



Universidad Nacional Autónoma



de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE LA REGIÓN PROMOTORA BASAL
DEL GEN Fbxw15**

Tesis que para obtener el grado de Biólogo presenta:

Luis Alberto García Avila

Directora de Tesis:

Dra. Elsa de la Chesnaye Caraveo.

Asesora interna:

Dra. Juana Monroy Moreno.

México, DF. 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente proyecto fue realizado con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de proyecto 1166.

Resumen

La foliculogénesis es un proceso crucial en la vida reproductiva de la hembra el cual, está controlado por múltiples factores de transcripción que determinan la supervivencia y viabilidad de los folículos en las diferentes etapas que la comprenden. En un estudio previo, se llevó a cabo un ensayo de microarreglos, el cual permitió identificar un nuevo gen (*Fbxw15*) que presenta un patrón de expresión bifásico durante el desarrollo ovárico feto-neonatal de murinos, lo que coincide con el inicio del ensamble y el crecimiento folicular temprano, independiente del estímulo gonadotrópico. Cuyo transcrito codifica a una proteína con caja F en su porción amino-terminal. El objetivo de este estudio fue identificar mediante un análisis *in silico* la región del promotor de *Fbxw15*, amplificar por PCR dicha región, clonarla en un vector que contiene un gen reportero y comprobar su actividad promotora en un sistema heterólogo mediante ensayos de luciferasa. El promotor de *Fbxw15* probó tener actividad promotora en un 5.53% en comparación con el control endógeno (100%), sin embargo la secuencia del promotor en antisentido, mostró una actividad del 61.33% en comparación con la actividad del control endógeno, lo cual sugiere que el promotor *Fbxw15*, constituye un promotor bidireccional que podría estar implicado en la regulación en *cis* o *trans* de genes vecinos.

Abstract

Folliculogenesis is a crucial process in the female reproductive life, which is controlled by multiple transcription factors that determine the survival and viability of follicles in different stages that comprise it. In a previous study, we conducted a microarray assay, which identified a new gene (*Fbxw15*) having a biphasic pattern of expression during fetal-neonatal murine ovarian development, which coincides with the start of assembly and early follicular growth independent of gonadotropic stimulus. This transcript encodes a protein with F box at its amino-terminal portion. The objective of this study was identified by an *in silico* analysis of the promoter region *Fbxw15*, PCR amplify this region, clone into a vector containing a reporter gene and checking promoter activity in a heterologous system by luciferase assays. Promoter *Fbxw15* proved to have promoter activity in a 5.53% compared to the endogenous control (100%), but the promoter sequence in antisense showed an activity of 61.33% in compared with the activity of the endogenous control, which *Fbxw15* suggests that the promoter is a bidirectional promoter that may be involved in regulating *cis* or *trans* to neighboring genes.

Índice.

1. Introducción.....	1
2. Justificación.....	6
3. Hipótesis.....	7
4. Objetivos.....	7
4.1. Objetivos generales.....	7
4.2. Objetivos específicos.....	7
5. Metodología.....	8
5.1. Análisis <i>in silico</i>	8
5.2. Extracción de ADN.....	8
5.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	9
5.4. Clonación de la región amplificada en un vector de tránsito.....	11
5.5. Transformación de bacterias competentes <i>E. coli</i> DH5 α	12
5.6. Selección de colonias candidatas.....	12
5.7. Subclonación del fragmento con la región promotora en un vector que contiene un gen reportero.....	13
5.8. Cultivos celulares y co-transfecciones.....	15
5.9. Determinación de la actividad del gen reportero.....	17
5.10. Identificación del sitio de inicio de la transcripción.....	17

6. Resultados.....	20
6.1. <i>Análisis in silico</i>	20
6.2. Amplificación y clonación del fragmento correspondiente al promotor del gen <i>Fbxw15</i> en vector de tránsito.....	23
6.3. Subclonación del fragmento correspondiente al promotor de <i>Fbxw15</i> en un vector con un gen reportero.....	25
6.4. Evaluación de la expresión de <i>Fbxw15</i>	29
6.5. Sitio de inicio de la transcripción.....	31
7. Discusión.....	33
8. Conclusiones.....	37
9. Perspectivas.....	38
10. Bibliografía.....	39

1. Introducción.

En mamíferos el desarrollo gonadal inicia con la formación de las crestas gonadales, a partir de la proliferación del epitelio celómico, la condensación del mesénquima en ambos lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal y la migración de las células germinales primordiales (CGP), localizadas en el endodermo posterior del saco vitelino, hacia el primordio gonadal a través del mesenterio (1, 2). En ausencia de SRY el gen determinante del testículo, el primordio gonadal se desarrolla como ovario en donde las CGP se diferencian en ovogonias, que en conjunción con las células epiteliales (células de la pregranulosa), formarán los cordones ovígeros, delimitados por una delgada membrana basal rodeada en la parte externa por células del mesénquima (3).

Durante la etapa prenatal y de forma progresiva ocurre el rompimiento de los cordones ovígeros, lo que da lugar a la formación de los folículos primordiales conformados por ovocitos individuales detenidos en la fase de diploteno de la primera profase meiótica y rodeados por una capa de células aplanadas de la granulosa a su vez que está delimitada por la membrana basal (4,5). A este proceso de ensamble de ovocitos y células de la granulosa (CG) se le denomina foliculogénesis, que en murinos ocurre durante los primeros días después del nacimiento (6).

El desarrollo folicular requiere de la expresión de una variedad de genes durante las diferentes etapas de la foliculogénesis. Tanto en la mujer como en el

ratón hembra, se han identificado diversos genes involucrados en el proceso de foliculogénesis, como genes que codifican para factores de transcripción, factores de crecimiento, proteínas de la zona pelúcida y proteínas específicas de la meiosis (7). En diversos estudios se ha propuesto el papel fundamental que tienen los ovocitos en la histogénesis folicular. Debido a que se requiere una estrecha comunicación entre los ovocitos y las CG, por un lado los ovocitos regulan la proliferación de las CG y posteriormente su diferenciación, mientras que las CG, son indispensables para el crecimiento del ovocito, la meiosis del mismo, la maduración citoplasmática y el control de la actividad transcripcional (8). La individualización folicular y el crecimiento temprano de los folículos, que en el ovario murino ocurren durante los primeros días de vida posnatal, son eventos independientes del estímulo gonadotrópico. Lo anterior se ha mostrado en cultivos de ovocitos de ratón donde aún en la ausencia de hormonas gonadotrópicas, los ovocitos de ratón son completamente viables (9).

Experimentos llevados a cabo con ratones nulos para factores de crecimiento o de transcripción, sugieren la participación de estos, tanto en la proliferación de los ovocitos como en la formación de los folículos y su posterior desarrollo. De esta forma, diversos reportes indican a al factor en línea germinal alfa (*Figα*) como un factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice, requerido en la formación del folículo, este factor de transcripción ovocito específico, se caracterizó inicialmente como activador de genes que codifican proteínas de la zona pelúcida, sin embargo el ARN mensajero de *Figα* se identifica antes del comienzo de la expresión de estos genes y su transcripción se conserva hasta la edad adulta. Diversos autores sugieren que *Figα* regula tanto la sobrevivencia de las células germinales como la

formación de los folículos primordiales. En ratones hembras nulos para *Figa*, las etapas previas a la foliculogénesis son aparentemente normales hasta el día embrionario 13; sin embargo, durante la etapa perinatal no hay formación de folículos primordiales y los ovocitos se degeneran, lo que conlleva al desarrollo de estrías gonadales, que son estructuras en forma de cordón constituidas por células somáticas. Estos datos sugieren que *Figa* tiene un papel importante tanto en el desarrollo de las células germinales y en el folicular (10). Un fenotipo similar se describe en ratones hembras que carecen del gen *Wnt4*, cuyos ovarios pierden gran parte de la reserva de ovocitos días antes del nacimiento. Así mismo WNT4 se requiere para prevenir la migración de células esteroideogénicas de los mesonefros a la gónada femenina (11-13).

El factor de transcripción con caja homeótica (NOBOX) participa en la transición del folículo primordial al folículo primario y su expresión continúa durante toda la foliculogénesis (14). En los ratones con deficiencia de NOBOX y en mujeres con síndrome de falla ovárica prematura, se observa una pérdida posnatal tanto de ovocitos como de folículos, los cuales son reemplazados por tejido fibroso (15). NOBOX regula la actividad transcripcional de genes ovocito específicos ligados a infertilidad en hembras, como *Bmp15*, *Gdf9*, *Oct4*, *Oosp*, *Zar*, *Pad6*, *H1oo*, *Pou5f1*, *c-Mos*, *Oog1*, *Oas1d*, *Oas1e*, *Oas1h*, *Dnmt1o*, *Fgf8* y *Rfp14* (16-18). Los genes *Gdf9* y *Bmp15* pertenecen a la superfamilia TGF β (siglas en inglés para Transforming growth factor β) juegan papeles muy importantes en la maduración del ovocito y en el desarrollo folicular. Ambas proteínas se expresan en los ovocitos de los folículos crecientes de ovarios de ratón. Este patrón es altamente conservado en ratas y humanos (19-21).

En estudios *in vitro* utilizando folículos de ratón en los que se adiciona al medio el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) recombinante, se ha determinado el papel biológico y la importancia de *Gdf9* tanto en el desarrollo de la foliculogénesis durante todas sus etapas, como en el crecimiento del folículo. Ratones nulos para *Gdf9* o inmunizados para GDF9 presentan una reducción en el número de folículos primarios, además de un bloqueo en el crecimiento del folículo en la etapa primaria. La exposición *in vitro* de tejido ovárico de roedor o humano a GDF9, promueve la progresión a folículo primario. Se ha reportado que GDF9 actúa como regulador de la mitosis en las células de la granulosa, por dos vías de señalización; dependiente e independiente de *Smad* (22).

La proteína morfogenética de hueso (BMP15), miembro de la superfamilia TGF β , tiene una estrecha homología con GDF9. En contraste con los defectos ováricos e infertilidad que se observa en ratones nulos para el gen *Gdf9*, los ratones nulos para el gen *Bmp15* son subfértiles. No obstante, en ovejas, este fenotipo no se observa, ya que mutaciones en *Bmp15* ocasionan un bloqueo en la progresión del crecimiento del folículo primario, similar al que se encuentra en los ratones nulos para *Gdf9*. A pesar del hecho de que en roedores BMP15 no es esencial para la maduración del folículo temprano. BMP15 estimula la proliferación de las células de la granulosa primarias. Este efecto en la proliferación es potenciado en concomitancia con GDF9, indicando una sinergia entre estos ligandos. El efecto sinérgico en la proliferación no se observa en ovinos, indicando que existen diferencias entre especies en la respuesta a estos dos factores de crecimiento (23).

Otros miembros de la familia de los BMP importantes para el desarrollo folicular son BMP4 y BMP7, estas proteínas se producen en el estroma ovárico y en las células de la teca, lo cual se ha mostrado en estudios *in vitro* con cultivos de ovarios de rata, muestran que BMP4 promueve el desarrollo del folículo primario, mientras que el tratamiento de ovarios con un anticuerpo para este factor de crecimiento, ocasiona una pérdida progresiva de los ovocitos de los folículos primarios. *In vivo*, la inmunización pasiva contra la BMP4 en ratones, resulta en la escasa formación de folículos primarios, aunque también se presenta un incremento en los folículos primordiales, lo cual no se asocia con apoptosis. En ratas adultas, la inyección intraovárica del factor BMP7 incrementa el porcentaje de folículos primarios y disminuye a los folículos primordiales (24).

