

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Caracterización del promotor antisentido del gen *CACNG2*”

TESIS

Que presenta

Q.F.B. David Muñoz Herrera

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de Biología Celular

Director de tesis

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Ciudad de México

Agosto, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) y al departamento de Biología Celular por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría. Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico brindado a través la beca académica que me otorgó para realizar mis estudios.

De igual forma expreso mi gratitud a mi director de tesis el Dr. Ricardo Félix por la confianza puesta en mí, al aceptar que formara parte de su equipo de trabajo y apoyarme para la realización de mi tesis de Maestría. A mis asesores el Dr. Manuel Hernández y la Dra. Norma Oviedo por su buena disposición, sugerencias y comentarios respecto al trabajo. Asimismo, quisiera manifestar un agradecimiento especial al Dr. Ricardo González por toda la ayuda y consejos durante la fase experimental del proyecto.

Agradezco a los doctores Aida Calderón y Natanael Zarco, por realizar los experimentos que son la base de esta investigación. A la bióloga Mercedes Urbán por su ayuda con los cultivos celulares y al Ing. Hugo Cadena por el apoyo técnico. A mis compañeras y amigas de laboratorio Paz Durán y Alejandra Corzo por hacer más agradable el tiempo que pasé en el laboratorio. Agradezco además a mis compañeros de generación Karem Rodríguez, Sheila Ribalta, Kerlys Correoso, Landy Zambrano, Nicté Ramos, Carlos Egusquiza y Jorge del Río por su amistad.

Pero sobre todo muchas gracias a mis padres Antonia Herrera y José Paz Muñoz por su apoyo incondicional. Y a mis hermanos María Fernanda y José Paz Muñoz Herrera por siempre desearme lo mejor.

CONTENIDO

PREFACIO	3
RESUMEN	4
<i>ABSTRACT</i>	6
INTRODUCCIÓN	8
Canales de calcio dependientes de voltaje (Ca _v)	8
Clasificación de los canales Ca _v	9
Subunidades de los canales Ca _v	12
Subunidad Ca _v γ: clasificación y estructura	14
La subunidad Ca _v γ ₂	17
La subunidad Ca _v γ ₂ como parte de los canales de Ca ²⁺ neuronales	17
La subunidad Ca _v γ ₂ como parte de los receptores AMPA	19
Posible papel de la subunidad Ca _v γ ₂ en la adhesión celular	21
La mutación de <i>stargazer</i>	22
El gen <i>CACNG2</i> y su región promotora	23
Características y funciones generales de los lncRNAs	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Análisis bioinformático	32

Construcción de plásmidos reporteros	33
Secuenciación automática de las construcciones	39
Ensayos de bioluminiscencia	41
Cultivo celular y transfección transitoria	42
Ensayos de actividad del promotor	44
<i>Western blot</i> semicuantitativo	46
Análisis estadístico	47
RESULTADOS	48
Características del promotor del lncRNA	48
Clonación y análisis del promotor del gen que codifica para el lncRNA	51
Caracterización <i>in silico</i> de la secuencia del lncRNA	60
Efecto del lncRNA sobre la expresión de la subunidad Cav γ ₂	62
DISCUSIÓN	64
Hallazgos principales	65
Perspectivas	68
REFERENCIAS	69

PREFACIO

La subunidad auxiliar $Cav\gamma_2$ de los canales de calcio dependientes de voltaje es una proteína transmembranal, expresada principalmente en la membrana postsináptica de diversos tejidos neuronales en donde regula el tráfico, direccionamiento y apertura de los receptores AMPA. En menor medida se expresa en la membrana presináptica, sitio en el que actúa como inhibidor de las corrientes de calcio a través de los canales de alto umbral de activación y por lo tanto de la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica. La alteración en la expresión de $Cav\gamma_2$ resulta en el desarrollo de distintos padecimientos neurológicos como la epilepsia. Pese a la importancia de esta proteína en el sistema nervioso, no existen estudios respecto a su regulación transcripcional.

La finalidad del presente trabajo de tesis es reportar las primeras evidencias experimentales de la identificación y caracterización de la región promotora del gen *CACNG2* que codifica para $Cav\gamma_2$. La estrategia experimental combinó técnicas de biología molecular con métodos bioinformáticos. Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio 55 del Departamento de Biología Celular (DBC) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), bajo la dirección del doctor Ricardo Félix Grijalva profesor titular del DBC y el plan experimental se desarrolló con la asesoría de los doctores Ricardo González Ramírez investigador en Ciencias Médicas del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", José Manuel Hernández Hernández profesor titular del DCB del Cinvestav-IPN y Norma Angélica Oviedo de Anda investigadora asociada a la Unidad de Investigación en Infectología e Inmunología del Centro Médico Nacional "La Raza", del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

RESUMEN

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) son complejos proteicos que permiten el paso de iones Ca^{2+} al interior de la célula que actúan como un segundo mensajero en la regulación de diversos eventos fisiológicos. Los canales de alto umbral de activación (HVA) están formados la subunidad principal conductora de iones ($Ca_v\alpha_1$) y tres subunidades auxiliares ($Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ y $Ca_v\gamma$).

