



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICA

EFFECTO DE MUTACIONES EN LAS REGIONES AMINO-TERMINAL Y  
CARBOXILO-TERMINAL DE LA PROTEÍNA SRY SOBRE SU UNIÓN A LA  
SECUENCIA DE ADN SRY-CS+

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

BIOL. IRENE SÁNCHEZ MORENO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

COMITÉ TUTORAL: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

DR. RAMÓN CORAL VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Como estudiante fui apoyada por el CONACyT, el IMSS y la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Un agradecimiento profundo a mi casa de estudios la UNAM y a Fundación UNAM que me han brindado su apoyo incondicional a lo largo de 14 años de preparación profesional. Goya!

Un agradecimiento especial al Instituto Mexicano del Seguro Social por permitirme desarrollar mis trabajos doctorales y en especial al Dr. Juan Pablo Méndez Blanco y a la Dra. Patricia Canto Cetina Jefes de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, por brindarme la oportunidad de laborar en su grupo de trabajo.

Agradezco el apoyo que me otorgó la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del IMSS y en especial al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.

Agradezco a mi comité tutorial por su colaboración a lo largo del desarrollo de mis trabajos doctorales y en especial al Dr. Horacio Merchant Larios, por su valiosa participación y por permitirme tener el honor de colaborar.

A mis compañeras de trabajo, las Dras. De la Chesnaye, Olivares y Oviedo por el increíble apoyo que siempre me brindaron.

A mi familia a Carlos en el refrendo de mi tesis profesional y a mi hija Sofía.

## CONTENIDO

Índice de figuras .....	III
Índice de tablas .....	IV
Glosario .....	V
Resumen .....	1
Abstract .....	3
Introducción .....	5
Marco teórico	
Diferenciación sexual.....	7
Regulación molecular de la diferenciación sexual masculina .....	8
Factor determinante del testículo.....	20
Dominio funcional “CAJA HMG”.....	24
Región AMINO TERMINAL.....	27
Región CARBOXILO TERMINAL.....	28
Justificación .....	31
Objetivo general .....	33
Hipótesis.....	33
Metodología	
Extracción de ADN de leucocitos.....	34
Diseño de oligonucleótidos .....	35
Amplificación del exón del SRY .....	36
Secuenciación de ADN .....	37
Clonación de la secuencia codificante del SRY .....	38
Amplificación de las secuencias mutantes del SRY.....	40
Obtención de las proteínas recombinantes.....	41
Cuantificación de las proteínas.....	43
Inmunoelectrotransferencia de las proteínas recombinantes.....	44
Ensayos de movilidad electroforética (EMSA).....	46
Análisis estructural del complejo SRY-ADN.....	46
Resultados	
Amplificación y subclonación del exón del SRY.....	48
Comprobación de la construcción molecular con el exón del SRY ....	48
Construcciones moleculares del SRY con mutaciones por delección .	49

Identificación de las proteínas recombinantes .....	51
Análisis de unión de las proteínas recombinantes al ADN.....	52
Análisis <i>in silico</i> del complejo SRY-ADN.....	56
Discusión .....	59
Conclusiones .....	66
Bibliografía.....	67
Apéndice de Figuras.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .....	78
<b>REGULACIÓN MOLECULAR DE LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GONADAL</b>	
Figura 2 .....	79
<b>AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL SRY CODIFICANTE</b>	
Figura 3 .....	80
<b>VERIFICACIÓN DE LA SUBCLONACIÓN DEL EXÓN DEL SRY SILVESTRE</b>	
Figura 4 .....	81
<b>COMPROBACIÓN DE LA SUBCLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL SRY CON MUTACIONES POR DELECCIÓN</b>	
Figura 5 .....	82
<b>IDENTIFICACIÓN Y EMSA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES</b>	
Figura 6 .....	83
<b>IDENTIFICACIÓN Y EMSA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO FUSIONADAS PURAS</b>	
Figura 7 .....	84
<b>EMSA CON COMPETENCIA ESPECÍFICA Y SUPERRRETARDO</b>	
Figura 8 .....	85
<b>ANÁLISIS DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SRY RECOMBINANTES</b>	
Figura 9 .....	86
<b>DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (<i>kd</i>) DE LAS PROTEÍNAS DEL SRY SILVESTRE Y MUTANTES</b>	
Figura 10 .....	88
<b>MODELO DE LA INTERACCIÓN DEL SRY SILVESTRE-ADN</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 .....	86
<b>EVALUACIÓN DE LOS MODELOS MOLECULARES DEL SRY SILVESTRE</b>	

## GLOSARIO

**Alineamiento estructural:** De manera similar al alineamiento de secuencias de ADN, el alineamiento estructural de proteínas considera la secuencia de los aminoácidos, incluye datos fisicoquímicos, bioquímicos y estadísticos relativos a la frecuencia de aparición de dicho residuo en estructuras secundarias.

**Análisis densitométrico:** Análisis computacional basado en algoritmos mediante los cuales se determina la densidad óptica de una región en la superficie de un gel.

**Archivo PDB:** Archivo computacional que contiene las coordenadas de los átomos contenidos en una molécula, así como información adicional de la técnica utilizada (cristalografía, resonancia magnética nuclear o modelo) y de los autores. Los archivos PDB de las estructuras conocidas hasta el momento se encuentran depositados en la base de datos del Protein Data Bank en la dirección electrónica (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

**Choques atómicos:** Irrupción a la regla del equilibrio de la distancia interatómica y energía de repulsión o distancia de van der Waals que indica las distancias mínimas entre dos átomos (O-N 2.85Å, O-H 1.85Å).

**Complejos multiprotéicos de alto orden:** Unidades funcionales de gran importancia que participan en el ciclo celular (duplicación de ADN, apoptosis, etc.) y pueden estar compuestos por segmentos de ADN y/o ARN y proteínas.

**Desoxirribonucleótidos modificados y marcados:** Desoxirribonucleótidos trifosfatados (adenina, guanina, citosina, timina) con la adición por un lado de un grupo N en la posición 3', que imposibilita la formación del enlace 5-3' fosfodiéster y por el otro contienen una molécula fluorescente específica para cada uno de dichos desoxirribonucleótidos.

**Desviaciones de los carbonos  $\beta$ :** La medición de la distorsión del ángulo de enlace entre el carbono  $\beta$  y el grupo R de los aminoácidos refleja incompatibilidad entre las cadenas laterales de la proteína; a desviaciones mayores ( $>0.25 \text{ \AA}$ ) la incompatibilidad se ve reflejada entre las cadenas lateral y principal.

**Determinación de la constante de disociación ( $k_d$ ) por competencia:** En la determinación de la  $k_d$  mediante EMSA y la técnica de competencia específica del segmento de ADN se emplean concentraciones crecientes de la sonda de ADN no marcada y la cantidad de la proteína se mantiene constante, por lo que el ADN marcado es desplazado por el no marcado.

**Determinación de la  $k_d$  por titulación:** Determinación de la  $k_d$  mediante la incorporación de concentraciones crecientes de la proteína de interés en ausencia del competidor específico.

**Disgenesia gónadal 46,XY completa:** Es la condición clínica que se caracteriza por ausencia de la determinación testicular y en individuos con cariotipo 46,XY por la formación de genitales externos femeninos, estructuras mullerianas

normales, ausencia de estructuras wolffianas, así como gónadas disgenéticas bilaterales.

***Disgenesia gónadal 46,XY parcial:*** Es el cuadro clínico que se caracteriza por una formación testicular parcial. En individuos con cariotipo 46,XY se forman genitales externos ambiguos que pueden presentarse como casi completamente femeninos o casi masculinos, mezcla de conductos de Wolff y de Muller, estría gonadal de un lado y cualquiera de las siguientes condiciones en la gónada contralateral: testículo disgenético o normal, incluso con ambos testículos disgenéticos o bien un tumor de un lado con una gónada contralateral.

***Disgenesia gonadal:*** Término que incluye diversas patologías en las que el desarrollo de la gónada fetal es anormal, entre las que se encuentra el síndrome de Turner y sus variantes, la Disgenesia Gonadal Completa 46,XX o 46,XY; la Disgenesia Gonadal Parcial 46,XY o 45,X/46, XY.

***Displasia Campomélica:*** Es un cuadro clínico caracterizado por la curvatura y acortamiento simétrico de extremidades inferiores y generalmente mortal por insuficiencia respiratoria. Esta enfermedad se asocia en el 50% de las ocasiones con disgenesia gonadal con un fenotipo femenino y un cariotipo 46,XY. Se trata de un proceso genéticamente determinado y ligado a mutaciones del gen SOX9.

**Energía libre de una proteína:** La energía libre de la estructura de una proteína, al igual que en un modelo, está dada por las interacciones de atracción y repulsión de los átomos que la constituyen.

**Error en el ángulo del enlace químico:** Irrupción al plano de Ramachandran.

**Error en el enlace químico:** Irrupción a la regla del equilibrio en la distancia de enlace de van der Waals, en la que se considera el radio atómico y la carga de los átomos que conforman el enlace.

**Estrías gonadales:** Agenesia de la gónada, en donde predomina el tejido conectivo y la carencia de actividad endocrina.

**Estructura secundaria de proteínas:** Es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Las estructuras secundarias de las proteínas pueden ser hélice alfa, hoja beta, giros beta, hélice de colágena, láminas beta o láminas plegadas.

**Estructura terciaria de las proteínas:** Es el modo en el que la cadena polipeptídica se pliega en las tres dimensiones, lo que da lugar a la disposición de los dominios estructurales en el espacio. La estructura terciaria se organiza por las interacciones de repulsión y atracción entre los átomos que conforman a los aminoácidos de la cadena polipeptídica y el medio en que se encuentran disueltos, de manera que en un medio acuoso (polar) los aminoácidos no polares se sitúan hacia el interior y los polares hacia el exterior y viceversa. La

estructura terciaria de las proteínas está estabilizada por [enlaces covalentes](#) entre los residuos de cisteína, puentes de hidrógeno entre cadenas laterales, interacciones iónicas entre cadenas laterales, [interacciones de van der Waals](#) entre cadenas laterales y el efecto hidrofóbico.

**Geometría de la proteína:** Reglas matemáticas y fisicoquímicas de las proteínas para determinar si es globular (simetría esférica) o fibrosa.

**Hipoplasia suprarrenal congénita:** Esta condición agrupa varias enfermedades que tienen en común el incorrecto desarrollo de las glándulas suprarrenales durante el periodo embrionario; esta patología se hereda y se presenta al nacimiento y es evidenciada cuando las glándulas suprarrenales no producen suficiente cantidad de hormonas.

**Minimización de energía:** Análisis basado en diferentes algoritmos que contabiliza la energía de repulsión y atracción entre los átomos de una molécula, en el que se realizan cambios en la estructura para minimizar la energía y conseguir estructuras energéticamente equilibradas.

**Plano de Ramachandran:** Representación gráfica de la frecuencia de los ángulos  $\psi$  y  $\phi$  del enlace peptídico, presentes en las proteínas con estructura conocida, mismo que es utilizado como criterio de calificación para estructuras no normalizadas y modelos moleculares.

**Protonación:** Simulación (*in silico*) de la adición de átomos de hidrógeno a la molécula o modelo en la que se agregan datos al archivo PDB de los átomos

de hidrogeno, cargas totales, parciales y polaridad, así como la probabilidad de éstos para formar puentes de hidrógeno.

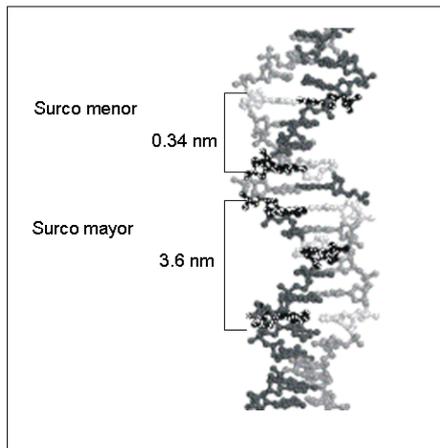
***Raíz cuadrática de la distancia media (RMSD):*** Medida de distancia entre los átomos de dos cadenas polipeptídicas que sirve para demostrar la similitud estructural entre dos moléculas.

***Síndrome de Frasier:*** Caracterizado por genitales externos femeninos en individuos 46,XY, falla renal, estrías gonadales con alto riesgo de desarrollar gonadoblastoma.

***Síndrome Denis Drash:*** Caracterizado por genitales ambiguos o pseudohermafroditismo masculino, enfermedad glomerular y nefroblastoma.

***Superretardo:*** Técnica de laboratorio basada en el ensayo de movilidad electroforética, en la que además de adicionar los componentes básicos de la reacción, se adiciona un anticuerpo específico contra la proteína de interés, con lo que se comprueba la interacción de la proteína (identificada con el anticuerpo) y el ADN, reflejado por el superretardo del complejo ternario formado en la reacción (anticuerpo-proteína-ADN).

***Surco menor del ADN:*** La relación de las cadenas complementarias antiparalelas del ADN, forman el surco mayor y el surco menor del ADN, sitios de interacción directa con diversos factores de transcripción.



***Tumor de Wilms:*** El tumor de Wilms, también denominado nefroblastoma, es un tumor maligno que se origina en las células del riñón. Es consecuencia de mutaciones en el gen supresor de tumor de Wilms en el que se ve afectado el crecimiento de las células del riñón. En general, estas mutaciones se producen después del nacimiento. Sin embargo, en ciertos casos los niños nacen con una alteración genética que los predispone a desarrollar el cáncer.

## RESUMEN

El SRY (Sex Region Y Chromosome) dirige el desarrollo testicular. Se ha sugerido que solo la caja HMG (High Mobility Group) del SRY es importante para su función; sin embargo, los estudios de Dezcloseaux y cols. y Assumpcao y cols. demostraron que la región amino-terminal (N-terminal) participa en la unión al ADN y que dicha participación esta mediada por la fosforilación de residuos de serina localizados en dicha región. Así mismo, los hallazgos descritos por Oh y cols. demuestran la participación del carboxilo-terminal (C-terminal) en la interacción del SRY con la proteína remodeladora de la cromatina KRAB-O.

Por lo anterior en el presente trabajo se analizó la actividad del SRY silvestre y de tres mutantes (la caja HMG, las proteínas con delección del C-terminal y del N-terminal) en su unión al ADN, mediante ensayos *in vitro*. Se determinó la capacidad de unión de las proteínas mediante la cuantificación de la densidad óptica de las bandas/complejos formados en los geles de retardo, así como la determinación de la constante de disociación. Adicionalmente, se analizó la participación de las regiones del N-terminal y C-terminal en un modelo molecular tridimensional del SRY.

Entre los resultados obtenidos se observó que la mutante de la caja HMG y la mutante con delección del C-terminal presentaron una disminución en su unión al ADN estadísticamente significativa, cuando se compararon con el SRY silvestre (SRYs). Contrariamente la afinidad de la mutante con delección del N-terminal al ADN fue similar a la presentada por el SRYs.

El modelo de la estructura tridimensional del SRY sugiere que algunos residuos de la región del C-terminal interactúan con el ADN. En el presente trabajo se demostró *in vitro* la importancia que tiene la región del C-terminal del SRY en su unión al ADN. Por otro lado, la afinidad del péptido correspondiente a la caja HMG es menor estadísticamente cuando se comparó con el SRYs. Finalmente en el presente trabajo se determinó que el análisis de la interacción del SRY-ADN en extractos crudos de proteínas, así como de proteínas fusionadas al Glutation-S-Transferasa (GST) pueden ocasionar resultados cualitativa y cuantitativamente imprecisos.

## ABSTRACT

It is well established that SRY transcription factor directs testicular development. Pioneer studies implicated the high mobility group (HMG) box of the SRY, as the only region important for the function of this protein. However, several studies have suggested that both, the N-terminal and the C-terminal regions are also involved in this process. Herein, we report the analysis and comparison of the results obtained from *in vitro* experiments, performed to assess the DNA binding activity of the full length SRY and three mutants (HMG box alone, N-terminal less and C-terminal less SRY proteins). DNA binding capability was analyzed by mobility shift assays, optical density and dissociation constant employing bacterial crude extract, pure GST-fusion SRY proteins and pure non-fusion SRY proteins. The structure of the full length SRY was carried out using a protein molecular model.

We observed a statistically significant diminished DNA binding capability in the HMG box SRY alone as well as in the mutant lacking the C-terminal portion of the protein, in comparison with the full length SRY. In contrast, the affinity for DNA presented by the N-terminal less SRY, was relatively similar to the wild type SRY. Likewise, the three dimensional structure of the full-length form, suggested that some residues of the C-terminal region of the SRY interact with the DNA. Hence, we demonstrated the importance of the full length SRY particularly the C-terminal region of the protein in the process of binding DNA *in vitro*. Moreover, the affinity of the HMG box alone was clearly reduced, when compared to the affinity for DNA of the full length SRY. Based upon the reduced affinity for DNA of the HMG box alone, we conclude that the C-terminal and N-

terminal regions of the SRY protein are important for the interaction with DNA. This interaction may occur through direct contact between the DNA and some residues of the C-terminal portion or indirectly with the N-terminal region, which was visualized in the three dimensional model.

## INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual surgió en nuestro planeta hace 600 millones de años y posteriormente la diferenciación entre organismos de la misma especie pero con diferente sexo o dimorfismo sexual. Biológicamente, la separación de sexos representa una enorme ventaja evolutiva que junto con la adaptación al medio ambiente favorecen el éxito de la especie, razón por la cual, Erasmus Darwin se refirió a la reproducción sexual como “la pieza maestra de la naturaleza” [1].

El primer acercamiento encaminado a dilucidar las diferencias entre los sexos fue realizado por Theophilus Shickel, quien presentó el primer conteo de cromosomas humanos [2]; por otro lado, Joe Hin Tjio y Albert Levan [3] determinaron que una célula somática humana contenía 46 cromosomas. Asimismo, los primeros indicios de que el sexo es un rasgo hereditario surgieron cuando se descubrió que en la mosca *Drosophila melanogaster* habían diferencias entre los cromosomas del macho y de la hembra. De esta forma se determinó que existe un componente genético en la determinación del sexo, de tal manera que tanto en el humano como entre otros organismos, el sexo masculino presenta un par de cromosomas sexuales XY y el sexo femenino, el par XX [4].

Los trabajos del fisiólogo Británico Edouard Brown-Séquard (a quien se le atribuye el descubrimiento de la hormona testosterona), dieron a conocer que ciertos factores presentes en el testículo son vitales para el mantenimiento de la vida [5]. Por otro lado, Alfred Jost demostró la importancia de las gónadas en el dimorfismo sexual; sus experimentos con conejos gonadectomizados *in útero* dejaron en claro que el paso intermedio entre la asignación del sexo genético y

las diferencias fenotípicas entre los sexos reside en las gónadas, ya que los conejos sin gónadas se desarrollaron con fenotipo femenino, independientemente del sexo cromosómico [4]. Gracias a los trabajos mencionados, se determinó que la hormona testosterona presente en el testículo, influye en la masculinización y que esta influencia tiene bases en el contenido genético de los organismos.

Los avances científicos y tecnológicos en las últimas décadas del siglo pasado permitieron la exploración científica a nivel molecular en la determinación y diferenciación sexual. Durante 40 años, diversos grupos de investigación se dieron a la tarea de encontrar el factor que determina la diferenciación testicular, el cual debía residir en alguna región del cromosoma Y, mismo que es distintivo del sexo masculino. Durante este lapso se postuló que el gen que codifica el *antígeno H-Y* [6, 7], las secuencias *Bkm* ("Banded Krait minor") [8] y el gen *ZFY* (que codifica para las proteínas de los dedos de Zinc del cromosoma Y) [9, 10], podrían ser el factor que determina la diferenciación del testículo, sin embargo, evidencias posteriores llevaron a descartarlas [11-15].

Finalmente en 1990, Sinclair y cols.[16] identificaron al gen que induce la diferenciación de la gónada primitiva en testículo, denominándosele gen determinante del sexo del cromosoma Y o *SRY* (por sus siglas en inglés, Sex Region in Y Chromosome).

## **MARCO TEÓRICO**

### *Diferenciación sexual*

En el desarrollo humano, la formación de las gónadas tiene lugar en la región del mesodermo intermedio, adyacente al mesonefros. Durante la 4ª semana de gestación surge una pequeña prolongación bilateral llamada cresta urogenital, mismas que permanecen sexualmente indiferenciadas hasta la 7ª semana. En este lapso de tres semanas el epitelio que cubre las crestas, prolifera y se extiende sobre el tejido conectivo presente en la médula de éstas [17].

En el rudimento gonadal se encuentran dos tipos celulares, las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales (CGPs). Estas últimas, durante la 6ª semana de gestación, migran desde la parte caudal del saco vitelino hasta las crestas urogenitales [18].

El componente celular somático de la gónada indiferenciada lo comprenden las células epiteliales y las células mesenquimales. El linaje de células epiteliales dan origen a las células de Sertoli y el proceso de diferenciación inicia al mismo tiempo que la actividad génica del factor determinante testicular (FDT) o gen *SRY* puede ser detectada, lo anterior se considera como decisivo en la iniciación de la formación de la arquitectura testicular. Posteriormente se diferencian las células mesenquimales mismas que darán origen a las células de Leydig y las células mioides peritubulares. La presencia de estos tres tipos celulares es crítica para establecer la morfología y producción hormonal del testículo [19, 20].

En el momento en que termina la migración de las CGPs, las células somáticas de la gónada masculina rodean a estas últimas, dicho arreglo constituye el primer rasgo distintivo en la diferenciación de la gónada masculina y representa el inicio en la conformación de los cordones testiculares; mas adelante, el arreglo testicular es más evidente, cuando las células peritubulares mioides forman la segunda capa alrededor de los cordones testiculares [21, 22].