Además de los antes mencionados, existen factores adicionales de los cuales poco se sabe del papel que juegan dentro del ensamble folicular y el crecimiento del mismo. Este es el caso del gen *Fbxw15* perteneciente a la familia de proteínas con caja F (F-BOX), el cual es ovocito específico. El transcrito de *Fbxw15* se identificó mediante un análisis por microarreglos, donde se observó una expresión máxima de ARNm a los 18 días poscoito y al día 19 decrece a niveles mínimos, hasta las primeras horas del nacimiento cuando sus niveles de expresión aumentan de nuevo en forma significativa. Coincidiendo lo anterior con el inicio del ensamble folicular y el crecimiento folicular temprano, independiente del estímulo gonadotrópico (25). Las proteínas con caja F, han sido caracterizadas como componentes del complejo ligasa de ubiquitina SCF, llamado así por las siglas en inglés de sus principales componentes (Skp1, Cullin, y una proteína con caja F) y

que facilita la interacción del sustrato con el conjugado enzimático ubiquitina. Las proteínas con caja F son subunidades del complejo SCF, que se unen a un sustrato específico y a su vez se ligan al complejo SCF por unión con Skp1 a través de la misma caja F (26).

2. Justificación.

El desarrollo folicular sucede gracias a un complicado proceso, cuyo mecanismo de acción se basa en una serie de interacciones moleculares que en sincronía, logran la comunicación entre las células somáticas y germinales para dar lugar a la formación de los folículos ováricos. El conocimiento que se tiene acerca de los genes específicos que participan en el proceso de la foliculogénesis, así como en el subsecuente desarrollo folicular, independiente del estímulo gonadotrópico aún es incompleto. Por tal motivo, diversos grupos de investigación se han dedicado a la identificación de nuevos genes en el ovario murino, empleando técnicas moleculares como los microarreglos de ADN y proteómica. En el presente estudio, se planteó caracterizar el promotor que regula la actividad transcripcional del gen *Fbxw15* y determinar si el ARN mensajero de la secuencia corriente arriba de dicho promotor contiene el sitio de inicio de la transcripción de *Fbxw15*, el cual se expresa de manera específica en el ovocito murino durante la etapa perinatal, lo que sugiere que la proteína correspondiente participa en la foliculogénesis y en el desarrollo folicular.

3. Hipótesis

El promotor del gen *Fbxw15*, se localiza dentro de la región situada 1000 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la traducción y regula el sitio de inicio de la transcripción de dicho gen.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Identificar y determinar la región promotora que regula la transcripción del gen *Fbxw15* usando métodos bioinformáticos y técnicas de biología molecular.

4.2. Objetivos específicos.

- 1.- Identificar mediante un análisis *in silico*, la secuencia correspondiente al promotor del gen *Fbxw15*.
- 2.-Clonar la región predicha por el análisis *in silico* en un vector de expresión.
- 3.-Evaluar la expresión del promotor *Fbxw15* en un sistema heterólogo.
- 4.-Identificar el sitio de inicio de la transcripción del gen *Fbxw15*.

5. Metodología.

5.1. Análisis *in silico*.

Se llevó a cabo el análisis *in silico* de la secuencia río arriba del codón de inicio de la traducción y del primer exón del gen *Fbxw15*. Para dicho análisis se empleó el programa de computación MatInspector, (Genomatix, Software GMBH, Manchen, Alemania. Disponible en: www.genomatix.de), que realiza la predicción de promotores con base en la identificación de sitios de reconocimiento a factores de transcripción específicos.

5.2. Extracción de ADN.

El ADN genómico se obtuvo de los riñones colectados de un ratón hembra adulto de la cepa C57BL/6J. Para ello el tejido se sometió a lisis tisular y desproteinización con proteinasa K (20 mg/ml) y dodecíl sulfato de sodio (SDS) al 10%, en amortiguador de digestión (NaCl 1M, Tris-HCl 0.01M, pH 8.0, EDTA 0.02M, pH8.0 y SDS al 0.5%). El lisado se centrifugó y el ADN se extrajo del sobrenadante con fenol/cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y fue precipitado con isopropanol a 4°C. Posteriormente el ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µl de ddH₂O. Finalmente, se determinó la concentración por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. Para corroborar la integridad del ADN, se

realizó la electroforesis de una alícuota de la muestra correspondiente en un gel de agarosa al 1%.

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un fragmento de la región río arriba que contenía el promotor teórico del gen *Fbxw15*, cuya longitud (945 pb) dependió del análisis *in silico*, se amplificó mediante PCR. Para ello, se utilizó un par de oligonucleótidos complementarios a la secuencia de dicho gen, los cuales contenían los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Bgl II y Hind III (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del promotor de *Fbxw15*.

Oligonucleótido sentido con sitio de reconocimiento para la enzima Bgl II	Oligonucleótido antisentido con sitio de reconocimiento para la enzima Hind III.
5'-AGATCTCTGCTGGGTTCTTGGGTTA-3'	5'-CGATCCATTTACCTTGTTTGCCGAAGCTT-3'

La PCR se realizó en un volumen total de 20 µl que contenía: 2 µl del ADN (100 ng/µl) obtenido a partir del tejido somático, 8.8 µl de agua libre de nucleasas, 0.6 µl de dimetilsulfóxido, 20 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 4 µl del amortiguador 5X Phusion HF, 0.4 µl de los deoxinucleótidos trifosfatados

(10 mM) y 0.2 µl de la enzima Phusion® DNA Polymerase 1U/µl (New England Biolabs, Ipswich MA, EUA). La reacción de amplificación se realizó con una desnaturalización inicial a 98°C por 30 seg, seguidos de 34 ciclos a 98°C por 10 seg, 63°C por 30 seg, 72°C por 50 seg y una extensión a 72°C por 10 min. Posteriormente, se realizó la electroforesis del producto amplificado en un gel de agarosa al 1%. Asimismo, los productos de la PCR correspondientes al fragmento de la región promotora se purificaron utilizando el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison WI EUA). Posteriormente se determinó su concentración por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm.

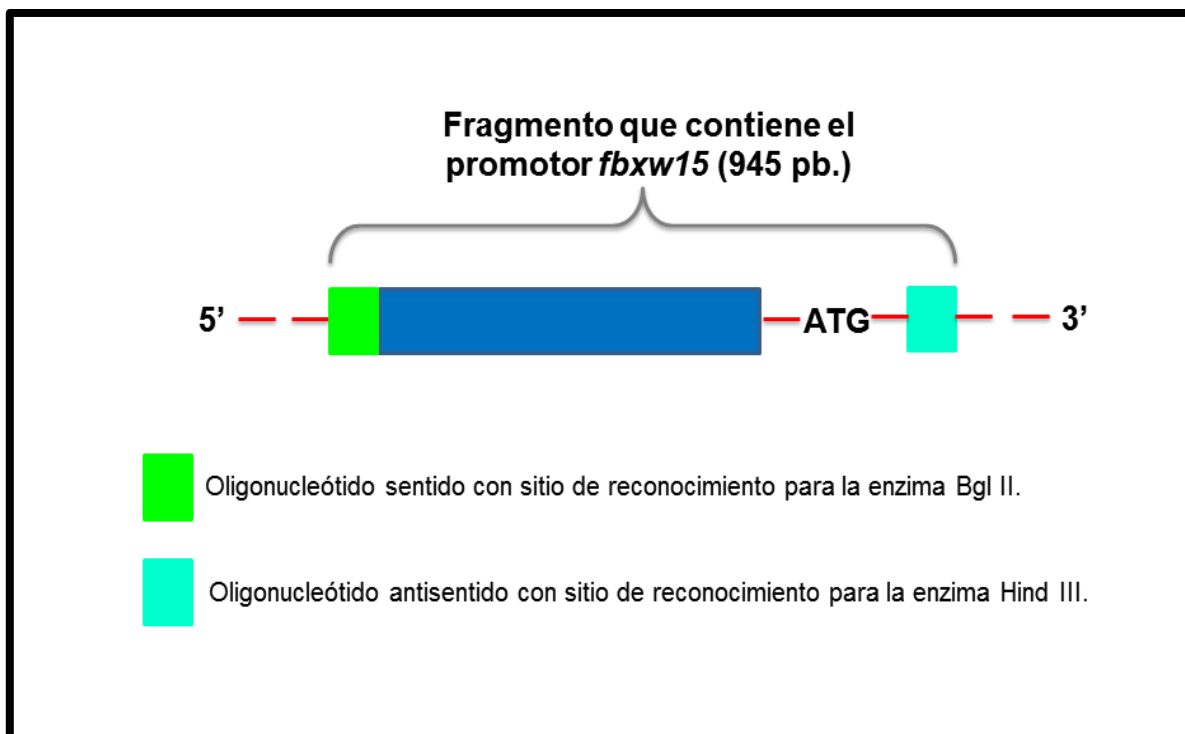


Figura 1. Esquematación del fragmento que contiene el promotor de *Fbxw15* según el resultado del análisis *in silico*.

5.4. Clonación de la región amplificada en un vector de tránsito.

El fragmento amplificado y purificado, se clonó en el vector de tránsito comercial pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA EUA). Para esto, se mezcló 10 µl de amortiguador de reacción 2X, 5 µl (100ng) del producto de PCR purificado, 1 µl (50ng) del vector pJET1.2/blunt, 1µl (5U/µl) de la enzima T4 DNA ligasa y 3 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó por 17 horas a 16°C.

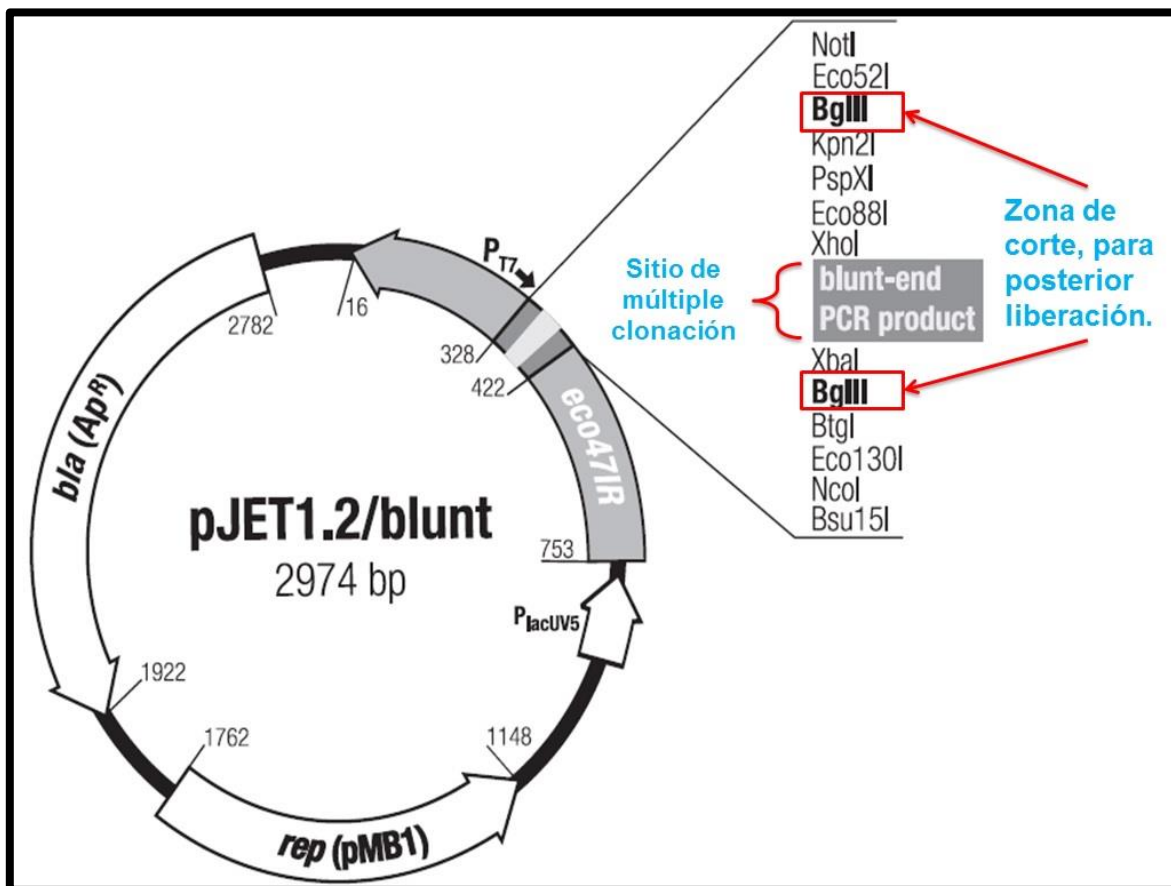


Figura 2. Esquema del pJet1.2/blunt donde se marca el sitio de múltiple clonamiento donde se ligó el fragmento *Fbxw15*, así como las zonas de reconocimiento a Bgl II, para su posterior liberación por digestión enzimática.

