</b>	250 ng	475 ng	250 ng	-	225 ng	-
<b>Control interno (pRL-CMV)</b>	0.2 ng					
<b>pGL4.10-CMV</b>	-	25 ng	-	-	25 ng	-
<b>pGL4.10</b>	-	-	250 ng	-	-	250 ng
<b>K2 Transfection reagent</b>	2 $\mu$ l					
<b>Medio DMEM sin suplementar</b>	Llevar a 60 $\mu$ l					
<b>DNA total</b>	0.5 $\mu$ g					

Las mezclas se dejaron reposando 20 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron lentamente a cada pozo, agitando suavemente. Los cultivos se incubaron durante 48 h para posteriormente obtener los extractos proteicos. A las 24 h se les hizo un cambio de medio.

## Ensayo de luciferasa DUAL

La actividad transcripcional de las construcciones conteniendo la región de 800pb del promotor de *Catsper2* murino y sus deleciones sobre los genes reporteros de luciferasa se cuantificó en los extractos proteicos en un sistema de ensayo Dual-Luciferase Reporter Assay (PROMEGA) para producir quimioluminiscencia, la cual fue cuantificada en el luminómetro Fluoroskan Ascent. El término reportero dual se refiere a la expresión simultánea y medición de dos enzimas reporteras individuales dentro de un mismo sistema.

Transcurridas las 48 horas de transfección se aspiró el medio de los pozos y se lavaron con 100  $\mu$ l de PBS 1X, en seguida, las células se incubaron con 100  $\mu$ l de Passive Lysis Buffer 1X durante 15 minutos a temperatura en agitación. Se recolectaron los sobrenadantes en tubos de 1.5 ml y las células se terminaron de lisar mediante lisis mecánica con la pipeta. Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min a 4°C para separar los restos celulares.

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

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

Las actividades de las construcciones analizadas fueron normalizadas con la actividad del control interno pRL-CMV y se consideró la actividad total de GL4.10 como una unidad relativa de luciferasa.

## Detección de la expresión de *Cremt* en las líneas celulares

### *Extracción de RNA y síntesis de cDNA*

Se sembraron células GC-1spg y MSC-1 en placas de 6 pozos a una densidad de  $9 \times 10^5$  y a las 24 horas fueron transfectadas con 2.9 y 4  $\mu\text{g}$  de DNA de plásmido con el gen *Cremt*. A las 48 horas se extrajo el RNA mediante la técnica de TRIZOL previamente descrita. Se cuantificó el RNA obtenido y se sintetizó cDNA a partir de 1  $\mu\text{g}$  del control y de la muestra problema.

### *Identificación de *Cremt* en las líneas celulares*

A partir del cDNA, se amplificó una región interna del gen *Cremt* para su usando oligonucleótidos específicos (Tabla#). Para esto se utilizó la Taq DNA polimerasa (NEB), haciendo una mezcla de la siguiente manera: 1  $\mu\text{g}$  de cDNA (1  $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de Buffer estándar 10X, 0.8  $\mu\text{l}$  de dNTP's 2.5 mM, 0.2  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido Forward y Reverse (10  $\mu\text{M}$ ), 0.05  $\mu\text{l}$  de polimerasa Taq DNA polimerasa y 6.75  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Las condiciones del programa de PCR fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 min
20	95°C	30 seg
	54°C	30 seg
	68°C	1:30 min
1	68°C	5 min
1	4°C	infinito

Para visualizar los productos de PCR se realizó un análisis electroforético en gel de agarosa (SIGMA) al 1.5%.

**Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR.**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
<b>Crem<math>\tau</math> Sec Fw</b>	CTGAATGAACTTTCTCTGATGTGCC
<b>Crem<math>\tau</math> Sec Rv</b>	CTTGGGGCAAGGTCAGTCTCC

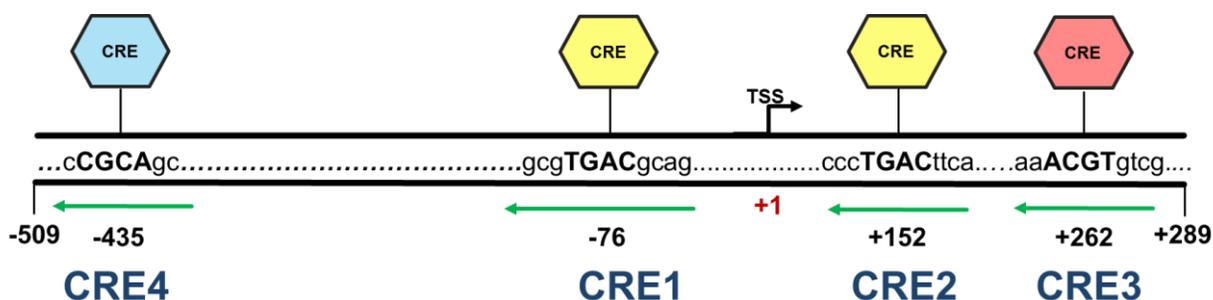
### **Análisis estadístico**

La actividad de las construcciones conteniendo el promotor putativo *Catsper2* murino y la delección de los sitios CRE fue analizada mediante la prueba t de student tomando una desviación estándar no homogénea y utilizando el programa GraphPad Prism 6 para Windows. Se consideró como diferencia estadística significativa de acuerdo con el siguiente código: p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*) y p<0.001 (\*\*\*).

## RESULTADOS

### Análisis *in silico* del promotor putativo de *Catsper2*

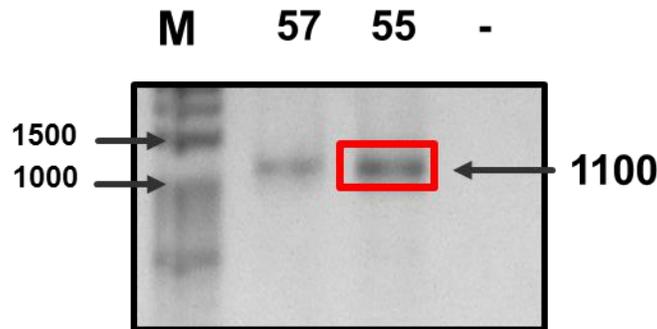
El análisis *in silico* del promotor putativo del gen *Catsper2* murino se hizo sobre la secuencia de la región de 800 pb que previamente fue clonada en nuestro laboratorio y fue usada en este trabajo para evaluar la actividad transcripcional (pCat2-800). Se utilizaron las bases de datos MatInspector (Genomatix), TFBind y PROMO (Algenne) para analizar la secuencia con valores altos de astringencia, como se describe en la metodología, y se tomaron en cuenta los sitios con mayor Score. Se predijeron cuatro sitios de unión para factores de transcripción responsivos a cAMP (CRE), de los cuales dos sitios fueron predichos por las tres bases de datos usadas. De manera interesante, estos sitios se encuentran en una región cercana al sitio de inicio de la transcripción (-150 a +150). Además, se encontró un sitio lejano río arriba del TSS (sitio de inicio transcripcional) predicho por la base de datos PROMO y uno río abajo del TSS empleando la base de datos MatInspector. Todos los sitios de unión encontrados están en sentido 3'-5' con respecto al TSS, sin embargo, al tratarse de secuencias palindrómicas, los factores son capaces de reconocer dichos sitios de unión en la otra dirección (Figura 7).



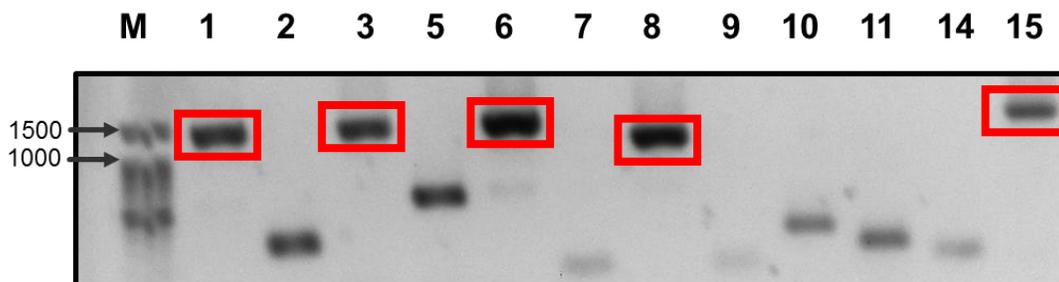
**Figura 7. Análisis *in silico* de la región del 800 pb del promotor putativo de *Catsper2* murino.** Los sitios señalados son los obtenidos con el mayor Score usando las bases de datos MatInspector, PROMO y TFBind. En amarillo se observan los sitios encontrados por las 3 bases de datos, en azul se señala un sitio encontrado por la base PROMO y en rojo un sitio encontrado por la base MatInspector. Se indica el sitio de inicio transcripcional (TSS). Las flechas verdes indican la dirección en la que se encontró el sitio de unión de factores CRE, el número indicado representa la posición de la primera base de la secuencia consenso con respecto al TSS. Los nucleótidos representados indican la posible secuencia reconocida por los factores CRE, resaltando en negritas el sitio de unión.

