



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Papel de los factores de transcripción CTCF y SP1 en la expresión del gen
Catsper2 murino”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. ANDREA DEL PILAR CONTRERAS MARCIALES

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de la tesis:

Dr. JAVIER HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

México, D.F.

Diciembre, 2022

ASESORES

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Investigador titular
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Investigadora titular
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. Jesús Valdés Flores

Investigador titular
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dra. Sara Luz Morales

Investigadora titular A
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimiento a CONACYT

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de Doctorado, 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

- ♥ Al Dr. *JAVIER HERNÁNDEZ SÁNCHEZ*, gracias por la paciencia, la comprensión y el tiempo dedicado a mi crecimiento, no sólo a nivel profesional sino a mi mejora como persona. Gracias por dejarme ser parte de su grupo de trabajo en estos casi 6 años y brindarme la confianza que necesitaba para la culminación de este proyecto de vida.
- ♥ A los Dres. *LUIS KAMEYAMA, ROSA BERMÚDEZ, JESÚS VALDÉS Y SARA MORALES*, gracias por aceptar ser parte de mi comité y compartir conmigo su conocimiento, experiencia, sugerencias, guía y su tiempo, que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo.
- ♥ A mi familia, cada vez más grande. A mis padres *MANUEL* y *JACKELINE*, mis hermanos *FERNANDA* y *JESÚS*, mis suegros *ANGELES* y *JULIO*, cuñados *ANGELES, GUILLERMO, KAREN* y *RONALD* y los más pequeñitos *MAJO* y *CÉSAR*. Todos han sido parte de este proceso y siempre han estado ahí para darme ánimos y empujarme hacia la meta.
- ♥ A mi esposo *JULIO ANGEL* y nuestro hijo *DIEGO*, gracias por no dejarme caer, por apoyarme siempre, por aguantarme cuando ni yo misma lo hago, por hacerme reír cuando quiero llorar, por levantarme cuando ya no quiero seguir, gracias por iluminar mis días más oscuros.
- ♥ A todos los integrantes del lab6, por su ayuda, consejos y tiempo dedicado en mi desarrollo profesional y especialmente a *SERGIO* y *DIEGO*, gracias por toda la comprensión y ayuda que me han brindado para lograr esta meta, de verdad lo aprecio demasiado.

- ♥ A todo el personal técnico, auxiliar y secretarias del área II de Genética, han sido varios años para llegar hasta acá y el buen trabajo y dedicación de todos, así como su colaboración cada vez que me fue necesario han contribuido a la culminación de esta etapa. Gracias *GABY* por asesorarme en todo el papeleo desde hace 7 años.
- ♥ Gracias al equipo del Dr, *VIANEY ORTIZ* del Depto de Biomedicina Molecular, por sacarme de apuros las veces que lo necesité.

ÍNDICE

1	Introducción	1
1.1	Canales iónicos de calcio en el espermatozoide	1
1.2	Canal CATSPER.....	1
1.2.1	<i>Catsper2</i>	2
2	Antecedentes	7
2.1	Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>Catsper2</i> murino	7
2.2	Actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper2</i> murino	8
2.3	El promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino se encuentra en una región de 243 pb9	
2.4	El promotor mínimo de <i>Catsper2</i> tiene sitios de unión a diferentes factores de transcripción	10
2.5	Factores de transcripción con el dominio dedos de zinc (Zn finger)	10
2.5.1	Factor de transcripción CTCF	12
2.5.2	Factor de transcripción Sp1	14
3	Justificación	16
4	Hipótesis.....	16
5	Objetivos	16
5.1	Objetivo general.....	16
5.2	Objetivos específicos.....	17
6	Diseño experimental	18
7	Metodología	19
7.1	Material biológico	19
7.2	Análisis bioinformático.....	19

7.2.1	Análisis de datos de Secuenciación de bisulfito del genoma completo – WGBS	20
7.2.2	Análisis de bases de datos de CHIP-Seq	21
7.3	Construcciones con el promotor de <i>Catsper2</i> murino	21
7.3.1	Mutagénesis sitio dirigida	21
7.3.2	Preparación de bacterias competentes	23
7.3.3	Transformación de bacterias competentes	24
7.4	Extracción de DNA plasmídico	24
7.4.1	Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System.....	24
7.4.2	QIAGEN Plasmid Midi Kit.....	25
7.5	Secuenciación del DNA.....	26
7.6	Verificación de las construcciones con los genes de los factores transcripcionales CTCF y SP1	26
7.7	Cultivos celulares.....	27
7.7.1	Transfección de la línea celular.....	27
7.7.2	Lisis celular y ensayos de luciferasa	29
7.8	Detección de la expresión de CTCF y SP1.....	30
7.8.1	Extracción de proteína total.....	30
7.8.2	Cuantificación de proteínas	30
7.8.3	Electroforesis SDS-PAGE	31
7.8.4	Inmunodetección de proteínas por Western-blot.....	32
7.9	Predicción de la interacción de Sp1 con el promotor de <i>Catpser2</i> murino	33
7.10	Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	34
7.10.1	Marcado y verificación de sondas.....	34

7.10.2	Reacciones de unión proteína-DNA	35
7.10.3	Electroforesis, transferencia y revelado	36
7.11	Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	36
7.11.1	Crosslinking y sonicación de las muestras	36
7.11.2	Incubación con el anticuerpo y precipitación de los complejos	37
7.11.3	Amplificación de la región promotora de <i>Catsper2</i> murino	38
8	Resultados	38
8.1	La isla CpG que se encuentra sobre el promotor mínimo de <i>Catsper2</i> no está metilada	38
8.2	La marca de histonas H3K4me3 se localiza sobre el promotor de <i>Catsper2</i> murino.	39
8.3	La marca H3K36me3 sobre <i>Catsper2</i> murino es específica de testículo	41
8.4	Funcionalidad de los sitios putativos CTCF y Sp1 en el promotor mínimo de <i>Catsper2</i>	43
8.5	Papel de los sitios de unión para CTCF y Sp1 del promotor de <i>Catsper2</i> murino	45
8.6	Análisis de la sobreexpresión de las proteínas CTCF y Sp1	46
8.7	La sobreexpresión de CTCF y Sp1 aumentan la actividad del promotor de <i>Catsper2</i> murino	49
8.8	Modelo de la interacción de Sp1 con el promotor de <i>Catsper2</i> murino	51
8.9	Evaluación de la interacción <i>in vitro</i> de CTCF y Sp1 con el promotor de <i>Catsper2</i> murino	55
8.10	Evaluación de la interacción <i>in vivo</i> de CTCF con el promotor de <i>Catsper2</i> murino	57
9	Discusión	60
10	Conclusiones	67

11	Perspectivas	67
12	Referencias.....	68
13	Anexos.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de CATSPER2.	3
Figura 2. Catsper2 se expresa únicamente en testículo.	3
Figura 3. Catsper2 es el primer gen de la familia Catsper que se expresa durante la espermatogénesis.	4
Figura 4. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>Catsper2</i> murino.	7
Figura 5. Actividad transcripcional del promotor de <i>Catsper2</i> murino en células GC-1 spg y MSC-1.	8
Figura 6. Promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino.	9
Figura 7. El promotor mínimo de <i>Catsper2</i> tiene sitios de unión para los factores de transcripción CTCF y Sp1.	10
Figura 8. Representación esquemática de la estructura de los dominios dedos de zinc más abundantes e importantes.	11
Figura 9. Dominios de la proteína CTCF.	12
Figura 10. Los espermatozoides maduros de los ratones <i>Ctcf</i> -cKO presentan morfología anormal en cabeza y cola.	13
Figura 11. Dominios de la proteína Sp1.	14
Figura 12. Expresión de Sp1 analizada por Western Blot.	15
Figura 13. Esquema del proceso de transferencia de un gel de poliacrilamida a una membrana.	32
Figura 14. Estado de metilación de la isla CpG encontrada en el promotor de <i>Catsper2</i> , basado en análisis de datos de WGBS.	40
Figura 15. Patrón de H3K4me3 en el locus de <i>Catsper2</i> basado en análisis de datos de ChIP-seq.	41
Figura 16. Patrones de la marca H3K36me3 en el locus de <i>Catsper2</i> y <i>Pdia3</i> basado en análisis de datos de ChIP-seq.	42
Figura 17. Señal de H3K36me3 en espermatoцитos wild-type y espermatoцитos Knock out de <i>Setd2</i>	43

Figura 18. Verificación de la mutación de los sitios de unión a CTCF del promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino.....	44
Figura 19. Verificación de la mutación de los sitios de unión a Sp1 del promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino.....	44
Figura 20. Efecto de la mutación de los sitios de unión para CTCF sobre la actividad del promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino.....	45
Figura 21. Efecto de la mutación de los sitios de unión para Sp1 sobre la actividad del promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino.....	46
Figura 22. Análisis por restricción de los plásmidos Sp1-pCMV6 y CTCF-pCMV6.	47
Figura 23. Análisis por secuenciación de los plásmidos CTCF-pCMV6 y Sp1-pCMV6.....	48
Figura 24. Análisis de la sobreexpresión de CTCF y Sp1 en células HEK293 y GC-1 spg. .	49
Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de CTCF en la actividad del promotor mínimo de <i>Catsper2</i>	50
Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de Sp1 en la actividad del promotor mínimo de <i>Catsper2</i>	51
Figura 27. Modelos de la interacción de los dedos de zinc de Sp1 con el promotor de <i>Catsper2</i> murino.....	52
Figura 28. Modelo de las bases nitrogenadas del promotor de <i>Catsper2</i> que tienen contacto con el dominio de unión al DNA de Sp1.	53
Figura 29. Modelo de la interacción de Sp1 con el promotor mínimo de <i>Catsper2</i> murino.	54
Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de Sp1 sobre la mutante Sp1(2/3).	55
Figura 31. Análisis de la interacción <i>in vitro</i> del promotor de <i>Catsper2</i> murino con CTCF y Sp1.....	56
Figura 32. Análisis de la interacción <i>in vitro</i> de Sp1 con el promotor de <i>Catsper2</i> murino.	57
Figura 33. Estandarización de las condiciones de sonicación para los ensayos de ChIP. .	58
Figura 34. Análisis de la integridad de la proteína CTCF después del proceso de sonicación.....	58

Figura 35. Estandarización de las condiciones de PCR para el ensayo de ChIP.	59
Figura 36. CTCF se une <i>in vivo</i> al promotor de <i>Catsper2</i> murino.	60
Figura 37. Modelo de los mecanismos que regulan la actividad del promotor de <i>Catsper2</i> murino en testículo.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos utilizados en los análisis <i>in silico</i> de WGBS y ChIP-Seq de marcas de histonas	20
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en el proyecto	22
Tabla 3. Mezclas de transfección empleadas en el proyecto	28
Tabla 4. Concentraciones de BSA empleadas para obtener la curva de calibración en el método de cuantificación Bradford	31
Tabla 5. Reactivos y cantidades para geles de electroforesis SDS-PAGE.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

CATSPER	Canal catiónico del espermatozoide
aa	Aminoácidos
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DIS	Síndrome de sordera e infertilidad

TSS	Sitio de inicio de la transcripción
CTCF	Proteína de unión a CCCTC
KO	Knockout
WT	Wild type
Sp1	Proteína específica 1
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
TFs	Factores de transcripción
WGBS	Secuenciación por bisulfito del genoma completo
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
mL	mililitro
mg	miligramo
μL	microlitro
μg	microgramo
rpm	revoluciones por minuto
min	minutos
ORF	Marco abierto de lectura
pM	picomoles
ng	nanogramos
U	Unidades
WB	Western blot
BSA	Albúmina de suero bovino

nm	nanómetro
h	hora
V	voltios
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética

RESUMEN

El gen *Catsper2* codifica para la proteína CATSPER2 (proteína 2 asociada al canal catiónico del espermatozoide), una de las subunidades principales del canal CATSPER, expresada únicamente en testículo durante el proceso de espermatogénesis. *Catsper2* es indispensable para el proceso de hiperactivación y para la fertilidad masculina, como ha sido demostrado en pacientes con deleciones o mutaciones sobre este gen y que presentan el síndrome de sordera-infertilidad o infertilidad masculina no sindrómica; sin embargo, los mecanismos que regulan su expresión se desconocen. En este trabajo se evaluó la regulación del promotor de *Catsper2* delimitado previamente durante la tesis de maestría y se observó mediante análisis de datos de secuenciación por bisulfito de todo el genoma (WGBS) que la isla CpG presente en el promotor se encuentra en un estado de no metilación, de forma independiente del tejido; asimismo, mediante análisis de datos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)-seq se evidenció la presencia de las marcas de histonas H3K4me3 y H3K36me3, ampliamente relacionadas al proceso de transcripción. Además, mediante mutagénesis y ensayos de transfección celular y de luciferasa se determinó la importancia de diferentes sitios de unión para los factores de transcripción CTCF y SP1 en la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Catsper2*. Finalmente, se comprobó la interacción *in vitro* de Sp1 mediante ensayos de EMSA e *in vivo* de CTCF mediante ChIP con el promotor de *Catsper2* murino en testículo. Este estudio representa el primer análisis funcional sobre los mecanismos que regulan la expresión tejido-específica del gen *Catsper2* murino.

ABSTRACT

The *Catsper2* gene encodes the CATSPER2 protein (cation channel sperm-associated protein 2), which is one of the main subunits of the CATSPER channel, expressed only in the testis during the spermatogenesis process. *Catsper2* is essential for the hyperactivation process and male fertility since patients with deletions or mutations of this gene present deafness-infertility syndrome or non-syndromic male infertility; however, the mechanisms that regulate its expression are unknown. In this work, the regulation of the *Catsper2* promoter, previously delimited during the master's thesis, was analyzed. It was observed through the analysis of whole genome bisulfite sequencing (WGBS) data that the CpG island located in the promoter is non-methylated in a tissue-independent manner; likewise, through analysis of chromatin immunoprecipitation (ChIP)-seq data, the presence of histone marks H3K4me3 and H3K36me3, widely related to the transcription process, was evidenced. In addition, the importance of different binding sites for the transcription factors CTCF and SP1 in the transcriptional activity of the *Catsper2* minimal promoter was determined by mutagenesis, transfection of GC-1 spg cells, and luciferase assays. Finally, the binding of Sp1 *in vitro* by EMSA assays and CTCF *in vivo* by ChIP with the murine *Catsper2* promoter in the testis was corroborated. This study represents the first functional analysis of the mechanisms that regulate the tissue-specific expression of the murine *Catsper2* gene.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Canales iónicos de calcio en el espermatozoide

Los canales iónicos son elementos esenciales en la señalización celular para los espermatozoides maduros y son importantes para el potencial de membrana que modula la actividad de unión membrana-enzimas [1]. Los canales iónicos difieren unos de otros por la secuencia de sus aminoácidos, la composición de subunidades, la naturaleza de los iones que conducen, las propiedades de cierre y sus mecanismos regulatorios. Una de las formas en que se pueden clasificar estos canales, es según los iones específicos que conducen y entre los más importantes se encuentran los canales de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ [2]. De estos canales iónicos, los que son específicos de Ca²⁺ son claves en el movimiento flagelar y en la fusión de la vesícula acrosomal, ya que estos procesos dependen de la concentración intracelular de Ca²⁺. La motilidad del espermatozoide está controlada por iones Ca²⁺ y por nucleótidos cíclicos, por lo que se han descrito diferentes canales de Ca²⁺ presentes en el espermatozoide, sin embargo, es probable que no todos sean esenciales para la motilidad, ya que también se expresan en otros tejidos como el cerebro [2,3]. Es por esta razón, que uno de los canales que representa mayor interés en este campo de estudio es el canal CATSPER, el cual es específico del espermatozoide, tiene una dependencia débil al voltaje y es sensible al pH; este canal permite la entrada de iones cargados positivamente, esenciales para la hiperactivación y la fertilidad masculina.

1.2 Canal CATSPER

El canal CATSPER (Cation channel of Sperm) es un canal iónico selectivo para Ca²⁺ formado por cuatro subunidades alfa (α) denominadas CATSPER1, CATSPER2, CATSPER3

y CATSPER4 [4–6], las cuales, a diferencia de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Ca_v) son codificadas por genes distintos y se unen como un heterotetrámero para formar el poro del canal [7]. Asimismo, cuenta con subunidades accesorias conocidas como CATSPER β [8], CATSPER γ [9] y CATSPER δ [10], que intervienen en la estructura y estabilidad del canal.

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

1.2.1 *Catsper2*

En 2001, se reportó la existencia de un gen que codifica para una proteína con topología similar a las proteínas de los canales de potasio dependientes de voltaje, pero con la secuencia del dominio del poro parecida a los canales de calcio, a este gen se le llamó *Catsper2*. La proteína CATSPER2 tiene 588 aminoácidos (aa), forma seis fragmentos transmembranales, en donde los residuos ubicados entre los fragmentos cinco y seis, conocidos como región P, determinan la selectividad del canal (figura 1). CATSPER2 contiene en su dominio C-terminal un motivo de cierre de leucina que posiblemente media la interacción proteína-proteína para la formación del canal. La proteína CATSPER2 de humanos tiene una identidad de 63-67% con la proteína de ratón, en la que la región transmembranal está conservada con un 77% de identidad que incluye una región P idéntica [4].

1.2.1.1 *Catsper2* es específico de testículo

El perfil de expresión de los genes *Catsper* se ha evaluado en diferentes grupos de trabajo. El mRNA de estos genes, incluido *Catsper2* es detectado únicamente en testículo tanto de humano como de ratón (figura 2) mediante técnicas de Northern blot [4] o RT-PCR. Por otro lado, la localización específica de la proteína CATSPER2, así como del canal funcional en la pieza principal del flagelo de los espermatozoides, se ha determinado mediante técnicas de inmunofluorescencia [11,12].

```

1  MAQEQQGHFQLLRADAIRSKLIDTFSLIEHLQGLSQAVPRHTLREILDPAI
51  QQKLMSGDQEQLVRFSIKPRRMGHIHRSRLLSRLRVRC SRMPPLSLWAG
101 WVLDSSVFSKFIISLIFLNTFVLMVEIELMESTNTALWPVKLALEVADWF
      S1
151 ILLSFIVEILLMWLASFSLFWKDAWNVDFVFTLLSLLPELVVLLGVPPAH
      S2                                     S3
201 SVWLQLLRVCRVLRSLKLFARFROIKVILLALVRALKSMTFLLMLLLIFF
      S4                                     S5
251 YIFAVTGVYFFREYSRSTIEGLEYNMFFSDLLNSLVTVFILFTLDHWYAV
      P
301 LQNIWKVPESRRVFSSIYVILWLLLGSIIFRNIIIAMVTFNQIRSELS
      S6
351 EEMSHLEVQYKADMFKQQIIQRRQHSESLRGTSLGKVSIEDIIETS DASDD
401 DDDDDDDDDDDDDDDDDKSDATESDGEESDSENSESENSESEKIDPEKDY
451 AKKSYPEKSHPEKSYPEKSHPEKSYPEKSHPEKSYDEQAEAEKVKEESKE
501 KAYPVSHSISSHGSI AADTAFLENLDWETLVHENLPGLMDMDQDDRIVWP
551 RDSLFRYFELLEKLQYNLEERKKLQEFQALMSFEDK

```

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de CATSPER2. Se muestran los fragmentos transmembranales (S1-S6) subrayados en negro y los residuos de la región P que determinan la selectividad del canal están subrayados en rojo. [4]

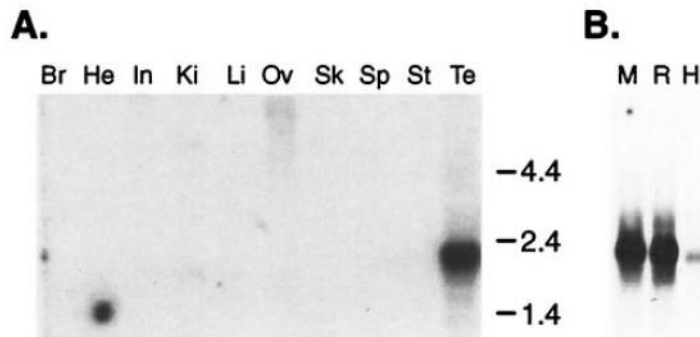


Figura 2. *Catsper2* se expresa únicamente en testículo. (A) Northern blot de RNA total de tejidos de ratón. Br: cerebro, He: corazón, In: intestino, Ki: riñón, Li: hígado, Ov: ovario, Sk: músculo esquelético, Sp: bazo, St: estómago, Te: testículos. (B) Northern blot de RNA poli(A) de testículos

de ratón (M), rata (R) y humano (H). En los dos experimentos se utilizó una sonda de cDNA de *Catsper2* murino marcada radioactivamente [4].

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

A pesar de que todos los genes de la familia *Catsper* se expresan específicamente en testículo y que la falta de alguno impide la formación del canal [13], la fase de la espermatogénesis en la que ocurre su transcripción es diferente. Mientras que *Catsper1*, 3 y 4 se expresan en etapas tardías de la espermatogénesis, es decir, en las espermátidas [13–15], *Catsper2* se expresa antes que cualquiera de los otros genes *Catsper* (en espermátocitos paquíteno), según estudios de PCR cuantitativa (qPCR) e hibridación *in situ*, en los que se detecta a partir del día 8 después del parto (dpp), con una expresión significativa entre los días 15-18 y llegando a una expresión máxima que supera la expresión de los otros genes a los 35 dpp, que es donde se completa la diferenciación de los espermatozoides en ratón (figura 3) [16].

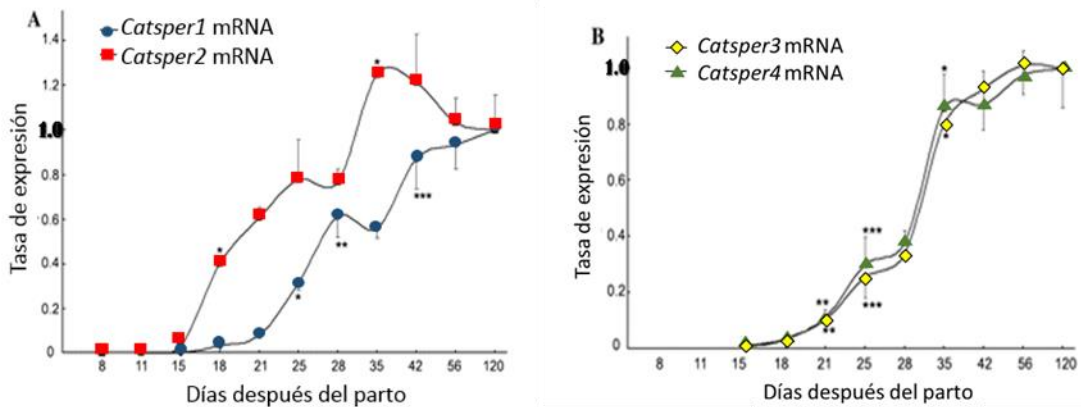


Figura 3. *Catsper2* es el primer gen de la familia *Catsper* que se expresa durante la espermatogénesis. Expresión temporal de los mRNA de *Catsper1*, *Catsper2* (A), *Catsper3* y *Catsper4* (B), en testículos de ratón desde el desarrollo postnatal hasta la adultez medidos por qPCR y normalizados a la expresión de β -Actina. Los niveles de los mRNAs se expresan en proporción relativa a los valores en testículo de adulto (120 días) (Modificado de [16]).

1.2.1.3 *Catsper2* es esencial en la fertilidad masculina

En el espermatozoide se han detectado varios canales de Ca^{2+} , debido a que es un importante mensajero para el proceso de capacitación e hiperactivación del espermatozoide; sin embargo, canales como $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ no son importantes en la fertilidad masculina según se desprende de ensayos de interrupción de genes. Así mismo, mutaciones encontradas en los canales CNGA3, TRPC2 y TRPC3, tampoco ocasionan disminución de la fertilidad y finalmente, mutantes nulos para los canales $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v2.1$ ocasionan la muerte del embrión, por lo tanto, se descartan como causantes de infertilidad. De esta manera, se puede argumentar que sólo los genes *Catsper* son requeridos para la fertilidad masculina lo que los convierte en blancos para el desarrollo de drogas anticonceptivas masculinas [2,12,17].