5.5. Transformación en bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, 100 µl de bacterias competentes, se transformaron con 10µl de la mezcla de ligación, mediante incubación en hielo por 15 min., seguido de un choque térmico a 42°C por 2 min., e incubando nuevamente en hielo por 15 min. Posteriormente, se agregó 1ml de medio rico en glucosa SOC (Medio súper óptimo más glucosa), y se incubó con agitación a 37°C por 1 hr. Terminado el tiempo, se hizo el plaqueado en medio agar Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100µg/ml), y se dejó incubar toda la noche a 37°C.

5.6. Selección de colonias candidatas.

Posterior a la incubación, se seleccionaron colonias candidatas al azar y se cultivaron en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), con agitación a 37°C durante toda la noche. Los plásmidos se purificaron a partir de 3 ml del medio de cultivo, mediante lisis alcalina. Los plásmidos fueron resuspendidos en 20 µl de agua libre de nucleasas, de los cuales 2 µl fueron digeridos a 37°C durante toda la noche, con la enzima de restricción Bgl II, la cual libera el inserto del vector pJET1.2. Los productos de las digestiones enzimática se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, una vez identificados aquellos plásmidos con el inserto correspondiente, se procedió a inocular con estos 200 ml de medio LB con ampicilina. Los plásmidos recombinantes se purificaron utilizando el kit QIAGEN® midiprep, (QIAGEN, Inc. Hilden, Alemania.), siguiendo el protocolo del mismo. Nuevamente, el inserto se identificó mediante la digestión con la

enzima Bgl II, que libera el fragmento del vector de tránsito y el producto de la digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La concentración del plásmido se cuantificó por espectrofotometría mediante lecturas a 260 nm y 280 nm.

5.7. Subclonación del fragmento con la región promotora en un vector que contiene un gen reportero.

El fragmento de interés se liberó del vector de tránsito utilizando las enzimas de restricción Bgl II y Hind III. De manera paralela y con las mismas enzimas de restricción utilizadas para liberar el inserto, se linealizó el vector pRL-null, el cual carece de promotor y contiene el gen reportero para la enzima luciferasa de *Renilla reniformis*, cuya expresión indica la actividad transcripcional de la región clonada. Ambas digestiones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, las bandas correspondientes al inserto y al vector se escindieron del gel y se purificaron por columna con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation). La concentración del inserto se determinó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, al comparar la intensidad de la banda correspondiente al producto purificado contra una escalera de masa.

El fragmento se subclonó en el vector pRL-null en orientación hacia el gen de la luciferasa, mezclando ADN del promotor del gen *Fbxw15*, y del vector de expresión para una relación molecular de 3:1. Posteriormente, se procedió a la transformación de células competentes, a la purificación de los plásmidos

recombinantes provenientes de las colonias seleccionadas mediante cultivo en placa agar LB con ampicilina (100 µg/ml), y a la identificación del inserto por medio de restricción enzimática y electroforesis, tanto para confirmar la identidad del inserto como su orientación, en un gel de agarosa al 1%, como se describió anteriormente. De igual forma, se realizó la secuenciación automática de los plásmidos recombinantes, empleando un secuenciador automático (Applied Biosystems DNA Sequencer modelo 377, Foster City, CA, EUA).

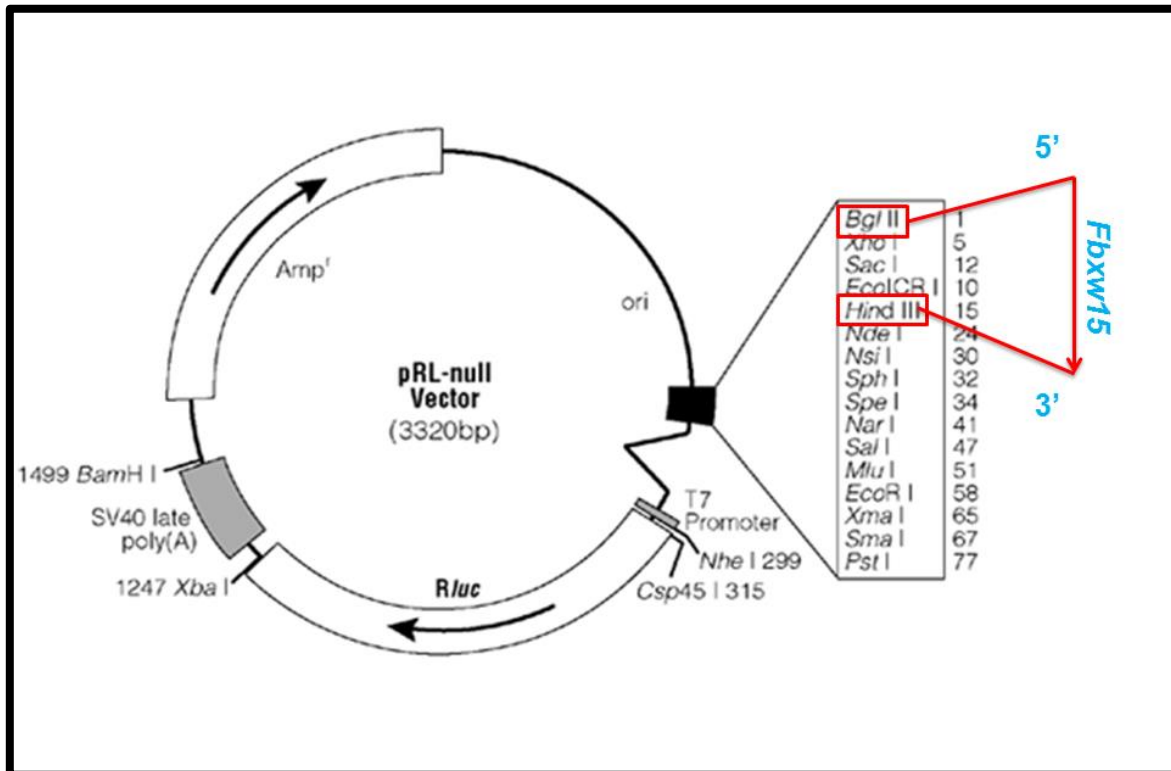


Figura 3. Esquema del vector pRL-null, donde se muestran los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción utilizadas para subclonar *Fbxw15* así como su orientación hacia el gen reportero.

5.8. Cultivos celulares y cotransfecciones.

Para determinar la actividad transcripcional de la región promotora, la línea celular HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) se transfectó con la construcción molecular descrita anteriormente.

Inicialmente, dicha línea celular se mantuvo en cultivo a un 80% de confluencia en medio esencial mínimo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, Sigma-Aldrich. San Luis MO, EUA.) que contenía suero fetal bovino (SFB, Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc.) a 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 110 mg/l, estreptomina 100 mg/l y penicilina 100 U/l, a pH 8.0, ajustado con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES) (15mM), en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

Posteriormente, se realizó la cotransfección de dicha línea celular con la construcción pRL/*Fbxw15* y el vector pGL3 CMV, el cual se utilizó como control interno, este vector contiene el gen reportero de la luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) y el promotor de *CitoMegalovirus* (CMV) que genera un alto nivel de expresión de la luciferasa de *Photinus pyralis*. Como control negativo se utilizaron los vectores pRL-null y pGL3 basic que carecen ambos de promotores. Como controles positivos se utilizaron los vectores pRL CMV y pGL3 CMV, ambos con el promotor del *CitoMegalovirus*.

Para llevar a cabo las cotransfecciones, 150,000 células se sembraron en cada pozo de una placa de poliestireno con 24 pozos (Falcon, Becton Dickinson, Franklin lakes, NJ, EUA), en 1 ml de medio DMEM complementado al 10% con

SFB. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C en presencia de 5% CO₂. Al día siguiente con una confluencia aproximada del 80%, las células se cotransfectaron con una mezcla de 1 µg de la construcción pRL/*Fbxw15* y 50 ng el vector pGL3 con el promotor del CMV. Para el control positivo se mezclaron 50 ng, tanto de pRL CMV como de pGL3 CMV y respectivamente de la misma forma, se utilizaron 50 ng de PRL null y pGL3 basic, como mezcla para el control negativo. Como agente de transfección se utilizó el reactivo lipofílico TurboFect® Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.), el cual forma complejos de lípidos de carga positiva junto con el ADN, estos complejos protegen al ADN de la degradación y facilita la entrada del plásmido a la célula eucarionte.

Para cada pozo, las mezclas correspondientes se diluyeron en la cantidad de medio DMEM sin suplementar necesaria para obtener 98µl de volumen, más 2 µl del reactivo TurboFect® para tener un volumen total de 100 µl por pozo, la dilución final se mezcló por pipeteo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se adicionó el volumen del complejo correspondiente a cada pozo más 1 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SFB. Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% por 48 h.

Una vez transcurridas las 48 h de incubación, el medio de cada pozo se removió por succión y se procedió a lisar las células utilizando un amortiguador de lisis pasiva 5X (PLB), contenido en el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation), agregando a cada pozo 100 µl de PLB diluido a una concentración de 1X y dejando la placa con agitación por 15 min a temperatura ambiente. El lisado celular se recuperó para los experimentos subsecuentes.

5.9. Determinación de la actividad del gen reportero.

El vector pRL contiene el módulo de expresión de la enzima luciferasa de *Renilla reniformis*, cuya actividad se utilizó para monitorear la actividad transcripcional del promotor de *Fbxw15*. La determinación de la actividad de la enzima luciferasa de *R. reniformis* se llevó a cabo empleando el kit comercial Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation). La actividad de la enzima antes mencionada se normalizó con la actividad de la enzima luciferasa de *Photinus pyralis*, cuyo gen lo expresa el vector pGL3 CMV. Las determinaciones de luminiscencia se realizaron utilizando un multidetector Victor III (Applied Biosystems, EUA.). Para ello, los reactivos LAR II y Stop and Glo, se prepararon de acuerdo al protocolo del kit, después se colocaron 20 µl del lisado celular en una placa opaca del luminómetro, y se les agregó 20 µl del reactivo LAR II. Se procedió a leer la actividad de la luciferasa de *P. pyralis*, posteriormente para cuantificar la actividad de la luciferasa *R. reniformes*, a cada muestra se le agregaron 20 µl del reactivo Stop and Glo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

5.10. Identificación del sitio de inicio de la transcripción.

Para confirmar que el sitio de inicio de la transcripción se encuentra dentro de la región promotora predicha por el análisis bioinformático, se empleó la técnica de amplificación rápida de extremos de ADN complementario (RACE 5' PCR), para ello, se aisló el ARN total de 5 pares de ovarios colectados de ratones hembra C57BL/6J adultas, empleando la técnica de fenol ácido. La concentración del ARN

se determinó por análisis espectrofotométrico, mediante lecturas a 260 nm. En todos los casos, se obtuvo una concentración suficiente (10 µg/µl) para la técnica de RACE 5'-PCR.

Se consideraron óptimas las relaciones 260/280 nm, comprendidas entre 1.7 y 2.0. Asimismo, la integridad del ARN aislado se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El análisis electroforético mostró para cada muestra, la presencia de dos bandas íntegras, correspondientes a los fragmentos 28S y 18S del ARN ribosomal. Posteriormente, a 10 µg de ARN se le adicionaron 2 µl de una enzima fosfatasa alcalina, 2 µl del amortiguador específico y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37°C durante una hora.