Por otro lado, las estructuras primordiales del tracto genital que darán origen a los genitales internos de ambos sexos son formados por los conductos de Wolff (mesonéfricos), en el caso del sexo masculino y los conductos de Müller (paramesonéfricos) en el caso del sexo femenino. Estos conductos se encuentran presentes en los organismos en desarrollo tanto de sexo masculino como femenino, de tal forma que uno de los dos conductos prevalece y el otro involuciona según el sexo del individuo [23].

En ausencia del FDT, la gónada primitiva se diferencia en ovario, proceso en el cual la presencia de las células germinales primordiales es crucial para su formación, ya que se ha observado que la ausencia de éstas da lugar a la formación de estrías de tejido fibroso [24].

### *Regulación molecular de la diferenciación sexual masculina*

La gónada bipotencial en los embriones de ambos sexos es morfológicamente indistinguible, por lo que antes de la expresión del *SRY/Sry* numerosos factores actúan en un esquema de regulación muy preciso para diferenciar la cresta urogenital bipotencial (figura 1). Adicionalmente, debido a que de la cresta urogenital se diferencian el mesonefros, la corteza suprarrenal y las gónadas,

la presencia de mutaciones en los genes involucrados se han asociado a alteraciones en la formación de los órganos antes mencionados; sin embargo, en pocos casos se ha descrito la alteración exclusiva de las gónadas.

### *LHX9*

Uno de los genes involucrados en la diferenciación de la gónada bipotencial del humano es *LHX9*, localizado en el cromosoma 1q31; dicho gen codifica para un factor de transcripción con homeodominio y dos regiones en donde predomina la cisteína, mismas que han sido catalogadas como sitios de interacción proteína-proteína (a través de la unión al ión zinc).

Mediante estudios moleculares se ha descrito que dicho gen se expresa en la región abdominal del embrión humano durante las semanas 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> de gestación. Hasta el momento, no se han descrito mutaciones en la región codificante de este gen en casos con aberraciones en la diferenciación gonadal [25]. Sin embargo, se ha demostrado en modelos murinos que la ausencia del factor *Lhx9* induce agenesia gónadal en organismos de ambos sexos, así como otras anomalías. Así mismo, se ha demostrado que el gen *Lhx9* murino se expresa al inicio de la gastrulación en los pliegues viscerales y laterales que dan lugar al mesenquima, así como en el cerebro, en las yemas que formaran las extremidades y en las crestas urogenitales, en estas últimas la expresión del *Lhx9* declina al tiempo en que las células epiteliales se diferencian en células de Sertoli y su expresión es imperceptible cuando estas células inician la expresión de la hormona antimülleriana (*HAM*) [26-28].

Por otro lado, se ha descrito que otros genes con homeodominio como *Emx2* y *Lim1* participan en la organización estructural del pliegue urogenital y de la gónada bipotencial del ratón, así como en la activación génica de *Pax2* [29, 30].

### *WT1*

El gen supresor del tumor de Wilms (*WT1*) (cromosoma 11p13), codifica para un factor de transcripción con un dominio de dedos de zinc en el extremo carboxilo terminal (interacción proteína-proteína) y secuencias ricas en glutamina-prolina en el amino terminal (interacción con el ADN). De este gen, se han descrito 24 isoformas, las cuales son generadas mediante la presencia de diferentes sitios de inicio de la transcripción y por la edición alternativa del ARN (splicing alternativo). Una de las isoformas es la *WT1-KTS*, en la cual se eliminan los aminoácidos lisina, treonina y serina ubicados en la región del carboxilo-terminal y por otro lado la isoforma *WT1+KTS*, que contiene dichos residuos. Ambas formas alternativas del factor *WT1* tienen funciones no redundantes de gran importancia en los procesos del desarrollo urogenital [31, 32].

Se ha descrito la participación de la isoforma *WT1+KTS* en el desarrollo renal, de las glándulas suprarrenales y de la gónada indiferenciada, en esta última a través de la regulación directa de la expresión del gen *SRY* [32]. Adicionalmente, en un modelo de ratones carentes de la isoforma *WT1+KTS*, presentaron reversión sexual completa XY, fenotipo femenino, estrías gonadales y una importante reducción en la expresión del gen *Sry*. Por otro

lado, se ha descrito que la isoforma *WT1-KTS*, regula la expresión de la *HAM*, en asociación con el factor de transcripción *SF1* [33].

Diversas evidencias apoyan que el factor de transcripción *WT1* desempeña funciones críticas en los procesos de desarrollo del riñón, de las crestas urogenitales y de las gónadas; así mismo, se ha descrito que participa en la diferenciación del epitelio celómico y en el mantenimiento de las crestas urogenitales, así como en el desarrollo del bazo, glándulas suprarrenales, epicardio y retina. Finalmente, mutaciones en este gen se han asociado a tres diferentes padecimientos con alteraciones en el tracto urogenital y retraso mental (Tumor de Wilms, Síndrome de Deniy-Drash y Síndrome de Frasier) [34, 35].

## *SF1*

El gen *SF1* se localiza en el cromosoma 11q13 y codifica para un factor de transcripción nuclear huérfano esterodogénico, el cual contiene un motivo de dedos de zinc con el que interactúa directamente con el ADN en forma de monómero. Este factor de transcripción es considerado un regulador importante del sistema reproductivo, ya que su función en el desarrollo es esencial para la homeostasis endocrina en la vida postnatal [36].

Se ha observado su expresión en células del mesodermo y en las crestas urogenitales, específicamente en las células precursoras de las células esteroidogénicas presentes en las glándulas suprarrenales y en las gónadas. Dicha actividad transcripcional se encuentra precedida por la activación génica de *WT1* y antecede a la del *SRY*. Su expresión es dimórfica, ya que la proteína

se ha encontrado en diferentes puntos del desarrollo gónadal en el sexo masculino, en los cordones testiculares y en las células esteroidogénicas de Leydig, estimulando la proliferación y supervivencia celular; por el contrario, en el sexo femenino solo se ha detectado su expresión en el epitelio celómico [31, 37].

Adicionalmente, en estudios en un modelo murino que no expresa esta proteína, se observó que estos ratones presentaban ausencia tanto de glándulas suprarrenales como de las gónadas, así como reversión sexual, entre otras alteraciones [38]. Finalmente, la presencia de mutaciones en el gen *SF1* en los humanos dan lugar a insuficiencia suprarrenal y reversión sexual 46,XY [39, 40]. Sin embargo, existen en la literatura casos en donde diversas mutaciones en este gen se tradujeron en reversión sexual 46,XY sin afectación en la función suprarrenal [41, 42].

### *DAX1*

El gen *DAX1*, se localiza en el cromosoma sexual Xp21.2-21.3. Es miembro de la familia de receptores nucleares hormonales huérfanos, el cual posee una región de unión a ligando en el extremo carboxilo-terminal y una región atípica de interacción con el ADN, la cual consiste de secuencias de aminoácidos repetidos [22].

La expresión de este gen se ha observado en las glándulas suprarrenales, la hipófisis y las gónadas; así mismo su función es principalmente la de inhibir la expresión de sus genes blanco como *SF1* y *GATA-4*, así como a los receptores de estrógenos y andrógenos. Por otro lado, su actividad génica debe

mantenerse en equilibrio con relación a la del gen *SRY* para el desarrollo testicular adecuado. En estadios posteriores a la activación del *SRY* en el testículo, el perfil de expresión de *DAX1* es dimórfico, ya que durante la formación de los cordones testiculares su expresión decrece, mientras que en el desarrollo del ovario permanece [43].

Los estudios llevados a cabo en ratones carentes de éste gen, demostraron que éstos eran infértiles y que presentaban alteraciones en la arquitectura testicular [44]. Finalmente, existen casos clínicos de pacientes con reversión sexual 46,XY en los cuales se demostró la presencia de duplicación del gen *DAX1*, con un gen *SRY* intacto, por lo que se ha propuesto que la presencia de una doble dosis de este gen es suficiente para impedir la diferenciación testicular [45]. No obstante, hasta la fecha, en el humano las mutaciones en éste gen dan lugar a sujetos con hipoplasia suprarrenal congénita e hipogonadismo hipogonadotrópico, sin alteración en la arquitectura testicular [46].

#### *GATA-4*

El gen *GATA-4* se localiza en el cromosoma 8p23.1-22 y codifica para un factor de transcripción con el motivo funcional de dedos de zinc, mismo que pertenece a la familia de factores GATA [47]. Hasta el momento, los estudios realizados para conocer los perfiles de expresión de este factor son escasos. La proteína *GATA-4* solo ha sido identificada en las células de la granulosa y estromales entre las semanas 13<sup>a</sup> a 33<sup>a</sup> de gestación y no existen estudios conducidos en otros estadios de la diferenciación femenina. Por otro lado, se

ha detectado su expresión a la 12<sup>a</sup> semana de gestación, específicamente en las células de Sertoli y en menor grado en los túbulos seminíferos, así mismo, se ha descrito que el nivel máximo de su expresión, se ubica durante la proliferación de las células de Sertoli (15<sup>a</sup> semana de gestación) y posteriormente la actividad del gen se mantiene en niveles detectables a lo largo del desarrollo, así como en la vida adulta [31, 48].

Se ha demostrado que este factor, así como su cofactor FOG2, promueven la diferenciación gonadal [49], ya que los ratones nulos para estos genes presentan defectos en la gonadogénesis de ambos sexos, así como un decremento en los transcritos del *Sry* en el momento esperado de máxima expresión (E 11.5). Adicionalmente se ha descrito que mutaciones *en Gata-4* y *Fog2* inhiben la expresión de los factores de transcripción *Sox9*, *Ham* y *Dhh*, así como la síntesis de algunas enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides como el citocromo P450 [50].

## SOX9

El gen *SOX9* se localiza en el cromosoma 17p13.3 y codifica para un factor de transcripción que se agrupa en la familia de proteínas SOX. La proteína *SOX9*, como otras proteínas SOX, posee un dominio de unión al ADN, llamado caja HMG, así como una región corta en el extremo amino-terminal y un carboxilo-terminal en el cual se encuentran dos sitios de transactivación y una secuencia de homodimerización [51].

Se demostró que *SOX9* tiene una expresión dimórfica, pudiendo localizarse en las células somáticas de la cresta genital en desarrollo. La activación génica

puede detectarse inmediatamente después de que el *SRY* inicia su expresión, por lo que *SOX9* se puede encontrar en el linaje de las células de Sertoli del macho, al mismo tiempo que el *SRY* se encuentra en su máxima expresión (figura 1). Se ha sugerido que el factor de transcripción *SOX9* en el desarrollo testicular normal tiene la función de mantener la maquinaria molecular para que se lleve a cabo de la diferenciación testicular ya que la expresión del *SRY* aumenta y decrece rápidamente [52].

Recientemente, el estudio realizado por Sekido y Lovell-Badge [53], terminó con el más grande enigma en los procesos moleculares de la diferenciación testicular en el ratón. En este trabajo los autores demuestran que la proteína *Sry* murina se une a sitios múltiples de regulación en la región promotora del gen *Sox9*. El estudio comprende ensayos con mutantes y cotransfecciones, así como ensayos *in vivo*. En este trabajo, el análisis de secuencias muestra un alto porcentaje de conservación de elementos reguladores entre las secuencias promotoras del gen *Sox9* murino y sus homólogos en el gorila, la cabra, el conejo y en el humano.

Adicionalmente, se ha descrito que el factor *SOX9*, entre otros como: *SF1*, *WT1* y *GATA-4*, activan la transcripción del gen que codifica para la *HAM*, misma que provoca la regresión de los conductos que darán lugar al aparato reproductor femenino [31, 51].

Se ha descrito que *SOX9* es capaz de inducir el desarrollo testicular en ratones transgénicos XX [54]. Por otro lado, el 75% de los pacientes con displasia campomélica (enfermedad en la que se presentan alteraciones en la formación de tejido cartilaginoso) con mutaciones en el gen *SOX9*, presentan reversión sexual 46,XY [55-57]. Asimismo, se reportó un caso con síndrome de varón XX,

el cual tenía duplicado el gen *SOX9* y no presentaba *SRY*, por lo que se ha sugerido que la dosis extra del gen es suficiente para iniciar la diferenciación testicular en ausencia del gen *SRY* [58].

### *HAM*

El gen que codifica para la hormona antimülleriana o inhibidora de los conductos de Müller se localiza en el cromosoma 19p13.3. La transcripción de este gen resulta en una proteína de secreción que forma parte de la familia de los factores transformantes del crecimiento (TGF-beta). La principal función del péptido activo (carboxilo-terminal) es producir la regresión de los tejidos Müllerianos en el desarrollo masculino. Se ha encontrado su ARN mensajero en las células de Sertoli durante la diferenciación sexual, la pubertad y en menor grado en células de la granulosa desde el nacimiento hasta la menopausia [59]. Su expresión es delicadamente regulada por *WT1*, *SF1*, *GATA-4* y *SOX9*. Se ha descrito el evento sincronizado en el disparo de la expresión de la HAM y la atenuación de la expresión del *SRY*, así como el máximo en la expresión de *SOX9* [51].

La HAM constituye la primera hormona sexual que se expresa en la gónada masculina, su función principal al igual que las demás hormonas sexuales es la de promover la diferenciación fenotípica.

Una vez iniciada la síntesis de la HAM ocurre la diferenciación de las células intersticiales del testículo fetal para dar lugar a las células de Leydig, mismas que iniciarán la síntesis y secreción de la segunda hormona masculinizante, la testosterona (T) [60].

En la literatura se han descrito diversas mutaciones en el gen que codifica para la *HAM* en pacientes con el síndrome de persistencia de derivados Mülllerianos (trompas de Falopio, útero y el tercio superior de la vagina), sin alteración en los genitales externos masculinos [60].

### *DHH*

El gen Desert hedgehog (*DHH*) se localiza en el cromosoma 12q12-13.1 y codifica para una proteína de secreción que pertenece a la familia de proteínas hedgehog (Hh), la cual es sintetizada como una proteína precursora. La proteína *DHH* madura está constituida por el fragmento amino-terminal, el cual es responsable de todas las funciones biológicas conocidas, entre las que destacan su participación en los eventos celulares de diferenciación y proliferación en el desarrollo del corazón, sistema nervioso periférico y testículo [52].

El gen *DHH* presenta una expresión sexual dimórfica y ésta puede ser detectada en el linaje de las células de Sertoli del macho, seguido de la expresión del gen *SRY*; contrariamente al ovario en el cual no se expresa (figura 1). Los estudios realizados con ratones machos carentes de este gen indicaron que más del 90% se clasificaron como pseudohermafroditas con fenotipo femenino, caracterizado por tejido mamario y apertura vaginal. Estos organismos eran estériles y presentaban anomalías en la morfología del testículo, ausencia de células de Leydig, así como acumulación de células semejantes a fibroblastos, entre otras [61].

Patched 1 (PTCH1) forma parte de la familia de genes patched y es receptor de DHH, así como de otras proteínas Hedgehog, el gen se localiza en 9q22.3 y su expresión génica ha sido estudiada en modelos murinos en donde se ha detectado en las células intersticiales del testículo (12.5-13.5 d.p.c.). Se ha determinado que la señalización de Dhh a través de su receptor Ptch1 estimula la diferenciación de las células de Leydig entre otras funciones [62].

Adicionalmente se han encontrado mutaciones en el gen *DHH* en sujetos 46XY con alteraciones en la diferenciación testicular, por lo que se ha propuesto que este gen desempeña un papel importante en la diferenciación de la gónada [63-65].

## **FGF9**

El gen que codifica para el factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF9) se localiza en 13q11-12 y forma parte de la familia de factores de crecimiento del fibroblastos, la cual está constituida por una amplia variedad de activadores de la mitosis y del mantenimiento celular. Estos factores están implicados en procesos biológicos como el desarrollo embriológico, crecimiento celular, morfogénesis, reparación tisular y crecimiento e invasión tumoral.

Particularmente el homólogo murino Fgf9 está implicado en la proliferación de las células progenitoras de las células de Sertoli promoviendo la formación de los cordones testiculares, así mismo se ha descrito que su actividad génica coincide con la activación del gen *Sry* y con la acumulación del factor de transcripción *Sox9* y sus propios receptores 2 y 3 (FgfR2 y FgfR3) en el núcleo de las células somáticas del testículo en desarrollo [66].

Por otro lado Fgf9 de manera conjunta con Fgf2 promueven la diferenciación celular de las células progenitoras del linaje que da lugar a las células de Sertoli y la sobrevivencia de las células germinales de la gónada masculina en desarrollo de la rata [67, 68].

Un estudio conducido en ratones carentes de el gen Fgf9 demostraron que el número de las células germinales decrece después de los 11.5 d.p.c., posteriormente la gónada inicia la reversión sexual masculina aparentando un arreglo femenino, mismo que más adelante sufre una desorganización [69].

Finalmente un estudio conducido en el humano demuestran que FGF9 se encuentra presente en la gónada masculina en el segundo trimestre del embarazo, por lo que se sugiere que pudiera tener algún papel en el mantenimiento del número de células de Sertoli y germinales. Sin embargo hasta el momento no se han descrito casos de reversión sexual en el humano debida a mutaciones en este gen, recientemente en un estudio conducido con pacientes con reversión sexual se determino que la presencia del polimorfismo funcional TG(14) en la región 3' no traducida del gen FGF9 afecta su actividad transcripcional, así como la estabilidad su transcrito maduro [66].

#### *WNT-4*

El gen que codifica para la proteína WNT-4 se localiza en el cromosoma 1p36.23, el producto de su transcripción corresponde a una proteína de secreción perteneciente a la familia de proteínas WNT que se encuentra involucrada en la determinación del sexo. Esta proteína se localiza en la gónada indiferenciada de ambos sexos en estadios embrionarios previos a la

determinación gonadal. Posteriormente, en el macho la expresión de WNT-4 se encuentra reprimida, mientras que en el desarrollo sexual femenino la expresión de este gen prevalece [69].

Se ha demostrado que la función de *WNT-4* es la de bloquear el desarrollo del fenotipo masculino en los embriones XX, es decir, que WNT-4 evita la expresión de las hormonas masculinas, reprime la migración de las células endoteliales y esteroidogénicas y como consecuencia la formación de vasos sanguíneos específicos del macho, los cuales son necesarios para el transporte de testosterona para dar lugar al fenotipo masculino [70].

Por otro lado, el exceso de *WNT-4* en ratones machos XY transgénicos, conduce a una desorganización de la vasculatura testicular, así como a una disminución de la testosterona [71]. Adicionalmente, se describió un caso con reversión sexual 46,XY con duplicación de una parte del cromosoma 1, en el cual se encuentra el gen *WNT-4*, por lo que se considera que la presencia de una doble dosis de este gen es suficiente para impedir la diferenciación testicular, razón por la que se le a llamado factor “anti-masculino” [72].

### *SRY (FACTOR DETERMINANTE DEL TESTÍCULO)*

Al comienzo de la década de los 90's se identificó el gen que marca el inicio de los eventos de la diferenciación testicular. En un estudio molecular en el cual se utilizó el ADN de pacientes con reversión sexual así como de diferentes modelos animales, se identificó una secuencia que guardaba una alta homología con un gen antes identificado en la levadura *Sacharomizes pombe*. Se demostró que dicha secuencia estaba presente en organismos masculinos y

en pacientes con reversión sexual 46,XX (sujetos que presentaban testículos), al mismo tiempo que se encontraba ausente en organismos del sexo femenino y en pacientes con reversión sexual 46, XY (sujetos que presentaban estrías gonadales) y fenotipo femenino [16, 73].

A esta secuencia se le denominó gen determinante del sexo en el cromosoma Y o gen *SRY*, también llamado factor determinante del testículo. Posteriormente, se realizó un estudio con animales transgénicos en el cual a ratones XX se les introdujo un fragmento del cromosoma Y que contenía la secuencia del gen *Sry* murino y observaron que éstos desarrollaron testículos idénticos a los presentados por ratones XY. Sin embargo, los ratones transgénicos con el gen *SRY* humano no desarrollaron testículos, lo cual evidenció las diferencias entre ambos genes ortólogos [74].

Este gen codifica para un factor de transcripción, cuyo ARN mensajero consta de 1.1 kb y su secuencia codificante no presenta intrones por lo que está formado por un solo exón, mismo que codifica para una proteína de 204 aminoácidos. La proteína *SRY* presenta un dominio funcional llamado caja HMG (high movility group) de 80 aminoácidos, un extremo carboxilo-terminal y amino-terminal (57 y 67 aminoácidos, respectivamente) [75]. El motivo central de esta proteína está altamente conservado entre diversos genes parálogos y ortólogos, adicionalmente la homología en este dominio funcional ha servido como criterio de inclusión para agrupar a las diferentes proteínas relacionadas con el *SRY* (proteínas *SOX*) [76]

El gen *SRY* se localiza en el cromosoma sexual Y, en la citobanda Yp11.3. Este gen codifica para un factor de transcripción con un dominio funcional llamado caja HMG, el cual puede unirse y doblar el ADN, así mismo el factor de

transcripción *SRY* es el fundador de la familia de proteínas SOX (SRY BOX proteins) [16].

Durante el desarrollo gonadal masculino, se ha detectado su expresión en la gónada indiferenciada un poco antes del inicio de la diferenciación testicular, es decir, cuando la cresta urogenital se ha integrado con todos sus componentes celulares y el reacomodo de las células somáticas que rodean a las germinales primitivas forman el primer esbozo de los cordones testiculares. El comienzo de la expresión del *SRY* humano determina que la gónada indiferenciada se transforme en testículo y su expresión se observa principalmente en la cresta genital en el período que corresponde al inicio de la formación del testículo, entre la sexta y séptima semana de edad gestacional [77].