Debido a la expresión específica del canal CATSPER en el espermatozoide y a su gran afinidad por el Ca^{2+} , se han realizado diferentes ensayos para determinar su función. Se produjeron ratones mutantes sin el gen *Catsper2* (*Catsper2*^{-/-}) con los que se hicieron ensayos de fertilización *in vitro*, enfrentándolos a ovocitos con o sin zona pelúcida (ZP) y ensayos *in vivo*. En el ensayo *in vitro* se observó que los espermatozoides *Catsper2*^{-/-} no pudieron fertilizar ovocitos normales, pero sí ovocitos sin ZP. Por otro lado, en el ensayo *in vivo* se observó que sólo los ratones machos *Catsper2*^{-/-} no tuvieron descendencia [18]. Con estos resultados, se demostró que *Catsper2* es importante en la fertilidad masculina, concretamente en el proceso de hiperactivación, que es necesario para atravesar la ZP del ovocito y llevar a cabo la fertilización.

Asimismo, la infertilidad masculina humana no sindrómica se ha vinculado a mutaciones en el gen *CATSPER2* [19]. En una familia de origen francés en la que dos hermanos presentaban anemia diseritropoyética congénita tipo I y ambos sufrían de una reducción severa de la motilidad de sus espermatozoides, se encontró que tenían una delección de aproximadamente 70 kb que removía parte del gen *CATSPER2*, sugiriendo su papel en la astenoteratozoospermia y describiendo por primera vez el síndrome de sordera e infertilidad (DIS) en el 2003 [11].

Más adelante, en un estudio realizado en 2007 [20], evaluaron a miembros de tres familias de Irán, diagnosticados con el síndrome descrito en 2003 [11]. Mediante escaneo del genoma completo y secuenciación directa, encontraron deleciones en el cromosoma 15q15.3 sobre el gen *STRC*, al que asociaron la sordera y sobre el gen *CATSPER2*, concluyendo que la ausencia de este último era la causa del fenotipo de infertilidad.

Posteriormente, investigadores de India, analizaron a 150 pacientes masculinos infértiles, realizando amplificaciones y secuenciaciones directas sobre el gen de *CATSPER2*. En esta investigación, detectaron una mutación de cambio de sentido sobre el exón 6 en 8 pacientes, dicha mutación genera el cambio de una arginina por una prolina; razón por la que los autores concluyen que una conformación diferente de la proteína *CATSPER2* puede ser la causa de infertilidad en los pacientes en que fue encontrada la mutación [21].

Por otro lado, en un caso reportado en Estados Unidos [22], se analizó el genoma de un paciente masculino de 4 semanas en el que se detectó sordera y se encontró una deleción homocigota sobre el cromosoma 15, igual a la reportada anteriormente en el DIS; de forma inusual, el genotipo presentado por este paciente, se debió a herencia por disomía uniparental por parte de su madre.

Finalmente, en 2019 describen a un paciente infértil que aunque tiene una de las dos copias de *CATSPER2* intacta, los niveles de expresión de mensajero y proteína disminuyen 92% y 95%, respectivamente; además, proponen a este paciente como un modelo de estudio *CATSPER2* “knockout” [23].

A pesar de la evidencia que existe sobre la importancia de este gen en la fertilidad masculina, no se ha reportado ninguna investigación sobre los mecanismos que regulan la expresión de *Catsper2*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Análisis *in silico* del promotor de *Catsper2* murino

En nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis *in silico* para encontrar la región promotora del gen *Catsper2* murino, usando el software MathInspector de Genomatix (<https://www.genomatix.de/matinspector.html>). Se encontraron dos promotores putativos de 601 pb y 784 pb (figura 4A) y ambos fueron clonados en un fragmento de 1598pb río arriba del gen reportero de la luciferasa del vector pGL4.10 (pCat2-1598pb). Además, se encontró una isla CpG sobre el promotor putativo de 784pb que se ubica sobre el inicio de la transcripción (TSS por *transcription start site*) del gen, mediante el software CpGFinder de softberry (figura 4B).

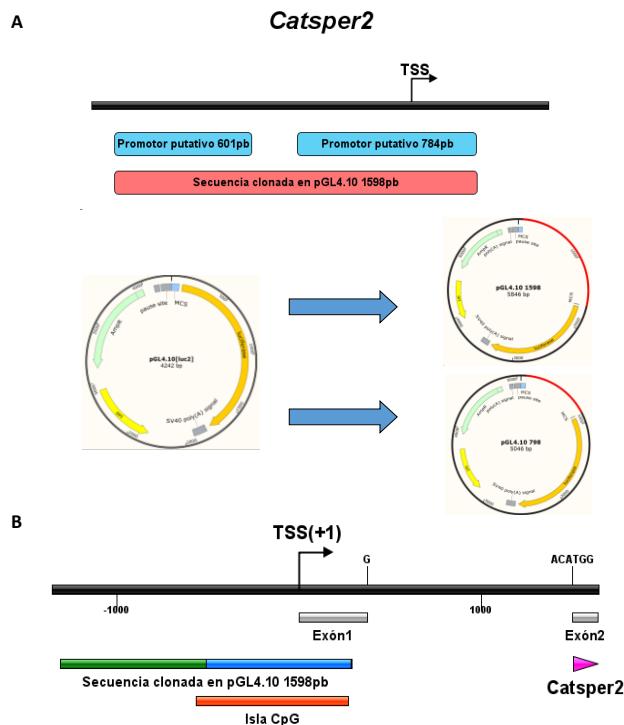


Figura 4. Análisis *in silico* de la región promotora de *Catsper2* murino. (A) Se encontraron 2 posibles secuencias promotoras del gen (rectángulos azules). Un fragmento de 1598pb (rectángulo rojo) que contiene ambos promotores y un fragmento de 798 pb con el promotor que incluye el inicio transcripcional (TSS) fueron clonados río arriba del gen reportero de

luciferasa en el vector pGL4.10. (B) Se muestra la ubicación del promotor con respecto al TSS de *Catsper2* y se señalan los 2 primeros exones, que al unirse forman la secuencia Kozak sobre el inicio de la traducción (fucsia). La región promotora de 798pb (azul) coincide con la predicción de una isla CpG (naranja).

2.2 Actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino

Con el objetivo de determinar la actividad transcripcional de los promotores encontrados en el análisis *in silico*, se realizaron ensayos de transfección transitoria de las líneas celulares GC-1 spg y MSC-1 con la construcción pCat2-1598pb y otra construcción en la que se clonó un fragmento de 798 pb que contiene el promotor de 784 pb, río arriba del gen reportero de la luciferasa del vector pGL4.10 (pCat2-798pb, figura 4A). Con las células transfectadas se realizaron ensayos de luciferasa y los resultados demostraron la actividad transcripcional de las secuencias evaluadas; se observó que el promotor de *Catsper2* murino se encuentra en el fragmento de 798 pb que se ubica sobre el TSS de gen y que presentó una actividad de 11.7 y 100 veces mayor que el control (pGL4.10) en las células GC-1 spg y MSC-1, respectivamente (figura 5) (Contreras-Marciales, tesis de Maestría).

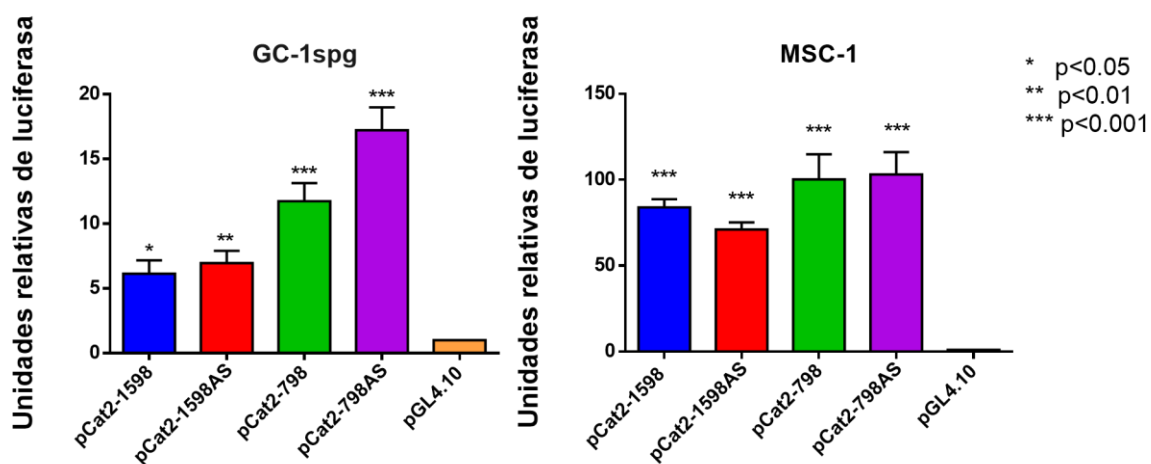


Figura 5. Actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* murino en células GC-1 spg y MSC-1. Las construcciones con las regiones de 1598pb y 798pb clonadas en sentido o antisentido río arriba del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* fueron co-transfectadas con el plásmido pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus) para normalización de

los datos, a las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de las luciferasas. La actividad transcripcional de los promotores putativos de *Catsper2* en las líneas celulares GC-1 spg y MSC-1 se calculó como número de veces de incremento respecto de la actividad del vector pGL4.10 la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos indican la media \pm SEM, n=3 y los asteriscos las diferencias significativas.

2.3 El promotor mínimo de *Catsper2* murino se encuentra en una región de 243 pb

Para delimitar el promotor basal de *Catsper2* murino, se realizaron deleciones en los extremos 5' y 3' del promotor de *Catsper2* y la actividad transcripcional de dichas construcciones se evaluó mediante ensayos de transfección y actividad de luciferasa. Como se observa en la figura 6, la actividad promotora de la construcción pCat2-287, que no contiene el TSS, no presentó diferencias significativas con la actividad presentada por el control negativo en la línea celular GC-1 spg, demostrando que esa región es esencial para la expresión de *Catsper2* en las células germinales. Además, el fragmento de la construcción pCat2-243 pb, que se ubica de -54 a +189 respecto del TSS (Contreras-Marciales, tesis de Maestría), resultó ser el fragmento más corto evaluado que presentó actividad transcripcional con diferencia significativa respecto del control (pGL4.10), concluyendo que dentro de esta región se encuentra el promotor mínimo de *Catsper2*.

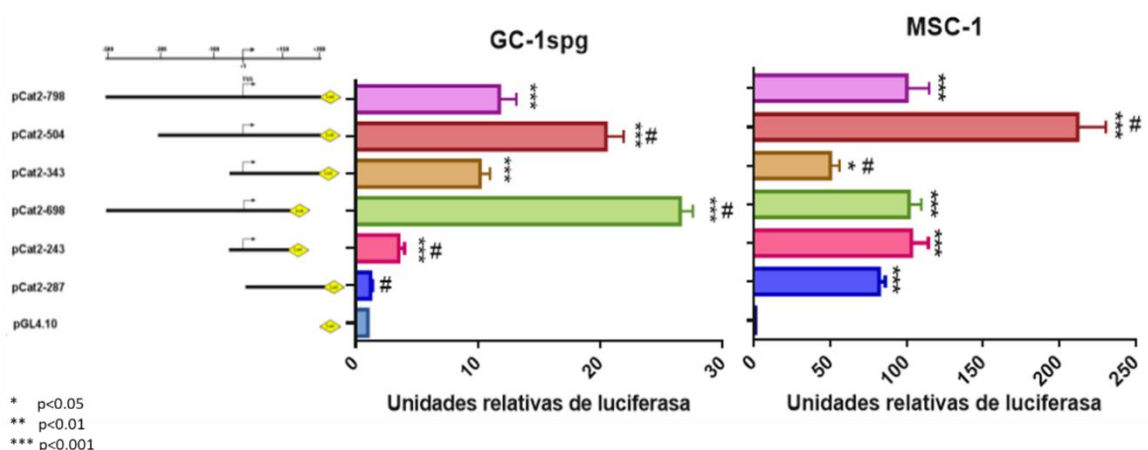


Figura 6. Promotor mínimo de *Catsper2* murino. Para delimitar el promotor mínimo de *Catsper2*, las construcciones con las deleciones del promotor de *Catsper2* clonadas río arriba del gen de luciferasa de *Photinus pyralis* fueron co-transfectadas con el plásmido pRL-CMV (luciferasa de

Renilla reniformis con promotor de citomegalovirus) para normalización de los datos; a las 48h post-transfección se realizó lisis celular para analizar la actividad de luciferasa. La actividad transcripcional de las construcciones en las líneas celulares GC-1 spg y MSC-1 se calculó como número de veces de incremento con respecto a la actividad del vector pGL4.10, la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados en triplicado. Los datos indican la media \pm SEM, n=3, los asteriscos (*) las diferencias significativas con la actividad del promotor completo (pCat2-798) y los # las diferencias significativas con la actividad de la construcción pCat2-287.

2.4 El promotor mínimo de *Catsper2* tiene sitios de unión a diferentes factores de transcripción

Una vez que la región que contiene el promotor mínimo de *Catsper2* fue encontrada (-54, +189), se realizó un análisis *in silico* (<https://www.genomatix.de/matinspector.html>) para determinar los sitios de unión a factores de transcripción, localizando varios sitios de unión para los factores CTCF y SP1 (figura 7).



Figura 7. El promotor mínimo de *Catsper2* tiene sitios de unión para los factores de transcripción CTCF y Sp1. Mediante análisis bioinformático se encontraron 3 sitios de unión para Sp1 (cuadros azules) y 3 sitios de unión para CTCF (cuadros rojos).

2.5 Factores de transcripción con el dominio dedos de zinc (Zn finger)

Las proteínas con dominios dedos de Zn son uno de los grupos más abundantes y diversos y tienen una gran variedad de funciones biológicas, que incluyen degradación de proteínas mediada por ubiquitina, transducción de señales, reparación del DNA, migración celular y regulación transcripcional [24].

Un dedo de Zn puede ser definido como una unidad pequeña y funcional que requiere de uno o más iones de Zn para estabilizar su estructura [25]. Este dominio permite que ocurran interacciones proteína-DNA, proteína-RNA y proteína-proteína [26]. La estabilidad de un dedo de Zn se logra cuando se forman enlaces coordinados entre el ión y combinaciones de los residuos cisteína (Cys) e histidina (His), en donde la combinación C2H2 (también Cys₂His₂) es la más común y se conoce como estructura clásica [27]. Con estudios de cristalografía se ha observado que la estructura C2H2 de un dedo de Zn posee dos hojas β y un α -hélice ($\beta\beta\alpha$), en donde la región α -hélice contiene la mayoría de residuos polares y cargados que permiten que el dedo de Zn haga contacto con el surco mayor del DNA [28]. En la figura 8 se puede observar la estructura de un dedo de Zn clásico, así como de algunos de los dedos de Zn con estructura no clásica más abundantes e importantes.

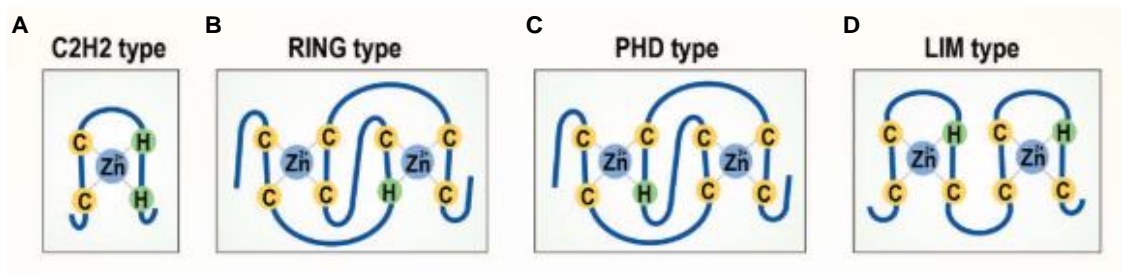


Figura 8. Representación esquemática de la estructura de los dominios dedos de zinc más abundantes e importantes. Estructura clásica C2H2 de un dedo de Zn, la unión del ión a los residuos de Cys e His confieren la estabilidad de la estructura. B. Estructura no clásica del dominio RING (*really interesting new gene*), las proteínas con este dominio incluyen numerosas E3 ubiquitin ligasas. C. Estructura no clásica del dominio PHD (*plant homeodomain*), las proteínas con este dominio tienen actividad remodeladora de la cromatina por lo que están involucradas en la regulación de modificaciones epigenéticas. D. Estructura no clásica del dominio LIM (*Lin-11, Isl-1 and Mec-3*), las proteínas con este dominio incluyen factores de transcripción y otras proteínas importantes en interacciones del citoesqueleto y adhesión focal, entre otras. Modificado de [24].

Dentro de este gran grupo de proteínas con dedos de Zn, se encuentran CTCF y SP1, las cuales utilizan estos dominios para actuar como factores de transcripción.

2.5.1 Factor de transcripción CTCF

La proteína CTCF o proteína de unión a CCCTC, fue descubierta en 1990 [29] al estudiar una proteína con la capacidad de unirse a una región rica en GCs del promotor del gen *c-myc* de pollo, encontrando que podía regular la transcripción de este gen [30].

Aunque se existen algunas isoformas del mensajero de este gen que se pueden encontrar en bases de datos, sólo una de ellas se traduce (NM_001358924/NM_181322). La proteína CTCF se expresa de forma ubicua y está formada por 736 aminoácidos (aa) distribuidos en tres dominios (figura 9): los dominios N- y C-terminal, los cuales presentan divergencia entre organismos y, un dominio de unión a DNA formado por 11 dedos de Zn de tipo C2H2, el cual presenta cerca del 100% de homología entre el ratón, pollo y humano [31].

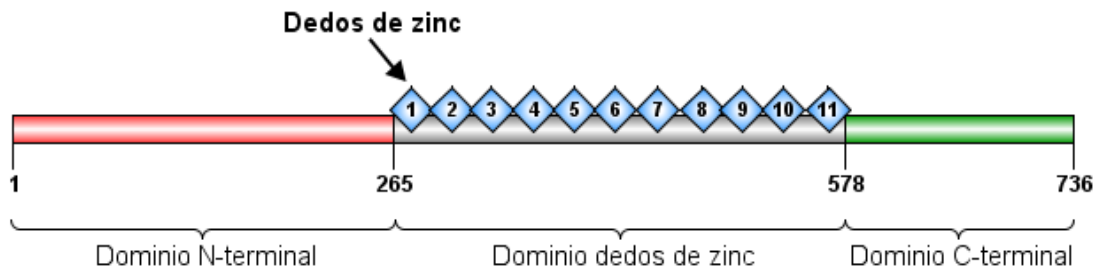


Figura 9. Dominios de la proteína CTCF. La proteína CTCF está formada por el dominio N-terminal que comprende los aminoácidos 1 a 265, seguido por el dominio dedos de Zn (residuos 266-578) y el dominio C-terminal ubicado en los residuos 579 a 736.

Desde que se descubrió a CTCF, se han realizado diversos estudios que indican que esta proteína está involucrada en diferentes funciones que incluyen la organización de la cromatina, factor de transcripción, mediación en la interacción de *enhancers*-promotores, *splicing* alternativo y proteína de unión a secuencias aislantes (*insulator* en inglés), para impedir la transcripción de genes; los ejemplos más importantes de esta última son el locus del gen *β -globina* y el locus H19/Igf2 en el que los genes *H19* e *Igf2* se encuentran separados por una región de control de impronta (ICR) [32].

Además, en varios trabajos se han revisado otras funciones de la proteína CTCF incluyendo regulación de las recombinaciones V(D)J [33], inducción de tumorigénesis en cáncer de mama [34] y otros tipos de cáncer [35] y diferenciación celular [36].

Por otro lado, en un estudio realizado en 2016 [37], se evaluó el papel de CTCF en la espermatogénesis, encontrando que los ratones con un *knockout* condicional de este gen (*Ctcf*-cKO), presentaron daños en la espermiogénesis e infertilidad, evidenciado por un menor número total de espermatozoides, mayor frecuencia de aberraciones morfológicas de los espermatozoides en los ratones *Ctcf*-cKO, respecto de los ratones silvestres (*wild type*, WT) (figura 10) y en los intentos de reproducción fallidos.

Además, en este estudio se realizaron ensayos de microarreglos para determinar cuáles genes se veían afectados al inactivar a *Ctcf* en células germinales de ratón; encontrando que algunos genes *Catsper*, incluido *Catsper2* presentaron regulación a la baja, siendo la expresión para este último, 2.7 veces menos con respecto a los ratones wild-type (WT), sugiriendo un papel importante de la proteína CTCF en la expresión de *Catsper2*.

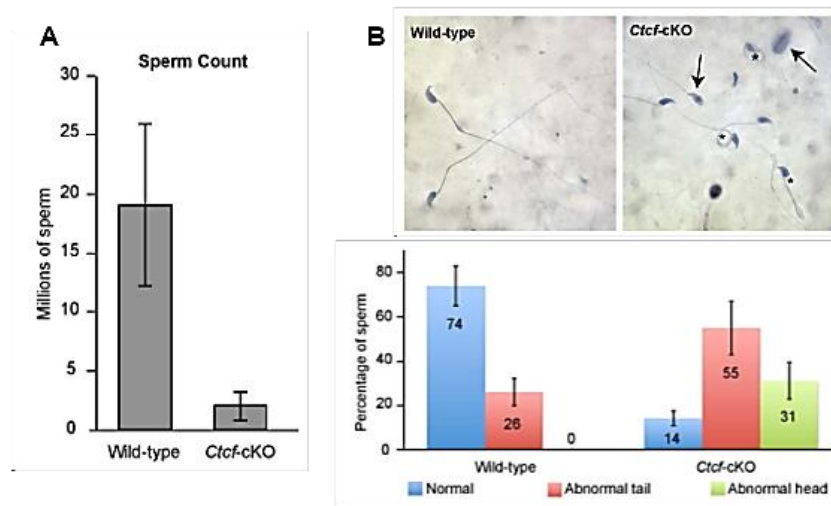


Figura 10. Los espermatozoides maduros de los ratones *Ctcf*-cKO presentan morfología anormal en cabeza y cola. El conteo de espermatozoides fue menor en los ratones *Ctcf*-cKO. Se analizó el espermatozoides de 3 ratones WT y 12 ratones *Ctcf*-cKO. (B). Imágenes en campo claro de espermatozoides de ratones Wild-type y ratones *Ctcf*-cKO (arriba), las flechas señalan las cabezas anormales y los asteriscos las colas anormales. En la gráfica (abajo) se observan los porcentajes de tres réplicas biológicas de las estructuras normales (azul), y de las colas (rojo) y cabezas (verde) anormales. Tomado de [37].

2.5.2 Factor de transcripción Sp1

La proteína específica 1 o Sp1 fue descubierta en 1983 [38], al buscar elementos necesarios para la transcripción en un extracto de células HeLa; estos autores describieron a Sp1 como un factor de transcripción específico e importante para la activación de los promotores temprano y tardío del virus SV40.

La proteína Sp1 presenta dos isoformas: la proteína completa de 781 aa y una isoforma más pequeña de 467 aa [39]. Sp1 se expresa de forma ubicua y pertenece a la familia de factores de transcripción Krüppel-like Factor (KLF), que se caracteriza por un dominio de unión a DNA altamente conservado; este dominio consiste en tres dedos de Zn consecutivos (figura 11), que se ubican entre los aminoácidos 627-714 en la proteína de ratón. Además, la proteína Sp1 cuenta con un dominio de inhibición o represión ubicado en el N-terminal (aminoácidos 2 a 84) y 2 dominios de transactivación (entre los aminoácidos 148 y 496) [40,41] (figura 11).



Figura 11. Dominios de la proteína Sp1. La proteína Sp1 está formada por un dominio de inhibición o represión (DR), 2 dominios de transactivación (DTA) y el dominio de unión a DNA compuesto por 3 dedos de ZN (ZF) consecutivos.

La proteína Sp1 puede unirse y actuar a través de elementos ricos en guaninas, también conocidos como cajas GC (GC box), los cuales se encuentran ampliamente en las secuencias promotoras de genes celulares y virales [41,42]. Diferentes estudios han reportado que la actividad de Sp1 puede ser inhibida por metilación de las citosinas presentes en la caja GC [43–45] o no verse afectada por dicha metilación [46,47].

La función de Sp1 como factor de transcripción ha sido ampliamente estudiada, por ejemplo, se sabe que puede actuar como activador o represor y que puede regular tanto promotores que contienen la caja TATA como aquellos que no la presentan. En una revisión sobre esta proteína [48], se mencionan diferentes procesos celulares en los que Sp1 participa como regulador transcripcional, entre los que se encuentran: crecimiento y diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune. En otros estudios, se observó que la sobreexpresión de Sp1 desencadena arresto del ciclo celular y posterior apoptosis de células normales (no transformadas) [49]; mientras que el silenciamiento de SP1 mediado por RNA de interferencia (RNAi) en células tumorales resulta en la inhibición del crecimiento celular y de la invasión/migración, así como en una disminución de la supervivencia [50].

