



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis estructural de la región promotora  
del gen *Catsper3* murino”**

**T E S I S**

Que presenta

**QFB. Diego Eduardo Sánchez Jasso**

Para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la Especialidad de  
**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de Tesis  
**Dr. Javier Hernández Sánchez**

Ciudad de México

Agosto 2021

## **ASESORES**

**Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda**

Investigador titular

Unidad de investigación Médica en Inmunología e Infectología, CMN "La Raza"

Instituto Mexicano del Seguro Social

**Dra. Rosa María Bermúdez Cruz**

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

**Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe**

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

*A mis padres, Luz Herendira y Fernando Arturo.*

*We must know. We will know.*

*David Hilbert*

## **AGRADECIMIENTO AL CONACyT**

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo de 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 en el Laboratorio del Dr. Javier Hernández Sánchez.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis, Dr. Javier Hernández Sánchez. Gracias por otorgarme su confianza y aceptarme en su equipo de trabajo, por sus valiosas correcciones, el tiempo dedicado, pero sobre todo su gran disposición y apoyo para avanzar en este proyecto a pesar de las circunstancias actuales.

A mis asesores, Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda, Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe. Gracias por dedicarse a la asesoría de este proyecto, la revisión y corrección de este documento, sin la cual esta tesis no sería como lo es finalmente.

A la Dra. María Luisa Benítez Hess. Gracias por todos los consejos, reuniones de imprevisto, por su gran disposición y tiempo dedicado, sin esto el presente documento sería considerablemente más pequeño.

A mis compañeros de laboratorio, Andrea, Carlos y Sergio. Gracias por apoyarme y guiarme, siempre de buen humor compartiendo su conocimiento conmigo tanto en el laboratorio como en los seminarios, ciertamente este trabajo no podría haber sido sin su ayuda.

A todos los profesores que nos impartieron clases. Gracias por compartir su conocimiento de una manera excelente.

A mis amigos de generación del CINVESTAV y a los de toda la vida. Por el apoyo ante la necesidad al realizar nuestros proyectos y por compartir los momentos de estrés y diversión, siempre presentes y necesarios.

A Gabriela Mora. Gracias por apoyarme al realizar todos los trámites, siempre amable y atenta, con una dedicación extraordinaria.

A la Dr. Dulce de la unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM) por su apoyo con el servicio de secuenciación.

Al Laboratorio de Secuenciación del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI por los servicios de secuenciación prestados.

A mis padres, Luz Herendira Jasso Arias y Fernando Arturo Sánchez Tapia. Gracias por todo el apoyo incondicional que me han dado, por ayudarme a hacer lo que me gusta e inculcarme a la par el sentido de responsabilidad. Es duro, pero siempre satisfactorio hacer las cosas de forma correcta. A mis hermanos, Yahir Alfredo Martínez Jasso y Fernando José Sánchez Jasso. Ustedes me enseñaron con ejemplo que se debe seguir adelante sin importar las circunstancias. Como lo dejé escrito hace un par de años, ustedes son la razón fundamental por la cual sigo adelante.

A Andrea, mi novia, prometida y mejor amiga. Por ser una excelente compañera de vida, por ser comprensiva, mantener todo en orden cuando yo salía al laboratorio y recibirme con un beso y una sonrisa. Por los momentos que pasamos juntos, las discusiones que tenemos sobre temas interminables y que sin duda disfruto mucho. En fin, gracias por ser parte lo que hasta ahora es mi vida.

# CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABLAS.....	II
Lista de abreviaturas .....	III
RESUMEN .....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Espermatogénesis y espermiogénesis.....	1
1.2 Fecundación.....	3
1.3 Regulación transcripcional .....	3
1.3.1 Promotores .....	4
1.3.2 Características clave de un promotor .....	5
1.3.3 Elementos regulatorios .....	6
1.4 CatSper: importancia y estructura.....	8
1.5 Genes <i>Catsper</i> .....	10
1.5.1 Información general .....	10
Expresión.....	11
1.6 Importancia de <i>Catsper3</i> .....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Regulación transcripcional de <i>Catsper1</i> .....	13
2.2 Regulación transcripcional de <i>Catsper2</i> .....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	22
6. METODOLOGÍA .....	22
6.1 Análisis bioinformático .....	22
6.1.1 Predicción de Islas CpG .....	22
6.1.2 Establecimiento de sitios de inicio de la transcripción .....	22
6.1.2 Predicción de elementos de promotor mínimo.....	23
6.1.3 Predicción de sitios de unión a TFs .....	24
6.1.4 Obtención y Análisis de datos de CHIP-seq.....	24
6.2 Purificación de DNA .....	25
6.2.1 Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System .....	25
6.2.2 Extracción de DNA por Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) ..	26
6.3 Preparación de bacterias competentes .....	26
6.4 Transformación bacteriana.....	27
6.5 Extracción de DNA plasmídico.....	27
6.5.1 kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System .....	27
6.5.2 QIAGEN Plasmid Midi Kit .....	28
6.6 Clonación del promotor de <i>Catsper3</i> murino.....	28
6.6.1 Amplificación del promotor putativo de <i>Catsper3</i> murino.....	28

6.6.2 Clonación de la región -540..439 en pJET1.2/Blunt.....	30
6.6.3 Subclonación de la región -540..439 en pGL4.10[luc2] .....	31
6.7 Deleciones del promotor de <i>Catsper3</i> murino .....	31
6.7.1 pCat3-540..5 .....	31
6.7.2 pCat3-198..439 .....	32
6.7.3 pCat3-198..5 .....	32
6.8 Secuenciación de DNA .....	33
6.9 Cultivos celulares .....	33
6.9.1 líneas celulares .....	33
6.9.2 Pase celular .....	34
6.9.3 Criopreservación.....	34
6.9.4 Transfección transitoria.....	34
6.10 Lisis celular y ensayo de luciferasa .....	36
6.11 Análisis estadístico.....	36
7. RESULTADOS .....	37
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>Catsper3</i> murino. ....	37
7.2 Clonación del promotor de <i>Catsper3</i> .....	40
7.3 Deleciones de la región promotora de <i>Catsper3</i> murino .....	44
7.4 Actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper3</i> .....	47
7.5 Actividad de las deleciones en el promotor de <i>Catsper3</i> .....	47
8. DISCUSIÓN .....	49
9. CONCLUSIONES.....	56
10. PERSPECTIVAS.....	56
11. BIBLIOGRAFÍA .....	57
12. ANEXOS .....	i

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la diferenciación de células germinales durante la espermatogénesis.....	1
Figura 2. Geometría de un espermatozoide. ....	2
Figura 4. Resumen de características clave de un promotor. ....	6
Figura 5. Elementos presentes en promotores mínimos canónicos y no canónicos. ....	7
Figura 6. Modelo para la activación/regulación de la hiperactivación activada por CatSper.....	8
Figura 9. Representación esquemática de construcciones con deleciones en el promotor de <i>CATSPER1</i> humano río arriba del gen de luciferasa de <i>Renilla reniformis</i> . ....	14
Figura 10. Identificación de sitios SRY en el promotor del gen de <i>CATSPER1</i> . ....	15
Figura 11. Esquema de las construcciones de deleciones consecutivas del extremo 5' <i>Catsper1</i> y posición de sitios Sox. ....	16
Figura 12. Sox5 promueve la actividad del promotor <i>Catsper1</i> .....	16
Figura 13. Análisis in silico de las señales de transcripción en el promotor de <i>Catsper2</i> murino. ....	18
Figura 14. Determinación del promotor basal de <i>Catsper2</i> murino. ....	19
Figura 15. Representación de la estrategia experimental planteada. ....	22
Figura 16. Representación gráfica de la región -2180/+678 de <i>Catsper3</i> según análisis in silico.....	37
Figura 17. Predicción de elementos característicos de promotor basal.....	38
Figura 18. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción para <i>Catsper3</i> murino. ....	39
Figura 20.- Amplificación de la región -2181 a +678 (Cat3-2181..678).....	41
Figura 21.- Amplificación de la región -540 a +439 (Cat3-540..439).....	41
Figura 22.- Obtención de la construcción pJETCat3-540..439. ....	42
Figura 23.- Obtención de la construcción pCat3-540..439. ....	43
Figura 25.- Selección de colonias candidatas con deleciones del promotor. ....	45
Figura 26.- Confirmación de las colonias candidatas por restricción enzimática. ...	46
Figura 27.- Determinación del promotor de <i>Catsper3</i> murino. ....	47
Figura 28.- Actividad de las deleciones del promotor de <i>Catsper3</i> murino.....	48

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Información esencial de las de los genes de las subunidades de CatSper en humano y ratón. ....	10
Tabla 2. Criterios usados en la predicción de sitios de unión a factores de transcripción.....	23
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados. ....	29
Tabla 4. Programas del termociclador empleados para reacciones de PCR .....	30
Tabla 5. Mezclas de transfección usadas para línea celular GC-1 spg.....	35
Tabla 6. Coordenadas, secuencia y puntaje de sitios de unión a factores de transcripción predichos para <i>Catsper3</i> murino. ....	38

## Lista de abreviaturas

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Calcio intracelular	<b>min</b>	Minuto
<b>μm</b>	Micrómetros	<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>aa</b>	Aminoácido	<b>ml</b>	Mililitro
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza	<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>AP1</b>	Proteína activadora 1	<b>MTE</b>	Elemento motivo diez
<b>ATAC-Seq</b>	Ensayo de cromatina accesible a transposasa acoplado a secuenciación	<b>NDR</b>	Regiones empobrecidas en nucleosomas
<b>BRE</b>	Elemento de reconocimiento de TFIIB	<b>ng</b>	Nanogramos
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>CAGE</b>	Análisis de expresión génica por Cap	<b>nt</b>	Nucleótido
<b>cAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclico	<b>°C:</b>	Grados centígrados
<b>CatSper</b>	Cation channel of sperm/canal catiónico de los espermatozoides	<b>pA</b>	Sitios poli Adenilación
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina	<b>pacSC</b>	Espermatocitos en paquiteno
<b>ChIP-seq</b>	Inmunoprecipitación de cromatina acoplado a secuenciación	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>CICR</b>	Liberación de Ca <sup>2+</sup> inducida por Ca <sup>2+</sup>	<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>COF</b>	Cofactores	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>CRE</b>	Elemento de respuesta a cAMP	<b>pHi</b>	pH intracelular
<b>CREB</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP	<b>PIC</b>	Complejo de preiniciación
<b>CREM</b>	Modulador del elemento de respuesta a cAMP	<b>piRNA</b>	RNA que interactúa con piwi
<b>CTCF</b>	Factor de unión a CCCTC	<b>PLuc</b>	Luciferasa Photinus Pyralis
<b>CTSS</b>	Sitio de inicio de la transcripción por CAGE	<b>pMol</b>	Picomol

<b>DCE</b>	Elemento central río abajo	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>RNAPol II</b>	RNA polimerasa II
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato	<b>rST</b>	Espermátidas redondas
<b>DPE</b>	Elemento promotor río abajo	<b>RT-PCR</b>	PCR en tiempo real
<b>dpp</b>	días post-parto	<b>seg</b>	Segundos
<b>E2F</b>	Factor de transcripción E2F	<b>SEM</b>	Media del error estándar
<b>Em</b>	Potencial de membrana	<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>EMSA</b>	Ensayo de movilidad electroforética	<b>SP1</b>	Proteína de especificidad 1
<b>ENCODE</b>	Encyclopedia of DNA Elements	<b>SS 5'</b>	Sitios de splicing 5'
<b>ER</b>	Reticulo endoplásmico	<b>sZ</b>	Espermatozoide
<b>gDNA</b>	DNA genómico	<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>GEO</b>	Gene expression Omnibus	<b>TIP</b>	Plataforma de inicio transcripcional
<b>GTF</b>	Factores transcripcionales generales	<b>tiRNA</b>	RNA asociado al inicio de la transcripción
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua	<b>TSS</b>	Sitio de inicio de la transcripción
<b>IDR</b>	Tasa de descubrimiento irreproducible	<b>U</b>	Unidades
<b>Inr</b>	Iniciador	<b>uaRNA</b>	RNAs antisentido ascendentes
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inoitol-1,4,5-trifosfato	<b>Vf</b>	Volumen final
<b>Kb</b>	Kilobases	<b>ZF5F</b>	Factor de transcripción con dominio POZ
<b>LB</b>	Luria-Bertani	<b>ZP</b>	Zona pelúcida
<b>lncRNA</b>	RNA largo no codificante	<b>µg</b>	Microgramos
<b>M</b>	Molar	<b>µl</b>	Microlitros
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple		
<b>mg</b>	Miligramos		

## RESUMEN

El gen *Catsper3* codifica para una de las cuatro subunidades  $\alpha$  que componen al canal de calcio CatSper (Canal catiónico de los espermatozoides), ubicado en la pieza principal del flagelo de los espermatozoides. *Catsper3* es esencial para la correcta función de CatSper, la hiperactivación de los espermatozoides, la penetración de la zona pelúcida del ovocito y en consecuencia para su fecundación. A pesar de que se ha caracterizado su funcionabilidad y relevancia para la fertilidad masculina, nada se conoce sobre su regulación a nivel transcripcional. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es comenzar la caracterización de su región promotora, un elemento de gran relevancia para la regulación de la expresión génica.

En el presente trabajo se identificó el promotor de *Catsper3* murino mediante transfección en la línea celular GC-1 spg y ensayos de actividad luciferasa. Dicho promotor se encontró en la región de -540 a +439 respecto a su sitio de inicio transcripcional (TSS) ya que presentó un aumento significativo en la actividad de luciferasa respecto al vector pGL4.10[Luc2] vacío. Además, mediante deleciones se observó que la región de -540 a -199 es una zona de represión ya que su eliminación genera un aumento en la actividad transcripcional respecto al promotor completo. Asimismo, se determinó que el extremo 3' del promotor (+6 a +439) es indispensable para su actividad ya que su eliminación generó el abatimiento de la actividad del promotor. Por esta razón, se propone que el promotor mínimo de *Catsper3* probablemente se ubique dentro de la región -198 a +439. Además, mediante el análisis *in silico* del promotor se identificaron múltiples sitios de unión para los factores de transcripción SOX, CREB y CREM, los cuales posiblemente regulen su actividad como lo sugiere las deleciones generadas.

## ABSTRACT

The *Catsper3* gene encodes one of the four  $\alpha$  subunits which make up CatSper calcium channel (cation channel of sperm) located at the main part of the sperm flagellum. *Catsper3* is essential for CatSper function, hyperactivation of the sperm, penetration of the zona pellucida of the oocyte and thus for its fertilization. Although its functionality and relevance for male fertility have been characterized, nothing is known about its regulation at the transcriptional level. Therefore, the objective of this project is to begin the characterization of its promoter region, a significant regulatory element of gene expression.

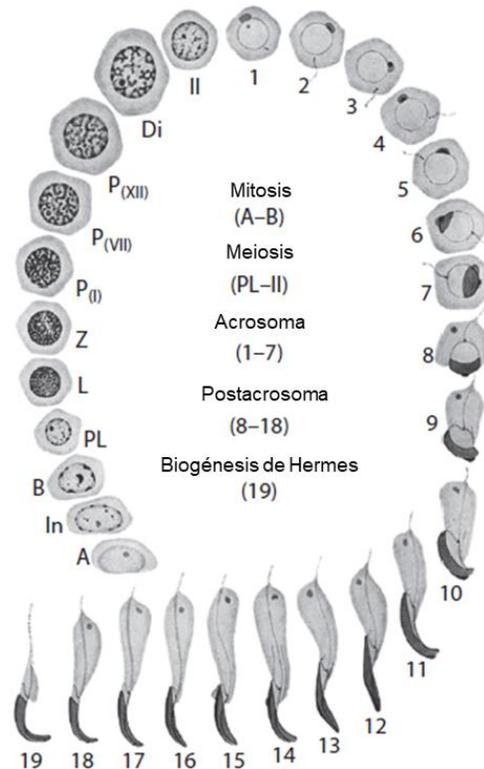
In the present work, the murine *Catsper3* promoter was identified by transfection in GC-1 spg cell line and luciferase activity assays. This promoter was found in the region from -540 to +439 with respect to its transcriptional initiation site (TSS) since it presents a significant increase in luciferase activity against the empty pGL4.10 [Luc2] vector. In addition, through deletion analysis it was observed that -540 to -199 region is a repression zone as its elimination increased transcriptional activity beyond complete promoter. Likewise, it was determined that 3' end of the promoter (+6 to +439) is essential for its activity since its elimination triggered complete reduction of the promoter activity. Therefore, it is proposed that the minimal *Catsper3* promoter is likely to be situated within the -198 to +439 region. Furthermore, through *in silico* promoter analysis several putative binding sites were identified for SOX, CREB and CREM transcription factors, which possibly regulate their activity as suggested by the deletions generated.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Espermatogénesis y espermiogénesis

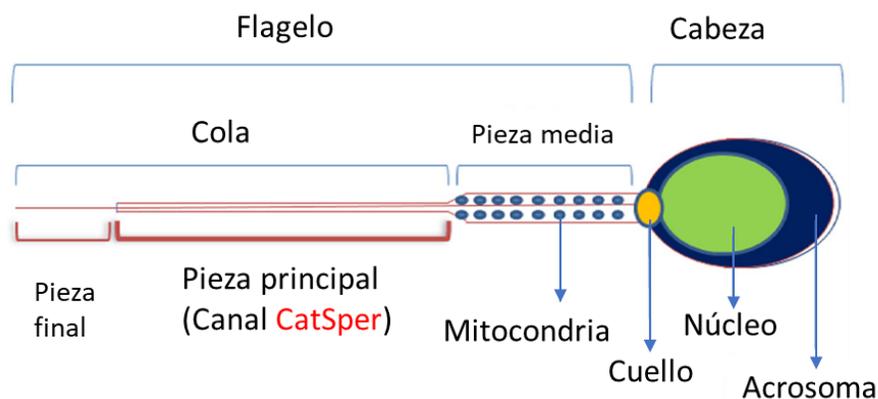
La espermatogénesis se define como un evento temporal por el cual las células germinales en el epitelio seminífero de los testículos se someten a un proceso de diferenciación hasta espermatozoides maduros, así, la fertilidad masculina depende de la continuidad de este proceso (Cheng, 2019). La espermatogénesis se divide en tres fases generales: 1) Una fase proliferativa donde el número de células madre espermáticas (espermatogonia) aumenta por mitosis. 2) Una fase meiótica, que involucra las dos divisiones que crean el estado haploide y 3) Una fase postmeiótica llamada espermiogénesis, durante la cual las células redondas (espermátidas) expulsan la mayor parte de su citoplasma y se convierten en espermatozoides aerodinámicos (Figura 1) (Gilbert & Barresi, 2018).

**Figura 1. Representación de la diferenciación de células germinales durante la espermatogénesis.** Se ilustran las espermatogonias mitóticas tipos A, intermedias (In) y B; espermaticitos sometidos a meiosis: preleptoteno (PL), leptoteno (L), cigoteno (Z), paquiteno (P), diploteno (Di) y espermaticitos secundarios (II). Las espermátidas evolucionan a través de 19 pasos de espermiogénesis que pueden subdividirse en formación de acrosomas (pasos 1-7), eventos postacrosómicos (pasos 8-18) y formación del cuerpo de Hermes (gota citoplasmática, paso 19) (Modificado de Cheng, 2019).



Durante la espermiogénesis, muchos genes y proteínas se expresan, algunos por primera vez, con implicaciones en los diversos eventos dinámicos que ocurren en este momento del desarrollo de células germinales. Estos eventos incluyen la

formación del acrosoma y el flagelo, condensación nuclear y modificación de orgánulos específicos, como el aparato Golgi y el retículo endoplasmático (ER), lo que lleva a la formación de espermatozoides destinados a ser liberados del epitelio seminífero. Al final de la espermiogénesis hay un cierre completo de la transcripción en el núcleo y facilita que el núcleo asuma una estructura casi cristalina (Cheng, 2019; Gilbert & Barresi, 2018.). Al momento de llegar al lumen, el espermatozoide ya es morfológicamente maduro, consta de una cabeza, que tiene el acrosoma y el núcleo, y un flagelo conectado por un cuello. En el flagelo se distingue una estructura proximal a la cabeza llamada pieza media que contiene mitocondrias y otra distal, la cola: dividida en la pieza principal, en donde se encuentra el canal CatSper (Cation channel of Sperm), y la pieza final (Figura 2). La integridad del flagelo es indispensable para la fertilidad masculina pues su correcto funcionamiento le permite, en primera instancia, desplazarse por el tracto reproductor femenino y acercarse lo suficiente al ovulo gracias al aprovechamiento de la energía generada por las mitocondrias en la pieza media. Sin embargo, la activación y aprovechamiento energético oportuno es de igual importancia. Para esto, el espermatozoide debe ser capaz de reconocer y responder a las condiciones ambientales, capacidad conferida principalmente por receptores y canales iónicos como los de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), entre los cuales se encuentra CatSper (Brown *et al.*, 2019; Zhang-Gopalakrishnan, 2005).



**Figura 2. Geometría de un espermatozoide.** Un espermatozoide maduro consiste en cabeza, cuello, pieza media y cola. La cabeza incluye acrosoma y núcleo mientras que la cola tiene la pieza principal y la pieza final (Modificado de Singh & Rajender, 2015).

## 1.2 Fecundación

Durante el periodo de incubación en el tracto femenino, los espermatozoides experimentan una serie de transformaciones bioquímicas, conocidas colectivamente como capacitación, que incluyen cambios en la composición y fluidez de la membrana plasmática, el metabolismo celular y concentración de iones intracelulares como  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). La maquinaria de movilidad se activa por factores extra e intracelulares y los espermatozoides se vuelven progresivamente más móviles (Zhang & Gopalakrishnan, 2005). Los cambios se acompañan de un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , causando niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  y adenosina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular, aumento de la fluidez de la membrana y la adquisición de un nuevo patrón de movilidad conocido como hiperactivación, caracterizado por movimientos de alta amplitud asimétrica y un golpe flagelar de baja frecuencia (Holt & Morrell, 2013; Lehti & Sironen, 2017). Estos cambios estructurales y metabólicos permiten que los espermatozoides eventualmente alcancen la zona pelúcida (ZP) que rodea al ovocito. Al entrar en contacto con las glicoproteínas en la superficie del óvulo, los espermatozoides se someten a la reacción acrosomal, lo que resulta en la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa y la liberación de enzimas hidrolíticas almacenadas. Después de la infiltración en la ZP, la membrana del espermatozoide se fusiona con la del óvulo, desencadenando oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , un requisito previo para la activación en el proceso de fertilización (Zhang & Gopalakrishnan, 2005). Sin capacitación, no ocurre la hiperactivación y por lo tanto los espermatozoides no pueden unirse a la ZP así como tampoco penetrarla para fertilizar el óvulo.

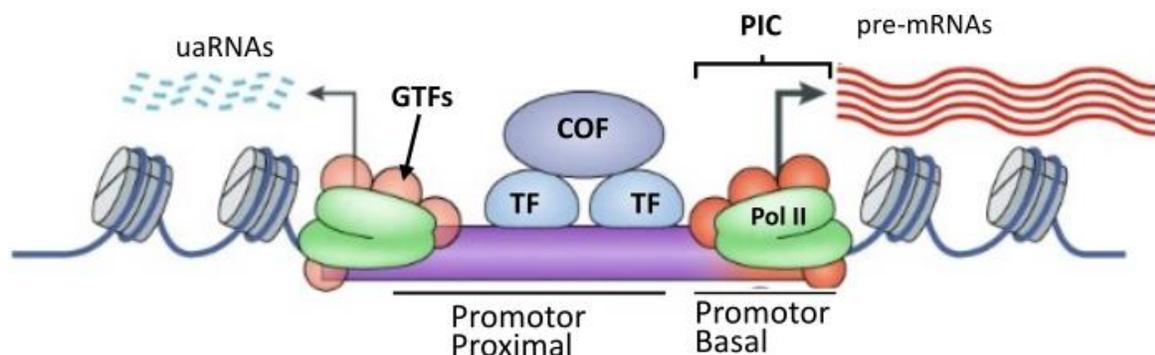
## 1.3 Regulación transcripcional

Múltiples eventos suceden antes de iniciar la transcripción de un gen que codifica una proteína eucariótica, incluyendo la descondensación del locus, remodelación de nucleosomas, modificaciones de histonas, unión de activadores y coactivadores transcripcionales a promotores y potenciadores (*enhancers*), así como el

reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal al promotor central, también llamado promotor mínimo o basal (Smale & Kadonaga, 2003).