El énfasis del presente trabajo recae en una de las subunidades auxiliares, $Ca_v\gamma_2$, también conocida como *stargazin*. Esta proteína está presente en la membrana presináptica, donde inhibe a los canales Ca_v . Sin embargo, se sabe que $Ca_v\gamma_2$ se expresa principalmente en la membrana postsináptica de las células de Purkinje en donde controla el direccionamiento de los receptores AMPA hacia la membrana y aumenta las corrientes iónicas a través de estos canales. Como puede anticiparse por su localización y función, las alteraciones en la expresión de la subunidad $Ca_v\gamma_2$ dan lugar al desarrollo de diversos trastornos neurológicos entre los que destaca la epilepsia.

A pesar de la importancia de la subunidad $Ca_v\gamma_2$ en el funcionamiento del sistema nervioso, no hay estudios de su regulación a nivel transcripcional. Con anterioridad en nuestro laboratorio se demostró que el promotor del gen *CACNG2*, que codifica a la subunidad $Ca_v\gamma_2$, puede dirigir la actividad transcripcional de manera bidireccional. En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización inicial del promotor del gen *CACNG2* en antisentido. Un análisis bioinformático inicial señala que en dirección antisentido, el promotor podría regular la transcripción de un ARN largo no codificante (*long non-coding RNA* o *lncRNA*), cuya secuencia es capaz de formar estructuras secundarias estables y posiblemente aumentar la expresión de $Ca_v\gamma_2$. La

región promotora del posible lncRNA tiene ~1.3 kb, y aquí se muestra evidencia que posee dos posibles sitios de inicio de la transcripción (*transcription start site(s)*, TSS) y una caja TATA que regulan su transcripción. Existe además la posibilidad de que pudiera presentar un tercer TSS funcional.

Este trabajo es el primero en caracterizar la región promotora del gen *CACNG2* y sentará las bases para comprender los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de la subunidad $Ca_v\gamma_2$.

ABSTRACT

Voltage-gated calcium (Ca_v) channels are protein complexes that allow Ca^{2+} entry into cells, where act as a second messenger in the regulation of diverse physiological events. High voltage-activated (HVA) calcium channels are formed of a main ion conducting subunit ($\text{Ca}_v\alpha_1$) and three auxiliary subunits ($\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ y $\text{Ca}_v\gamma$).

The emphasis of this work centers on one of the auxiliary subunits, $\text{Ca}_v\gamma_2$, also known as stargazin. This protein is expressed in the presynaptic membrane, where it inhibits Ca_v channel activity. However, it is known that $\text{Ca}_v\gamma_2$ is mainly expressed at the postsynaptic membrane of Purkinje cells where it controls the targeting of the AMPA receptors towards the plasma membrane and increases the ionic currents through these channels. As can be anticipated from its location and function, alterations in the expression of the $\text{Ca}_v\gamma_2$ subunit give rise to various neurological disorders including epilepsy.

Despite the relevance of the $\text{Ca}_v\gamma_2$ subunit in the functioning of the nervous system, its regulation at the transcriptional level is unknown. Previously in our laboratory it was found that the promoter of the *CACNG2* gene, which codes for the $\text{Ca}_v\gamma_2$ subunit, can direct transcriptional activity both in sense and antisense directions. In the present work, we present the results obtained from the initial characterization of the promoter of the *CACNG2* gene in antisense. An initial bioinformatic analysis indicates that in the antisense direction, the promoter could regulate the transcription of a long non-coding RNA (lncRNA), whose sequence is able to form stable secondary structures and possibly increases the expression of $\text{Ca}_v\gamma_2$. The promoter region of this lncRNA is ~1.3 kb, has two

possible transcription start site(s), TSS, and a TATA box that regulate its transcription. However, it is possible that a third functional TSS could be present.

This work is the first to characterize the promoter region of the *CACNG2* gene and will provide insight to understand the transcriptional mechanisms that regulate the expression of the Ca γ ₂ subunit.

INTRODUCCIÓN

Canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)

Todas las células animales se encuentran delimitadas por una membrana impermeable que sólo permite el paso de moléculas con ciertas características. Los acarreadores y canales son estructuras proteicas de la membrana celular que permiten el intercambio de átomos y moléculas entre los medios extracelular e intracelular. Gracias a proteínas acarreadoras, como la ATPasa Na^+/K^+ , es posible el transporte de iones en contra de gradientes de concentración, lo que involucra el consumo de energía. Por otro lado, los canales son poros que se abren permitiendo el transporte pasivo de iones a favor de su gradiente electroquímico. La apertura de un canal se realiza por tres mecanismos generales, i) la unión específica de un ligando directamente al canal o a una proteína de membrana acoplada al canal, ii) por estímulos físicos como la temperatura o el estiramiento de la membrana celular, o iii) por cambios en el voltaje de la membrana plasmática (Lacinova, 2005).