Después, la reacción se purificó al adicionar 15 µl de una solución de acetato de amonio, 150 µl de una mezcla de fenol ácido-cloroformo y 115 µl de agua libre de nucleasas. Luego, a 5 µl de la mezcla purificada, se le agregaron 2 µl de una pirofosfatasa ácida, 1 µl del amortiguador y 2 µl de agua libre de nucleasas para un volumen final de 10 µl. Nuevamente la reacción se incubó a 37°C durante una hora y se procedió a la ligación del oligonucleótido adaptador externo, añadiendo 1 µl de éste a 2 µl de la muestra de ARN, 1 µl del amortiguador correspondiente, más 2 µl de la enzima T4 ligasa (2.5 U/ µl) y 4 µl de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 10 µl. De igual forma, esta reacción se incubó a 37°C durante una hora.

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario, utilizando como templado 2 µl del ARN ligado al oligonucleótido adaptador externo, 4 µl de la mezcla de dNTP, 2 µl de los oligodecámeros con secuencia al azar, 2 µl de amortiguador 10X, 1 µl de una enzima inhibidora de ARNasas, 1 µl de la enzima transcriptasa reversa y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó a 42°C durante una h. Después a 1 µl de la reacción de transcripción reversa, se agregaron 5 µl del amortiguador 10X para la PCR, 4 µl de la mezcla de dNTP, 2 µl de uno de los oligonucleótidos externos específicos (en antisentido), complementario a la secuencia codificante del gen *Fbxw15* en las posiciones 269 a 250, una concentración de 10 µM, 2 µl del oligonucleótido externo (en sentido), incluido en el kit y 1.25 unidades de una ADN polimerasa termoestable, de largo alcance para un volumen final de 50 µl. Se llevó a cabo la reacción de amplificación, siguiendo el protocolo descrito en el manual del kit First Choice RLM-RACE kit (Ambion, Applied Biosystems). El cual consistió de 3 min de desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, alineamiento a 55°C, 30 seg y extensión a 72°C 30 seg, finalizando con un paso de extensión a 72°C por 7 min.

Por último, se llevó a cabo una segunda reacción de PCR (PCR anidada), empleando el oligonucleótido interno (en sentido) que provee el kit, y el segundo oligonucleótido externo (en antisentido) complementario a la región 146 a 127 de la región codificante del gen, utilizando las condiciones de amplificación descritas previamente. El producto de esta segunda amplificación por PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.8%. Una vez purificado, este

fragmento se clonó en el vector de tránsito pJET1.2/Blunt para analizar la secuencia del mismo, empleando un secuenciador automático (Applied Biosystems DNA sequencer modelo 337 EUA.).

6. Resultados.

6.1. Análisis *in silico*.

Los resultados obtenidos a partir del análisis *in silico*, mediante el programa de computación MatInspector, (Genomatix, Software GMBH, Manchen, Alemania), tanto de la secuencia río arriba del codón de inicio de la traducción como del primer exón del gen *Fbxw15*, indican que en dicha región se delimita un promotor de 601 pares de bases, de las cuales 532 se localizan río arriba del codón ATG y 69 pb corresponden al primer exón del gen *Fbxw15*. Se indica un posible sitio de inicio de la transcripción en la posición -32 a partir del codón de inicio de la traducción; de igual forma, en los segmentos -49 a -65 y -367 a -383 se localizan sitios de reconocimiento para la proteína de unión a caja TATA. Cercano a este último, específicamente en la región -361 a -371, se encuentra un sitio de reconocimiento para los elementos iniciadores del promotor mínimo (Figura 4).

LOCUS GXP_67899(Fbxw15/mouse) 601 bp DNA

DEFINITION loc=GXL_56745|sym=Fbxw15|geneid=382105|acc=GXP_67899|

taxid=10090|spec=Mus musculus|chr=9|ctg=NC_000075|str=(-)|
start=109568162|end=109568762|len=601|tss=501|
descr=F-box and WD-40 domain protein 15|
comm=GXT_12982617/AK087669/501/gold;
GXT_13129625/NM_199036/501/bronze

ACCESSION GXP_67899

BASE COUNT 165 a 126 c 151 g 159 t

ORIGIN

```
1 CTACTAGAAA GCTGAGTATA CAGCATATGA TCTCAGAGGC TGTGCAGGCA CAGAGAGGTG
61 GGTCCCTGCTG ATCTAACTCA GTTCTCAAGG TAGACATAAA CATGGAAACC AGAGTCCTTA
121 CACCAGTAAT TTGCAGCAAC CTAACTGGCT TCATAAAAAC AATTGAACCT GTTGAAAATT
181 AGTGTGCTAC TCAGAATTTT CTAGAAAGTT CTGACAAGTA CATCATCAAT CAGGACAGCC
241 CCAGATCATG TGCTTTTGGT CTCCACAGTG CCAGGAAGGG GTTGTGTGAGC TCATCTACTC
301 AGTGAAAATC ACTGTGCAGT GAGTTAAGGT GTGAGCACTC TCAGCTGAGT GTTTCTGGTT
361 CCAGTGAGTG GGGGCTTGGA GTCAGGCTGA GCGTCTACAC AGCTGCAGCT TTCTCCAGTC
421 AAAGTCTGAT GAGCTGTGGT CGGCAATCCT GTGAAATCTT TGGCCAAGTC TTTAAAATCA
481 GAGCAAGCTG GGGAGGAGAA AGAAGAGTCA GTGTGGACTT AGGCCACTGA AGATGGCGAT
541 CCATTTACCT TGTTTGCCGA TGATGAAAAT CCTCTCCTAT CTGGATGCCT ACAGTTTGCT
```

601 A

CTGCTGGGTTCCCTGGGTTATTGTTTTACAGTACAAAGTATCACAGTTACTAAGGATCCAGGACAT
AAGCCCTACCTGTAGATACACATGTGAAGGTAATTTAAGAATGAAAATACATTTCTGATTACTAGTT
AGTACTATAATCATCATGAATACAATCAGCATGACTCTTTTACTCTTTTTTGGAAACAAATTCTCA
TTCTTTACCCTAGACTGGCCTGGAATTCATGTGCAGTACATGTAAAAGTATATGCAGGAGTGCCTA
TGCCGTGTGTATGTGCAGAGACCAGCAATAAACATCATGTGTCTCTTTAACTGCCACTTTTCTACTAG
AAAGCTGAGTATACAGCATATGATCTCAGAGGCTGTGCAGGCACAGAGAGGTGGGTCCTGCTGATC
TAACTCAGTTCTCAAGGTAGACATA**AACATGGAAACCAGAGTCC****TTAC****ACCAGTAATTTCCAGCAA**
CCTAACTGGCTTCATAAAAACAATTGAACCTGTTGAAAATTAGTGTGCTACTCAGAATTTTCTAGA
AAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAGCCCCAGATCATGTGCTTTTGGTCTCCACAGTGC
CAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGTGAAAATCACTGTGCAGTGAAGTTAAGGTGTGAGCA
CTCTCAGCTGAGTGTCTGTTCCAGTGAGTGGGGCTTGGAGTCAGGCTGAGCGTCTACACAGC
TGCAGCTTTCTCCAGTCAAAGTCTGATGAGCTGTGGTCGGCAATCCTGTGAAATCTTTGGCCAA**GT**
CTTTAAAATCAGAGCAAGCTGGGGAGGAGAA**A**GAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCACTGAAG**ATG**
GCGATCCATTTACCTTGTTTGCCGATGATGAAAATCCTCTCCTATCTGGATGCCTACAGTTTGCTA
CAGGCTGCCCAAGTGAACAAGGACTGGAATGAACTTGCCAGCAGT

Tamaño del promotor (segmento subrayado) = 601 pb

Tamaño del fragmento clonado=945 pb + 3320 pb del vector=4,265 pb

Sitio de inicio de la transcripción



Sitio de inicio de la traducción



Caja TATA



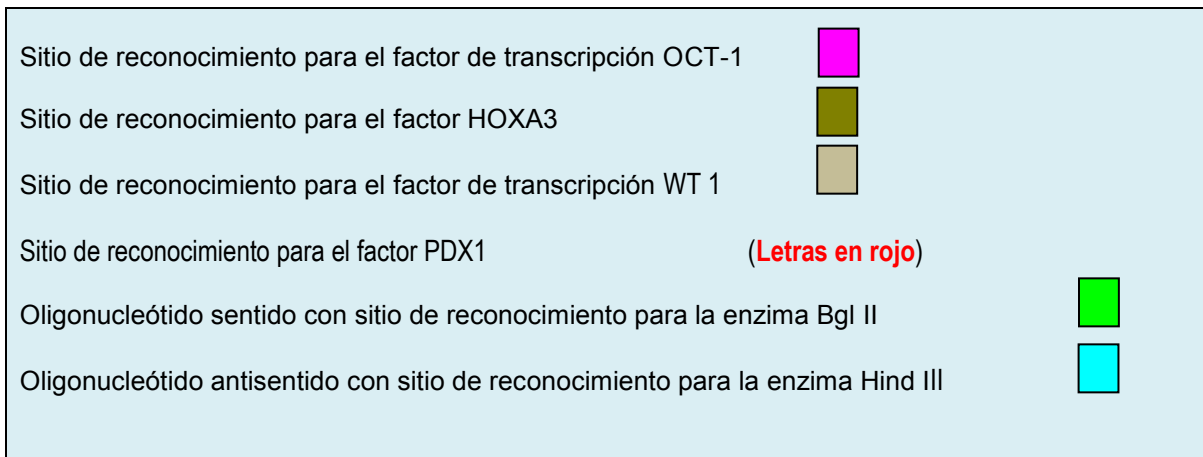


Figura 4: Región corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, donde se localiza el promotor predicho por el análisis bioinformático. Dicha región, abarca 601 pares de bases (región subrayada). Se señala con color los respectivos sitios de reconocimiento para los elementos iniciadores del promotor. Así como los sitios de reconocimiento para la proteína de unión a caja TATA.

Asimismo, el análisis bioinformático identificó sitios de reconocimiento para diversos factores de transcripción (Figura 5) como: el factor octamérico de transcripción 1 (OCT-1), perteneciente a la familia de factores POU, el cual se expresa en los ovocitos de folículos primordiales y folículos primarios (27), la importancia molecular de este factor radica en el mantenimiento de la pluripotencialidad en poblaciones celulares de mamíferos (28). Los factores de transcripción HOXA3, cuya expresión se ha identificado en todas las etapas del crecimiento del ovocito (29) y HOXA5, que se expresa en las células de la granulosa (30), y del que se ha demostrado que la pérdida de su función no impacta en el proceso de foliculogénesis pero si incrementa la incidencia de la formación de estrías gonadales (31). WT1, un factor de transcripción conformado por cuatro dedos de zinc y cuya expresión en el folículo está limitada a las células de la granulosa (32). Se ha demostrado que WT1 inhibe la apoptosis de las

células de la granulosa de los folículos primordiales y primarios al regular a p53 (33). Por último el promotor duodenal pancreático Homeobox 1 (PDX1), del cual no se ha descrito expresión en el ovario o en ovocitos en condiciones normales, pero que es ampliamente conocido por su importante papel en la morfogénesis pancreática (34).

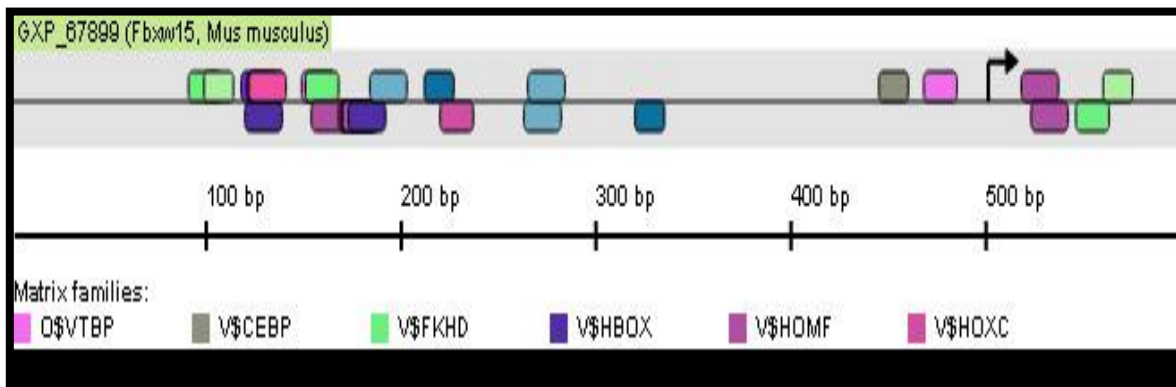


Figura 5. Esquema de los sitios de reconocimiento para diversos factores de transcripción, identificados en la región del promotor predicho para *Fbxw15*.