### 1.3.1 Promotores

La regulación de la expresión génica a nivel transcripcional depende en gran medida de los promotores, regiones genómicas alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) compuestas de un promotor central y un promotor proximal río arriba que de forma coordinada y autónoma regulan la transcripción génica. El promotor proximal es una secuencia de activación de la transcripción inmediatamente río arriba del promotor central, típicamente hasta 250 pares de bases (pb) río arriba del TSS, que contiene sitios de unión para factores de transcripción (TF) específicos y que funciona como un potenciador transcripcional (Majewska *et al.*, 2018; Harbele & Stark, 2018). El promotor central, también llamado basal o mínimo, se define como la secuencia mínima de DNA que dirige con precisión el TSS y frecuentemente comprende un segmento de DNA de 50-100 pb alrededor del TSS (Danino, *et al.*, 2015; Roy & Singer, 2015). El promotor mínimo actúa como una plataforma donde se ensambla la maquinaria transcripcional esencial: la RNAPol II, que transcribe RNAs codificantes y no codificantes, varios factores transcripcionales generales (GTF) y cofactores necesarios para la formación del complejo de pre-inicio y consiguientemente el inicio de la síntesis de RNA (Figura 3) (Roy & Singer, 2015; Harbele & Stark, 2018).

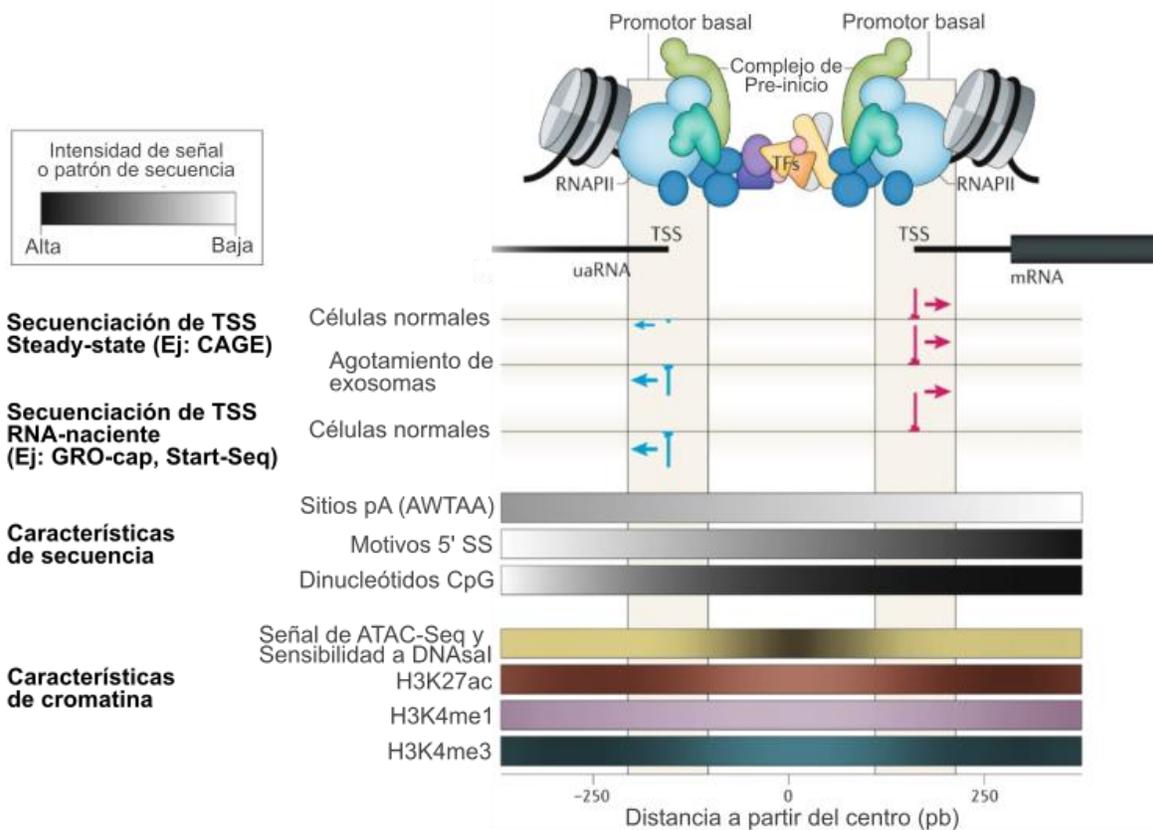


**Figura 3. Visión general del inicio transcripcional en promotores.** La transcripción se inicia en los promotores basales, reclutando la maquinaria de transcripción, que consta de la RNAPolII (PolII) y factores de transcripción general (GTF), lo que conduce a la formación del complejo de preiniciación (PIC) y al inicio de la transcripción. También pueden unirse factores de transcripción específicos de secuencia (TF) al promotor proximal, reclutando

cofactores (COF) que transmiten las señales de activación al PIC en el promotor central. Los promotores producen mRNAs largos y estables a partir de un promotor basal en sentido (orientación del gen) y RNAs antisentido ascendentes (uaRNA) río arriba del promotor proximal que mantiene TFs unidos. Así los PIC separados impulsan la transcripción unidireccional de cada uno de los dos TSS (Modificado de Harbele & Stark, 2018).

### **1.3.2 Características clave de un promotor**

Los promotores activos están directamente asociados con firmas de cromatina específicas. Estas incluyen: El enriquecimiento de modificaciones específicas de histonas, como mono-, di- y trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3, respectivamente), así como la acetilación de la lisina 4 y 27 de la histona 3 (H3K4ac y H3K27ac, respectivamente) (Danino *et al.*, 2015; Andersson & Sandelin, 2020). Además, contienen regiones empobrecidas en nucleosomas (NDR) sobre los promotores (también llamadas regiones de ocupación reducida de nucleosomas), sitios hipersensibles a DNase y señales altas de ATAC-Seq (Figura 4). Otras características asociadas a un alto potencial promotor incluyen: la presencia de muchos sitios de unión de TF por región, gran cobertura de unión de TF del NDR así como una alta superposición entre sitios de unión. Asimismo, la presencia de algunos sitios de unión a TFs con un claro efecto impulsor de promotores, incluidos los TF de clase CREB, SP1, ETS y RFX. También pueden contener una alta densidad de CpG cuyo efecto se debe principalmente a su inherente riqueza de sitios de unión a TFs. Adicionalmente, estas características a menudo son evolutivamente conservadas (Andersson & Sandelin, 2020).

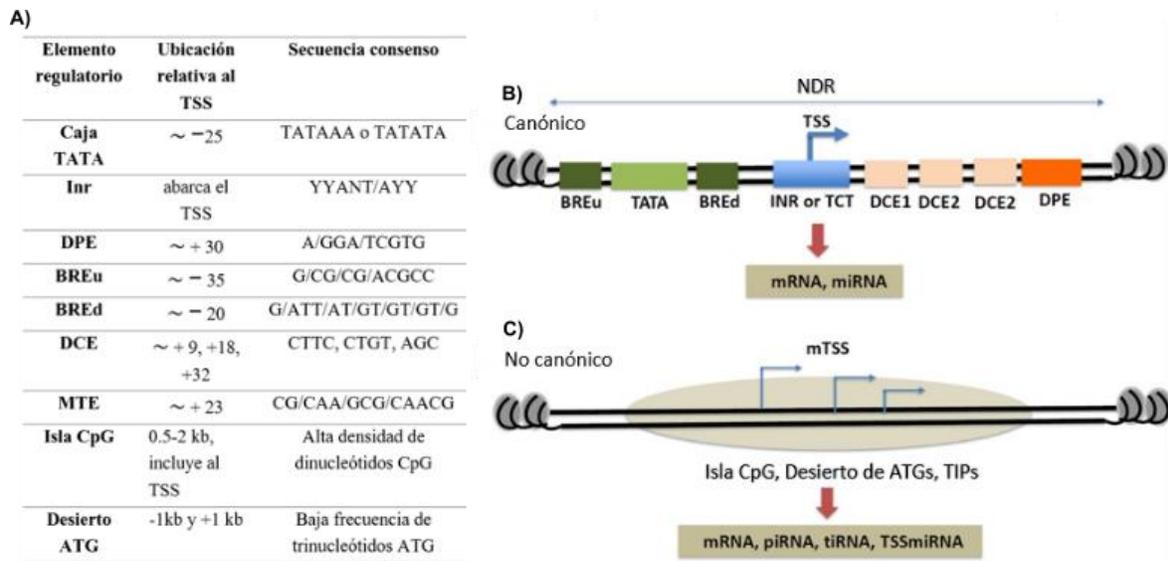


**Figura 4. Resumen de características clave de un promotor.** En la parte superior se muestra un esquema de la ubicación del nucleosoma, NDR, la unión de TFs al centro del NDR y el complejo de pre-inicio. La segunda fila muestra los uaRNAs y mRNAs producidos a partir los bordes del NDR. Las filas restantes muestran niveles de intensidad de señal típicos de experimentos usados en identificación y caracterización de promotores. Las dos primeras filas muestran señales típicas de técnicas que detectan TSS mediante la secuenciación de los extremos 5' de los RNAs estables (Ej: análisis de Cap de la expresión génica (CAGE)), con o sin agotamiento del exosoma nuclear. La siguiente fila muestra los resultados típicos de las técnicas que secuencian los extremos 5' de RNA's nacientes (Ej: GRO-cap o Start-seq) en células normales. Las características de la secuencia, incluidos los sitios poli (A) (pA), los sitios de splicing 5' (SS 5') y los dinucleótidos CpG así como las características de cromatina como accesibilidad (ATAC-Seq) e hipersensibilidad a la DNasa (DNasa-seq) y la presencia de las modificaciones H3K27ac, H3K4me4me1 y H3K4me1 (ChIP-seq) se visualizan como barras en escala de grises que muestran su densidad de patrón promedio, donde el negro indica una densidad más alta (Modificada de Andersson & Sandelin, 2020)

### 1.3.3 Elementos regulatorios

Distintos elementos regulatorios dentro de los promotores mínimos son comunes a un gran número de genes y se han conservado en la evolución. Sin embargo, la

función específica de estos elementos en la regulación de la transcripción de todos los genes no está claro, ya que no todos los elementos descritos se encuentran asociados con todos los genes (Figura 5A) (Roy & Singer, 2015). El análisis de los promotores concentrados, presentes en genes altamente regulados específicos de tipo celular de expresión restringida y un patrón de transcripción de un solo TSS o un grupo estrecho de TSSs con una ventana de  $\leq 5$  nt derivado probablemente de un solo PIC bien posicionado, ha llevado al descubrimiento de secuencias regulatorias consideradas canónicas como la caja TATA, el iniciador (Inr), el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), el elemento promotor río abajo (DPE), el elemento central río abajo (DCE) y el elemento motivo diez (MTE) (Figura 5B). Por el contrario, los promotores dispersos generalmente carecen de motivos BRE, TATA, DPE y MTE, pero tienen islas CpG, plataformas de inicio transcripcional (TIP) y desiertos ATG que permitirían que una sola proteína sea codificada por una región promotora con múltiples TSS, todos ellos considerados no canónicos a pesar de ser ampliamente usados (Figura 5C) (Smale & Kadonaga, 2003; Gershon & Kadonaga, 2010; Roy & Singer, 2015; Vo ngoc *et al.*, 2017).

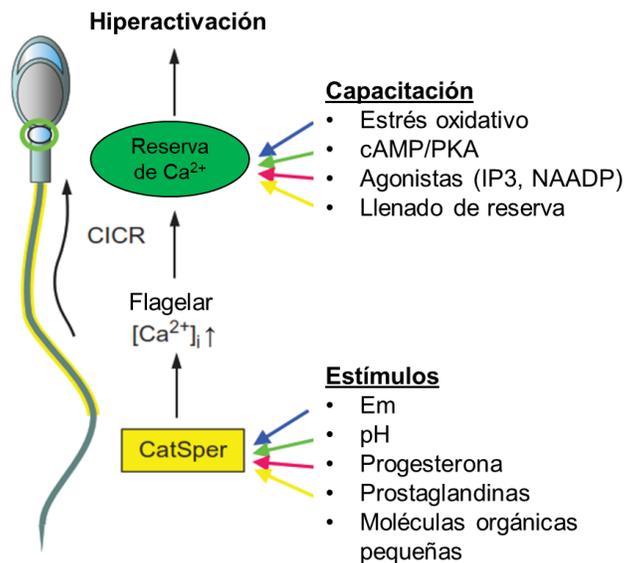


**Figura 5. Elementos presentes en promotores mínimos canónicos y no canónicos.** Los diversos elementos promotores centrales establecidos se muestran en (A). Algunos promotores de miRNA y codificadores de proteínas (mRNA) tienen elementos promotores canónicos asociados con ellos. No todos estos elementos están presentes en todos los promotores y muchos están presentes en genes específicos de linaje. (B) Una gran parte de genes de mamíferos carecen de elementos promotores centrales clásicos, pero en

cambio contienen regiones amplias (100-150 pb) asociadas con el inicio de la transcripción. Los elementos o regiones no canónicos establecidos son islas CpG, desiertos ATG y plataformas de inicio de transcripción (TIP). Estos están presentes en el RNA codificante y en varios RNA no codificantes, incluido el RNA que interactúa con piwi (piRNA), el RNA asociado al inicio de la transcripción (tiRNA) y el miRNA asociado a TSS (TSSmiRNA). Estos promotores se caracterizan con frecuencia por múltiples TSS (mTSS) (Modificado de Roy & Singer, 2015).

#### 1.4 CatSper: importancia y estructura

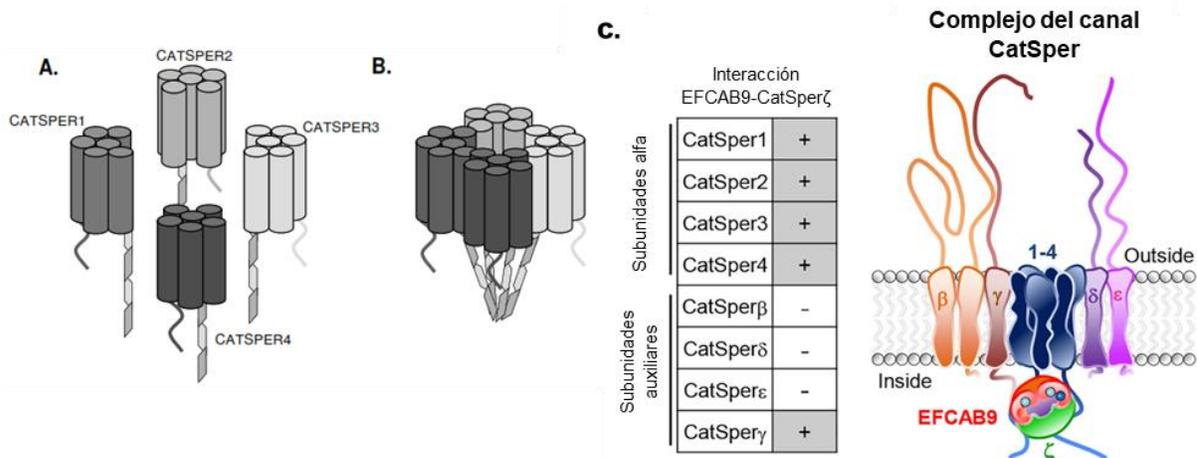
El canal CatSper es un canal formado exclusivamente en espermatozoides y ubicado en la membrana de la pieza principal del flagelo. CatSper es dependiente de pH, ligeramente dependiente de voltaje, permeable a iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y es esencial en la quimiotaxis hacia el óvulo, reacción acrosomal, capacitación e hiperactivación del espermatozoide (Sun *et al.*, 2017). Se ha propuesto que la activación de CatSper actúa como un desencadenante de la hiperactivación y la consecuente elevación de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en el flagelo estimula una liberación secundaria de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el cuello del espermatozoide, ya sea estimulando la síntesis de inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) o mediante liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), lo que lleva a la hiperactivación (Figura 6) (Correia *et al.*, 2015).



**Figura 6. Modelo para la activación/regulación de la hiperactivación activada por CatSper.** Los canales CatSper en el flagelo (recuadro amarillo; sombreado amarillo en el flagelo del espermatozoide) se activan mediante diversos estímulos que incluyen pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ), potencial de membrana ( $E_m$ ), progesterona, prostaglandinas y otras

moléculas orgánicas. El  $\text{Ca}^{2+}$  del flagelo se difunde hacia adelante, elevando  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el cuello del espermatozoide y puede movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR). La susceptibilidad del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  a CICR está potencialmente regulada/sensibilizada por procesos que ocurren durante la capacitación, incluida la señalización de cAMP, el estrés oxidativo y la S-nitrosilación, así como el llenado del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  y los efectos de agonistas en los canales que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  de sus depósitos (Modificado de Correia *et al.*, 2015).

CatSper está formado por cuatro subunidades  $\alpha$  (Catsper1-4) y al menos seis subunidades auxiliares: Catsper  $\beta$  (beta), Catsper  $\gamma$  (gamma), Catsper  $\delta$  (delta), Catsper  $\epsilon$  (épsilon), Catsper  $\zeta$  (zeta) y EFCAB9 (Figura 7C) (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2001; Lobley *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011, 2017; Hwang *et al.*, 2019). Todas las subunidades  $\alpha$  (alfa), al igual que la subunidad  $\delta$ , son esenciales para la fertilidad masculina y la hiperactivación de los espermatozoides (Qi *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2011) mientras que la ausencia de las subunidades  $\zeta$  y EFCAB9 comprometen la movilidad del espermatozoide resultando en un fenotipo de subfertilidad (Chung *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2019).



**Figura 7. Estructura y composición del canal CatSper.** (A) Representación esquemática de las subunidades Catsper 1–4. (B) Modelo en el que se forma un canal tetramérico a través de la interacción directa de los dominios en espiral. (C) Izquierda: se muestra la interacción del complejo EFCAB9-CatSper $\zeta$  con las demás subunidades; Derecha: Representación esquemática predictiva de la interacción y topología de las subunidades del canal CatSper (A y B: Lobley *et al.*, 2003; C: Modificado de Hwang *et al.*, 2019).

Las subunidades  $\alpha$  tienen seis segmentos transmembranales (Figura 7A) que forman dos dominios fisiológicamente activos: el dominio del sensor de voltaje (S1-S4) y el dominio de formación de poro (S5-S6). El dominio S1-S4 está unido por una

estructura cíclica corta y el segmento transmembranal 4 (S4) es el responsable de la capacidad de sensor de voltaje del dominio debido a que tiene varios residuos de aminoácidos cargados positivamente (lisina/arginina). S5 y S6 están unidos por una estructura cíclica corta e hidrofóbica, tiene una secuencia homóloga conservada ([T]xx[D]xx[W]) que permite la entrada selectiva de calcio a través de la membrana celular. La unión de estas cuatro subunidades  $\alpha$  forman un heterotetrámero funcional (Figura 7B) (Singh & Rajender, 2015; Sun *et al.*, 2017).

## 1.5 Genes *Catsper*

### 1.5.1 Información general

El gen *Catsper1* se ubica en el cromosoma 19 en ratones, se estructura en 13 exones y codifica para una proteína de 686 aminoácidos (aa) mientras que *Catsper2* se ubica el cromosoma 2, consta de 16 exones y codifica una proteína de 588 aa. *Catsper3* se ubica en el cromosoma 13, tiene nueve exones y codifica una proteína de 395 aa, siendo la subunidad  $\alpha$  la más pequeña del canal. *Catsper4* consta de 12 exones, se ubica en el cromosoma 12 y genera una proteína de 442 aa. Las subunidades auxiliares  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y Efcab9 se ubican en el cromosoma 12, 7, 17, 1, 19 y 11, respectivamente, codificando proteínas de 1109, 1145, 805, 956, 194 y 216 aa, respectivamente (Sun *et al.*, 2017). Estos datos, así como los correspondientes al humano son resumidos en la tabla 1.

**Tabla 1. Información esencial de las de los genes de las subunidades de CatSper en humano y ratón.** Se muestra la ubicación cromosómica, el numero exones y la longitud en aa de cada una de las subunidades que conforman el canal CatSper reportadas hasta el momento (Modificado de Sun *et al.*, 2017).

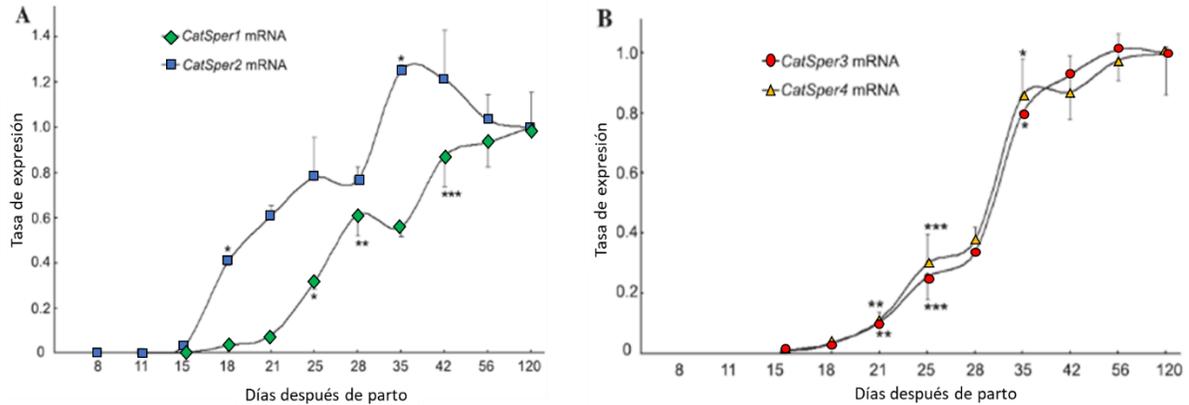
<b>Gen</b>	<b>Humano</b>			<b>Ratón</b>		
	Ubicación cromosómica	Número de exones	Número de aminoácidos	Ubicación cromosómica	Número de exones	Número de aminoácidos
<i>Catsper1</i>	11q13.1	12	780	19A	13	686
<i>Catsper2</i>	15q15.3	14	530	2E5	16	588
<i>Catsper3</i>	5q31.1	8	344	13B1	9	395
<i>Catsper4</i>	1p36.11	11	472	4D3	12	442
<i>Catsper<math>\beta</math></i>	14q32.12	27	1116	12E	27	1109

**Tabla 1 (Continuación). Información esencial de las de los genes de las subunidades de CatSper en humano y ratón.** Se muestra la ubicación cromosómica, el numero exones y la longitud en aa de cada una de las subunidades que conforman el canal CatSper reportadas hasta el momento (Modificado de Sun *et al.*, 2017).

<b>Gen</b>	<b>Humano</b>			<b>Ratón</b>		
	Ubicación cromosómica	Número de exones	Número de aminoácidos	Ubicación cromosómica	Número de exones	Número de aminoácidos
<i>Catsper<math>\gamma</math></i>	19q13.2	36	1159	7B1	30	1145
<i>Catsper<math>\delta</math></i>	19p13.3	25	798	17D	28	805
<i>Catsper<math>\epsilon</math></i>	1q44	31	800	1H4	26	956
<i>Catsper<math>\zeta</math></i>	11q13.1	5	200	19A	5	194
<i>Efcab9</i>	5q35.1	4	197	11 A4	5	216

## Expresión

La expresión de RNA mensajero (mRNA) de Casper1-4 es específica de testículo tanto en humano como en ratón, sin embargo, en humano se ha reportado una expresión débil de *Catsper4* en placenta y pulmones (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2001; Lobleby *et al.*, 2003). Además, se ha observado expresión de *Catsper3* en cerebro de ratón (Kim *et al.*, 2010) y en otros tejidos en un modelo de cerdo (Song *et al.*, 2011) pero su implicación funcional no ha sido analizada. En testículos de ratón, *Catsper2* se detecta desde los ocho días post-parto (dpp) pero su expresión se reprime siete días y en seguida se presentan dos grandes aumentos en su expresión a los 18 y 35 dpp. El mRNA de *Catsper1* se detecta en testículos desde el día 18 y llega a su máxima expresión al día 25 mientras que el mRNA de *Catsper3* y *Catsper4* son detectados desde los 15 dpp (después de meiosis), con incrementos significativos a los 21, 25 (espermátidas redondas) y 35 dpp (espermatogénesis completa) e incrementando gradualmente hasta alcanzar el nivel máximo a los 120 dpp, cuando el ratón es adulto (Figura 8). Así, las diferencias entre los perfiles de expresión temporal de los transcritos de *Catsper* en el desarrollo de testículos de ratón sugieren una regulación transcripcional diferente, que a su vez podría contribuir a la formación de los canales heteroméricos entre sus productos proteicos (Li *et al.*, 2007).