Respecto a su papel en la espermatogénesis, se ha evaluado su perfil de expresión en las diferentes etapas de diferenciación de las células germinales, encontrando que la expresión de la proteína Sp1 está restringida a estadios tempranos, es decir, desde espermatogonias hasta espermatocitos primarios en paquiteno temprano [51] (figura 12).

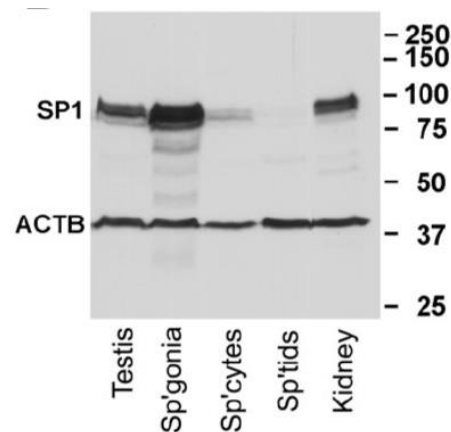


Figura 12. Expresión de Sp1 analizada por Western Blot. Se analizaron extractos de células germinales purificadas que corresponden a una mezcla de espermatogonias A y B (Sp'gonia), espermatocitos paquiteno tardíos (Sp'cytes) y espermátidas redondas (Sp'tids). Como control se utilizó extracto de testículo completo de adulto (testis) y riñón (kidney).

Debido a ese perfil de expresión, varios grupos de investigación han sugerido que la proteína Sp1 puede tener un papel inhibitorio sobre genes específicos de testículo cuya transcripción se detecta a partir de espermatoцитos paquiteno y que poseen sitios de unión para Sp1 en su promotor [51,52]; como sería el caso de *Catsper2*.

3 JUSTIFICACIÓN

Catsper2 es uno de los genes que codifican para las proteínas del canal CATSPER, el cual es importante en la fertilidad masculina. En los análisis *in silico* del promotor de *Catsper2* se encontraron diferentes sitios de unión para factores de transcripción que pueden ser reconocidos por las proteínas CTCF y Sp1. Se ha demostrado que CTCF participa en la regulación de genes esenciales en el proceso de espermatogénesis, ya que los ratones sin este gen son infértiles. Asimismo, Sp1 disminuye su expresión a la par que empieza la expresión de *Catsper2*. Por esta razón, la evaluación de estas proteínas como reguladoras de la transcripción de *Catsper2* representa la posibilidad de una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen en la expresión de este gen.

4 HIPÓTESIS

El promotor mínimo de *Catsper2* murino está bajo regulación epigenética y además es regulado por los factores de transcripción CTCF y SP1.

5 OBJETIVOS

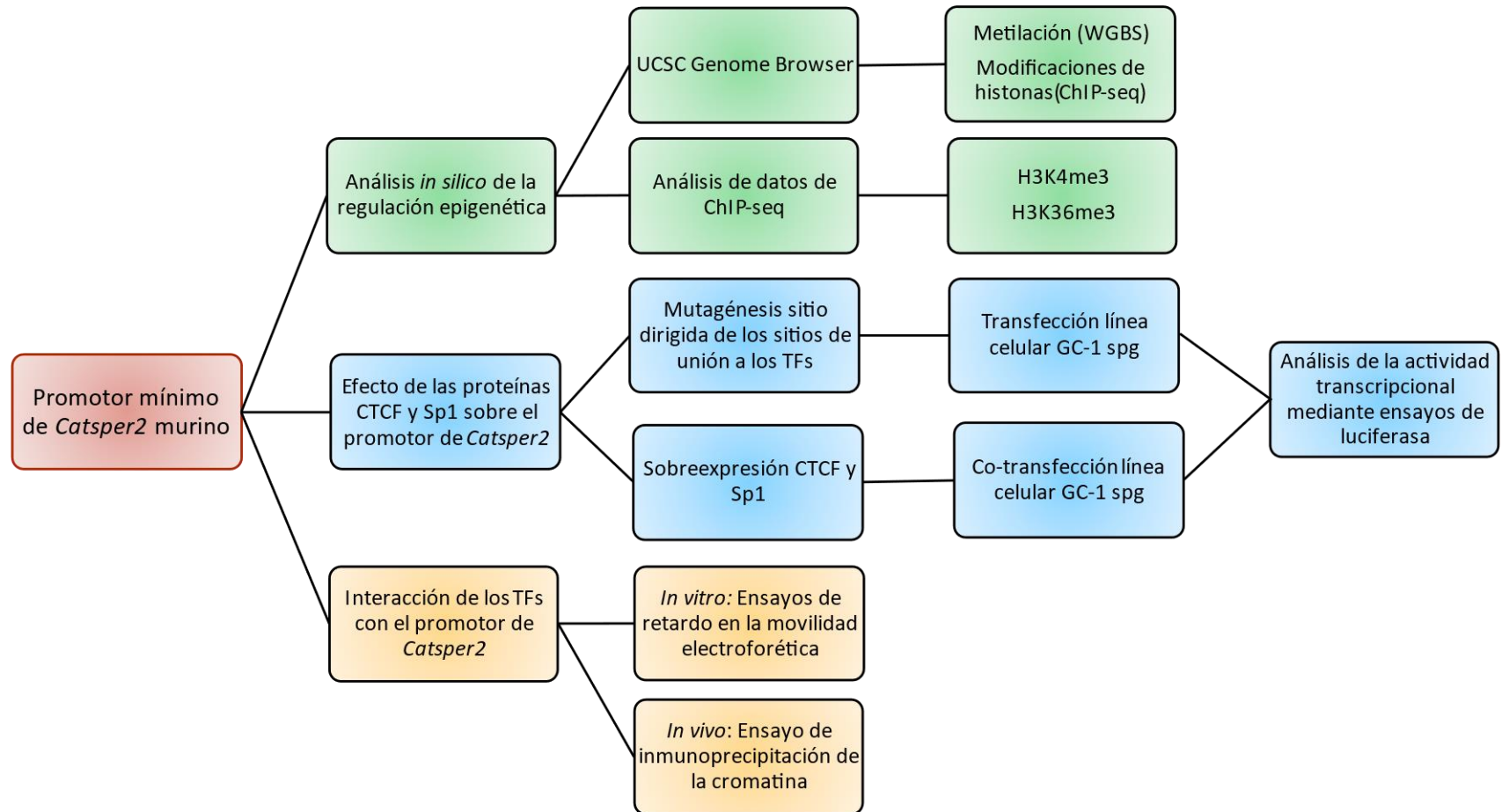
5.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente la regulación genética y epigenética del promotor de *Catsper2* murino

5.2 Objetivos específicos

- Analizar *in silico* los elementos que pueden actuar en la regulación epigenética del promotor mínimo de *Catsper2* murino
- Evaluar si las proteínas CTCF y Sp1 tienen efecto sobre la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Catsper2* murino
- Determinar si los factores de transcripción CTCF y SP1 se unen *in vitro* al promotor de *Catsper2* murino
- Determinar si el factor de transcripción CTCF se une *in vivo* al promotor de *Catsper2* murino

6 DISEÑO EXPERIMENTAL



7 METODOLOGÍA

7.1 Material biológico

En este trabajo se utilizó la línea celular GC-1 spg (ATCC® CRL-2053™), que son células germinales de ratón con características de un estado entre espermatogonias tipo B y espermatoцитos primarios. Las células se manipularon en campana de flujo vertical, se cultivaron en medio Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM) de SIGMA suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) de GIBCO y 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.

Además, se utilizaron ratones de la cepa CD1 en edades entre 3-4 y 6-8 semanas; los animales fueron proporcionados por la Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio (UPEAL) y los experimentos se realizaron de acuerdo con el protocolo 0113-14 aprobado por el Comité Interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

7.2 Análisis bioinformático

Para evaluar los posibles mecanismos de regulación epigenética que controlan la expresión de *Catsper2* murino, se realizaron análisis *in silico* de diferentes bases de datos.

7.2.1 Análisis de datos de Secuenciación de bisulfito del genoma completo – WGBS

Para verificar y comparar el estado de metilación de la isla CpG presente en la región promotora de *Catsper2* murino, se realizó una búsqueda de datos de WGBS en la base de datos ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>) para diferentes tejidos y etapas de la espermatogénesis. Los datos fueron descargados en formato BigWig (

Tabla 1) y graficados en la región de interés usando RStudio v. 1.4.1103.

Tabla 1. Datos utilizados en los análisis *in silico* de WGBS y ChIP-Seq de marcas de histonas

Ensayo	Número de acceso o enlace	Tipo celular	Referencia
WGBS	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hub_8415_Sperm	Espermatogonias	[53]
		Espermatocitos	
		Espermátidas	
	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/Hon_Mouse_2013	Hígado	[54]
Bazo			
H3K4me3 ChIP-seq	SRR1049855 (A)	Espermatocitos	[55]
	SRR1049857 (I)	paquitenos	
	SRR1049856 (A)	Espermátidas	
	SRR1049858 (I)	redondas	
	SRR566800 (A)	Testículo 8 semanas	[56]
	SRR566962 (I)		
	SRR317233 (A)	Hígado 8 semanas	
	SRR317274 (I)		
H3K36me3 ChIP-seq	SRR566775 (A)	Testículo 8 semanas	
	SRR566962 (I)		

SRR566943 (A)	Hígado 8 semanas	[57]
SRR317274 (I)		
SRR6437434 (A)	Espermatocitos	
SRR6437435 (I)	paquiteno	
SRR6437436 (A)	Espermatocitos	
SRR6437437 (I)	paquiteno, KO <i>Setd2</i>	

7.2.2 Análisis de bases de datos de CHIP-Seq

Para verificar y comparar la presencia de las marcas de histonas H3K4me3 y H3K36me3 sobre la región promotora de *Catsper2* murino, se realizó una búsqueda de datos de CHIP-Seq en las bases de datos ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>) y Gene Expression Omnibus, GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) para diferentes tejidos o tipos celulares (

Tabla 1). Los datos evaluados fueron descargados de la base de datos Sequence Read Archive, SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) y analizados en UBUNTU v. 18.04.5 (los comandos utilizados para hacer los diferentes análisis hasta la llamada a picos se especifican en el Anexo 1). Con los datos obtenidos, se realizaron gráficas de comparación entre diferentes tipos celulares para ambas marcas de histonas utilizando RStudio v. 1.4.1103.

7.3 Construcciones con el promotor de *Catsper2* murino

Para evaluar el papel de los sitios de unión a los factores de transcripción CTCF y SP1, se realizaron diferentes construcciones partiendo de la construcción pCat2-243 que contiene el promotor mínimo de este gen.

7.3.1 Mutagénesis sitio dirigida

Los sitios de unión para los TFs CTCF y SP1 encontrados *in silico* en el promotor mínimo de *Catsper2* se mutaron mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida. Para esto, se diseñaron un par de oligonucleótidos que poseen mutaciones para cada sitio a evaluar (Tabla 2). Se hizo una mezcla de PCR que contenía: Buffer de reacción 1X, MgSO₄ 1 mM, Buffer enhancer 1X, mezcla de dNTPs 0.2 mM, 50-120 ng de DNA, 1U de la enzima platinum y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µL. Posteriormente, la mezcla se dividió en 2 tubos de PCR y a cada uno se le adicionó 7.5 µM de uno de los oligonucleótidos con la mutación. Las reacciones se llevaron a un termociclador Axygene Maxygene, con un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min y 10 ciclos de 94°C/30 s y 68°C/ 6 min, al término de los cuales, ambas reacciones se mezclaron en un solo tubo y se dieron 25 ciclos adicionales de 94°C/30 s y 68°C/6 min. Finalmente, el DNA molde de la PCR se eliminó agregando 1 µL de la enzima DpnI a la reacción y se incubó por 1h a 37°C. Se utilizaron 5 µL de la reacción final para transformar bacterias quimio competentes. Cada una de las construcciones fue verificada mediante secuenciación con los oligonucleótidos RVPrimer3 y Luc2Rev (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en el proyecto

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' -> 3'	Ensayo en el que fue usado
CTCF(1)mut Fw	GCGGAACAGCTGGTATTCTTATTGTGGCGGGCGCGCGGG	Mutagénesis sitio dirigida
CTCF(1)mut Rev	CCCGCGCGCCCGCCACAATAAGAATACCAGCTGTTCCGC	
CTCF(2)mut Fw	GGGCGCGCGGGGCGATTCTTATTGTTTCGCTTAGGCGAACGC	
CTCF(2)mut Rev	GCGTTCGCCTAAGCGAACATAAGAATCGCCCCGCGCGCCC	
CTCF(3)mut Fw	AGCCGGAGCGGCCCTTATTCTTGCCCGCTGGGGAGGAG	
CTCF(3)mut Rev	CTCCTCCCCAGCGGGCAAGAATAAGGGCCGCTCCGGCT	
Sp1(1)mut Fw	CCGATTGGCGGGCGCGCGTTATGAGGCGGGGCGGACGC	
Sp1(1)mut Rev	GCGTCCGCCCCGCTCATAACGCGCGCCCGCCAATCGG	
Sp1(2)mut Fw	GGCGGGCGCGCGGGGCGATTATGGGCGGACGCTTAGGCG	
Sp1(2)mut Rev	CGCCTAAGCGTCCGCCATAATCGCCCCGCGCGCCCCGCC	

Sp1(3)mut Fw	GCGCGCGGGGCGAGGCGTTATGGACGCTTAGGCGAACG	
Sp1(3)mut Rev	CGTTCGCCTAAGCGTCCATAACGCCTCGCCCCGCGCGC	
RVPrimer3*	CTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAG (T _m = 54°C)	Secuenciación en pGL4.10
Luc2Rev	GTCCCGTCTTCGAGTGGGTAG (T _m = 59°C)	
VP1.5*	GGACTTTCCAAAATGTCTG (T _m = 51°C)	
XL39*	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG (T _m = 60°C)	Secuenciación en pCMV6
CTCF(1) Wt EMSA Fw	GAGAACAGCTGGTAACTGCCGATTGGCGGGCGCGCGGG	EMSAs
CTCF(1) Wt EMSA Rev	CCCGCGCGCCCGCCAATCGGCAGTTACCAGCTGTTCTC	
CTCF(2) Wt EMSA Fw	GCGGGCGCGCGGGGCGAGGCGGGGCGGACGCTTAGGCG	
CTCF(2) Wt EMSA Rev	CGCCTAAGCGTCCGCCCCGCTCGCCCCGCGCGCCCGC	
CTCF(3) Wt EMSA Fw	AGCCGGAGCGGCCCTGAGCGCCACCCGCTGGGGAGGAG	
CTCF(3) Wt EMSA Rev	CTCCTCCCCAGCGGGTGGCGCTCAGGGCCGCTCCGGCT	
mMyc ChIP Fw	GAACCTGGAAACCCTGCAGCCC	ChIPs
mMyc ChIP Rev	GCCTCAAACACCAAGAGCCACC	
Int1 mMyc ChIP Fw	GCGTTGGAAACCCCGGTAAGC	
Int1 mMyc ChIP Rev	CGTCAGCCCATAGTAACCTCGG	
mCat2 ChIP Fw	GCGGAACAGCTGGTAACTGCCG	
mCat2 ChIP Rev	CTTTCGCGGGCCTCACTTCC	

*Oligonucleótidos reportados

7.3.2 Preparación de bacterias competentes

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

mL de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubó en hielo por 10 min; nuevamente se centrifugó a 7000 rpm por 10 min a 4°C, este proceso se repitió con 10 mL/incubación por 20 min y 5 mL/incubación por 30 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y se agregaron 200 µL de glicerol estéril. Las células competentes se dividieron en alícuotas de 50 µL o 100 µL en tubos eppendorf estériles y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para luego ser almacenadas a -70°C hasta su uso.

7.3.3 Transformación de bacterias competentes

Se colocaron 20-50 ng de plásmido o 5 µL de reacción de mutagénesis en un tubo de bacterias competentes (50 o 100 µL, respectivamente) y se mantuvo en hielo por 30 min; a continuación, se realizó un choque térmico, incubando a 42°C por 1 min y nuevamente en hielo por 1 min. Posteriormente, se agregó 1 mL de caldo LB a las células y se incubaron a 37°C por 1h en agitación constante. Pasado ese tiempo, las células se centrifugaron a 5000 rpm por 3 min a TA y se descartó 1 mL de medio. Las bacterias se resuspendieron en el volumen restante y se sembraron en placas de agar LB con kanamicina (0.05 mg/mL) o ampicilina (0.1 mg/mL) para seleccionar las colonias transformadas. Las placas se incubaron a 37°C por 18h aproximadamente. Las candidatas seleccionadas se aislaron en placas de agar LB con kanamicina o ampicilina.

7.4 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System y el kit QIAGEN Plasmid Midi, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El contenido de cada buffer se especifica en el Anexo 2. Los protocolos son los siguientes:

7.4.1 Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Se inoculó una colonia transformada con el plásmido de interés en 15 mL de caldo LB-ampicilina y se incubó a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min y se descartó el medio. Las bacterias se resuspendieron en 250 µL de solución de Resuspensión celular, se agregaron 250 µL de solución de Lisis celular y se mezcló por inversión 4 veces; se adicionaron 10 µL 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 µL 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 µL y 250 µL de Solución de lavado, respectivamente. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 50 µL de agua estéril libre de nucleasas y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min a TA. El DNA se almacenó a -20°C.

7.4.2 QIAGEN Plasmid Midi Kit

Se inocularon bacterias transformadas con el plásmido de interés en 100 mL de caldo LB-ampicilina (0.1 mg/mL) o LB-kanamicina (0.05 mg/mL) y se incubaron a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células en un tubo falcon estéril a 7000 rpm por 15 min a 4°C y se decantó el medio. Las células se resuspendieron en 10 mL de la solución P1 del kit con 0.1 mg/mL de RNasa y luego se agregaron 10 mL de buffer P2 (buffer de lisis), se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó a TA por 5 min. Después de la incubación, se neutralizó la reacción añadiendo 10 mL del buffer P3 frío, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó en hielo por 15 min. Posteriormente, se centrifugó a ≥ 12500 rpm por 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se repitió el paso anterior para eliminar cualquier residuo; luego, el sobrenadante se pasó por una columna de purificación, previamente equilibrada con 10 mL de buffer QBT. Seguidamente, se lavó la columna 2 veces con 30 mL de buffer QC y se transfirió a

un tubo nuevo, en donde se eluyó el DNA con 15 mL de buffer QF. Se utilizaron 10.5 mL de isopropanol a TA y se centrifugó a ≥ 12500 rpm por 30 min para precipitar el DNA. El pellet se limpió con 5 mL de etanol 70% y se centrifugó a ≥ 12500 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el DNA. Por último, se resuspendió en 100 μ L de agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a -20°C .

7.5 Secuenciación del DNA

Para verificar la secuencia de las diferentes construcciones, se utilizó el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ L que contenía 4 μ L de Buffer de secuenciación 5X, 2 μ L de mix de reacción, 10 pM de oligonucleótido (Tabla 2) y 1 μ g de DNA plasmídico. La reacción se llevó a cabo en termociclador con un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C por 4 min, 30 ciclos a $96^{\circ}\text{C}/30$ s, $T_m/30$ s (ver T_m de cada oligonucleótido en la Tabla 2) y $60^{\circ}\text{C}/4$ min y un ciclo de extensión final a 60°C por 5 min.

7.6 Verificación de las construcciones con los genes de los factores transcripcionales CTCF y SP1

Para evaluar el efecto de las proteínas CTCF y SP1 sobre el promotor de *Catsper2*, se adquirieron plásmidos comerciales (10 μ g) de la empresa OriGene© con el marco abierto de lectura (ORF) de cada uno de los TFs: CAT# MR210366 para CTCF (CTCF-pCMV6) y CAT# MR225692 para Sp1 (Sp1-pCMV6). La identidad de ambos plásmidos se evaluó mediante ensayos de restricción enzimática y de secuenciación. Para esto, los plásmidos liofilizados se resuspendieron en 20 μ L de agua libre de nucleasas estéril y se transformaron bacterias competentes con 50 ng. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico de las bacterias transformadas y se realizó digestión enzimática a 1 μ g de DNA

en una reacción de volumen final 20 μ L (Buffer de la enzima 1x, 1U de BamHI o DpnI y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen). Además, se usaron los oligonucleótidos VP1.5 y XL39 (Tabla 2) para realizar secuenciación siguiendo la metodología descrita anteriormente.

7.7 Cultivos celulares

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

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

7.7.1 Transfección de la línea celular

Siguiendo el procedimiento descrito en el pase celular, se sembraron 1×10^5 células en 500 μ L de medio DMEM suplementado en placas de 24 pozos. Las células se incubaron a 37°C por 24h hasta una confluencia de 70-80%. Las células GC-1 spg se prepararon 2h antes de ser transfectadas, agregando 5 μ L del reactivo K2 multiplier en cada pozo;

posteriormente, las mezclas de transfección se prepararon con el reactivo K2[®] Transfection System (Tabla 3).

Tabla 3. Mezclas de transfección empleadas en el proyecto

	Sitios CTCF		Sobreexpresión CTCF		Sitios Sp1		Sobreexpresión Sp1		pGL4.10	pGL4.10-CMV
Promotor Wt (pCat2-243)	250 ng	-	250 ng	-	250 ng	-	250 ng	-	-	-
Promotor mutado, CTCF(1), (2) o (3)	-	250 ng	-	250 ng	-	-	-	250 ng	-	-
Promotor mutado, Sp1(1), (2) o (3)	-	-	-	-	-	250 ng	-	-	-	-
CTCF-pCMV6	-	-	250ng	250 ng	-	-	-	-	-	-
Sp1-pCMV6	-	-	-	-	-	-	250ng	250 ng	-	-
pGL4.10	-	-	-	-	-	-	-	-	250 ng	-
pGL4.10-CMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ng
pRL-CMV	0.4 ng para cada pozo									
K2 transfection Reagent	2 µl para cada pozo									
DMEM no suplementado	Hasta completar un volumen de 60 µl para cada pozo									

Cada mezcla se incubó a TA por 15 min y luego se depositaron en los pozos (placas de 24 pozos). Se usó el plásmido pGL4.10 con el promotor de Citomegalovirus (pGL4.10-CMV) como control positivo de transfección, el plásmido pGL4.10 vacío como actividad basal de referencia y un plásmido con la luciferasa de *Renilla reniformis* y el promotor de CMV (pRL-CMV) como control interno de transfección con el que se realizó la normalización de los datos obtenidos. Además, se dejó un pozo de células sin transfectar para restar el fondo de las células.

7.7.2 Lisis celular y ensayos de luciferasa

Para cuantificar la actividad de luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System de Promega. A las 48h pos-transfección se realizó la lisis de las células, para lo cual, se eliminó cuidadosamente todo el medio de cultivo, se lavaron las células con 100 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.

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

La lectura de la muestra de las células sin transfectar y de un pozo sin muestra se usaron para restar los fondos, la lectura de la actividad de *Renilla reniformis* se usó para normalizar los valores de *Photinus pyralis* y el valor obtenido para pGL4.10 se tomó como una unidad relativa de luciferasa para escalar los valores obtenidos en los diferentes ensayos.

7.8 Detección de la expresión de CTCF y SP1

La sobreexpresión de las proteínas SP1 y CTCF en las líneas celulares GC-1 spg y HEK293 se comprobó a partir de la extracción de proteína total de células transfectadas (9×10^5 células) con las respectivas construcciones CTCF-pCMV6 y Sp1-pCMV6, mediante inmunodetección por Western Blot (WB).

7.8.1 Extracción de proteína total

Se retiró cuidadosamente todo el medio de cultivo de las células y se lavaron 3 veces con PBS 1X estéril; posteriormente, se agregó 1 mL de PBS 1X a cada pozo de células y se resuspendieron con la pipeta para luego ser transferidas a un tubo de 1.5 mL estéril. El pellet de células se obtuvo centrifugando a 2500 rpm por 5 min. Las células se resuspendieron con ayuda de una jeringa de insulina, en el buffer RIPA (Anexo 3) suplementado con inhibidores de proteasas y se incubaron 30 min en hielo. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad por 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante con la proteína total.