6.2. Amplificación y clonación del fragmento correspondiente al promotor del gen *Fbxw15* en un vector de tránsito.

Con base en los resultados del análisis *in silico*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (tabla 1) que permitieron amplificar la región analizada la cual comprende un fragmento de 945 pb. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En la figura 6a se observa la electroforesis de tres reacciones de amplificación cuyo tamaño corresponde con el esperado. Cada uno de los tres fragmentos se escindieron del gel y se procedió a

la purificación del ADN, empleando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation.)

El fragmento purificado se ligó dentro del vector de tránsito pJET1.2, y 100 µl bacterianas competentes *E. coli* DH5α se transformaron con estos productos de ligación, posteriormente para liberar el fragmento correspondiente al promotor de *Fbxw15* se digirió el vector de tránsito con la enzima Bgl II. En la figura 6b se muestra la electroforesis de la digestión enzimática de 16 colonias recombinantes, de las cuales la mayoría resultaron ser colonias positivas para el promotor de *Fbxw15*; se observan las bandas correspondientes a *Fbxw15* (945 pb) y al vector de tránsito (3,320pb).

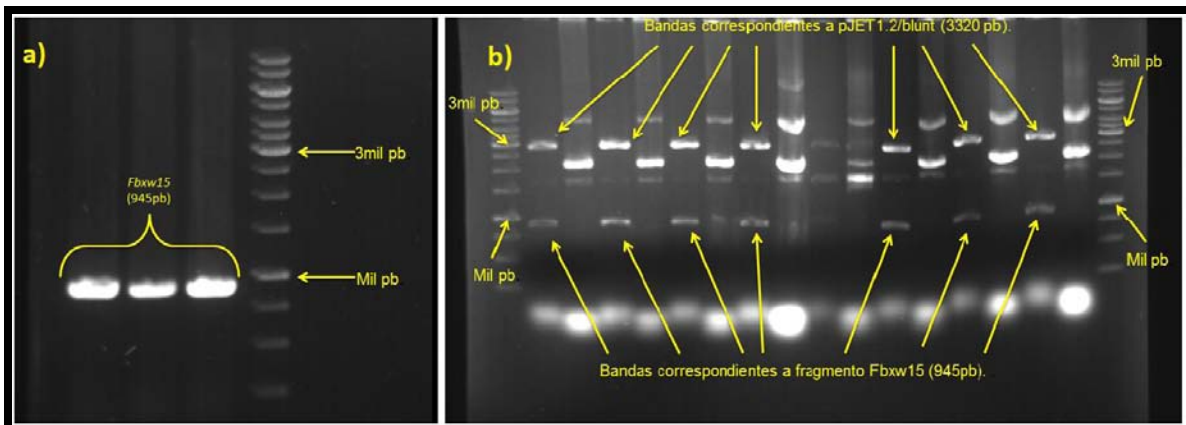


Figura 6. a) Fragmentos correspondientes a la amplificación por PCR de la región promotora de *Fbxw15*. El peso molecular de los fragmentos corresponden al tamaño esperado (945 pb). **b)** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática con Bgl II, de 16 colonias bacterianas recombinantes analizadas siete de las colonias resultaron positivas para el inserto de *Fbxw15*.

6.3. Subclonación del fragmento correspondiente al promotor de *Fbxw15* en un vector reportero.

Una vez identificadas las colonias positivas, una de ellas se seleccionó para hacer un cultivo a gran escala y obtener así una mayor concentración de plásmido, el cual se purificó con el kit QIAGEN® midiprep (QIAGEN, Inc.). El fragmento correspondiente al promotor *Fbxw15* se obtuvo por digestión, con las enzimas Bgl II y Hind III. De forma paralela el vector de expresión pRL-null se digirió con las mismas enzimas y se fosforiló.

Siguiendo los pasos anteriormente descritos, el promotor de *Fbxw15* se liberó del vector de tránsito posteriormente se subclonó en el vector de expresión pRL-null, ambos, fragmento y vector fueron mezclados en una relación molecular de 3:1. Células bacterianas *E. coli* DH5 α se transformaron con la mezcla anterior. Las colonias positivas se identificaron digiriendo el plásmido pRL/*Fbxw15* con la enzima Bgl II la cual solo linealiza el plásmido. En la figura 7a se muestra la electroforesis de las digestiones enzimáticas de 16 colonias; se observa que la mayoría de colonias solo contenían el vector de expresión (banda de 3,320 pb), únicamente una de las 16 colonias contenía el plásmido recombinante. Se observa la banda correspondiente al peso molecular de la construcción de pRL/*Fbxw15* (426 5pb). Posteriormente, para liberar el fragmento correspondiente al promotor de *Fbxw15*. En la Figura 7b se muestra la digestión con Hind III del plásmido linealizado, la cual liberó el fragmento del vector de expresión, se pueden observar dos bandas, una correspondiente al vector pRL (3,320 pb) y otra

correspondiente al fragmento del promotor de *Fbxw15* (945 pb). Después de corroborar al inserto mediante digestión enzimática, se procedió a realizar el cultivo a gran escala del plásmido pRL/*Fbxw15*, para utilizarlo en las cotransfecciones de la línea celular Hek 293.

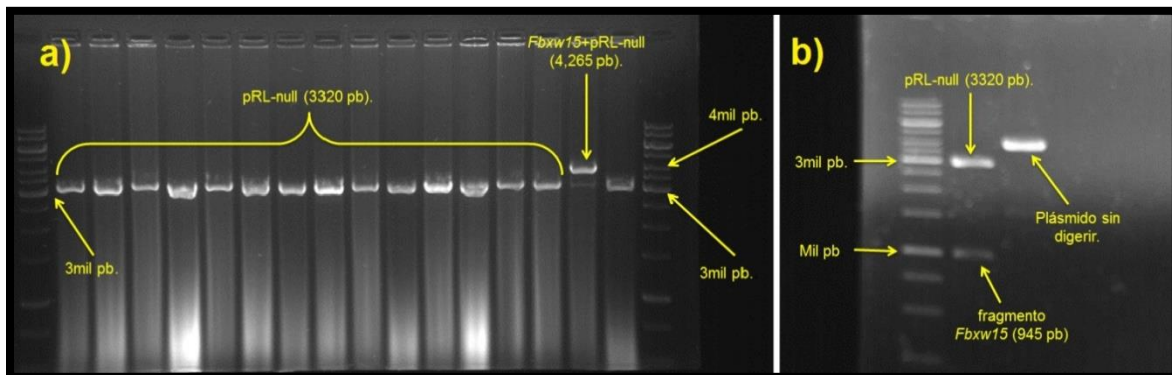


Figura 7. a) Identificación de colonias positivas. Se muestra la electroforesis de plásmidos digeridos con la enzima Bgl II, donde solo una colonia resultó positiva, correspondiendo al peso molecular de pRL/*Fbxw15* (4265pb.), la demás colonias solo contenían el vector pRL-null religado. **b)** Digestión del plásmido con Bgl II y Hind III, se observan 2 bandas, que corresponden a los pesos moleculares de pRL null (3,320 pb) y a *Fbxw15* (945 pb), respectivamente.

El plásmido recombinante aislado de la clona positiva, se purificó y posteriormente se utilizó como templado para realizar una reacción de secuencia. Los resultados de la secuenciación automática se compararon contra la secuencia teórica corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen *Fbxw15* contenida en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. En la figura 8 se muestra la comparación de la secuencia de la construcción pRL/*Fbxw15* en sentido contra la secuencia teórica y en la figura 9 se muestra la comparación de la construcción pRL/*Fbxw15AS* contra la secuencia teórica.

PRL/Fbxw15	CTCCTGCAGCGCTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAG	60
Fbxw15b	---CTGC--TGG---GTTTCCTGGGTTATTGTTTTACAGTACAAA-----	37
	**** * ** * * * * * * * * * * * * *	
PRL/Fbxw15	GGTGTTTAGTAAAGTTACAGTTACTATTGATCCAGGACATAAGCCCTACCTGTAGATACA	120
Fbxw15b	-----GTA---TCACAGTTACTAAGGATCCAGGACATAAGCCCTACCTGTAGATACA	86
	*** * ***** *****	
PRL/Fbxw15	CATGTGAAGGAAATTTAAGAATGAAAATACATTCTGATTACTAGATAGTACTATAATCAT	180
Fbxw15b	CATGTGAAGGTAATTTAAGAATGAAAATACATTCTGATTACTAGTTAGTACTATAATCAT	146
	***** *****	
PRL/Fbxw15	CATGAATACAATCAGCATGACTCTTTTACTCTTTTTTGGAAACAAATTCTCATTCTTTAC	240
Fbxw15b	CATGAATACAATCAGCATGACTCTTTTACTCTTTTTTGGAAACAAATTCTCATTCTTTAC	206

PRL/Fbxw15	CCTAGACTGGCCTGGAATTCATGTGCAGTACATGTAAGTATATGCAGGAGTGCCTATG	300
Fbxw15b	CCTAGACTGGCCTGGAATTCATGTGCAGTACATGTAAGTATATGCAGGAGTGCCTATG	266

PRL/Fbxw15	CCTGTGTATGTGCAGAGACCAGCAATAAACATCATGTGTCTCTTTAACTGCCACTTTCTA	360
Fbxw15b	CCTGTGTATGTGCAGAGACCAGCAATAAACATCATGTGTCTCTTTAACTGCCACTTTCTA	326

PRL/Fbxw15	CTAGAAAGCTGAGTATACAGCATATGATCTCAGAGGCTGTGCAGGCACAGAGAGGTGGGT	420
Fbxw15b	CTAGAAAGCTGAGTATACAGCATATGATCTCAGAGGCTGTGCAGGCACAGAGAGGTGGGT	386

PRL/Fbxw15	CCTGCTGATCTAACTCAGTTCTCAAGGTAGACATAAACATGGAAACCAGAGTCCTTACAC	480
Fbxw15b	CCTGCTGATCTAACTCAGTTCTCAAGGTAGACATAAACATGGAAACCAGAGTCCTTACAC	446

PRL/Fbxw15	CAGTAATTTGCAGCAACCTAACTGGCTTCATAAAAACAATTGAACCTGTTGAAAATTAGT	540
Fbxw15b	CAGTAATTTGCAGCAACCTAACTGGCTTCATAAAAACAATTGAACCTGTTGAAAATTAGT	506

PRL/Fbxw15	GTGCTACTCAGAATTTTCTAGAAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAGCCCCA	600
Fbxw15b	GTGCTACTCAGAATTTTCTAGAAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAGCCCCA	566

PRL/Fbxw15	GATCATGTGCTTTTGGTCTCCACAGTGCCAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGT	660
Fbxw15b	GATCATGTGCTTTTGGTCTCCACAGTGCCAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGT	626

PRL/Fbxw15	GAAACTCACTTGTGCAGTGAGTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTCTTCTGGTTCC	720
Fbxw15b	GAAAATCACT-GTGCAGTGAGTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTCTTCTGGTTCC	685
	**** *****	
PRL/Fbxw15	AGTGAGTGGGGGCTTGGAGTCAGGGCTGAGCGTCTACACAGCTGCCAGCTTTCTCCAGTC	780
Fbxw15b	AGTGAGTGGGGGCTTGGAGTCAGG-CTGAGCGTCTACACAGCTGC-AGCTTCTCCAGTC	743

PRL/Fbxw15	AAAGTCTTGAATGAGCTGTGGCCGCAATCCTGTGAAATCTTTGGCCAAAGCCTTTAAT	840
Fbxw15b	AAAGTCT--GATGAGCTGTGGTCCGCAATCCTGTGAAATCTTT--GGCCAAGTCTTTAAA	799
	***** *****	
PRL/Fbxw15	ATTCAGAGCCAGTCTGGGGGAGTGAAGAAAAG-----AAGG--	876

Fbxw15b	AT-CAGAGCAAGCTGGGGAGGAGAAAGAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCACTGAAGATG	858
	** ***** ** *** * ***** **	***
PRL/Fbxw15	-----AGT	879
Fbxw15b	GCGATCCATTTACCTTGTTCGCGATGATGAAAATCCTCTCTATCTGGATGCCTACAGT	918

PRL/Fbxw15	CT-----	881
Fbxw15b	TTGCTACAGGCTGCCCAAGTGAACAAGGACTGGAATGAACTTGCCAGCAGT	969

Figura 8. Comparación con *ClustalW2* de la construcción pRL/*Fbxw15* en sentido contra la secuencia teórica.