**Figura 8. Expresión temporal del mRNA *Catsper1-4* en testículo de ratón durante el desarrollo postnatal.** Los niveles de mRNA *Catsper1, 2* (A) y *Catsper3, 4* (B) se expresan como proporciones en relación con los valores de testículo de ratón adulto (120 días). Los datos fueron normalizados a  $\beta$ -Actina, cuantificados por RT-PCR. Las regulaciones ascendentes significativas en comparación con su punto de tiempo anterior fueron marcadas con asteriscos (\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.05$ ) (Modificado de Li *et al.*, 2007).

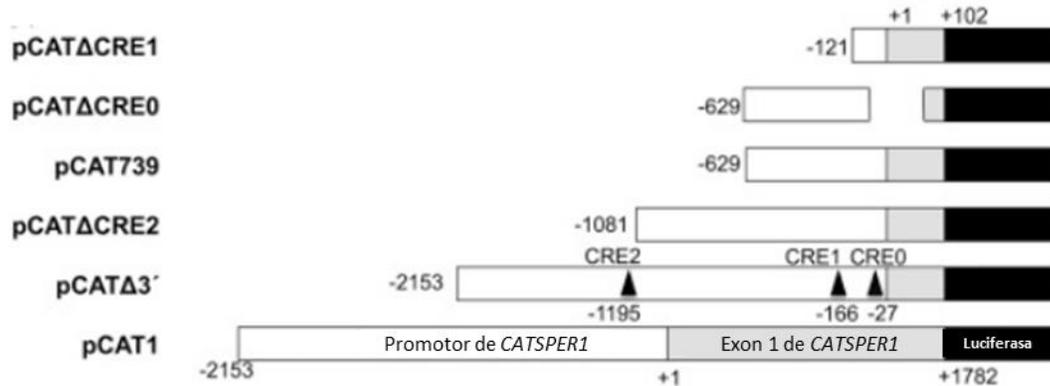
### 1.6 Importancia de *Catsper3*

La generación de líneas de ratones macho que carecen de la subunidad CatSper3 funcional (*CatSper3<sup>-/-</sup>*) demostraron que, a pesar de que la disrupción no afecta el proceso de espermatogénesis y estos ratones tienen un comportamiento normal, los ratones *CatSper3<sup>-/-</sup>* fueron incapaces de generar camadas. Asimismo, los espermatozoides de los ratones *CatSper3<sup>-/-</sup>* presentan una reducción en su velocidad, una disminución significativamente más rápida y de mayor magnitud en el porcentaje de espermatozoides móviles respecto a los espermatozoides normales. Además, los espermatozoides *CatSper3<sup>-/-</sup>* no pueden generar el patrón característico de hiperactivación al ser incubados en un medio capacitador y perdieron totalmente la movilidad al ser colocados en un medio viscoso mientras que los espermatozoides normales pudieron hiperactivarse y seguir en movimiento (Qi *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007). Estos datos demuestran que *CatSper3* es esencial para la fertilidad masculina e indispensable para la hiperactivación del espermatozoide. En humanos, *CatSper3* se ha asociado positivamente con la hiperactivación y morfología del espermatozoide. Además, la disminución de la expresión génica de *Catsper3* se ha relacionado significativamente con astenozoospermia, teratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia (Carckzci *et al.*, 2017).

## 2. ANTECEDENTES

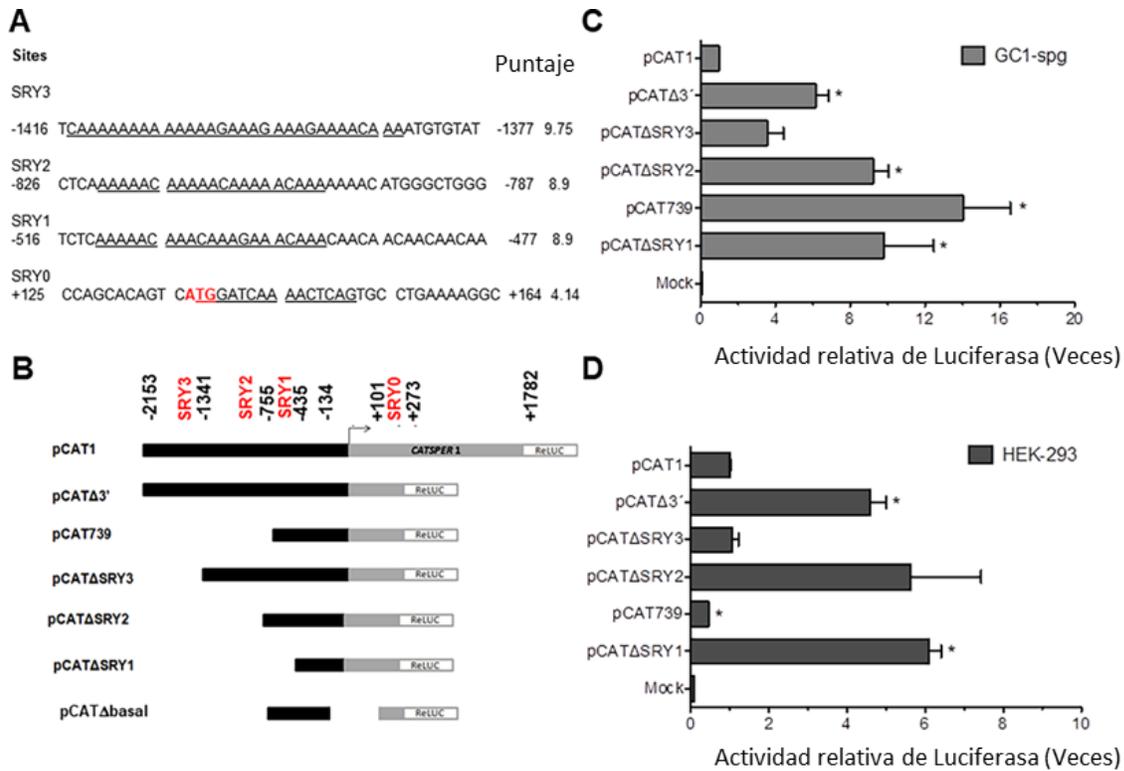
### 2.1 Regulación transcripcional de *Catsper1*

La región promotora de *Catsper1* tanto de ratón como de humano ha sido analizada y se ha mostrado que pueden considerarse promotores tipo TATA-less ya que la actividad transcripcional no se ve afectada después de la eliminación de los sitios tipo caja TATA, sin embargo, estos promotores tienen un elemento de respuesta a cAMP (CRE) conservado, que podría actuar como sustituto, el cual solo se ha analizado en el promotor de *CATSPER1* humano. En humanos, la región inmediata río arriba respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el primer exón contiene sitios CRE que aparentemente regulan negativamente su actividad transcripcional (Mata-Rocha *et al.*, 2013). Hasta el momento, se han identificado tres sitios CRE: CRE0 a -27, CRE1 a -166 y CRE2 a -1195 respecto al TSS (Figura 9). Mediante delecciones y mutaciones de los sitios CRE dentro del promotor de *CATSPER1*, así como la sobreexpresión de los factores CREB-A y CREM $\tau$ , se observó que el factor de transcripción CREB-A es el principal activador del promotor y que CRE1 es el sitio principal reconocido por CREB-A para la activación del promotor *CATSPER1*. En contraste, la sobreexpresión individual de CREM $\tau$  no afecta la actividad transcripcional del promotor, sin embargo, su co-transfección con CREB-A resulta en un incremento de la actividad transcripcional del promotor completo y en una reducción cuando el sitio CRE1 es mutado, lo que indica un efecto cooperativo entre los factores CREB-A y CREM $\tau$  dependiente del sitio CRE1 (Oviedo *et al.*, 2018). Debido a esta evidencia se considera que el promotor de *CATSPER1* es regulado positivamente por el factor CREB-A en células HEK293 y GC1-spg *in vitro*.



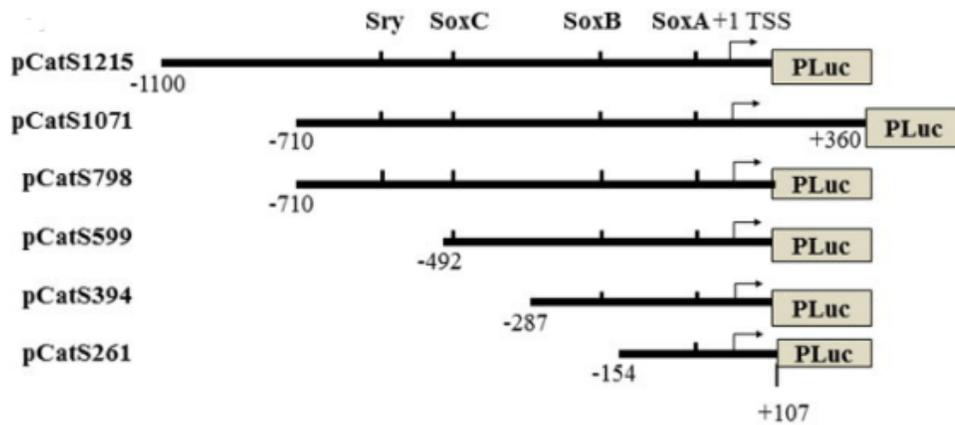
**Figura 9. Representación esquemática de construcciones con delecciones en el promotor de *CATSPER1* humano río arriba del gen de luciferasa de *Renilla reniformis*.** Los triángulos indican la posición en la que se ubican los sitios CRE y +1 indica el sitio de inicio de la transcripción (Modificado de Oviedo *et al.*, 2018).

Según un análisis bioinformático, el promotor de *CATSPER1* también contiene cuatro sitios de unión a SRY, nombrados SRY0 (+137/+145), SRY1 (-511/-491), SRY2 (-822/-802) y SRY3 (-1405/-1386), cuya eliminación y/o mutación afecta la actividad transcripcional del promotor *in vitro* (Figura 10). Además, la sobreexpresión de SRY resulta, en todos los casos, en el incremento de la actividad transcripcional del promotor. Sin embargo, solo el sitio SRY2 une al factor SRY *in vitro* de manera específica mientras que los sitios SRY1 y SRY3 también son reconocidos por otros factores SOX. Aunado a esta información el análisis ChIP en células HEK-293 y espermatozoides detectó la unión específica de SRY a los sitios SRY0 y SRY2. En conjunto, los ensayos EMSA, supershift y ChIP revelaron una interacción específica entre SRY y el sitio SRY2 lo que sugiere que SRY2 es un sitio importante para la regulación de la actividad promotora de *CATSPER1* (Olivares *et al.*, 2018).



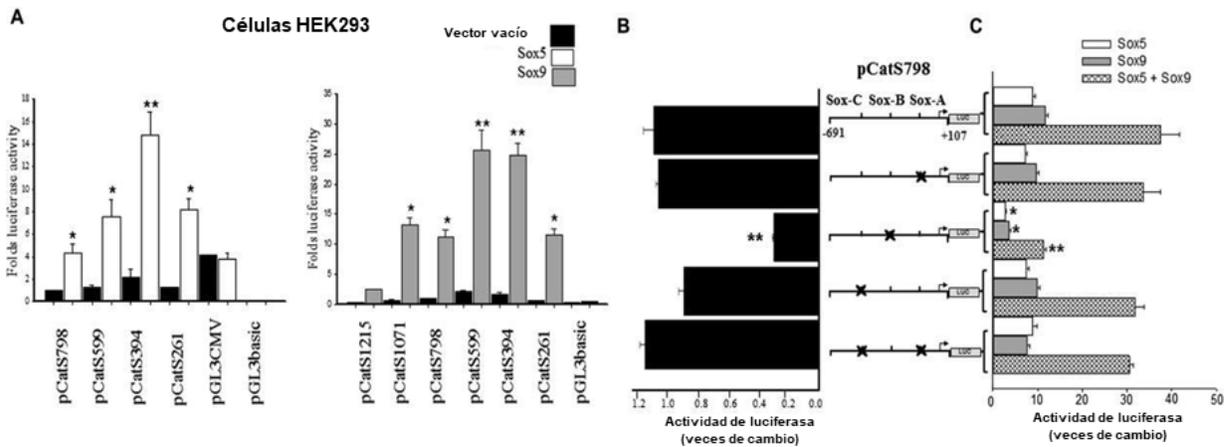
**Figura 10. Identificación de sitios SRY en el promotor del gen de *CATSPER1*.** A) Cuatro sitios SRY fueron identificados *in silico* por el software MatInspector y ConSite. Los sitios SRY en tándem y únicos están subrayados, los números corresponden a la posición en relación con el TSS del gen *CATSPER1*. B) Construcciones con deleciones secuenciales del promotor de *CATSPER1* y localización de los sitios SRY. Estas construcciones se transfectaron en dos líneas celulares, GC1-spg (C) y HEK-293 (D). Se midieron las actividades de luciferasa y las actividades relativas se normalizaron con respecto a la actividad total de pCAT1. Los resultados se presentan como media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). pRLnull se usó como control negativo. Las diferencias estadísticamente significativas respecto del nivel del control pCAT1 (Número de veces la actividad de pCAT1) se indican con \*;  $P < 0,05$  (Modificado de Olivares *et al.*, 2018).

El promotor murino contiene sitios de unión para los factores de transcripción Sry, Sox5, Sox9 y Creb, cuyas secuencias son protegidas por proteínas nucleares en testículo y se ha demostrado que el promotor mínimo de *Catsper1* consiste en una región de 394 pb (-287 a +107) (Mata-Rocha *et al.*, 2013; 2014). Hasta el momento solo se conoce el efecto de los factores de transcripción Sox en la regulación de *Catsper1* y se han identificado tres sitios de unión para estos factores, cuyas coordenadas son de -145/-135 para el sitio Sox-A, -218/-208 para Sox-B y -484/-472 para Sox-C (Mata-Rocha *et al.*, 2014) (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de las construcciones de delecciones consecutivas del extremo 5' *Catsper1* y posición de sitios Sox.** Cada construcción fue nombrada de acuerdo con la longitud de la región insertada río arriba y río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS), conteniendo el gen reportero luciferasa *Photinus* de luciérnaga (PLuc) (Mata-Rocha *et al.*, 2014).

Las mutaciones en los sitios Sox-A y Sox-C no afectan la transactivación del promotor por parte de Sox5 y Sox9, en contraste la mutación del sitio Sox-B, genera una reducción del 60% en la actividad transcripcional indicando que Sox-B es responsable de la mayor parte de la regulación transcripcional y de la transactivación con Sox5 y Sox9, los cuales muestran un efecto cooperativo en la actividad del promotor (Figura 12). Adicionalmente se mostró que ambos factores de transcripción interactúan de manera específica con el promotor *in vitro* e *in vivo* (Mata-Rocha *et al.*, 2014).



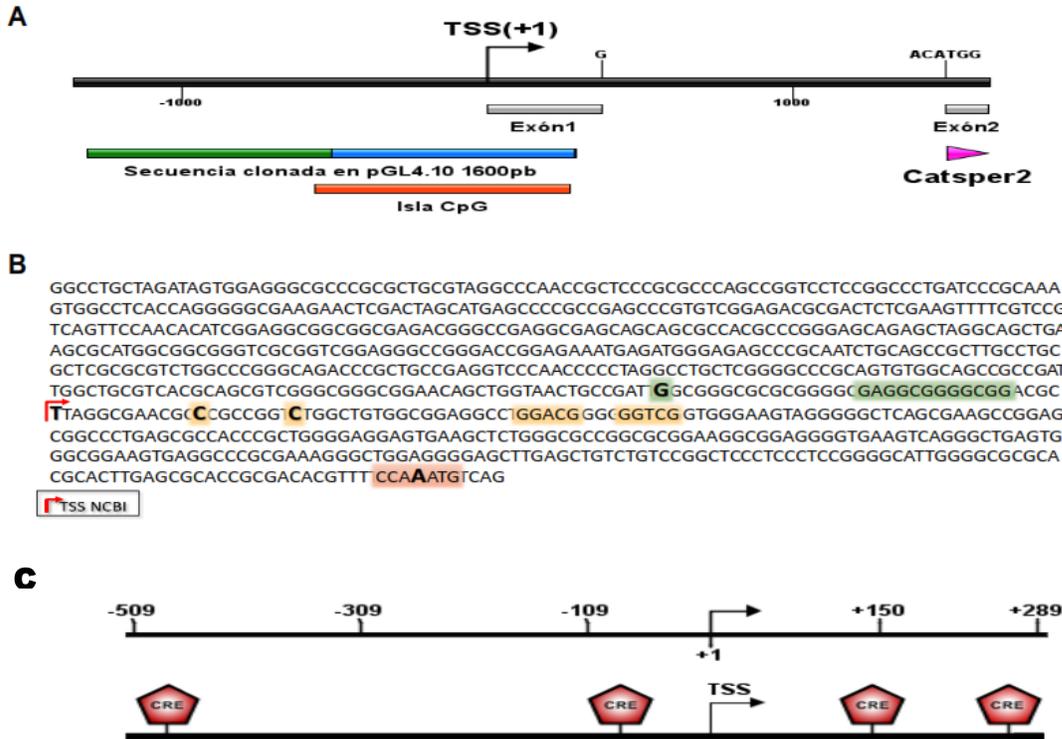
**Figura 12. Sox5 promueve la actividad del promotor *Catsper1*.** (A) La actividad transcripcional se representa en barras para cada construcción. Todas las construcciones

se transactivaron mediante la expresión de Sox5 (barras abiertas) y Sox9 (barras sólidas). (B) Células HEK-293 se transfectaron con construcciones pCatS798 de tipo silvestre o mutadas en los sitios de unión de Sox. (C) Las mismas construcciones se co-transfectaron con los plásmidos Sox5, Sox9 o ambos. Se calcularon las actividades de luciferasa en la condición de control (barras sólidas) y después de la sobreexpresión de Sox5 y Sox9 (barras abiertas, sólidas y sombreadas). Se muestra un diagrama que muestra las diferentes construcciones probadas (panel central) en el que se indican los supuestos sitios de unión del factor de transcripción Sox, el sitio de inicio de la transcripción y las mutaciones introducidas. Los valores indican la media  $\pm$  S.E.M. de las actividades relativas de luciferasa (n = 3). \* P  $\leq$  0.05 \*\* P  $\leq$  0.001 (prueba t de Student) (Modificado de Mata-Rocha *et al.*, 2014).

Asimismo, el promotor *Catsper1* tiene actividad transcripcional antisentido *in vivo* con niveles de expresión significativos en testículos de ratón. Este transcrito es un RNA largo no codificante nombrado *Catsper1au* localizado en el núcleo de células somáticas y germinales de testículo, pero no en espermatozoides (Jiménez *et al.*, 2017).

## 2.2 Regulación transcripcional de *Catsper2*

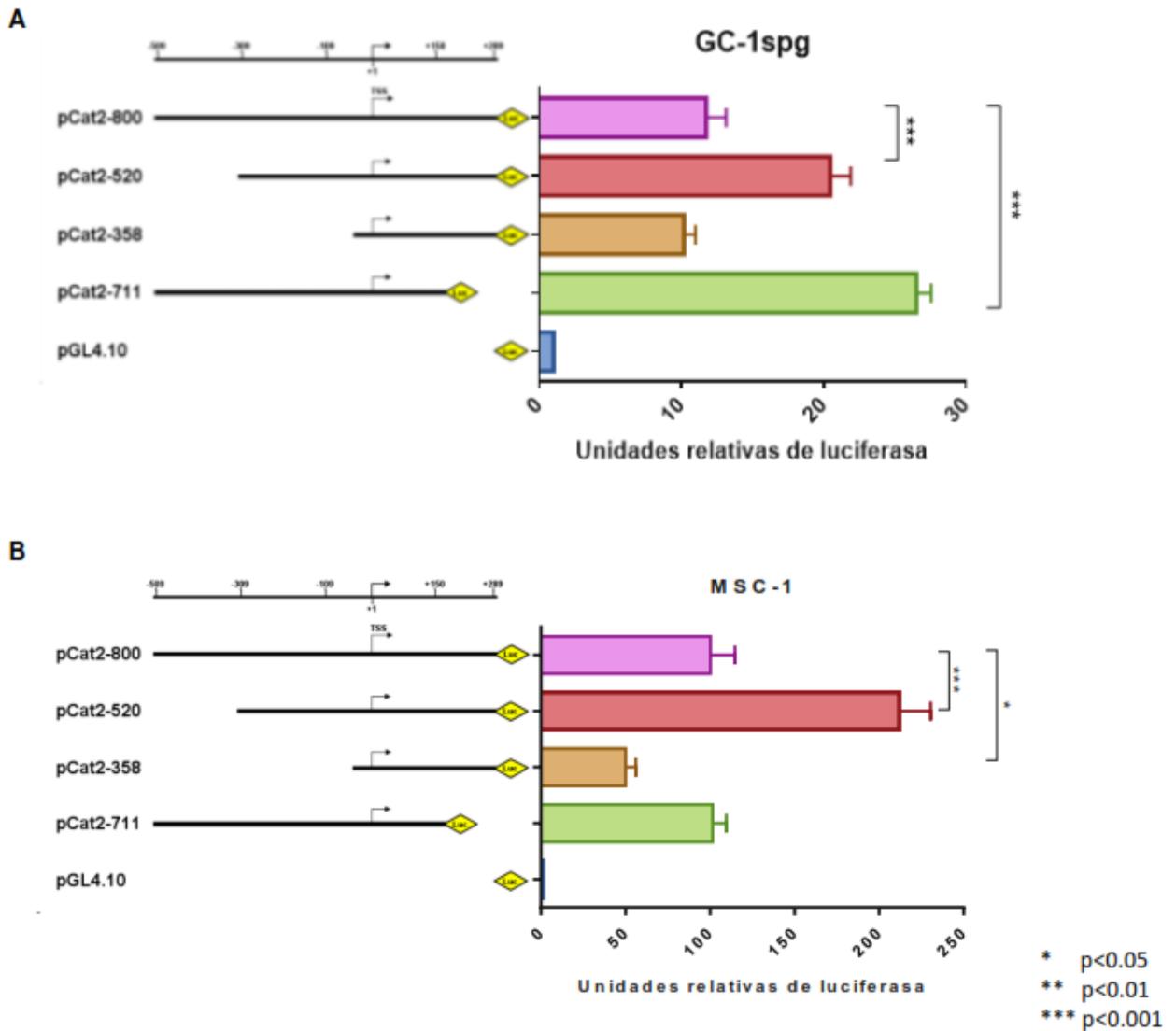
Recientemente se ha identificado que el promotor de *Catsper2* se encuentra en la región -500/+284 así como posibles sitios de unión para diversos factores de transcripción ubicuos y específicos de testículo que podrían regular la actividad transcripcional de *Catsper2*, siendo relevantes cuatro sitios CRE (Figura 13). Sin embargo, según el análisis bioinformático también se encuentran sitios de unión para los factores de transcripción, ZF5F (factor de transcripción con dominio POZ), AP1 (proteína activadora 1), E2F (factor de transcripción E2F), SP1 (proteína de especificidad 1), CTCF (factor de unión a CCCTC) y CREBP (proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP) (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018).



**Figura 13. Análisis in silico de las señales de transcripción en el promotor de *Catsper2* murino.** (A) Predicción de la región promotora de 800 pb (azul) e isla CpG (naranja); se muestra la ubicación del promotor con respecto al inicio transcripcional (TSS) de *Catsper2* y se señalan los dos primeros exones, así como el comienzo de la traducción (fucsia) y la secuencia Kozak (ACATGG). (B) Predicción de elementos de promotor basal de la secuencia con YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor; posible elemento iniciador o INR (naranja), dos posibles elementos río abajo de promotor o DPE (amarillo) y un posible elemento de motivo diez o MTE (verde). Los inicios transcripcionales de acuerdo con los elementos predichos se encuentran resaltados en negrita. (C) Predicción de cuatro secuencias consenso CRE, que sirven para la unión de factores de transcripción de la familia CREB usando los programas MathInspector, Promo y TFBind (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018).

Además, se ha propuesto que el promotor mínimo comprende la región -54/+189 respecto al TSS con base a resultados de ensayos de actividad de luciferasa de construcciones con regiones deletadas del promotor en líneas celulares MSC-1 y

GC-1spg (Figura 14) (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018).



**Figura 14. Determinación del promotor basal de *Catsper2* murino.** Actividad transcripcional de las construcciones con las deleciones del promotor de *Catsper2* en las líneas celulares GC-1 spg (A) y MSC-1 (B). Los datos indican la media  $\pm$  SEM, n=3 y los asteriscos las diferencias significativas respecto a la actividad del promotor completo (pCat2-800) (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se reconoce al canal CatSper como un elemento indispensable en los espermatozoides para lograr la fertilización del ovulo y se ha demostrado que la subunidad CatSper3 es necesaria para la hiperactivación de los espermatozoides y esencial en la fertilidad masculina. Sin embargo, nada se conoce sobre su regulación transcripcional por lo que el análisis de su región promotora nos permitiría conocer su composición, estructura y sitios relevantes en su regulación, comenzando así a comprender el control de su expresión a nivel transcripcional.