En los ratones machos, la expresión del *Sry* en la gónada indiferenciada desencadena diversos eventos, entre los cuales se destacan la diferenciación de las células de Sertoli, la migración de las células mesonéfricas hacia la gónada y la reorganización de la vasculatura gonadal [78]. La expresión del *SRY* humano a diferencia del *Sry* del ratón continúa en la vida adulta, sugiriéndose que el *SRY* participa en otros procesos diferentes a la determinación testicular [77].

Se ha descrito que la actividad del gen *SRY* está regulada por los factores de transcripción *WT1* y *SF1* [32, 79], así mismo, en su secuencia promotora se encuentran numerosas regiones *cis* reguladoras para factores de transcripción con caja HMG, lo que evidencia la posibilidad de su autorregulación o del establecimiento de una regulación de retroalimentación entre este factor y el *SOX9*, sin embargo, tales observaciones no han sido comprobadas experimentalmente [75].

A pesar de que el *SRY* es considerado el factor determinante testicular, solo del 10 al 15% de los individuos con disgenesia gónadal (DG) 46,XY, en su forma completa o parcial presentan mutaciones en este gen. Estudios moleculares llevados a cabo en algunos de estos sujetos demostraron que la unión al ADN y/o el ángulo de doblamientos se encuentran alterados, aunque esto no sucede en todos los casos [80-90].

Estudios conducidos con la proteína *SRY*, han demostrado que puede reconocer y unirse a secuencias de ADN lineal, ricas en adenina y timina (A y T), la secuencia AACAAAT/A fue reconocida por la proteína en 13 de 19 secuencias de ADN [91]; sin embargo, en diversos trabajos se ha destacado una gran afinidad de dicha proteína por la secuencia de reconocimiento AACAAATG [86]. Por otro lado, se ha descrito que la proteína *SRY* es capaz de unirse al estereoisómero cis del diaminodicloroplatino (cis-platino) [92], una molécula utilizada en el tratamiento de tumores canceroso del testículo.

Posteriormente, el grupo de Poulat y cols. [93] demostraron mediante inmunocitofluorescencia que el *SRY* se encuentra predominantemente en el núcleo celular. Así mismo, mediante mutagénesis dirigida, este grupo de investigación determinó que existen dos señales de localización nuclear (SLN), la primera ubicada en los residuos 58 al 78, el cual es reconocido por la proteína transportadora, calcio-calmodulina [94], la segunda SNL, ubicada en los aminoácidos 131-134, es reconocida por la proteína importina  $\beta$  [95]. La función de dichas señales han sido verificadas mediante la recreación de las mutaciones (R133W, R75N y R76P) encontradas en sujetos con reversión sexual 46,XY, en donde se observó que las proteínas mutadas se localizaban principalmente en el citoplasma celular [90], por lo que se ha sugerido que la

ausencia del SRY en el núcleo dio lugar a la presencia de reversión sexual en dichos pacientes. Adicionalmente, se determinó en un estudio reciente, que la localización del SRY también puede ser regulada mediante la acetilación [96]. En este trabajo se encontró que el SRY interactúa con la proteína p300, misma que provocó la acetilación en el residuo de lisina 136; dicha proteína acetilada, presentó una localización nuclear principalmente; sin embargo, cuando el SRY interactúa con la proteína desacetilasa de histonas 3 (HDAC3) dejando desacetilada dicha lisina, el SRY presentó una ubicación citoplasmática principalmente. Así mismo, en este trabajo se encontró que la acetilación de la lisina 136 promueve la interacción con el ADN, así como la interacción proteína-proteína con la importina  $\beta$ .

#### Dominio funcional "CAJA HMG"

El dominio funcional llamado caja HMG, es característico de la familia de proteínas SOX, éste se encuentra altamente conservado. Los miembros de esta familia presentan un 60-80% de similitud en dicha región con respecto al SRY. Dentro de esta familia se han descrito ocho subgrupos, los cuales son clasificados por sus homologías funcionales presentes en el extremo amino-terminal y carboxilo-terminal. El subgrupo A de la familia de proteínas SOX lo constituye únicamente el SRY humano, lo que evidencia la ausencia de proteínas con homologías estructurales y funcionales en las regiones fuera de la caja HMG [76].

La caja HMG del factor de transcripción SRY se ha estudiado exhaustivamente, lo que ha permitido describir detalladamente su estructura secundaria y

terciaria. Hasta el momento se ha descrito la estructura secundaria de este motivo mediante resonancia magnética nuclear (RMN), en el que se ha observado que está conformado por tres hélices alfa ( $H\alpha$ ), mismas que se encuentran formadas por los residuos 57-83, 90-102 y 104-125. Adicionalmente, se describió que su estructura terciaria es en forma de "L" o similar a un "boomerang retorcido" cuyo brazo largo mide 28 Å y el brazo corto mide 22 Å. Así mismo, se determinó que en la concavidad de la caja HMG se encuentra el sitio de interacción con el ADN y que dicha unión es a través del surco menor, lo cual se ha corroborado en diversos estudios [78,79]. Adicionalmente, se ha descrito que los residuos Asn65, Phe67, Ile68, Ser88, Ile90, Ser91 y Tyr129 contactan directamente el ADN y que dicha interacción se ve favorecida por puentes salinos en los que participan otros residuos de la caja HMG y las bases adenina 5 y 6 de la secuencia consenso [86].

En trabajos realizados con el péptido correspondiente a la caja HMG, se ha demostrado que éste presenta la capacidad de unirse al ADN con conformación B, en la secuencia específica 5'-AACAAAG-3', así como a estructuras específicas, como el cruciforme (four way junctions) [84], ADN con secuencias GGS/TCC y GGA repetidas [97] y con dobleces preexistentes [98].

Adicionalmente, se ha determinado mediante interferencia con metilación y con carboxilación que los nucleótidos C3, A4 y A5 son cruciales para preservar la interacción proteína-ADN y que mediante dicha interacción el factor de transcripción realiza su efecto en la activación y represión de los genes blanco [99].

El estudio del efecto de mutaciones en esta región de la proteína, que se encuentran presentes en pacientes con reversión sexual 46,XY, han permitido

determinar que los aminoácidos, M64, F67, R75, R76, M78, I90, L94, G95, T96, F109, K106, A113 son importantes para la interacción con el ADN [80-85, 87-90].

Las interacciones directas e indirectas provocan un doblamiento en el ADN de 70-80°, en el cual, la Tyr129 al parecer tiene un papel importante [86, 98]. Se ha sugerido que la propiedad del SRY de doblar el ADN promueve la interacción proteína-proteína y/o proteína-ADN para la formación de complejos de proteínas de alto orden; sin embargo, esta hipótesis no ha sido verificada experimentalmente. Así mismo, se ha determinado que la cinética de la interacción del péptido con el ADN puede afectar la potencia transcripcional de factor SRY [100].

En otros trabajos conducidos con el péptido HMG, se ha detectado la interacción con la proteína poly(ADP ribosilasa) y la proteína remodeladora de la cromatina KRAB-O [101]. De igual forma, se ha determinado que el SRY regula la actividad transcripcional de L1H, el cual forma parte de una familia de retrotransposones, así como también, se ha determinado mediante inmunofluorescencia que la caja HMG se encuentra en los complejos multiproteicos formados antes del procesos de corte y empalme (splicing) del ARN inmaduro, para la formación del ARN mensajero [102].

Cabe resaltar que en los trabajos en donde se ha descrito detalladamente la interacción ADN-SRY, han sido realizados utilizando el péptido que corresponde a la caja HMG de la proteína SRY, dejando de lado las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal. Así mismo, durante los primeros años de investigaciones sobre el SRY no se concedió alguna importancia a las regiones antes mencionadas; algunos autores sugerían que sólo participaban en la

estabilidad de la proteína; sin embargo, durante los últimos años se ha retomado el estudio de ambas regiones.

### *Región AMINO-TERMINAL*

La región amino-terminal (N-terminal) está constituida por 57 aminoácidos y hasta el momento se desconoce su estructura secundaria y terciaria. Por otra parte, no existen en la literatura estudios en donde se analice su participación directa en la interacción del SRY con el ADN.

El primer indicio que sugirió la importancia de la región amino-terminal del SRY fue el descrito por Domenice y cols. [103], los cuales describieron una mutación en dicha región (S18N) en un paciente con disgenesia gonadal 46,XY. Posteriormente, la misma mutación fue descrita por nuestro grupo de investigación en un paciente mosaico de síndrome de Turner con secuencias derivadas del cromosoma Y. Previamente, habían sido descritas otras mutaciones en la región del N-terminal, las cuales dieron lugar a una proteína trunca. Durante el mismo año, Desclozeaux y cols. [87], demostraron que la región amino-terminal participa en la regulación de la interacción de la proteína SRY con el ADN. Sus estudios demostraron que en la región del N-terminal se encuentra un sitio de fosforilación situado en los residuos 31 a 33 de la proteína SRY y que dichos residuos son fosforilados por medio de la proteína cinasa A (PKA). Así mismo, demostró que la proteína SRY fosforilada tiene una afinidad mayor al ADN con respecto al SRY no fosforilado. Por otro lado, en este trabajo se determinó que la localización de la proteína en su estado fosforilado era en su mayoría nuclear y la proteína sin fosforilación se encontraba principalmente

en el citoplasma, concluyendo de esta forma que la región del N-terminal tiene gran importancia para la realización de la función de regulador transcripcional del SRY.

Posteriormente, Assumpcao y cols. [89], describieron un paciente con reversión sexual 46,XY y con la mutación R30I en la región N-terminal. En este trabajo, se demostró que el residuo R30 es de gran importancia para la fosforilación en los residuos de serina localizados en las posiciones 31-33, ya que la proteína SRY mutada se fosforila en menor grado que el SRY silvestre (SRYs) y en consecuencia el SRY mutado presenta una menor afinidad por el ADN. Adicionalmente se analizó el efecto de la mutación S18N y se encontró que dicha mutación no afecta su unión al ADN. Finalmente, hasta el momento, las mutaciones en sentido erróneo S3L [104] y Q57R [105] no se han estudiado.

#### *Región CARBOXILO-TERMINAL*

La región carboxilo terminal (C-terminal) consta de 67 aminoácidos y no presenta algún dominio funcional descrito hasta el momento, así mismo se desconoce su estructura secundaria y terciaria, así como su orientación en el espacio con respecto a la caja HMG. Sin embargo, en 1994, el grupo de Poulat y cols. [106], demostraron por primera vez que la secuencia de aminoácidos localizados en la región del C-terminal de la proteína SRY posee una función específica, habiéndose identificado una interacción proteína-proteína. Lo anterior, lo llevaron a cabo mediante un ensayo de doble híbrido con levaduras, en el cual detectaron que una proteína era capaz de mantener contacto proteína-proteína con el SRY, a la cual la llamaron, proteína que interactúa con

el SRY 1 (por sus siglas en inglés SIP I). Posteriormente, al llevar a cabo deleciones progresivas en la región del C-terminal de la proteína SRY, se identificó que la interacción con la proteína SIP1 ocurre en los 7 aminoácidos finales de la región C-terminal del SRY [107].

La delimitación de esta región puede explicar el defecto molecular que dio lugar a la reversión sexual de un sujeto 46,XY descrita por Tajima y cols. [108], en la que se encontró una mutación sin sentido (L163c.p.), provocando la pérdida de los últimos 41 aminoácidos. Así como en la mutación (L159FsX167) descrita por Shahid y cols. [105] presente en un paciente con un mosaico 45X/46XY, en el cual se alteró el marco de lectura de la proteína SRY en los residuos 159-167 y se truncó la misma a partir de la posición 167, que corresponde a la pérdida de los 37 residuos finales de la región del C-terminal. Así mismo ofrece una explicación para el caso reportado con la mutación (Q152fsX180) descrita por Baldazzi y su grupo de investigación [109], encontrada en un paciente con reversión sexual 46,XY, en la cual se produjo una proteína alterada de los residuos 158 a 180 y truncada en los últimos 46 aminoácidos.

Se ha sugerido un modelo en el cual SIP-1 podría permitir la interacción de la proteína SRY con otras proteínas (interacción proteína-proteína) para formar complejos multiproteicos de alto orden, que son característicos de la familia de proteínas SOXs. Lo anterior evidencia una gran importancia de la región C-terminal para la función biológica del SRY.

En un estudio reciente, se demostró que dentro de la región C-terminal se lleva cabo la interacción proteína-proteína entre el SRY humano y la proteína remodeladora de la cromatina KRAB-O. Lo anterior se realizó mediante ensayos de doble híbrido con levaduras, utilizando diferentes construcciones

moleculares del SRY [110, 111]. En este estudio, se encontró que la interacción con dicha proteína se produjo con la construcción molecular que contenía la región que los autores denominaron “puente” (residuos 138 a 155 localizados entre la caja HMG y el extremo C-terminal), así como con el SRY y no se encontró interacción con la construcción de la caja HMG sola, ni en la construcción que contenía el N-terminal y la caja HMG. La delimitación de esta región en la interacción con la proteína KRAB-O pudiese ofrecer una explicación alternativa a la alteración en la diferenciación sexual los pacientes con la mutación S143G, descrita por nuestro grupo de investigación, en un paciente con reversión sexual 46,XY [112] y la mutación S143C, descrita por Shahid y cols. [105], presente en un paciente con reversión sexual 46,XY. Adicional a los hallazgos descritos, mediante ensayos de unión conducidos con la proteína mutante S143G se ha demostrado que su afinidad para unirse al ADN se encuentra disminuida con respecto al SRYsilvestre (SRYs) [112].

## JUSTIFICACIÓN

La diferenciación sexual masculina es un programa molecular iniciado por la presencia y acción del SRY el factor determinante del testículo, posteriormente tiene lugar la acción de una compleja red de factores de transcripción y proteínas de secreción.

El dominio funcional característico de esta proteína, la caja HMG, está altamente conservada en la evolución. Por lo que diversos autores han sugerido que su función reguladora de la transcripción depende únicamente de esta región. No obstante, diversos estudios han remarcado la importancia de las regiones N y C-terminales del SRY; sin embargo, no se ha verificado su participación directa en la interacción de la proteína SRY con el ADN. Asimismo, en un estudio conducido sobre la caja HMG, del factor de transcripción TCF1 $\alpha$ , se observó que ésta incrementa su afinidad al ADN, al mismo tiempo en que se incrementa la longitud de los extremos terminales, amino y carboxilo, evidenciando un papel activo de dichas regiones en la interacción proteína-ADN [113].

Finalmente, algunos estudios realizados con la proteína SRY, han puesto en claro que las regiones fuera de la caja HMG del SRY, no solamente podrían funcionar como estabilizadores de la molécula, sino que potencialmente podrían tener una participación más activa de la que se ha descrito hasta el momento. Lo anterior es apoyado por la presencia de mutaciones en dichas regiones que modificaron la función del SRY, al grado de originar una alteración en la formación del testículo. Por lo anterior, es de gran relevancia, analizar la participación directa de los extremos N y C-terminales de la proteína

SRY en la unión al ADN, con ello, se contribuirá a definir el papel de dichas regiones relevantes para la función del SRY, así como a precisar los mecanismos íntimos involucrados en la traducción del sexo genético al sexo gonadal en el humano.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la participación de las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal en la unión de la proteína SRY al ADN.

### **Objetivos particulares:**

- Analizar la participación de la región del amino-terminal de la proteína SRY en la unión de ésta al ADN.
- Analizar la participación de la región del carboxilo-terminal de la proteína SRY en la unión de ésta al ADN.

## **HIPÓTESIS**

Las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal del gen *SRY* participan en la regulación de la unión de este gen al ADN.

## MÉTODOS

### Extracción de ADN de leucocitos

Se extrajo una muestra de 5 ml de sangre periférica de un individuo de sexo masculino con el fin de aislar los leucocitos para la obtención del ADN genómico, mediante la técnica descrita por John y Cols. [114]. Brevemente, la sangre se depositó en tubos de polipropileno de 50 ml, el cual contenía una solución anticoagulante (EDTA 0.5M, pH8), la muestra se incubó en hielo al tiempo que se adicionaban 25 ml de la solución de lavado (sacarosa 0.64M, trizma base 0.02M,  $MgCl_2$  0.01M y tritón100X al 2%) y 15 ml agua desionizada ( $ddH_2O$ ). Se agitó por inversión suavemente y se colectaron los leucocitos por centrifugación a 732 g (fuerza relativa de centrifugación) a 4°C durante 15 minutos, posteriormente se desechó el sobrenadante y se procedió a un segundo lavado. Una vez obtenido el botón celular blanco, libre de eritocitos, se adicionó 3ml de la solución de lisis (trizma base 0.01M, NaCl 0.4M,  $Na_2EDTA$  0.02M, 21.6  $\mu g$  de lauril sulfato de sodio de una solución al 20% y 2 mg de proteinasa K). Se procedió a incubar la muestra por espacio de 14 hr a 37°C en baño maría con agitación suave. Al termino se adicionó 1 ml de una solución de NaCl saturada, posteriormente se centrifugó a 732 g a temperatura ambiente (TA), durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml, posteriormente se precipitó el ADN mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto y se agitó por inversión suavemente. Finalmente el ADN fue lavado con una solución de etanol al 70% frío, secado a TA, resuspendido en  $ddH_2O$  y cuantificado mediante espectrofotometría.

## Diseño de los oligonucleótidos

Con la finalidad de obtener la construcción molecular con la región codificante del *SRYs*, se sintetizaron los oligonucleótidos con las secuencias correspondientes a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Bam HI en el iniciador sentido (SRYT1) y Eco RI en el iniciador antisentido (SRYT2). Dichos oligonucleótidos se utilizaron para la amplificación del exón del gen *SRYs* a partir el ADN genómico obtenido en la sección anterior.

Para corroborar la secuencia del *SRYs*, así como la inserción de los sitios de restricción y el marco de lectura, se utilizaron dos oligonucleótidos situados dentro de la secuencia del único exón del gen *SRYs* (AP1/AP2).

Las secuencias de los oligonucleótidos en dirección 5'→3' son las siguientes:

**SRYT1:** 5'-GCG-CG/G-ATC-CCA-TGC-AAT-CAT-ATG-CTT-CTG-CTA-T-3'  
BAMHI

**SRYT2:** 5'-GCG-CG/A-AAT-CGT-AGC-CAA-TGT-TAC-CCG-ATT-GTC-3'  
ECOR I

**AP1:** 5'- GAA-TAT-TCC-CGC-TCT-CCG-G- 3'

**AP2:** 5'-ACA-ACC-TGT-TGT-CCA-GTT-GC-3'

Se diseñaron los oligonucleótidos con el fin de obtener las tres construcciones moleculares mutantes del *SRY* con deleciones en sus diferentes regiones: la construcción de la caja HMG [deleción de las regiones N-terminal, (aminoácidos 1-57) y la región C-terminal, (aminoácidos 138-204)], la construcción del N-terminal-HMG box *SRY* [deleción del C-terminal, (aminoácidos 138-204)] y la construcción del HMG box-C-terminal [deleción del N-terminal, (aminoácidos 1-57)]. Dos oligonucleótidos fueron diseñados en

base a secuencias correspondientes al SRYs: los oligonucleótidos (B y C), los cuales adicionalmente contenían las regiones de reconocimiento para las enzimas Bam HI, oligonucleótido sentido (B) y para la enzima Eco RI en el oligonucleótido antisentido (C). Los oligonucleótidos A y D se pueden ubicar dentro de la secuencia del plásmido p-GEX-3X.

Las secuencias de los oligonucleótidos en dirección 5'→3' son las siguientes:

A: 5'-GCA-AGT-ATA-TAG-CAT-GGC-CTT-TG-3'

B: 5'-GCG-CG/A-ATT-CGC-ATC-TTC-GCC-TTC-GCC-TCC-CGA-CGA-GGT-3'

Eco RI

C: 5'-GCG-CG/G-ATC-CCG-ATA-GAG-TGA-AGC-GAC-CCA-TGA-AC-3'

Bam HI

D: 5'-GGC-AGA-TCG-TCA-GTC-AGT-C AC-CA-3'

Todos los iniciadores fueron obtenidos de Invitrogene (Carlsbad, California, USA). Cada uno de los oligonucleótidos fueron resuspendidos en agua estéril a una concentración de 100  $\mu$ M. Así mismo se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 2.5% con el fin de determinar que no existiesen oligonucleótidos adicionales.

#### Amplificación del exón del SRY

Con la finalidad de obtener la secuencia de ADN que codifica para la proteína SRY, se procedió a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello 400 ng del ADN genómico, 0.4  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos (SRYT1 y SRYT2), 200  $\mu$ M de cada uno de los

desoxirribonucleótidos trifosfatados y 1.5 unidades de la enzima Taq polymerase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) en un volumen final de 50  $\mu$ l. El programa de amplificación fue el siguiente: 5 minutos iniciales para la desnaturalización a 94°C, posteriormente la amplificación se llevó a cabo durante 35 ciclos de un paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, 68°C por 1 min y 72°C por 1 min y finalmente un paso de extensión de la síntesis de ADN a 72°C durante 4 min. El producto único de la amplificación fue purificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, para lo cual se utilizó como marcador de tamaño molecular una escalera de 100 pares de bases (pb). El ADN fue teñido con bromuro de etidio, posteriormente, la banda correspondiente fue separada del gel y el ADN fue purificado mediante un estuche comercial QIAEX II, Gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). El ADN purificado se cuantificó mediante espectrofotometría y fue almacenado para su posterior clonación.