PRL/Fbxw15	GAGTCGCGAATCCCTATTTGGGAAAACGCCCAGCAGCGCATTTTTAACGGTCTTGACC	60
Fbxw15b	-----	
PRL/Fbxw15	TTTTGCTGACCTTTTGTTCACATGGCTCGACAGAATCTCTGCTGGTTCCTTGGGTTATT	120
Fbxw15b	--CTGCTG-----GGTTCCTTGGGTTATT	22
	*****	*****
PRL/Fbxw15	GTTTTACAGTACAAAGTATCACAGTTACTAAGGATCCAGGACATAAGCCCTACCTGTAGA	180
Fbxw15b	GTTTTACAGTACAAAGTATCACAGTTACTAAGGATCCAGGACATAAGCCCTACCTGTAGA	82

PRL/Fbxw15	TACACATGTGAAGGTAATTTAAGAATGAAAAATACATTCTGATTACTAGTTAGTACTATA	240
Fbxw15b	TACACATGTGAAGGTAATTTAAGAATGAAA-TACATTCTGATTACTAGTTAGTACTATA	141

PRL/Fbxw15	ATCATCATGAATACAATCAGCATGACTCTTTTACTCTTTTTTGAAACAAATTCTCATTC	300
Fbxw15b	ATCATCATGAATACAATCAGCATGACTCTTTTACTCTTTTTTGAAACAAATTCTCATTC	201

PRL/Fbxw15	TTTACCCTAGACTGGCCTGGAATTCATGTGCAGTACATGTAAGATATATGCAGGAGTGC	360
Fbxw15b	TTTACCCTAGACTGGCCTGGAATTCATGTGCAGTACATGTAAGATATATGCAGGAGTGC	261

PRL/Fbxw15	CTATGCCTGTGTATGTGCAGAGACCAGCAATAAACATCATGTGTCTCTTTAACTGCCACT	420
Fbxw15b	CTATGCCTGTGTATGTGCAGAGACCAGCAATAAACATCATGTGTCTCTTTAACTGCCACT	321

PRL/Fbxw15	TTCTACTAGAAAGCTGAGTATACAGCATATGATCTCAGAGGCTGTGCAGGCACAGAGAGG	480
Fbxw15b	TTCTACTAGAAAGCTGAGTATACAGCATATGATCTCAGAGGCTGTGCAGGCACAGAGAGG	381

PRL/Fbxw15	TGGGTCCTGCTGATCTAACTCAGTTCCTCAAGGTAGACATAAACATGAAACCAGAGTCCCT	540
Fbxw15b	TGGGTCCTGCTGATCTAACTCAGTTCCTCAAGGTAGACATAAACATGAAACCAGAGTCCCT	441

PRL/Fbxw15	TACACCAGTAATTTGCAGCAACCTAACTGGCTTCATAAAAAACAATTGAACCTGTTGAAA	600
Fbxw15b	TACACCAGTAATTTGCAGCAACCTAACTGGCTTCATAAAAAACAATTGAACCTGTTGAAA	501

PRL/Fbxw15	TTAGTGTGCTACTCAGAATTTTCTAGAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAG	660
Fbxw15b	TTAGTGTGCTACTCAGAATTTTCTAGAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAG	561

PRL/Fbxw15	CCCCAGATCATGTGCTTTTGGTCTCCACAGTGCCAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTAC	720
Fbxw15b	CCCCAGATCATGTGCTTTTGGTCTCCACAGTGCCAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTAC	621

PRL/Fbxw15	TCAGTGAAAATCACTGTGCAGTGAGTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTCTCTGG	780
Fbxw15b	TCAGTGAAAATCACTGTGCAGTGAGTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTCTCTGG	681

PRL/Fbxw15	TTCCAGTGAGTGGGGGCTTGGAGTCAGGCTGAGCGTCTACACAGCTGCAGCTTTCTCCAG	840
Fbxw15b	TTCCAGTGAGTGGGGGCTTGGAGTCAGGCTGAGCGTCTACACAGCTGCAGCTTTCTCCAG	741

PRL/Fbxw15	TCAAAGTCTGATGAGCTGTGGTCGGCAATCCTGTGAAATCTTTGACCAAGTCTTTAAAT	900
Fbxw15b	TCAAAGTCTGATGAGCTGTGGTCGGCAATCCTGTGAAATCTTTGGCCAAGTCTTTAAAT	801

PRL/Fbxw15	CAGAGCAAGCTGGGGAGGAGAAAGAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCAAGTCTTTAAAT	954
Fbxw15b	CAGAGCAAGCTGGGGAGGAGAAAGAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCA-CTGAAGATGGC	860

PRL/Fbxw15	-----	
Fbxw15b	GATCCATTTACCTTGTTTGCCGATGATGAAAATCCTCTCTATCTGGATGCCTACAGTTT	920

PRL/Fbxw15	---ACGGGTTG-----	962
Fbxw15b	GCTACAGGCTGCCAAGTGAACAAGGACTGGAATGAACTTGCCAGCAGT	969
	** ** *	

Figura 9. Comparación con *ClustalW2* de la construcción *pRL/Fbxw15AS* contra la secuencia teórica.

6.4. Evaluación de la expresión de *Fbxw15* mediante el ensayo de luciferasa.

La actividad transcripcional del promotor *Fbxw15* se evaluó de forma indirecta, al cuantificar el nivel de expresión del gen que codifica para la luciferasa de *Renilla reniformis*, contenido en el vector pRL-null. Para ello, células HEK-293 se co-transfectaron con el vector pRL/*Fbxw15* en sentido o antisentido, y el vector pGL3 CMV como control endógeno, que contiene el gen que codifica para la enzima luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* y el promotor del CitoMegalovirus (CMV) que genera un alto nivel de expresión. Como control positivo se utilizó el vector pRL CMV. Lo anterior se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Construcciones colocadas por pozo para el ensayo de luciferasas.

<p><i>pRL/Fbxw15</i> + pGL3 CMV</p>	<p><i>pRL/Fbxw15AS</i> + pGL3 CMV</p>	<p>pRL null + pGL3 basic</p>	<p>pRL CMV + pGL3 CMV</p>
---	---	--------------------------------------	-----------------------------------

Las lecturas de la luminiscencia mostraron que el fragmento correspondiente a la zona promotora de *Fbxw15* en sentido tiene una actividad 11 veces menor que la que presenta el vector *pRL/Fbxw15AS*. En la **Figura 10** se muestra la gráfica del porcentaje de la luminiscencia proveniente de las luciferasas de *Renilla reniformis* del vector pGL3 CMV y *Photinus pyralis* generada por la actividad transcripcional del promotor *Fbxw15* en sentido y antisentido y de los vectores pRL CMV y pRL null. Observamos en la **Figura 10a** el porcentaje de la actividad promotora del fragmento correspondiente a *Fbxw15* en su secuencia sentido (5.53 %), contra su control endógeno pGL3 CMV (100%). en la **Figura 10b** el porcentaje de la actividad promotora de *Fbxw15AS* (61.33%), contra su control endógeno pGL3 CMV (100%). En la **Figura 10c** el porcentaje de la actividad promotora de pRL CMV (154.43%), contra su control endógeno pGL3 CMV (100%). Por ultimo en la **Figura 10d** el porcentaje de la actividad de pRL null (0.379%), contra su control endógeno pGL3 CMV (100%). Cada ensayo se realizó por triplicado.

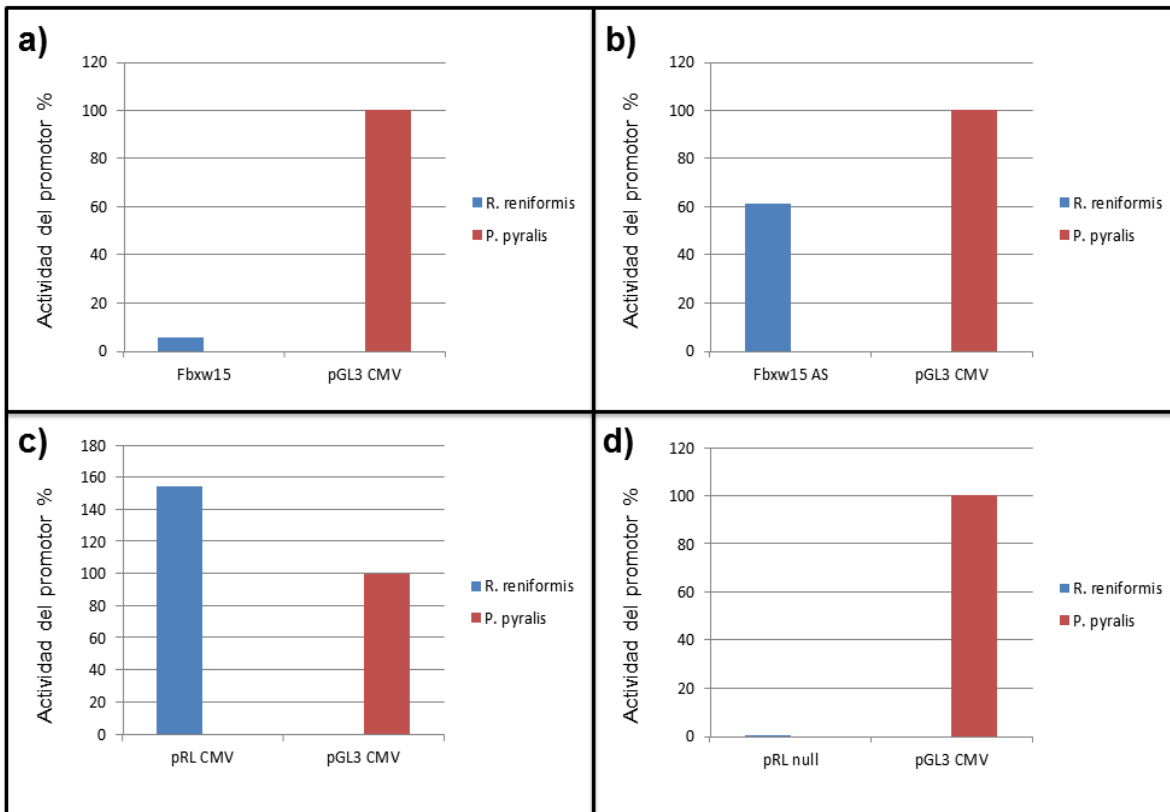


Figura 10. Representación gráfica de la cuantificación de la luminiscencia proveniente de las luciferasas de *Renilla reniformis* generada por la actividad transcripcional del promotor *Fbxw15* en sentido y antisentido y de *Photinus pyralis* generada por la actividad transcripcional del promotor del CMV contenido en el vector pGL3CMV, así como la actividad de los controles positivo pRL CMV y negativo pRL null.