7.8.2 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína obtenida en la extracción se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford. Para esto, se realizó una curva de calibración, usando diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) y el reactivo de Bradford, en un volumen total de 1 mL (Tabla 4). En el caso de las muestras evaluadas, se diluyó 1 μ L de proteína en 799 μ L de agua destilada y se agregaron 200 μ L del reactivo de Bradford. En todos los casos, la reacción se incubó a TA en oscuridad por mínimo 5 min y posteriormente se leyó la absorbancia de las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro.

Con los datos obtenidos para el BSA, se graficó una curva y se calculó el valor de R^2 y la ecuación de la recta, para calcular la concentración de cada muestra en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabla 4. Concentraciones de BSA empleadas para obtener la curva de calibración en el método de cuantificación Bradford

Agua destilada (μL)	BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Reactivo de Bradford
800	0	200 μL cada uno
799.5	0.5	
799	1	
798	2	
796	4	
792	8	
788	12	

7.8.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para separar las proteínas se usaron geles de poliacrilamida 10% de 1.5 mm (Tabla 5). Cada una de las muestras (50 μg) se mezcló con buffer de carga de proteínas 2X y se llevó a 95°C por 10 min, posteriormente se pusieron en hielo hasta que se cargaron en el gel de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en buffer TANK 1X (Buffer TANK 10X: 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 1% SDS) a amperaje constante de 0.02-0.03 A. Se corrieron 2 geles idénticos, uno con el que se transfirieron las proteínas para la inmunodetección y el otro que se tiñó con azul de Comassie y se observó la separación de las muestras.

Tabla 5. Reactivos y cantidades para geles de electroforesis SDS-PAGE

	Reactivo	Cantidad
Gel de resolución	Acrilamida-Bisacrilamida 30% 29:1	2.67 mL
	Bufer Tris-SDS pH 8.8	2 mL
	H ₂ O	3.33 mL
	Persulfato de amonio (APS) 10%	60 μL

	TEMED	6 μ L
Gel concentrador	Acrilamida-Bisacrilamida 30% 29:1	492 μ L
	Bufer Tris-SDS pH 6.8	780 μ L
	H ₂ Od	1.74 mL
	APS 10%	40 μ L
	TEMED	4 μ L

7.8.4 Inmunodetección de proteínas por Western-blot

El gel de poliacrilamida se transfirió en semiseco a una membrana de PVDF. Primero, la membrana de PVDF del tamaño adecuado se equilibró en metanol por 1 min; posteriormente, la membrana, el gel de poliacrilamida, 2 blot paper y 4 papeles filtro, se equilibraron en buffer de transferencia (Buffer TANK 1X sin SDS más 20% de metanol), por al menos 30 min a 4°C en agitación constante. Una vez equilibrados, los componentes se acomodaron en la cámara de transferencia como se muestra en la Figura 13 y el proceso se llevó a cabo a 25V por 1h.

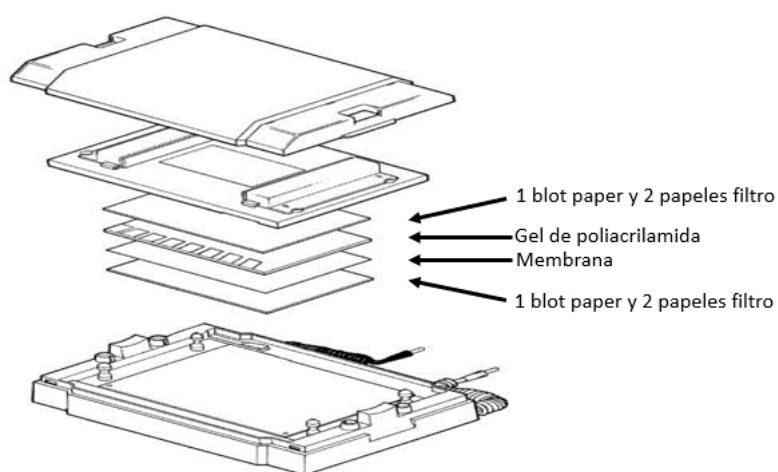


Figura 13. Esquema del proceso de transferencia de un gel de poliacrilamida a una membrana. Se ilustra la forma en que se acomoda la cámara de transferencia en semiseco para transferir un gel de poliacrilamida a una membrana, ya sea de PDVF o de nylon.

Una vez se obtuvo la membrana con la proteína, esta fue bloqueada en un volumen suficiente de solución de bloqueo (buffer TBS-T 1X [NaCl 15 mM, Tris 20mM, 0.1% Tween 20, pH 7.6] con 5% de leche Svelty), por 2h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiró la solución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo anti-c-myc (Cat. No. SC-40 Santa Cruz) o con el anticuerpo anti-CTCF (Cat. No. SC-271474 Santa Cruz), cada uno diluido 1:500 en buffer TBS-T 1X, toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 5 lavados con buffer TBST por 5 min en agitación constante cada uno para luego incubar la membrana con el anticuerpo AP-Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Cat. No. 62-6522 Invitrogen) diluido 1:1000 en buffer TBS-T 1X por 1h a TA en agitación constante. Finalmente, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 5 lavados con buffer TBST por 5 min en agitación constante cada uno.

Al terminar los lavados de la membrana, se incubó con el reactivo BCIP[®]/NBT Liquid Substrate System (Cat. No. B1911 SIGMA) por 20 min a TA para revelar las bandas detectadas correspondientes a la proteína sobre-expresada. Se utilizaron las bandas correspondientes a c-myc endógeno como control de carga de proteína.

7.9 Predicción de la interacción de Sp1 con el promotor de *Catsper2* murino

Para evaluar *in silico* la interacción del factor de transcripción Sp1 con el promotor mínimo de *Catsper2*, se descargaron los archivos de las coordenadas atómicas (x, y, z en formato pdb) de los tres dedos de zinc que forman el dominio de unión a DNA de Sp1 de la base de datos RCSB (<https://www.rcsb.org/>, ID 1VA1, 1VA2 y 1VA3); además, con la herramienta “DNA sequence to structure” (<http://scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/bdna.jsp#>) se generó un archivo con las coordenadas atómicas en formato pdb de la secuencia de DNA de una región de 18 pb que contiene los tres sitios de unión para Sp1 del promotor de *Catsper2* (CGGGGCGAGGCGGGGCGG); con estos archivos se generaron modelos de interacción utilizando el servidor HDOCK

(<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) y diagramas de las interacciones ligando-proteína con el programa LigPlot (LigPlot+ v.2.2 <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>), los resultados fueron visualizados y editados en el programa Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>, Chimera v.1.14).

7.10 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Con el fin de analizar la interacción *in vitro* de las proteínas CTCF y Sp1 con la región promotora de *Catsper2*, se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), utilizando las sondas descritas en la Tabla 2 y extracto total de proteína de células GC-1 spg transfectadas con CTCF-pCMV6 o Sp1-pCMV6.

7.10.1 Marcado y verificación de sondas

Para el ensayo de EMSA de CTCF se utilizó el kit EMSA quimioluminiscente LightShift™ por lo que las sondas se marcaron con biotina; para esto, se usó 1 nmol de cada oligo complementario (Tabla 2) y se resuspendieron en 50 µl de Tris (10 mM), EDTA (1 mM, pH 8) y NaCl (100 mM), se calentó a 95°C por 10 min y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente. Para marcar la sonda, se tomaron 5 µL (100 pmol) del oligo en cadena doble y se mezclaron con 2.5U de la enzima *terminal transferase* (TdT), buffer de la enzima 1X, buffer de CoCl₂ 1X, 1 mM de Biotin 11-dUTP (Cat. No NU-1619-BIOX-L, Jena Bioscience), en un volumen final de 20 µL; la reacción se incubó a 37°C por 1h. Posteriormente, la sonda marcada se precipitó agregando 2 µL de LiCl 4M y 60 µL de etanol absoluto frío y se incubó a -70°C por 2h; seguido de esto, el DNA se recolectó por centrifugación a máxima velocidad por 30 min a 4°C; el pellet se lavó con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad por 15 min a 4°C. Finalmente, el DNA seco se resuspendió en 40 µL de agua mili Q estéril para obtener una concentración final de 2.5 pmol/µL y se guardó a -20°C.

Para verificar el marcado de las sondas se realizó la técnica de dot-blot como sigue: se diluyó la sonda a una concentración final de 500 fmol y 1000 fmol y se puso 1 μ L de cada concentración sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Amersham Hybond- N+, GE Healthcare), seguido de esto se fijó el DNA en la membrana con luz UV 312 nm por 15 min. Para revelar se siguieron las indicaciones del kit, brevemente: se bloqueó la membrana con buffer de bloqueo por 30 min, después se incubó en una solución 1:300 de estreptavidina-HRP en buffer de bloqueo por 15 min, a continuación, se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con buffer de lavado y posteriormente, se equilibró la membrana por 5 min en buffer de equilibrio. Finalmente, se incubó la membrana en solución de Luminol/Enhancer por 5 min y la señal fue revelada en cuarto oscuro con radiografías.

Para el ensayo de EMSA de Sp1, se utilizaron las construcciones pCat2-243, Sp1(1), Sp1(2), Sp1(3) para hacer restricción enzimática con las enzimas HindIII y XhoI y liberar el fragmento con el promotor mínimo de *Catsper2* WT y con los sitios de unión a Sp1 mutados; los fragmentos fueron cortados del gel, purificados y cuantificados.

7.10.2 Reacciones de unión proteína-DNA

Las reacciones de interacción se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L conteniendo binding buffer 1x, ZnSO₄ 0.1 mM, 2.5 pmol o 200 ng de sonda para CTCF o Sp1, respectivamente, para las muestras de sonda libre; para la formación de complejos se agregó 3 μ g de proteína total de células sobreexpresando a CTCF o Sp1. En el ensayo para Sp1, además se hizo una reacción en la que se agregó 1 μ g de anticuerpo anti-Sp1 (Santa Cruz, sc-17824). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 20 min y finalmente se agregó buffer de carga para realizar la electroforesis.

7.10.3 Electroforesis, transferencia y revelado

Para el ensayo de CTCF, la electroforesis se realizó en gel de acrilamida (80:1) 5%, preparado con buffer TBE. Antes de cargar las muestras, el gel se pre corrió en buffer TBE 0.5x frío a 80 V por 45 min. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 1 h y la transferencia se hizo siguiendo la metodología descrita en el apartado 7.8.4 con pequeñas variaciones: la transferencia se hizo a una membrana de nylon cargada positivamente (Amersham Hybond- N+, GE Healthcare) usando buffer TBE 0.5x a 70V por 30 min. Finalmente, la membrana fue procesada como se describió previamente para el ensayo de dot blot en el apartado 7.10.1.

Para el ensayo de Sp1, la electroforesis se realizó en gel de agarosa 2.5% preparado con TBE 0.5x y bromuro de etidio 0.5 µg/mL, las muestras se corrieron a 250 V por 15 min y se revelaron en un transiluminador.

7.11 Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para analizar la interacción *in vivo* del factor de transcripción CTCF con la región promotora de *Catsper2* murino, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina utilizando testículo, hígado o bazo de ratones de 3-4 y 6-8 semanas de edad, de acuerdo con el protocolo de X-ChIP del libro de protocolos de abcam (<https://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book.pdf>) con pequeñas modificaciones.

7.11.1 Crosslinking y sonicación de las muestras

Para cada ensayo se partió de 70 mg de tejido fresco, el cual fue lavado con PBS 1x frío y puesto en una caja de Petri sobre hielo y con ayuda de bisturí, jeringas y micropipetas se disgregó muy bien el tejido tratando de separar las células lo mejor posible. Posteriormente, se transfirió a un tubo falcon y se dejó sedimentar por 3 minutos en

hielo para descartar el tejido que no se disgregó por completo. Seguido de esto, se devolvió el sobrenadante con las células a la caja de Petri y se completó el volumen hasta 4.5 mL con PBS 1X frío, se agregaron 0.148 mL de formaldehído 37% y 0.352 mL de HEPES 1M pH 7.8. Esta mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave y constante y posteriormente se detuvo la reacción agregando glicina a una concentración final de 0.125M. Después de 5 minutos de agitación suave, las células se transfirieron a un tubo falcon y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se hicieron 2 lavados con PBS 1X frío. Para lisar las células, se resuspendieron en 1.6 mL de buffer Swelling (Anexo 4) y se incubaron en hielo por 10 minutos; seguido de esto, las células se centrifugaron (2000 rpm/5 min/4°C), se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1.6 mL de buffer de sonicación (Anexo 4). Para lisar los núcleos y fragmentar la cromatina se analizaron diferentes condiciones de sonicación, incluyendo tres porcentajes de amplificación (30%, 50% y 80%), diferentes números de pulsos (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80) y tiempo de cada pulso (15/45 y 30/30). Los fragmentos obtenidos se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

7.11.2 Incubación con el anticuerpo y precipitación de los complejos

Una vez que se seleccionaron las condiciones óptimas de sonicación de la cromatina, se utilizaron aproximadamente 25 µg de cromatina para cada ensayo de inmunoprecipitación, diluyendo 1:10 en buffer RIPA. Se realizó un pre-aclarado de la muestra con 20 µL de perlas de proteína G agarosa (Cat. No. SC-2002, Santa Cruz) por 2h en agitación constante a 4°C, transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm por 1 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo en el que se agregaron 2 µg del anticuerpo anti-CTCF (Ver 7.8.4) o anti-MHC-II (eBioscience, 14-5321-81) como control IgG irrelevante; las muestras se incubaron en agitación constante a 4°C toda la noche (aproximadamente 16h). Al día siguiente, se agregaron 20 µL de perlas de proteína G agarosa a cada tubo y se incubó nuevamente a 4°C en agitación constante por 2h para luego centrifugar las muestras (2000 rpm/1 min/4°C), las perlas se lavaron

sucesivamente con buffer bajo en sales, buffer alto en sales y buffer de cloruro de Litio (Anexo 4), después de cada lavado se centrifugaron las perlas y descartó el sobrenadante. Finalmente, el DNA se eluyó agregando 120 μ L de buffer de elución (Anexo 4) a cada tubo e incubando por 15 min a 30°C. Después de centrifugar, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 4.8 μ L de NaCl 5M y 2 μ L de RNAsa A (10 mg/mL), se incubó a 65°C por 4h y posteriormente se agregaron 2 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 60°C por 30 min. El DNA se extrajo mediante el método de fenol cloroformo, se resuspendió en 20 μ L de agua miliQ estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.11.3 Amplificación de la región promotora de *Catsper2* murino

Para evaluar la presencia del promotor de *Catsper2* en el DNA precipitado, se realizaron ensayos de PCR utilizando los oligos descritos en la Tabla 2. Las mezclas de PCR consistieron en buffer 1X de la polimerasa, 200 μ M de dNTPs, 0.2 μ M de cada oligonucleótido (forward y reverse), 1U Taq Polimerasa (NEB) y 2 μ L de DNA. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de BioRad bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 96°C por 5 min, 40 ciclos de: desnaturalización 96°C/30 s, alineamiento 68°C/30 s y extensión 72°C/30 s y 1 ciclo final de extensión a 72°C por 5min. Los fragmentos fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

8 RESULTADOS

8.1 La isla CpG que se encuentra sobre el promotor mínimo de *Catsper2* no está metilada

En un análisis *in silico* previo se encontró una isla CpG sobre la región promotora del gen *Catsper2* murino; con el objetivo de determinar el estado de metilación de esta región,

se hizo una búsqueda de datos de WGBS en el Genome Browser de la UCSC, para etapas específicas de la espermatogénesis y para órganos control y los archivos se descargaron en formato BigWig (Tabla 1). Con estos datos, se obtuvo una gráfica del perfil de metilación de la región del cromosoma 2 en donde se ubica el inicio de la transcripción de *Catsper2* (Figura 14) en donde se pudo observar que la isla CpG presente en esta zona se encuentra no metilada tanto en células de espermatogonias, espermátocitos y espermátidas, que forman parte del proceso de espermatogénesis, así como en hígado y bazo en donde normalmente no hay expresión de *Catsper2*; indicando que la expresión tejida específica de este gen no se debe a un patrón diferencial de metilación en la isla CpG de su promotor.

8.2 La marca de histonas H3K4me3 se localiza sobre el promotor de *Catsper2* murino.

Otro mecanismo de regulación epigenética es mediante las marcas de histonas y una de las más estudiadas es la H3K4me3, ya que ha sido relacionada a regiones promotoras. Con el fin de determinar si esta marca se encuentra sobre el promotor de *Catsper2*, se hizo una búsqueda en diferentes bases de datos y los archivos de datos de CHIP-seq para H3K4me3, se procesaron de acuerdo con lo descrito en la metodología. Con los archivos BiGwig que se generaron, se graficó la señal en la región del promotor de *Catsper2* (Figura 15), con lo que se evidenció la localización de la marca H3K4me3 en esta región tanto para células de testículo como para hígado (usado como tejido control), demostrando la función promotora de esta región *in vivo*.

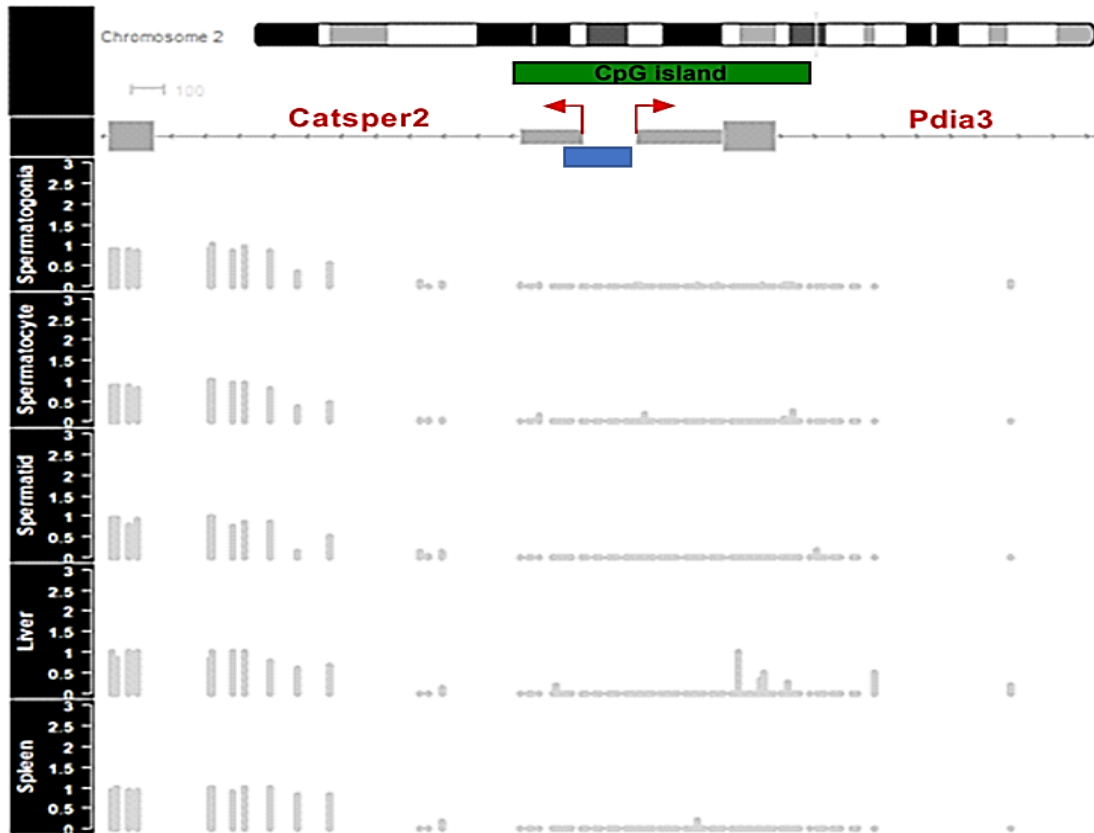


Figura 14. Estado de metilación de la isla CpG encontrada en el promotor de *Catsper2*, basado en análisis de datos de WGBS. Los datos de WGBS para espermatogonias, espermatocitos, espermátidas, hígado y bazo fueron obtenidos de ENCODE y se graficó la región promotora del gen *Catsper2* murino; la escala muestra a los sitios CpG no metilados como 0 y a los sitios CpG completamente metilados como 1, representada en color gris. El rectángulo verde indica la posición de la isla CpG y el rectángulo azul la posición del promotor mínimo de *Catsper2*. Los inicios de transcripción se indican con flechas rojas.

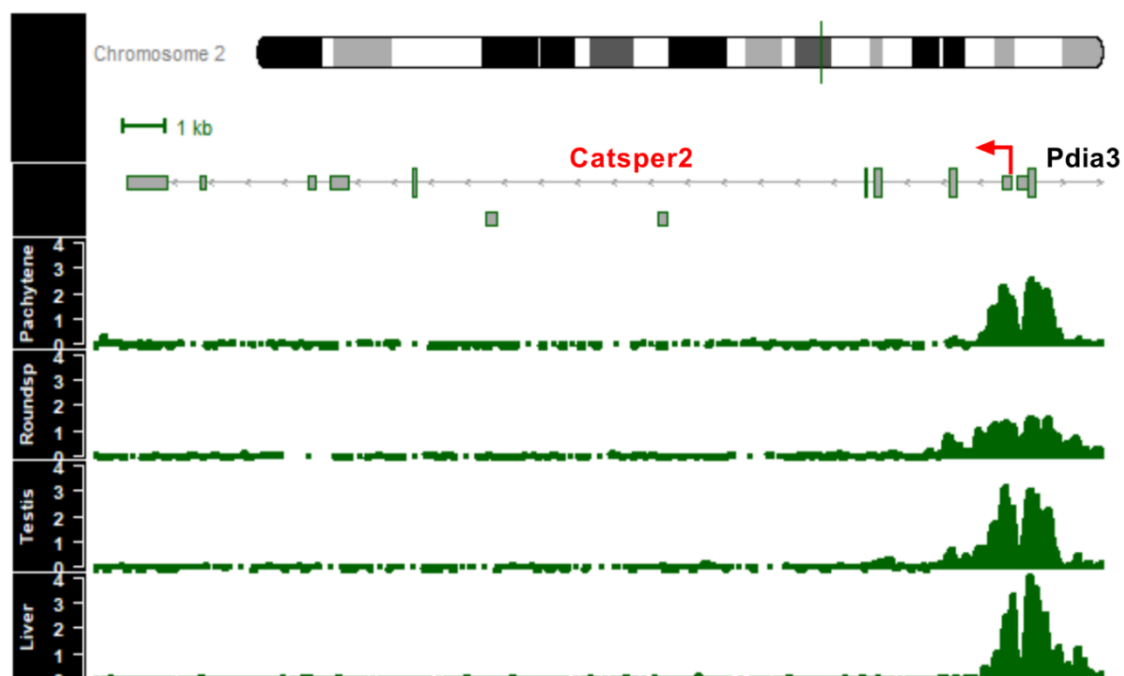


Figura 15. Patrón de H3K4me3 en el locus de *Catsper2* basado en análisis de datos de CHIP-seq. Los datos de CHIP-seq para H3K4me3 en espermatocitos (Pachytene), espermatidas (Roundsp), testículo (testis) e hígado (liver) fueron analizados como se describe en la metodología; la señal de H3K4me3 está representada en color verde. Las líneas y rectángulos en gris representan la estructura del gen *Catsper2* murino y el primer exón y parte del primer intrón del gen divergente *Pdia3*. La fleche roja marca el sitio de inicio de la transcripción.

8.3 La marca H3K36me3 sobre *Catsper2* murino es específica de testículo

Otra marca de histonas que ha sido asociada con elongación de la transcripción y por tanto a genes transcripcionalmente activos, es la marca H3K36me3. Con el fin de evaluar la presencia de esta marca sobre *Catsper2*, los datos de CHIP-seq para H3K36me3 obtenidos de la búsqueda en bases de datos, se procesaron de la forma anteriormente descrita; los archivos BigWig que contienen la señal de las lecturas, fueron utilizados para graficar la región que corresponde al locus de *Catsper2* y de *Pdia3* (Figura 16), mostrando un patrón diferente en la presencia de esta marca sobre el locus de *Catsper2*, cuando se compara testículo contra hígado, diferencia que se hace más notoria en el hígado al comparar la señal de esta marca sobre *Catsper2* con respecto a *Pdia3*, gen que tiene una

expresión ubicua. Estos resultados que revelan una posible implicación de la marca H3K36me3 en la expresión tejido-específica de *Catsper2*.