### Secuenciación de ADN

Las secuenciación del ADN correspondiente a las diferentes construcciones del SRYs y mutantes, subclonadas en el vector de expresión, se llevó a cabo mediante el método de Sanger y cols. [115], mediante el uso de un estuche comercial Dye terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, New Jersey, USA). Las reacciones de secuencia contenían en general: 75 ng del ADN templado (cada uno de los vectores recombinantes por separado), desoxirribonucleótidos modificados y marcados con una molécula colorida, en una concentración final de 0.5  $\mu$ M y 0.5 unidades de Amplitaq polimerasa. Las condiciones para la

incorporación de nucleótidos en todos los casos, fueron la siguientes: desnaturalización 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 segundos, seguido por un paso de alineamiento a 50°C por 5 segundos y finalmente un paso de incorporación de nucleótidos a 60°C por 4 minutos, al término de la PCR, el ADN fue purificado en columnas de Sefadex 100. El ADN con los nucleótidos coloridos incorporados fueron separados en un gel de poliacrilamida-urea al 4.75% y fueron analizadas en un secuenciador automático (Applied Biosystem 373 DNA sequencer) (Perkin Elmer, New Jersey, USA).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de secuenciación es la siguiente:

p-GEX-3XI:5'-AGG-GCT-GCC-AAG-CCA-CGT-TTG-GT-3'

p-GEX-3XII:5'-TGG-AGA-CTG-TGT-ACG-TCG-AGC-GCC-3'

Clonación de la región codificante del gen SRY

La secuencia que codifica para la proteína SRY fue subclonada en el vector de expresión procarionta pGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech, L. Ch. B. England, UK), el cual codifica para una proteína recombinante fusionada al glutatión-S-transferasa (GST) y contiene un gen de resistencia a la ampicilina. Dicha clonación se realizó entre los sitios de restricción para las enzimas BamHI y Eco RI como se describe a continuación: Inicialmente el vector fue amplificado *in vivo*, utilizando para ello las bacterias *Escherichia coli* BL21, mismas que fueron hechas competentes mediante el método del cloruro de

calcio. El plásmido fue introducido a las bacterias mediante su transformación por el método de choque térmico. Las bacterias recombinantes fueron sembradas en platos con medio sólido Luria-Broth (LB)-Agar, mismas que contenían 50  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina. Posteriormente, una de las colonias resultantes se incubó durante 12 horas a 37°C, con agitación en medio líquido LB con 50  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina. Al término de la misma, el plásmido fue purificado mediante el método de lisis alcalina, utilizando para ello un estuche comercial Plus SV Miniprep (Promega, Madison, USA) y el mismo fue cuantificado mediante espectrofotometría.

A continuación, se llevó a cabo la digestión de 5  $\mu\text{g}$  del plásmido con 1 unidad de cada una de las enzimas BamH I y EcoR I (NEB, Beverly, USA), la reacción se incubó por espacio de 5 horas, al finalizar la misma, se inactivaron dichas enzimas mediante una incubación a 65°C por 20 min; el plásmido se defosforiló con una unidad de la enzima fosfatasa alcalina (NEB, Beverly, USA) durante una incubación de 2 horas a 37°C, y finalmente el plásmido se purificó mediante su extracción con fenol-cloroformo.

Por otro lado, 2  $\mu\text{g}$  del ADN correspondiente a la región codificante para la proteína SRY, obtenido mediante la PCR, fue incubado con 0.5 unidades de cada una de las enzimas y en las condiciones antes mencionadas, al finalizar, el ADN fue purificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se purificó el mismo, mediante un estuche comercial QUIEXII siguiendo las instrucciones del proveedor Quiagen (Valencia,USA).

El ADN purificado y cuantificado por espectrofotometría, fue subclonado en el vector de expresión en una reacción de ligación que contenía el ADN del vector y el producto de la PCR en una relación molar 1:3 mediante un estuche

comercial Rapid DNA Ligation (Roche. Mannheim, Alemania). El plásmido recombinante se transformó en bacterias *E coli* BL21 competentes, las bacterias transformadas fueron sembradas en platos con medio LB-agar con ampicilina, e incubadas a 37°C por 12 horas. De las colonias bacterianas resultantes, se seleccionaron 10, mismas a las que se les comprobó la presencia del inserto (ADN codificante para la proteína SRY), mediante la PCR y con enzimas de restricción.

Finalmente, se realizó la secuenciación del plásmido recombinante pGEX-3X-SRY para verificar el marco de lectura de la proteína de fusión.

#### Amplificación de las secuencias mutadas del SRY

Para la obtención de las tres mutantes por delección del *SRY* (*pGEX-3X-HMG*, *pGEX-3X-NHMG*, *pGEX-3X-CHMG*), se procedió a la amplificación de las secuencias del *SRY* con delecciones mediante la PCR, para lo cual en todos los casos se utilizó como ADN templado 200 ng de la construcción molecular del *SRYs* subclonado en el vector *pGEX-3X-SRY*, así como 200  $\mu$ M de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfatados, 1.5 unidades de la enzima Taq polymerase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) y 0.4  $\mu$ M de los oligonucleótidos diseñados previamente para tal fin en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para la obtención del ADN codificante para la caja HMG, se utilizaron los iniciadores B y C, para el ADN que contenía la región codificante del N-terminal y la caja HMG se utilizaron los oligonucleótidos A y B y finalmente para la obtención del ADN que codifica la región de la caja HMG y el C-terminal, se utilizaron los oligonucleótidos C y D. De igual forma, se utilizó el

mismo programa de amplificación con el que se obtuvo la secuencia que codifica para el *SRYs*.

El producto único de la amplificación en cada uno de los casos fue purificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador de tamaño molecular una escalera de 100 pares de bases (pb) y para visualizar el DNA, bromuro de etidio. Posteriormente, la banda correspondiente a cada fragmento de ADN fue cortado del gel y purificado mediante un estuche comercial QIAEX II, Gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Posteriormente, éste se cuantificó mediante espectrofotometría y posteriormente se preparó para su subclonación en el vector de expresión *pGEX-3X*, como se indicó para el *SRYs*. Los tres diferentes vectores de expresión recombinantes se transformaron en bacterias *E coli* BL21 hechas competentes. Diez de las colonias resultantes fueron utilizados para la comprobación de la subclonación mediante la PCR, análisis de restricción con las enzimas Bam HI y Eco RI, así como para su secuenciación.

#### Obtención de las proteínas recombinantes

Una vez verificado el marco de lectura de todas las construcciones moleculares y de que no existiesen cambios puntuales en la secuencia que codifica para el *SRYs* y mutantes, se obtuvieron las proteínas recombinantes. Para ello, se incubaron las bacterias que contenían cada uno de los plásmidos recombinantes por separado en un matraz cónico de 250 ml de medio líquido LB con ampicilina a 30°C y 180 ciclos por minuto de agitación. Al término de la misma, el cultivo fue resembrado en una proporción 1:10 en matraces cónicos

de 1L, con 500 mL de medio LB con ampicilina, el cultivo se incubó a 30°C por tres horas ( $A_{600}=0.6-1.0$ ). Posteriormente, se estimuló la expresión de las proteínas recombinantes con una concentración final de 0.1M de isopropil-tiogalactosido (IPTG), Los cultivos estimulados se incubaron por 3 horas a 30°C, finalmente se obtuvieron las bacterias del medio por centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 15 min, mismas que fueron resuspendidas en 2-5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (NaCl 1.4M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  18 mM) y tritón 100X al 0.1%.

Las bacterias con las proteínas recombinantes fueron tratadas con el fin de obtener, los extractos totales de las proteínas bacterianas, las proteínas del SRY silvestre y mutantes fusionadas al GST, así como, las proteínas del SRYs y mutantes puras. En primer lugar los extractos de proteínas totales se obtuvieron por la lisis de las bacterias cultivadas, mediante cinco disparos de 20 segundos con un ultrasonido de pistilo y los detritos bacterianos fueron separados mediante centrifugación a 8050 g por 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante, se obtuvieron las proteínas de fusión del SRY silvestre y mutantes por separado, mediante su purificación en columnas de sefadex acoplado al GST (Amersham Pharmacia Biotech, L. Ch. B. England, UK). Brevemente: los extractos bacterianos fueron incubados por 30 min a TA con agitación vertical en una columna que contenía 400  $\mu\text{g}$  de sefadex previamente equilibrado con PBS. Posteriormente se eliminaron los restos de extracto total de proteínas mediante centrifugación a 8050 g por 1 min a 4°C. Las esferas de sefadex, que en este momento contenían fijadas las proteínas de fusión, fueron lavadas en cinco ocasiones con 600  $\mu\text{L}$  de PBS. Al término de los lavados, las proteínas de fusión fueron obtenidas de la matriz de sefarosa, mediante la

incubación con una solución que contenía glutation-S-transferasa reducido (GST red) 10mM y Tris HCl 50mM (pH 8.0).

Una vez purificadas las proteínas de fusión, las proteínas del SRYs recombinante así como las diferentes mutantes fueron liberadas del GST por digestión con la proteasa que reconoce la secuencia de aminoácidos presente en el factor de coagulación Xa (FaXa), misma que se encuentra entre la proteína GST y el SRYs. La reacción de incubación contenía 400 µg de cada una de las proteínas de fusión por separado, una unidad de la proteasa y 100 µL de Tris HCl 50 mM (pH 8.0). La reacción se incubó por 12 horas a 4°C con agitación vertical, posteriormente se retiró la proteína GST mediante la purificación de las proteínas del SRY recombinantes en columnas de sefadex acopladas a GST, como se describió con anterioridad.

#### Cuantificación de las proteínas

Las proteínas recombinantes de los extractos totales, de las proteínas de fusión y de las proteínas recombinantes puras fueron cuantificadas, mediante una modificación del método descrito por Bradford, utilizando para ello un estuche comercial (BIORAD, Hércules, USA). Brevemente: De una solución de albúmina de suero de bovino 2mg/mL (calibrada por su coeficiente de extinción), se preparó una curva estándar de concentraciones decrecientes de la misma (0 a 10 µg/mL), con 800 µL de H<sub>2</sub>O desionizada y 200 µL de la solución con el colorante azul de Coomassie. Las muestras que correspondían a los extractos totales, a las proteínas de fusión y a las proteínas puras se prepararon de la siguiente forma: Se adicionaron a 10 µL de una dilución 1:10

de los extractos totales, a 3  $\mu\text{L}$  de las proteínas de fusión y a 5  $\mu\text{L}$  de las proteínas puras (por separado), 200  $\mu\text{L}$  de la solución de tinción con el colorante azul de Coomassie en un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  con ddH<sub>2</sub>O. La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 495 nm.

#### Inmunoelectrotransferencia de las proteínas recombinantes

Con la finalidad de identificar las proteínas recombinantes del SRY silvestre y mutantes con deleciones, se procedió a la electroforesis de las mismas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Las proteínas de los extractos totales (5  $\mu\text{g}$ ) y las proteínas de fusión (3  $\mu\text{g}$ ) fueron separados mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida al 10% y las proteínas puras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12 %. La separación se realizó durante 40 min a 150 V, utilizando para ello, un estándar de peso molecular para proteínas (Sigma, St. Louis, USA) y una solución amortiguadora que contenía Tris base 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0.1%.

Una vez terminada la electroforesis se procedió a la tinción del gel con una solución de tinción (ácido acético 10% y colorante azul brillante de Coomassie 0.006%) durante 10 min a TA, posteriormente se eliminó del exceso de colorante mediante su lavado con agua corriente y su incubación en agua a 90°C por 15 minutos. Al finalizar las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes fueron analizadas y comparadas con el marcador de peso molecular.

Una vez verificada la correspondencia del peso molecular con las proteínas recombinantes se procedió a su identificación mediante Western blot. Para ello, se realizó la electroforesis de las proteínas en un gel de poliacrilamida como se indicó arriba y al finalizar el gel fue equilibrado en un amortiguador SDS-PAGE (Tris 48mM, pH 9.2, glicina 39mM) por 5 min, posteriormente se electrotransfirió a un membrana de difluoruro de polivinildieno (PVDF) en una cámara húmeda a 350 mA por 1 hora.

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas fue secada a TA, y almacenada hasta su análisis con anticuerpos específicos.

La identificación de las proteínas recombinantes se realizó mediante Western blot utilizando para ello, un anticuerpo específico dirigido contra la proteína de fusión GST y un anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano. Inicialmente la membrana fue humedecido por 5 segundo en metanol al 100%, inmediatamente se lavo con H<sub>2</sub>O bidestilada y se bloquearon las proteínas (con la finalidad de evitar uniones no específicas anticuerpo-proteína), incubando la membrana, en una solución al 10% con leche descremada en una solución amortiguadora de fosfato PBS-T (PBS, Tween 20, 0.1% p/v), misma que se incubó durante dos horas a 37°C en un agitador horizontal. Al término del mismo, se procedió a la incubación de la membrana con una solución PBS-T con el anticuerpo primario, en una relación 1:10 000, durante una hora a 37°C. A continuación se realizaron 5 lavados de 15 minutos cada uno con PBS-T, se procedió a la incubación de la membrana con PBS-T y el anticuerpo secundario en una relación 1:10 000 por espacio de 1 hora a 37°C, en un paso posterior se realizaron 5 lavados como se describió con anterioridad y finalmente se procedió al revelado de las bandas para lo cual se utilizó una solución de

revelado (Diaminobenzidina 27nM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% en PBS-T). Finalmente se compararon el peso de las bandas reveladas contra el marcador de peso molecular.

#### Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)

Para el análisis de la unión de las diferentes proteínas recombinantes se utilizó la metodología de geles de retardo. Brevemente: 80 ng de proteína recombinante fueron incubados con una solución amortiguadora para geles de retardo (HEPES 40mM, pH 7.9, KCl 100 mM, MgCl 100 mM, glicerol al 10% y DTT 1 mM), 1 µg del polímero poli dl-dC como competidor inespecífico de la reacción de unión, en los casos de competencia específica se adicionó la sonda de DNA sin marcaje radiactivo, en una concentración final 4 µM. Dicha reacción se incubó por 30 min a TA, posteriormente se adicionó la sonda específica marcada con fósforo radiactivo, en una concentración final de 4µM y se incubó la reacción por 30 min a temperatura ambiente. Los complejos proteína-DNA formados fueron separados en un gel de poliacríamida al 6%, el cual fue recorrido por dos horas a 100 V. La electroforesis se realizó en 6 horas a 100 V a 4 °C. Finalmente el gel de poliacrilamida se secó en una secador de geles con vacío y se expuso a una placa autoradiográfica por 48 h.

#### Análisis estructural del complejo SRY-ADN

Con la finalidad de obtener la estructura tridimensional de la proteína SRY, se utilizó el servidor Roberta, mismo que se encuentra disponible en la dirección electrónica <http://robeta.bakerlab.org/> [116]. Los resultados del modelaje

molecular fueron analizados y validados en el servidor Molprobit, en la dirección electrónica <http://molprobit.biochem.duke.edu/> [117].

La energía de los modelos validados fue minimizada en el programa computacional Chimera [118]. Los modelos con mejor puntaje fueron alineados estructuralmente con la estructura tridimensional de la caja HMG del SRY, la cual se obtuvo de la base de datos del Protein Data Bank (PDB, 1J46) [119], dicho alineamiento estructural se realizó en los programas computacionales Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/index.html>) y Superpose v1.0 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/>) [120]. Una vez realizado el alineamiento, se calculó la raíz cuadrada de la distancia media (RSMD) medida entre los carbonos alfa de ambas cadenas polipeptídicas.

Por otro lado la superficie de la molécula del SRY fue analizada en el servidor Castp (<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>) [121], con la finalidad de encontrar cavidades y/o concavidades de interés en la función de la misma proteína. Todas las imágenes fueron diseñadas utilizando el programa computacional Pymol.

## RESULTADOS

### Amplificación y subclonación del exón del SRY

En la figura 2 (panel a) se puede observar una representación esquemática del exón del SRY en donde se ubica tanto los oligonucleótidos utilizados como iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa, como los oligonucleótidos utilizados para la verificación del ADN mediante secuenciación (ap1 y ap2). En el panel b, se observa la separación electroforética del producto único de la amplificación, misma que se realizó como indica el protocolo de la PCR (panel c). El exón del SRY amplificado fue verificado mediante secuenciación y posteriormente se subclonó en el vector de expresión *pGEX-3X*, el cual como lo muestra la figura 3 (panel a), posee la secuencia que codifica para la proteína GST que se sintetiza fusionada a la proteína del SRY.

### *Comprobación de la construcción molecular con el exón del SRY*

Una vez realizada la subclonación del SRYs, se seleccionaron en total diez colonias recombinantes. En la figura 3, panel b, se muestra la comprobación mediante la PCR de tres de las colonias seleccionadas, en donde se observa la separación electroforética de los fragmentos de ADN de 667 pb, los cuales corresponden al tamaño molecular esperado (carriles 1-3).

Adicionalmente se verificó una de las construcciones recombinantes del SRYs, mediante enzimas de restricción, en el cual el ADN plasmídico extraído fue tratado con las enzimas Bam HI y Eco RI, esto con la finalidad de liberar el

ADN correspondiente a la secuencia codificante del *SRY*. Los productos de la digestión con las enzimas antes mencionadas fueron separados en un gel de agarosa. En el panel c de la figura 3, se puede observar la banda correspondiente a los 667 pb del *SRYs* y una banda de 4.9 kilobases (kb) (carril +) que corresponde al fragmento de ADN del vector de expresión *pGEX-3X*. Así mismo, se muestra el producto de la digestión con las enzimas antes mencionadas del vector de expresión sin subclonación (carril -), los carriles m y m1, corresponden a los marcadores de tamaño molecular de 1 kb y 100 pb, respectivamente.

Finalmente se verificó la secuencia y el marco de lectura de la construcción recombinante. En la figura 3, panel d, se observa una representación esquemática de la construcción molecular *pGEX-3X-SRY*; se puede observar la región correspondiente a la secuencia codificante para la proteína GST, así como el sitio de proteólisis compuesto por los aminoácidos que reconoce el factor de coagulación X-A (FaXa) y el sitio de reconocimiento para la enzima Bam HI. En el panel inferior se puede ver un fragmento del electroferograma correspondiente a la región 5' de la inserción del *SRY* al vector de expresión. Se puede observar, el marco de lectura en tripletes, desde el sitio de proteólisis hasta el codón de inicio de la transcripción del exón del *SRY* (\*ATG), así mismo se verificó que no hubiera errores en la secuencia total del *SRY*.

Construcciones moleculares del *SRY* con mutaciones por delección

Una vez comprobada la clonación del exón del *SRY* en el vector de expresión, el vector recombinante *p-GEX-3X-SRYs* fue utilizado como ADN templado para la obtención de los fragmentos del *SRY* con deleciones (ver esquemas en figura 4). Los productos de la amplificación fueron subclonados del mismo modo que el exón del *SRYs*. Las colonias bacterianas resultantes fueron verificadas mediante la PCR, utilizando para ello los oligonucleótidos A y B. Los productos de la amplificación de las diferentes construcciones se muestran en la figura 4, panel a. Se observa en el gel de agarosa, carriles 1-6, el producto único de la amplificación de las construcciones del *SRYs* (740pb), *HMG-C* (560 pb), *N-HMG* (541 pb), *HMG* (360 pb) y el vector *p-GEX-3X* (139 pb). Los carriles 6, m y m<sub>1</sub>, corresponden a la amplificación sin ADN templado (control negativo), marcadores de 1kb y 100 pb, respectivamente.

La comprobación de las diferentes construcciones mediante el análisis con enzimas de restricción se observa en la figura 4, panel b. En los carriles 1-5 se muestran los productos de la digestión enzimática correspondientes el vector de expresión de 4.9 kb, mismo que se observa en todos los carriles (1-5) y una banda de 667 pb en el carril correspondiente al *SRY* (carril 1), así como una banda correspondiente a la construcción *C-HMG* de 560pb (carril 2), construcción *N-HMG* de 541 pb (carril 3) y la construcción *HMG* de 360 pb (carril 4). Los carriles m y m<sub>1</sub>, representan a los marcadores de tamaño molecular de 1 kb y 100 pb, respectivamente.

Finalmente se verificó cada una de las construcciones mediante su secuenciación. En la figura 4, panel c, se muestra una representación esquemática de las diferentes construcciones moleculares, así como un

fragmento del electroferograma correspondiente a la región de clonación en 5' (derecha) y en 3' (izquierda). En cada electroferograma se indican la secuencia inicial (ATG) y final (\*) del SRY mutado, subclonado en el vector.

#### Identificación de las proteínas recombinantes

Una vez comprobadas las diferentes construcciones moleculares, se procedió a la obtención de las proteínas recombinantes, mismas que fueron identificadas en tres modalidades: las obtenidas de extractos crudos de proteínas de las bacterias, las purificadas fusionadas al GST y las proteínas no fusionadas puras. La identificación, mediante Western blot, se realizó en las extractos crudos de proteínas, así como en la proteínas purificadas de fusión con el GST. Las proteínas puras no fusionadas al GST, fueron verificadas mediante su electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y teñido con el colorante azul de Coomasie. En la figura 5 paneles a y b (paneles superiores), se muestra la identificación de las proteínas recombinantes de extracto y de proteínas de fusión, respectivamente, realizadas mediante Western blot y para lo cual se utilizó un anticuerpo específico anti GST. En ambos casos se muestra una banda inmunoreactiva de 50 kD, correspondiente a la proteína de fusión GST-SRY (carriles SRY), así como una banda de 37.5 kd correspondiente a la proteína de fusión GST-HMG (carriles HMG), una banda de 44.5 kd de la proteína GST-N-HMG (carriles N-HMG), una banda de 46.8 de la proteína GST-HMG-C (carriles HMG-C) y finalmente una banda de 26 kd que corresponde a la proteína GST (carriles GST). Por otro lado, en la electroforesis de las proteínas puras no fusionadas (figura 6, panel superior) se

observa una banda de 24 kd correspondiente a la proteína SRY (carril SRY), de 11.5 proteína HMG (carril HMG), de 18.5 proteína N-HMG (carril N-HMG), de 20.8 proteína HMG-C (carril HMG-C), así como la banda de 26 kd, que corresponde a la proteína GST (carril GST). Las proteínas recombinantes en las tres modalidades (extractos, fusión purificadas y no fusionadas puras) fueron utilizadas para determinar su unión al ADN, mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA).