En particular, los canales Cav son proteínas transmembranales presentes en las células excitables (Hille, 2001) y en menor medida en las no excitables (Cahalan *et al.*, 2001; Darszon *et al.*, 2005). Estos canales se abren en respuesta a un potencial de acción que da como resultado final la despolarización de la membrana, permitiendo la entrada del ion calcio (Ca^{2+}) al interior de las células (Lacinova, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013). Una vez en el medio intracelular, el Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero que desencadena una gran cantidad de procesos biológicos como la liberación de hormonas y

neurotransmisores, la contracción muscular, y la regulación de la expresión genética, entre muchos otros (Lacinova, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013).

Clasificación de los canales Ca_v

La sensibilidad al voltaje es un parámetro usado para clasificar a los canales Ca_v en dos familias. Aquellos que se abren a voltajes $\leq -40\text{mV}$ se denominan canales de bajo umbral de activación (LVA, del inglés *Low Voltage-Activated*), mientras que los que necesitan voltajes más despolarizantes ($> -40\text{mV}$) para su apertura, se conocen como canales de alto umbral de activación (HVA, *High Voltage-Activated*; Lacinova, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013).

Los canales LVA se han caracterizado en una gran variedad de tipos celulares. Están formados por una subunidad principal $Ca_v\alpha_1$ (Tabla 1), la cual forma al poro transmembranal conductor de los iones de Ca^{2+} . Entre las propiedades electrofisiológicas más sobresalientes de estos canales se encuentran una activación a potenciales de acción relativamente más negativos, una conductancia pequeña y una inactivación rápida, lo que da origen a corrientes transitorias, razón por la que se les conoce también como canales tipo T (del inglés *Transient*; Lacinova, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013; Gandini *et al.*, 2014).

Por otro lado, los canales HVA son complejos proteicos que comprenden 4 subunidades: $Ca_v\alpha_1$, $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ y $Ca_v\gamma$ (Fig. 1; Felix *et al.*, 2013; Dolphin, 2016). Existen diferentes subunidades $Ca_v\alpha_1$ con perfiles funcionales y farmacológicos diversos, lo que permite clasificar a los canales de acuerdo con el tipo de corriente al que dan origen en L, N, P/Q o R. El resto de proteínas o subunidades se consideran auxiliares, ya que regulan

la actividad y la expresión membranal de la subunidad conductora de iones $\text{Ca}_v\alpha_1$ (Lacinova, 2005; Felix *et al.*, 2013; Dolphin, 2016). Aunque no todas las subunidades auxiliares están en la totalidad de los canales HVA (Lacinová, 2005).

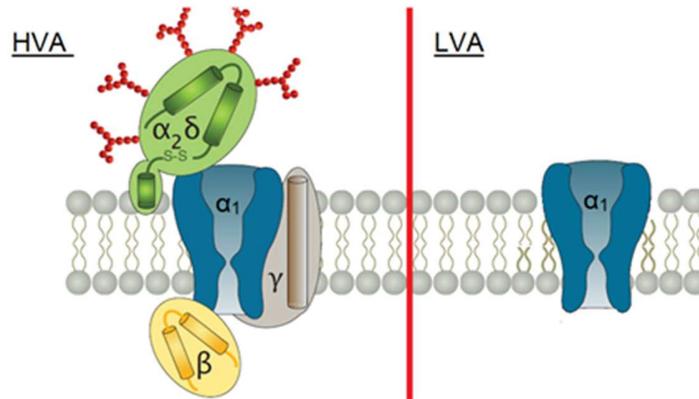


Figura 1. Subunidades de los canales Ca_v . De acuerdo con su sensibilidad al voltaje, los canales Ca_v se clasifican en HVA y LVA. El poro conductor por el cual el Ca^{2+} entra al medio intracelular, está formado por la subunidad formadora del poro $\text{Ca}_v\alpha_1$ presente en ambos tipos de canales. Adicionalmente, los canales HVA están constituidos por las subunidades auxiliares ($\text{Ca}_v\alpha_2\delta$, $\text{Ca}_v\beta$ y $\text{Ca}_v\gamma$) capaces de alterar la expresión funcional de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ (modificado de Weiss & Zamponi, 2017).

Además de ser clasificados como HVA y LVA, los canales Ca_v se subdividen por el tipo de corriente observada en los registros electrofisiológicos. La subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ varía en cada tipo de canal, lo cual le confiere propiedades diferenciales de localización tisular y susceptibilidad a fármacos y toxinas que modifican su actividad (Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013; Gandini *et al.*, 2014). Los canales Ca_v de alto umbral de activación (HVA) se dividen en dos subfamilias, una llamada tipo L que agrupa cuatro miembros, y otra que engloba a los canales de los tipos N, P/Q y R (Tabla 1).

Canal	Familia	Corriente	Subunidad α_1	Localización	Inhibidor específico
Cav1.1	HVA	Tipo L	α_{1S}	Músculo esquelético	Dihidroxipiridinas (DHPs)
Cav1.2			α_{1C}	Músculo cardiaco y pulmón	DHPs
Cav1.3			α_{1D}	Neuronas, oído interno, islotes pancreáticos, m. liso y cardiaco	DHPs
Cav1.4			α_{1F}	Retina	DHPs
Cav2.1		Tipo P/Q	α_{1A}	Tejido nervioso	ω -Agatoxina IVA
Cav2.2		Tipo N	α_{1B}	Terminales nerviosas	ω -Conotoxina GVIA
Cav2.3		Tipo R	α_{1E}	Neuronas	SNX-482
Cav3.1	LVA	Tipo T	α_{1G}	Neuronas y corazón	No tiene
Cav3.2			α_{1H}	Neuronas y corazón	No tiene
Cav3.3			α_{1I}	Neuronas	No tiene

Tabla 1. Clasificación y características de los canales Cav.