Consecuentemente, la información que resulte de este trabajo podrá fungir como base para evaluar *in vitro* e *in vivo* la interacción de los factores en *trans* asociados a estas secuencias, así como su papel sobre la regulación transcripcional de *Catsper3* durante la espermatogénesis.

## 4. OBJETIVOS

### General

Caracterizar la región promotora del gen *Catsper3* murino.

### Específicos

- 1) Analizar *in silico* el promotor y secuencias reguladoras putativas de *Catsper3* murino.
- 2) Determinar la región correspondiente al promotor mínimo de *Catsper3* murino.
- 3) Identificar secuencias regulatorias en el promotor de *Catsper3* murino *in vitro*.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia que se seguirá para el cumplimiento de los objetivos planteados se presenta en el siguiente diagrama de flujo (Figura 15).

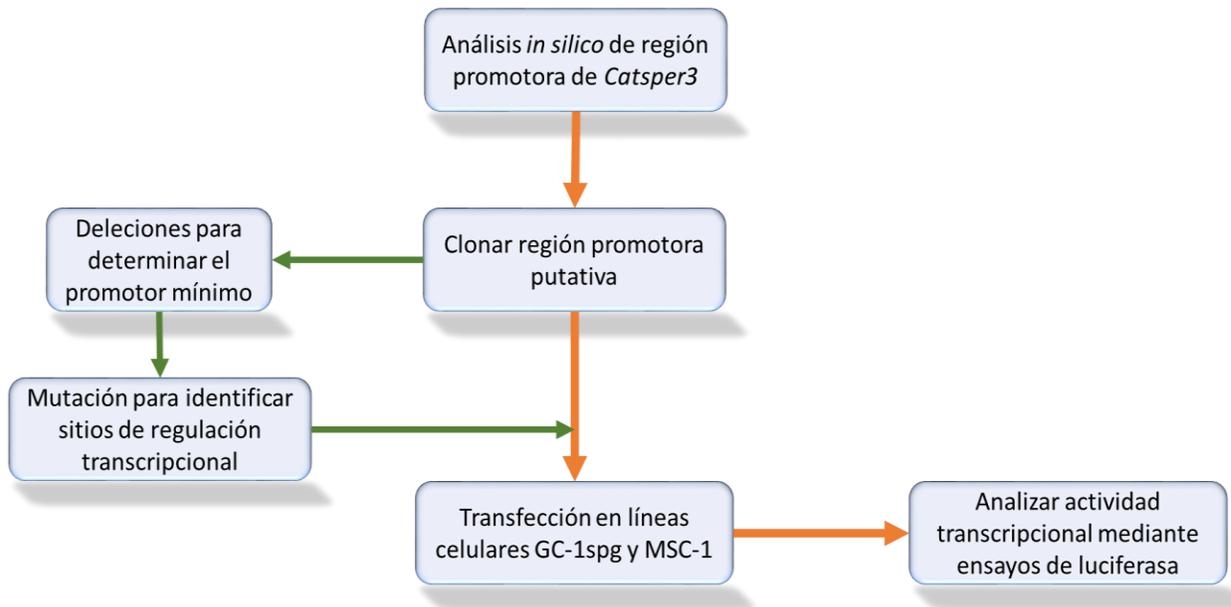


Figura 15. Representación de la estrategia experimental planteada.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Análisis bioinformático

#### 6.1.1 Predicción de Islas CpG

Se usó una secuencia DNA de 2859 pb correspondiente a la región -2181/+678 respecto al TSS del gen *Catsper3* murino. Se realizó la predicción de islas CpG putativas con los programas CpGfinder, CpGislandDB, Cpgplot utilizando los criterios mostrados en la tabla 2.

#### 6.1.2 Establecimiento de sitios de inicio de la transcripción

Para establecer los TSS usados en este trabajo se utilizaron datos públicamente disponibles del consorcio Fantom5 EntrezGene:76856. Los datos corresponden a resultados experimentales de *Análisis de Expresión Génica por Cap* (CAGE) de testículo de ratón adulto, considerados como picos o sitios de inicio de la

transcripción por CAGE (CTSS's). Los picos se visualizaron en el *UCSC genome browser* en busca de los CTSS para el gen *Catsper3* murino. Los picos p1@catsper3 (CTSS1), p2@catsper3 (CTSS2) y p3@catsper3 (CTSS3) corresponden al TSS encontrado con mayor frecuencia, al segundo en frecuencia y al encontrado en menor frecuencia, respectivamente. El ID de acceso del experimento es [DRX009101](#) y los ID's de los CTSS (archivos.bed) para mm9 y mm10 son DRZ002783 y DRZ014133, respectivamente.

### 6.1.2 Predicción de elementos de promotor mínimo

Usando una secuencia de DNA de 979 pb correspondiente a la región -540/+439 respecto al TSS del gen *Catsper3* murino, se realizó la predicción de elementos de promotor mínimo con los programas YAPP- Eukaryotic Core Promoter Predictor y ElemeNT v2, utilizando los criterios mostrados en la tabla 2.

**Tabla 2. Criterios usados en la predicción de sitios de unión a factores de transcripción**

Software	Criterios	URL
<b>YAPP</b>	Cut-off= 0.80	<a href="http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp.cgi">http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp.cgi</a>
<b>ElemeNT v2</b>	Por defecto	<a href="http://lifefaculty.biu.ac.il/gershon-tamar/index.php/element-description/elementv2">http://lifefaculty.biu.ac.il/gershon-tamar/index.php/element-description/elementv2</a>
<b>CpGFinder</b>	Tamaño min=200 %GCmin= 50 Radio min de GC= 0.6	<a href="http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&amp;group=programs&amp;subgroup=promoter">http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&amp;group=programs&amp;subgroup=promoter</a>
<b>CpGislandDB</b>	Por defecto	<a href="https://bioinfo2.ugr.es/CpGislandDB/">https://bioinfo2.ugr.es/CpGislandDB/</a>
<b>Cpgplot</b>	Por defecto	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/</a>
<b>MatInspector</b>	Por defecto	<a href="https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html">https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html</a>
<b>TFBind</b>	0.85	<a href="http://tfbind.hgc.jp/">http://tfbind.hgc.jp/</a>
<b>ConSite</b>	Cut-off= 85%	<a href="http://consite.genereg.net/">http://consite.genereg.net/</a>
<b>PROMO</b>	Mat. Sim = 85%	<a href="http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3">http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3</a>
<b>P-match 1.0</b>	Mat. Sim = 85% Cor. Sim = 85%	
<b>MatrixCatch v2.1</b>	P-value = 0.05	<a href="http://gene-regulation.com/pub/programs.html">http://gene-regulation.com/pub/programs.html</a>
<b>AliBaba2.1</b>	Conservación Min mat. = 80%(alto).	

### 6.1.3 Predicción de sitios de unión a TFs

Se usó una secuencia DNA de 979 pb correspondiente a la región -540/+439 respecto al TSS del gen *Catsper3* murino. La identificación de sitios putativos de unión a TFs se realizó con los programas web TFBIND, MatInspector, ConSite, PROMO, GenePromoterMiner, AliBaba2.1, MatrixCatch v2.7, Match - 1.0, P-match 1.0 con los criterios presentes en la tabla 2, recuperando aquellos sitios putativos de unión a TFs expresados en alguna de las etapas de la espermatogénesis y que pudieran ser reguladores transcripcionales relevantes según la literatura.

### 6.1.4 Obtención y Análisis de datos de ChIP-seq

Se descargó un archivo en formato .bed con los picos para CTCF con un IDR óptimo (tasa de descubrimiento irreproducible) y que sobrepasaron el umbral (ENCFF443TPY) de muestra de testículo de ratón, disponible públicamente como el experimento ENCSR000CEF del proyecto ENCODE.

Se recolectaron datos de secuenciación de ChIP-seq de CTCF de espermátocitos en paquiteno (Acceso SRA: SRR11424141, SRR11424142, SRR11424143, SRR11424144) y espermátidas redondas (Acceso SRA: SRR11424145, SRR11424146, SRR11424147, SRR11424148) publicados bajo la serie GSE147536 en el “Gene Expression Omnibus”. Los datos representan dos replicas para cada tipo celular, así como el respectivo control de carga (Input). Se ejecutó la herramienta FastQC (Galaxy Version 0.72+galaxy1) en cada muestra para evaluar la calidad general de los datos y en seguida se usó Trim Galore! (Galaxy Version 0.6.3) para eliminar las secuencias correspondientes a los adaptadores; se especificó datos tipo *paired-end*, en detección automática y los demás parámetros se dejaron por defecto. Las secuencias recortadas fueron sometidas a la herramienta FastQC para confirmar la eliminación de los adaptadores. A continuación, las secuencias fueron mapeadas contra el genoma de referencia de *Mus musculus* mm10 ejecutando Bowtie2 (Galaxy Version 2.3.4.3+galaxy0) usando los parámetros por defecto. Para eliminar las secuencias multi-mapeadas se usó la herramienta Filter SAM or BAM (Galaxy Version 1.8+galaxy1) de Samtools estableciendo un puntaje mínimo calidad MAPQ de 1, el formato de salida como

BAM (-b) y los demás parámetros por defecto. En seguida los alineamientos fueron ordenados por ubicación genómica (coordenadas) con SortSam (Galaxy Version 2.18.2.1) de Samtools y usando RmDup (Galaxy Version 2.0.1) de Samtools se conservaron los alineamientos con la calidad de mapeo más alta en el caso de que existieran lecturas con coordenadas externas idénticas, especificando datos tipo *paired-end*. Finalmente, se realizó la llamada a picos usando MACS2 Callpeak (Galaxy Version 2.1.1.20160309.6) agrupando las muestras (CTCF) así como los controles de carga (no CTCF), seleccionando el formato de entrada a *paired-end BAM*, tamaño efectivo del genoma de 1.87e9, sin construcción de modelo (--nomodel), tamaño de extensión de 200, una detección del pico basada en el q-value con corte mínimo del FDR (q-value) de 0.05.

Los picos descargados del proyecto ENCODE así como los generados con los datos de secuenciación fueron visualizados con el software IGV (v 2.8.9) e IGB (v 9,1,6).

## **6.2 Purificación de DNA**

Para la purificación de DNA se utilizó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el protocolo del fabricante así como extracción por el método de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico. Los protocolos se describen a continuación.

### **6.2.1 Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System**

Se pesó un microtubo de 1.5 ml por cada fragmento de DNA aislado y se registró el peso. Se cortó el fragmento de DNA de interés en el menor volumen posible de gel de agarosa usando un bisturí limpio y se transfirió el fragmento de gel al microtubo correspondiente. El tubo se pesó de nuevo, se calculó el peso del gel y se agregaron 10 µl de *Membrane Binding Solution* por cada 10 mg de gel. Se agitó brevemente en vortex, se incubó a 60°C durante 10 min o hasta disolver completamente el gel y se dio un spin. A continuación, se colocó una minicolumna SV en un tubo de colección, se agregó el gel disuelto a la minicolumna SV y se incubó durante 1 min a TA. En seguida se centrifugó durante 1 min a 13,500 rpm a TA y se descartó el líquido del tubo de colección. Para lavar la columna se agregaron 700 µl de

*Membrane Wash Solution* previamente diluida con etanol al 95%, se centrifugó durante 1 min a 13,500 rpm a TA, se descartó el líquido del tubo de colección y se repitió el proceso con 500 µl de *Membrane Wash Solution*. Se centrifugó durante 1 min a TA para evaporar cualquier residuo de etanol y a continuación se transfirió la columna SV a un microtubo de 1.5 ml limpio. Se agregaron 20 µl de agua milliQ estéril en el centro de la columna sin tocar la membrana, se incubó a TA por 1 min y se centrifugó durante 2 min a 13,500 rpm a TA. Finalmente, se descartó la columna SV y el DNA se cuantificó y almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.2.2 Extracción de DNA por Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1)**

Se agregó un volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamílico 25:24:1 al tubo que contiene el DNA, se agitó en vortex por 20 seg y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo, cuidando no llevar nada de fenol. Se agregó 1 volumen de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó 1 µl de Glucógeno 20 µg/µl, 40 µl de Acetato de sodio 3M y 1 ml de etanol absoluto. Se agitó cuidadosamente y se precipitó el DNA a -70°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 13,500 rpm durante 20 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla de DNA formada se lavó con 200 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13,500 rpm durante 2 min a 4°C. Se retiró el etanol sin perturbar la pastilla y se dejó secar completamente a TA. Finalmente, el DNA se resuspendió en el volumen deseado de agua milliQ estéril, se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.3 Preparación de bacterias competentes**

Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5α (Genotipo: F– Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1) a 37°C durante toda la noche en 3 ml de medio LB. Se inoculó 1 ml del cultivo en 100 ml de medio LB fresco, se incubó a 37°C con agitación a 180 rpm en un matraz Erlenmeyer hasta alcanzar una absorbancia de 0.6-0.9 a 600 nm. Posteriormente se centrifugaron las bacterias a 6000 rpm 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M recién preparada. Se repitió

el ciclo de centrifugado y de resuspensión con  $\text{CaCl}_2$  0.1 M agregando 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml y 2.5 ml. Finalmente, a los 2.5 ml de bacterias se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de glicerol estéril, se realizaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de bacterias manteniéndolas en hielo y finalmente se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### **6.4 Transformación bacteriana**

Se utilizaron de 10-25 ng de plásmido o 5  $\mu\text{l}$  de mezcla de ligación para transformar 50  $\mu\text{l}$  de bacterias competentes. Las bacterias se mezclaron con el plásmido e incubaron por 30 min en hielo, se les dio un choque térmico sometiendo la mezcla a un pulso de calor de  $42^\circ\text{C}$  por 1 min y rápidamente se transfirieron a hielo por 2 min. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de medio LB y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora con agitación constante a 200 rpm. Se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de la reacción de transformación sobre placas de agar LB con ampicilina a 0.2 mg/ml y se incubaron toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se seleccionaron colonias candidatas y se aislaron en placas de agar LB-ampicilina a 0.2 mg/ml.

#### **6.5 Extracción de DNA plasmídico**

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

##### **6.5.1 kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System**

Se inoculó una colonia transformada con el plásmido de interés en 15 ml de caldo LB con ampicilina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de solución de *resuspensión celular*, se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de solución de *lisis celular* y se mezcló por inversión 4 veces; se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de solución de *proteasa alcalina*, se mezcló por inversión 4 veces y se incubó a TA por 5 min. Posteriormente, se detuvo la reacción con 350  $\mu\text{l}$  de *solución de neutralización* y se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a TA. El sobrenadante se transfirió a una columna del kit y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min a TA, se descartó el “flow through” y se realizaron

dos lavados con 750  $\mu$ l y 250  $\mu$ l de *Solución de lavado* y finalmente se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 20  $\mu$ l de agua estéril libre de nucleasas y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min a TA. El DNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.5.2 QIAGEN Plasmid Midi Kit**

Se inocularon bacterias transformadas con el plásmido de interés en 100 ml de caldo LB-ampicilina (0.2 mg/ml) y se incubaron a 37°C con agitación constante de 180 rpm toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células en un tubo Falcon estéril a 6000 rpm por 15 min a 4°C y se desechó el medio. Las células se resuspendieron en 10 ml de la solución P1 (buffer de resuspensión) del kit con 0.1 mg/ml de RNasa y luego se agregaron 10 ml de buffer P2 (buffer de lisis), se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó a TA por 5 min. Después de la incubación, se neutralizó la reacción añadiendo 10 ml del buffer P3 (buffer de neutralización) frío, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó en hielo por 15 min. Posteriormente, se centrifugó a  $\geq 12500$  rpm por 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se repitió el paso anterior para eliminar cualquier residuo; luego, el sobrenadante se pasó por una columna de purificación, previamente equilibrada con 10 ml de buffer QBT. En seguida, se lavó la columna 3 veces con 10 ml de buffer QC y se transfirió a un tubo nuevo, en donde se eluyó el DNA con 15 ml de buffer QF.

Se agregaron 10.5 ml de isopropanol a TA y se centrifugó a  $\geq 12500$  rpm por 30 min para precipitar el DNA. El pellet se limpió con 5 ml de etanol 70% y se centrifugó a  $\geq 12500$  rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el DNA. Por último, se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua estéril libre de nucleasas, se cuantificó y se almacenó a -20°C.

## **6.6 Clonación del promotor de *Catsper3* murino**

### **6.6.1 Amplificación del promotor putativo de *Catsper3* murino**

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando DNA genómico (gDNA) de ratón de la cepa c57BL/6 como molde para amplificar las regiones de -

2181..678 y -540..439 respecto al TSS del gen *Catsper3* murino (Gene ID: 76856; NCBI Reference Sequence: NC\_000079.6) usando oligonucleótidos específicos que contienen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, los sitios de restricción que contienen y la región que amplifican se muestra en la tabla 3.

Se preparó la mezcla de reacción para la PCR compuesta por: 2µl Phusion Buffer GC 5X (1X), 0.5 µl de DMSO 100% (5%), 0.8 µl de dNTP's 2.5 mM, ~150 ng de gDNA o agua (control neg), 0.2 µl del oligonucleótido Cat3.FwdA\_-2181 10µM (0.2 µM), 0.2 µl del oligonucleótido Cat3.Rev\_+678 10 µM (0.2 µM), 0.1 µl de Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase 2 U/µl (0.2 U) de NEB y se llevó a un volumen final (Vf) de 10 µl con agua milliQ estéril. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygene Maxygene y las condiciones del programa de PCR utilizado en ambas reacciones se muestra en la tabla 4. El producto de PCR fue observado en un gel de agarosa al 1%, purificado mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System de PROMEGA y cuantificado por absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop®.

**Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados.**

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Sitio de restricción	Objetivo
Cat3.FwdA_-2181	TTAT <b>GGTACCGGATCC</b> ACTTTCCGCCTTACCA CTAACTG	<i>KpnI</i> y <i>BamHI</i>	Cat3- 2181..678
Cat3.Rev_+678	ATTG <b>CTCGAG</b> CTTGCCTGAACCTGTGACATGA C	<i>XhoI</i>	
Cat3.Fwd_-540	ATTT <b>GGTACC</b> ACACTCCTGTCTGTAACC	<i>KpnI</i>	Cat3-540..439
Cat3.Rev_+439	ATAG <b>CTCGAG</b> GAAATAGGCCCTGTGAC	<i>XhoI</i>	
RVprimer3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC	-----	pGL4.10[Luc2]
Luc2Rev	GTCCCGTCTTCGAGTGGGTAG	-----	

Los nucleótidos marcados en negritas corresponden al sitio de restricción.

**Tabla 4. Programas del termociclador empleados para reacciones de PCR**

Región	Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
<b>Ca3-2181..678</b>	Desnaturalización inicial	1	98°C	5 min
	Desnaturalización	30	98°C	50 seg
	Alineamiento (gradiente)		67.2°C; 68.7°C; 70.1°C; 71.3°C; 72°C	50 seg
	Extensión		72°C	4 min
	Extensión final	1	72°C	10 min
	Reposo	1	4°C	∞
<b>Cat3-540..439</b>	Desnaturalización inicial	1	98°C	5 min
	Desnaturalización	30	98°C	30 seg
	Alineamiento (gradiente)		58°C; 61.9°C; 65.3°C; 66.4°C; 67.4°C; 68°C	30 seg
	Extensión		72°C	2 min
	Extensión final	1	72°C	10 min
	Reposo	1	4°C	∞
<b>Construcciones en pGL4.10</b>	Desnaturalización inicial	1	95°C	5 min
	Desnaturalización	30	95°C	30 seg
	Alineamiento		53.3°C	15 seg
	Extensión		72°C	2 min
	Extensión final	1	72°C	10 min
	Reposo	1	4°C	∞

### 6.6.2 Clonación de la región -540..439 en pJET1.2/Blunt

Para clonar el amplicón correspondiente a la región -540..439 y obtener la construcción llamada pJETCat3-540..439, se utilizó el kit comercial CLONEJET™ PCR cloning de Thermo Fisher Scientific usando un ratio inserto:vector de 3:1 y siguiendo el protocolo descrito a continuación: se incubaron ~28 ng del amplicón Cat3-540..439 purificado, 5 µl del buffer de reacción 2X (1X), 0.5 µl del plásmido pJET1.2/blunt 50 ng/µl (25 ng), 0.5 µl de T4 DNA ligasa 5 U/µl (2.5 U) y se llevó a un Vf de 10 µl con agua milliQ estéril. Se incubó la reacción durante 2 h a 22°C y se transformaron 50 µl células DH5α competentes con 5 µl de la mezcla de ligación.

### **6.6.3 Subclonación de la región -540..439 en pGL4.10[luc2]**

Para subclonar la región -540..439, se liberó el inserto de pJETCat3-540..439 mediante restricción enzimática y se religó en el vector pGL4.10[luc2], que carece de promotor y contiene el gen reportero de luciferasa de *Photinus pyralis* río abajo del sitio de clonación múltiple (MCS) (Anexo 1). El procedimiento para obtener la construcción llamada pCat3-540..439 se describe a continuación.

Se realizó la restricción de 20 µg de pJETCat3-540..439 y 20 µg de pGL4.10[luc2] con 20 U de *KpnI*-HF (NEB) y 20 U *XhoI* (NEB), una concentración final 1X de buffer cutsmart 10X (NEB), se llevó a un Vf de 50-60 µl y se incubó a 37°C toda la noche. La mezcla de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1% y los fragmentos correspondientes a Cat3-540..439 cortado y pGL4.10[luc2] linealizado fueron cortados del gel, purificados mediante extracción fenol:cloroformo:isoamílico y cuantificados por absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop®. A continuación se realizó la reacción de ligación para lo cual se mezclaron 6 µl de Cat3-540..439 cortado ~150 ng/µl (~900 ng) con 3 µl de pGL4.10[luc2] linealizado ~100 ng/µl (~300 ng), 1.25 µl de buffer T4 DNA ligasa 10X (1X), 1 µl de T4 DNA ligasa 5 U/µl (5 U) (Thermo Scientific™) y 1.25 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril para completar un Vf de 12.5 µl. La mezcla de ligación se incubó 1 h a TA, toda la noche a 4°C y 2 h a TA. En seguida, se usaron 5 µl de la mezcla de ligación para transformar bacterias *E. coli* DH5α competentes.

## **6.7 Deleciones del promotor de *Catsper3* murino**

### **6.7.1 pCat3-540..5**

Se realizó la restricción de 20 µg de pCat3-540..439 con 20 U de *EcoRI*-HF (NEB) y 20 U de *XhoI* (NEB), una concentración final 1X de buffer cutsmart 10X (NEB), se llevó a un Vf de 60 µl y se incubó a 37°C toda la noche. La mezcla de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1% y el fragmento correspondiente a pCat3-540..5 linealizado fue cortado del gel, purificado mediante extracción fenol:cloroformo:isoamílico y cuantificado por absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop®. A continuación se repararon los sitios cortados para generar extremos romos con 450 ng de pCat3-540..5 lineal, una

concentración final a 1X de *2X Reaction buffer*, 0.5 µl de *Blunting enzyme*, (ThermoScientific™) y suficiente H<sub>2</sub>O milliQ estéril para alcanzar un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 70°C durante 5 min y en seguida se agregaron 2.5 U de T4 DNA ligasa (ThermoScientific™) para religar el plásmido. La mezcla de ligación se incubó 1 h a 22°C, toda la noche a 4°C y 2 h a 22°C. Finalmente se usaron 10 µl de la mezcla de ligación para transformar 100 µl de bacterias *E. coli* DH5α competentes.

### **6.7.2 pCat3-198..439**

Se realizó la restricción de 10 µg de pCat3-540..439 y 5 µg de pGL4.10[luc2] con 10 U de *Bgl*II (Fermentas), una concentración final 1X de buffer P0 (Fermentas), se llevó a un Vf de 40 µl y se incubó a 37°C toda la noche. La mezcla de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1% y los fragmentos correspondientes a Cat3-198..439 cortado y pGL4.10[luc2] linealizado fueron cortados del gel, purificados mediante extracción fenol:cloroformo:isoamílico y cuantificados por absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop®. A continuación se realizó la reacción de ligación con un radio inserto:vector de 10:1 para lo cual se mezclaron 77 ng de Cat3-198..439 cortado con 50 ng de pGL4.10[luc2] linealizado, se usó una concentración final de 1X de buffer T4 DNA ligasa, 1 Weiss U de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific™) y se llevó a un Vf de 10 µl con H<sub>2</sub>O milliQ estéril. La mezcla de ligación se incubó 1 h a 22°C, toda la noche a 4°C y 2 h a 22°C. En seguida, se usaron 5 µl de la mezcla de ligación para transformar 50 µl de bacterias *E. coli* DH5α competentes.