### Clonación del gen del factor transcripcional *Cre $\mu$* .

Basándose en la predicción in silico de sitios de unión para factores de transcripción responsivos a cAMP (CRE), se decidió hacer la clonación del gen *Cre $\mu$*  a partir de RNA total de testículo de ratón adulto, ya que en este tejido y etapa se encuentra la isoforma específica de este factor. A partir del RNA total se sintetizó cDNA y se realizó una PCR para clonar el gen con oligonucleótidos específicos (Tabla 3) (Figura 8). El producto de dicha amplificación (1057 pb) se clonó en el vector pJET1.2 y mediante PCR de colonia se determinó la presencia del inserto en las bacterias candidatas (Figura 9).



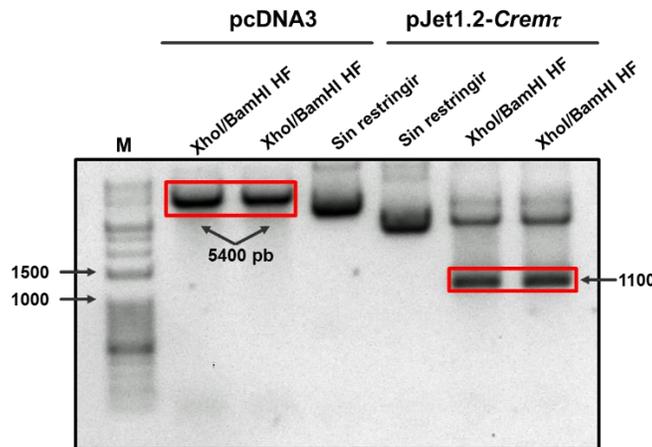
**Figura 8. Amplificación del gen *Cre $\mu$*  murino.** Se amplificó un fragmento de 1057 pb del gen *Cre $\mu$*  a partir de cDNA de ratón macho adulto usando oligos específicos y un gradiente de temperatura de alineamiento. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.5%.



**Figura 9. Análisis de bacterias candidatas transformadas con el plásmido pJET1.2-*Cre $\mu$* .** El fragmento con el gen de *Cre $\mu$*  murino fue clonado en el vector pJET y las bacterias transformadas con esta construcción fueron analizadas por PCR de colonia con los oligos específicos para pJET (ThermoFisher Scientific) obteniéndose 5 candidatas con el fragmento deseado.

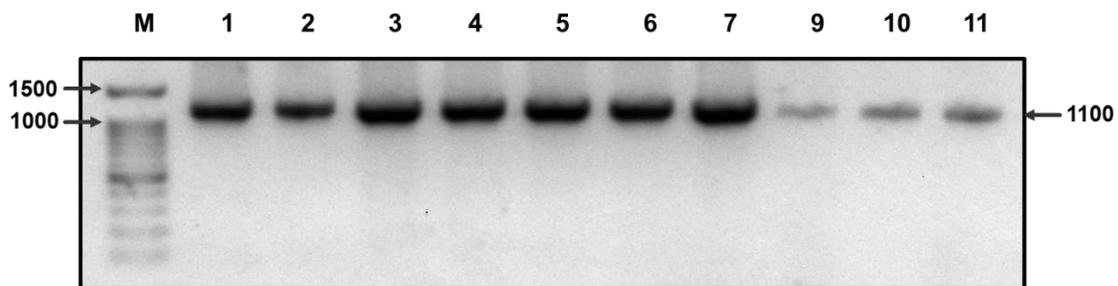
Se seleccionó una candidata y se liberó el fragmento de interés por restricción enzimática con las enzimas *Xho*I y *Bam*HI, al mismo tiempo se linealizó el vector de

expresión pcDNA3 con las mismas enzimas para subclonar el gen *Crem $\tau$*  murino (Figura 10).



**Figura 10. Subclonación del gen *Crem $\tau$*  murino en el vector pcDNA3.** El fragmento de 1057 pb se liberó de pJET1.2-*Crem $\tau$*  por restricción enzimática utilizando *Xho*I y *Bam*HI (carriles 6 y 7), usando las mismas enzimas se linealizó el vector pcDNA3 (carriles 2 y 3) para realizar la subclonación.

Posteriormente se seleccionaron las bandas de interés, se purificaron mediante el kit comercial de purificación de bandas (PROMEGA) y se realizó la ligación con la enzima T4 DNA Ligasa en una relación 3:1 del inserto con respecto al vector pcDNA3. En seguida se transformó el producto de ligación en bacterias DH5 $\alpha$  competentes y se comprobó la presencia del inserto de interés mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *Crem $\tau$*  (Figura 11).



**Figura 11. Análisis de bacterias candidatas transformadas con el plásmido pcDNA3-*Crem $\tau$* .** El fragmento con el gen de *Crem $\tau$*  murino fue subclonado en el vector de expresión pcDNA3 y las bacterias transformadas con esta construcción fueron analizadas por PCR de colonia con los oligos específicos para la amplificación del gen *Crem $\tau$*  obteniendo las 11 candidatas con el fragmento deseado.

Finalmente, la construcción pcDNA3- Crem $\tau$  fue enviada a secuenciación para verificar la identidad de la secuencia del gen, comparándola con la de la base de datos de NCBI. Se encontró que la construcción no presentaba ningún cambio con respecto a la secuencia reportada en NCBI (Figura 12)