Las corrientes que fluyen a través de los canales tipo L (del inglés *Long lasting*) son persistentes, resultado de una lenta inactivación dependiente de voltaje. Estas corrientes se observan principalmente en células musculares y endocrinas, donde son importantes para iniciar los fenómenos de acople excitación-contracción y excitación-secreción que dan como resultado la contracción muscular y cardiaca, así como la liberación de hormonas (Stojilkovic, 2012; Shuja & Colecraft, 2018; Bannister & Beam KG, 2013).

Asimismo, existen canales cuya apertura ocurre a voltajes intermedios y su expresión se restringe al sistema nervioso, por lo que la corriente a que dan origen ha sido llamada tipo N (del inglés *Neuronal*), y su comportamiento es en términos biofísicos es distinto al de los canales de tipo L y T (Catterall, 2011). Así, la cinética de inactivación es más lenta que la de los canales que originan las corrientes tipo T, pero más rápida que aquellos que dan lugar a las corrientes tipo L.

Por otro lado, las corrientes tipo P y Q, se registraron por primera vez en células de Purkinje y en neuronas granulares de cerebelo, respectivamente (Hillman *et al.*, 1991; Randall & Tsien, 1995). Los canales con estas corrientes son sensibles a distintas concentraciones de la toxina llamada ω -agatoxina-IVA (Randall & Tsien, 1995; Nimmrich & Gross, 2012) y constituyen entidades moleculares diferentes. Por último, la corriente residual o resistente de Ca^{2+} (tipo R) se caracteriza por no ser alterada por la mayoría de los bloqueadores específicos de los canales de Ca^{2+} (Catterall, 2011).

Subunidades de los canales Cav

La subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ es responsable de detectar los cambios en el voltaje membranar y es el sitio de unión de fármacos y toxinas que regulan la actividad del canal. Debido a su conformación espacial, crea un poro por el cual los iones Ca^{2+} pasan del medio extracelular al intracelular. En su estructura tiene 4 dominios homólogos repetidos, unidos por asas citoplasmáticas, cuyos extremos N y C-terminal se encuentran del lado intracelular (Fig. 2). Cada uno de estos repetidos está formado por 6 segmentos transmembranales con estructura de α -hélices llamados S1-S6 (Felix *et al.*, 2013; Gandini *et al.*, 2014; Dolphin, 2016; Catterall *et al.*, 2017). El filtro de selectividad iónica se encuentra dentro del poro conductor y comprende 4 residuos de glutamato y en los canales LVA a 2 glutamatos y 2 aspartatos en los HVA (Catterall *et al.*, 2017).

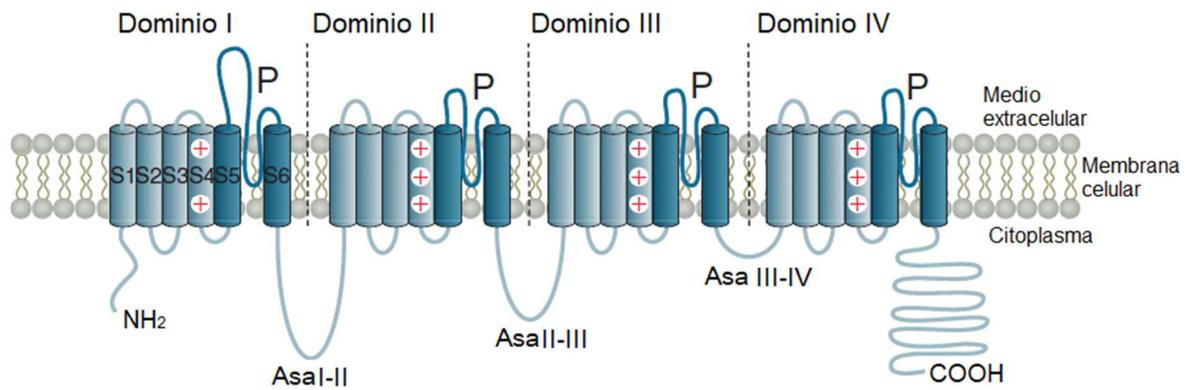


Figura 2. Organización estructural de la subunidad Cav α_1 . La estructura primaria de Cav α_1 comprende 4 dominios homólogos repetidos (I-IV), cada uno formado por 6 segmentos transmembranales (S1-S6) unidos por asas citoplasmáticas. El sensor de voltaje se localiza en el segmento S4, mientras que el poro conductor de iones (P) está formado por un asa reentrante localizada entre los segmentos S5 y S6 (modificado de Weiss & Zamponi, 2017).