#### Análisis de unión de las proteínas recombinantes al ADN

En la figura 5, en los paneles de abajo, se muestra el EMSA de las diferentes proteínas recombinantes, tomadas de extractos crudos de proteínas (panel a), y de proteínas de fusión purificadas (panel b). En cada EMSA se señalan los complejos proteína-ADN ligeros o monoméricos (\*), los complejos pesados o multiméricos (\*\*), así como los complejos formados por la proteína SRY (carriles 2), HMG (carriles 3), HMG-C (carriles 4), N-HMG (carriles 5) y la proteína GST, como control negativo (carriles 6). Los carriles 1, corresponden a la electroforesis de la sonda de ADN radiomarcada.

Con respecto al patrón de bandas presentado por las proteínas obtenidas de extractos crudos (panel a), se observó una marcada disminución en la unión al ADN, tanto de la proteína N-HMG (delección del C-terminal, carril 4) como de la proteína HMG (carril 3), con respecto al control del SRYs (carril 2). Finalmente, se puede observar que la proteína HMG-C, mutante cuya región amino-terminal se eliminó (carril 5), presentó un incremento en la intensidad de los complejos formados, con respecto al SRYs, así mismo, se muestra que dicha proteína

recombinante, presentó dos complejos adicionales a los que forma la proteína SRYs. Lo anterior pudiese corresponder a complejos alternos de proteínas con degradación. Los carriles 1 y 6 muestran la electroforesis de la sonda de ADN sin proteína y el control negativo, la proteína GST, respectivamente.

Por otro lado, en la parte de debajo de la figura 5 panel b, se presentan los resultados obtenidos con las proteínas de fusión purificadas. Se puede observar un patrón similar al presentado en el EMSA con los extractos crudos. Las proteínas N-HMG y HMG (carriles 3 y 4 respectivamente) forman complejos menos intensos con respecto a los formados por el SRYs. Adicionalmente, la proteína HMG-C (carril 5), presentó un ligero incremento en la intensidad de los complejos formados con respecto al SRYs, así como la formación de los dos complejos adicionales referidos en los resultados obtenidos con las proteínas en extractos crudos.

Finalmente el análisis de la unión de las proteínas no fusionadas puras (Figura 6, panel de abajo), reveló que el SRYs (carril 2) forma al menos tres complejos diferentes al unirse al ADN, interesantemente, la proteína HMG (carril 3) forma una sola banda (complejo) con intensidad disminuida con respecto al SRY, del mismo modo los complejos formados por la proteína N-HMG (carril 4) se encuentran disminuidos cuando se compararon con los complejos formados por el SRY. La proteína HMG-C (carril 5) forma complejos de manera similar al SRY.

Con la finalidad de verificar tanto la especificidad de la unión al ADN de las diferentes proteínas, como la especificidad de los complejos formados por las proteínas SRYs y mutantes, se procedió a su comprobación mediante competencia específica con la sonda de ADN sin marcaje radiactivo, así como

la prueba de superretardo, con el anticuerpo anti GST. En la figura 7 (carriles a), se muestra el EMSA de las diferentes proteínas recombinantes del SRYs y sus mutantes, adicionalmente se muestra la prueba de competencia específica, realizada con un exceso de sonda de ADN, sin marcaje radiactivo (carriles b). Se puede observar que la intensidad de todos los complejos formados por las diferentes proteínas está disminuida. Del mismo modo, la presencia del anticuerpo anti GST, en las pruebas de superpetardo (carriles c), dió lugar a una disminución en la intensidad de todas las bandas observadas. Los carriles sonda y GST muestran la electroforesis de la sonda de ADN sin proteína y los complejos formados por la proteína GST, respectivamente.

El análisis densitométrico, de los complejos formados por las diferentes proteínas del SRY se muestra en la figura 8. El análisis estadístico en donde se comparó la intensidad de cada una de las bandas (complejos) formados por las proteínas HMG, N-HMG y HMG-C con relación a las formadas por el SRYs. En cada una de las tres modalidades: extractos crudos, proteínas de fusión purificadas y proteínas no fusionadas puras, se consideró la unión del SRYs al ADN como el 100%. Dicha comparación permitió observar que la proteína sin el extremo C-terminal (N-HMG), presentó un decremento en su unión del 52%, 50% y 84% en las tres modalidades respectivamente y esta disminución en la unión fue estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  y  $P < 0.0001$ , respectivamente).

Por otro lado, la proteína HMG, carente de los extremos N y C-terminales, presentó un decremento en su unión al ADN del 15.4%, 24% y 35%, en extractos crudos, proteína de fusión y pura no fusionada, respectivamente. Sin embargo, solo la disminución en la unión de la proteína no fusionada pura al

ADN, fue estadísticamente significativa ( $P < 0.005$ ). Finalmente en este análisis densitométrico de las uniones proteína-ADN, se observó que la proteína carente del N-terminal (HMG-C) incrementó significativamente su unión hasta un 25% ( $P < 0.035$ ), con respecto al SRYs cuando se utilizaron extractos crudos de proteínas; tal condición no se observó en los EMSA con proteínas de fusión purificadas y proteínas no fusionadas puras.

La determinación de la constante de disociación de los complejos proteína-ADN formados por las diferentes proteínas refuerza los hallazgos descritos anteriormente. En la figura 9, se muestra la separación electroforética de los complejos formados por las proteínas no fusionadas puras del SRY (panel SRY), HMG (panel HMG), N-HMG (panel N-HMG) y HMG-C (panel HMG-C), en donde se adicionaron las proteínas en concentraciones crecientes; en cada panel se observa el complejo proteína-ADN (\*), así como la sonda de ADN libre (\*\*). La densitometría de cada uno de los carriles fue graficada con relación a la cantidad de ADN unido a la proteína. La gráfica de los valores obtenidos por cada proteína se muestran en los paneles inferiores, en donde se puede observar que la  $K_d$  de la proteína HMG-C es similar a la del SRY (58 nM y 57 nM respectivamente). Por otro lado se encontró que la proteína N-HMG presentó una disminución en la unión al ADN de 2.5 veces con respecto al SRY ya que su  $K_d$  es de 123 nM, de igual manera la proteína HMG se une al ADN en menor medida con respecto al SRY, siendo su  $K_d$  de 73 nM.

## Análisis *in silico* del complejo SRY-ADN

Se obtuvieron 10 candidatos tridimensionales, derivados del proceso de modelado de la proteína del SRYs, dichos modelos tridimensionales fueron validados en el servidor Molprobit. Los parámetros considerados para la validación de cada uno de ellos fueron: choques atómicos, geometría de la proteína, violaciones al plano de Ramachandran, desviaciones de los carbonos  $\beta$  y bonificaciones por el cumplimiento al plano de Ramachandran (átomos con errores en los enlaces y átomos con errores en los ángulos de enlace). El proceso de validación se realizó después de cada minimización de la energía de la molécula, de tal forma que se considerarán en la elección todos los modelos antes o después de uno o dos procesos de minimización de su energía. En la tabla 1, se observan la calificación de cada parámetro considerado en la validación sin minimización (protonación), así como los valores de cada uno de los modelos después de uno o dos procesos de minimización. Los valores señalados con color verde, se consideran parámetros dentro del rango permitido, los valores marcados con color rojo son violatorios del límite establecido en el servidor. Por lo anterior se eligió el modelo 7 con un ciclo de minimización de la energía para el análisis de su interacción con el ADN.

El modelo 7 del SRY fue alineado estructuralmente con el archivo que contiene las coordenadas de la estructura tridimensional correspondiente a la caja HMG del SRY humano (pdb file 1J46). La figura 10, panel a, muestra las estructuras de la caja HMG (archivo de coordenadas 1J46, azul) y del SRY, en donde se distingue la región correspondiente al N-terminal (amarillo), la caja HMG

(verde), así como la región del C-terminal (rojo). En la estructura de la caja HMG se han señalado los aminoácidos de inicio y término de dicho motivo funcional (Q57 y L138). En esta figura, se puede observar que la estructura secundaria del amino-terminal consiste de dos fragmentos pequeños de  $H\alpha$  que se ubican entre los aminoácidos Y4-F12, la primera y S18-V21, la segunda, los aminoácidos restantes conforman tres segmentos de asas de baja complejidad estructural. Por otro lado, se muestra que la estructura secundaria del carboxilo-terminal está formada por 5 fracciones pequeñas de  $H\alpha$ , las cuales están formadas por los residuos D148-Q156, R162-D167, L170-H173, M176-L180 y Q193-S199. Al igual que la estructura descrita para la caja HMG del SRY, en el modelo 7, se observan las tres  $H\alpha$  formadas por los aminoácidos A66-Q81, N87-M100 y Q103-L123, así mismo las RMSD medidas entre los carbonos  $\alpha$  de ambas estructuras fue de 0.79 Å.

La superposición del modelo 7 del SRY con la 1J46, permitió ubicar espacialmente el ADN en interacción con las regiones faltantes de la estructura obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN). En el panel b, se observa el modelo del SRY con la molécula del ADN superpuesta (estructuras rígidas), en donde las diferentes regiones de la proteína SRY se han representado como mallas de color amarillo (N-terminal), verde (caja HMG) y rojo (C-terminal). En esta figura se observa que el espacio ocupado por el carboxilo-terminal, en el modelo del SRY, es atravesado por el fragmento de ADN, los residuos que son contactados directamente son: Q193, R197 y W201 (flechas blancas).

Finalmente, el análisis de la superficie de la proteína reveló (panel c), que la cavidad formada por los aminoácidos A66, F69, S89, R130 y R132 (esferas verdes), ubicados en la caja HMG, se encuentra prolongada por los residuos

N141, D160, L163, R194, W201-L204 localizados en el C-terminal (esferas rojas).

## DISCUSION

El factor de transcripción SRY, pertenece a la familia de proteínas SOX, de la cual es bien conocido su dominio funcional llamado caja HMG, que le confiere a estas proteínas la capacidad de unirse al ADN de manera secuencia específica y el cual esta altamente conservado en la evolución. Sin embargo, las proteínas SOX también pueden reconocer secuencias similares de ADN, por lo tanto, estas proteínas pueden presentar características adicionales en los extremos N y C-terminales, que puedan contribuir en la especificidad del reconocimiento del ADN de sus los respectivos genes blanco [76].

En el presente estudio, comparamos la unión al ADN del SRYs, así como de tres mutantes del SRY, el dominio funcional de la caja HMG, la región que comprende la caja HMG y el N-terminal y finalmente la región correspondiente a la caja HMG y el C-terminal. Dicha comparación se realizó mediante EMSA, de los cuales se determinó la densidad óptica de los complejos proteína-ADN y la constante de disociación de dichos complejos. Los ensayos de unión fueron conducidos utilizando tres diferentes protocolos: con extractos crudos de proteínas bacterianas recombinantes, con proteínas fusionadas al GST purificadas y con proteínas no fusionadas puras. Lo anterior, fue debido a que los estudios funcionales de unión del SRY mutado al ADN de pacientes con reversión sexual 46,XY han sido realizados utilizando uno de los tres protocolos. Sin embargo no existen estudios en donde se compare la interacción de la proteína SRY con el ADN en los tres protocolos antes mencionados [80-83, 87, 89, 90, 98, 122].

Hasta el momento, los estudios llevados a cabo con la técnica de EMSA, para valorar la interacción con el ADN, han sido realizados en su mayoría utilizando el péptido correspondiente a la caja HMG. Ferrari y cols. [98], analizaron los mecanismo de la interacción de la caja HMG del SRY con el ADN y demostraron que tanto la caja HMG sola como el SRYs, se une al ADN. Con base en lo anterior, este grupo de investigación sugirió que ambas proteínas pueden ser intercambiables en el estudio de la unión al ADN. En el presente trabajo, nosotros encontramos resultados similares, ya que con la técnica de EMSA se observó que el SRYs y el péptido correspondiente a la caja HMG mantienen la capacidad de unirse al ADN, utilizando las proteínas de los tres diferentes protocolos. Sin embargo, la afinidad de la caja HMG aislada, obtenida tanto de los extractos crudos, como de las proteínas de fusión, así como de las proteínas no fusionadas, mostraron una disminución en su afinidad al ADN, cuando se compararon con el SRYs. Este hallazgo fue confirmado mediante la medición de la densidad óptica de las bandas formadas en los EMSA y la determinación de las constantes de afinidad. Por otro lado, el péptido correspondiente a la caja HMG aislada, no fusionada al GST, mostró una disminución significativa.

Por otro lado, la unión de la proteína N-terminal-HMG (delección del C-terminal) al ADN mostró una marcada disminución con respecto al SRYs, en los tres protocolos y tal disminución fue estadísticamente significativa. Estos resultados confirman que la caja HMG es necesaria para la interacción del SRY al ADN y que la región del C-terminal tiene un papel importante en dicha interacción. Con respecto a las afinidades de la proteína mutante sin la región N-terminal, observamos que éstas fueron similares a las encontradas en el SRYs, por lo

que sugerimos que la región del N-terminal no tiene efecto sobre la unión *in vitro* del SRY al ADN.

Por otro parte, cuando analizamos la capacidad de formación de complejos múltiples, nuestros resultados también fueron similares a aquellos descritos por Ferrari y cols. [98]. Con respecto a los resultados obtenidos por ensayos de EMSA, utilizando solo la caja HMG, dichos autores observaron que se formaba una sola banda (complejo) en comparación con las dos bandas formadas por el SRY. En el presente trabajo, encontramos resultados similares, cuando se analizó la unión de la caja HMG no fusionada pura, observamos la formación de una sola banda, en comparación con las formadas por el SRYs no fusionado. De manera similar, este patrón de bandeo fue observado por Peirano y cols. [123], cuando analizó la unión de la proteína SOX10 al ADN. Ellos observaron que cuando usaban solo la caja HMG de dicha proteína, ésta se unía al ADN en forma de monómeros (una sola banda).

Sin embargo, nosotros observamos que las proteínas mutantes correspondientes a la caja HMG y la mutante HMG-N-terminal obtenidas de proteínas de extractos crudos y fusionadas, al igual que las observadas con la proteína N-terminal-HMG no fusionada, presentaban dos bandas de migración rápida y éstas fueron claramente menos intensas, en comparación con el SRYs. En el análisis con el anticuerpo anti-GST, las bandas de migración de todas las proteínas SRYs y mutantes fueron superretardadas, con lo que quedó demostrada su especificidad, por lo que sugerimos que las bandas/complejos observadas, pudiesen corresponder a los complejos formados con una, dos o más moléculas de la proteína respectiva y el ADN y que la presencia de estas

moléculas puede contribuir a la función del SRY, como se ha sugerido para otras proteínas SOX [123, 124].

Por otra parte, nosotros observamos que la proteína HMG-C-terminal (delección del N-terminal) obtenida de los extractos crudos, mostró una afinidad por el ADN aumentada, dicha situación no fue observada en los ensayos realizados con las proteínas de fusión y no fusionadas. Así mismo, en esta proteína mutante se observaron dos bandas ligeras de migración rápida, adicionales a las observadas en otras proteínas. La formación de dichos complejos pudiesen ser explicada por la presencia de múltiples proteínas, presentes en los extractos crudos, los cuales podrían incrementar la interacción proteína-ADN, o por la presencia de la proteína de fusión (GST), el cual podría coadyuvar a la formación de complejos adicionales, ya que cuando se utilizó la proteína no fusionada tales bandas no se observaron. En contraste con las observaciones realizadas sobre la unión de la proteína HMG con el N-terminal-HMG, la intensidad de los complejos formados con el ADN fueron similares a las formadas por el SRYs, por lo que la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Es ampliamente reconocido, que la caja HMG del SRY es requerida para su interacción con el ADN y que las regiones fuera de la caja HMG pueden funcionar como estabilizadores de las interacciones proteína-proteína, o contribuir a la especificidad de dichas interacciones, discriminando a través de estas regiones a las proteínas que forman el complejo multiproteico [32, 76, 107]. El resultado del presente estudio sugiere que la región del C-terminal del SRY contribuye en forma importante a la interacción proteína-ADN *in vitro*. Tal hallazgo fue posible visualizarlo mediante el modelo tridimensional del SRYs,

con el que podemos sugerir que además de la caja HMG, algunos residuos de la región C-terminal tiene interacción directa con el ADN. Lo cual es reforzado por la evidencia de la recreación de la mutación S143G, realizada por nuestro grupo de investigación, en la cual la afinidad de dicha proteína mutada está comprometida [112]. De esta forma, el C-terminal incrementa la afinidad de la proteína por el ADN tal vez incrementando las fuerzas electrostáticas de interacción. Por otro lado, en nuestro modelo del SRYs, se observa que la región del N-terminal no contribuye en la unión al ADN, lo cual está de acuerdo con los hallazgos bioquímicos observados en el presente trabajo. Cabe destacar que éste es el primer acercamiento a la visualización de la proteína SRY completa, en la que fue posible advertir la orientación de las regiones N y C-terminales en la estructura completa del SRY humano, así como la función de estas regiones en los mecanismos involucrados en su interacción con el ADN.

Es importante remarcar que independientemente de que los datos bioquímicos obtenidos con las mediciones de las densidades ópticas de las bandas/complejos formados por las diferentes proteínas del SRY, así como, el cálculo de las  $k_d$ , son congruentes con lo observado en nuestro modelo molecular; existe discordancia con los valores de la  $k_d$  obtenidos para el SRYs y la caja HMG, reportados en otros trabajos. Por ejemplo, Trimmer y cols. [92], encontraron una  $k_d$  para la caja HMG de 3nM y para el SRY 15nM, obtenida mediante EMSA con la técnica de competencia y de 50 nM para el SRY, derivada de técnica de titulación. Por otro lado, Mitchell, y cols. [88], encontraron una  $k_d$  de 32 nM para el complejo SRY-ADN, en donde utilizaron proteínas de extractos crudos. En el presente trabajo se determinó una  $k_d$  de

57nM para el SRY-ADN y de 73 nM para la caja HMG-ADN, obtenido de proteínas no fusionadas puras. Las discrepancias observadas en estos tres trabajos, pueden ser explicadas debido a diferencias en parámetros medulares en la realización de la técnica de EMSA, tales como las secuencias colindantes a la secuencia consenso que reconoce la proteína, la sonda empleada en el presente trabajo ha sido utilizada en los trabajos de Harley y Jäger [80, 125], misma que corresponde a la región del promotor del gen del SRY en la secuencia consenso que se encuentra en la orientación 5'-3'.

Otros parámetros de importancia en la realización de los EMSA son: el tiempo en que se permite la formación de (los) complejo(s), la temperatura de incubación, la presencia de cationes divalentes en la solución amortiguadora, la presencia de glicerol y el uso de colorantes en la mezcla de la reacción. Ya que solo en la literatura se pueden citar dos trabajos en los que se reporta un valor de kd para el SRY, en el presente trabajo se optó por las condiciones para la realización de los EMSA empleados por la mayoría de los estudios del SRY en donde se realiza dicha técnica.

Adicionalmente, en nuestro modelo molecular observamos que la región del N-terminal no contribuye a la unión con el ADN, lo anterior está de acuerdo con los hallazgos bioquímicos encontrados en el presente trabajo, Sin embargo, esta condición puede abordarse desde un enfoque diferente, en el que la región del C-terminal evita o equilibra una posible función inhibidora del N-terminal, ya que al estar ausente el C-terminal del SRY, el N-terminal ejerce la inhibición reflejado por la disminución en la afinidad de la proteína N-terminal-HMG por el ADN. Lo anterior, puede ser apoyado por las observaciones

hechas por Desclozeaux y cols. [87], en donde la fosforilación del N-terminal incrementa la afinidad del SRY por su secuencia consenso en el ADN.

Adicionalmente, ha sido demostrado por Matsuzawa- Watanebe y cols.[32], que la región del C-terminal presenta otra función. En este estudio los autores demuestran la asociación de los factores WT1 y SRY. Sus experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, con mutantes similares a las generadas en este trabajo, demuestran que la ausencia de la región del carboxilo terminal altera tal interacción proteína-proteína.

En el presente trabajo, se remarca la importancia en particular de la región del C-terminal en la interacción de la proteína SRY con el ADN *in vitro*, adicionalmente la afinidad de la caja HMG aislada está claramente reducida en comparación con el SRY. Así mismo, de acuerdo con nuestros resultados, sugerimos que el análisis comparativo de la interacción del SRY con mutaciones recreadas y el ADN deben ser conducidos con proteínas puras no fusionadas, con la finalidad de obtener mayor exactitud en los resultados.

## CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo permitió determinar que las regiones N y C-terminales de la proteína SRY contribuyen a la unión del SRY al ADN, dado por la diferencia en la unión de la caja HMG con respecto al SRY y que específicamente la región del carboxilo-terminal participa activamente en la unión de la proteína SRY al ADN, lo anterior fue posible visualizarlo utilizando los modelos moleculares del SRY y el fragmento de ADN. Adicionalmente los modelos moleculares permitieron visualizar que la región del amino-terminal en apariencia no contribuye de manera directa en la formación del complejo proteína-ADN.