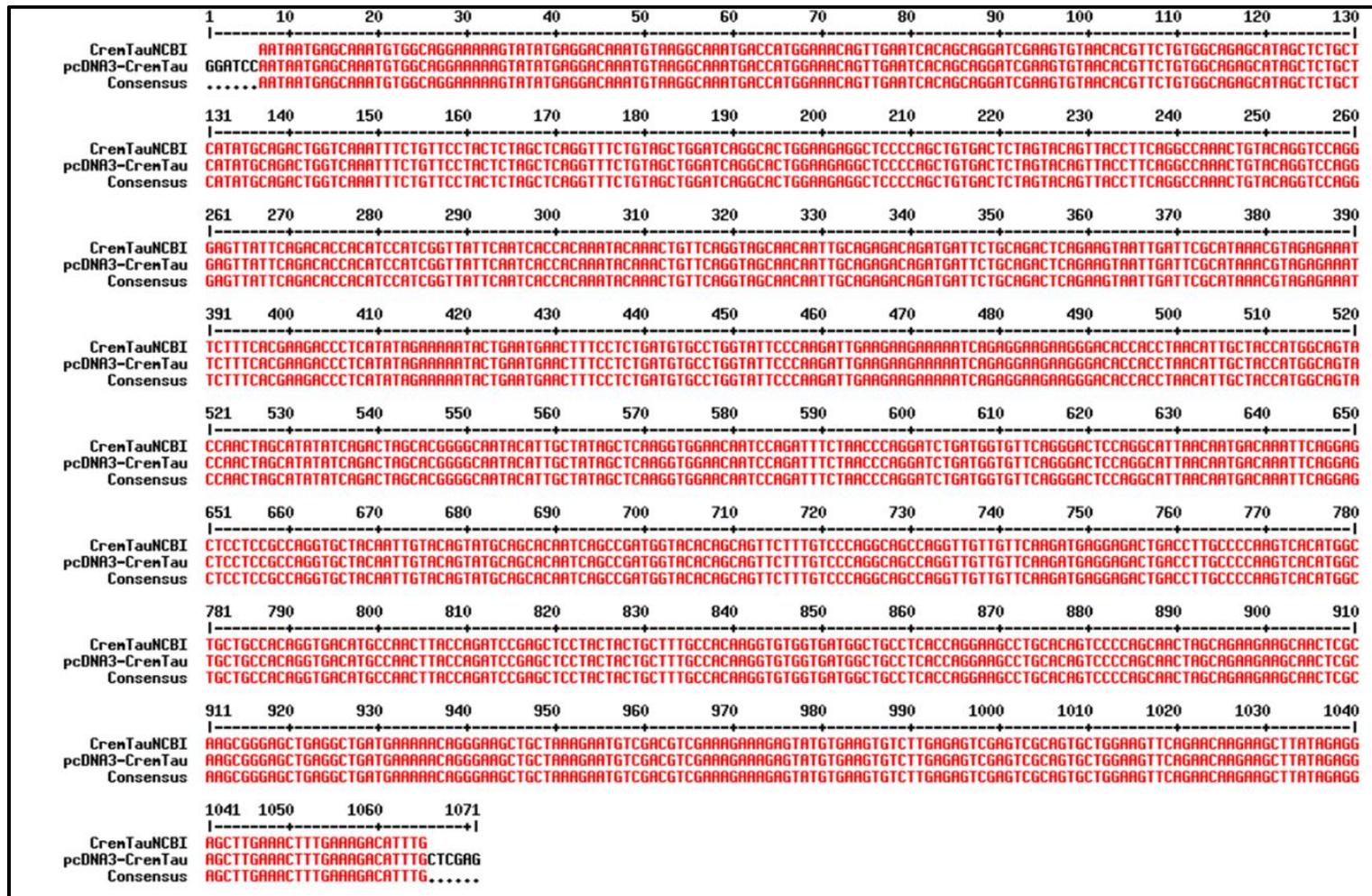
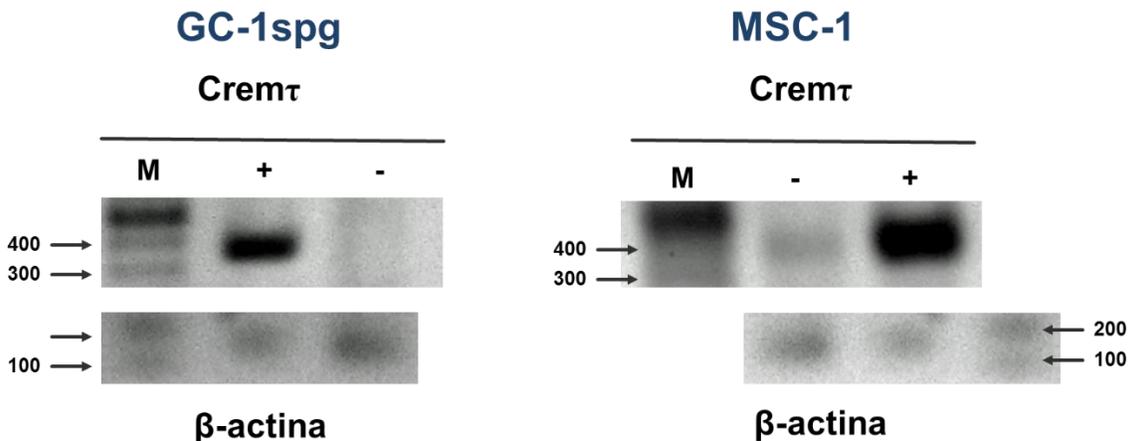


Figura 12. **Análisis de la secuencia de la construcción pcDNA3-Crem $\tau$ .** Se realizó secuenciación automática del gen *Crem $\tau$*  clonado en el vector pcDNA3-Crem $\tau$  y se alinearon las secuencias nucleotídicas para corroborar la identidad de la secuencia clonada, observando que la identidad de nuestra construcción no presentó cambios.

### Expresión endógena y sobreexpresión del factor transcripcional *Cre $\tau$* .

Para determinar si las células GC-1spg y MSC-1 transfectadas con la construcción pDNA3-*Cre $\tau$*  sobreexpresaban el factor *Cre $\tau$*  a nivel de RNA mensajero, se obtuvo cDNA a partir de RNA (1  $\mu$ g) de ambas líneas celulares y utilizando oligos específicos (Tabla 5) se amplificó una región que contiene la isoforma activadora CREM $\tau$  (Figura 13) Como control de carga se utilizó al gen de  $\beta$ -Actina, el cual se amplificó utilizando oligos específicos (Anexo).



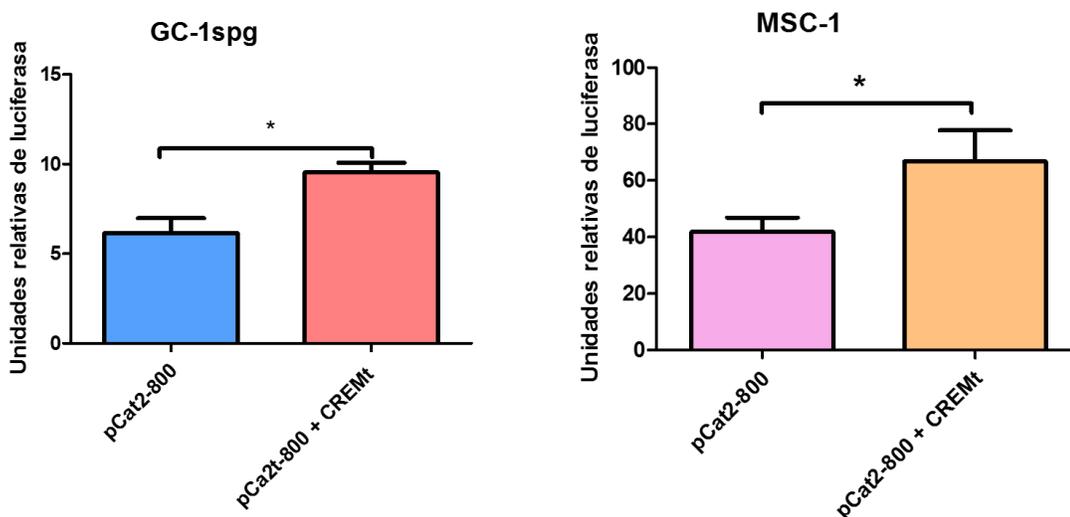
**Figura 13. Análisis de la sobreexpresión del RNA mensajero de *Cre $\tau$*  en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1.** Se amplificó un fragmento de 303 pb correspondiente a la región activadora del RNA mensajero del gen *Cre $\tau$*  (superior) y como control de carga se amplificó el gen  $\beta$ -Actina (inferior). En el panel izquierdo se observa una banda intensa en las células GC-1spg transfectadas con la construcción pDNA3- *Cre $\tau$*  (carril 2) mientras que en las células control no se observa banda (carril 3). En el panel derecho, correspondiente a la línea celular MSC-1, se observa una banda más intensa en las células transfectadas con la construcción pDNA3-*Cre $\tau$*  (carril 3), en comparación con las células control (carril 2).

### Efecto del factor transcripcional CREM $\tau$ en la actividad del promotor de *Catsper2* murino.

La actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino previamente clonado río arriba del gen de luciferasa de *Photinus* (pCat2-800) fue evaluada bajo condiciones de sobreexpresión del factor CREM $\tau$  a partir de la construcción pDNA3- *Cre $\tau$*  mediante el ensayo de luciferasa dual en las líneas celulares GC-

1spg y MSC-1.

Al analizar los datos obtenidos de actividades de luciferasa como se describe en Materiales y Métodos, se observó que la sobreexpresión del factor transcripcional CREM $\tau$  induce la activación del promotor de *Catsper2* murino en ambas líneas celulares. En la línea celular GC-1spg que corresponde a espermatogonia, se observó un aumento de dos veces las unidades de luciferasa, en cuanto a la línea celular MSC-1 que corresponde a células de Sertoli de ratón, el aumento observado fue de un 20% aproximadamente (Figura 14).