Por su parte, Cav $\alpha_2\delta$ es una subunidad extracelular, anclada a la membrana celular por un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estructuralmente se encuentra formada por dos péptidos (α_2 y δ) unidos por un enlace disulfuro (Davies *et al.*, 2010; Calderón-Rivera *et al.*, 2012; Dolphin, 2013). Existen diversas variantes de Cav $\alpha_2\delta$ resultado del *splicing* alternativo que se lleva a cabo a partir de la transcripción de los 4 genes que codifican para esta subunidad (Lacinova, 2005; Dolphin, 2013). Aunque los procesos moleculares aún no se conocen con precisión, la expresión heteróloga de Cav $\alpha_2\delta$ con las subunidades Cav α_1 y Cav β provoca un aumento en la densidad de corriente, así como una alteración en su cinética de inactivación y un cambio en el mecanismo de apertura y cierre de los canales. Así, se ha propuesto que el aumento de corriente podría estar relacionado con un incremento del direccionamiento de los canales Cav hacia la membrana celular y con una disminución de las vías de degradación. Adicionalmente, Cav $\alpha_2\delta$ ayuda a mantener al canal en las balsas lipídicas (Dolphin, 2012; 2013).

La subunidad $\text{Ca}_v\beta$ es citoplasmática, y al igual que los genes que codifican para las otras subunidades de los canales de Ca^{2+} , los 4 genes que codifican para esta subunidad auxiliar dan origen a diversas variantes de *splicing* alternativo del ARNm una vez que se transcriben. Desde el punto de vista funcional, $\text{Ca}_v\beta$ modula al canal por distintos mecanismos. Uno de ellos es la interacción con diferentes moléculas en la vecindad del canal como las proteínas G, algunas proteínas cinasas y de la maquinaria de liberación vesicular (Dolphin 2012; Felix *et al.*, 2013). Además, como ya se mencionó, modifica las propiedades físicas de los Ca_v cuando se expresa junto con $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ y $\text{Ca}_v\alpha_1$ (Walker & De Waard, 1998; Dolphin 2012; Felix *et al.*, 2013).

Finalmente, $\text{Ca}_v\gamma$ es una subunidad transmembranal formada por 4 α -hélices, cuyos extremos están localizados en la parte citoplasmática de la membrana. Registros electrofisiológicos revelan el efecto inhibitorio de $\text{Ca}_v\gamma$ sobre la actividad de los canales HVA (Letts *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2001; Kang & Campbell, 2003; Sandoval *et al.*, 2007a; 2007b). Asimismo, regula el tráfico hacia la membrana celular de los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA, por sus siglas en inglés; Price *et al.*, 2005; Jackson & Nicoll, 2011).

Subunidad $\text{Ca}_v\gamma$: clasificación y estructura

La familia de las subunidades γ la conforman las 8 isoformas descritas de $\text{Ca}_v\gamma$ (γ_1 - γ_8), las cuales se distinguen por tener 4 dominios transmembranales con estructura de hélice y por la localización citoplasmática de sus extremos N- y C-terminal. Con base en análisis filogenéticos, se ha determinado que las distintas subunidades γ son resultado de la duplicación de un gen ancestral común (Kang & Campbell, 2003). Asimismo, por sus

4 dominios transmembranales, las claudinas y las isoformas de $Cav\gamma$ se considera que forman parte de la familia de proteínas conocidas como tetraspaninas, las cuales se caracterizan por presentar en la primera asa extracelular un motivo GLW (Glicina-Leucina-Triptofano) y un par de residuos de cisteína. Adicionalmente, las subunidades $Cav\gamma$ poseen sitios de *N*-glicosilación anteriores del motivo GLW (Chen *et al.*, 2007; Fig. 3). Tomando la expresión en tejidos como criterio de clasificación, las $Cav\gamma$ s se dividen en esqueléticas (γ_1 y γ_6) o neuronales (γ_{2-5} y γ_{7-8} ; Kang & Campbell, 2003).