6.5. Sitio de inicio de la transcripción.

Para confirmar que el sitio de inicio de la transcripción se encuentra dentro de la región promotora predicha por el análisis bioinformático, se empleó la técnica de amplificación rápida de extremos de ADN complementario (RACE 5' PCR). Se llevaron a cabo las reacciones de amplificación, siguiendo el protocolo descrito en el manual del kit First Choice RLM-RACE kit (Ambion, Applied Biosystems). El producto de la segunda amplificación se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8%. En la figura 11, se observa una banda de aproximadamente 200

pares de bases, cuyo tamaño coincide con el número de bases que abarca el fragmento comprendido entre el oligonucleótido específico en antisentido en las posiciones 146 a 127 y el adaptador externo ligado al sitio de inicio de la transcripción identificado por el análisis bioinformático. Una vez purificado, este fragmento se clonó en el vector de tránsito pJET1.2/Blunt para analizar la secuencia del mismo, empleando un secuenciador automático.

El análisis del electrograma mostró que el sitio de inicio de la transcripción se localiza 33 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. Lo anterior coincide con el sitio teórico indicado por el programa Matinspector.

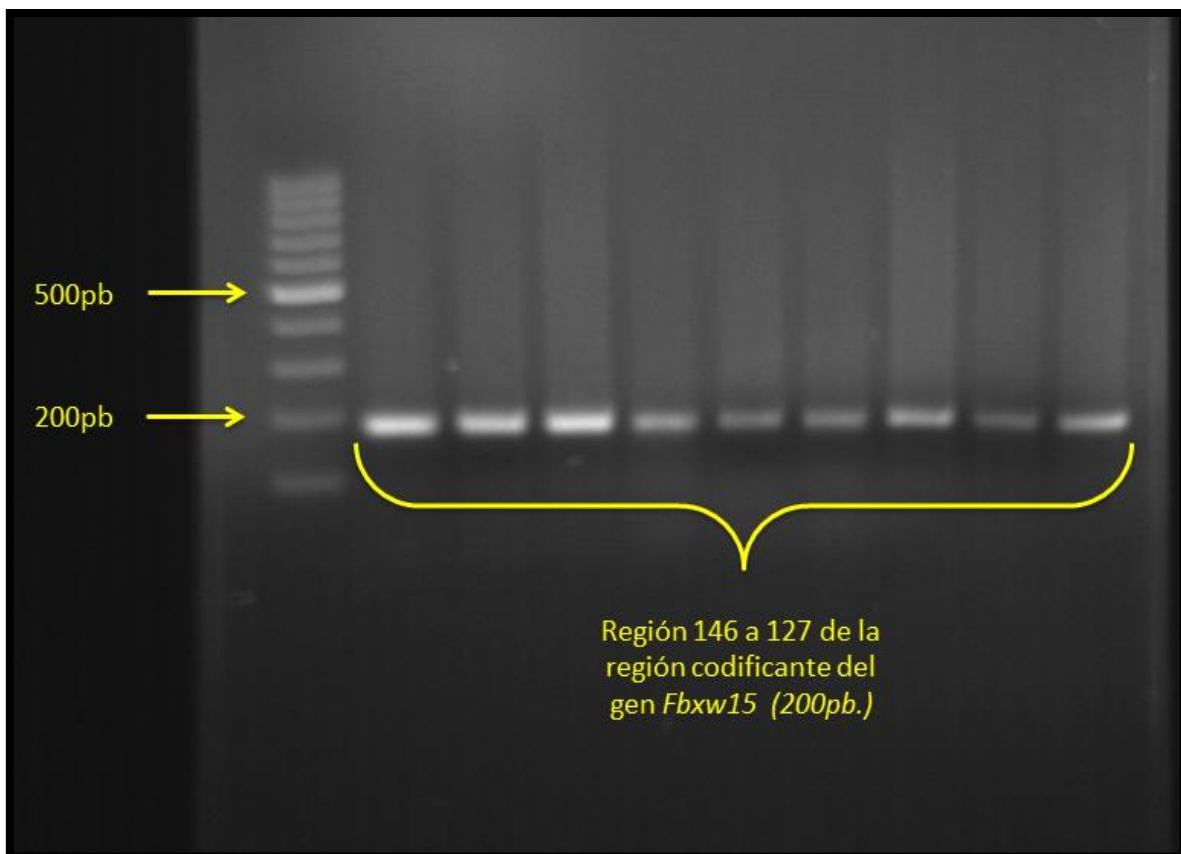


Figura 11. Electroforesis del producto de la segunda RACE-PCR, se observa una banda del tamaño esperado (200 pb aproximadamente). Reacción por triplicado.

7. Discusión.

En el presente estudio se determinó la región que conforme al análisis *in silico*, comprende el promotor del gen *Fbxw15*, cuyo ARNm se identificó a partir de un ensayo de microarreglos de ADN complementario, que se llevó a cabo para identificar en el ovario murino, genes con expresión diferencial durante el ensamble y crecimiento folicular independiente del estímulo gonadotrópico. *Fbxw15* es un gen ovocito específico que presenta una expresión bifásica. Esto es, el ARNm se expresa en niveles elevados durante el décimo octavo día gestacional, disminuyendo drásticamente al día siguiente, hasta incrementarse de nuevo a partir de los primeros dos días de vida, momento en que la expresión de *Fbxw15* aumenta de nuevo, coincidiendo con el ensamble y el crecimiento folicular temprano (25). El transcrito codifica para una proteína con caja F. Las proteínas con caja F participan en procesos proteolíticos mediante ubiquitinación. Estos se llevan a cabo gracias a un conjunto de proteínas que conforman el proteosoma 26s, el cual reconoce un substrato previamente unido al complejo ubiquitina-ligasa E3, conformado por cuatro proteínas: SKP1, Cul1, Rbx1/Roc1 y una proteína con caja F; esta última reconoce específicamente a la proteína destinada a degradación (35). A su vez, este complejo se une a otras dos enzimas, la primera denominada E1, la cual activa de manera ATP dependiente a la ubiquitina al unirse con esta última por medio de un enlace tio-éster entre el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y una cisteína presente en el sitio activo de la enzima. Posteriormente, la ubiquitina se enlaza con la enzima que la conjuga (E2). Este

enlace ocasiona la transferencia de la ubiquitina hacia el complejo E3 en donde se une al sustrato por medio de un enlace isopeptídico entre el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y residuos de lisina presentes en la proteína que sufrirá proteólisis (36). Usualmente, el proceso proteolítico involucra el enlace de cincuenta ó más moléculas de ubiquitina con el sustrato (37).

En diversos estudios se mostraron que la participación del complejo SCF en la regulación por proteólisis tanto del ciclo celular, como de la transducción de señales (39). Más aún, Zou y colaboradores (2013), demostró que *Fbxw15*, participa en la degradación de la proteína HBO1, la cual permite la replicación del ADN y la proliferación celular; por lo tanto, es probable que la actividad transcripcional del promotor *Fbxw15*, ocurra durante las etapas perinatales en que se requiere dicha replicación del ADN (40).

El fragmento de 945 pb que comprende el promotor teórico se subclonó en un vector reportero. Contrario a lo que se esperaba, la actividad transcripcional que mostró el vector que contenía la secuencia del promotor en sentido, fue baja (5.53 %) en comparación a la que presentó el control endógeno pGL3/CMV (100%). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que para analizar la actividad transcripcional de *Fbxw15*, se utilizaron células de una estirpe diferente a la que naturalmente expresa el gen correspondiente (HEK 293). Por lo tanto, podemos especular que la baja actividad transcripcional del promotor *Fbxw15*, se debe a que la maquinaria transcripcional presente en las células de riñón de embrión humano (HEK 293), no es la adecuada para activar el promotor de un gen ovocito-específico identificado

en murinos. Para dilucidar lo anterior, se requiere utilizar una línea celular derivada de ovario murino, preferentemente, lo cual se llevará a cabo en un futuro próximo.

Por otra parte sorprendentemente la construcción pRL/*Fbxw15* que contenía la secuencia de *Fbxw15* en antisentido y que se utilizó como un control negativo, mostró una actividad promotora superior (61.33%) a la construcción que contiene la región del promotor en sentido, lo cual sugiere que el promotor de *Fbxw15* actúa como un promotor bidireccional, el cual podría regular a un transcrito natural antisentido (NAT), localizado en antisentido adyacente al gen *Fbxw15*. Al respecto, los NAT son transcritos de la cadena de ADN en antisentido involucrados en el control de la expresión de genes en eucariontes. Los NATs generalmente son ARNs no codificantes (41). Estos ARNs no codificantes podrían estar implicados en la regulación transcripcional en *cis* o en *trans* de genes vecinos o de *loci* diferentes (42).

Por otro lado, inicialmente y por azar se subclonó en el vector reportero, la secuencia correspondiente al gen *Fbxw24* el cual comparte una homología del 87% con el gen *Fbxw15*. La construcción de pRL/*Fbxw24* mostró mayor actividad promotora que *Fbxw15* pero menor que *Fbxw15AS*. El gen *Fbxw24* al igual que el *Fbxw15* está localizado en el cromosoma 9 F2 (Figura 12), este gen se expresa específicamente en tejido ovárico humano y su proteína correspondiente en ovocitos (43).

Estudios metagenómicos en los que se analizó el perfil de expresión del ADNc tanto de cigotos como de embriones murinos en etapas previas a la implantación,

demonstraron la existencia de cohortes de genes con patrones de expresión similares, lo que sugiere que estos genes presentan una función coordinada en etapas específicas del desarrollo (44). La sincronía en la regulación hacia arriba de varios genes específicos de las células germinales de ovarios procedentes de ratones neonatales, confirma lo anterior (45) y conlleva a la hipótesis de que la localización del gen *Fbxw15*, en un locus conformado por varias secuencias con un alto grado de homología entre ellas, constituye un aspecto relevante para el desarrollo folicular temprano en el ovario murino. Más aún, estudios por hibridación *in situ* demostraron que dos de los genes (*Fbxo12B* y *Fbxo12D*), presentes en el locus del cromosoma 9 F2, se expresan selectivamente en los ovocitos de los folículos primordiales (46).

Se ha hipotetizado que la agrupación en un locus específico de genes con un alto grado de homología, es consecuencia de la duplicación de un gen ancestral (47), por lo que es posible que la actividad transcripcional de los genes que conforman dicho locus, ocurra gracias a los mismos elementos reguladores *en cis*. El locus 9 F2 se localiza en la región subtelomérica del cromosoma, regiones genómicas que se caracterizan por contener secuencias con un alto índice evolutivo (48). Como tal, cada uno de los genes presentes en el locus 9 F2 podría desempeñar una función específica, pero a la vez complementaria y redundante dentro del ovario murino, propiciando así el correcto desarrollo del mismo.

Es importante mencionar el hecho de que en el análisis *in silico* se identificaron regiones de reconocimiento a factores de transcripción tales como: OCT-1,

HOXA3, WT1, que son esenciales en el desarrollo y mantenimiento del folículo y nos permite sugerir que podrían regular al gen *Fbxw15*.

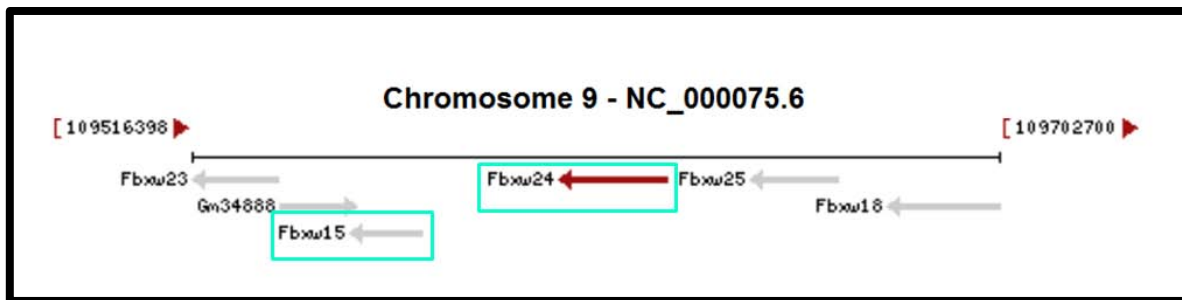


Figura 12. Localización de los genes *Fbxw15* y *Fbxw24* en el cromosoma 9. Mapa disponible en línea en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/382106>.