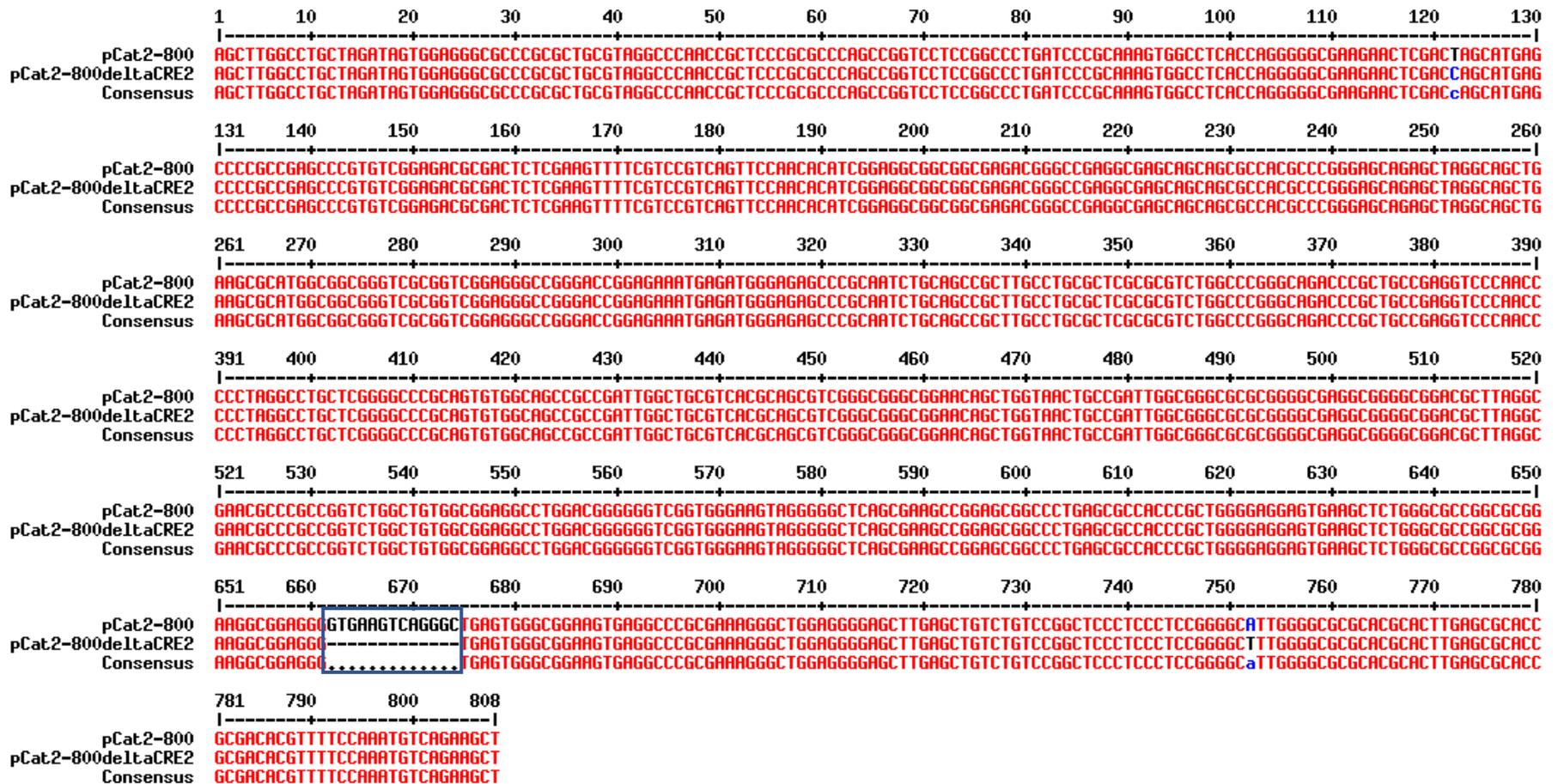


**Figura 14. El factor transcripcional CREM $\tau$  incrementa la actividad transcripcional del promotor *Catsper2* murino en células GC-1spg y MSC-1.** La construcción pCat2-800, que contiene el promotor de *Catsper2* murino río arriba del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*, fue co-transfectada en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1 junto con el plásmido pRL-CMV (que contiene el promotor de CMV río arriba del gen de Renilla reniformis) para la normalización de los datos. Además, se co-transfectó con la construcción pcDNA3-Crem $\tau$  para sobreexpresar el factor de transcripción. A las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de las luciferasas. La actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* 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 SEM, n=3 y los asteriscos la diferencia significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### **Delección de sitios CRE.**

Tomando como base la construcción pCat2-800, se diseñaron oligos específicos para eliminar los sitios de unión a CRE cercanos (-76 y +152, ver Figura 7) al sitio de inicio transcripcional para determinar si son funcionales dentro del promotor. Hasta ahora solo se han deletado dos de los cuatro sitios consenso encontrados in silico mediante mutagénesis dirigida usando oligonucleótidos específicos (Tabla 4) como se indica en Materiales y Métodos. A la construcción que se le deletó el sitio consenso río arriba del TSS se le denominó  $\Delta$ CRE1 y a la que se encuentra río abajo del TSS se le denominó  $\Delta$ CRE2 (Figura 15).

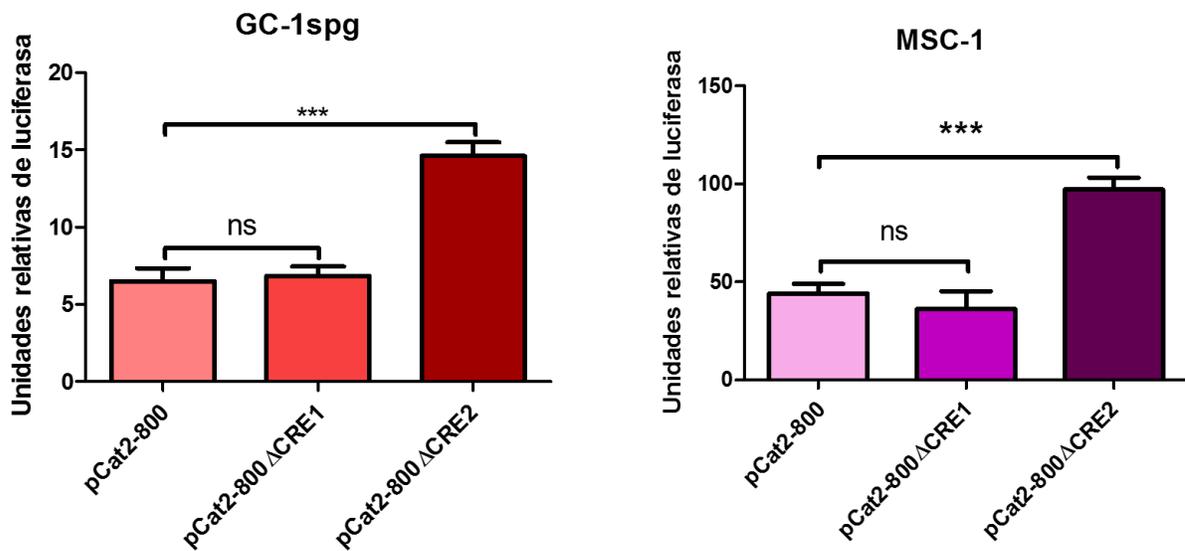
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
pCat2-800	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCat2-800deltaCRE1	AGCTTGGCCTGCTAGATAGTGGAGGGCGCCCGCGCTGCGTAGGCCCAACCCTCCCGCGCCAGCCGGTCTCCGGCCCTGATCCCGCAAGTGGCCTCACCAGGGGGCGAAGAACTCGACTAGCATGAG													
Consensus	AGCTTGGCCTGCTAGATAGTGGAGGGCGCCCGCGCTGCGTAGGCCCAACCCTCCCGCGCCAGCCGGTCTCCGGCCCTGATCCCGCAAGTGGCCTCACCAGGGGGCGAAGAACTCGACAGCATGAG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
pCat2-800	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCat2-800deltaCRE1	CCCCGCCGAGCCCGTGTCCGGAGACGCGACTCTCGAAGTTTTCTGTCCTCAGTTCCAAACACATCGGAGGCGGCGGCGAGACGGGCCGAGGCAGCAGCAGCGCCACGCCCGGGAGCAGAGCTAGGCAGCTG													
Consensus	CCCCGCCGAGCCCGTGTCCGGAGACGCGACTCTCGAAGTTTTCTGTCCTCAGTTCCAAACACATCGGAGGCGGCGGCGAGACGGGCCGAGGCAGCAGCAGCGCCACGCCCGGGAGCAGAGCTAGGCAGCTG													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
pCat2-800	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCat2-800deltaCRE1	AAGCGCATGGCGGCGGGTCCGCGTCCGGAGGCGGGACCGGAGAAATGAGATGGGAGAGCCCGCAATCTGCAGCCGCTTGCCCTGCCTCGCGCTGCGCGCTGCGCCGGGCGAGACCCGCTGCCGAGGTCCCAACC													
Consensus	AAGCGCATGGCGGCGGGTCCGCGTCCGGAGGCGGGACCGGAGAAATGAGATGGGAGAGCCCGCAATCTGCAGCCGCTTGCCCTGCCTCGCGCTGCGCGCTGCGCCGGGCGAGACCCGCTGCCGAGGTCCCAACC													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
pCat2-800	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCat2-800deltaCRE1	CCCTAGGCTGCTCGGGGCCCGCAGTGTGGCAGCCGCCGATTGCTGCGCTCAGCGAGCGTGGGGCGGGCGGAACAGCTGGTAACTGCCGATTGGCGGGCGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGGACGCTTAGGC													
Consensus	CCCTAGGCTGCTCGGGGCCCGCAGTGTGGCAGCCGCCGATTGCTGCGCTCAGCGAGCGTGGGGCGGGCGGAACAGCTGGTAACTGCCGATTGGCGGGCGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGGACGCTTAGGC													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
pCat2-800	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCat2-800deltaCRE1	GAAAGCCCGCCGGTCTGGCTGTGGCGGAGGCTGGACGGGGGTCGGTGGGAAATAGGGGGCTCAGCGAAGCCGGAGCGGCCCTGAGCGCCACCCGCTGGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCCGGCGCGG													
Consensus	GAAAGCCCGCCGGTCTGGCTGTGGCGGAGGCTGGACGGGGGTCGGTGGGAAATAGGGGGCTCAGCGAAGCCGGAGCGGCCCTGAGCGCCACCCGCTGGGGAGGAGTGAAGCTCTGGGCGCCGGCGCGG													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
pCat2-800	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
pCat2-800deltaCRE1	AAGGCGGAGGGGTGAAGTCAGGGCTGAGTGGGCGGAGTGAAGCCCGCAAGGGCTGGAGGGGAGCTTGAAGTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCTCCGGGGCAATTGGGGCGCGCACGCACTTAGCGCACCC													
Consensus	AAGGCGGAGGGGTGAAGTCAGGGCTGAGTGGGCGGAGTGAAGCCCGCAAGGGCTGGAGGGGAGCTTGAAGTGTCTGTCCGGCTCCCTCCCTCCGGGGCAATTGGGGCGCGCACGCACTTAGCGCACCC													
	781	790	800	808										
pCat2-800	-----													
pCat2-800deltaCRE1	GCGACACGTTTTCCAATGTCAAGAGCT													
Consensus	GCGACACGTTTTCCAATGTCAAGAGCT													