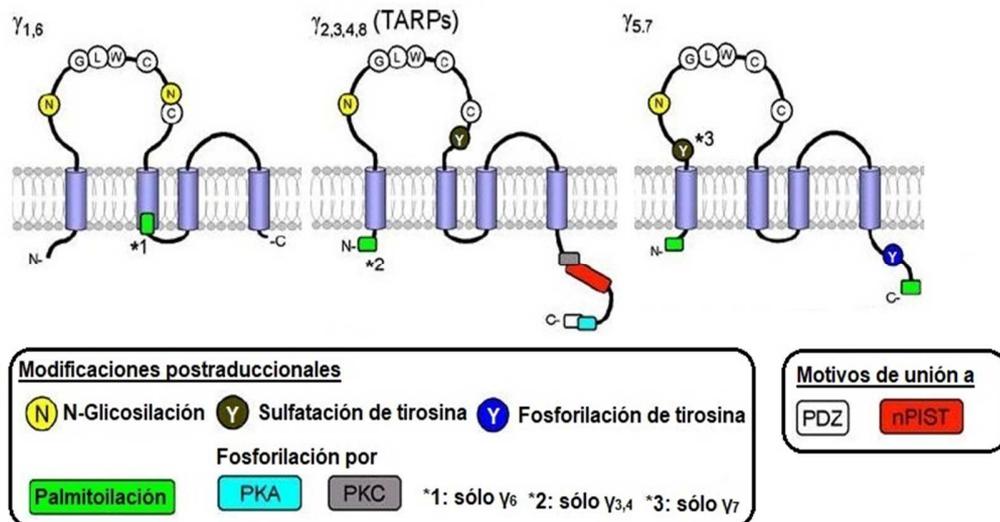


Figura 3. Dominios funcionales en las subunidades $Cav\gamma$. Las $Cav\gamma$ s y las claudinas tienen 4 pases transmembranales. La primera asa extracelular posee un motivo GLW y un par de residuos de cisteínas (capaces de formar un enlace disulfuro). Asimismo, $Cav\gamma$ puede ser sujeta a *N*-glicosilación y en algunos casos sulfatación. En el resto de la estructura, dependiendo de tipo de $Cav\gamma$, existen otras modificaciones postraduccionales como palmitoilación y fosforilación. Asimismo, las $Cav\gamma$ neuronales poseen dominios de unión a PDZ y a nPIST en el C-terminal de la proteína (modificado de Chen *et al.*, 2007).

Si se considera su homología de secuencia, las $\text{Ca}_v\gamma$ se dividen en 3 grupos. El primero de ellos comprende a las subunidades $\text{Ca}_v\gamma_1$ y $\text{Ca}_v\gamma_6$. Estas proteínas comparten un 62.5% de su secuencia de aminoácidos. Se expresan fundamentalmente en el músculo estriado y en menor medida en el cerebro. $\text{Ca}_v\gamma_1$ se encuentra presente únicamente en el músculo esquelético, mientras que $\text{Ca}_v\gamma_6$ está tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco. Ambas se caracterizan por tener sitios de *N*-glicosilación, antes y después del motivo GLW, y un extremo C-terminal corto que aparentemente carece de motivos funcionales. La secuencia de $\text{Ca}_v\gamma_6$ puede ser sujeta a palmitoilación, una modificación postraduccional capaz de modificar las propiedades funcionales de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$ de los canales de calcio (Qin *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2007). El segundo grupo lo conforman las proteínas reguladoras del receptor AMPA transmembranal, TARPs (por sus siglas en inglés). Este grupo está integrado en particular por las subunidades neuronales $\text{Ca}_v\gamma_2$, $\text{Ca}_v\gamma_3$, $\text{Ca}_v\gamma_4$ y $\text{Ca}_v\gamma_8$, que se caracterizan por presentar, en su extremo C-terminal, dominios reguladores como el motivo de unión al dominio PDZ o el motivo de unión a proteínas con nuevas isoformas de PDZ (nPIST). La primera asa extracelular es blanco de modificaciones postraduccionales como sulfatación y algunos aminoácidos en la secuencias de los dominios reguladores son fosforilados por las proteínas cinasas A y C (PKA y PKC; Fig. 3).

El tercer grupo incluye a las subunidades $\text{Ca}_v\gamma_5$ y $\text{Ca}_v\gamma_7$. Estas subunidades se caracterizan por estar codificadas por 5 exones en lugar de 4. Se expresan en los mismos tejidos que las TARPs pero no poseen motivos de unión a dominios específicos, ni tampoco tienen una función específica conocida. Sus secuencias tienen modificaciones postraduccionales como palmitoilación, sulfatación y fosforilación (Fig. 3).

La subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2$

$\text{Ca}_v\gamma_2$, también conocida como *stargazin*, es la TARP más estudiada (Fig. 4). Su transcrito se ha encontrado en el cerebro, los testículos y la hipófisis. Sin embargo, a nivel proteico sólo se ha identificado en el cerebro, en zonas como la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el tálamo y el hipocampo. Asimismo, se ha encontrado que $\text{Ca}_v\gamma_2$ se expresa de manera importante en la membrana postsináptica de las células de Purkinje del cerebelo, aunque también se encuentra en la membrana presináptica de otros tipos neuronales (Black, 2003).