### **6.7.3 pCat3-198..5**

Se realizó la restricción de 20 µg de pCat3-540..5 con 10 U de *Bgl*II (Fermentas), una concentración final 1X de buffer P0 (Fermentas), se llevó a un Vf de 50 µl y se incubó a 37°C toda la noche. La mezcla de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1.5% y el fragmento correspondiente a Cat3-198..5 restringido fue cortado del gel, purificado mediante el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y cuantificados por absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop®. A continuación se realizó la reacción de ligación con un radio inserto:vector de 10:1

para lo cual se mezclaron 26 ng de Cat3-198..5 cortado con 50 ng de pGL4.10[luc2] linealizado con *Bgl*II, se usó una concentración final 1X de buffer T4 DNA ligasa, 1 Weiss U de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific™) y se llevó a un Vf de 10 µl con H<sub>2</sub>O milliQ estéril. La mezcla de ligación se incubó 1 h a 22°C, toda la noche a 4°C y 2 h a 22°C. En seguida, se usaron 5 µl de la mezcla de ligación para transformar 50 µl de bacterias *E. coli* DH5α competentes.

## **6.8 Secuenciación de DNA**

Para verificar la secuencia de las construcciones en el plásmido pGL4.10[Luc2] se utilizó el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Las reacciones consistieron de 4 µl de Buffer de secuenciación 5X, 1 µl de mix de reacción, 5 pMol de oligonucleótido, 500 ng de DNA plasmídico y suficiente H<sub>2</sub>O milliQ estéril para completar un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador con un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C por 4 min, 35 ciclos a 96°C/30 s, 54°C/30s (para el oligonucleótido RVPrimer3) o 59°C/30 s (para el oligonucleótido Luc2Rev) y 60°C/4 min. Finalmente, un ciclo de 4°C/∞. Los productos de PCR fueron purificados mediante precipitación por etanol y las muestras secas fueron secuenciadas en el Laboratorio de Secuenciación del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LANSE).

## **6.9 Cultivos celulares**

### **6.9.1 líneas celulares**

Debido a que no existe una línea celular que se encuentre en el estadio de espermátidas a partir del cual se expresa el gen *Catsper3*, se utilizó la línea celular GC1-spg (ATCC® CRL-2053™) las cuales son células espermátogénicas tipo B inmortalizadas por transfección con el vector pSV3-neo (un plásmido que contiene la secuencia del antígeno T largo del virus SV40), pertenecientes al linaje celular germinal masculino.

El manejo de las células se realizó dentro de una campana de flujo vertical esterilizada con luz UV durante 15 min. Todas las soluciones utilizadas fueron

previamente esterilizadas por filtración con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro o por autoclave. El medio de cultivo utilizado fue el Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y antibióticos penicilina-estreptomicina al 1%. Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.9.2 Pase celular**

Se eliminó el medio de cultivo de las cajas con células adherentes y se lavaron con PBS 1X estéril. Para despegar las células GC-1spg 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. Las células se transfirieron a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente se decantó el medio y el pellet celular se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado. Se tomaron 10 µl, se mezclaron con 80 µl de medio DMEM suplementado y 10 µl de azul de tripano para cuantificarlas en cámara de Neubauer. Se sembraron 1x10<sup>6</sup> células en una nueva caja con 7 ml de medio DMEM suplementado.

### **6.9.3 Criopreservación**

Las células se despegaron siguiendo el procedimiento descrito para el pase celular. Posteriormente el pellet celular se resuspendió en 1 ml de suero fetal bovino (SFB) y se tomaron 100 µl para dar un pase celular. En seguida se agregaron 100 µl de DMSO a los 900 µl de células restantes, se resuspendieron y se transfirieron a criotubos. Posteriormente las células se congelaron lentamente, primero colocándolas en hielo, en seguida en hielo seco (-20°C), luego en un ultracongelador (-70°C) y finalmente en nitrógeno líquido (-196°C), donde se almacenaron hasta su uso.

### **6.9.4 Transfección transitoria**

La transfección de las construcciones del promotor del gen *Catsper3* murino en la línea celular GC1-spg se realizó con el sistema de transfección K2® (Biontexas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

De acuerdo al protocolo de pase celular, se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 24 pozos con 500  $\mu$ l de medio DMEM suplementado y se incubaron a 37°C por 24 h hasta una confluencia celular de 70-80%. Las células se sensibilizaron 2 h antes de transfectar añadiendo 5  $\mu$ l del reactivo K2 Multiplier en cada pozo. En seguida se prepararon las mezclas de transfección (Tabla 5), se incubaron a TA por 20 min e inmediatamente se añadieron a los pozos agitando suavemente. Cada cultivo se incubó 48 h a 37°C, cambiando el medio a las 24 h y en seguida las células se lisaron para obtener el extracto celular. Se utilizó el vector pGL4.10[luc2] vacío como control de actividad basal de referencia, con el promotor de citomegalovirus (pGL4.10-CMV) como control positivo de transfección (estos vectores contienen el gen reportero de luciferasa de *Photinus pyralis*) y se dejó un pozo de células sin transfectar para restar el ruido de fondo. En todos los pozos transfectados se añadió como control interno de transfección el vector pRL-CMV, que contiene el gen reportero de luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus.

**Tabla 5. Mezclas de transfección usadas para línea celular GC-1 spg.**

	COMPONENTE	CANTIDAD POR POZO
<b>Construcciones pCat3 o pGL4.10[Luc2] vacío</b>	DNA (plásmido)	500 ng
	pRL-CMV	0.4 ng
	K2 Transfection Reagent	2 $\mu$ l
	DMEM sin suplementar	Suficiente para completar 60 $\mu$ l
<b>pGL4.10-CMV (control positivo)</b>	DNA (plásmido)	250 ng
	pRL-CMV	0.4 ng
	K2 Transfection Reagent	2 $\mu$ l
	DMEM sin suplementar	Suficiente para completar 60 $\mu$ l

## 6.10 Lisis celular y ensayo de luciferasa

Para cuantificar la actividad de luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System de Promega.

A las 48 h pos-transfección se realizó la lisis de las células, para lo cual, se eliminó cuidadosamente todo el medio de cultivo, se lavaron las células con 100 µl de PBS 1X, se agregaron 100 µl de buffer de lisis pasiva 1X a cada pozo y se incubó a TA por 15 min en agitación constante; finalmente, se disgregaron bien las células con micropipeta y el contenido celular se transfirió a un tubo eppendorf, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se almacenó a -20°C por un máximo de 30 días.

Las actividades de luciferasa se cuantificaron secuencialmente: se agregaron 20 µl de lisado celular y 20 µl del Reactivo LARII (que contiene el sustrato para la luciferasa de *Photinus pyralis*) en placas negras de 96 pozos e inmediatamente se realizó la lectura en el luminómetro Fluoroskan Ascent® FL de Thermo Scientific. Posteriormente, se agregó 20 µl del reactivo Stop & Glo® para detener la primera reacción e iniciar la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis* en el mismo pozo e inmediatamente se realizó la lectura en el luminómetro.

La lectura de la muestra sin transfectar, correspondiente al ruido de fondo, se restó a los valores obtenidos de cada una de las lecturas de las muestras transfectadas (*Photinus pyralis* y *Renilla reniformis*). Las lecturas de luciferasa de las construcciones analizadas (*Photinus*) fueron normalizadas con las del control interno (*Renilla*) y la lectura para pGL4.10[luc2] fue asignada como una unidad relativa de luciferasa. Cada construcción se realizó por triplicado. Se realizaron tres experimentos independientes de cada construcción a menos que se indique lo contrario

## 6.11 Análisis estadístico

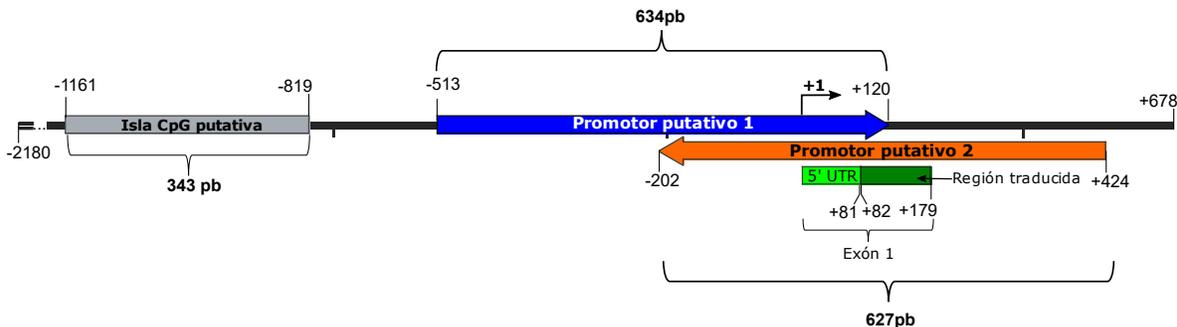
En análisis estadístico de las diferentes construcciones y la generación de las gráficas se realizó con el software GraphPad Prism 8. Los datos se procesaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba t-student. Las diferencias significativas se representaron como sigue: \*p<0.05; \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* de la región promotora del gen *Catsper3* murino.

#### 7.1.2 Predicción de región promotora de *Catsper3* murino

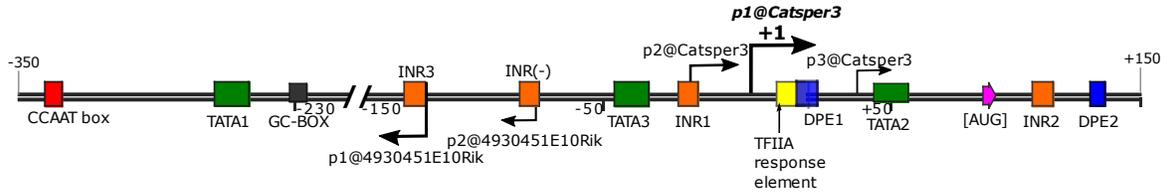
Previamente en nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis *in silico* preliminar en el cual se identificaron dos promotores putativos, uno de 634 pb (-513 a +120) y otro en la cadena complementaria de 627 pb (-202 a +424) respecto al TSS usando la suite de Genomatix (Romero-Tlalolini, datos no publicados). Además, con base a los resultados arrojados por los programas CpGplot, CpGfinder y CpGislandDB se identificó una isla CpG putativa con una longitud 343 pb (-1161 a -819), 52.8% de CG y un radio observado/esperado de 0.81 (Figura 16).



**Figura 16. Representación gráfica de la región -2180/+678 de *Catsper3* según análisis *in silico*.** Se muestra el tamaño y la posición del promotor putativo 1 (Azul), el promotor putativo 2 (Naranja) y de la predicción de una isla CpG (Gris) respecto al TSS (+1). Además, se ilustra el exon1, comprendido de la región traducida (verde) y el 5'UTR (verde limón), anotados para el gen *Catsper3* de *Mus musculus* (Gene ID: 76856; NCBI Reference Sequence: NC\_000079.6).

#### 7.1.3 Predicción de elementos característicos de promotor basal

La secuencia correspondiente a los promotores putativos predichos por genomatix fue usada para realizar la predicción de elementos característicos de promotor basal con los programas YAPP y ElemeNTv2. Se encontraron distintos elementos de promotor basal putativos en la región de -350 a +150 respecto al p1@Catsper3 (CTSS1 que corresponde al TSS encontrado con más frecuencia), incluyendo tres cajas TATA, cuatro secuencias iniciadoras (INR), dos DPE, una caja GC, una caja CCAAT y un elemento de respuesta a TFIIA (Figura 17).



**Figura 17. Predicción de elementos característicos de promotor basal.** Se muestran las tres cajas TATA, cuatro secuencias INR, dos DPE, un elemento de respuesta a TFIIA, una caja GC y una caja CCAAT predichas *in silico* dentro de la región -540..439 respecto al p1@Catsper3 (CTSS1).

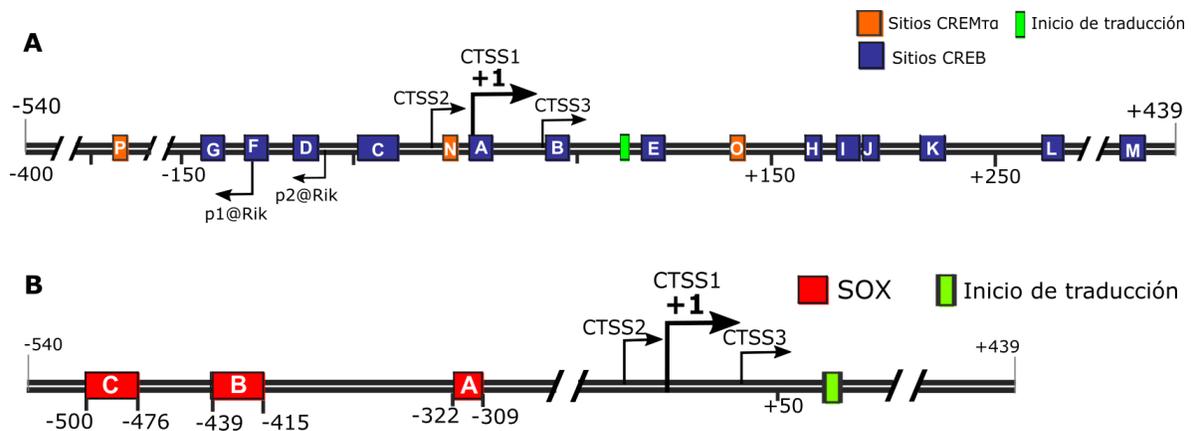
#### 7.1.4 Predicción de sitios de unión a factores de transcripción

La secuencia correspondiente a los promotores putativos predichos por genomatix fue usada para realizar la predicción de sitios de unión a TF con los programas MatInspector, TFBind, Consite, PROMO, P-match 1.0, MatrixCatch v2.1 y AliBaba2.1, las coordenadas exactas de los sitios predichos, su secuencia así como el puntaje (score) obtenido se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Coordenadas, secuencia y puntaje de sitios de unión a factores de transcripción predichos para *Catsper3* murino.**

Factor de transcripción	Sitio	Posición	Secuencia 5' a 3' (cadena)	Puntaje de similitud	
				Matriz	Core
CREB	A	+1..12	agaATTCAggtg (-)	0.926	0.988
	B	+41..52	tgtaTGATAaaa (+)	0.853	0.976
	C	-58..-38	gctttATGAggtcgctcttag (-)	0.924	1.000
	D	-91..-80	cccTCTCAagcc (-)	0.870	0.988
	E	+91..102	catTTTCAccac (-)	0.915	0.976
	F	-117..-106	caagTGAATagg (+)	0.876	0.988
	G	-128..-139	ttaTCTCAggaa (-)	0.919	0.988
	H	+176..183	TTAAGTAA (+)	0.873321	-----
	I	+192..203	aagACTCAgtaa (-)	0.900	1.000
	J	+206..213	TTAAGTAA (+)	0.873321	-----
	K	+236..247	gagaTGAGTgaa (+)	0.944	1.000
	L	+299..309	tctcAGACAag (+)	0.911	0.988
	M	+417..428	TCTTTTGTGTCACA (-)	0.841508	-----
CREMt	N	-13..-7	GCTGCTG (+)	1.000	-----
	O	+137..143	CTACAGC (+)	0.9846	-----
	P	-387..-381	CTACAGC (+)	0.9846	-----
SOX5/9	A	-322..-309	gtccATTGCctgac(-)	0.862	0.911
	B	-439..-415	tgtaaaCAATgtctaaggtcccagc (-)	0.991	1.000
	C	-500..-476	ggggaatcAATGagtttgggttt (-)	0.902	1.000

Se encontraron un total de 13 sitios putativos de unión para el TF CREB distribuidos a lo largo de la región analizada. El sitio A se traslapa con CTSS1 de *Catsper3* y los sitios B y C se encuentran a una distancia menor de 60 nucleótidos alrededor del CTSS1, sin embargo, la mayoría de los sitios CREB se encuentran río abajo del CTSS1. De manera interesante, se observa un patrón similar en la posición de los sitios CREB respecto al TSS1 del lncRNA (p1@Rik), adyacente a *Catsper3* (Figura 18A). Además se encontraron un total de 3 sitios putativos de unión para CREMt, de los cuales el sitio N se ubicado cerca al CTSS1 de *Catsper3*, específicamente en la región -13..-7 (Figura 18A). Es importante mencionar que los 16 sitios mencionados se consideran como elementos de respuesta a cAMP (CRE). Por otro lado, se encontraron 3 sitios putativos de unión para los TF SOX5 y SOX9, denominados SOXA, SOXB y SOXC. El más cercano de estos sitios se encuentra ubicado en -322..-309 respecto al CTSS1 de *Catsper3* (Figura 18B) (Anexo 2) Finalmente, se encontraron algunos sitios de unión putativos para la familia de TF SP(1 y 3), RFX (1 y 7) y DMRT (4 y 1) (Anexo 3).

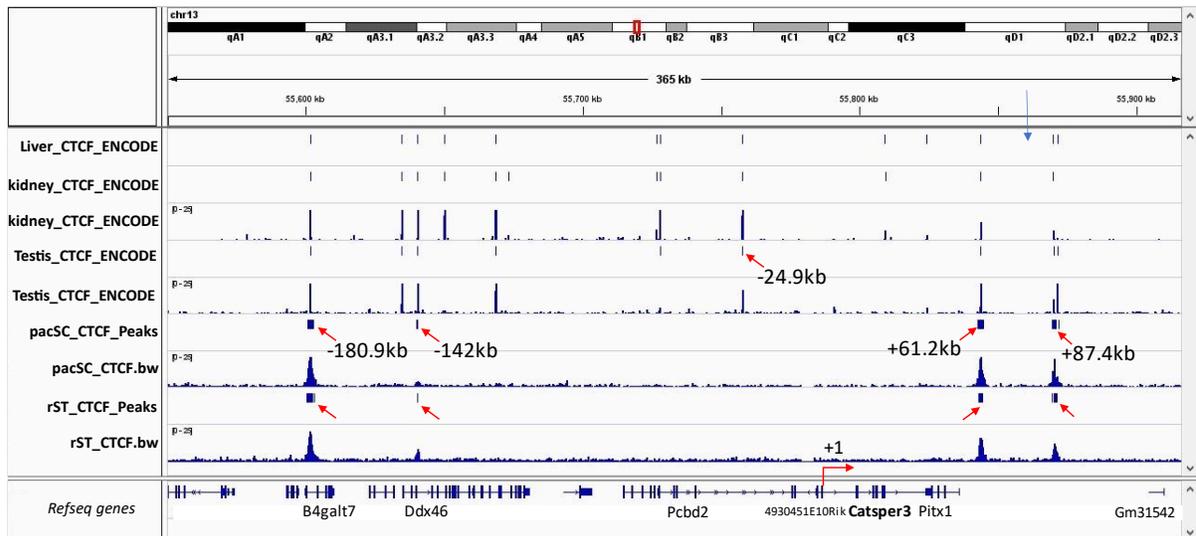


**Figura 18. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción para *Catsper3* murino.** Se muestran los sitios putativos de unión para los TF CREB, CREMt $\alpha$  (A) y SOX (B) predichos *in silico* dentro de la región -540..439 respecto al CTSS1 del gen *Catsper3* murino.

### 7.1.5 Análisis de datos de ChIP-seq para CTCF

Analizando los datos de ChIP-seq provenientes de testículos, espermátidas redondas (rST) y espermatoцитos en pachiteno (pacSC) no se encontró ningún pico que indique unión de CTCF cerca o dentro del gen *Catsper3*. Los picos más

próximos al gen *Catsper3* se encuentran a aproximadamente 24.9 kb río arriba y 61.2 kb río abajo respecto al inicio del gen en la muestra de testículo. En las muestras de pacSC y rST se encontró un pico a 142 kb río arriba y 61.2kb río abajo del gen *Catsper3*, traslapándose con el pico reportado en la muestra de testículo (Figura 19).

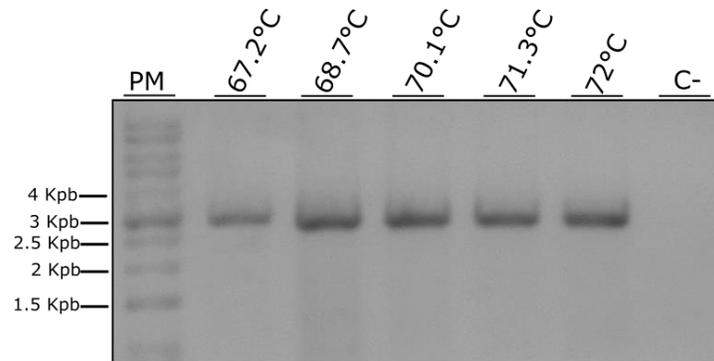


**Figura 19. Sitios de unión para CTCF en las inmediaciones de *Catsper3* murino.** Se muestran los picos (flecha roja) que representan los sitios de unión de CTCF en testículo (testis), espermatocitos paquitenos (pacSC) y espermatidas redondas (rST) de ratón. En la parte superior los picos que representan los sitios de unión de CTCF en hígado y riñón como control reportados por el proyecto ENCODE. El sitio +1 representa el inicio del gen *Catsper3* y los números la distancia respecto al inicio del gen. Los picos mostrados para pacSC y rST son resultado del análisis de datos RAW experimentales de ChIP-seq (Luo, Z. *et al.*, 2020 publicados en GEO bajo el número de serie GSE147536) con un q-value < 0.05 y visualizados con el software IGV.

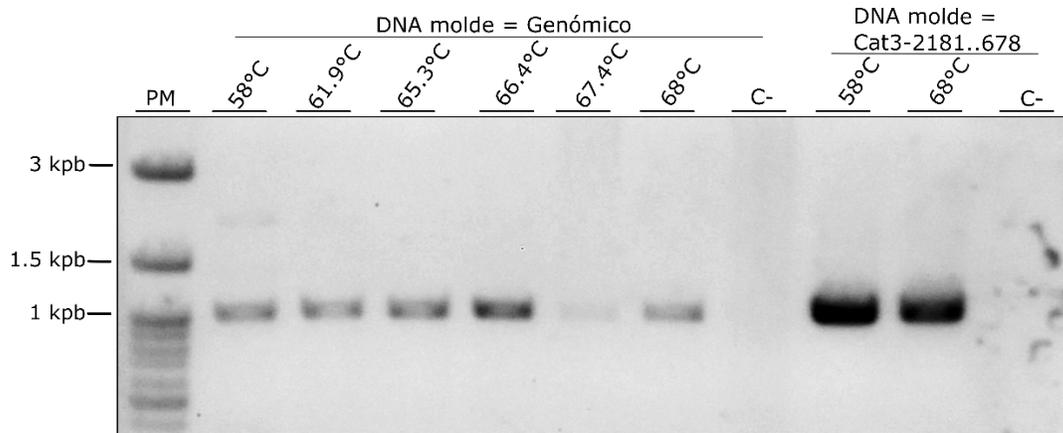
## 7.2 Clonación del promotor de *Catsper3*

Con el objetivo de generar una construcción que contenga los promotores putativos 1 y 2 predichos en genomatix, se amplificó la región correspondiente a -2181 a +678 (Cat3-2181..678) respecto al TSS del gen *Catsper3* murino mediante PCR de gradiente de temperatura utilizando los oligonucleótidos Cat3\_Fwd.-2181 y Cat3\_Rev.+678, usando como molde DNA genómico de ratón de la cepa C57BL/6 (Figura 20). El amplicón resultante y DNA genómico fueron utilizados como molde para amplificar la región correspondiente a -540 a +439 usando los oligonucleótidos

Cat3\_Fwd.-540 y Cat3\_Rev.+439, generando así el amplicón Cat3-540..439 (Figura 21).