**Figura 15. Análisis de las secuencias de las construcciones pCat2-800ΔCRE1 y pCat2-800ΔCRE2.** Se realizaron secuenciaciones posteriores a las mutagénesis sitio dirigidas realizadas para deletar los sitios de unión CRE cercano al TSS. Se muestran los alineamientos con la secuencia silvestre del promotor pCat2-800. En el panel A se observa la delección del sitio CRE1 río arriba del TSS denominada pCat2-800ΔCRE1 y en el panel B la delección del sitio CRE2 río abajo del TSS denominada pCat2-800ΔCRE2. En el recuadro azul se indica la delección realizada.

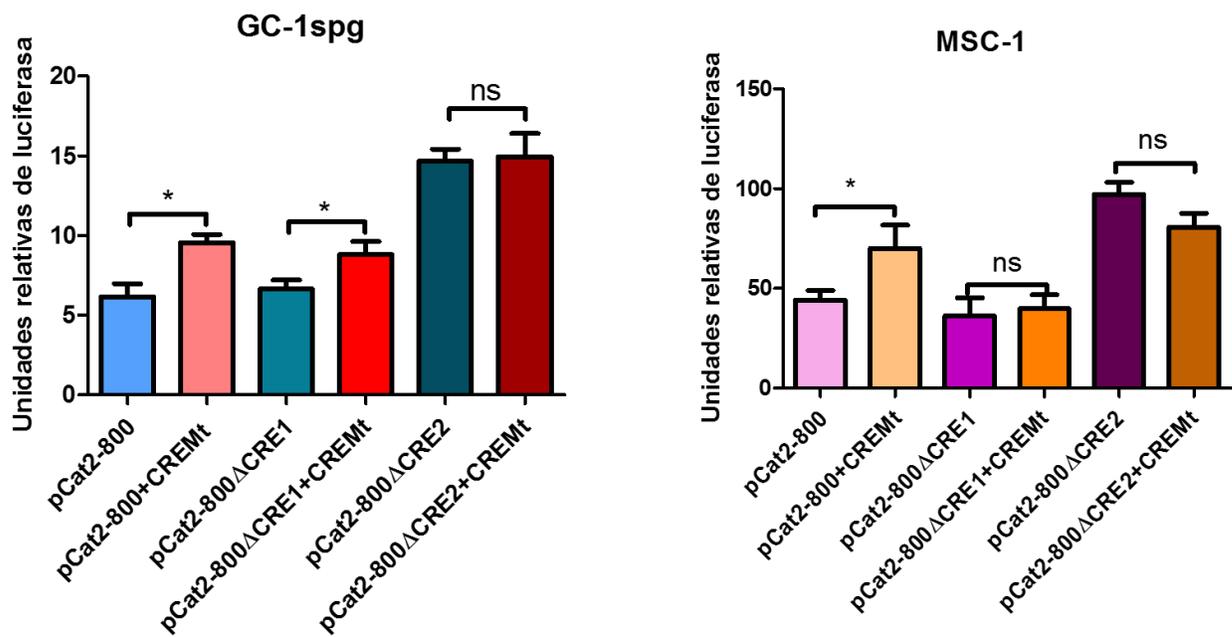
## Análisis de la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* conteniendo las deleciones de los sitios CRE

Para analizar la actividad transcripcional de las construcciones del promotor de *Catsper2* murino con los sitios CRE deletados, se transfectaron las líneas celulares GC-1spg y MSC-1 y se determinaron las actividades de luciferasa. Al analizar los datos obtenidos se observó que la deleción del sitio CRE río arriba del TSS (pCat2-800 $\Delta$ CRE1) tuvo una actividad transcripcional igual con respecto al promotor sin deleciones (pCat2-800), en cambio, la deleción del sitio río abajo del TSS (pCat2-800 $\Delta$ CRE2) produjo actividad transcripcional en ambas líneas celulares (Figura 16). Estos resultados sugieren que el sitio CRE encontrado a +152 del TSS podría estar siendo ocupado por un represor, puesto que la deleción de este provoca un aumento de la actividad transcripcional.



**Figura 16.** La deleción del sitio CRE2 río abajo del TSS ( $\Delta$ CRE2) aumenta la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1. Las construcciones que contienen las deleciones de los sitios CRE1 (pCat2-800 $\Delta$ CRE1) y CRE2 (pCat2-800 $\Delta$ CRE2), fueron co-transfectadas en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1 junto con el plásmido pRL-CMV (que contiene río abajo del promotor de CMV el gen de *Renilla reniformis*) para la normalización de los datos. A las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de las luciferasas. La actividad transcripcional del promotor 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 en triplicado. Los datos indican la media SEM, n=3 y los asteriscos la diferencia significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

Para determinar si los sitios CRE deletados son activados específicamente por el factor CREM $\tau$ , se co-transfectaron las líneas celulares GC-1spg y MSC-1 con las construcciones conteniendo el promotor de *Catsper2* silvestre o con las deleciones de los sitios CRE y junto con la construcción pcDNA3-Crem $\tau$  para sobreexpresar el factor CREM $\tau$ , y se analizaron las actividades de luciferasa. Los datos obtenidos demostraron que la sobreexpresión del factor CREM $\tau$  produjo un incremento significativo de la actividad transcripcional sobre el promotor en ambas líneas celulares independientemente de la deleción del sitio CRE1. Asimismo, la sobreexpresión de CREM $\tau$  no produjo un incremento adicional de la actividad transcripcional del promotor con la deleción del sitio CRE2.