8. Conclusiones.

- Se identificó la región promotora del gen *Fbxw15* y del gen homólogo *Fbxw24*.
- Se clonó satisfactoriamente la región predicha en el análisis *in silico* en un vector de expresión
- La secuencia en antisentido de la región promotora del gen *Fbxw15* poseé una mayor actividad transcripcional que la correspondiente a la secuencia del gen en sentido.

9. Perspectivas.

De los resultados obtenidos en este estudio surgen varias interrogantes, algunas de las cuales se plantean a continuación.

¿Cuál es la función de la secuencia en antisentido de la región promotora del gen *Fbxw15* en el proceso de la foliculogénesis?

¿Cómo son las interacciones que se establecen entre la región en sentido de la región promotora del gen *Fbxw15* con diferentes factores de transcripción que participan en el desarrollo folicular ovárico?

10. Bibliografía.

1. Grumbach M.M., Conte F.A. Disorders of sex differentiation. En: Watson JD, Foster DW (eds). Williams Textbook of Endocrinology. WB Saunders, Filadelfia, EUA, 1992: 853.
2. Wassarman P.M., Albertini D.F. The mammalian ovum. En: Knobil E, Neill JD. (eds). The Physiology of Reproduction. 2^a ed. Raven Press, EUA, 1994: 79-122.
3. Schlessinger D., Garcia-Ortiz J.E., Forabosco A., Uda M., Crisponi L., Pelosi E. Determination and Stability of Gonadal Sex. Journal of Andrology. Vol. 31 (1). 2010: 16–25.
4. Guigon C.J., Magre S. Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary. Biology of Reproduction. Vol. 74 (3). 2005: 450–458.
5. Edson M.A., Nagaraja A.K., Matzuk M.M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. Endocrine Reviews. Vol. 30 (6). 2009: 624-712.
6. Fortune J.E. The Early Stages Of Follicular Development: Activation Of Primordial Follicles And Growth Of Preantral Follicles. Animal Reproduction Science. Vol.78 (3-4). 2003: 135-163.
7. Oktem O., Urman B. Understanding Follicle Growth In Vivo. Human Reproduction. Vol. 25 (12). 2010: 2944-2954.
8. Bonnet A., Cabau C., Bouchez O., Sarry J., Marsaud N., Foissac S., Woloszyn F., Mulsant P., Mandon-Pepin B. An Overview Of Gene Expression Dynamics During Early Ovarian Folliculogenesis: Specificity Of Follicular Compartments And Bi-Directional Dialog. Genomics. Vol. 14. 2013:904-923.

9. Kezele P., Nilsson E., Skinner M.K. Cell-Cell Interactions In Primordial Follicle Assembly And Development. *Frontiers in Bioscience*. Vol. 7. 2002:1990-1996.
10. Joshi S., Davies H., Sims L., Levy S.E., Dean J. Ovarian Gene Expression In The Absence Of FIGLA, An Oocyte-Specific Transcription Factor. *BMC Developmental Biology*. Vol 7. 2007:67.
11. Soyol S.M., Amleh A., Dean J. Fig α , A Germ Cell-Specific Transcription Factor Required For Ovarian Follicle Formation. *Development* Vol. 127. 2000: 4645-4654.
12. Epifano O., Jurrien D. Genetic Control Of Early Folliculogenesis In Mice .*TRENDS In Endocrinology & Metabolism*. Elsevier Science Ltd. Vol. 13. No. 4. 2002: 169-173.
13. Boyer A., Lapointe E., Zheng X., Cowan R.G., Li H., Quirk S.M., DeMayo F.J., Richards J.S., Boerboom D. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *The FASEB Journal*. Vol. 24. 2010: 3010-3025.
14. Bouilly J., Bachelot A., Broutin I., Touraine P., Binart N. Novel NOBOX Loss-of-Function Mutations Account for 6.2%of Cases in a Large Primary Ovarian Insufficiency Cohort. *Human Mutation*, Vol. 32 (10). 2011: 1108–1113.
15. Lechowska A., Bilinski S., Choi Y., Shin Y., Kloc M., Rajkovic A. Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Vol 28. 2011: 583–589.
16. Tripurani S.K., Kyung-Bon L., Wang L., Wee G., Smith G.W., Lee Y.S., Latham K.E., Yao J. A Novel Functional Role for the Oocyte-Specific Transcription Factor Newborn Ovary Homeobox (NOBOX) during Early Embryonic Development in Cattle. *Endocrinology*. Vol. 152 (3). 2011: 1013-1023.
17. Eun-Jin L., Choi Y. Transcription Factors In The Maintenance And Survival Of Primordial Follicles. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. Vol. 39 (4). 2012: 127-131.

18. Belli M., Cimadomo D., Merico V., Redi C.A., Garagna S., Zuccotti M. The NOBOX Protein Becomes Undetectable In Developmentally Competent Antral And Ovulated Oocytes. *The International Journal of Developmental Biology*. Vol. 57. 2013: 35-39.
19. McNatty K.P., Moore L.G., Hudson NL, Quirke L.D., Lawrence S.B., Reader K., Hanrahan J.P., Smith P., Groome N.P., Laitinen M., Ritvos O., Juengel J.L. The Oocyte And Its Role In Regulating Ovulation Rate: A New Paradigm In Reproductive Biology. *Reproduction*. Vol. 128. 2004: 379–386.
20. Hosoe M., Kaneyama K., Ushizawa K., Hayashi K., Takahashi T. Quantitative Analysis Of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) And Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) Gene Expression In Calf And Adult Bovine Ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Vol. 9. 2011: 33.
21. Kathirvel M., Soundian E., Kumanan V. Differential Expression Dynamics Of Growth Differentiation Factor9 (GDF9) And Bone Morphogenetic Factor15 (BMP15) Mrna Transcripts During In Vitro Maturation Of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cumulus–Oocyte Complexes. *SpringerPlus*. Vol. 2. 2013: 206.
22. Otsuka F., McTavish K., Shimasaki S. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol Reprod Dev*. Vol. 78(1). 2011: 9–21.
23. Trombly D.J., Woodruff T.K., Mayo K.E. Roles for Transforming Growth Factor Beta Superfamily Proteins in Early Folliculogenesis. *Seminars in Reproductive Medicine*. Vol. 27(1). 2009: 14–23.
24. Pangas S.A. Bone Morphogenetic Protein Signaling Transcription Factor (SMAD) Function In Granulosa Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 356(1-2). 2012: 40–47.
25. De La Chesnaye E., Bredford K, Paredes A., Merchant-Larios H., Méndez J.P., Ojeda S.R. Fbxw15/Fbxo12J Is an F-Box Protein-Encoding Gene Selectively Expressed in Oocytes of the Mouse Ovary. *Biology Of Reproduction*. Vol. 78. 2008: 714–725.
26. Kipreos E.T., Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biology*. Vol. 1. (1). 2000.

27. Markholt S., Grondahl M.L., Ernsts E.H., Yding Andersen C., Ernst E., Lykke-Hartmann k. Global Gene Analysis Of Oocytes From Early Stages In Human Folliculogenesis Shows High Expression Of Novel Genes In Reproduction. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 18 (2). 2012: 96-110.
28. Yoshimizu T., Sugiyama N., De Felice M., Yeom Y., Ohbo K., Masuko K., Obinata M., Abe K., Schöler H.R., Matsui Y. Germline-Specific Expression Of The Oct-4/green Fluorescent Protein (GFP) Transgene In Mice. *Development, Growth and Differentiation*. Vol. 41. 1999: 675-684.
29. Paul P., Bridoux L., Hazy R.R., Donnay I. HOX Genes Are Expressed in Bovine and Mouse Oocytes and Early Embryos. *Molecular Reproduction and Development*. Vol. 78. 2011: 436-449.
30. Huntriss J., Hinkins M., Picton H.M. cDNA Cloning And Expression Of The Human NOBOX Gene In Oocytes And Ovarian Follicles. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 12 (5). 2006: 283-289.
31. Gendronneau G., Boucherat O., Aubin J., Lemieux M., Jeannotte L. The Loss of Hoxa5 Function Causes Estrous Acyclicity and Ovarian Epithelial Inclusion Cysts. *Endocrinology*. Vol. 153. 2012: 1484-1497.
32. Pelletier J., Schalling M., Buckler A. J., Rogers A., Haber D.A., Housman D. Expression Of The Wilms' Tumor Gene WT1 In The Murine Urogenital System. *Genes and Development* Vol. 5. 1991:1345-1356.
33. Makrigiannakis A., Amin K., Coukos G., Tilly J.L., Coutifaris C. Regulated Expression and Potential Roles of p53 and Wilms' Tumor Suppressor Gene (WT1) during Follicular Development in the Human Ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 85 (1). 2000: 449-459.
34. Teo A.K., Tsuneyoshi N., Hoon S., Tan E.K., Stanton L.W., Wright C., Dunn R. PDX1 Binds and Represses Hepatic Genes to Ensure Robust Pancreatic Commitment in Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*. Vol. 4. 2015: 578-590.
35. Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System. *The Annual Review of Biochemistry* Vol 67. 1998: 425-479.

36. Wu G, Xu G, Schulman B.A., Jeffrey P.D., Harper J.W., Pavletich N.P. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-Catenin Complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF (beta-TrCP1) Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*. Vol. 11. 2003: 1445-1456.
37. Skowyra D., Craig K.L., Tyers M., Elledge S.J., Harper J.W. F-Box Proteins are Receptors that recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell*. Vol. 91. 1997: 209-219.
38. Craig KL, Tyers M. The F-box: A New Motif For Ubiquitin Dependent Proteolysis In Cell Cycle Regulation And Signal Transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Vol. 72. 1999: 299-328.
39. Zou C., Chen Y., Smith R.M., Snavely C., Li J., Coon T.A., Chen B.B., Zhao Y., Mallampalli R.K. SCFFbxw15 Mediates Histone Acetyltransferase Binding to Origin Recognition Complex (HBO1) Ubiquitin-Proteasomal Degradation to Regulate Cell Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 288. 2013:6306-6316.
40. Chiba M. Differential Expression Of Natural Antisense Transcripts During Liver Development In Embryonic Mice. *Biomedical Reports*. Vol. 2. 2014: 918-922.
41. Villegas V.E., Zaphiropoulos P.G. Neighboring Gene Regulation by Antisense Long Non-Coding RNAs. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 16. 2015: 3251-3266.
42. He W., Yang L.H., Sun L.L., Xiang Y.L., Long L., Wu Y.Z. Screening And Identification Of A Novel Ovarian Specific Protein In Mouse .*Chinese Medical Journal*. Vol. 90 (37). 2010: 2643-2646.
43. Ko M.S., Kitchen J.R., Wang X., et al. Large-scale cDNA Analysis Reveals Phased Gene Expression Patterns During Preimplantation Mouse Development. *Development*. Vol.127. 2000: 1737-1749.
44. Herrera L., Ottolenghi C., Garcia-Ortiz J.E., Pellegrini M., Manini F., Ko M.S., Nagaraja R., Forabosco A., Schlessinger D. Mouse Ovary Developmental RNA And Protein Markers From Gene Expresión Profiling. *Developmental Biology*. Vol. 279. 2005: 271-290.

45. Paillisson A., Dadé S., Callebaut I., Bontoux M., Dalbiès-Tran R., Vaiman D., Monget P. Identification, Characterization And Metagenome Analysis Of Oocyte-Specific Genes Organized In Clusters In The Mouse Genome. *BMC Genomics*. Vol. 6. 2005: 76-86.
46. Ohno S. Gene Duplication And The Uniqueness Of Vertebrate Genomes Circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol*. Vol. 10. 1999: 517-522.
47. Der-Sarkissian H., Vergnaud G., Borde Y.M., Thomas G., Londoño-Vallejo J.A. Segmental Polymorphisms In The Proterminal Regions Of A Subset Of Human Chromosomes. *Genome Research*. Vol. 12. 2002: 1673-1678.