En este trabajo fue posible determinar que las regiones del amino y carboxilo terminales de la proteína contribuyen a la formación de complejos multiméricos proteína-ADN, evidenciado por la incapacidad de la caja HMG de formar múltiples bandas en los EMSA. Así mismo, mediante el uso de tres metodologías de obtención de proteínas (extractos crudos, proteínas de fusión puras y proteínas no fusionadas puras) se determinó que la interacción SRY-ADN, utilizando proteínas de fusión y extractos crudos de proteínas puede producir resultados cuantitativa y cualitativamente imprecisos.

Finalmente el presente trabajo constituye la primera evidencia de que la región C-terminal del SRY contribuye directamente en la unión de la proteína al ADN, así como el primer acercamiento a la visualización de la estructura terciaria de la proteína del SRY integrada en interacción con el ADN.

## REFERENCIAS

1. King-Hele, D., *Erasmus Darwin, master of many crafts*. Nature, 1974. **247**:87-91.
2. Glass, B., *Theophilus Shickel Painter*. Biogr Mem Natl Acad Sci. 1990. **59**:309-37.
3. Gartler, S., *The chromosome number in humans: a brief history*. Nat Rev Genet, 2006. **7**:655-60.
4. Dinapoli, L. and B. Capel, *SRY and the Standoff in Sex Determination*. Mol Endocrinol, 2008. **22**:1-9.
5. Jefferson, M., *Brown-Séguard: a biographical essay*. Lancet. 1952. **1**:760-1.
6. Zenzes M, M.U., Aschmoneit I, Wolf U. *Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. In mature germ cells are antigen H-Y negative*. Hum Genet, 1978. **45**:297-303.
7. Wachtel S, O.S., Koo G, Boyse E. *Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex*. Nature, 1975. **257**:235-236.
8. Kiel-Metzger K, W.G., Wilson G, Erickson R. *Evidence that the human Y chromosome does not contain clustered DNA sequences (Bkm) associated with heterogametic sex determination in other vertebrates*. N Engl J Med, 1985. **313**:242-245.
9. Page D, M.E., Simpson E, Fisher E, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L, *The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein*. Cell. 1987. **51**:1091-1104.
10. Sinclair A, F.J., Spencer J, Page D, Palmer M, Goodfellow P, Graves J, *Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials*. Nature. 1988. **336**:780-783.
11. Koopman P, G.J., Collignon J, Lovell-Badge R. *ZFY gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination*. Nature, 1989. **342**:940-942.
12. Palmer M, S.A., Berta P, Ellis N, Goodfellow P, Abbas N, Fellous M, *Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor*. Nature. 1989. **342**:937-939.
13. Verga V, E.R. *An extended long-range restriction map of the human sex-determining region on Xp, including ZFY, finds marked homology and no detectable Y sequences in an XX male*. Am J Hum Genet, 1989. **44**:756-765.

14. Schneider-Gädicke A, Brown L. *ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation*. Cell. 1989. **57**:1247-1258.
15. Cuevas-Covarrubias S, K.-A.S. *El cromosoma Y humano*. Rev Invest Clin. 1990. **42**:290-297.
16. Berta, P.H., J. R. Sinclair, A. H. Taylor, A. Griffiths, B. L. Goodfellow, P. N. Fellous, M. *Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor*. Nature. 1990. **348**:448-50.
17. McKay, D. *Histochemical observations on the germ cells of human embryos*. Anat Rev. 1953. **117**:201-206.
18. Merchant-Larios, H. *Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis*. Ultrastructure of Reproduction, ed. M.P. Van Blerkom J. 1984, Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.
19. Merchant-Larios, H. Moreno-Mendez. N. *Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells*. Arch Med Res. 2001. **32**:553-8.
20. Grumbach, M.M. *The neuroendocrinology of human puberty revisited*. Horm Res, 2002. **57 Suppl 2**:2-14.
21. Jirásek, J. *Development of the genital system and male pseudohermaphroditism*. John Hopkins University Press ed, ed. C. M. 1971, Baltimore.
22. Goodfellow, Poulat. *DAX-1, an "antitestis" gene*. Exs, 2001:57-69.
23. Grumbach M, C.F. *Disorders of sex differentiation*. Williams Textbook of Endocrinology, ed. F.D. Wilson J. 1998, Philadelphia: Saunders. 1303-1425.
24. López, M.T., Méndez, JP. Cervantes, A. Alfaro, G. Pérez-Palacios, G. Erickson, R. Kofman-Alfaro, S. *SRY alone can induce normal male sexual differentiation*. Am J Med Genet, 1995. **55**:356-358.
25. Ottolenghi, C.M, Mendonça, BB. Barbieri, M. Fellous, M. Berkovitz, GD. McElreavey, K. *Absence of mutations involving the LIM homeobox domain gene LHX9 in 46,XY gonadal agenesis and dysgenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **6**:2465-9.
26. Birk, O.C., DE. Wassif, CA. Cogliati, T. Zhao, L. Zhao, Y. Grinberg, A. Huang, S. Kreidberg, J A. Parker, K L. Porter, FD. Westphal, H. *The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation*. Nature. 2000. **403**:909-13.
27. Oreal, E.M., S. Picard, J. Y. Magre, S. Carre-Eusebe, D. *Different patterns of anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads*. Dev Dyn. 2002. **225**:221-32.

28. Mazaud Guittot, S.T., A. Legault, E. Pilon, N. Silversides, DW. Viger, RS. *The proximal Gata4 promoter directs reporter gene expression to sertoli cells during mouse gonadal development.* Biol Reprod. 2007. **76**:85-95.
29. Di Napoli, L.C. *SRY and the standoff in sex determination.* Mol Endocrinol. 2008. **22**:1-9.
30. McElreavey, K.F. *Sex-determining genes.* Trends Endocrinol Metab. 1997. **8**:342-6.
31. de Santa Barbara, P.M., B. Poulat, F. Berta, P. *Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development.* Dev Dyn. 2000. **217**:293-8.
32. Matsuzawa-Watanabe Y, I.J., Semba K. *Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1.* Oncogene. 2003. **22**:7900-4.
33. Nachtigal, M.W., Enyeart-VanHouten, D. L. Flanagan, J. N. Hammer, G. D. Ingraham, H. A. *Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression.* Cell. 1998. **93**:445-54.
34. Auber, F.L.-J., S. Sarnacki, S. Jaubert, F. Salomon, R. Thibaud, E. Jeanpierre, C. Nihoul-Fekete, C. *Surgical management and genotype/phenotype correlations in WT1 gene-related diseases (Drash, Frasier syndromes).* J Pediatr Surg. 2003. **38**:124-9.
35. MacLaughlin, D.D. *Sex determination and differentiation.* N Engl J Med. 2004. **350**:367-78.
36. Moore, C.G., MM. *Sex determination and gonadogenesis: a transcription cascade of sex chromosome and autosome genes.* Semin Perinatol. 1992. **16**:266-78.
37. Park, S.M., JJ. Raverot, G. Pfaff, LE. Weiss, J. Hammer, GD. Jameson, JL. *Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development.* Development, 2005. **132**:2415-23.
38. Zhao, L.B., M. Krimkevich, Y. Cushman, LJ. Parlow, AF. Camper, SA. Parker, KL. *Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function.* Development. 2001. **128**:147-54.
39. Domenice, S.C., R. V. Costa, E. M. Nishi, M. Y. Vilain, E. Arnhold, I. J. Mendonca, B. B. *Mutations in the SRY, DAX1, SF1 and WNT4 genes in Brazilian sex-reversed patients.* Braz J Med Biol Res. 2004. **37**:145-50.
40. Kohler, B.L., L. Ferraz-de-Souza, B. Wieacker, P. Heidemann, P. Schroder, V. Biebermann, H. Schnabel, D. Gruters, A. Achermann, J. C. *Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY*

*patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency.* Hum Mutat. 2008. **29**:59-64.

41. Lin L, P.P., Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, Molini V, Sebire NJ, Einaudi S, Conway GS, Hughes IA, Jameson JL, Sultan C, Dattani MT, Achermann JC. *Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function.* J Clin Endocrinol Metab. 2007. **92**:991-9.
42. Köhler B, L.L., Ferraz-de-Souza B, Wieacker P, Heidemann P, Schröder V, Biebermann H, Schnabel D, Grüters A, Achermann JC. *Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency.* Hum Mutat. 2008. **29**:59-64.
43. Hanley, N.A.H., D. M. Clement-Jones, M. Ball, S. G. Strachan, T. Salas-Cortes, L. McElreavey, K. Lindsay, S. Robson, S. Bullen, P. Ostrer, H. Wilson, D. I. *SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development.* Mech Dev 2000. **91**:403-7.
44. Meeks, J.J., Jameson, J L. *Dax1 is required for testis determination.* Nat Genet. 2003. **34**:32-3.
45. Barbaro, M.O., M. Schoumans, J. Staaf, J. Ivarsson, SA. Wedell, A. *Isolated 46,XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21.2 interstitial duplication containing the DAX1 gene.* J Clin Endocrinol Metab. 2007. **92**:3305-13.
46. Krone, N.R., FG. Dörr, HG. Morlot, M. Rudorff, KH. Drop, SL. Weigel, J. Pura, M. Kreze, A. Boronat, M. de Luca, F. Tiulpakov, A. Partsch, CJ, Peter, M, Sippell, WG. *Thirteen novel mutations in the NR0B1 (DAX1) gene as cause of adrenal hypoplasia congenita.* Hum Mutat. 2005. **25**: 1584-1486.
47. LaVoie, H. *The role of GATA in mammalian reproduction.* Exp Biol Med (Maywood). 2003. **228**:1282-90.
48. Ketola, I.P., V. Vaskivuo, T. Ilvesmäki, V. Herva, R. Dunkel, L. Tapanainen, JS. Toppari, J. Heikinheimo, M. *Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease.* J Clin Endocrinol Metab. 2000. **10**:3925-31.
49. Tevosian, S.A., KH. Crispino, JD. Fujiwara, Y. Eicher, EM. Orkin, SH. *Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2.* Development. 2002. **129**:4627-34.
50. Molkentin, J.L., Q. Duncan, SA. Olson, EN. *Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis.* Genes Dev. 1997. **11**:1061-72.

51. De Santa Barbara, P.B., N. Boizet, B. Desclozeaux, M. Moniot, B. Sudbeck, P. Scherer, G. Poulat, F. Berta, P. *Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene.* Mol Cell Biol. 1998. **18**:6653-65.
52. Beverdam, A.K., P. *Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes.* Hum Mol Genet. 2006. **15**:417-31.
53. Sekido, R., Lovell-Badge, R. *Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer.* Nature. 2008. **23**:73-78
54. Vidal, V.C., MC. de Rooij, DG. Schedl, A. *Sox9 induces testis development in XX transgenic mice.* Nat Genet. 2001. **28**:216-7.
55. Foster, J.W.D.-S., M. A. Guioli, S. Kowk, G. Weller, P. A. Stevanovic, M. Weissenbach, J. Mansour, S. Young, I. D. Goodfellow, P. N. *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene.* Nature. 1994. **372**:525-30.
56. Cameron, F.J. and Sinclair A.H. *Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes.* Hum Mutat. 1997. **9**:388-95.
57. Giordano, J. Prior, H. M. Bamforth, J. S. Walter, M. *Genetic study of SOX9 in a case of campomelic dysplasia.* Am J Med Genet. 2001. **98**:176-81.
58. Huang, B. Wang, S. Ning, Y. Lamb, A. N. Bartley. *Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9.* Am J Med Genet. 1999. **87**:349-53.
59. Rey, R. Lukas-Croisier, C. Lasala, C. Bedecarras, P. *AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation.* Mol Cell Endocrinol. 2003. **211**:21-31.
60. MacLaughlin, D.D., Prior K. *Mullerian inhibiting substance: an update.* Adv Exp Med Biol. 2002. **511**: p. 25-38; discussion 38-40.
61. Clark, A.G., KK. Russell, LD. *Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules.* Biol Reprod. 2000. **63**: p. 1825-38.
62. Yao, H.H., W. Whoriskey, and B. Capel. *Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis.* Genes Dev. 2002. **16**:1433-40.
63. Umehara, F. Tate, G. Itoh, K. Osame, M. *Minifascicular neuropathy: a new concept of the human disease caused by desert hedgehog gene mutation.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2002. **48**:187-9.

64. Umehara, F.T., G. Itoh, K. Yamaguchi, N. Douchi, T. Mitsuya, T. Osame, M. *A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy.* Am J Hum Genet. 2000. **67**:1302-1305.
65. Canto P, Souderlund D., Reyes E, Méndez JP. *Mutations in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis.* J Clin Endocrinol Metab. 2004. **89**: 4480-4483.
66. Chen, T.M. Kuo, P. L. Hsu, C. H. Tsai, S. J. Chen, M. J. Lin, C. W. Sun, H. S. *Microsatellite in the 3' untranslated region of human fibroblast growth factor 9 (FGF9) gene exhibits pleiotropic effect on modulating FGF9 protein expression.* Hum Mutat. 2007. **28**: 98.
67. El Ramy, R. Verot, A. Mazaud, S. Odet, F. Magre, S. Le Magueresse-Battistoni, B. *Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis.* J Endocrinol. 2005. **187**:135-47.
68. DiNapoli, L., J. Batchvarov, and B. Capel. *FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis.* Development. 2006. **133**:1519-27.
69. Bernard, P.H., V. R. *Wnt4 action in gonadal development and sex determination.* Int J Biochem Cell Biol. 2007. **39**:31-43.
70. Jeays-Ward, K.D., M. Swain, A. *Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development.* Dev Biol, 2004. **276**:431-40.
71. Jordan, B.K.M., M. Ching, S. T. Delot, E. Chen, X. N. Dewing, P. Swain, A. Rao, P. N. Elejalde, B. R. Vilain, E. *Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans.* Am J Hum Genet 2001. **68**:1102-9.
72. Schlaubitz, S.Y., SA. Smith, LD. Keller, KL. Vissers, LE. Scott, DA. Cai, WW. Reardon, W. Abdul-Rahman, OA. Lammer, EJ. Lifchez, CA. Magenis, E. Veltman, JA. Stankiewicz, P. Zabel, BU. Lee, B. *Ovotestes and XY sex reversal in a female with an interstitial 9q33.3-q34.1 deletion encompassing NR5A1 and LMX1B causing features of Genitopatellar syndrome.* Am J Med Genet A. 2007. **143A**:1071-81.
73. Jager, R.J.A., M. Hall, K. Scherer, G. *A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY.* Nature. 1990. **348**:452-4.
74. Koopman, P.G., J. Vivian, N. Goodfellow, P. Lovell-Badge, R. *Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry.* Nature. 1991. **351**:117-21.
75. Su, H.L., Youh. F. *Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach.* Am J Hum Genet. 1993. **52**:24-38.

76. Smith, M.D., L.S. Jones, and M.A. Wilson. *Sex differences in hippocampal slice excitability: role of testosterone*. Neuroscience. 2002. **109**:517-30.
77. Clepet, C.S., A. J. Sinclair, A. H. Palmer, M. S. Lovell-Badge, R. Goodfellow, P. N. *The human SRY transcript*. Hum Mol Genet. 1993. **2**: 2007-12.
78. Albrecht, K.E., EM. *Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor*. Dev Biol. 2001. **240**:92-107.
79. de Santa Barbara, P.M., C. Moniot, B. Malcles, M. H. Berta, P. Boizet-Bonhoure, B. *Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression*. Biol Reprod. 2001. **64**:775-83.
80. Jager, R.J.H., V. R. Pfeiffer, R. A. Goodfellow, P. N. Scherer, G. A *familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes*. Hum Genet. 1992. **90**:350-5.
81. Pontiggia, A.R., R. Harley, V. R. Goodfellow, P. N. Lovell-Badge, R. Bianchi, M. E. *Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes*. Embo J. 1994. **13**:6115-24.
82. Poulat, F.S., S. Goze, C. Heitz, F. Calas, B. Berta, P. *Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY*. Hum Mutat. 1994. **3**:200-4.
83. Schmitt-Ney, M.T., H. Kaltwasser, P. Bardoni, B. Cisternino, M. Scherer, G. *Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers*. Am J Hum Genet. 1995. **56**:862-9.
84. Peters, R.K., C. Y. Ukiyama, E. Falsafi, S. Donahoe, P. K. Weiss, M. A. *An SRY mutation causing human sex reversal resolves a general mechanism of structure-specific DNA recognition: application to the four-way DNA junction*. Biochemistry. 1995. **34**:4569-76.
85. Werner, M.H.H., Jager. R. Gronenborn, A. M. Clore, G. M. *Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex*. Cell. 1995. **81**:705-14.
86. Werner, M.H.B., M. E. Gronenborn, A. M. Clore, G. M. *NMR spectroscopic analysis of the DNA conformation induced by the human testis determining factor SRY*. Biochemistry. 1995. **34**:11998-2004.
87. Poulat, F., Chevron M.P. *Mutation in the 5' noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient*. Hum Mutat. 1998. **Suppl 1**:S192-4.

88. Mitchell, C., Harley, V.R. *Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis*. Mol Genet Meta. 2002. **77**:217-25.
89. Assumpcao, J.G., Harley, V.R.L., S. Mitchell, C. L. *Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes*. J Mol Med. 2002. **80**:782-90.
90. Harley, V.R.L., S. Mitchell, C. L. Forwood, J. K. John, A. P. Briggs, L. J. McDowall, S. G. Jans, D. A. *Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. **100**:7045-50.
91. Harley, V.Lovell-Badge. R. Goodfellow, PN. *Definition of a consensus DNA binding site for SRY*. Nucleic Acids Res. 1994. **22**:1500-1.
92. Trimmer, E.E., et al., *Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities*. Biochemistry. 1998. **37**:352-62.
93. Poulat, F.G., F. Chevron, M. P. Goze, C. Rebillard, X. Calas, B. Lamb, N. Berta, P., *Nuclear localization of the testis determining gene product SRY*. J Cell Biol. 1995. **128**:737-48.
94. Harley, V.R., Lovell-Badge. R., Goodfellow, P. N. Hextall, P. J. *The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain*. FEBS Lett. 1996. **391**:24-8.
95. Harley, V.R., Lovell-Badge. R., Goodfellow, P. N. Hextall, P. J. *Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**:7045-50.
96. Thevenet, L., et al. *Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation*. Embo J. 2004. **23**:3336-45.
97. Suda, T.M., Y.Takayanagi,K. Asakura, H. Odani, S. Kominami, R. *A novel activity of HMG domains: promotion of the triple-stranded complex formation between DNA containing (GGA/TCC)<sub>11</sub> and d(GGA)<sub>11</sub> oligonucleotides*. Nucl. Acids Res. 1996. **24**:4733-4740.
98. Ferrari, S.H., V. R. Pontiggia, A. Goodfellow, P. N. Lovell-Badge, R. Bianchi, M. E., *SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA*. Embo J. 1992. **11**:4497-506.
99. van de Wetering, M.C., H. *Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix*. Embo J. 1992. **11**:3039-44.
100. Phillips, N.B.J.-R., A. Ittah, V. Singh, R. Chan, G. Haas, E. Weiss, M. A. *SRY and human sex determination: the basic tail of the HMG box*

- functions as a kinetic clamp to augment DNA bending.* J Mol Biol. 2006. **358**:172-92.
101. Li, Y.O., H. J. Lau, Y. F. *The poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions.* Mol Cell Endocrinol. 2006. **257-258**:35-46.
  102. Kandel-Kfir, Gur, G. Melamed, P. Zilberstein, Y. Cohen, Y Zmora, N.Kobayashi, M Elizur, A.Yaron, Z.M. *Gonadotropin response to GnRH during sexual ontogeny in the common carp, Cyprinus carpio.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2002. **132**:17-26.
  103. Domenice, S. Yumie Nishi, M. Correia Billerbeck, A. E. Latronico, A. C. Aparecida Medeiros, M. Russell, A. J. Vass, K. Marino Carvalho, F. Costa Frade, E. M. Prado Arnhold, I. J. Bilharinho Mendonca, B. *A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives.* Hum Genet. 1998. **102**:213-5.
  104. Gimelli, G.G., S. Dimasi, N. Bocciardi, R. Di Battista, E. Pramparo, T. Zuffardi, O. *Identification and molecular modelling of a novel familial mutation in the SRY gene implicated in the pure gonadal dysgenesis.* Eur J Hum Genet. 2007. **15**:76-80.
  105. Shahid, M. Chillion, V. S. Jain, N. Hedau, S. Diwakar, S. Sachdeva, P. Batra, S. Das, B. C. Husain, S. A. *Two new novel point mutations localized upstream and downstream of the HMG box region of the SRY gene in three Indian 46,XY females with sex reversal and gonadal tumour formation.* Mol Hum Reprod. 2004. **10**:521-6.
  106. Poulat, F.B., P. S. Desclozeaux, M. Soullier, S. Moniot, B. Bonneaud, N. Boizet, B. Berta, P. *The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains.* J Biol Chem. 1997. **272**:7167-72.
  107. Thevenet, L. Albrecht, K. H. Malki, S. Berta, P. Boizet-Bonhoure, B. Poulat, F. *NHERF2/SIP-1 interacts with mouse SRY via a different mechanism than human SRY.* J Biol Chem. 2005. **280**:38625-30.
  108. Tajima, T.N., J. Shinohara, N. Fujieda, K. *A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonadal dysgenesis.* Hum Mol Genet. 1994. **3**:1187-9.
  109. Baldazzi, L.N., A. Gennari, M. Barbaro, M. Pirazzoli, P. Cicognani, A. Cacciari, E. *Two new point mutations of the SRY gene identified in two Italian 46,XY females with gonadal dysgenesis.* Clin Genet. 2003. **64**:258-60.
  110. Oh, H.L., Y. Lau, YF. *Sry associates with the heterochromatin protein 1 complex by interacting with a KRAB domain protein.* Biol Reprod. 2005. **72**:407-15.