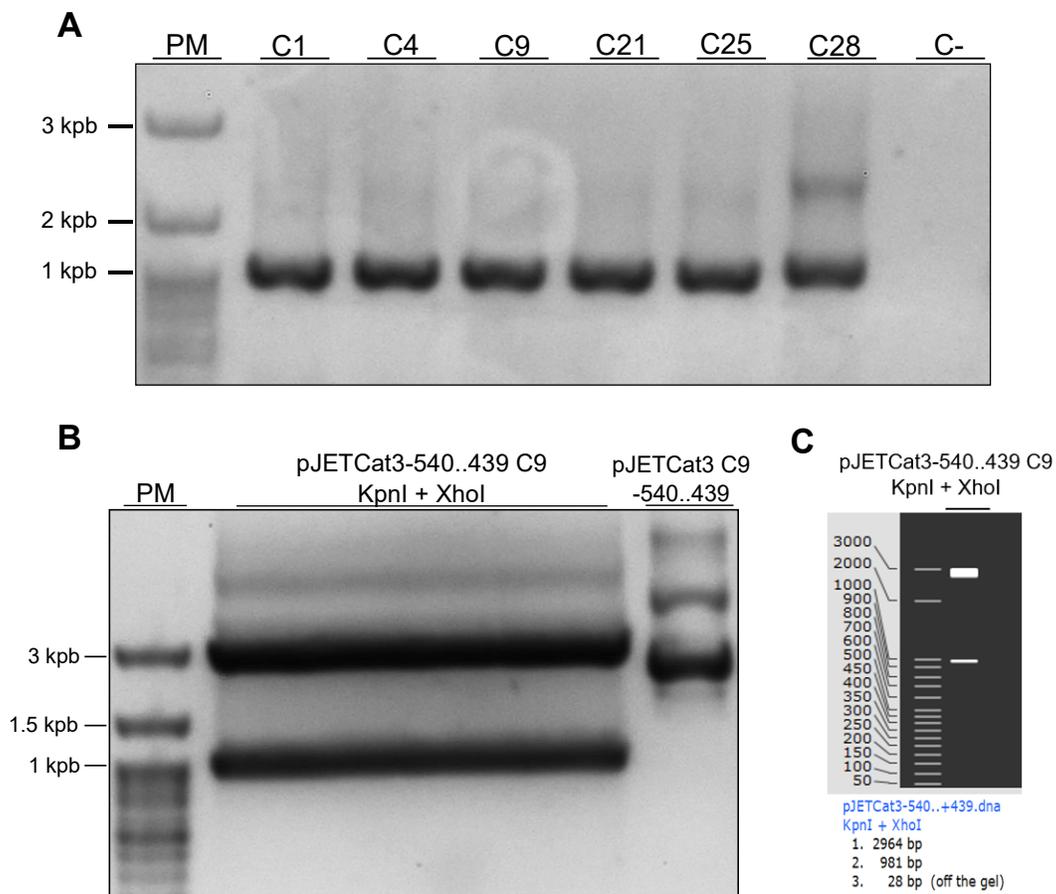
**Figura 20.- Amplificación de la región -2181 a +678 (Cat3-2181..678).** Se amplificó un fragmento de 2886 pb que contiene los promotores putativos y la isla CpG putativa mediante PCR en gradiente de temperatura a partir de DNA genómico. Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 21.- Amplificación de la región -540 a +439 (Cat3-540..439).** Se amplificó un fragmento de 1000 pb que contiene los promotores putativos 1 y 2 mediante PCR en gradiente de temperatura a partir de DNA genómico y Cat3-2181..678. Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente el amplicón Cat3-540..439 generado a partir de Cat3-2181..678 fue purificado y clonado en el vector de transición pJET1.2/blunt, generando la construcción pJETCat3-540..439. La construcción pJETCat3-540..439 se usó para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Las transformantes candidatas se analizaron por PCR de colonia usando los oligonucleótidos Cat3\_Fwd.-540 y Cat3\_Rev.+439 y las 6 candidatas resultaron positivas, generando un amplicón de

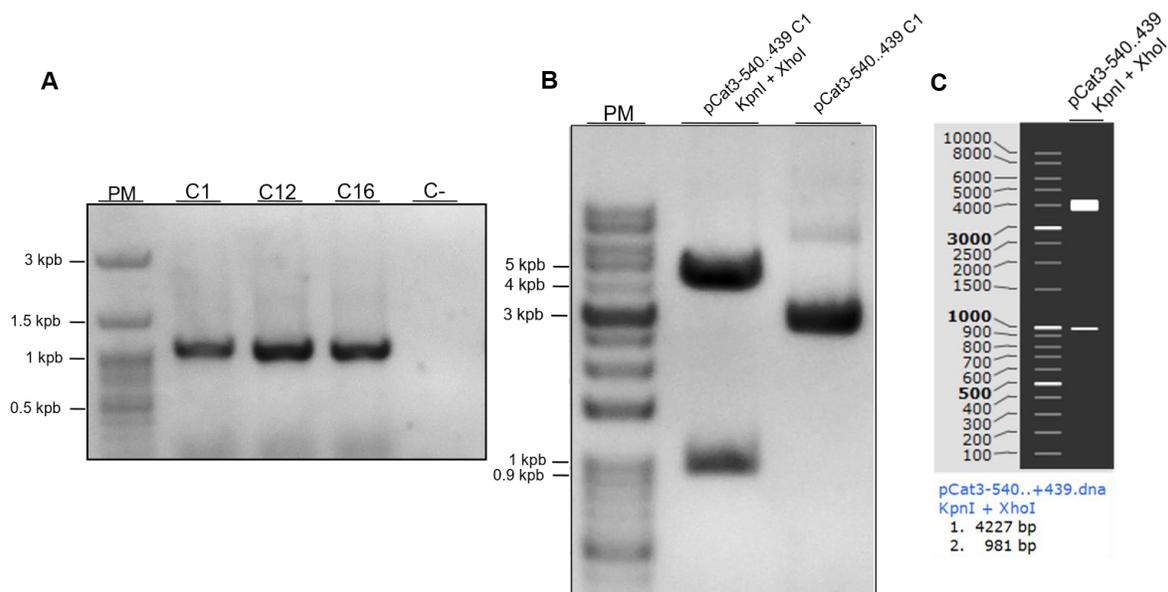
1 kpb (Figura 22A). En paralelo se realizó la transformación y selección de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes con el vector pGL4.10[luc2], que no tiene promotor y codifica el gen reportero de luciferasa (*Photinus pyralis*). A continuación se realizó la extracción de DNA plasmídico de las colonias candidatas 9 (C9) y 21 (C21) para pJETCat3-540..439 y de las colonias 1 y 2 para pGL4.10[luc2]. Para verificar la presencia del inserto se realizó una doble digestión de la candidata 9 (pJETCat3-540..439 C9) con las enzimas *KpnI* y *XhoI*, generando un fragmento de 2964 pb correspondiente al vector pJET1.2/blunt lineal y otro fragmento de 981 pb correspondiente al inserto Cat3-540..439 (Figura 22B), en concordancia con la restricción *in silico* de pJETCat3-540..439 utilizando las mismas enzimas (Figura 22C). Por otra parte, se realizó la doble restricción del vector pGL4.10 con *KpnI* y *XhoI* para prepararlo para la subclonación (Anexo 4).



**Figura 22.- Obtención de la construcción pJETCat3-540..439. A)** PCR de colonia de las candidatas C1, C4, C9, C21, C25 y C28 transformadas con la construcción pJETCat3-540..439 para determinar si contienen el fragmento esperado de 1000 pb. **B)** Análisis por

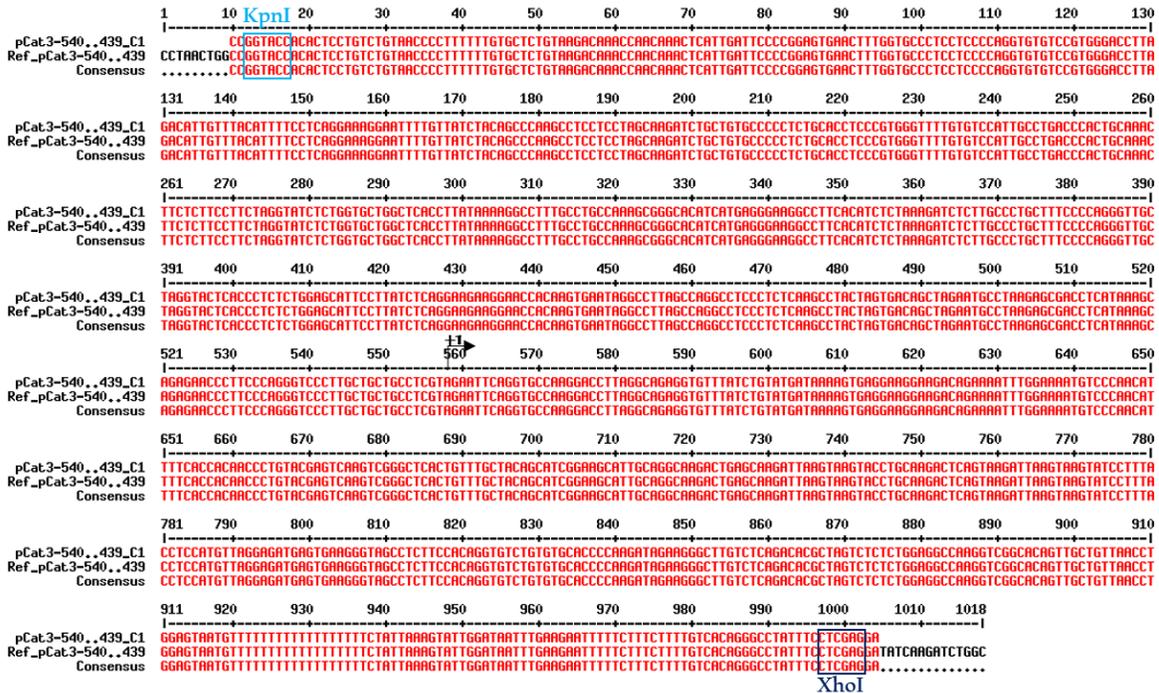
doble restricción enzimática de la colonia candidata 9 con *KpnI* y *XhoI* para verificar la liberación del fragmento de 981 pb correspondiente a Cat3-540..439. **C)** Análisis de restricción enzimática predictivo con *KpnI* y *XhoI* de la construcción pJETCat3-540..439 usando el software SnapGene. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

El inserto Cat3-540..439 liberado fue purificado y en seguida subclonado en el vector pGL4.10[luc2] mediante ligación de los extremos cohesivos generados por *KpnI* y *XhoI* en ambas secuencias de DNA, creando la construcción pCat3-540..439. La mezcla de ligación que contiene pCat3-540..439 se usó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes y las transformantes candidatas se analizaron por PCR de colonia usando los oligonucleótidos Cat3\_Fwd.-540 y Cat3\_Rev.+439, siendo positivas las candidatas C1, C12 y C16 (Figura 23A). Se seleccionó la colonia C1, se extrajo el DNA plasmídico y la presencia del inserto se verificó mediante su liberación al realizar la restricción con *KpnI* y *XhoI* (Figura 23B), cuyo tamaño corresponde a lo esperado según la restricción realizada *in silico* (Figura 23C).



**Figura 23.- Obtención de la construcción pCat3-540..439. A)** PCR de colonia de las candidatas C1, C12 y C16 transformadas con la construcción pCat3-540..439 para determinar si contienen el fragmento esperado de 1000 pb. **B)** Análisis por doble restricción enzimática de la colonia candidata 1 con *KpnI* y *XhoI* para verificar la liberación del fragmento de 981 pb correspondiente a Cat3-540..439. **C)** Análisis de restricción enzimática predictivo con *KpnI* y *XhoI* de la construcción pCat3-540..439 usando el software SnapGene. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

Con el objetivo de verificar la presencia de la región esperada y la integridad de la secuencia clonada, la región de interés del plásmido *pCat3-540..439 C1* fue secuenciada usando los oligonucleótidos RVprimer3 y Luc2Rev obteniendo un 100% de identidad con la secuencia anotada en el NCBI para la región de -540..439 respecto al TSS del gen *Catsper3* murino (Figura 24).



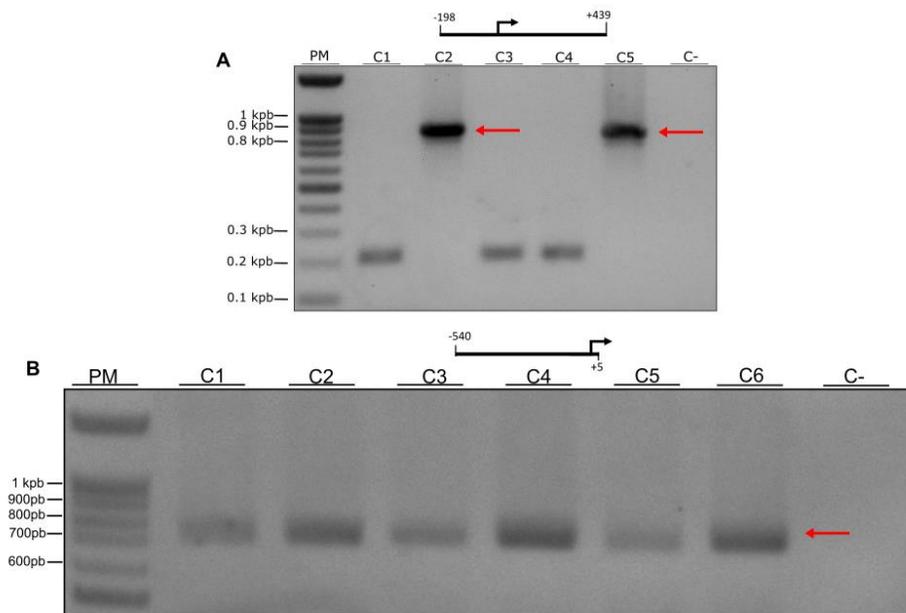
**Figura 24.- Secuenciación de pCat3-540..439.** Se realizó el análisis de las secuencias mediante secuenciación Sanger automática y posteriormente fueron alineadas contra la secuencia de referencia usando el programa MultiAlin.

Debido a que la presencia e integridad del inserto de interés en el vector reportero pGL4.10[luc2] fue confirmada mediante PCR, digestión enzimática y secuenciación automática Sanger, el plásmido *pCat3-540..439 C1* fue seleccionado para ser transfectado en la línea celular GC1-spg con el objetivo de verificar su actividad transcripcional.

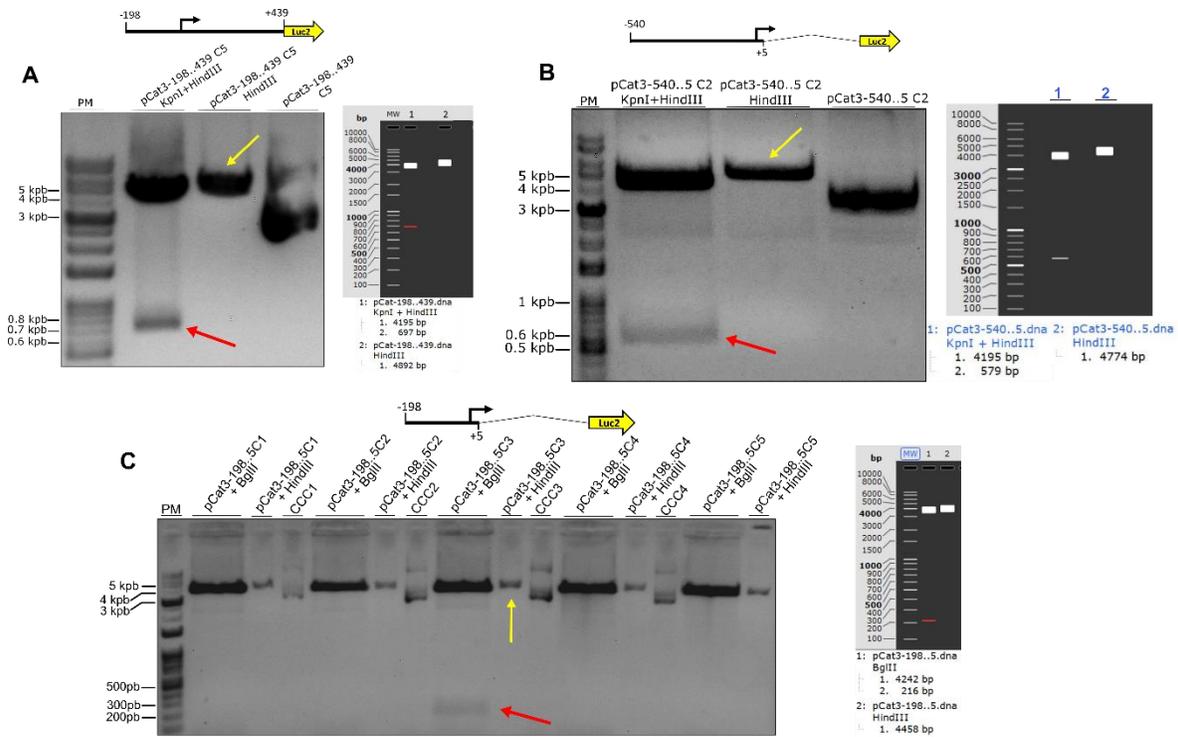
### 7.3 Delecciones de la región promotora de *Catsper3* murino

Con el objetivo de delimitar el promotor mínimo de *Catsper3* se realizó la delección de regiones específicas considerando la disponibilidad de sitios de restricción así como la presencia de sitios putativos de unión a los TF CREB, CREMt y SOX encontrados.

Se generaron tres construcciones en total: 1) pCat3-198..439 que contiene la región de -198 a + 439 respecto al TSS, 2) pCat3-540..5 que contiene la región de -540 a +5 respecto al TSS y, 3) pCat3-198..5 que contiene la región de -198 a +5 respecto al TSS de *Catsper3* murino. En todos los casos las deleciones se generaron mediante restricción enzimática (ver sección 6.7 para protocolo detallado) y posteriormente los plásmidos se usaron para transformar *E. coli* DH5alfa competentes. Las colonias candidatas resultantes se analizaron mediante PCR de colonia y se confirmó el tamaño esperado de los fragmentos de 864 pb y de 746 pb correspondientes a pCat3-198..439 (Figura 25A) y pCat3-540..5 (Figura 25B), respectivamente. Posteriormente, se realizó la extracción de plásmido de las colonias seleccionadas y se analizaron mediante restricción enzimática para verificar la liberación del fragmento del tamaño deseado de 697 pb, 597 pb y 216 pb correspondiente a pCat3-198..439 (Figura 26A), pCat3-540..5 (Figura 26B) y pCat3-198..5 (Figura 26C), respectivamente.



**Figura 25.- Selección de colonias candidatas con deleciones del promotor.** Todas las colonias candidatas transformadas con las construcciones pCat3-198..439 (A) y pCat3-540..5 (B) fueron analizadas mediante PCR de colonia usando los oligonucleótidos RVprimer3 y Luc2Rev dirigidos contra el plásmido pGL4.10[luc2]. La posición del fragmento del tamaño esperado para cada construcción se denota con una flecha color rojo. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%.



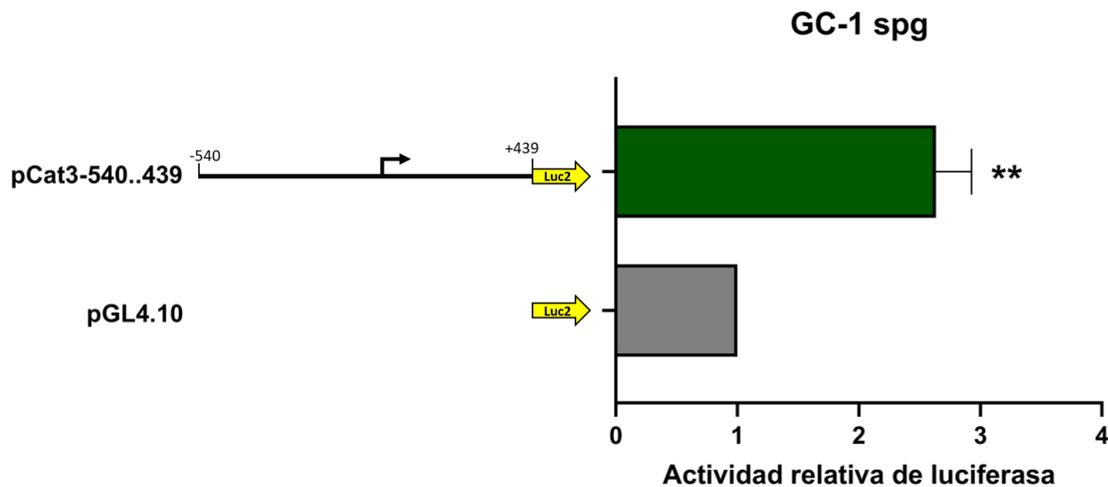
**Figura 26.- Confirmación de las colonias candidatas por restricción enzimática.** Todas las colonias candidatas seleccionadas fueron analizadas mediante restricción enzimática para linealizar el vector así como para liberar el inserto. **A)** Análisis de pCat3-198..439 colonia 5 por doble restricción enzimática con *KpnI* y *HindIII* para verificar la liberación del fragmento de 687 pb correspondiente a Cat3-198..439. Restricción única con *HindIII* para linealizar pCat3-198..439 y obteniendo el tamaño esperado de 4892 pb. **B)** Análisis de pCat3-540..5 colonia 2 por doble restricción enzimática con *KpnI* y *HindIII* para verificar la liberación del fragmento de 579 pb correspondiente a Cat3-540..5. Restricción única con *HindIII* para linealizar pCat3-540..5 y obteniendo el tamaño esperado de 4774 pb. **C)** Análisis de pCat3-198..5 colonias 1, 2, 3, 4 y 5 por restricción enzimática con *KpnI* para verificar la liberación del fragmento de 216 pb correspondiente a Cat3-198..5. Restricción única con *HindIII* para linealizar pCat3-198..5 y obteniendo el tamaño esperado de 4458 pb. El tercer carril de **A** y **B** así como los carriles denotados como CCC en **C** corresponden al plásmido sin digerir. La posición del fragmento del tamaño esperado para la construcción linealizada, así como del inserto liberado de cada construcción se denota con una flecha color amarilla y roja, respectivamente, correspondiendo con la restricción *in silico*. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%.

Finalmente, la integridad de la región de interés de cada una de las construcciones fue analizada mediante secuenciación automática Sanger, encontrando un 100% de identidad con la secuencia de referencia (Anexo 5). Inicialmente, la estrategia seguida debió generar una construcción que va de -540 a +6 y otra de -198 a +6. Sin embargo, la secuenciación Sanger reveló la eliminación inesperada del

nucleótido +6, por lo que las construcciones obtenidas contienen realmente la región de -540 a +5 y -198 a +5, es decir, pCat3-540..5 y pCat3-198..5, respectivamente.

#### 7.4 Actividad transcripcional del promotor de *Catsper3*

La construcción pCat3-540..439, que contiene el promotor predicho, fue transfectada en la línea celular GC-1 spg con el sistema de transfección K2 y su actividad se determinó mediante ensayos de luciferasa. La presencia de pCat3-540..439 resultó en una actividad de luciferasa de 2.6 veces la actividad del vector pGL4.10 vacío, es decir, un incremento real del 160% respecto al vector vacío (Figura 27). Debido al incremento significativo en la actividad transcripcional se sugiere que la región de -540 a +439 contiene el promotor del gen *Catsper3* murino.

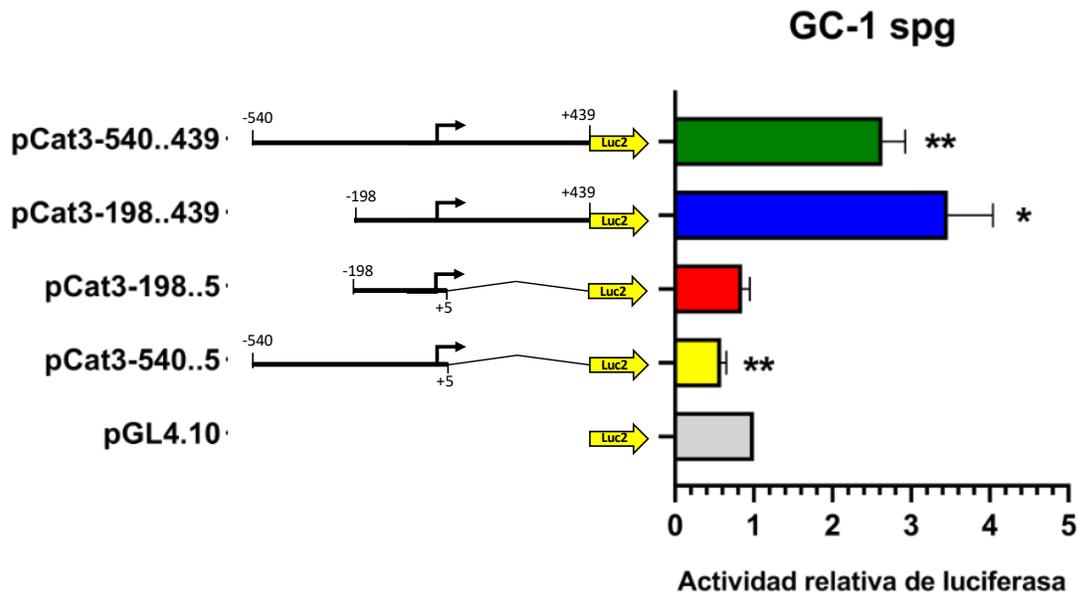


**Figura 27.- Determinación del promotor de *Catsper3* murino.** Las construcciones pCat3-540..439 (*Photinus pyralis*) y pRL-CMV (*Renilla reniformis*) fueron co-transfectadas en la línea celular GC-1 spg. Después de 48 h las células se lisaron y se analizó la actividad de luciferasa en un luminómetro. La actividad de *Photinus* se normalizó con las lecturas *Renilla* y la actividad del promotor de *Catsper3* se calculó como veces de incremento respecto de la actividad del vector pGL4.10 vacío la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos indican la media  $\pm$ SEM, n=3 y los asteriscos la diferencia significativa (\*\*p<0.01).