**Figura 17. La sobreexpresión de CREM $\tau$  promueve la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino en líneas celulares GC-1spg y MSC-1.** Las construcciones que contienen las deleciones de los sitios CRE1 (pCat2-800ΔCRE1) y CRE2 (pCat2-800ΔCRE2), fueron co-transfectadas en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1 junto con el plásmido pRL-CMV (que contiene río abajo del promotor de CMV el gen de Renilla reniformis) para la normalización de los datos. Además, se co-transfectó con la construcción Crem $\tau$ -pcDNA3 para sobreexpresar el factor de transcripción. A las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de las luciferasas. La actividad transcripcional del promotor 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 en triplicado. Los datos indican la media SEM, n=3 y los asteriscos la diferencia significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que una región de 800 bases del promotor putativo de *Catsper2* tiene actividad transcripcional. Asimismo, se determinó que el factor CREM $\tau$  incrementó la actividad transcripcional del promotor en concordancia con los 4 sitios putativos CRE encontrados *in silico*. De los 4 sitios CRE encontrados, los sitios cercanos al inicio transcripcional fueron deletados observándose que la eliminación del sitio río arriba del TSS no originó cambio en la actividad transcripcional a diferencia de la delección del sitio río abajo del TSS que produjo un incremento importante de dicha actividad independientemente de la sobreexpresión de CREM $\tau$ .

La región promotora del gen *Catsper2* murino fue identificada previamente en nuestro grupo de trabajo mediante análisis *in silico*, obteniendo un promotor putativo de ~800 pb, el cual fue clonado en el vector pGL4.10. Mediante análisis *in silico* para detectar sitios para unión a factores de transcripción, se predijeron cuatro posibles sitios de unión CRE dentro de este promotor, dos ubicados río arriba del TSS (-435 y -76) y dos ubicados río abajo del TSS (+152 y +262). De estos cuatro, dos concuerdan con lo descrito anteriormente por Sassone-Corsi (1995), quién menciona que la mayoría de los sitios funcionales de esta familia se encuentran en una región de 50 a 250 pb del TSS. Cabe mencionar que los sitios predichos se conocen como “half-CRE” debido a que sólo cuentan con la mitad de los nucleótidos de un sitio CRE consenso, el cual es de 8 nucleótidos, además de encontrarse en dirección antisentido al gen *Catsper2* murino. Sin embargo, estos factores son capaces de reconocer secuencias palindrómicas y activar la transcripción en cualquier sentido (Sassone-Corsi, 1995), por lo que no representa un problema la direccionalidad de la secuencia en este caso.

Dentro de los miembros de la familia de elementos responsivos a cAMP (CRE), destaca el factor transcripcional CREM $\tau$ , un gen maestro que participa durante la espermatogénesis en etapas post-meióticas y es encargado de activar 12 genes durante este proceso, principalmente genes relacionados con la espermiogénesis (Delmas *et al.*, 1993; Kistler *et al.*, 1994; Sun, Z *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996; Ha

*et al.*, 1997; Steger *et al.*, 1999; Rajkovic *et al.*, 2010). El presente estudio demuestra que el factor transcripcional CREM $\tau$  es capaz de activar al promotor de *Catsper2* murino (pCat2-800) en las líneas celulares GC-1spg y en MSC-1. En la línea celular GC-1 el aumento es del doble cuando se sobreexpresa este factor (Crem $\tau$ -pcDNA3), con respecto al promotor de *Catsper2* murino, mientras que en la línea celular MSC-1 el incremento es de un 20% aproximadamente. Dichas diferencias pueden deberse a que son líneas celulares de diferente linaje, puesto que la línea celular GC-1spg proviene de células germinales de ratón, específicamente en una etapa entra espermatogonia y espermatozoides primarios, y la línea celular MSC-1 de células de Sertoli de ratón, por lo que ambas líneas expresan diferentes factores de transcripción que pudieran estar influyendo en la activación del promotor de *Catsper2* murino. Aunque los modelos empleados en esta investigación no concuerdan con la etapa en la que *Catsper2* se expresa, nos dan la ventaja de tener un fondo libre del factor transcripcional que sobreexpresamos, debido a que en ninguna de las dos líneas celulares se expresa CREM $\tau$ .

Al observar que la sobreexpresión de CREM $\tau$  era capaz de activar al promotor de *Catsper2* murino, decidimos tratar de detectar aquellos sitios CRE a los cuáles posiblemente se esté uniendo el factor de transcripción. Con base a lo descrito anteriormente por Sassone-Corsi (1995), decidimos eliminar mediante mutagénesis sitio dirigida los sitios CRE cercanos al TSS (-76 y +152). La delección del sitio CRE1 no altera la actividad transcripcional con respecto al promotor basal de *Catsper2* murino (pCat2-800), lo que indica que este sitio no es funcional al menos en estas líneas celulares, sin embargo, la delección del sitio CRE2 origina un aumento importante en los niveles de transcripción del promotor de *Catsper2* murino. Esto podría deberse a la presencia de algún represor transcripcional que se uno a este sitio e inhiba la transcripción, el cual plausiblemente no es CREM $\tau$  porque la sobreexpresión de este factor no incrementa la actividad transcripcional. Dentro de las isoformas de CREM, existe una serie de represores transcripcionales que compiten contra los activadores, silenciando genes (Molina *et al.*, 1993; Sassone-Corsi, 1998). Dentro de los represores, destaca ICER (Inducible cAMP Early Repressor), una isoforma que sólo cuenta con los dominios de unión al DNA y que

se expresa principalmente en fases pre-meióticas (Molina *et al.*, 1993). Se ha descrito la presencia de esta isoforma tanto en células germinales como en somáticas y su participación se ve involucrada en diversos procesos fisiológicos (Bodor *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Borlikova & Endo, 2009). Debido a que las líneas celulares utilizadas en esta investigación corresponden a células pre-meióticas y somáticas, es probable que ICER se encuentre presente en ellas, lo que nos daría una idea de por qué al eliminar el sitio encontrado a +152 pb río arriba del TSS (pCat2-800ΔCRE2) la actividad transcripcional aumente, sin embargo, son necesarios estudios posteriores para confirmar esto.

Futuros estudios deberán estar dirigidos a evaluar si existen otros sitios CRE funcionales dentro del promotor de *Catsper2* murino, además de la elucidación del mecanismo por el cual CREM $\tau$  podría estar activando a este promotor. De igual manera se debe evaluar si el factor se está uniendo al sitio CRE que sugerimos mediante técnicas de interacción DNA-proteína. De igual forma, se deben realizar estudios in vivo para saber si este factor puede activar al promotor de *Catsper2* murino en cultivos de tejidos primarios.

Finalmente, los resultados de esta investigación contribuyen a la caracterización de la regulación transcripcional del gen *Catsper2* murino y demuestran que miembros de la familia de elementos responsivos a cAMP (CRE) podrían estar involucrados en la activación del promotor de *Catsper2* murino uniéndose al sitio predicho a +152 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS).

## CONCLUSIONES

- Se predijeron 4 posibles sitios de unión a miembros de la familia de factores de transcripción de elementos responsivos a cAMP (CRE).
- El factor CREM $\tau$  es capaz de activar transcripcionalmente al promotor de *Catsper2* murino en las líneas celulares GC-1spg y MSC-1.
- El sitio CRE (CRE2) ubicado a +152 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción es importante para la unión activar al promotor de *Catsper2* murino.

## PERSPECTIVAS

- Realizar deleciones para probar si los otros 2 sitios CRE encontrados en el promotor de *Catsper2* murino son funcionales.
- Realizar ensayos de unión proteína-DNA para corroborar que el factor CREM $\tau$  es capaz de unirse al sitio CRE2 del promotor de *Catsper2* murino,
- Evaluar la participación del factor CREM $\tau$  en la activación del promotor de *Catsper2* murino utilizando modelos de cultivo primario de células germinales.
- Identificar y evaluar la participación de isoformas represoras de CREM en la regulación del promotor de *Catsper2* murino.