111. Oh, H.L., Youh F. *KRAB: a partner for SRY action on chromatin*. Mol Cell Endocrinol. 2006. **247**:47-52.
112. Sánchez-Moreno. i, Canto. p., Munguía, M. Bermúdez de León, B. Cisneros, F. Vilchis, E. Reyes, and J.P. Méndez, *DNA binding activity studies and computational approach of the Y96C and S143G mutant SRY proteins in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis*. Mol Endocrinol, 2008. **enviado a publicación**.
113. Lnenicek-Allen, M.R., CM. Crane-Robinson, C. *The DNA bend angle and binding affinity of an HMG box increased by the presence of short terminal arms* Nucl. Acids Res. 1996. **24**:1047-1051.
114. John, S.W.M.W., G Rozen, R. and C.R. Sriver. *A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes*. Nucl. Acids Res. 1991. **19**:408.
115. Sanger, F.N., S. Coulson, AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Biotechnology 1977. **24**:104-8.
116. Kim, D.C., D. and Baker, D. *Protein structure prediction and analysis using the Robetta server*. Nucleic Acids Res. 2004. **32**:W526-W531.
117. Davis, I.L.-F., A. Chen, VB. Block, JN. Kapral, GJ. Wang, X. Murray, LW. Arendall, WB 3rd. Snoeyink, J. Richardson, JS. *MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids*. Nucleic Acids Res. 2007. **35**:W375-W383.
118. Pettersen, E., Goddard, TD., Huang, CC., Couch, GS., Greenblatt, DM., Meng, EC., and Ferrin, TE. *UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis*. J Comput Chem. 2004. **25**:1605-1612.
119. Murphy, E.C., Zhurkin, V.B., Louis, J.M., Cornilescu, G., Clore, G.M. *Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation*. J.Mol.Biol. 2001. **312**:481-499.
120. Maiti, R.V.D., GH. Zhang, H. and Wishart, DS. *SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition*. Nucleic Acids Res. 2004. **32**:W590-W594.
121. Binkowski, A.N., S. and Liang, J. *CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins*. Nucleic acids Res. 2003. **31**:3352-3355.
122. Harley, V.R. *The molecular action of testis-determining factors SRY and SOX9*. Novartis Found Symp. 2002. **244**:57-66; discussion 66-7, 79-85, 253-7.
123. Peirano, R.a.W., M. *The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences*. Nucleic Acids Res. 2000. **28**:3047-3055.

124. Bernard, P.T., P. Liu, S. Dewing, P. Harley, VR. Vilain, E. *Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination*. Hum Mol Genet. 2003. **12**:1755-65.
125. Harley, V.R.J., D. I. Hextall, P. J. Hawkins, J. R. Berkovitz, G. D. Sockanathan, S. Lovell-Badge, R. Goodfellow, P. N. *DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females*. Science. 1992. **255**:453-6.

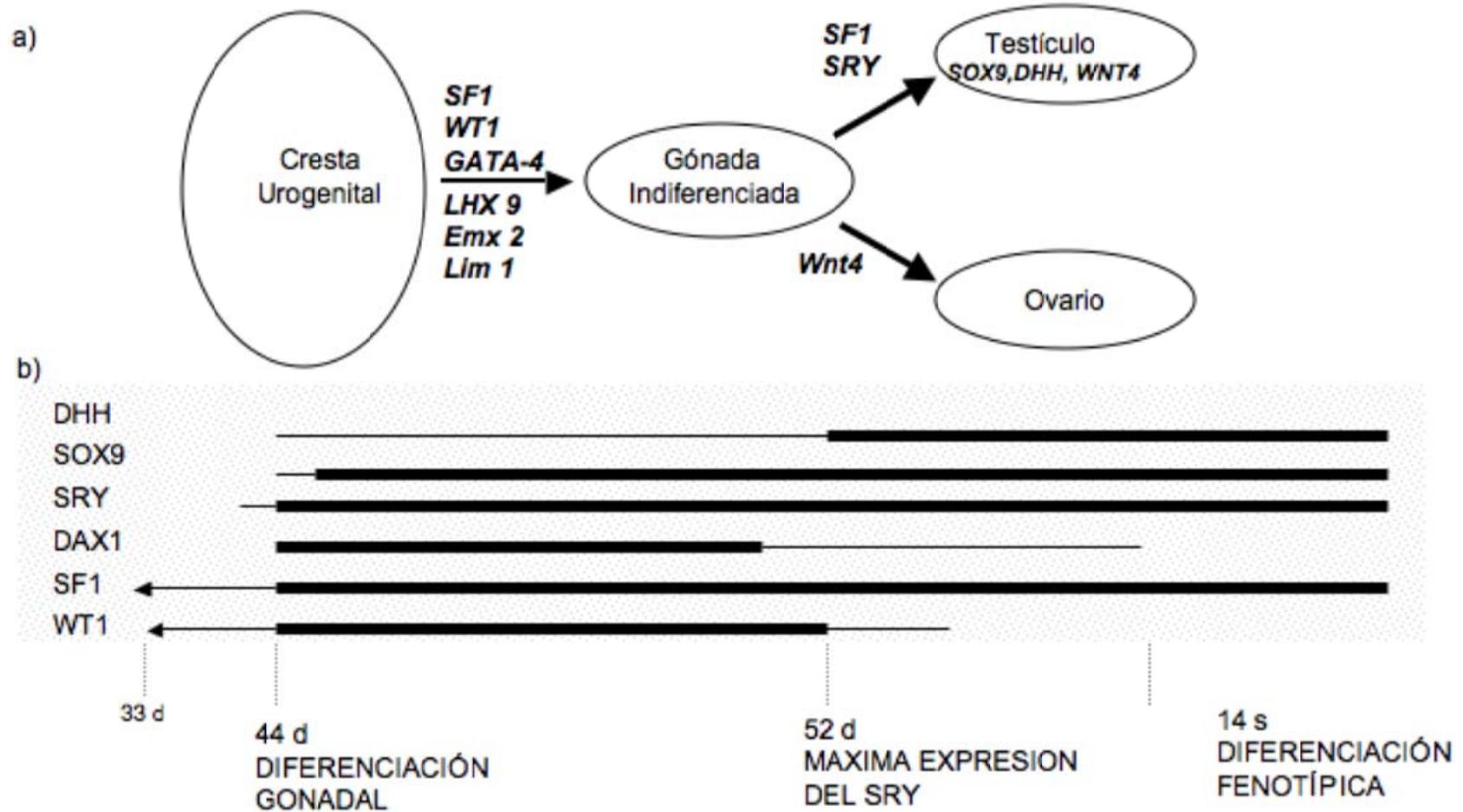


Figura 1. Regulación molecular de la determinación y diferenciación gonadal. a) Regulación molecular para la formación de la gónada indiferenciada a partir de la cresta urogenital, así como de la diferenciación del testículo y ovario. b) Perfiles de expresión de los principales factores de transcripción durante la diferenciación testicular. (d: días post ovulación, S: semanas de gestación).

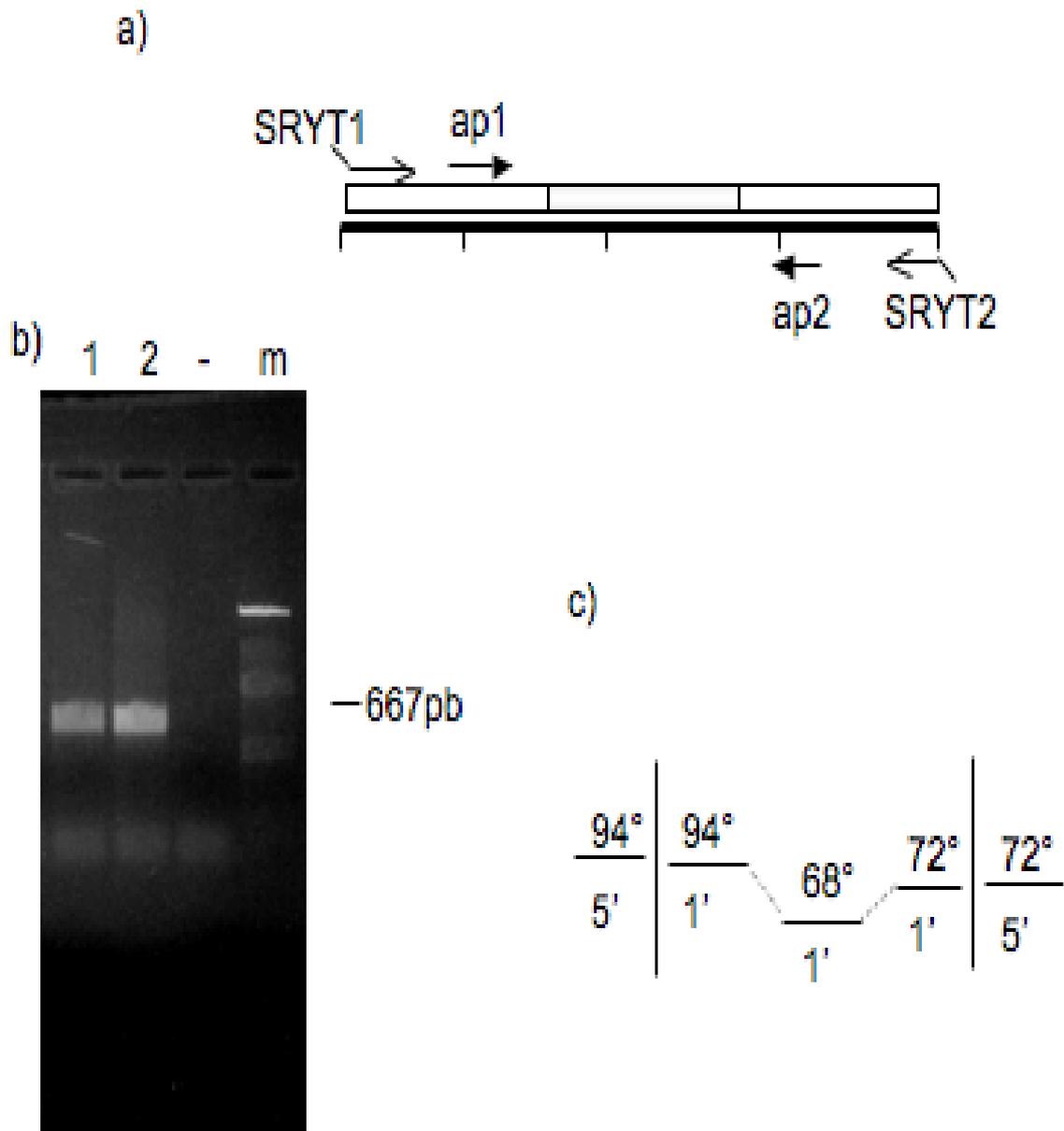


Figura 2. Amplificación de la secuencia codificante del SRY silvestre. a) Representación esquemática del exón del SRY, correspondiente a un fragmento de 667 pb, en donde se muestra la ubicación y el sentido de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por la PCR y para la secuenciación. b) Electroforesis de los productos de la amplificación del exón del SRY (carriles 1 y 2), en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. se muestra el producto único de la amplificación que corresponde a 667 pb, carril (-) control negativo de la amplificación, reacción sin ADN y carril m, marcador de tamaño molecular. c) Protocolo de amplificación utilizado para la PCR.

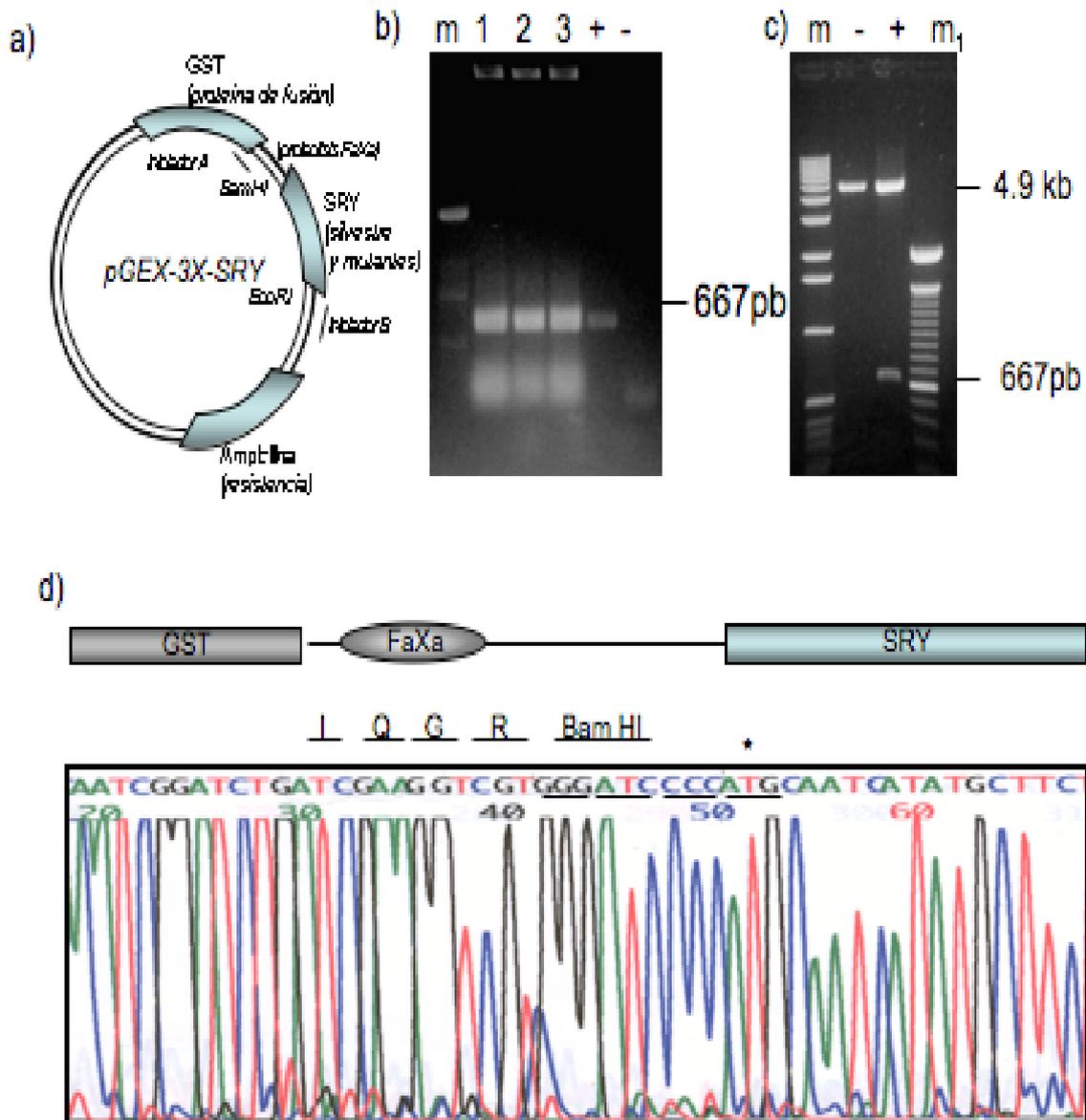


Figura 3. Verificación de la subclonación del exón del SRY silvestre. a) representación esquemática de la construcción molecular pGEX-3X-SRY. Se observa la región que codifica para la proteína de fusión GST, el gen de resistencia a la ampicilina y la secuencia del exón del SRY insertada en los sitios Bam HI y Eco RI. b) Electroforesis de la comprobación de la construcción molecular mediante la PCR. Se observa el producto único de la amplificación (~ 667 pb) obtenido de tres colonias bacterianas (carriles 1-3), se muestran el marcador de tamaño molecular de 100 pb, así como los controles positivo (+ ADN genómico) y negativo (- amplificación sin ADN). c) Comprobación de la construcción molecular mediante enzimas de restricción. Se muestran los fragmentos del SRY y el vector de expresión de 667 pb y 4.9 kb respectivamente (carril + colonia bacteriana seleccionada) así como el control negativo (- banda de 4.9 kb) correspondiente al análisis de una colonia bacteriana sin inserción del exón del SRY. Carriles m y m<sub>1</sub> marcadores de tamaño molecular de 1 kb y 100 pb, respectivamente. d) Electroferograma de la construcción molecular pGEX-3x-SRY, se muestra las regiones correspondientes al GST (proteína de fusión), sitio de proteólisis que reconoce el FaXa y la secuencia que corresponde al SRY, en donde se observa que el marco de lectura se encuentra en fase con el GST.

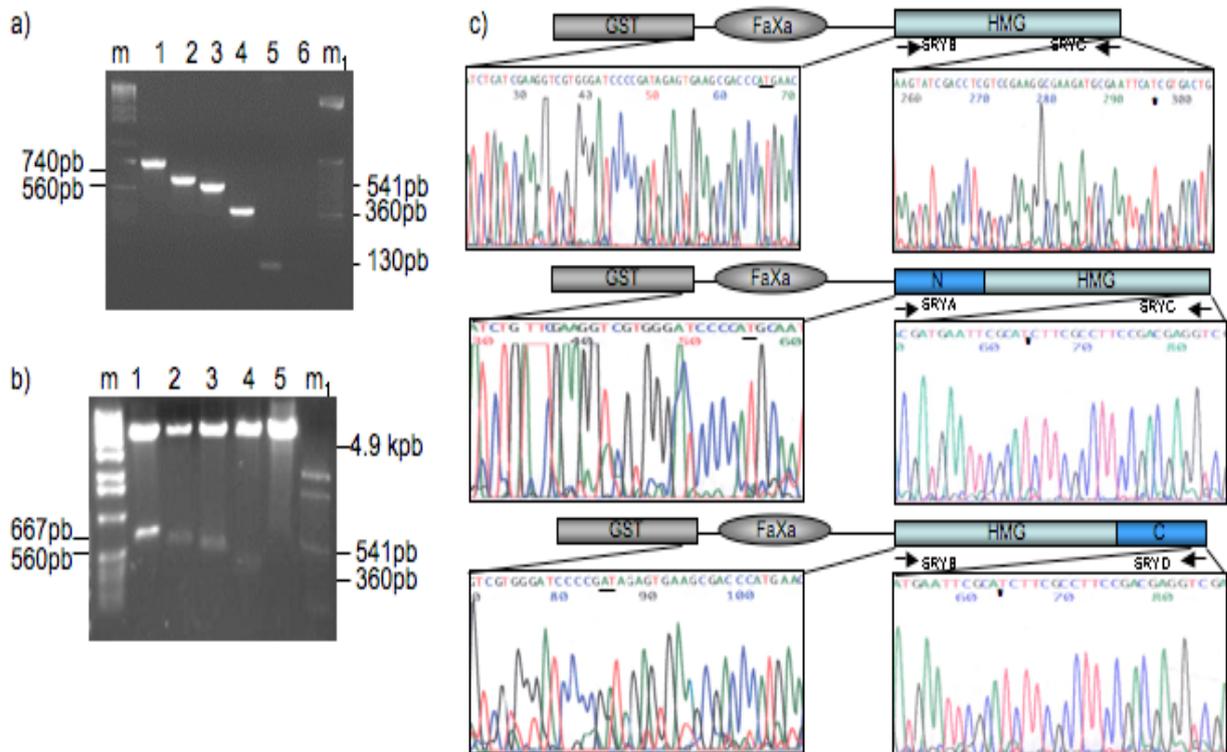


Figura 4. Comprobación de la subclonación de las secuencias del SRY con delección. a) Comprobación por la PCR, amplificación de los insertos correspondientes a las construcciones SRY (740 pb, carril 1), HMG-C (560 pb, carril 2), N-HMG (541 pb, carril 3) y HMG (360 pb, carril 5), en el vector pGEX-3X (carril 5). Los carriles 6, m y m1 corresponden al control negativo (reacción sin ADN) y a los marcadores de tamaño molecular de 1 kb y 100 pb respectivamente. b) Comprobación por análisis con enzimas de restricción, electroforesis de los productos de la digestión con las enzimas BamHI y Eco RI de todas las construcciones SRY (740 pb carril 1), HMG-C (560 pb, carril 2), N-HMG (541 pb, carril 3) y HMG (360 pb, carril 5) en el vector pGEX-3X (carril 5). En todos los casos se observa un fragmento de 4.9 kb, correspondiente al vector lineal. Los carriles m y m1 corresponden a los marcadores de tamaño molecular de 1 kb y 100 pb respectivamente. c) Verificación por secuenciación, se observa una representación esquemática de cada una de las construcciones mutantes en donde se marca la proteína de fusión, el sitio de proteólisis (FaXa) y la región correspondiente al SRY mutante, adicionalmente se muestran los oligonucleótidos utilizados para la construcción. Electroferograma en cada construcción molecular, correspondiente a la inserción en 5' (izquierda) y 3' (derecha), el inicio de las secuencias del SRY mutante(-) y el final (\*).