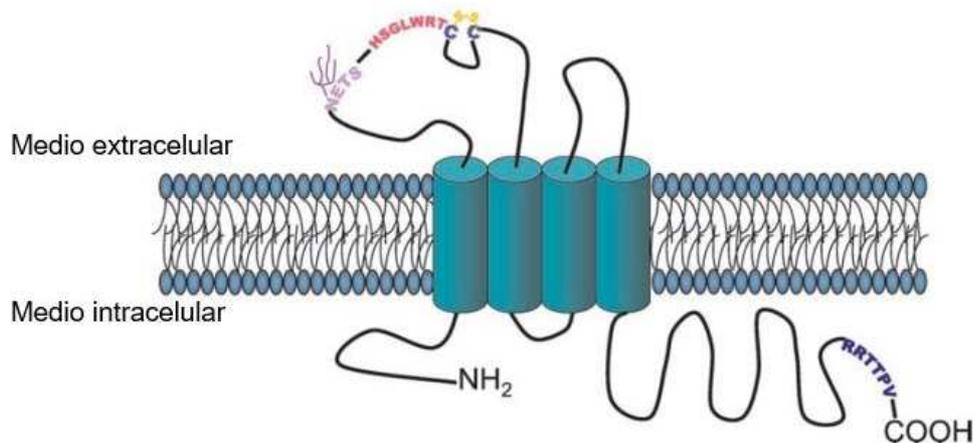


Figura 4. Características estructurales de $\text{Ca}_v\gamma_2$. La proteína consta de 4 dominios transmembranales (cilindros azules); la primera asa extracelular presenta un sitio conservado de *N*-glicosilación (secuencia en morado), una región altamente conservada (secuencia en rojo) y un enlace disulfuro (S-S en amarillo) entre cisteínas (C en azul). La proteína presenta además un dominio de unión a PDZ (secuencia en azul), cerca del extremo C-terminal (modificado Kang & Campbell, 2003).

La subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2$ como parte de los canales de Ca^{2+} neuronales

Estudios previos han mostrado que $\text{Ca}_v\gamma_2$ (así como $\text{Ca}_v\gamma_3$) interacciona en la membrana presináptica con las subunidades $\text{Ca}_v2.1\alpha_1$ y $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$ de los canales HVA, gracias a una secuencia localizada en la primera asa extracelular. Asimismo, los registros

electrofisiológicos muestran que la expresión de $Ca_v\gamma_2$, sola o junto con $Ca_v\alpha_2\delta$, provoca una disminución muy marcada en la densidad de la corriente a través de los canales tipo P/Q y N (Kang *et al.*, 2001; Sandoval *et al.*, 2007a; Fig. 5).

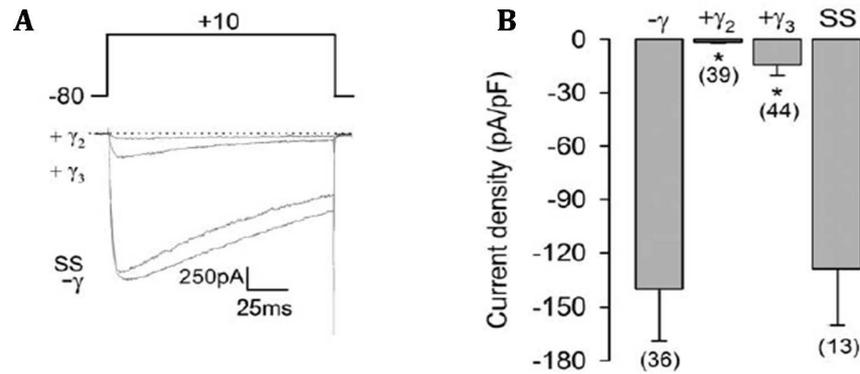


Figura 5. La subunidad $Ca_v\gamma_2$ y $Ca_v\gamma_3$ inhiben las corrientes de Ca^{2+} a través de los canales $Ca_v2.2$. A) Trazos representativos de la amplitud de corriente obtenida en células HEK-293 transfectadas con las subunidades $Ca_v\gamma$, según se indica, en conjunto con las subunidades $Ca_v2.2\alpha_1/Ca_v\alpha_2\delta-1/Ca_v\beta_3$, que muestran que la reducción en la amplitud de la corriente provocada por las subunidades $Ca_v\gamma$, efecto que no se observa con proteína membranal *sarcospan* (SS) usada como control negativo. B) Comparación de la disminución en la densidad en presencia de las subunidades $Ca_v\gamma$ (modificado de Sandoval *et al.*, 2007a).

Usando inhibidores de la internalización, en el laboratorio se han encontrado evidencias de que la disminución de los canales funcionales de la membrana plasmática es un mecanismo improbable de la regulación ejecida por las subunidades $Ca_v\gamma$. Los cambios en la densidad de la corriente podrían atribuirse a dos mecanismos distintos. En primer lugar, la expresión de las subunidades $Ca_v\gamma$ podría alterar la dependencia al voltaje de los canales y en segundo lugar, podría reducir la síntesis de los canales a través de la activación de un mecanismo del retículo endoplásmico conocido como respuesta a

proteínas mal plegadas. Esos hallazgos corroboran que las subunidades Cav γ neuronales regulan la actividad de los canales Cav2.2 (tipo N), ponen en evidencia un papel para estas proteínas en la expresión de los canales neuronales a través de los componentes iniciales de la ruta biosintética, y sugieren que bajo ciertas condiciones las subunidades Cav γ podrían inducir el plegamiento incorrecto de la proteína formadora del poro del canal (Sandoval *et al.*, 2007a).

Asimismo, existen reportes que involucran a la subunidad Cav γ_2 en la regulación de los canales LVA. Green y sus colaboradores (2001) mostraron que la sobreexpresión de esta subunidad auxiliar podía enlentecer la cinética de inactivación de los canales Cav3.3, aunque dicho cambio no resultó significativo estadísticamente. Asimismo, el grupo de investigación liderado por Phil Best ha mostrado que un péptido de ocho aminoácidos que contiene el motivo GxxxA de Cav γ_6 podría inhibir la corriente de calcio a través de canales Cav3.1, al interactuar con el canal y reducir su disponibilidad para ser abierto (Lin *et al.*, 2007). Poco tiempo después ese mismo grupo mostró evidencias de que el péptido en mención podía actuar como un inhibidor farmacológico sugiriendo un mecanismo distinto de la regulación de la expresión membranar de la subunidad formadora del poro del canal (Chen & Best, 2009). Sin embargo, es importante mencionar que en canales nativos aún no se ha reportado la interacción de ninguna de las isoformas de Cav γ con los canales LVA.