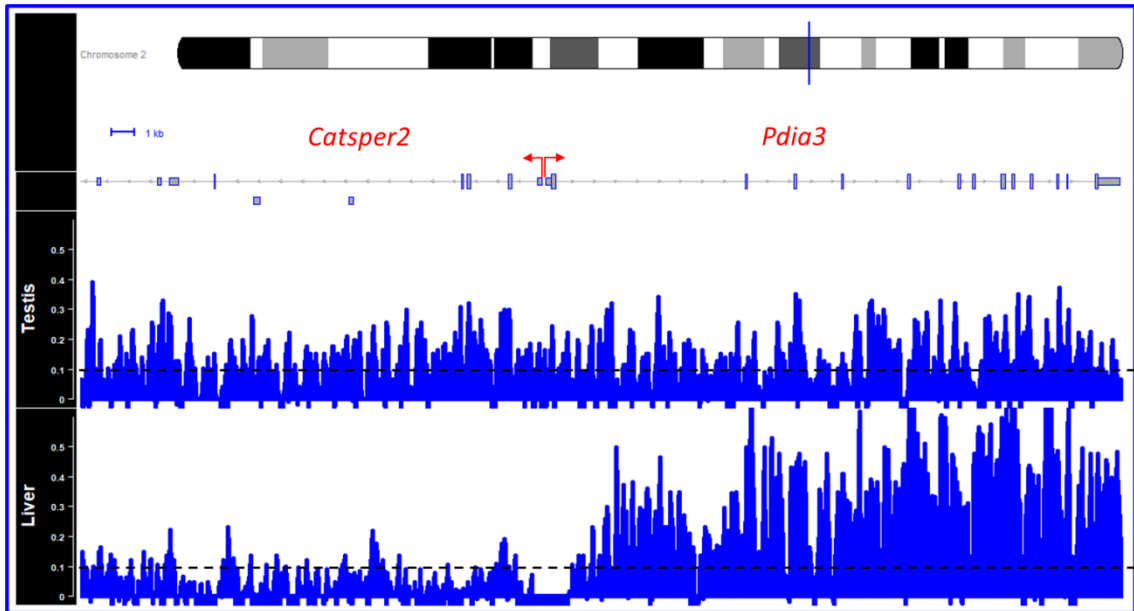


Figura 16. Patrones de la marca H3K36me3 en el locus de *Catsper2* y *Pdia3* basado en análisis de datos de CHIP-seq. Los datos de CHIP-seq para H3K36me3 de testículo e hígado de ratones de ocho semanas de edad se graficaron en la región que comprende los genes *Catsper2* y *Pdia3*. Las líneas y rectángulos grises representan la estructura de los genes *Catsper2* y *Pdia3*. Las líneas punteadas negras muestran un incremento de 2 veces normalizado con las muestras input de cada tejido, respectivamente. Las flechas rojas marcan el sitio de inicio de la transcripción.

Para confirmar los resultados anteriores, se comparó la señal de H3K36me3 en células de espermatoцитos wild-type (WT) con células de espermatoцитos knock out (KO) para *Setd2*, gen que codifica para la proteína encargada de poner el grupo metilo en la marca H3K36me. Como se observa en la Figura 17, hay una clara diferencia entre la presencia de esta marca de histonas entre los espermatoцитos WT y los espermatoцитos KO, reafirmando que H3K36me3 se encuentra sobre el gen *Catsper2* en células de testículo.

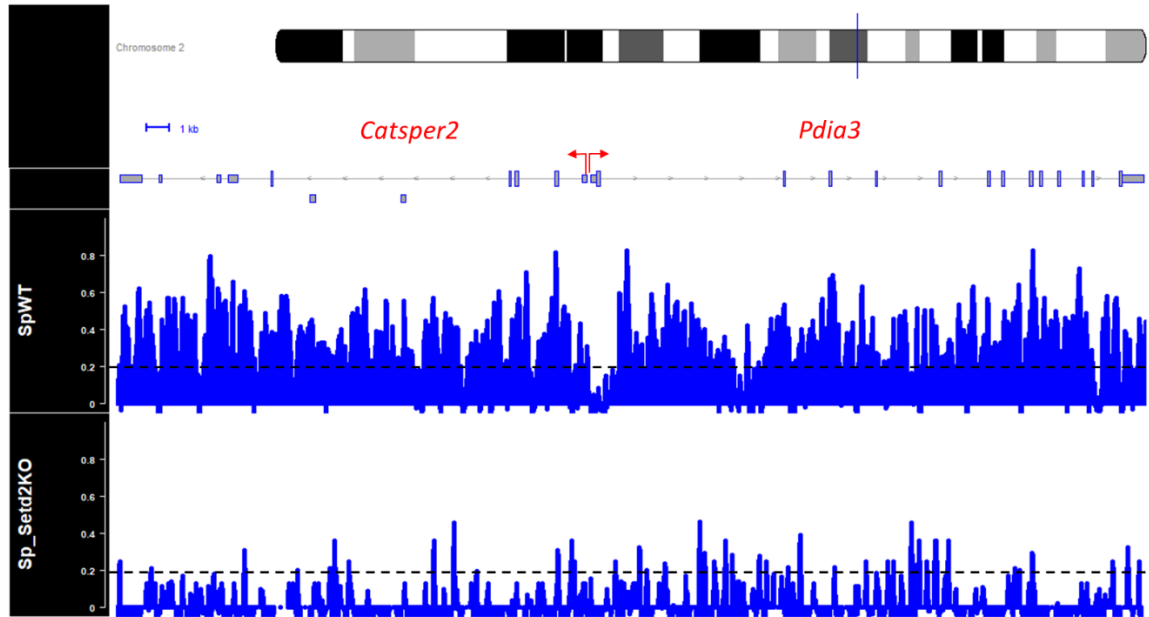


Figura 17. Señal de H3K36me3 en espermatocitos wild-type y espermatocitos Knock out de *Setd2*. Los datos de ChIP-seq para H3K36me3 de espermatocitos wild-type (SpWT) y espermatocitos Knock out de *Setd2* (Sp_Setd2KO) se graficaron en la región que comprende los genes *Catsper2* y *Pdia3*. Las líneas y rectángulos grises representan la estructura de los genes *Catsper2* y *Pdia3*. Las líneas punteadas negras muestran un incremento de 2 veces normalizado con las muestras input de cada tejido, respectivamente. Las flechas rojas marcan el sitio de inicio de la transcripción.

8.4 Funcionalidad de los sitios putativos CTCF y Sp1 en el promotor mínimo de *Catsper2*

Para determinar la funcionalidad de los sitios putativos de unión a los factores de transcripción CTCF y Sp1, encontrados a través del análisis *in silico* en el promotor mínimo de *Catsper2*, se generaron mutaciones sobre los sitios “core” de interacción para estas proteínas en la construcción con el promotor mínimo previamente obtenida (tesis maestría). Se obtuvieron las mutantes CTCF(1), CTCF(2) y CTCF(3) y las mutantes Sp1(1), Sp1(2) y Sp1(3) para evaluar los 3 posibles sitios de unión de CTCF y Sp1, respectivamente. Estas construcciones fueron verificadas mediante secuenciación (Figura 18 y Figura 19) y el efecto de las mutaciones sobre la actividad transcripcional del

promotor mínimo de *Catsper2* fue analizado realizando transfecciones en la línea celular GC-1 spg y posteriormente, ensayos de luciferasa.

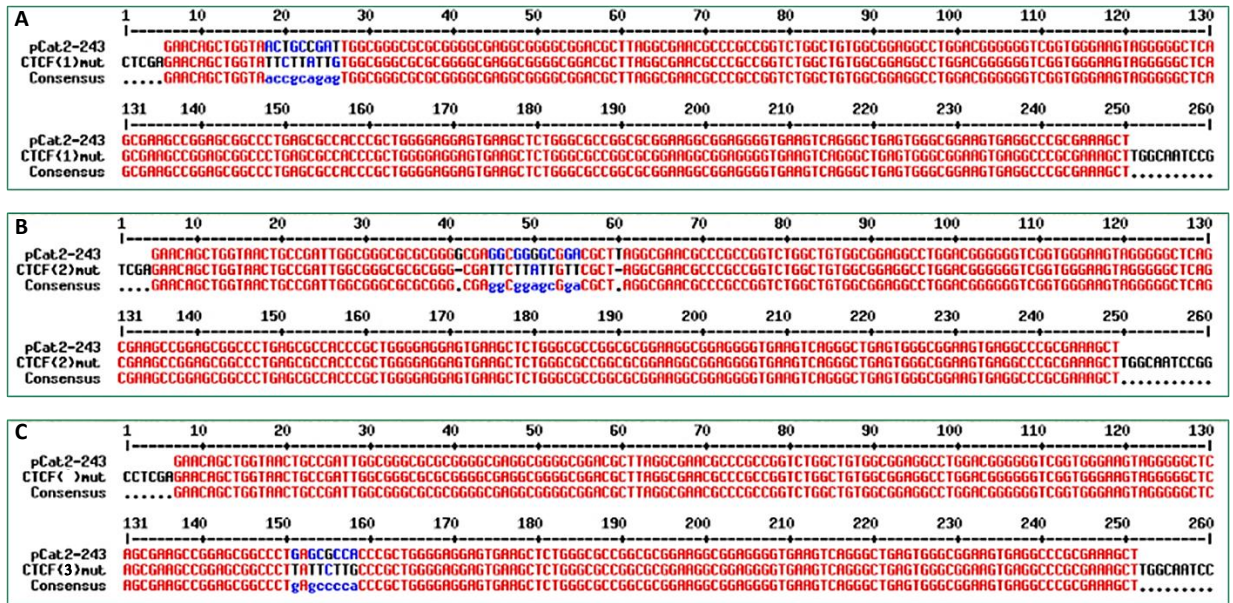


Figura 18. Verificación de la mutación de los sitios de unión a CTCF del promotor mínimo de *Catsper2* murino. Las construcciones conteniendo cada uno de los posibles sitios de unión para CTCF del promotor mínimo de *Catsper2*, (A) CTCF(1), (B) CTCF(2) y (C) CTCF(3) fueron verificadas mediante secuenciación y alineamiento con la secuencia wild type del promotor mínimo (pCat2-243). En color azul y negro se muestran las bases mutadas en cada construcción.

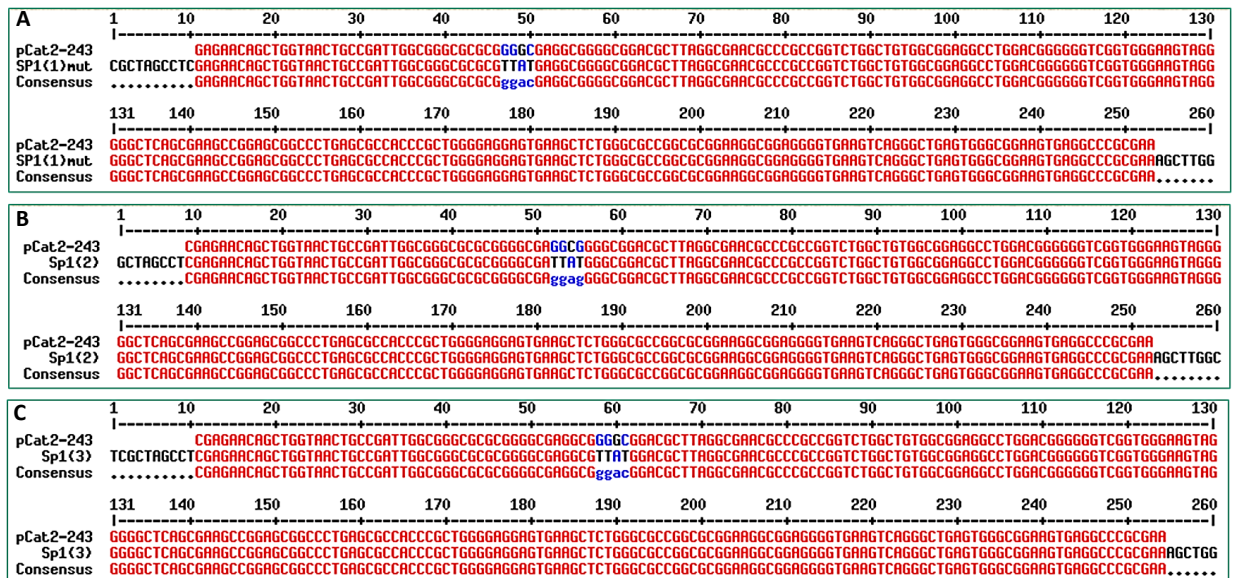


Figura 19. Verificación de la mutación de los sitios de unión a Sp1 del promotor mínimo de *Catsper2* murino. Las construcciones conteniendo cada uno de los posibles sitios de unión para

Sp1 del promotor mínimo de *Catsper2*, (A) Sp1(1), (B) Sp1(2) y (C) Sp1(3) fueron verificadas mediante secuenciación y alineamiento con la secuencia wild type del promotor mínimo (pCat2-243). En color azul y negro se muestran las bases mutadas en cada construcción.

8.5 Papel de los sitios de unión para CTCF y Sp1 del promotor de *Catsper2* murino

Como se observa en la Figura 20, la mutación del sitio 1 de unión para CTCF (CTCF(1)), disminuyó la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Catsper2* de 36.92 unidades a 20.50 unidades, representando una disminución del 44.5%, asimismo, la mutante CTCF(2), presentó una disminución de la actividad transcripcional hasta 8.80 unidades, es decir, el 76.1%. Por otro lado, la mutante CTCF(3) tuvo una disminución del 5% de la actividad transcripcional, sin embargo no fue estadísticamente significativa al compararse con la actividad del promotor wild-type. Estos resultados permitieron concluir que los sitios 1 y 2 de unión para CTCF del promotor mínimo de *Catsper2* murino influyen en la actividad promotora de esta región como sitios activadores de la transcripción.

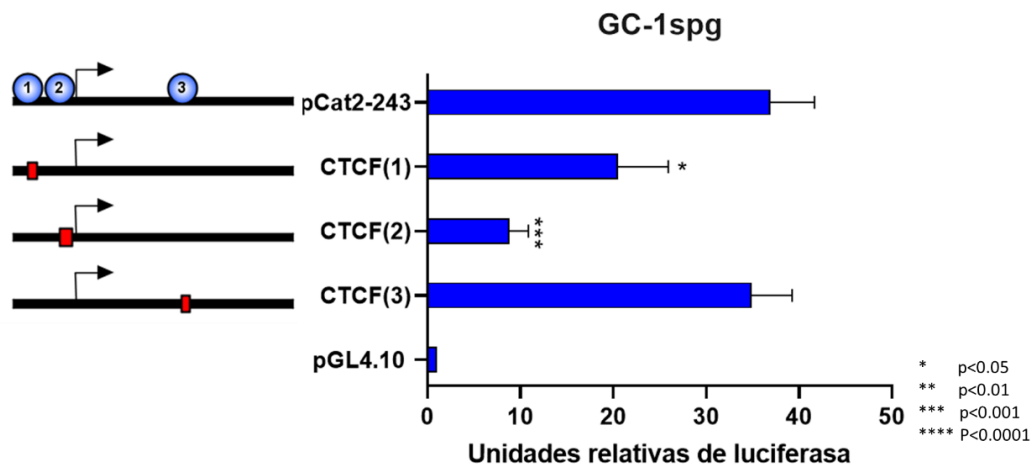


Figura 20. Efecto de la mutación de los sitios de unión para CTCF sobre la actividad del promotor mínimo de *Catsper2* murino. Las construcciones con los sitios de unión para CTCF del promotor mínimo de *Catsper2* mutados, fueron transfectadas en la línea celular GC-1 spg y 48h después, las células fueron lisadas para realizar ensayos de luciferasa. Para cada condición, se realizó la co-transfección con el vector pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus) para realizar la normalización de los datos. La actividad transcripcional se calculó como número de veces de incremento con respecto a la actividad del vector vacío

pGL4.10 (luciferasa de *Photinus pyralis*), la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos realizados de forma independiente por triplicado (media \pm SEM, n=9). Los * indican las diferencias estadísticamente significativas, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Por otro lado, la mutación del sitio Sp1(1) tuvo una tendencia hacia el aumento de la actividad promotora del 60% con respecto del promotor wild-type, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas como también se observó con las construcciones Sp1(2) y Sp1(3), . Estos resultados sugieren que los sitios mutados en las construcciones evaluadas no tienen un efecto sobre la actividad del promotor mínimo de *Catsper2*.

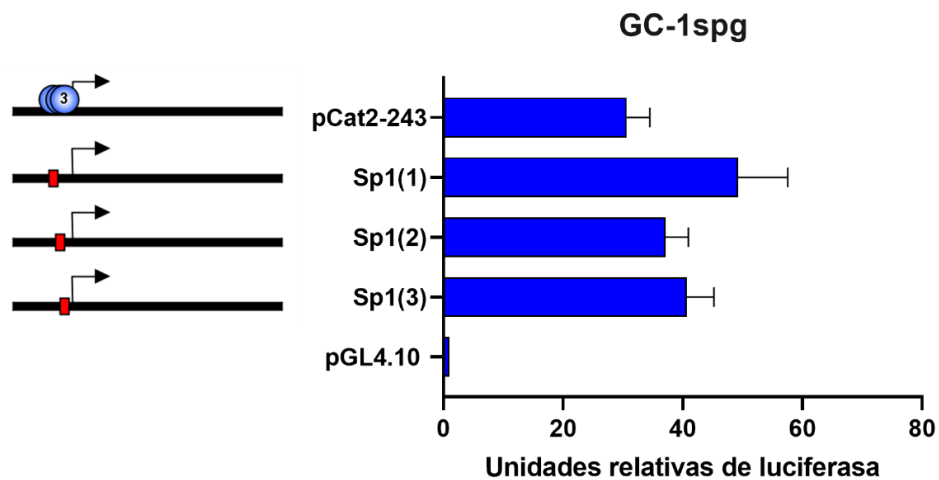


Figura 21. Efecto de la mutación de los sitios de unión para Sp1 sobre la actividad del promotor mínimo de *Catsper2* murino. Las construcciones con los sitios de unión para Sp1 del promotor mínimo de *Catsper2* mutados, fueron transfectadas en la línea celular GC-1 spg y 48h después, las células fueron lisadas para realizar ensayos de luciferasa. Para cada condición, se realizó la co-transfección con el vector pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus) para realizar la normalización de los datos. La actividad transcripcional se calculó como número de veces de incremento con respecto a la actividad del vector vacío pGL4.10 (luciferasa de *Photinus pyralis*), la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos realizados de forma independiente por triplicado (media \pm SEM, n=9).

8.6 Análisis de la sobreexpresión de las proteínas CTCF y Sp1

Con el fin de tener una mayor comprensión del papel de los factores de transcripción CTCF y Sp1 sobre la actividad del promotor mínimo de *Catsper2*, se adquirieron los plásmidos CTCF-pCMV6 y Sp1-pCMV6 y se realizó el análisis de la sobreexpresión de cada una de estas proteínas sobre las diferentes construcciones del promotor. Inicialmente, se verificó la identidad de los plásmidos de expresión mediante ensayos de restricción enzimática utilizando las enzimas BamHI y DpnI y se observó en un gel de agarosa el patrón de corte esperado para ambos vectores (Figura 22).

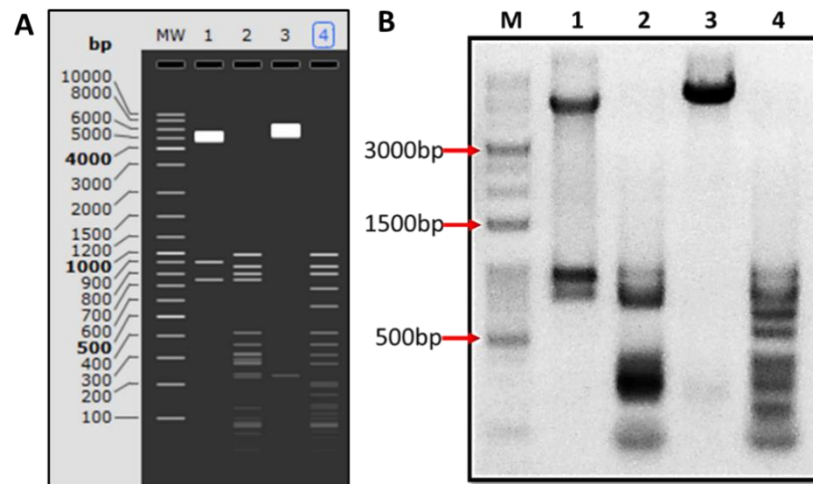


Figura 22. Análisis por restricción de los plásmidos Sp1-pCMV6 y CTCF-pCMV6. (A) Análisis *in silico* mediante el programa Snapgene del patrón de corte y (B) restricción enzimática con la enzima BamHI o DpnI de los vectores Sp1-pCMV6 (carriles 1 y 2, respectivamente) y CTCF-pCMV6 (carriles 3 y 4, respectivamente), en gel de agarosa 1.2%. M o MW indican el marcador de peso molecular.

Además, mediante secuenciación se confirmó la presencia del sitio de inicio de traducción (atg) y las banderas myc y flag en los dos plásmidos (Figura 23).



Figura 23. Análisis por secuenciación de los plásmidos CTCF-pCMV6 y Sp1-pCMV6. Se realizó el análisis de los plásmidos (A) CTCF-pCMV6 y (B) Sp1-pCMV6 mediante secuenciación. El sitio de inicio de la traducción “atg” se encuentra subrayado en negro y las bases que codifican para las banderas myc y flag están delimitadas por recuadros negros, para ambas construcciones.

Finalmente, se realizó la transfección de las células HEK293 y de las células GC-1 spg para analizar la sobreexpresión de los factores de transcripción CTCF y Sp1, mediante ensayos de western blot (Figura 24 y **Error! Reference source not found.**), con lo que se pudo determinar que a las 48h post-transfección es el tiempo adecuado para realizar la lisis celular y los ensayos de luciferasa.

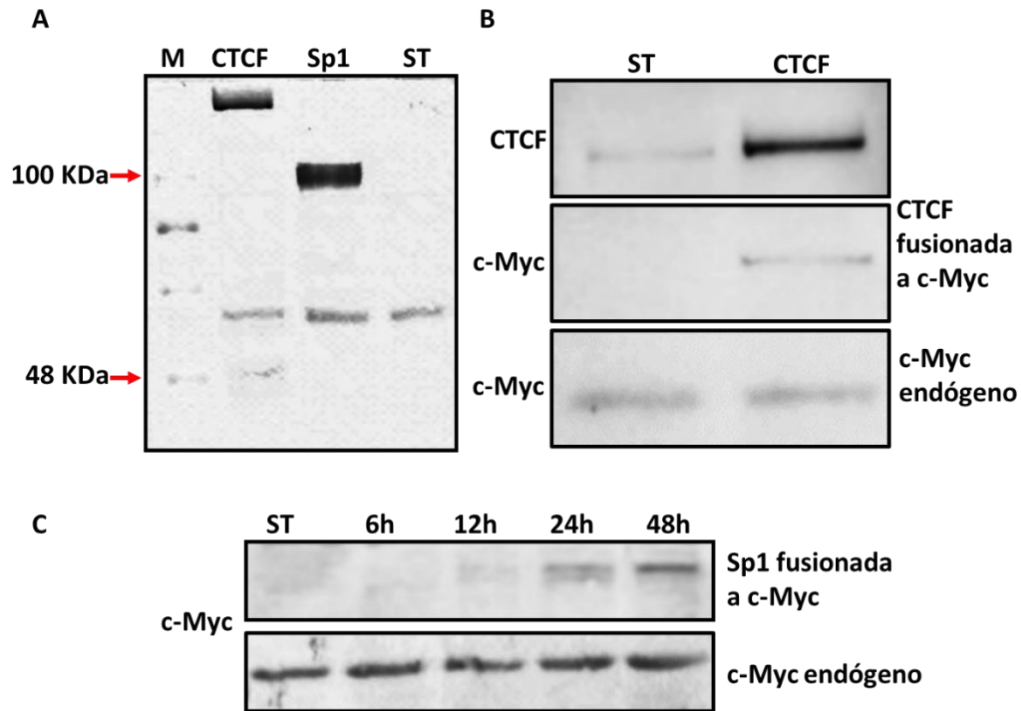


Figura 24. Análisis de la sobreexpresión de CTCF y Sp1 en células HEK293 y GC-1 spg. La proteína total de células HEK293 (A) o GC-1 spg (B y C) transfectadas con los plásmidos CTCF-pCMV6 (CTCF), Sp1-pCMV6 (Sp1) o sin transfectar (ST) fue analizada por western blot. Las proteínas recombinantes fueron detectadas con un anticuerpo dirigido a la bandera Myc (α -Myc) o un anticuerpo específico para CTCF; en el panel (C) se determinó la sobreexpresión de Sp1 a diferentes horas post-transfección (6h, 12h, 24h y 48h). En todos los paneles se utilizó la detección de c-myc endógeno como control de carga. Las bandas fueron reveladas con fosfatasa alcalina.