#### 7.5 Actividad de las deleciones en el promotor de *Catsper3*

Con el objetivo de determinar el promotor mínimo, las construcciones pCat3-198..439, pCat3-540..5 y pCat3-198..5 se transfectaron en la línea celular GC-1 spg y su actividad se determinó mediante ensayos de luciferasa (Figura 28).

Se observó que la delección de los nucleótidos -540 a -199 (pCat3-198..439) resultó en una actividad de luciferasa de 3.5 veces la actividad del vector vacío, es decir, un incremento real del 250%. Por otra parte, la delección de los nucleótidos +6 a +439 (pCat3-540..5) eliminó la actividad de luciferasa, teniendo una actividad de 0.58 (reducción del 42%) veces la actividad del vector vacío. Finalmente, la delección de los nucleótidos -540 a -199 y +6 a +439 (pCat3-198..5) también resultó en la eliminación de la actividad de luciferasa, siendo de 0.82 (reducción del 28%) veces la actividad del vector vacío. Estos datos indican que la región de -540 a -199 es una región de represión y que el extremo 3' del promotor de *Catsper3* es relevante para su actividad transcripcional.



**Figura 28.- Actividad de las delecciones del promotor de *Catsper3* murino.** Las construcciones pCat3-540..439 (*Photinus pyralis*) y pRL-CMV (*Renilla reniformis*) fueron co-transfectadas en la línea celular GC-1 spg. Después de 48h las células se lisaron y se analizó la actividad de luciferasa en un luminómetro. La actividad de *Photinus* se normalizó con las lecturas *Renilla* y la actividad del promotor de *Catsper3* se calculó como veces de incremento respecto de la actividad del vector pGL4.10 vacío la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes para pCat3-540..439 y pCat3-540..5, dos experimentos independientes para pCat3-198..439 y un experimento para pCat3-198..5, todos realizados por triplicado. Los datos indican la media  $\pm$ SEM, n=3 y los asteriscos la diferencia significativa (\*p<0.05 y \*\*p<0.01).

## 8. DISCUSIÓN

*Catsper3* pertenece a una de las cuatro subunidades alfa del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  CatSper, ubicado exclusivamente en la membrana de la pieza principal de la cola de los espermatozoides (Singh & Rajender, 2015). La disrupción de la actividad de este canal debido al knock out de *Catsper3* genera espermatozoides incapaces de llevar a cabo el proceso de hiperactivación, que en última instancia provoca un fenotipo infértil ya que los ratones *Catsper3* nulos son incapaces de generar camadas (Qi *et al.*, 2007). En humanos se han identificado mutaciones en las cuatro subunidades alfa de CatSper, incluyendo a *Catsper3*. Estas mutaciones solo estuvieron presentes en casos de hombres astenozoospermicos, es decir, que presentan una disminución en la motilidad de los espermatozoides. Su efecto putativo sobre la estructura proteica, su ubicación en dominios funcionales y su ausencia en los controles sugieren que estas mutaciones pueden ser causales en el fenotipo de astenozoospermia en humanos (Visser *et al.*, 2011). Además, Carkci y col. en 2017 observaron una disminución en la expresión génica de *Catsper3* en pacientes con astenozoospermia, teratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia comparados con el grupo control. Por lo que, además de astenozoospermia, la desregulación *Catsper3* puede estar asociada con los fenotipos de teratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia en humanos. A pesar de la relevancia del canal CatSper, poco se conoce sobre su regulación a nivel transcripcional, siendo este aspecto el principal tema de estudio de nuestro grupo de trabajo. Asimismo, nada se conoce sobre la regulación transcripcional de *Catsper3*, por lo que comenzar a identificar el promotor y secuencias reguladoras es el principal objetivo del presente trabajo.

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se realizó una predicción usando el software Genomatix que indicaba que el promotor de *Catsper3* murino se encontraba en la región de -513 a +424 respecto al TSS (Romero-Tlalolini, datos no publicados). Por esta razón, en el presente trabajo se realizó la amplificación y clonación de la región -540 a +439, encontrando que la región de -540 a +439 efectivamente contiene el promotor de *Catsper3* ya que la construcción pCat3-

540..430 genera un aumento significativo en la actividad de luciferasa respecto al vector pGL4.10[luc2] vacío (2.6 veces la actividad de pGL4.10[luc2]).

La proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) y el modulador del elemento de respuesta a cAMP (CREM) son factores de transcripción que regulan la actividad transcripcional en respuestas a señales metabólicas, de estrés y de desarrollo a través de la unión a sus elementos de respuesta en el DNA (CRE) (Martianov *et al.*, 2010). A través del tiempo, se ha establecido que la vía de transducción de señales dependiente de cAMP es un mecanismo de regulación relevante en diferentes etapas de la espermatogénesis, vía en la que participan los TF CREB y CREM, que además han mostrado tener funciones sobre la espermatogénesis (Don & Stelzer., 2002). Dentro del promotor de *Catsper3* se encontraron 16 sitios putativos CRE de los cuales 13 son considerados de unión a CREB y 3 a CREM. Diez de estos sitios se encuentran río abajo y seis río arriba respecto al TSS. Anteriormente, se había descrito que la mayoría de los sitios CRE funcionales se encuentran de 50 a 250 pb del TSS (Sassone-Corsi, 1995), sin embargo, mediante ensayos de ChiP-seq se ha observado que la mayoría de los sitios de unión para CREB y CREM se agrupan preferencialmente a aproximadamente 150 nucleótidos alrededor del TSS en la línea celular GC-1 spg y en espermátidas redondas de ratón (Martianov *et al.*, 2010). De los sitios CRE predichos en el promotor de *Catsper3*, nueve se encuentran a una distancia menor de 150 pb alrededor del TSS por lo que alguno de estos sitios puede ser funcional para la actividad del promotor, no obstante, esto necesitaría ser demostrado mediante la delección y mutación de estos sitios como se ha hecho para dos CRE encontrados dentro del promotor de *CATSPER1* (Oviedo *et al.*, 2018).

De igual forma, en la región 5' del promotor de *Catsper3* murino se encontraron tres sitios putativos de unión para los TF SOX, específicamente Sox5 y Sox9. Los TF SOX activan o reprimen la expresión génica a través de interacciones específicas con uno o más factores asociados y estableciendo contactos con la maquinaria transcripcional basal (Kamachi *et al.*, 2000). Los TF SOX se pueden expresar diferencialmente en los testículos y se ha demostrado que Sox4, Sox8, Sox9 y

Sox12 están altamente expresados en células de Sertoli, los TF Sox3, Sox4, Sox12, Sox13 y Sox18 en espermatogonias, que Sox5, Sox6 y que Sox30 se expresan típicamente en espermatocitos y espermátidas (Roumaud *et al.*, 2018) mientras que en la línea celular GC-1 spg solo se ha estudiado y probado la presencia de Sox5 (Mata-Rocha *et al.*, 2014). El promotor de *Catsper1* murino contiene tres sitios de unión a Sox funcionales pues se ha observado que los TF Sox5 y Sox9 causan un aumento significativo en la transactivación del promotor, además su interacción *in vivo* con el promotor *Catsper1* se demostró mediante ChIP (Mata-Rocha *et al.*, 2014). Acorde a estos datos, es interesante observar que el promotor *Catsper3* también contenga 3 sitios putativos de unión para los factores SOX pero su funcionalidad debería ser confirmada mediante los métodos usados por Mata-Rocha y colaboradores.

La unión del TF CTCF (Factor de Unión a CCCT) al DNA contribuye a la formación de loops de DNA tridimensionales generando interacciones de cromatina de largo alcance que regulan diversos procesos nucleares, incluyendo la regulación transcripcional por interacción directa con la RNAPolIII y mediando interacciones promotor-promotor y potenciador-promotor, entre otros (Chernukhin *et al.*, 2007; Ong & Corces, 2014). Interesantemente, CTCF contribuye de manera crítica al proceso de espermiogénesis asociado con la regulación negativa de la expresión de genes asociados a la espermiogénesis en ratones *Ctcf*-cKO, entre los que se encuentra *Catsper3* con una reducción significativa de 3 veces en sus niveles de mRNA (Hernández-Hernández *et al.*, 2016). Apoyando estos datos, se ha observado que CTCF se une a promotores de genes expresados activamente en espermátidas redondas con un fenotipo canceroso, sugiriendo igualmente que CTCF contribuye a la expresión génica en estas células (Pugacheva, E. *et al.*, 2015). A pesar de que no se encontró ningún sitio de unión putativo para CTCF dentro del promotor de *Catsper3* mediante el análisis *in silico*, la reducción en su expresión en ratones *Ctcf*-cKO implica que de alguna manera CTCF está regulando positivamente la expresión de *Catsper3* en espermátidas redondas. Para verificar si CTCF regula la actividad de *Catsper3* mediante la unión directa a su promotor o a alguna región intragénica se analizaron datos crudos de ChIP-seq para CTCF de

espermatoцитos y espermátidas redondas (Luo, Z. *et al.*, 2020) y se compararon con datos procesados en el proyecto ENCODE para testículo completo, hígado y riñón. Según el análisis, CTCF no se une al promotor y tampoco a regiones intragénicas de *Catsper3* en espermatoцитos, espermátidas redondas y en testículo completo. Sin embargo, en hígado y riñón se une al principio del intrón 8 y al exón 9. En espermatoцитos y espermátidas, el pico de unión de CTCF más cercano es de 142 kb río arriba (tercer intrón de *Ddx46*) y 61.2kb río abajo (entre *Pitx1* y *H2afy*) del inicio de *Catsper3* mientras que en testículo se encuentra a 24.9kb río arriba y 61.2kb río abajo, unión que se encuentra conservada en hígado y riñón en donde además se encuentran múltiples sitios de unión que no están presentes en espermatoцитos y espermátidas redondas (región que comprende 142 kb río arriba y 61.2kb río debajo de *Catsper3*). Por esta razón podemos decir que CTCF no regula la expresión de *Catsper3* mediante la unión directa con su promotor sino indirectamente, posiblemente mediante la desregulación de TF que regulan *Catsper3* o quizá mediante la formación de loops de largo alcance en espermatoцитos y espermátidas en lugar de interacciones cortas como podría ser el caso de hígado y riñón.

La predicción de elementos característicos de un promotor mínimo mostró la presencia de varios de estos elementos en la región de -350 a +150 respecto al p1@*Catsper3* (CTSS1). Debido a su posición, es probable que la regulación transcripcional del p1@*Catsper3*, el principal pico de inicio transcripcional, sea independiente de caja TATA al igual que en los promotores de *Catsper1* (Mata-Rocha *et al.*) y *Catsper2* (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018). Sin embargo, la presencia de las cajas CCAAT y GC podrían sustituir su función como se ha demostrado en los promotores de los genes *Mipu1* (Ben-Lv *et al.*, 2009) y DHFR (Blake *et al.*, 1990). Por otro lado, la secuencia INR1 abarca el p2@*Catsper3* (CTSS2) y se encuentra rodeado por la caja TATA3 y el DPE1 a una distancia posiblemente funcional por lo que la transcripción a partir de esta posición podría ser mediada por estos tres elementos, pero esto debería demostrarse mediante la mutación de estos sitios. Aparentemente no hay más elementos en posiciones adecuadas para iniciar la transcripción a partir de p3@*Catsper3*. De manera

interesante, las secuencia INR(-) y TATA3 coincide con la posición de un TSS para el lncRNA de función desconocida 4930451E10Rik (p2@4930451E10Rik). Considerando que su transcrito se genera a partir de la cadena complementaria dentro el promotor de *Catsper3*, es posible que se trate de un promotor divergente y de transcribirse en la línea celular GC-1 spg este pueda regular indirectamente la actividad observada del promotor de *Catsper3*. Este fenómeno se presenta en el promotor de *Catsper1*, considerado como un promotor divergente ya que tiene actividad en antisentido y genera el lncRNA *Catsper1au* (Jiménez-Badillo *et al.*, 2017). Asimismo, el promotor de *Catsper2* clonado en antisentido también presenta actividad transcripcional, aunque esta podría atribuirse a la presencia en la cadena antisentido del gen *Pdia3* dentro de esta región o bien tratarse de un promotor divergente (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018). De cualquier forma, la función de 4930451E10Rik y si desempeña algún papel sobre la expresión *Catsper3* *in vivo* o *in vitro* aún se desconocen.

Un promotor mínimo frecuentemente comprende un segmento de DNA de 50 a 100 pb alrededor del TSS (Danino, *et al.*, 2015; Roy & Singer, 2015). Además, la actividad puede ser afectada considerablemente por el promotor proximal presente normalmente río arriba del promotor mínimo, así como las secuencias de activación o represión que contenga (Harbele & Stark, 2018). Al realizar deleciones del promotor de *Catsper3* se encontró que la deleción de los nucleótidos -540 a -199 genera un aumento en la actividad de luciferasa respecto al promotor completo (pCat3-540..439), lo que sugiere que esta es una región de represión de la actividad transcripcional del promotor proximal. Dentro de esta región se encuentran los 3 sitios predichos para los TF SOX, un sitio CRE, una caja GC y una caja CCAAT, por lo tanto, es probable que alguno de estos sitios sea funcional sobre la regulación transcripcional de *Catsper3*.

Por otra parte, la eliminación de los nucleótidos +6 a +439 (pCat3-540..5) genera el abatimiento de la actividad transcripcional, observando incluso una disminución significativa respecto al vector vacío. Además, al combinar la eliminación de los nucleótidos -540 a -199 con los nucleótidos +6 a +439 (pCat3-198..5), el abatimiento

de la actividad se mantiene pero regresa a niveles comparables con el vector vacío, indicando nuevamente que el segmento de -540 a -199 es una región de represión. No obstante, esta última conclusión solo debe tomarse como apoyo de los resultados obtenidos para pCat3-198..439 ya que solo se realizó una réplica biológica para pCat3-198..5. Está claro que el extremo 3' del promotor de *Catsper3* es indispensable para su actividad, sin embargo, el mínimo de nucleótidos hacia el extremo 3' necesario para dirigir la transcripción eficientemente aún no se ha determinado. Dentro de la región 3' eliminada se encuentran 10 de los 16 sitios CRE predichos y de los cuales 4 (CREBA, CREBB, CREBE y CREMO) se encuentran antes del nucleótido +150 por lo que estos sitios tienen un gran potencial de regulación y podrían ser causales del abatimiento de la actividad promotora. No obstante, también se encuentra el elemento de respuesta al factor general TFIIA y un elemento promotor río abajo (DPE1) por lo que es posible que el abatimiento de la actividad transcripcional sea resultado de la eliminación de los nucleótidos necesarios para el ensamblaje de la maquinaria transcripcional basal alrededor TSS y no directamente a la eliminación de los sitios CRE putativos. Con los datos obtenidos actualmente solo se puede sugerir que el promotor mínimo de *Catsper3* podría encontrarse dentro de la región de -198 a +439 respecto TSS (p1@Catsper3), sin embargo, considerando la posición del elemento de respuesta a TFIIA y el DPE1, la presencia de un pico de inicio transcripcional alterno (p3@Catsper3), así como el tamaño de los promotores mínimos descritos para *Catsper1* (Mata-Rocha *et al.*, 2014) y *Catsper2* (Contreras-Marciales, tesis de maestría, 2018), hace necesario evaluar otra construcción que contenga al menos 100 nucleótidos del extremo 3' y determinar su actividad para delimitar el promotor mínimo de *Catsper3* murino.

Aunque la línea celular empleada GC-spg1, que corresponde a espermatogonia de ratón, puede no ser la adecuada dado que en esta etapa de la espermatogénesis no se expresa *Catsper3*, ha permitido el análisis de los promotores *Catsper 1* y *2* y al menos con *Catsper1* los resultados obtenidos han sido validados en la línea de células de Sertoli MSC-1 e inclusive *in vivo* mediante transfección de testículos en el modelo murino.

Finalmente, los resultados del presente proyecto contribuyen a la caracterización de la región promotora de *Catsper3* murino, la cual previamente no se había identificado, así como regiones y posibles factores en trans que regulan su actividad. Sin embargo, futuros experimentos son necesarios para caracterizar formalmente el promotor de *Catsper3*.

## 9. CONCLUSIONES

- I. El promotor de *Catsper3* murino se encuentra en la región -540 a +439 respecto al sitio de inicio transcripcional reportado.
- II. La región de -540 a -199 es una región de represión del promotor de *Catsper3* murino, posiblemente regulada por los factores de transcripción Sox o Creb.
- III. El promotor mínimo de *Catsper3* podría encontrarse dentro de la región -198 a +439 respecto al sitio de inicio transcripcional reportado.

## 10. PERSPECTIVAS

Reducir el tamaño de las construcciones generadas mediante deleciones para identificar con precisión la región correspondiente al promotor mínimo de *Catsper3* murino.

Analizar la actividad transcripcional de las construcciones con el promotor de *Catsper3* en la línea de células de Sertoli MSC.

Determinar la operatividad y efecto sobre la actividad del promotor de *Catsper3* murino de los sitios de unión predichos para los TF SOX, los sitios CRE y los elementos de promotor basal mediante mutagénesis dirigida, sobreexpresión y/o silenciamiento.

Realizar mutaciones de los sitios de unión predichos para los TF SOX, los sitios CRE y los elementos de promotor basal mediante mutagénesis dirigida para determinar su operatividad y efecto sobre la actividad del promotor de *Catsper3* murino.

Determinar la operatividad y rol de la isla CpG predicha de 343 pb sobre la expresión de *Catsper3* murino mediante ensayos de metilación *in vitro* y conversión por bisulfito acoplado a secuenciación.

Identificar las interacciones proteína-DNA de los factores predichos en el promotor de *Catsper3* murino *in vitro* mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) e *in vivo* mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Andersson, R., & Sandelin, A. (2020). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature reviews. Genetics*, 21(2), 71–87. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0173-8>

Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W., & Azizkhan, J. C. (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Molecular and cellular biology*, 10(12), 6632–6641. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.12.6632-6641.1990>

Brown, S. G., Publicover, S. J., Barratt, C., & Martins da Silva, S. J. (2019). Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Human reproduction update*, 25(6), 758–776. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz032>

Carkci, S., Etem, E. O., Ozaydin, S., Karakeci, A., Tektemur, A., Ozan, T., & Orhan, I. (2017). Ion channel gene expressions in infertile men: A case-control study. *International journal of reproductive biomedicine (Yazd, Iran)*, 15(12), 749–756.

Cheng, C. (2019). *Spermatogenesis*. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9780429488634>

Chernukhin, I., Shamsuddin, S., Kang, S. Y., Bergström, R., Kwon, Y. W., Yu, W., Whitehead, J., Mukhopadhyay, R., Docquier, F., Farrar, D., Morrison, I., Vigneron, M., Wu, S. Y., Chiang, C. M., Loukinov, D., Lobanenko, V., Ohlsson, R., & Klenova, E. (2007). CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Molecular and cellular biology*, 27(5), 1631–1648. <https://doi.org/10.1128/MCB.01993-06>

Chung, J. J., Miki, K., Kim, D., Shim, S. H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., Cai, X., Iseri, Y., Zhuang, X., & Clapham, D. E. (2017). CatSper $\zeta$  regulates the structural continuity of sperm Ca<sup>2+</sup> signaling domains and is required for normal fertility. *eLife*, 6, e23082. <https://doi.org/10.7554/eLife.23082>

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. *Nature communications*, 2, 153. <https://doi.org/10.1038/ncomms1153>

Correia, J., Michelangeli, F., & Publicover, S. (2015). Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm. *Reproduction (Cambridge, England)*, 150(2), R65–R76. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0102>

Danino, Y. M., Even, D., Ideses, D., & Juven-Gershon, T. (2015). The core promoter: At the heart of gene expression. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(8), 1116–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.04.003>

Don, J. & Stelzer, G. (2002). The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(2), 115-124. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00696-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00696-7)

Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. (2018). *Developmental biology* (11th ed.). Oxford: Oxford University Press.

Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>

Hernández-Hernández, A., Lilienthal, I., Fukuda, N., Galjart, N., & Höög, C. (2016). CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility. *Scientific reports*, 6, 28355. <https://doi.org/10.1038/srep28355>

Holt, W., & Morrell, J. (2013). Sperm biology and maturation. In K. Coward & D. Wells (Eds.), *Textbook of Clinical Embryology* (pp. 89-97). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139192736.012

Hwang, J. Y., Mannowetz, N., Zhang, Y., Everley, R. A., Gygi, S. P., Bewersdorf, J., Lishko, P. V., & Chung, J. J. (2019). Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell*, 177(6), 1480–1494.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.047>

Jiménez-Badillo, S. E., Oviedo, N., Hernández-Guzmán, C., González-Mariscal, L., & Hernández-Sánchez, J. (2017). Catsper1 promoter is bidirectional and regulates the expression of a novel lncRNA. *Scientific reports*, 7(1), 13351. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13867-2>

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. *Biology of reproduction*, 73(6), 1235–1242. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045468>

Juven-Gershon, T., & Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental biology*, 339(2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>

Kamachi, Y., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG*, 16(4), 182–187. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01955-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01955-1)

Kim, C. W., Tak, H. M., Kim, G. T., Mun, Y. J., Jeon, B. T., Kim, H. J., Roh, G. S., Han, J., & Kang, D. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced up-regulation of CatSper3 in mouse brain. *Molecular reproduction and development*, 77(8), 650. <https://doi.org/10.1002/mrd.21216>

Lehti, M. S., & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of reproduction*, 97(4), 522–536. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox096>

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. *Molecular human reproduction*, 13(5), 299–306. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam009>

Liu, J., Xia, J., Cho, K. H., Clapham, D. E., & Ren, D. (2007). CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *The Journal of biological chemistry*, 282(26), 18945–18952. <https://doi.org/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. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 53. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-53>

Luo, Z., Wang, X., Jiang, H., Wang, R., Chen, J., Chen, Y., Xu, Q., Cao, J., Gong, X., Wu, J., Yang, Y., Li, W., Han, C., Cheng, C. Y., Rosenfeld, M. G., Sun, F., & Song, X. (2020). Reorganized 3D Genome Structures Support Transcriptional Regulation in Mouse Spermatogenesis. *iScience*, 23(4), 101034. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101034>

Lv, B., Tang, Y., Li, X., Wang, G., Yuan, C., Liu, Y., Jiang, L., & Xiao, X. (2009). Identification and characterization of the minimal promoter of Mipu1: the role of GC boxes in the regulation of basal transcription. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 41(4), 309–315. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp019>

Majewska, M., Wysokińska, H., Kuźma, Ł., & Szymczyk, P. (2018). Eukaryotic and prokaryotic promoter databases as valuable tools in exploring the regulation of gene transcription: a comprehensive overview. *Gene*, 644, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.079>

Martianov, I., Choukrallah, MA., Krebs, A., Ye, T., Legras, S., Rijkers, E., Van Ijcken, W., Jost, B., Sassone-Corsi, P. & Davidson, I. (2010). Cell-specific occupancy of an extended repertoire of CREM and CREB binding loci in male germ cells. *BMC Genomics*, 11:530. DOI: 10.1186/1471-2164-11-530

Mata-Rocha, M., Alvarado-Cuevas, E., Hernández-Sánchez, J., Cerecedo, D., Felix, R., Hernández-Reyes, A., Tesoro-Cruz, E., & Oviedo, N. (2013). Molecular cloning and analysis of the Catsper1 gene promoter. *Molecular human reproduction*, 19(5), 336–347. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat003>

Mata-Rocha, M., Hernández-Sánchez, J., Guarneros, G., de la Chesnaye, E., Sánchez-Tusié, A. A., Treviño, C. L., Felix, R., & Oviedo, N. (2014). The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS letters*, 588(18), 3352–3360. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.07.024>