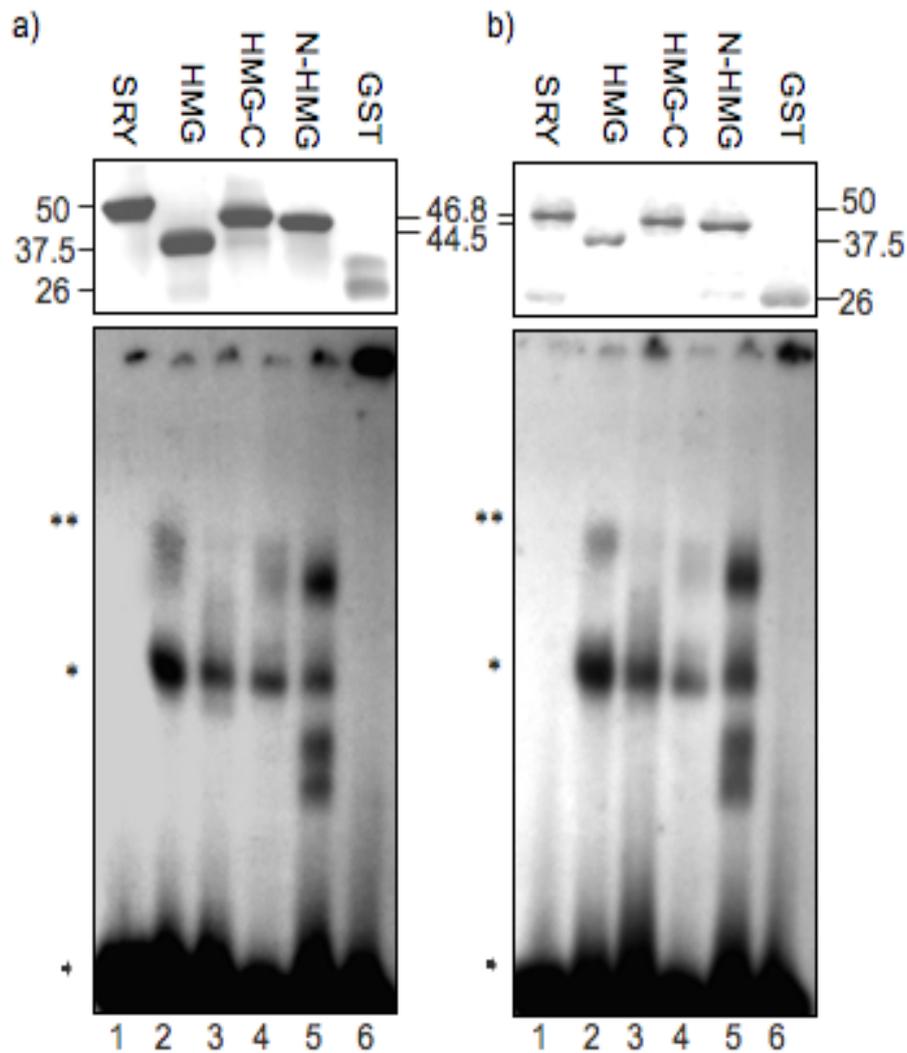


Figura 5. Identificación y EMSA de las proteínas recombinantes. a) Proteínas obtenidas de extractos totales, se muestran las bandas inmunoreactivas para cada una de las proteínas correspondientes (panel arriba) SRY-GST silvestre (50 kd, carril SRY), HMG-GST (37.5 kd, carril HMG), N-HMG-GST (44.5 kd, carril N-HMG) HMG-C-GST (46.8 kd, carril HMG-C) y GST (26 kd, carril GST). Los complejos DNA-proteína se muestran en el panel de abajo, los complejos ligero (\*), los complejos pesados o multiméricos (\*\*), así como la sonda de ADN libre (→) se observan en cada carril (1) sonda de ADN, (2) SRY, (3) HMG, (4) N-HMG, (5) HMG-C y 6 (GST/ control negativo). b) Proteínas de fusión puras, se muestra las bandas inmunoreactivas para SRY, HMG, N-HMG, HMG-C y GST. El panel de abajo muestra el gel de retardo con las proteínas fusionadas puras.

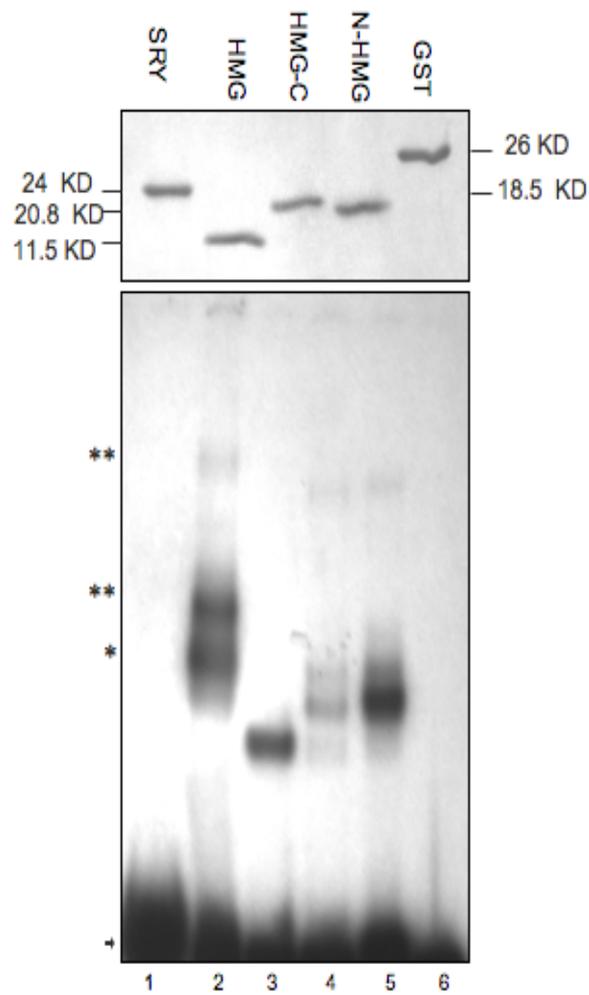


Figura 6. Identificación y EMSA de las proteínas recombinantes no fusionadas puras. En el Panel superior se observan las bandas inmunoreactivas para cada una de las proteínas correspondientes SRY silvestre (24 kd, carril SRY), HMG (11.5 kd, carril HMG), N-HMG (18.5 kd, carril N-HMG) HMG-C (20.8 kd, carril HMG-C) y GST (26 kd, carril GST). Los complejos DNA-proteína se muestran en el panel de abajo, los complejos ligero (\*), los complejos pesados o multiméricos (\*\*), así como la sonda de ADN libre (→) se observan en cada carril (1) sonda de ADN, (2) SRY, (3) HMG , (4) N-HMG, (5) HMG-C y 6 (GST/ control negativo).

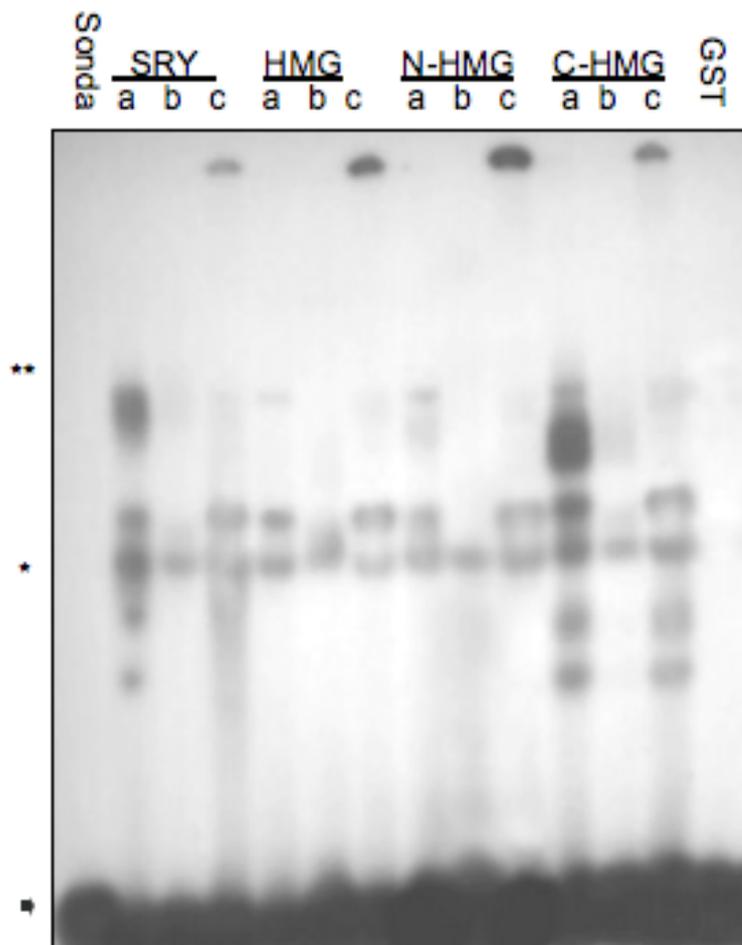


Figura 7. Comprobación de EMSA con competencia específica y superretardo. Se muestran la separación electroforética de los complejos formados por las proteínas recombinantes del SRY silvestre y mutantes (carriles a), así como las pruebas de competencia específica (carriles b) y superretardo con el anticuerpo anti GST (carriles c). Se observa la disminución en la intensidad de los complejos ligeros (\*) y pesados (\*\*) formados, en los carriles con el competidor y con el anticuerpo específicos. Carril sonda, muestra la electroforesis de la sonda de ADN sin proteína y el carril GST, los complejos formados con la proteína GST (control negativo).

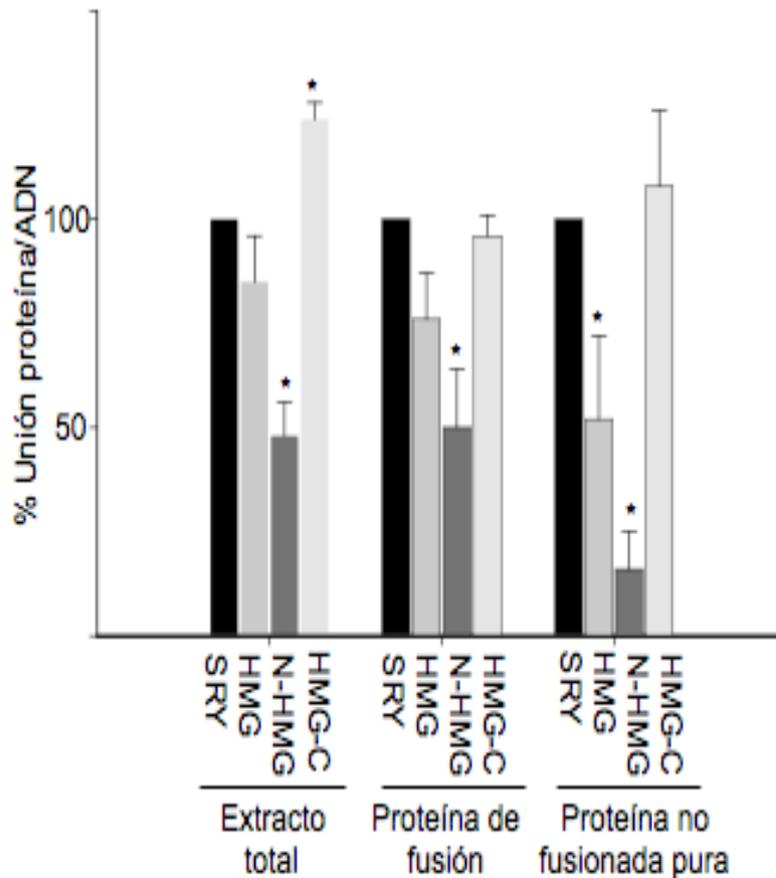
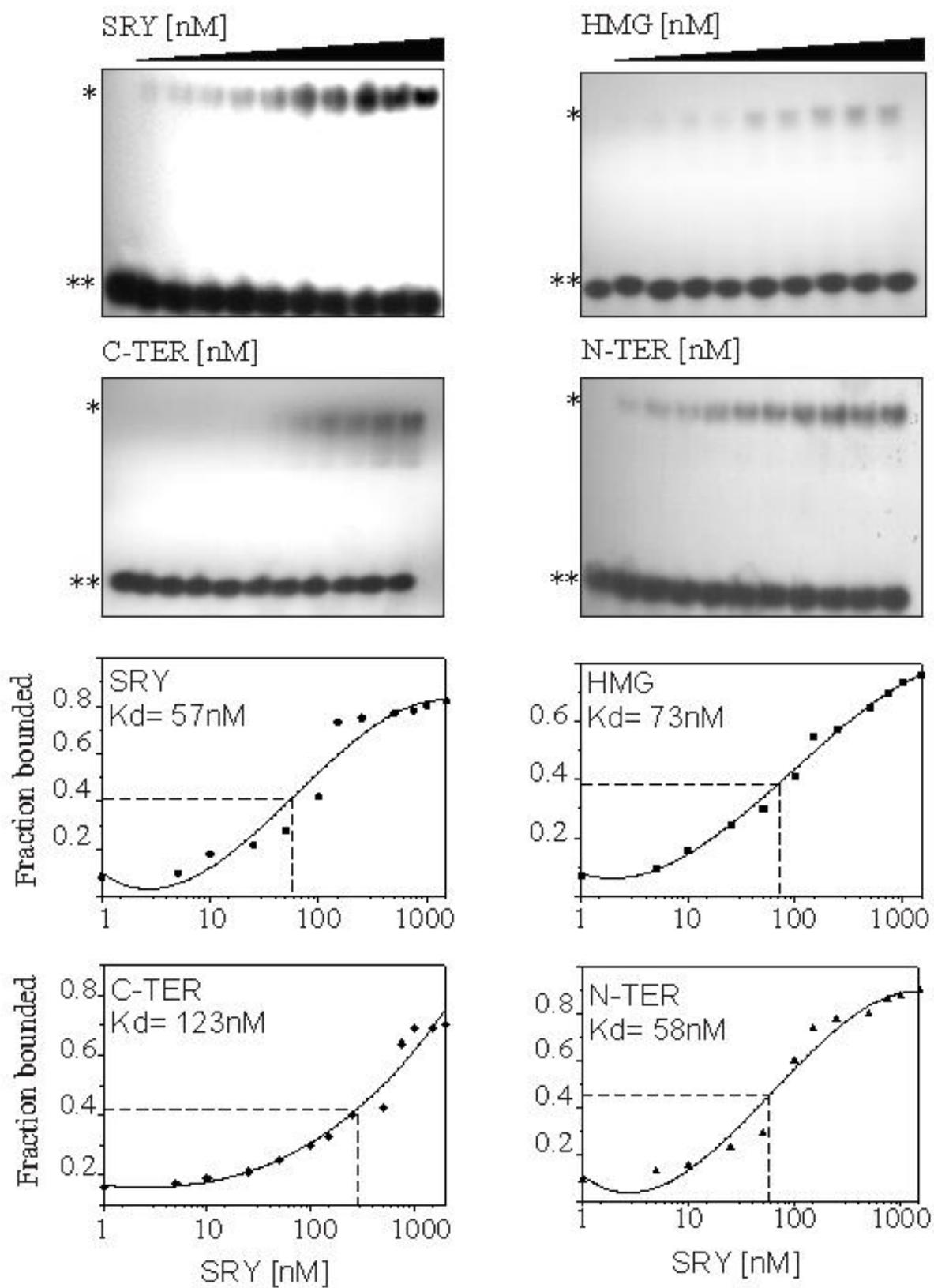


Figura 8. Análisis de la unión de las proteínas del SRY recombinantes. Se muestra el porcentaje de unión de las diferentes proteínas del SRY silvestre y mutantes al ADN observados en las tres condiciones, extractos totales, proteínas de fusión y proteínas no fusionadas puras. Las barras representan el promedio de cinco experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. (\*)  $p < 0.05$

Figura 9. Determinación de la constante de disociación ( $k_d$ ) de las proteínas del SRY silvestre y mutantes. En los paneles de arriba se muestran los complejos (\*) proteína no fusionada pura -ADN formados por cantidades crecientes (0-2000 nM) de la proteína SRY silvestre (panel SRY) y las proteínas HMG (panel HMG), N-HMG (panel N-HMG) y HMG-C (panel HMG-C), así mismo se observa sonda libre en el gel (\*\*). La  $k_d$  fue definida como la cantidad de proteína requerida para obtener la unión media máxima. Los valores de densitometría de cada una de las bandas obtenidas fue graficada contra la fracción de ADN unido a la proteína. En los paneles de abajo se muestran las gráficas correspondientes a cada una de las proteínas. La  $k_d$  calculada para el SRY silvestre fue de 57 nM (gráfica SRY), para la HMG de 73 nM (gráfica HMG), para N-HMG de 58 nM (gráfica C-TER) y para HMG-C de 123 nM (gráfica N-TER). Siguiente página.



Parámetros		Modelo1			Modelo2			Modelo3			Modelo4			Modelo5			Modelo 6			Modelo 7			Modelo 8			Modelo 9			Modelo 10		
		H+	m1	m2	H+	m1	m2	H+	m1	m2	H+	m1	m2	H+	m1	m2	H+	m1	m2												
C. A.	C. A.	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Green	Yellow	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Orange	Orange	Orange	Green	Orange
	Penalizaciones estéricas	Orange	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Orange	Orange	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Green	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Green	Orange
Geometría	Penalizaciones P.R.	Red	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange												
	Penalizaciones Rotámeros	Green	Green	Green	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange									
	Premiaciones P.R.	Green	Green	Green	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange									
	Desviaciones C $\beta$	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange	Green	Orange	Orange

Tabla 1. Evaluación de modelos moleculares del SRYs. Se muestran los parámetros considerados en la evaluación así como la calificación de cada parámetro después de los procedimientos de protonación (H+) y los ciclos de minimización de energía 1 y 2 (m1 y m2, respectivamente). C.A.: Contactos entre átomos, P.R.: Plano de Ramachandran, C $\beta$ : Carbonos beta.

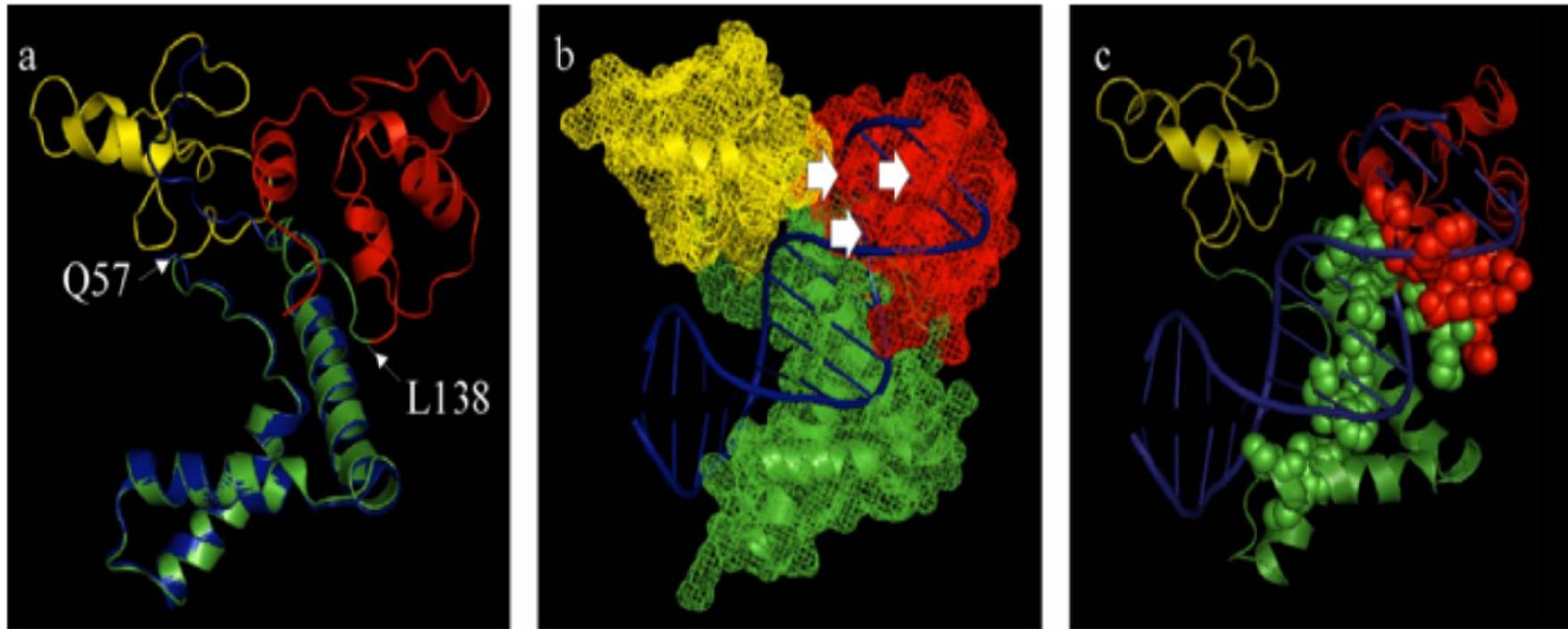


Figura 10. Modelo de la interacción del SRY silvestre-ADN. a) El modelo tridimensional de la proteína SRY silvestre (región del amino-terminal color amarillo, región de la caja HMG, color verde y la región del carboxilo-terminal, color rojo) fue estructuralmente alineado con la el archivo 1J46 (estructura azul), el cual contiene la estructura de los aminoácidos Q57 a L138. La distancia media cuadrática entre los carbonos alfa (RMSD) de cada cadena polipeptídica fue computada en 0.79 Å. b) Superposición de las estructuras del SRY silvestre y 1J46, muestra que el ADN atraviesa la región del carboxilo-terminal, específicamente los residuos Q193, R197, Y201 (flechas blancas). c) Análisis de la superficie de la proteína. Se muestra la formación de una cavidad integrada por los residuos D66, F68, I69, S89, R130, R132 a M137 de la caja HMG (esferas verdes) así como los residuos D141, N160, L163, R194, Y201 y L204 del carboxilo terminal (esferas rojas), adicionalmente se muestra la interacción con el ADN en estas regiones (azul).