8.7 La sobreexpresión de CTCF y Sp1 aumentan la actividad del promotor de *Catsper2* murino

El efecto de la sobreexpresión de los factores de transcripción CTCF y Sp1 sobre las diferentes construcciones del promotor mínimo de *Catsper2*, se evaluó mediante ensayos de co-transfección en las células GC-1 spg y ensayos de luciferasa. Como se observa en la Figura 25, la sobreexpresión de CTCF aumentó 3 veces la actividad transcripcional de las mutantes CTCF(1), CTCF(2) y CTCF(3) del promotor, comparada con la actividad basal de cada una, respectivamente; reforzando lo observado en ensayos

anteriores, de una función activadora de estos sitios posiblemente a través de la interacción con la proteína CTCF.

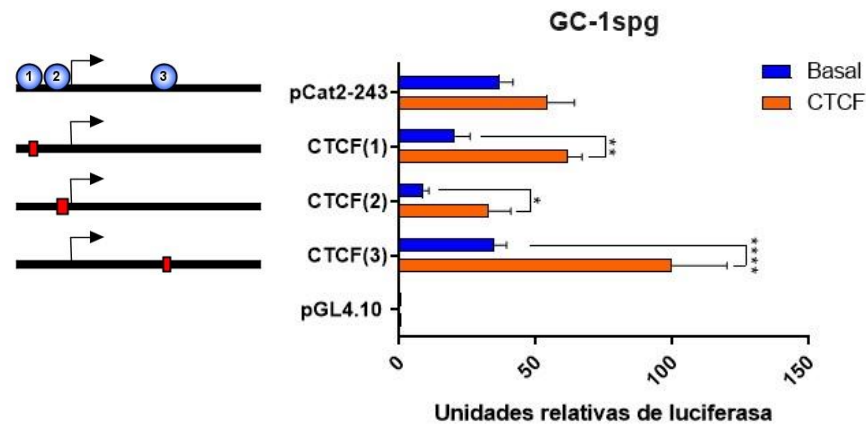


Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de CTCF en la actividad del promotor mínimo de *Catsper2*. Las construcciones con los sitios de unión para CTCF del promotor mínimo de *Catsper2* mutados (esquema en la parte izquierda), fueron co-transfectadas con el vector CTCF-pCMV6 en la línea celular GC-1 spg y 48h después, las células fueron lisadas para realizar ensayos de luciferasa (barras de color naranja). Para cada condición, se realizó la co-transfección con el vector pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus) para realizar la normalización de los datos. La actividad transcripcional se calculó como número de veces de incremento con respecto a la actividad del vector vacío pGL4.10 (luciferasa de *Photinus pyralis*), la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos realizados de forma independiente por triplicado (media \pm SEM, n=9). Los * indican las diferencias estadísticamente significativas, al comparar con la actividad basal de la misma construcción (barras de color azul) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Este mismo efecto activador se pudo observar con la sobreexpresión de Sp1 sobre las construcciones pCat2-243, Sp1(1) y Sp1(2), con incrementos de 3, 1.8 y 2.2 veces, respectivamente, con respecto a la actividad basal de cada construcción (Figura 26). Estos resultados, a diferencia de los obtenidos al transfectar únicamente las mutantes del promotor (Figura 21), mostraron la posibilidad de una regulación positiva del promotor mínimo de *Catsper2* a través de Sp1, que podría efectuarse utilizando a los sitios Sp1(1), Sp1(2) y Sp1(3) como un único sitio de reconocimiento en el promotor.

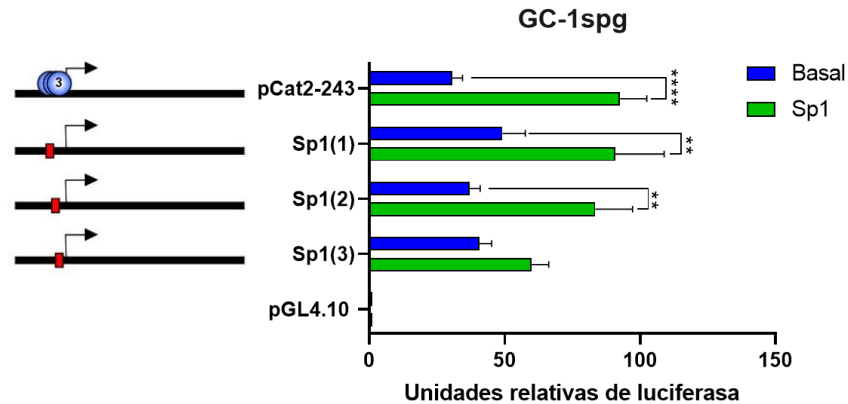


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de Sp1 en la actividad del promotor mínimo de *Catsper2*.

Las construcciones con los sitios de unión para Sp1 del promotor mínimo de *Catsper2* mutados (esquema en la parte izquierda), fueron co-transfectadas con el vector Sp1-pCMV6 en la línea celular GC-1 spg y 48h después, las células fueron lisadas para realizar ensayos de luciferasa (barras de color verde). Para cada condición, se realizó la co-transfección con el vector pRL-CMV (luciferasa de *Renilla reniformis* con el promotor de citomegalovirus) para realizar la normalización de los datos. La actividad transcripcional se calculó como número de veces de incremento con respecto a la actividad del vector vacío pGL4.10 (luciferasa de *Photinus pyralis*), la cual se llevó a 1. Los valores representan la media de tres experimentos realizados de forma independiente por triplicado (media \pm SEM, n=9). Los * indican las diferencias estadísticamente significativas, al comparar con la actividad basal de la misma construcción (barras de color azul) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

8.8 Modelo de la interacción de Sp1 con el promotor de *Catsper2* murino

La interacción *in silico* del factor de transcripción Sp1 con el promotor mínimo de *Catsper2*, se evaluó mediante la obtención de modelos 3D de interacción con el servidor HDOCK (**Figura 27**), con los que se pudo inferir que cada dedo de zinc de Sp1 utiliza al menos 2 de los sitios de unión presentes en el promotor de *Catsper2* para llevar a cabo la interacción con el DNA. Igualmente, el análisis a detalle con el programa LigPlot, de las bases nucleotídicas involucradas en estas interacciones, permitió confirmar que los enlaces más fuertes de cada motivo se formarían usando como mínimo 2 sitios de unión presentes en esta región del promotor (Figura 28).

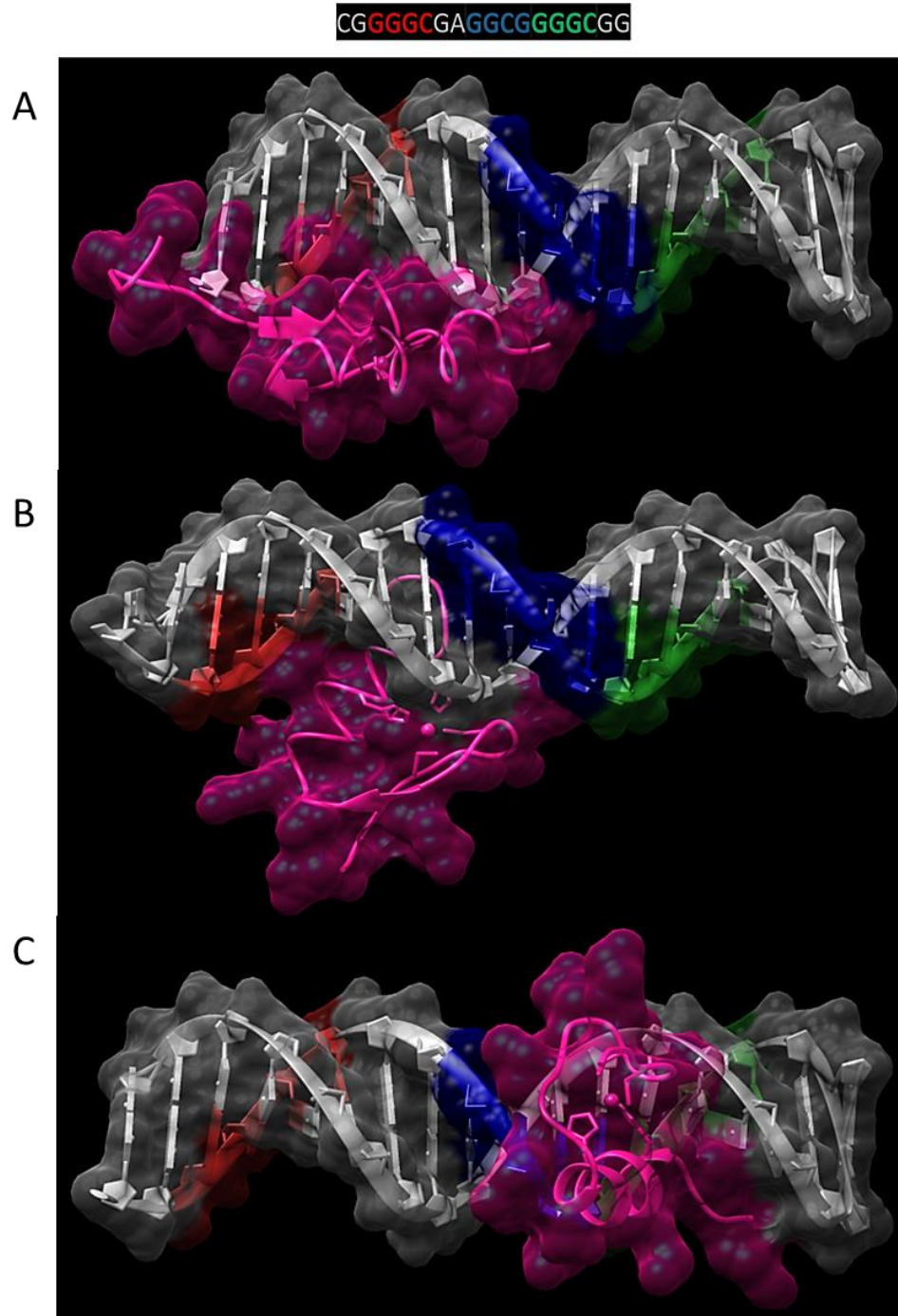


Figura 27. Modelos de la interacción de los dedos de zinc de Sp1 con el promotor de *Catsper2* murino. Los modelos de interacción se obtuvieron a partir de archivos en formato pdb y usando el servidor HDOCK. La secuencia de DNA utilizada que contiene los sitios Sp1(1) (rojo), Sp1(2), azul y Sp1(3) (verde) se especifica en la parte superior de la figura. Los modelos muestran la interacción de la región del promotor de *Catsper2* con el dedo de Zn 1 (A), el dedo de Zn 2 (B) y el dedo de Zn 3 (C) de Sp1. La estructura de aminoácidos se ilustra en color violeta y la de ácidos nucleicos en color gris.

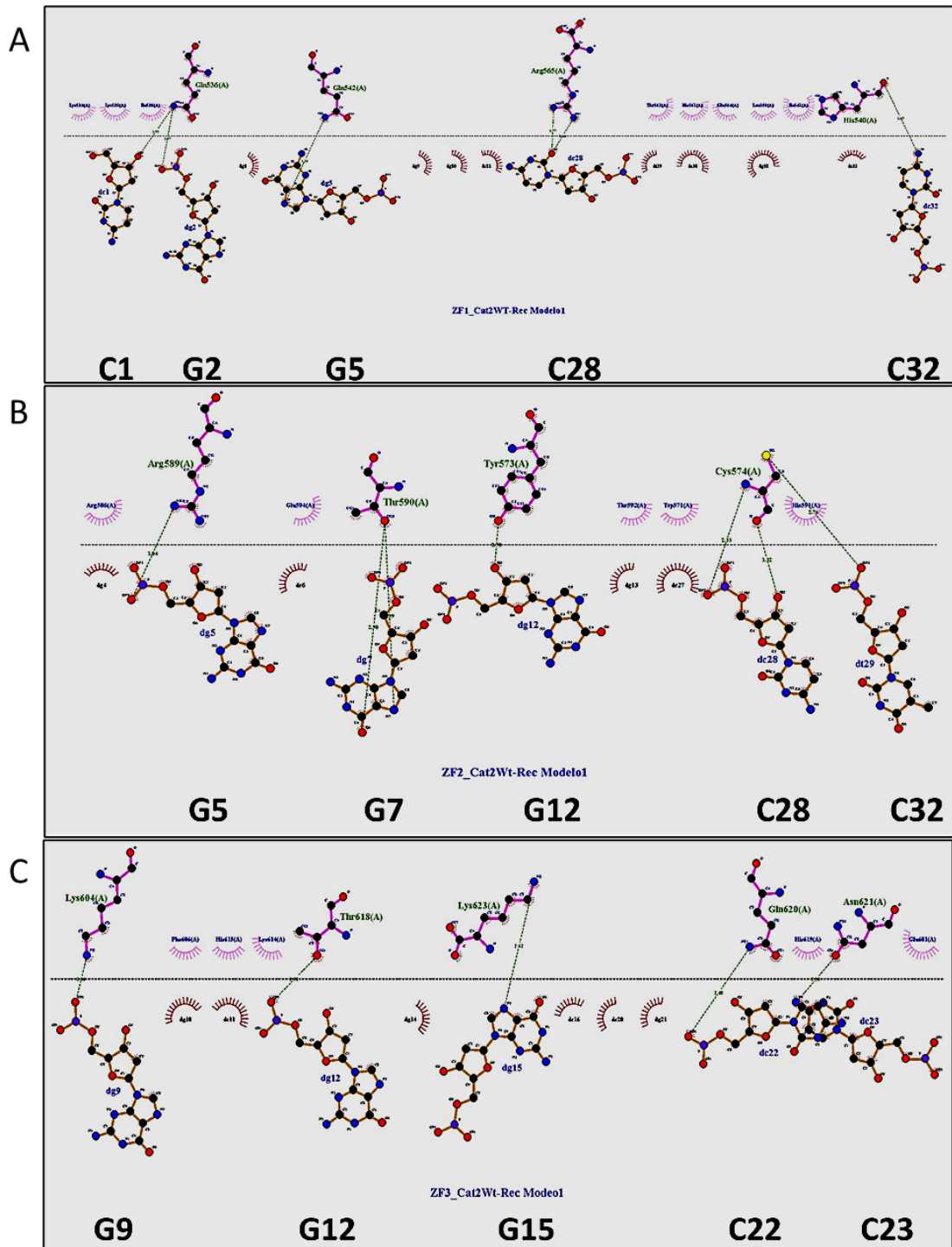


Figura 28. Modelo de las bases nitrogenadas del promotor de *Catsper2* que tienen contacto con el dominio de unión al DNA de Sp1. Se utilizó el programa Ligplot para determinar los nucleótidos que interactúan de forma directa con el dedo de Zn1 (A), dedo de Zn2 (B) y dedo de Zn3 (C) del dominio de unión a DNA de la proteína Sp1, según los modelos generados con el servidor HDOCK

(Figura 27). Se muestran las interacciones atómicas y se resalta en la parte inferior de cada panel la posición de los nucleótidos implicados en dichas interacciones.

Además, al unir estos 3 modelos en uno solo para poder visualizar la interacción del dominio de unión a DNA completo con el promotor de *Catsper2* (Figura 29), se pudo concluir que es probable que la proteína Sp1 utilice toda esta región, es decir, los sitios Sp1(1), Sp1(2) y Sp1(3) para interactuar con el promotor mínimo de *Catsper2* y esto podría explicar el hecho de que no se ve cambio en la actividad del promotor cuando se mutan estos sitios de forma individual.

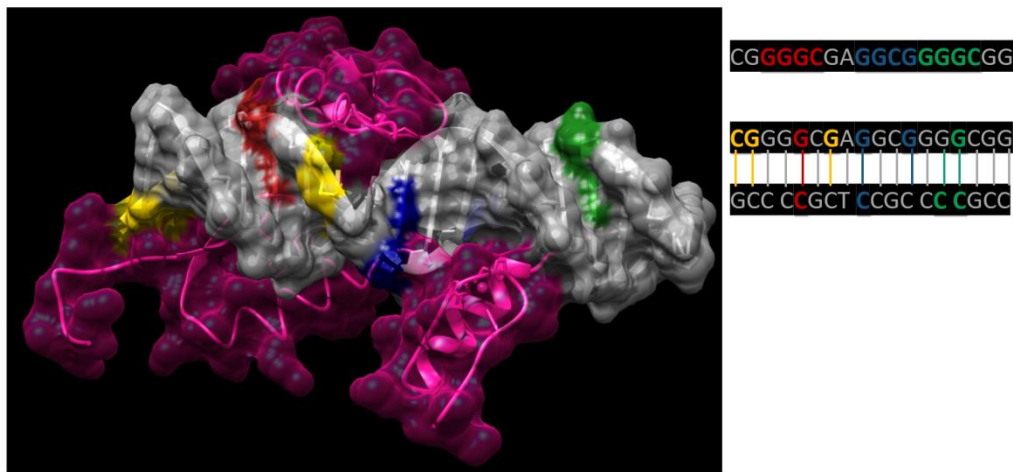


Figura 29. Modelo de la interacción de Sp1 con el promotor mínimo de *Catsper2* murino. A partir de los modelos mostrados en la Figura 27, se obtuvo un modelo de interacción de Sp1 con la región promotora de *Catsper2*. En la parte derecha del panel se muestra la secuencia de DNA en sentido 5'-3' indicando los sitios Sp1(1) en rojo, Sp1(2) en azul y Sp1(3) en verde, además de la secuencia en cadena doble resaltando en los mismos colores, las bases que estarían implicadas de forma directa en la interacción, de acuerdo con el resultado mostrado en la Figura 28, en color amarillo se señalan las bases que no hacen parte de los sitios de unión para Sp1 predichos. La estructura de aminoácidos se ilustra en color violeta y la de ácidos nucleicos en color gris.

La hipótesis de que los tres sitios de unión a Sp1 del promotor de *Catsper2* pueden funcionar como un único sitio de interacción para este factor de transcripción, fue evaluada por medio de la construcción CTCF(2); ya que como se muestra en la Figura 7 de la sección de Antecedentes y en el esquema de la Figura 30, sobre este sitio se encuentran los sitios Sp1(2) y Sp1(3), por lo que la mutante CTCF(2) también representa

una mutante Sp1(2/3) (sitios Sp1(2) y Sp1(3) mutados). Con esta construcción ya se había observado una marcada disminución de la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* (Figura 20). congruente con esto, el aumento en la actividad transcripcional no fue tan pronunciado en comparación con la actividad transcripcional de las mutantes individuales de los sitios de unión para Sp1 (Figura 30) al sobreexpresar la proteína Sp1 con la mutante Sp1(2/3). Tomando en cuenta estos resultados, se puede decir que el promotor de *Catsper2* murino posee un único sitio de interacción para Sp1.

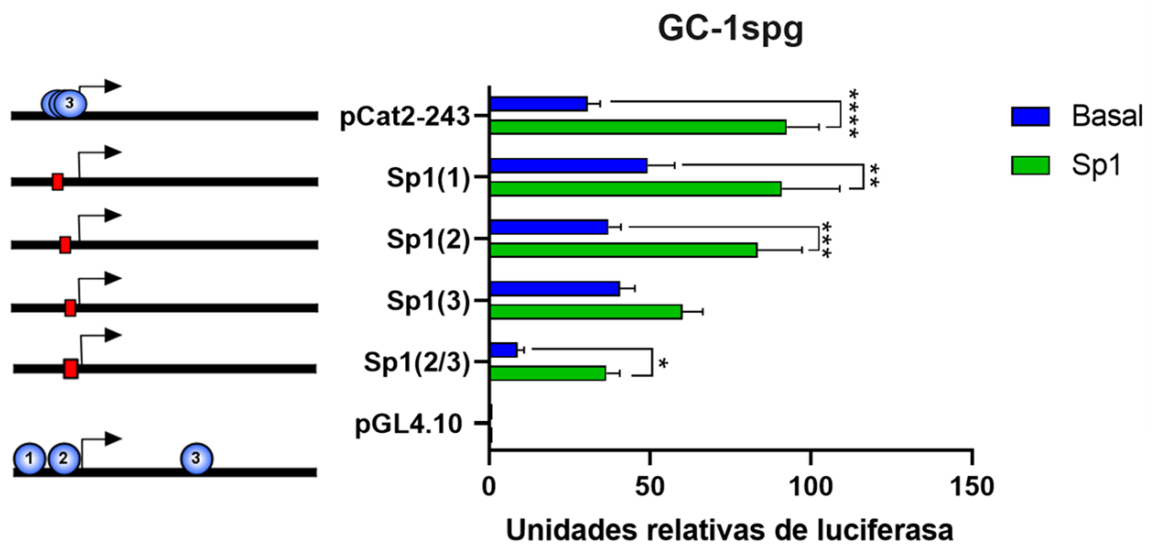


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de Sp1 sobre la mutante Sp1(2/3). A los resultados mostrados en la Figura 26 se anexa el resultado del efecto de la sobreexpresión de Sp1 sobre la construcción Sp1(2/3) (esquema en la parte izquierda). Los ensayos de transfección y de luciferasa se realizaron de acuerdo con lo descrito anteriormente. El valor representa la media de tres experimentos realizados de forma independiente por triplicado (barra de color verde, media \pm SEM, n=9). Los * indican las diferencias estadísticamente significativas, al comparar con la actividad basal de la misma construcción (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

8.9 Evaluación de la interacción *in vitro* de CTCF y Sp1 con el promotor de *Catsper2* murino

Con el Fin de analizar la interacción *in vitro* de los factores de transcripción CTCF y Sp1 con el promotor mínimo de *Catsper2* murino, se realizaron ensayos de cambio en la

movilidad electroforética usando sondas marcadas con biotina y electroforesis en gel de acrilamida para evaluar los sitios de unión a CTCF y electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, para evaluar los sitios de unión a Sp1. Como se observa en la Figura 31, las sondas que contienen los sitios de unión para CTCF wild-type (Tabla 2), formaron complejos con el extracto total de proteína de células que sobreexpresan a CTCF (carriles 2a-c y 3a-c), evidenciado en una migración más lenta de las sondas en comparación con los carriles en los que sólo se cargó el fragmento de DNA (sonda libre, carril 1a-c). Esto mismo fue observado para la sonda CTCF(2) [sitios Sp1(2) y Sp1(3) WT], cuando se llevó a cabo la reacción de unión con extracto total de proteína de células que sobreexpresan a Sp1 (carriles 2d y 3d) en comparación con la sonda libre (carril 1d), .