Olivares, A., Hernández-Reyes, A., Felix, R., Forero, Á., Mata-Rocha, M., Hernández-Sánchez, J., Santos, I., Aguirre-Alvarado, C., & Oviedo, N. (2018). Regulation of CATSPER1 expression by the testis-determining gene SRY. *PloS one*, 13(10), e0205744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205744>

Ong, C. T., & Corces, V. G. (2014). CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nature reviews. Genetics*, 15(4), 234–246. <https://doi.org/10.1038/nrg3663>

Oviedo, N., Ortiz-Borrayo, L., Hernández-Sánchez, J., Jiménez-Badillo, S. E., Tesoro-Cruz, E., Moreno-Navor, E., Aguirre-Alvarado, C., & Bekker-Méndez, V. C. (2018). Human CATSPER1 Promoter Is Regulated by CREB1 and CREM $\tau$  Transcriptional Factors In Vitro. *Archives of medical research*, 49(3), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.06.004>

Pugacheva, E. M., Rivero-Hinojosa, S., Espinoza, C. A., Méndez-Catalá, C. F., Kang, S., Suzuki, T., Kosaka-Suzuki, N., Robinson, S., Nagarajan, V., Ye, Z., Boukaba, A., Rasko, J. E., Strunnikov, A. V., Loukinov, D., Ren, B., & Lobanenkov, V. V. (2015). Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions. *Genome biology*, 16(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0736-8>

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1219–1223. <https://doi.org/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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12527–12531. <https://doi.org/10.1073/pnas.221454998>

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. <https://doi.org/10.1038/35098027>

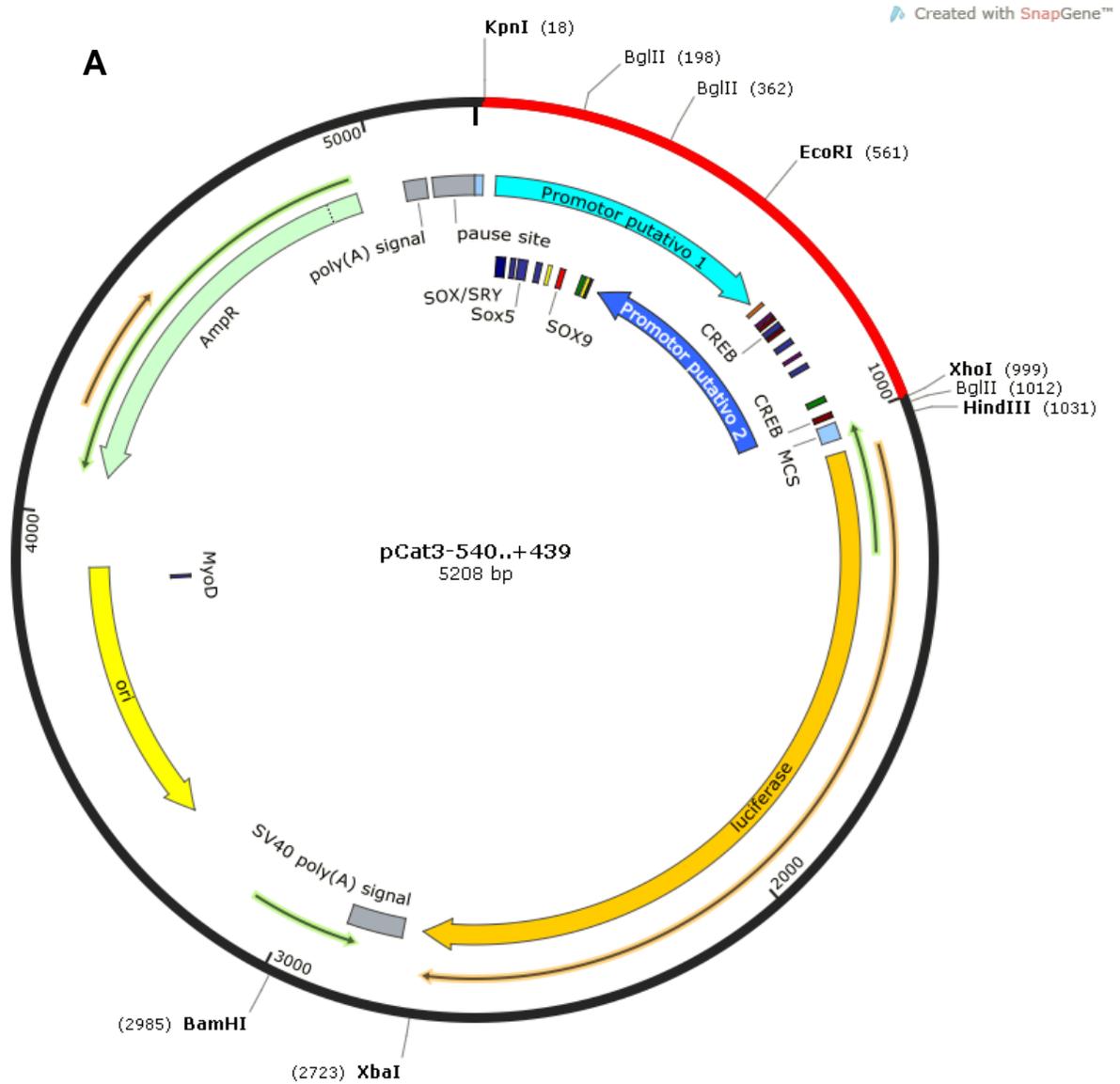
Roumaud, P., Haché, J., & Martin, L. J. (2018). Expression profiles of Sox transcription factors within the postnatal rodent testes. *Molecular and cellular biochemistry*, 447(1-2), 175–187. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3302-3>

Roy, A. L., & Singer, D. S. (2015). Core promoters in transcription: old problem, new insights. *Trends in biochemical sciences*, 40(3), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.01.007>

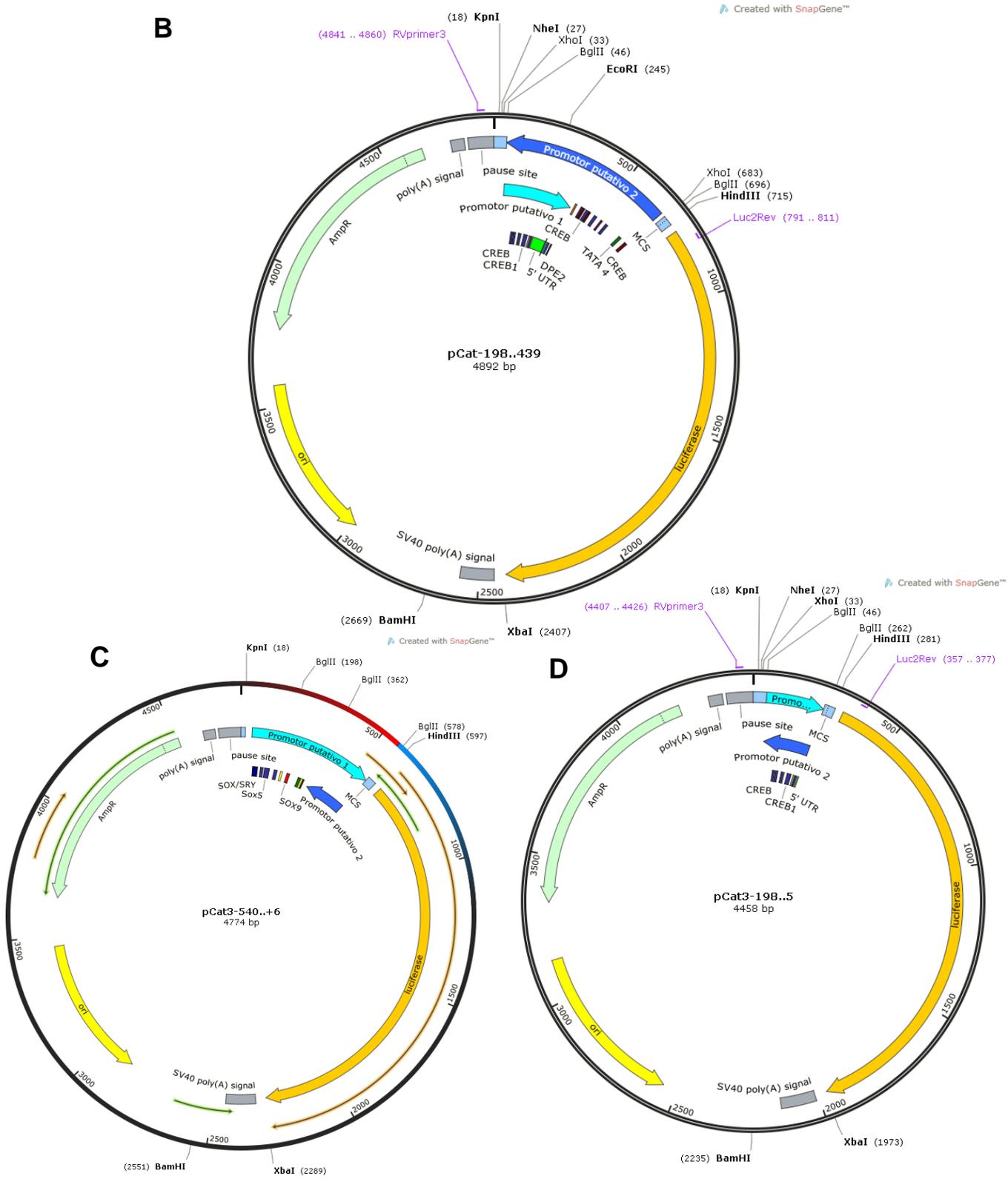
Sassone-Corsi P. (1995). Transcription factors responsive to cAMP. *Annual review of cell and developmental biology*, 11, 355–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002035>

- Singh, A. P., & Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive biomedicine online*, 30(1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.014>
- Smale, S. T., & Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry*, 72, 449–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>
- Song, C., Gao, B., Wu, H., Xie, Y., Wang, X., Li, B., Chen, G., & Mao, J. (2011). Molecular cloning, spatial and temporal expression analysis of CatSper genes in the Chinese Meishan pigs. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 9, 132. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-132>
- 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. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0281-2>
- Visser, L., Westerveld, G. H., Xie, F., van Daalen, S. K., van der Veen, F., Lombardi, M. P., & Repping, S. (2011). A comprehensive gene mutation screen in men with asthenozoospermia. *Fertility and sterility*, 95(3), 1020–4.e49. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.067>
- Vo Ngoc, L., Kassavetis, G. A., & Kadonaga, J. T. (2019). The RNA Polymerase II Core Promoter in *Drosophila*. *Genetics*, 212(1), 13–24. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302021>
- Vo Ngoc, L., Wang, Y. L., Kassavetis, G. A., & Kadonaga, J. T. (2017). The punctilious RNA polymerase II core promoter. *Genes & development*, 31(13), 1289–1301. <https://doi.org/10.1101/gad.303149.117>
- Wang, H., Liu, J., Cho, K. H., & Ren, D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biology of reproduction*, 81(3), 539–544. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077107>
- Zhang, D., & Gopalakrishnan, M. (2005). Sperm ion channels: molecular targets for the next generation of contraceptive medicines?. *Journal of andrology*, 26(6), 643–653. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05009>

## 12. ANEXOS



**Anexo 1. Mapa de las construcciones generadas en el vector pGL4.10[Luc2]. A) pCat3-540..439. B) pCat3-198..439. C) pCat3-540..5 y D) pCat3-198..5.**



Anexo 1 (continuación). Mapa de las construcciones generadas en el vector pGL4.10[Luc2]. A) pCat3-540..439. B) pCat3-198..439. C) pCat3-540..5 y D) pCat3-198..5.

-540 ACACTCCTGTCTGTAACCCCTTTTTTGTGCTCTGTAAGACAAACCAACAAACTC**ATTGATT**CCCCGGAGT  
Sox5/9-C

-470 GAACTTTGGTGCCCTCCTCCCCAGGTGTGTCCGTGGGACCTTAGAC**ATTGTT**TACATTTTCCTCAGGAAA  
Sox5/9-B

-400 GGAATTTTGTATCTACAGCCCAAGCCTCCTCCTAGCAAGATCTGCTGTGCCCCCTCTGCACCTCCCGTG  
CREM-P

-330 GGTTTTGTGTCC**ATTGC**CTGACCCACTGCAAACCTTCTTTCCTTCTAGGTATCTCTGGTGCTGGCTCACC  
Sox5/9-A

-260 TTATAAAAGGCCCTTTCCTGCCAAAGCGGGCACATCATGAGGGAAGGCCTTACATCTCTAAAGATCTCT

-190 TGCCCTGCTTTCCCCAGGGTTGCTAGGTACTCACCTCTCTGGAGCATTCCTTAT**CTCA**GGGAAGAAGGAA  
CREB-G

-120 CCACAAG**TGAAT**AGGCCTTAGCCAGGCCTCCCT**CTCA**AGCCTACTAGTGACAGCTAGAATGCCTAAGAGC  
CREB-F CREB-D +1  
→

-50 GACCT**CAT**AAAGCAGAGAACCCTTCCCAGGGTCCCTTGCTGCTGCCTCGT**AGAATTCA**GGTGCCAAGGAC +20  
CREB-C CREM-N CREB-A

CTTAGGCAGAGGTGTTTATCTGTAT**GATA**AAAAGTGAGGAAGGAAGACAGAAAATTTGGAAAATGTCCCAA +90  
CREB-B

CATTT**TCA**CCACAACCCTGTACGAGTCAAGTCGGGCTCACTGTTTGCTACAGCATCGGAAGCATTGCAGG +160  
CREB-E CREM-O

CAAGACTGAGCAAGATTAAGTAAGTACCTGCAAG**ACTCA**GTAAGATTAAGTAAGTATCCTTTACCTCCAT +230  
CREB-H CREB-I CREB-J

GTTAGGAGAT**GAGT**GAAGGGTAGCCTCTTCCACAGGTGTCTGTGTGCACCCCAAGATAGAAGGGCTT**GTC** +300  
CREB-K

TC**AGACA**CGCTAGTCTCTCTGGAGGCCAAGGTCGGCACAGTTGCTGTTAACCTGGAGTAATGTTTTTTTTT +370  
CREB-L

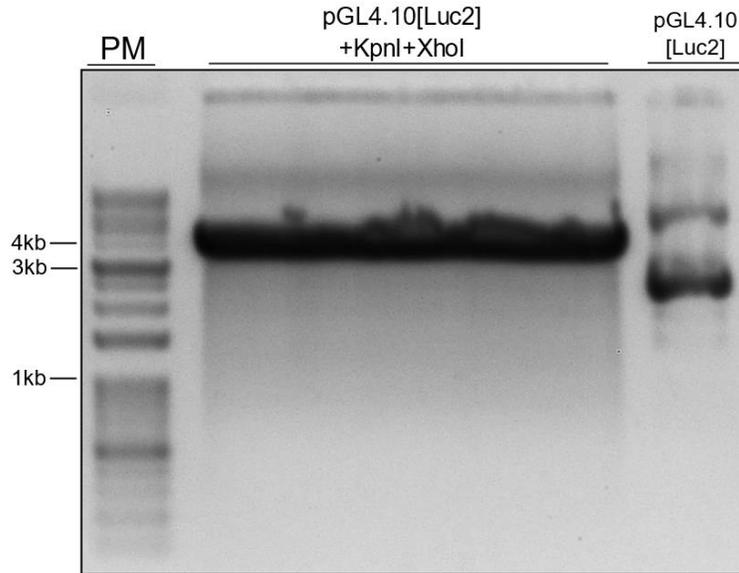
TTTTTTTTTTCTATTAAAGTATTGGATAATTTGAAGAATTTTTCTTTCTTTTGT**CAC**AGGGCCTATTTTC +439  
CREB-M

**Anexo 2.- Sitios putativos de unión a TF Sox, Creb y Crem en el promotor de *Catsper3*.**

Se muestra la secuencia nucleotídica de 979 pb del promotor de *Catsper3*. Los sitios putativos de unión encontrados mediante el análisis *in silico* se encuentran subrayados y los nucleótidos marcados en negritas representan el sitio núcleo de unión. La flecha representa el sitio de inicio de la transcripción.

Factor de transcripción	Posición	Secuencia 5' a 3' (+) (dirección)
SP1	-96..-87	GGCCTCCCTC (-)
SP3	+99..+109	CCACAACCCTG (+)
SP1	-162..-153	ACTCACCTC (-)
SP1	-246..-237	TGCCTGCCAA (-)
SP1/SP3	-356..-347	GCTGTGCCCC (-)
SP1	-380..-368	CCAAGCCTCCTCC (+)
SP1	-459..-447	CCCTCCTCCCCAG (-)
RFX1/7	-177..-157	CCAGGGTTGCTAGGTACTCAC (-)
RFX	-451..-431	CCCAGGTGTGTCCGTGGGACC (+)
DMRT4	+75..+95	aaatgtgg <b>GAC</b> Attttcaa (-)
DMRT1	+86..+106	ggttgtggtgaaa <b>ATGT</b> tggg (-)
DMRT1	-436..-416	gggaccttagaca <b>TTGT</b> ttac (+)
DMRT3	-427..-407	Gacattgt <b>TAC</b> Attttcctc (+)

**Anexo 3. Sitios putativos de unión a otros factores de transcripción predichos dentro del promotor de *Catsper3* murino.**



**Anexo 4. pGL4.10[Luc2] linealizado.** El vector se linealizó usando las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* para ser utilizado posteriormente en las subclonaciones. El DNA visualizó en un gel de agarosa al 1%.



**Anexo 5. Secuenciación de las construcciones con deleciones generadas.** A) pCat3-198..439 colonia 3.5, B) pCat3-540..5 colonia 2 y C) pCat3-198..5 colonia 3. Se realizó el análisis de las secuencias mediante secuenciación Sanger automática y posteriormente fueron alineadas contra la secuencia de referencia usando el programa MultiAlin.

**B**

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pCat.3-540..5_C2  CTAAC TGGCC GGTACC ACCTCC TGCTGT GTRACCCCTTTT TGTGCT CTGTAGAC ARAACCA CAAACTCATT GATTC CCGGAGTGAAC TTGGT GCCCTCC CCGAGGTGT CCGTGGGACCTTAG
Ref_pCat.3-540..5 GGTACC ACCTCC TGCTGT GTRACCCCTTTT TGTGCT CTGTAGAC ARAACCA CAAACTCATT GATTC CCGGAGTGAAC TTGGT GCCCTCC CCGAGGTGT CCGTGGGACCTTAG
Consensus        GGTACC ACCTCC TGCTGT GTRACCCCTTTT TGTGCT CTGTAGAC ARAACCA CAAACTCATT GATTC CCGGAGTGAAC TTGGT GCCCTCC CCGAGGTGT CCGTGGGACCTTAG

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pCat.3-540..5_C2  ACATTGTTACATTTT CCTCAGGA AAGGAATTTG TTTATCTACAG CCCAAGCCCT CCTTAGC ARAATCTGCTGTGCC CCTCTGC ACCTCCCGTGGGTTT TGTGTCATTG CCTGACCCACTGCAAACT
Ref_pCat.3-540..5 ACATTGTTACATTTT CCTCAGGA AAGGAATTTG TTTATCTACAG CCCAAGCCCT CCTTAGC ARAATCTGCTGTGCC CCTCTGC ACCTCCCGTGGGTTT TGTGTCATTG CCTGACCCACTGCAAACT
Consensus        ACATTGTTACATTTT CCTCAGGA AAGGAATTTG TTTATCTACAG CCCAAGCCCT CCTTAGC ARAATCTGCTGTGCC CCTCTGC ACCTCCCGTGGGTTT TGTGTCATTG CCTGACCCACTGCAAACT

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pCat.3-540..5_C2  TCTCTTCCCTTAGG TATCTTGGTGT GGTCCACTTAT AARAAGCCCTT TGGCTGC CAAAGCGGGC AATCATGAGGG AAGGCCCTT CACATCTCTA RAAGATCTCTTGG CCTGCTTCC CCGAGGTTGCT
Ref_pCat.3-540..5 TCTCTTCCCTTAGG TATCTTGGTGT GGTCCACTTAT AARAAGCCCTT TGGCTGC CAAAGCGGGC AATCATGAGGG AAGGCCCTT CACATCTCTA RAAGATCTCTTGG CCTGCTTCC CCGAGGTTGCT
Consensus        TCTCTTCCCTTAGG TATCTTGGTGT GGTCCACTTAT AARAAGCCCTT TGGCTGC CAAAGCGGGC AATCATGAGGG AAGGCCCTT CACATCTCTA RAAGATCTCTTGG CCTGCTTCC CCGAGGTTGCT

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pCat.3-540..5_C2  AGGTACTCCCTCTC TGAGCATTCC TTATCTCAG GAAGAAGGAC CACAAGTGA RTAGGCTTAG CCAAGGCCCTC CCTCTCAG CCTACTAGT GACAGCTAGATG CCTAAGAGC GACCTCATAAAGCA
Ref_pCat.3-540..5 AGGTACTCCCTCTC TGAGCATTCC TTATCTCAG GAAGAAGGAC CACAAGTGA RTAGGCTTAG CCAAGGCCCTC CCTCTCAG CCTACTAGT GACAGCTAGATG CCTAAGAGC GACCTCATAAAGCA
Consensus        AGGTACTCCCTCTC TGAGCATTCC TTATCTCAG GAAGAAGGAC CACAAGTGA RTAGGCTTAG CCAAGGCCCTC CCTCTCAG CCTACTAGT GACAGCTAGATG CCTAAGAGC GACCTCATAAAGCA

521     530     540     550     560     570     580     590     600     605
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pCat.3-540..5_C2  GAGAACCTTCCCA GGGTCCCTTGTGCTG CCTCGTAGAAT --CGAGGATATC AAGATCTG GCTCGGCCG CAGCTTGGC AAT
Ref_pCat.3-540..5 GAGAACCTTCCCA GGGTCCCTTGTGCTG CCTCGTAGAATTT CGAGGATATC AAGATCTG GCTCGGCCG CAGCTTGGC AAT
Consensus        GAGAACCTTCCCA GGGTCCCTTGTGCTG CCTCGTAGAAT.. CGAGGATATC AAGATCTG GCTCGGCCG CAGCTT.....

MCS                               HindIII

```

**C**

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Sang_pCat.3-198..5_C3 CCGTACC TGAGCTCG CTAGCCTC GAGGATATC AAGATCTCTT GCCCTGCTT CCCCAGGGTTC GTAGTACTC ACCCTCTCTG GAGCATTCC TATCTCAG GAAGAAGGAC CCAAGTGAATAGGCCCT
pCat.3-198..5       GGTAACC TGAGCTCG CTAGCCTC GAGGATATC AAGATCTCTT GCCCTGCTT CCCCAGGGTTC GTAGTACTC ACCCTCTCTG GAGCATTCC TATCTCAG GAAGAAGGAC CCAAGTGAATAGGCCCT
Consensus          ..GGTACC TGAGCTCG CTAGCCTC GAGGATATC AAGATCTCTT GCCCTGCTT CCCCAGGGTTC GTAGTACTC ACCCTCTCTG GAGCATTCC TATCTCAG GAAGAAGGAC CCAAGTGAATAGGCCCT

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Sang_pCat.3-198..5_C3 TAGCCAGGCCCTCC CTTCAAGCCTACTAG TGACAGCTAG AATGCTTA GAGGCCACCTC ATARAAGCAG AAGACCCTT CCCCAGGGTCC CTTGCTGCTGCC TCGTAGAAT --CGAGGATATC AAGATCTG GCC
pCat.3-198..5       TAGCCAGGCCCTCC CTTCAAGCCTACTAG TGACAGCTAG AATGCTTA GAGGCCACCTC ATARAAGCAG AAGACCCTT CCCCAGGGTCC CTTGCTGCTGCC TCGTAGAATTT CGAGGATATC AAGATCTG GCC
Consensus          TAGCCAGGCCCTCC CTTCAAGCCTACTAG TGACAGCTAG AATGCTTA GAGGCCACCTC ATARAAGCAG AAGACCCTT CCCCAGGGTCC CTTGCTGCTGCC TCGTAGAAT.. CGAGGATATC AAGATCTG GCC

261     270     277
|-----|-----|
Sang_pCat.3-198..5_C3 TCGCGGCCAAGCTTGG
pCat.3-198..5       TCGCGGCCAAGCTT
Consensus          TCGCGGCCAAGCTT..

```

**Anexo 5 (continuación). Secuenciación de las construcciones con deleciones generadas.** A) pCat3-198..439 colonia 3.5, B) pCat3-540..5 colonia 2 y C) pCat3-198..5 colonia 3. Se realizó el análisis de las secuencias mediante secuenciación Sanger automática y posteriormente fueron alineadas contra la secuencia de referencia usando el programa MultiAlin.