## REFERENCIAS

- Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Smith, L. L., Kahrizi, K., Najmabadi, H., & Smith, R. J. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet*, *84*(4), 505-510. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.03.004
- Avidan, N., Tamary, H., Dgany, O., Cattan, D., Pariente, A., Thulliez, M., Borot, N., Moati, L., Barthelme, A., Shalmon, L., Krasnov, T., Ben-Asher, E., Olender, T., Khen, M., Yaniv, I., Zaizov, R., Shalev, H., Delaunay, J., Fellous, M., Lancet, D., & Beckmann, J. S. (2003). CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet*, *11*(7), 497-502. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200991
- Behr, R., & Weinbauer, G. F. (1999). Germ cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator expression in rodent and primate testis is maintained despite gonadotropin deficiency. *Endocrinology*, *140*(6), 2746-2754. doi: 10.1210/endo.140.6.6764
- Blendy, J. A., Kaestner, K. H., Weinbauer, G. F., Nieschlag, E., & Schutz, G. (1996). Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature*, *380*(6570), 162-165. doi: 10.1038/380162a0
- Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B., & Sakaguchi, S. (2007). Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol*, *81*(1), 161-167. doi: 10.1189/jlb.0706474
- Bokar, J. A., Roesler, W. J., Vandenbark, G. R., Kaetzel, D. M., Hanson, R. W., & Nilson, J. H. (1988). Characterization of the cAMP responsive elements from the genes for the alpha-subunit of glycoprotein hormones and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Conserved features of nuclear protein binding between tissues and species. *J Biol Chem*, *263*(36), 19740-19747.
- Borlikova, G., & Endo, S. (2009). Inducible cAMP early repressor (ICER) and brain functions. *Mol Neurobiol*, *40*(1), 73-86. doi: 10.1007/s12035-009-8072-1
- Britannica, E. (2010). Spermatogenesis, from <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>
- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L., & Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(25), 14864-14868. doi: 10.1073/pnas.2536658100
- Comb, M., Birnberg, N. C., Seasholtz, A., Herbert, E., & Goodman, H. M. (1986). A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*, *323*(6086), 353-356. doi: 10.1038/323353a0
- Chung, J. J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun*, *2*, 153. doi: 10.1038/ncomms1153
- Daniel, P. B., Rohrbach, L., & Habener, J. F. (2000). Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element modulator theta isoforms expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis. *Endocrinology*, *141*(11), 3923-3930. doi: 10.1210/endo.141.11.7758

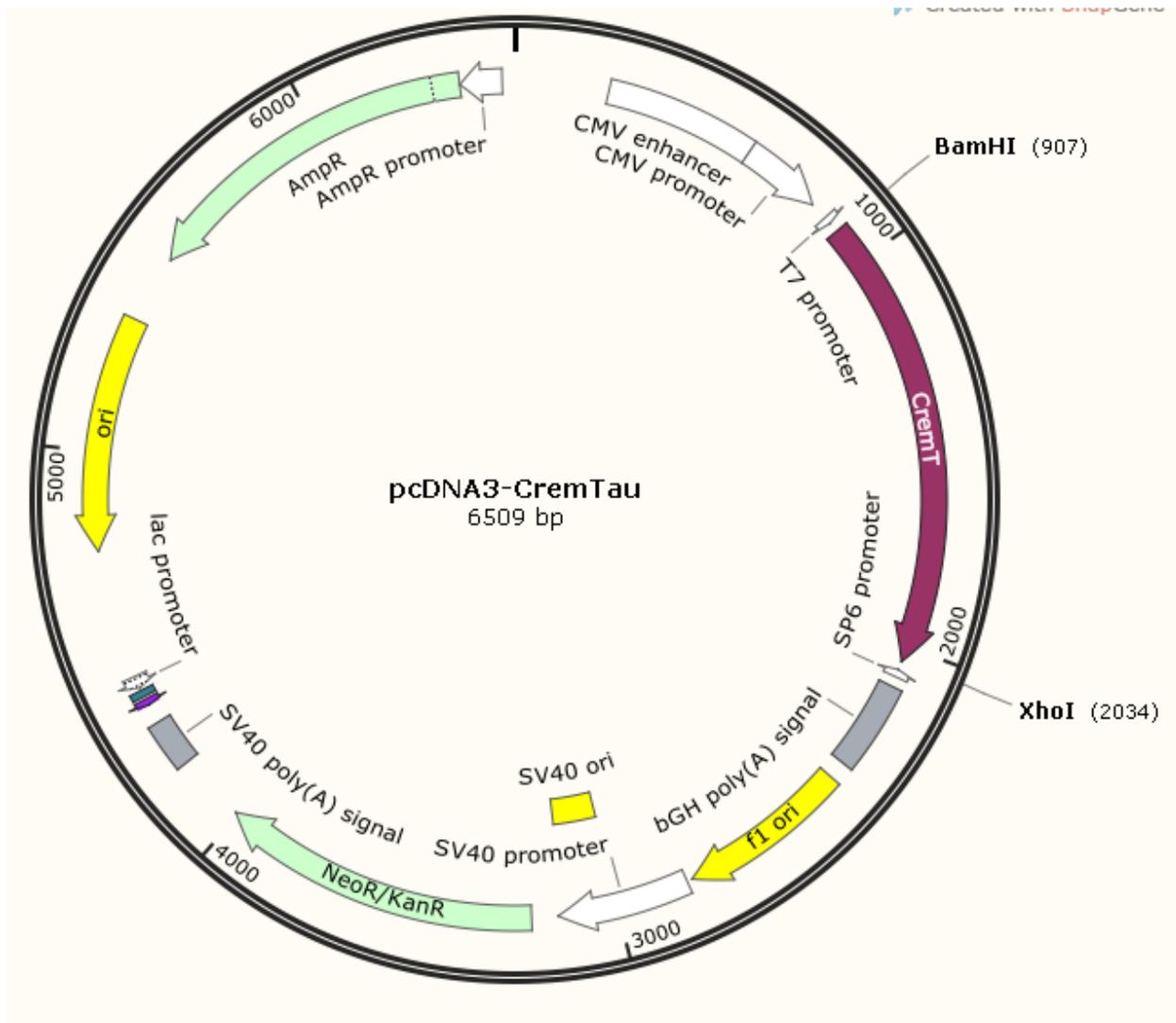
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Trevino, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, 91(4), 1305-1355. doi: 10.1152/physrev.00028.2010
- Delmas, V., van der Hoorn, F., Mellstrom, B., Jegou, B., & Sassone-Corsi, P. (1993). Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol Endocrinol*, 7(11), 1502-1514. doi: 10.1210/mend.7.11.8114765
- Don, J., & Stelzer, G. (2002). The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 187(1-2), 115-124.
- Dwarki, V., Montminy, M., & M Verma, I. (1990). *Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation* (Vol. 9).
- Fimia, G. M., De Cesare, D., & Sassone-Corsi, P. (1999). CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature*, 398(6723), 165-169. doi: 10.1038/18237
- Foulkes, N. S., Borrelli, E., & Sassone-Corsi, P. (1991). CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell*, 64(4), 739-749.
- Foulkes, N. S., Mellstrom, B., Benusiglio, E., & Sassone-Corsi, P. (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature*, 355(6355), 80-84. doi: 10.1038/355080a0
- Foulkes, N. S., Schlotter, F., Pevet, P., & Sassone-Corsi, P. (1993). Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature*, 362(6417), 264-267. doi: 10.1038/362264a0
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9(4), 411-416. doi: 10.1006/scdb.1998.0203
- Guraya, S. (1987). *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ha, H., van Wijnen, A. J., & Hecht, N. B. (1997). Tissue-specific protein-DNA interactions of the mouse protamine 2 gene promoter. *J Cell Biochem*, 64(1), 94-105.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*, 14(6), 816-821. doi: 10.1038/aja.2012.81
- Jakobsen, B. K., & Pelham, H. R. (1988). Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol Cell Biol*, 8(11), 5040-5042.
- Jin, J. L., O'Doherty, A. M., Wang, S., Zheng, H., Sanders, K. M., & Yan, W. (2005). Catsper3 and catsper4 encode two cation channel-like proteins exclusively expressed in the testis. *Biol Reprod*, 73(6), 1235-1242. doi: 10.1095/biolreprod.105.045468
- Kerppola, T. K., & Curran, T. (1991). Transcription factor interactions: basics on zippers: Current Opinion in Structural Biology 1991, 1:71-79. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(1), 71-79. doi: [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(91\)90014-K](https://doi.org/10.1016/0959-440X(91)90014-K)
- Kistler, M. K., Sassone-Corsi, P., & Kistler, W. S. (1994). Identification of a functional cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the 5'-flanking