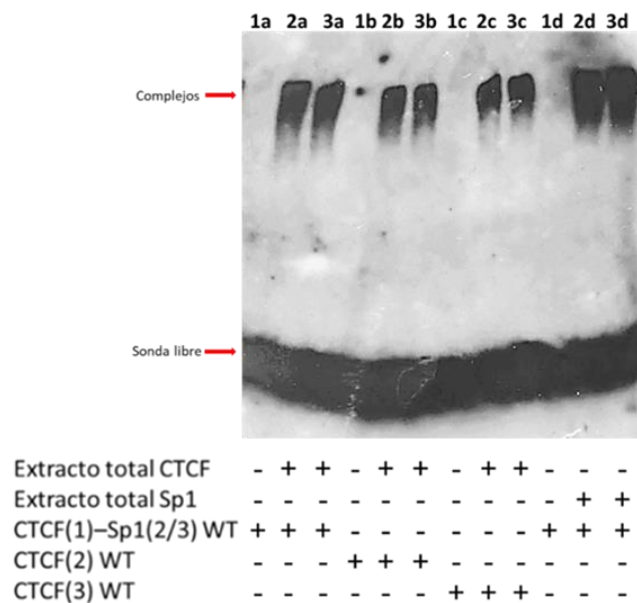


Figura 31. Análisis de la interacción *in vitro* del promotor de *Catsper2* murino con CTCF y Sp1. Las sondas libres (carriles 1a-d) con los sitios de unión de unión para CTCF o Sp1 WT (a: CTCF(1), b: CTCF(2), c: CTCF(3) y d: Sp1(2/3)) o después de una reacción de unión con extracto total de proteína de células que sobreexpresan a CTCF o Sp1 (carriles 2 y 3 de la a-c y carriles 2d y 3d, respectivamente), fueron resueltas en un gel de poliacrilamida, transferidas a una membrana de Nylon⁺ y reveladas con estreptavidina-HRP. La señal que corresponde a la sonda libre y a los complejos se indica con flechas rojas.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 32, el fragmento que corresponde al promotor mínimo de *Catsper2* (243pb) también pudo formar complejos con extracto de

proteína total de células que sobreexpresan a Sp1, tanto en la forma WT (carriles 1, 2 y 9) como con las mutantes Sp1(1) (carriles 3 y 4), Sp1(2) (carriles 5 y 6) y Sp1(3) (carriles 7 y 8). Además, se pudo comprobar la identidad de la proteína con la que se formaron los complejos, al incluir anticuerpo específico para Sp1 en una de las reacciones y observar que la migración de este último complejo fue un poco más lenta (carril 9). Con todos estos resultados, se puede deducir que los efectos vistos en los ensayos de luciferasa, sobre la actividad transcripcional de las diferentes mutantes del promotor de *Catsper2* murino puede estar ocurriendo por interacción con los correspondientes factores de transcripción CTCF y/o Sp1.

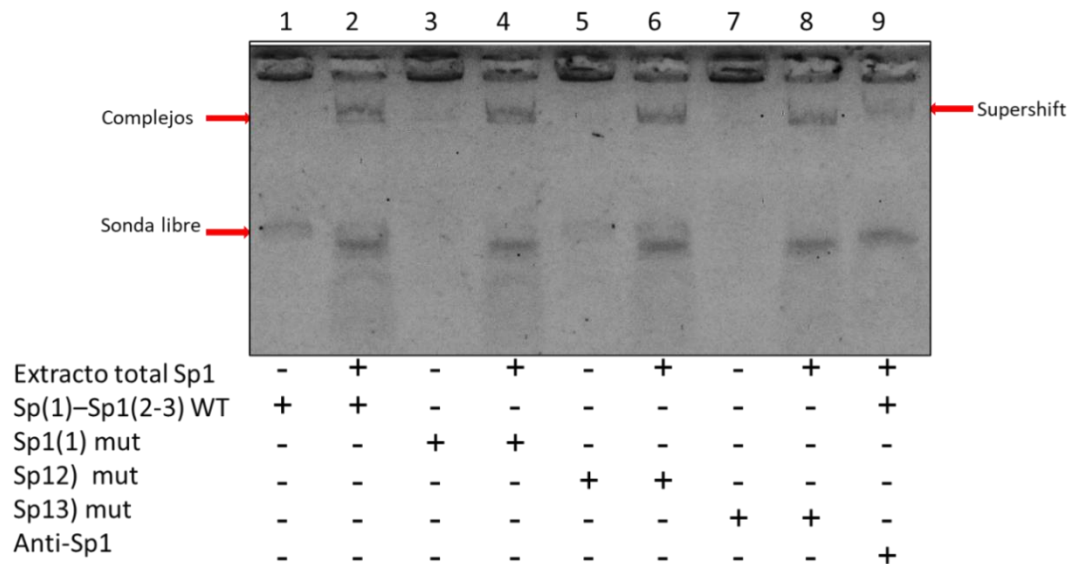


Figura 32. Análisis de la interacción *in vitro* de Sp1 con el promotor de *Catsper2* murino. Las sondas libres (carriles 1, 3, 5 y 7) con los sitios de unión para Sp1 WT o mutados, o en complejo después de una reacción de unión con extracto total de proteína de células que sobreexpresan a Sp1 (carriles 2, 4, 6, y 8) y con anticuerpo específico para Sp1 (carril 9), fueron resueltas en un gel de agarosa y reveladas por tinción con bromuro de etidio. La señal que corresponde a la sonda libre, a los complejos y al supershift, se indica con flechas rojas.

8.10 Evaluación de la interacción *in vivo* de CTCF con el promotor de *Catsper2* murino

Para verificar la interacción del factor de transcripción CTCF *in vivo* con el promotor mínimo de *Catsper2*, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de la Cromatina. Para esto se estandarizó el proceso de sonicación de la cromatina, evaluando diferentes porcentajes de amplitud de sonicación, número de pulsos y tiempo de pulsos y descanso (Figura 33). Además, se evaluó la integridad de las proteínas de las condiciones evaluadas en la Figura 33B mediante un ensayo de Western blot con un anticuerpo específico para CTCF (Figura 34); de acuerdo con los resultados observados se escogió la condición de 50% amplitud, 20 pulsos de 30 segundos cada pulso y 30 segundos de descanso entre pulsos (Figura 33B, carril 2) para continuar con el experimento.

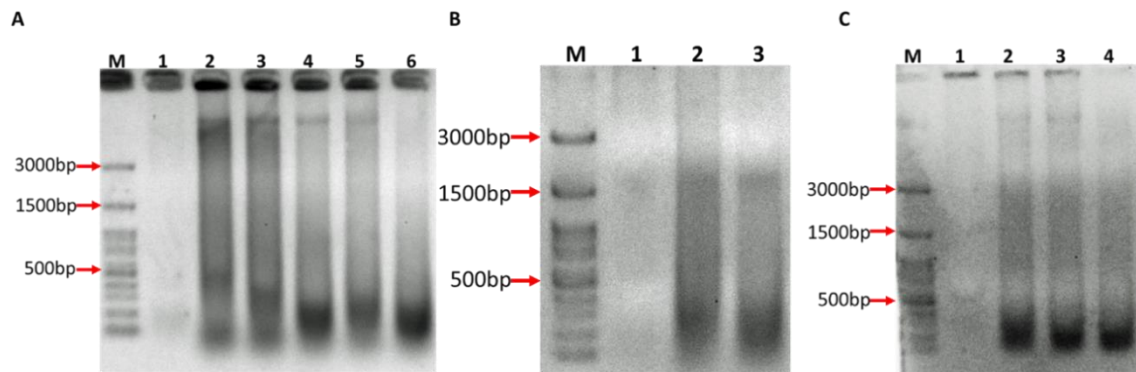


Figura 33. Estandarización de las condiciones de sonicación para los ensayos de ChIP. Se analizaron diferentes parámetros para sonicar las muestras de cromatina mediante geles de agarosa 1.5%. (A) Sonicación de cromatina a 80% de amplitud con pulsos de 15 segundos y descanso de 45 segundo entre pulsos, 2: 10 pulsos, 3: 20 pulsos, 4: 40 pulsos, 5: 60 pulsos y 6: 80 pulsos. (B) Sonicación a 50% de amplitud, 30 segundos cada pulso y descanso de 30 segundos, 2: 20 pulsos y 3: 40 pulsos. (C) Sonicación a 30% de amplitud con pulsos de 15 segundos y descanso de 45 segundos, 2: 30 pulsos, 3: 50 pulsos y 4: 80 pulsos. En todos los paneles M: marcador de peso molecular y 1: Cromatina sin sonicar; con flechas rojas se indican las bandas de 500pb, 1500pb y 3000pb del marcador.

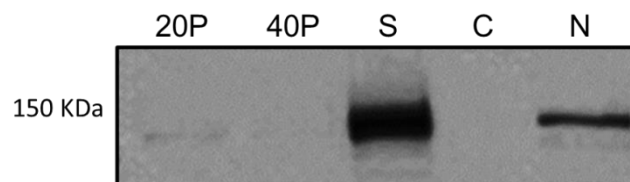


Figura 34. Análisis de la integridad de la proteína CTCF después del proceso de sonicación. Alícuotas de las muestras de sonicación de la Figura 33B, fueron evaluadas mediante western blot con un anticuerpo específico para CTCF, 20P: 50% amplitud-20 pulsos, 40P: 50%

amplificación-40 pulsos, S: extracto de proteína total de células HEK293 sobreexpresando a CTCF, C: Extracto de proteína citoplasmática de testículo de ratón adulto, N: Extracto de proteína nuclear de testículo de ratón adulto. Las bandas fueron reveladas con fosfatasa alcalina.

Por otro lado, se estandarizaron las condiciones para la amplificación de la región que contiene el promotor mínimo de *Casper2* y una región control negativa para la unión de CTCF (intrón 1 del gen *myc*), por medio de una PCR en gradiente de temperaturas, con lo que se pudo establecer una temperatura de alineamiento óptima de 66.5°C (Figura 35).

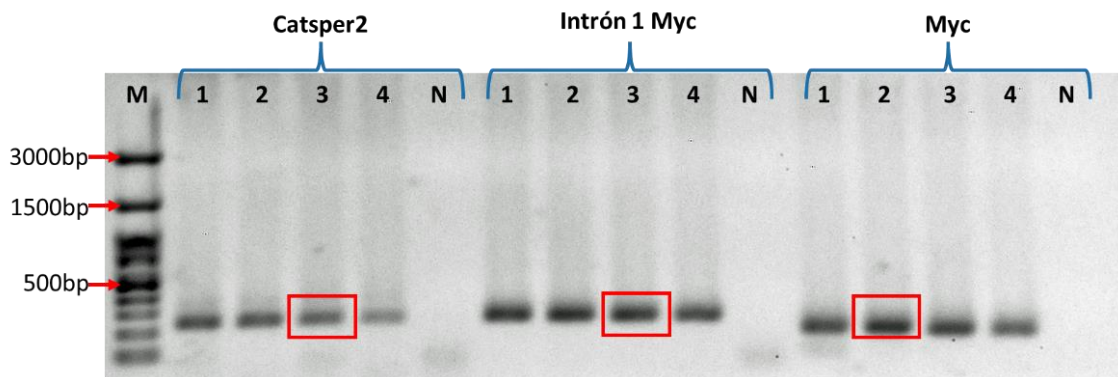


Figura 35. Estandarización de las condiciones de PCR para el ensayo de ChIP. Se realizó un gradiente de temperaturas para determinar la temperatura de alineamiento óptima para los juegos de oligos usados en el ensayo de ChIP (mCatsper2, mMyc e Int1 mMyc, Tabla 2). En Catsper2 e Intrón 1 Myc, 1: 60.7°C, 2: 63.2°C, 3: 66.5°C y 4: 69.2°C; en Myc, 1: 63.2°C, 2: 66.5°C, 3: 69.2°C y 4: 71°C. M: Marcador de peso molecular, N: Negativo. Tamaños esperados: 247 pb para Catsper2, 253 pb para Intrón 1 Myc y 210 pb para Myc.

Finalmente, se realizó el ensayo de ChIP en muestras de testículo y bazo de ratón adulto (8 semanas) y testículo e hígado de ratón joven (3-4 semanas). Como se muestra en la Figura 36, la banda correspondiente al promotor mínimo de *Casper2* únicamente amplificó en las muestras de testículo inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico para CTCF, a diferencia de las muestras de este mismo tejido inmunoprecipitadas con un anticuerpo irrelevante o de las muestras de los tejidos control. Resultado que confirma

que la acción que ejerce el factor de transcripción CTCF sobre la actividad del promotor de *Catsper2* sucede por interacción directa y específica de testículo.

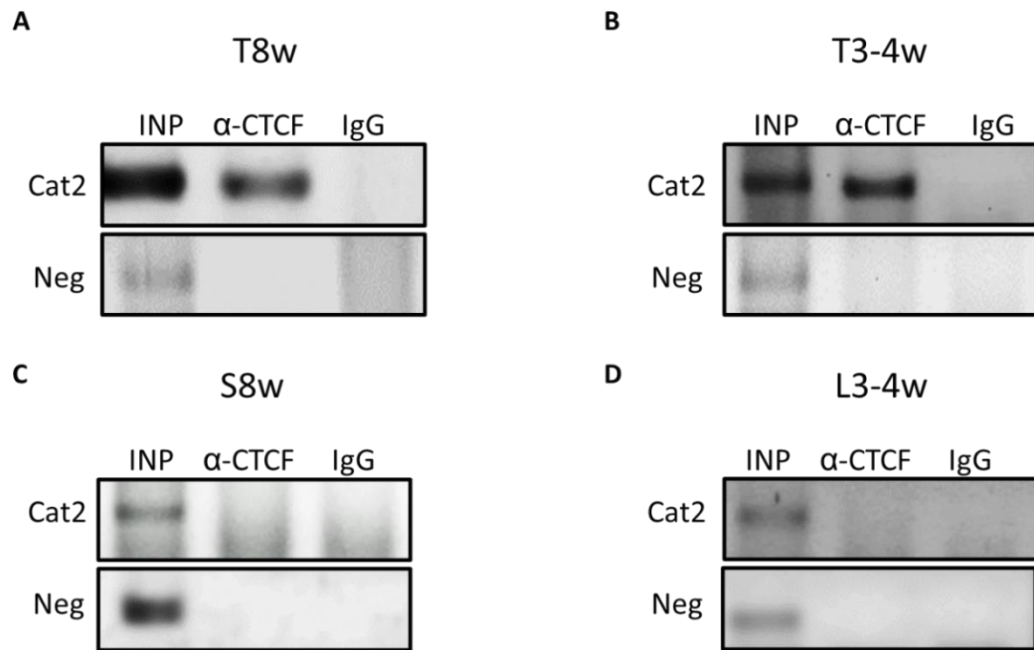


Figura 36. CTCF se une *in vivo* al promotor de *Catsper2* murino. La cromatina de testículo de 8 semanas (A), testículo de 3-4 semanas (B), bazo de 8 semanas (C) e hígado de 3-4 semanas (D) fue precipitada con anticuerpo anti-CTCF. Los productos de PCR de las muestras de ChIP fueron amplificadas con los oligos mCat2 ChIP Fw/Rev para *Catpers2* (Cat2) y mInt1 ChIP Fw/Rev para el negativo (Neg) y resueltos en geles de agarosa 1.5%. El anticuerpo anti-MHC-II fue usado como control negativo específico de isotipo (IgG). Las muestras Input (INP) representan la cromatina total.

9 DISCUSIÓN

El promotor mínimo y la maquinaria transcripcional son fundamentales en los procesos de regulación de la expresión génica los cuales son necesarios para el desarrollo celular, la diferenciación, la proliferación y la respuesta a estímulos [58]. Por esto, identificar y mapear las regiones promotoras permite entender la regulación o desregulación transcripcional de los genes responsables de enfermedades en humanos [59,60]. El canal

CATSPER, es específico del proceso de espermatogénesis y es esencial para la hiperactivación del espermatozoide y, por lo tanto, para la fertilidad masculina en muchas especies, incluidos ratones y humanos [4,11,16,20–23]. El gen *Catsper2* que codifica para una de las subunidades principales del canal CATSPER es relevante en la fertilidad masculina humana según se ha evidenciado en reportes que asocian deleciones o mutaciones en este gen con pacientes con el síndrome de sordera-infertilidad (DIS, por sus siglas en inglés) o con infertilidad masculina no sindrómica [11,20–23], por lo que es importante elucidar los mecanismos de su regulación transcripcional y así, poder explorar si existe relación con algunos casos de infertilidad masculina y, para encontrar posibles blancos en el desarrollo de anticonceptivos masculinos. En este trabajo, se describen algunos de los mecanismos que pueden estar involucrados en la expresión tejido-específica del gen *Catsper2*.

Tomando como referencia un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, en el que se caracterizó la región promotora del gen *Catsper2* murino y se encontró una isla CpG que abarca toda esta región; se evaluaron algunos mecanismos de regulación epigenética para evaluar su papel en la regulación de este gen. Las islas CpG son regiones de DNA con un alto contenido y frecuencia de dinucleótidos CpG que han sido fuertemente relacionadas a regiones promotoras y al sitio de inicio de la transcripción [61,62]; además, la presencia de islas CpG está relacionada con promotores sin caja TATA, como es el caso del promotor de *Catsper2*. Una de las formas en la que las islas CpG pueden regular la expresión de un gen es por su grado de metilación, por esta razón, se realizó el análisis del perfil de metilación sobre el promotor de *Catsper2* mediante análisis de datos de WGBS y de acuerdo a los resultados esta región rica en dinucleótidos CpG se encuentra no metilada tanto en células de la espermatogénesis como en tejidos en los que no se expresa *Catsper2* (Figura 14), sugiriendo entonces que si la isla CpG juega un papel en la regulación de la expresión de este gen, éste es independiente de su estado de metilación. En este contexto, un alto contenido de CpG en regiones promotoras se ha relacionado directamente con la presencia de modificaciones post-traduccionales en las histonas, siendo una de las principales, la modificación H3K4me3 [62], misma que ha sido

ampliamente relacionada a regiones promotoras activas [63–65] y que, además, ha sido propuesta como una de las formas en que se previene la metilación del DNA en estas regiones. Lo anterior coincide con lo encontrado en el presente trabajo en donde se observó una señal clara de la marca H3K4me3 sobre la región promotora de *Catsper2* tanto en testículo completo como en células de espermátocitos paquitenos y espermátidas redondas, de acuerdo con el análisis de datos de ChIP-seq (Figura 15). Sin embargo, también se encontró señal de H3K4me3 en hígado, lo que concuerda con un estado de no metilación de la isla CpG en este tejido y que podría estar relacionado con la presencia del gen ubicuo *Pdia3* que se encuentra en una configuración “head to head” respecto del gen *Catsper2*; por lo que este resultado también sugiere que la marca H3K4me3 podría actuar en esta región para mantener la cromatina abierta y que el inicio de la transcripción ocurra en sentido para el gen *Pdia3*.

Por otro lado, la marca de histonas H3K36me3 también ha sido ampliamente estudiada y relacionada con la elongación de la transcripción, ya que esta marca puede ser detectada en el cuerpo de los genes transcripcionalmente activos [66]. Asimismo, se ha reportado que la modificación H3K36me3 puede ser una de las formas en que se regulan los promotores bidireccionales de genes que tienen patrones diferentes de expresión [67]. Esto es consistente con los diferentes patrones de expresión de *Catsper2-Pdia3*, que parecen estar regulados por la misma región promotora, ya que se demostró en un trabajo anterior (tesis de maestría) que esta región tiene actividad transcripcional en ambas direcciones. De acuerdo con los análisis de datos de ChIP-seq (Figura 16), la presencia de H3K36me3 en *Catsper2*, en contraste a *Pdia3*, es encontrada sólo en testículo, sugiriendo que la marca H3K36me3 puede estar implicada en la expresión tejido-específica del gen *Catsper2*.

Todos los resultados anteriores sugieren fuertemente que el promotor de *Catsper2* puede estar bajo regulación epigenética; sin embargo, los factores de transcripción también tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica [68] y de acuerdo con los análisis *in silico* de la región promotora de *Catsper2*, los sitios de unión para factores de transcripción predichos para el promotor de *Catsper2* se concentran en

una región cercana al TSS, lo que concuerda con la definición de un promotor proximal [69,70]. Asimismo, en este trabajo se encontró que el promotor mínimo de *Catsper2* se ubica entre los nucleótidos -54 a +189 con respecto del TSS, que presenta sitios de unión para los factores de transcripción CTCF y Sp1 y que estos sitios se encuentran conservados entre ratón, rata y humano. De hecho, se ha reportado que los sitios de unión para factores de transcripción que participan en la regulación de un gen suelen estar conservados en diferentes especies [71].

CTCF es un factor de transcripción que ha sido ampliamente estudiado por ser un regulador maestro que además actúa como remodelador de la cromatina. Este factor tiene un dominio de unión a DNA compuesto por 11 dedos de Zn que le confiere la capacidad de usar diferentes combinaciones entre ellos para reconocer y actuar sobre varias secuencias consenso dentro del genoma [72,73]. De los sitios presentes en el promotor mínimo de *Catsper2*, la mutación de los sitios CTCF(1) y CTCF(2), redujo la actividad transcripcional de forma significativa, mientras que la mutación del sitio CTCF(3) no tuvo efecto sobre la actividad basal del promotor mínimo de *Catsper2* (Figura 20), indicando que los sitios 1 y 2 son esenciales en la regulación de este promotor en el contexto de las células GC-1 spg. De forma interesante, al sobreexpresar a CTCF con estas diferentes mutantes, aumentó la actividad transcripcional de cada una de las construcciones (Figura 25), confirmando el papel de esta proteína como activadora de la expresión de *Catsper2* murino. Se ha observado que en algunos promotores, los sitios de unión a CTCF se ubican en una región de 60 pb alrededor del TSS [74], lo que coincide con la ubicación de los sitios 1 y 2 del promotor de *Catsper2* y, según la literatura, la acción estimuladora de CTCF sobre este tipo de promotores podría deberse a que promueve el agrupamiento de la RNA Pol II en el núcleo [75] y a que recluta al factor asociado a TBP, TAF3 [76]; además, la presencia de sitios de unión para CTCF en los promotores se ha evaluado por su función como puntos mediadores del contacto entre promotores con enhancers o con regiones distales que provocan la formación de asas en la cromatina; en algunos casos, estos sitios se ubican en tándem para asegurar dichas interacciones [77,78]. De acuerdo con los resultados obtenidos, se podría pensar que el

sitio CTCF(3) podría estar más relacionado a esta función que a un efecto directo de su unión, sin embargo, serían necesarios experimentos como captura de la conformación cromosómica (3C) y la evaluación de dominios topológicamente asociados (TAD) para poder esclarecer la participación de este sitio en dichas funciones.

Con respecto al factor transcripcional Sp1, una de sus funciones está relacionada con el reclutamiento de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) para permitir la formación del complejo de inicio de la transcripción en algunos promotores que carecen de caja TATA regulando de forma positiva la expresión de un gen [79]. En el presente trabajo se encontró que la mutación de cuatro nucleótidos en cada uno de los sitios de unión para Sp1 (Sp1(1), Sp1(2) o Sp1(3)), no generó una diferencia estadísticamente significativa de la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Catsper2* (Figura 21); sin embargo, cuando se sobre-expresó la proteína con las diferentes mutantes del promotor, hubo un aumento de la actividad transcripcional (Figura 26), indicando la posibilidad de que esta región contiene un único sitio de unión para Sp1, lo que coincide con reportes que indican que además del sitio consenso, los nucleótidos que lo flanquean también intervienen en la afinidad de Sp1 por el DNA [80]. Esto fue visualizado a través de los análisis de interacción *in silico* en donde se pudo apreciar que el dominio de unión a DNA de Sp1 necesita una región más larga para poder llevar a cabo su interacción (Figura 27-29). Además, este hecho también puso ser comprobado experimentalmente con la construcción CTCF(2), también denominada en este trabajo como Sp1(2/3) que permitió concluir que este sitio es importante para la actividad del promotor mínimo de *Catsper2* y que es posible que sea utilizado por el factor de transcripción Sp1 como lo muestran los ensayos de co-transfección (Figura 30) y los ensayos preliminares de interacción *in vitro* (EMSAs, Figuras 31 y 32).

Como se menciona en el párrafo anterior, otro resultado interesante fue encontrar que el sitio CTCF(2) se traslapa con el sitio de unión para Sp1. Este hecho ya ha sido reportado para el promotor del gen *Alf*, que también es específico de las células germinales y codifica para una variante de una de las subunidades del factor de la maquinaria transcripcional TFIIA (Kim et al, 2006). A diferencia de ese estudio, en el presente trabajo

se encontró que ambos factores de transcripción tienen un efecto activador sobre el promotor mínimo; no obstante, también es importante realizar ensayos de EMSA para evaluar de forma más específica si hay competencia de estas dos proteínas por la unión a este sitio en el promotor y delimitar los nucleótidos clave para la interacción de cada uno de ellos.

Es importante recalcar que los sitios de unión consenso para CTCF y Sp1 contienen dinucleótidos CG y están propensos a metilación, sin embargo, estos dos factores prefieren las regiones CpG no metiladas [81–83]. Por lo tanto, se puede hipotetizar que el promotor mínimo de *Catsper2* que contiene una isla CpG y que además presenta la marca H3K4me3, permanece no metilado para permitir la unión de las proteínas CTCF y Sp1 y así activar la transcripción de *Catsper2* en testículo. Además, la presencia de sitios de unión para CTCF también ha sido asociada con promotores que contienen la marca H3K4me3 [84], demostrando que estos mecanismos están involucrados en la regulación de la expresión de *Catsper2*.

Finalmente, los mecanismos regulatorios que se describen en este trabajo, pueden ser parte de la regulación tejido-específica de *Catsper2*, ya que la unión del factor de transcripción CTCF al promotor basal de *Catsper2* tiene lugar sólo en testículo tanto de ratones jóvenes como de ratones adultos, de acuerdo con los resultados del ensayo de CHIP (Figura 36). Sería necesario llevar a cabo este mismo ensayo para determinar si la interacción de Sp1 con el promotor de *Catsper2* sigue este mismo patrón. Así mismo, es importante evaluar cuáles son los mecanismos o las proteínas que reprimen la transcripción de *Catsper2* en los demás tipos celulares.

Los resultados y las conclusiones obtenidas con el presente trabajo se resumen en el modelo presentado en la figura 37.

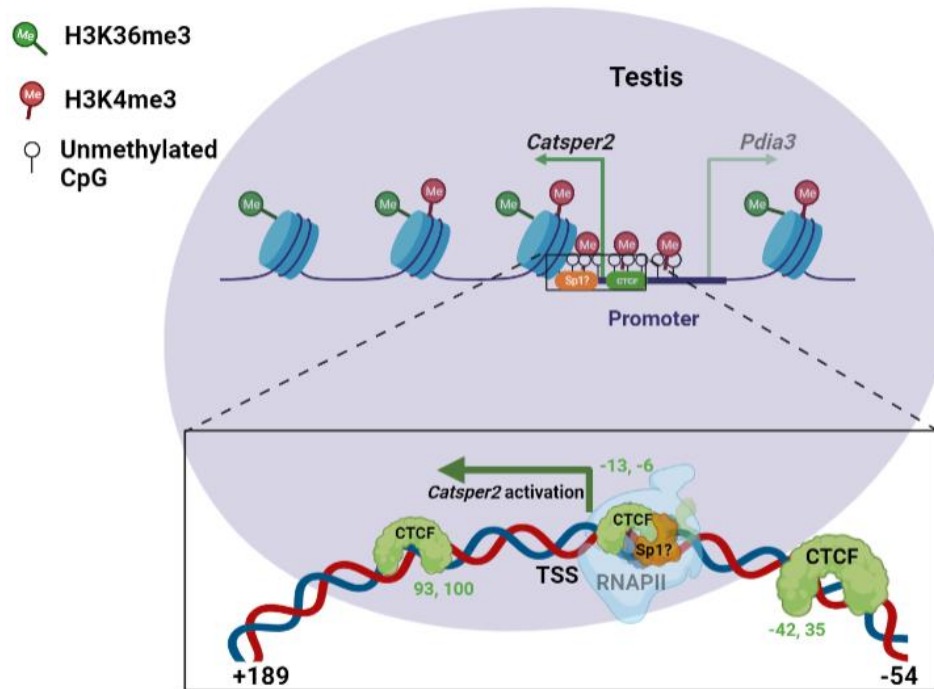


Figura 37. Modelo de los mecanismos que regulan la actividad del promotor de *Catsper2* murino en testículo. El promotor de *Catsper2* presenta como parte de su regulación las marcas de histonas H3K4me3 (círculos rojos) alrededor del sitio de inicio de la transcripción y H3K36me3 (círculos verdes) sobre el cuerpo del gen y una isla CpG no metilada (círculos sin color). Además, el factor de transcripción CTCF (representado en verde) aumenta la actividad transcripcional mediante interacción con los sitios de unión presentes en el promotor y el factor de transcripción Sp1 (representado en naranja) tiene una función activadora similar y comprobada hasta el momento únicamente *in vitro*.

10 CONCLUSIONES

- La región promotora de *Catsper2* murino contiene la modificación H3K4me3 de forma independiente del tejido mientras que el cuerpo del gen presenta la marca H3K36me3 de forma específica en testículo, sugiriendo que la expresión de *Catsper2* está bajo regulación epigenética.
- La mutación de los sitios de unión para el factor de transcripción CTCF disminuye la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Catsper2* murino.
- La mutación individual de los sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 no cambia la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Catsper2* murino, indicando que esta región puede actuar como un único sitio de interacción para este factor de transcripción.
- La sobreexpresión de CTCF y Sp1 aumentan la actividad transcripcional de las diferentes construcciones del promotor mínimo de *Catsper2* murino.
- Los fragmentos con los sitios de unión para las proteínas CTCF y Sp1 pueden formar complejos con los extractos proteicos que sobreexpresan cada uno de los TFs.
- La proteína CTCF se une *in vivo* a la región promotora de *Catsper2* murino únicamente en testículo.

11 PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto sobre la actividad transcripcional del promotor de *Catsper2* al mutar o eliminar los 3 sitios de unión para Sp1 al mismo tiempo.
- Determinar si Sp1 se une *in vivo* a la región promotora de *Catsper2*.

12 REFERENCIAS

- 1 Darszon A, Labarca P, Nishigaki T & Espinosa F (1999) Ion channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews* **79**, 481–510.
- 2 Zhang D & Gopalakrishnan M (2005) Sperm Ion Channels: Molecular Targets for the Next Generation of Contraceptive Medicines? *Journal of Andrology* **26**, 643–653.
- 3 Singh AP & Rajender S (2015) CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive BioMedicine Online* **30**, 28–38.
- 4 Quill TA, Ren D, Clapham DE & Garbers DL (2001) A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12527–12531.
- 5 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.
- 6 Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL & Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603–609.
- 7 Nishigaki T, Romero F & Sánchez-Guevara Y (2016) CatSper , el canal de Ca²⁺ que regula el batido flagelar del espermatozoide en eucariontes. *Revista Iberoamericana de Ciencias* **3**, 28–35.
- 8 Liu J, Xia J, Cho K-H, Clapham DE & Ren D (2007) CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 18945–18952.
- 9 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**, 539–544.
- 10 Chung J-J, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L & Clapham DE (2011) A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nature communications* **2**, 153.
- 11 Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattan D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D & Beckmann JS (2003) CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *European journal of human genetics : EJHG* **11**, 497–502.
- 12 Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ & Clapham DE (2008) Ion channels that control fertility

- in mammalian spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology* **52**, 607–613.
- 13 Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA & Clapham DE (2007) All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 1219–1223.
 - 14 Jin J-L, O'Doherty AM, Wang S, Zheng H, Sanders KM & Yan W (2005) Catsper3 and catsper4 encode two cation channel-like proteins exclusively expressed in the testis. *Biology of reproduction* **73**, 1235–1242.
 - 15 Schultz N, Hamra FK & Garbers DL (2003) A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 12201–12206.
 - 16 Li HG, Ding XF, Liao AH, Kong XB & Xiong CL (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**, 299–306.
 - 17 Carlson AE, Quill TA, Westenbroek RE, Schuh SM, Hille B & Babcock DF (2005) Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32238–32244.
 - 18 Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE & Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14869–14874.
 - 19 Shukla KK, Mahdi AA & Rajender S (2012) Ion Channels in Sperm Physiology and Male Fertility and Infertility. *Journal of Andrology* **33**, 777–788.
 - 20 Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Lohr NJ, Mohseni M, Mojahedi F, Daneshi A, Najmabadi H & Smith RJH (2007) Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *Journal of medical genetics* **44**, 233–240.
 - 21 Naqvi H, Jaiswar SP, Hussain SR, Ahmad MK, Mahdi F & Mahdi AA (2016) Genomic analysis of missense and silent mutations in CatSper2 gene in infertile male cases. *International Journal of Biomedical Research* **7**, 588–593.
 - 22 Karger L, Khan WA, Calabio R, Singh R, Xiang B, Babu A, Cohen N, Yang AC & Scott SA (2017) Maternal uniparental disomy of chromosome 15 and concomitant STRC and CATSPER2 deletion-mediated deafness-infertility syndrome. *American journal of medical genetics Part A* **173**, 1436–1439.
 - 23 Luo T, Chen H-Y, Zou Q-X, Wang T, Cheng Y-M, Wang H-F, Wang F, Jin Z-L, Chen Y, Weng S-Q & Zeng X-H (2019) A novel copy number variation in CATSPER2 causes

- idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Human reproduction (Oxford, England)* **34**, 414–423.
- 24 Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G & Raschellà G (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery* **3**, 17071.
- 25 Laity JH, Lee BM & Wright PE (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 39–46.
- 26 Eom KS, Cheong JS & Lee SJ (2016) Structural analyses of zinc finger domains for specific interactions with DNA. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 2019–2029.
- 27 Wolfe SA, Nekludova L & Pabo CO (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 183–212.
- 28 Malgieri G, Palmieri M, Russo L, Fattorusso R, Pedone P V. & Isernia C (2015) The prokaryotic zinc-finger: Structure, function and comparison with the eukaryotic counterpart. *FEBS Journal* **282**, 4480–4496.
- 29 Lobanenkova V V, Nicolas RH, Adler V V, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja A V & Goodwin GH (1990) A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* **5**, 1743–1753.
- 30 Klenova EM, Nicolas RH, Paterson HF, Carne AF, Heath CM, Goodwin GH, Neiman PE & Lobanenkova V V (1993) CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 7612–7624.
- 31 Phillips JE & Corces VG (2009) CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* **137**, 1194–1211.
- 32 Kim S, Yu NK & Kaang BK (2015) CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental & molecular medicine* **47**, e166.
- 33 Ribeiro C, Stadhouders R, Thongjuea S, Soler E & Hendriks RW (2012) DNA-binding factor CTCF and long-range gene interactions in V(D)J recombination and oncogene activation. *Blood* **119**, 6209–6219.
- 34 Oh S, Oh C & Yoo KH (2017) Functional roles of CTCF in breast cancer. *BMB Reports* **50**, 445–453.
- 35 Aitken SJ, Ibarra-Soria X, Kentepozidou E, Flicek P, Feig C, Marioni JC & Odom DT (2018) CTCF maintains regulatory homeostasis of cancer pathways. *Genome Biology* **19**, 1–17.
- 36 Arzate-Mejía RG, Recillas-Targa F & Corces VG (2018) Developing in 3D: the role of

CTCF in cell differentiation. *Development* **145**, dev137729.

- 37 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.
- 38 Dynan WS & Tjian R (1983) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* **32**, 669–680.
- 39 Persengiev SP, Saffer JD & Kilpatrick DL (1995) An alternatively spliced form of the transcription factor Sp1 containing only a single glutamine-rich transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 9107–9111.
- 40 Li L & Davie JR (2010) The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy* **192**, 275–283.
- 41 Suske G (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**, 291–300.
- 42 Oka S, Shiraishi Y, Yoshida T, Ohkubo T, Sugiura Y & Kobayashi Y (2004) NMR Structure of Transcription Factor Sp1 DNA Binding Domain. *Bioche* **43**, 16027–16035.
- 43 Douet V, Heller M & Saux O (2007) DNA methylation and Sp1 binding determine the tissue-specific transcriptional activity of the mouse Abcc6 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 66–71.
- 44 Tian H-P, Lun S-M, Huang H-J, He R, Kong P-Z, Wang Q-S, Li X-Q & Feng Y-M (2015) DNA Methylation Affects the SP1-regulated Transcription of FOXF2 in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 19173–19183.
- 45 Butta N, Larrucea S, Alonso S, Rodriguez RB, Arias-Salgado EG, Ayuso MS, González-Manchón C & Parrilla R (2006) Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter. *BMC Molecular Biology* **7**, 1–12.
- 46 Harrington MA, Jones PA, Imagawa M & Karin M (1988) Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 2066–2070.
- 47 Höller M, Westin G, Jiricny J & Schaffner W (1988) Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes & development* **2**, 1127–1135.
- 48 Tan NY & Khachigian LM (2009) Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 2483–2488.
- 49 Deniaud E, Baguet J, Chalard R, Blanquier B, Brinza L, Meunier J, Michallet MC, Laugraud A, Ah-Soon C, Wierinckx A, Castellazzi M, Lachuer J, Gautier C, Marvel J & Leverrier Y (2009) Overexpression of transcription factor Sp1 leads to gene expression perturbations and cell cycle inhibition. *PLoS ONE* **4**, e7035.

- 50 Hedrick E, Cheng Y, Jin U-H, Kim K & Safe S (2016) Specificity protein (Sp) transcription factors Sp1, Sp3 and Sp4 are non-oncogene addiction genes in cancer cells. *Oncotarget* **7**, 22245–22256.
- 51 Ma W, Horvath G, Kistler M & Kistler WS (2008) Expression patterns of SP1 and SP3 during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* **79**, 289–300.
- 52 Panigrahi SK, Vasileva A & Wolgemuth DJ (2012) Sp1 Transcription Factor and GATA1 cis-Acting Elements Modulate Testis-Specific Expression of Mouse Cyclin A1. *PLoS ONE* **7**, e47862.
- 53 Hammoud SS, Low DHP, Yi C, Carrell DT, Guccione E & Cairns BR (2014) Chromatin and Transcription Transitions of Mammalian Adult Germline Stem Cells and Spermatogenesis. *Cell Stem Cell* **15**, 239–253.
- 54 Hon GC, Rajagopal N, Shen Y, McCleary DF, Yue F, Dang MD & Ren B (2013) Epigenetic memory at embryonic enhancers identified in DNA methylation maps from adult mouse tissues. *Nature Genetics* **45**, 1198–1206.
- 55 Lesch BJ, Dokshin GA, Young RA, McCarrey JR & Page DC (2013) A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 16061–16066.
- 56 Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, Shen Y, Pervouchine DD, Djebali S, Thurman RE, Kaul R, Rynes E, Kirilusha A, Marinov GK, Williams BA, Trout D, Amrhein H, Fisher-Aylor K, Antoshechkin I, DeSalvo G, See L-H, Fastuca M, Drenkow J, Zaleski C, Dobin A, Prieto P, Lagarde J, Bussotti G, Tanzer A, Denas O, Li K, Bender MA, Zhang M, Byron R, Groudine MT, McCleary D, Pham L, Ye Z, Kuan S, Edsall L, Wu Y-C, Rasmussen MD, Bansal MS, Kellis M, Keller CA, Morrissey CS, Mishra T, Jain D, Dogan N, Harris RS, Cayting P, Kawli T, Boyle AP, Euskirchen G, Kundaje A, Lin S, Lin Y, Jansen C, Malladi VS, Cline MS, Erickson DT, Kirkup VM, Learned K, Sloan CA, Rosenbloom KR, Lacerda de Sousa B, Beal K, Pignatelli M, Flicek P, Lian J, Kahveci T, Lee D, Kent WJ, Ramalho Santos M, Herrero J, Notredame C, Johnson A, Vong S, Lee K, Bates D, Neri F, Diegel M, Canfield T, Sabo PJ, Wilken MS, Reh TA, Giste E, Shafer A, Kuttyavin T, Haugen E, Dunn D, Reynolds AP, Neph S, Humbert R, Hansen RS, De Bruijn M, Selleri L, Rudensky A, Josefowicz S, Samstein R, Eichler EE, Orkin SH, Levasseur D, Papayannopoulou T, Chang K-H, Skoultschi A, Gosh S, Disteche C, Treuting P, Wang Y, Weiss MJ, Blobel GA, Cao X, Zhong S, Wang T, Good PJ, Lowdon RF, Adams LB, Zhou X-Q, Pazin MJ, Feingold EA, Wold B, Taylor J, Mortazavi A, Weissman SM, Stamatoyannopoulos JA, Snyder MP, Guigo R, Gingeras TR, Gilbert DM, Hardison RC, Beer MA & Ren B (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355–364.
- 57 Zuo X, Rong B, Li L, Lv R, Lan F & Tong M-H (2018) The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and

- essential for spermiogenesis in mice. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 9188–9197.
- 58 Levine M, Cattoglio C & Tjian R (2014) Looping Back to Leap Forward: Transcription Enters a New Era. *Cell* **157**, 13–25.
- 59 Ionescu-Tîrgoviște C, Gagniuc PA & Guja C (2015) Structural Properties of Gene Promoters Highlight More than Two Phenotypes of Diabetes. *PLOS ONE* **10**, e0137950.
- 60 Jang YJ, LaBella AL, Feeney TP, Braverman N, Tuchman M, Morizono H, Ah Mew N & Caldovic L (2018) Disease-causing mutations in the promoter and enhancer of the ornithine transcarbamylase gene. *Human mutation* **39**, 527–536.
- 61 Gardiner-Garden M & Frommer M (1987) CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* **196**, 261–282.
- 62 Deaton AM & Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development* **25**, 1010–1022.
- 63 Wang Z, Schones DE & Zhao K (2009) Characterization of human epigenomes. *Current Opinion in Genetics & Development* **19**, 127–134.
- 64 Nightingale KP, O'Neill LP & Turner BM (2006) Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**, 125–136.
- 65 Martin C & Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 838–849.
- 66 Zhou VW, Goren A & Bernstein BE (2011) Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* **12**, 7–18.
- 67 Jangid RK, Kelkar A, Muley VY & Galande S (2018) Bidirectional promoters exhibit characteristic chromatin modification signature associated with transcription elongation in both sense and antisense directions. *BMC genomics* **19**, 313.
- 68 Mitsis T, Efthimiadou A, Bacopoulou F, Vlachakis D, Chrousos P. G & Eliopoulos E (2020) Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Acad Sci J* **2**, 3–8.
- 69 Novina CD & Roy AL (1996) Core promoters and transcriptional control. *Trends in genetics : TIG* **12**, 351–355.
- 70 Butler JEF & Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development* **16**, 2583–2592.
- 71 Moses AM, Chiang DY, Pollard DA, Iyer VN & Eisen MB (2004) MONKEY: identifying conserved transcription-factor binding sites in multiple alignments using a binding

- site-specific evolutionary model. *Genome Biology* **5**, R98.
- 72 Rhee HS & Pugh BF (2011) Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* **147**, 1408–1419.
- 73 Xu D, Ma R, Zhang J, Liu Z, Wu B, Peng J, Zhai Y, Gong Q, Shi Y, Wu J, Wu Q, Zhang Z & Ruan K (2018) Dynamic Nature of CTCF Tandem 11 Zinc Fingers in Multivalent Recognition of DNA As Revealed by NMR Spectroscopy. *The journal of physical chemistry letters* **9**, 4020–4028.
- 74 Dehingia B, Milewska M, Janowski M & Pękowska A (2022) CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease. *EMBO reports* **23**, e55146.
- 75 Lee R, Kang M-K, Kim Y-J, Yang B, Shim H, Kim S, Kim K, Yang CM, Min B, Jung W-J, Lee E-C, Joo J-S, Park G, Cho W-K & Kim H-P (2022) CTCF-mediated chromatin looping provides a topological framework for the formation of phase-separated transcriptional condensates. *Nucleic Acids Research* **50**, 207–226.
- 76 Liu Z, Scannell DR, Eisen MB & Tjian R (2011) Control of Embryonic Stem Cell Lineage Commitment by Core Promoter Factor, TAF3. *Cell* **146**, 720–731.
- 77 Jia Z, Li J, Ge X, Wu Y, Guo Y & Wu Q (2020) Tandem CTCF sites function as insulators to balance spatial chromatin contacts and topological enhancer-promoter selection. *Genome Biology* **21**, 75.
- 78 Kubo N, Ishii H, Xiong X, Bianco S, Meitinger F, Hu R, Hocker JD, Conte M, Gorkin D, Yu M, Li B, Dixon JR, Hu M, Nicodemi M, Zhao H & Ren B (2021) Promoter-proximal CTCF binding promotes distal enhancer-dependent gene activation. *Nature Structural & Molecular Biology* **28**, 152–161.
- 79 Lee J-A, Suh D-C, Kang J-E, Kim M-H, Park H, Lee M-N, Kim J-M, Jeon B-N, Roh H-E, Yu M-Y, Choi K-Y, Kim KY & Hur M-W (2005) Transcriptional Activity of Sp1 Is Regulated by Molecular Interactions between the Zinc Finger DNA Binding Domain and the Inhibitory Domain with Corepressors, and This Interaction Is Modulated by MEK*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 28061–28071.
- 80 Nagaoka M, Shiraishi Y & Sugiura Y (2001) Selected base sequence outside the target binding site of zinc finger protein Sp1. *Nucleic acids research* **29**, 4920–4929.
- 81 Wang H, Maurano MT, Qu H, Varley KE, Gertz J, Pauli F, Lee K, Canfield T, Weaver M, Sandstrom R, Thurman RE, Kaul R, Myers RM & Stamatoyannopoulos JA (2012) Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Research* **22**, 1680–1688.
- 82 Holwerda SJB & de Laat W (2013) CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**, 20120369.
- 83 Wei-Guo Z, Kanur S, Zunyan D, Wenrui D, J. DL, Haiming D, Lisa Y, A. V-CM, Christoph

P & A. OG (2003) Methylation of Adjacent CpG Sites Affects Sp1/Sp3 Binding and Activity in the p21Cip1 Promoter. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 4056–4065.

84 Huang X, Gao X, Li W, Jiang S, Li R, Hong H, Zhao C, Zhou P, Chen H, Bo X & Li H (2019) Stable H3K4me3 is associated with transcription initiation during early embryo development. *Bioinformatics* **35**, 3931–3936.

13 ANEXOS

Anexo 1. Comandos para el análisis de datos de CHIP-Seq en consola Ubuntu

- Descarga el archivo en formato “.sra” (herramienta: sratoolkit)

~\$./ prefetch SRRXXXXXX (código del archivo a descargar)

- Transformar el archivo “.sra” a formato “.fastq” (herramienta: sratoolkit)

~\$ fastq-dump SRRXXXXXX.sra (se genera el archivo SRRXXXXXX.fastq)

- Descargar los índices del genoma a utilizar de la página web de bowtie2 (<https://genome-idx.s3.amazonaws.com/bt/mm10.zip>)
- Ejecutar bowtie2 para realizar el alineamiento de las secuencias

~\$ bowtie2 -x index -U nombearchivo.fastq -S nombearchivo.sam (la palabra index corresponde al sufijo de los archivos descargados para el genoma de referencia y puede variar)

- Transformar el archivo “.sam” a formato “.bam” (herramienta samtools)

~\$ samtools sort -o nombearchivo.bam nombearchivo.sam

- Crear un índice del formato “.bam” (herramienta samtools)

~\$ samtools index nombearchivo.bam (se crea un archivo con el nombre nombearchivo.bam.bai)

Hasta aquí todo se debe hacer tanto para el archivo con las lecturas del Input como para el archivo con las lecturas del CHIP.

- Hacer la llamada a picos (programa macs2)

~\$ macs2 callpeak -t **CHIP**.bam -c **Input**.bam -f BAM --outdir . -n **YYY** --nomodel (t indica el archivo del tratamiento, c indica el archivo control, YYY es el prefijo que llevarán los archivos que se generan con este comando)

Anexo 2. Buffers del kit QIAGEN Plasmid Midi

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

Anexo 3. Buffer RIPA

Reactivo	Concentración final	Cantidad para 10mL de buffer
Tris-HCl pH 8.0 (0.1M)	0.05 M	5 mL
Cloruro de sodio (4M)	0.15 M	0.375 mL

Glicerol	1%	0.1 mL
Deoxicolato de sodio	0.5%	0.05 g
SDS (10%)	0.1%	0.1 mL
Tritón X-100	1%	0.1 mL
NP40	1%	0.1 mL
EDTA pH 8.0 (0.5M)	0.001M	0.02 mL
Agua destilada estéril	--	4.155 mL

Anexo 4. Buffers usados en el protocolo de inmunoprecipitación de la cromatina

Buffer	Composición	[final]
Buffer swelling	Hepes pH 7.8	25 mM
	MgCl ₂	1.5 mM
	KCl	10 mM
	DTT	1 mM
	NP-40	0.1%
	PMSF	1 mM
	Inhibidor de proteasas	1X
Buffer de sonicación	Hepes pH 7.9	50 mM
	NaCl	140 mM
	EDTA pH 8.0	1 mM
	Tritón X-100	1%
	SDS	1%
	Deoxicolato de sodio	0.1%
	PMSF	1 mM
	Inhibidor de proteasas	1X
Buffer bajo en sales	SDS	0.1%
	Tritón X-100	1%
	EDTA pH 8.0	2 mM

	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	NaCl	150 mM
Buffer alto en sales	SDS	0.1%
	Tritón X-100	1%
	EDTA pH 8.0	2 mM
	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	NaCl	500 mM
Buffer de LiCl	LiCl	250 mM
	NP-40	1%
	Deoxicolato de sodio	1%
	EDTA pH 8.0	1 mM
	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
Buffer de elución	SDS 0.1%	0.1 %
	NaHCO ₃ 100 mM	0.2 100 mM