- region of the gene for transition protein 1 (TP1), a basic chromosomal protein of mammalian spermatids. *Biol Reprod*, 51(6), 1322-1329.
- Li, H. G., Ding, X. F., Liao, A. H., Kong, X. B., & Xiong, C. L. (2007). Expression of CatSper family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: relationship to sperm motility. *Mol Hum Reprod*, 13(5), 299-306. doi: 10.1093/molehr/gam009
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391. doi: 10.1038/nature09767
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J. J., & Clapham, D. E. (2012). The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol*, 74, 453-475. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153258
- Liu, J., Xia, J., Cho, K. H., Clapham, D. E., & Ren, D. (2007). CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem*, 282(26), 18945-18952. doi: 10.1074/jbc.M701083200
- Lobley, A., Pierron, V., Reynolds, L., Allen, L., & Michalovich, D. (2003). Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 53. doi: 10.1186/1477-7827-1-53
- Mata-Rocha, M., Alvarado-Cuevas, E., Hernandez-Sanchez, J., Cerecedo, D., Felix, R., Hernandez-Reyes, A., Tesoro-Cruz, E., & Oviedo, N. (2013). Molecular cloning and analysis of the Catsper1 gene promoter. *Mol Hum Reprod*, 19(5), 336-347. doi: 10.1093/molehr/gat003
- Mata-Rocha, M., Hernandez-Sanchez, J., Guarneros, G., de la Chesnaye, E., Sanchez-Tusie, A. A., Trevino, C. L., Felix, R., & Oviedo, N. (2014). The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS Lett*, 588(18), 3352-3360. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.024
- Molina, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E., & Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*, 75(5), 875-886.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(18), 6682-6686.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A., & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(4), 1219-1223. doi: 10.1073/pnas.0610286104
- Quill, T. A., Ren, D., Clapham, D. E., & Garbers, D. L. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12527-12531. doi: 10.1073/pnas.221454998
- Rajkovic, M., Iwen, K. A., Hofmann, P. J., Harneit, A., & Weitzel, J. M. (2010). Functional cooperation between CREM and GCNF directs gene expression in haploid male germ cells. *Nucleic Acids Res*, 38(7), 2268-2278. doi: 10.1093/nar/gkp1220

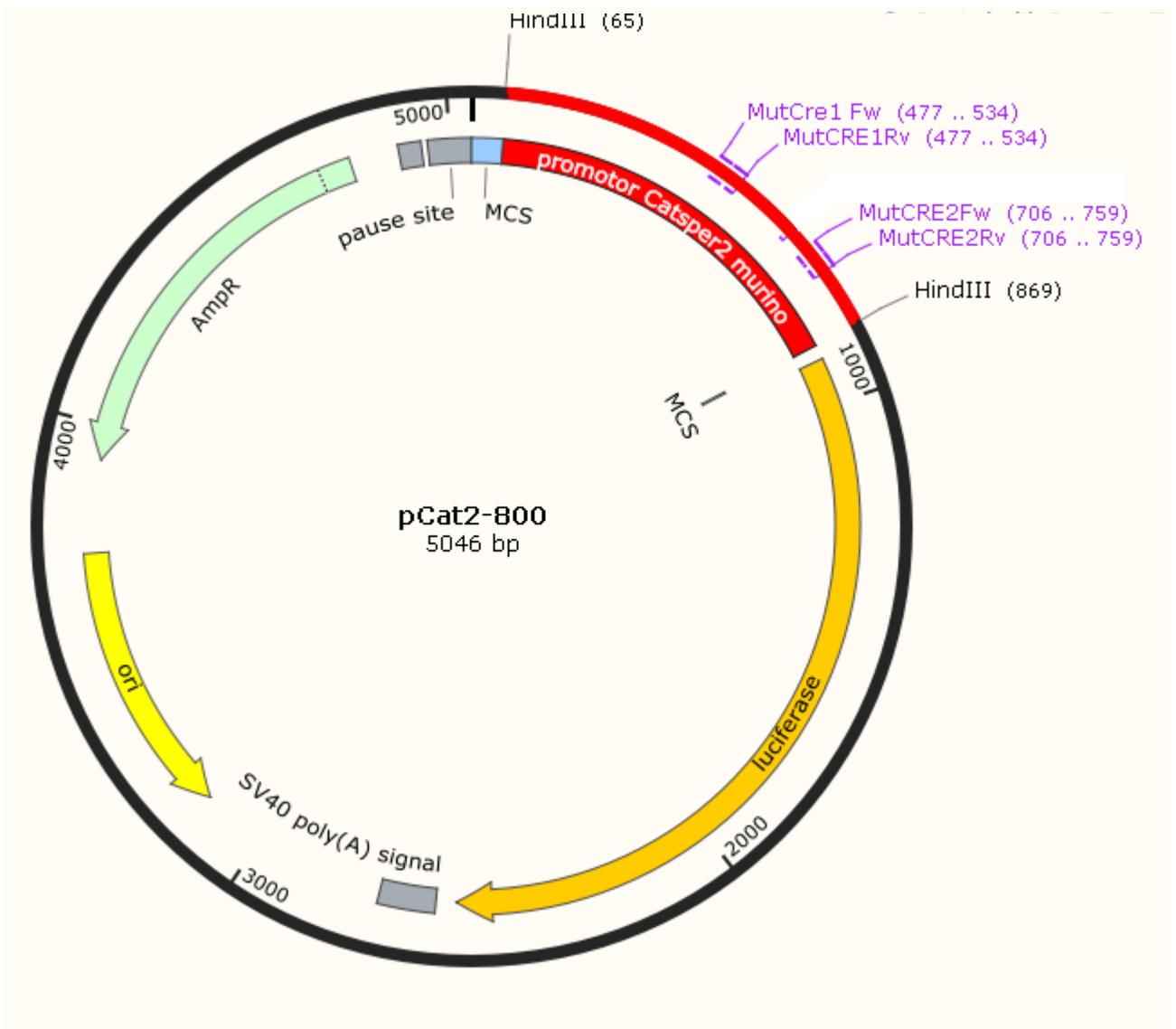
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, *413*(6856), 603-609. doi: 10.1038/35098027
- Ren, D., & Xia, J. (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)*, *25*(3), 165-175. doi: 10.1152/physiol.00049.2009
- Ruppert, S., Cole, T. J., Boshart, M., Schmid, E., & Schutz, G. (1992). Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes. *EMBO J*, *11*(4), 1503-1512.
- Sanborn, B. M. (2000). Increasing the options--new 3',5' cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-responsive promoters and new exons in the cAMP response element modulator gene. *Endocrinology*, *141*(11), 3921-3922. doi: 10.1210/endo.141.11.7829
- Sassone-Corsi, P. (1995). Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *11*, 355-377. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.002035
- Sassone-Corsi, P. (1998). Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol*, *30*(1), 27-38.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*, *296*(5576), 2176-2178. doi: 10.1126/science.1070963
- Schultz, N., Hamra, F. K., & 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. doi: 10.1073/pnas.1635054100
- Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Behr, R., Schaller, V., Drabent, B., Doenecke, D., Nieschlag, E., Bergmann, M., & Weinbauer, G. F. (1999). Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. *J Androl*, *20*(6), 747-754.
- Sun, X. H., Zhu, Y. Y., Wang, L., Liu, H. L., Ling, Y., Li, Z. L., & Sun, L. B. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*, *15*(1), 65. doi: 10.1186/s12958-017-0281-2
- Sun, Z., Sassone-Corsi, P., & Means, A. R. (1995). Calspermin gene transcription is regulated by two cyclic AMP response elements contained in an alternative promoter in the calmodulin kinase IV gene. *Mol Cell Biol*, *15*(1), 561-571.
- Wang, H., Liu, J., Cho, K. H., & Ren, D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod*, *81*(3), 539-544. doi: 10.1095/biolreprod.109.077107
- Weinbauer, G. F., Behr, R., Bergmann, M., & Nieschlag, E. (1998). Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol Hum Reprod*, *4*(1), 9-15.
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Eds.), *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* (pp. 11-59). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Xia, J., & Ren, D. (2009). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod*, 80(6), 1092-1098. doi: 10.1095/biolreprod.108.074039
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H., 3rd, & Montminy, M. R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 334(6182), 494-498. doi: 10.1038/334494a0
- Yan, C., Miller, C. L., & Abe, J. (2007). Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res*, 100(4), 489-501. doi: 10.1161/01.RES.0000258451.44949.d7
- Zhang, D., & Gopalakrishnan, M. (2005). Sperm ion channels: molecular targets for the next generation of contraceptive medicines? *J Androl*, 26(6), 643-653. doi: 10.2164/jandrol.05009
- Zhou, Y., Sun, Z., Means, A. R., Sassone-Corsi, P., & Bernstein, K. E. (1996). cAMP-response element modulator tau is a positive regulator of testis angiotensin converting enzyme transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22), 12262-12266.

# ANEXOS



Construcción para sobreexpresar el gen *Crem $\tau$*  con el vector pcDNA3.



**Construcción conteniendo el promotor de 800pb de Catsper2 murino en sentido en el vector pGL4.10. En morado se señalan las posiciones de las deleciones realizadas mediante mutagénesis sitio dirigida.**