La subunidad Cav γ_2 como parte de los receptores AMPA

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central. Durante la sinapsis química, el glutamato es liberado de la terminal presináptica

activando receptores presentes en la membrana postsináptica. Los receptores de glutamato se dividen en dos categorías: los receptores ionotrópicos, que son canales que se activan al unirse directamente al glutamato, y los receptores metabotrópicos, que están acoplados a proteínas G responsables de la producción de segundos mensajeros. De acuerdo con su perfil farmacológico, existen dos principales subtipos de canales ionotrópicos que se nombran de acuerdo a su agonista más potente. El primero comprende a los receptores al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de kainato, mientras que el segundo corresponde a los receptores al N-metil-D-aspartato (NMDA; Kandel *et al.*, 2013).

Los receptores AMPA son responsables de iniciar la despolarización de la membrana postsináptica, dando lugar al disparo de su potencial de acción (Sweatt, 2010). Estos canales se activan al unirse a glutamato, permitiendo la salida de K^+ y la entrada de Na^+ y en menor medida de Ca^{2+} . Dando paso a las corrientes excitadoras postsináptica y a la activación de enzimas que desencadenan cascadas de señalación involucradas en la plasticidad sináptica (Sumioka, 2013; Chater & Goda, 2014).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación, se ha encontrado que $Ca_v\gamma_2$ (*stargazin*) se une a las subunidades GluR de los receptores AMPA favoreciendo el transporte de estos receptores a la membrana celular y provocando consecuentemente un aumento en la densidad de corriente (Tomita *et al.*, 2003; 2005; Fig. 6A). Se sabe además, que gracias a los dominios en su extremo C-terminal, $Ca_v\gamma_2$ se une a proteínas con dominio PDZ (como PSD-95), provocando el direccionamiento de los receptores AMPA a la sinapsis (Chen *et al.*, 2000). Por otro lado, la primera asa extracelular de la subunidad $Ca_v\gamma_2$ ayuda a regular los procesos de apertura y cierre de los receptores AMPA, provocando una

disminución en su velocidad de desactivación y desensibilización (Tomita *et al.*, 2005; Fig. 6B).

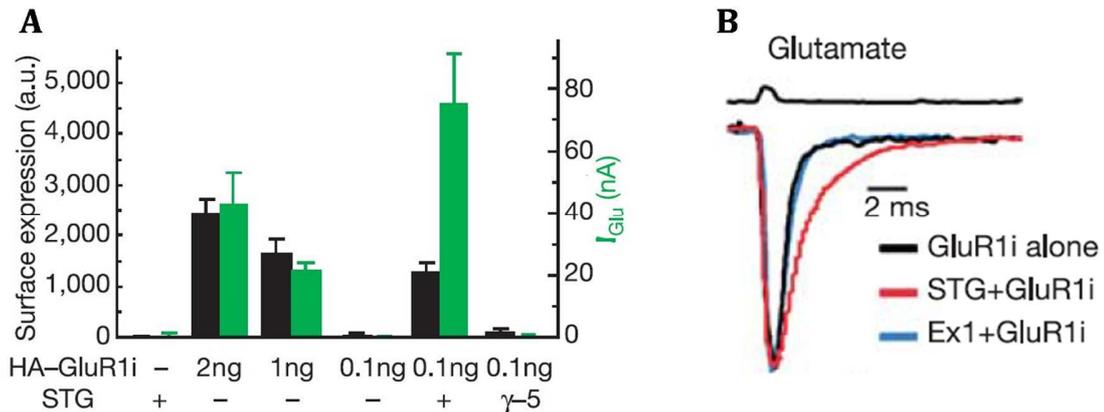


Figura 6. La subunidad $CaV\gamma_2$ modula el tráfico, la apertura y el cierre de los receptores AMPA. A) Comparación de la expresión en la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis* transfectados con cantidades variables de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA (HA-GluR1i) en presencia o ausencia de $CaV\gamma_2$ (*stargazin*, STG). La expresión de los receptores AMPA en la membrana celular (barras negras) y la densidad de corriente a través de ellos (barras verdes), aumentan en presencia de $CaV\gamma_2$, efecto que no se observa cuando las subunidades de los receptores AMPA se transfectan con $CaV\gamma_5$. B) Registro electrofisiológico de ovocitos de *Xenopus laevis* transfectados sólo con la subunidad GluR1 (línea negra) o en conjunto con $CaV\gamma_2$ (línea roja), o su asa extracelular (línea azul). Al estimular las células con glutamato se observa un cambio en la cinética de inactivación cuando está presente $CaV\gamma_2$ o su asa extracelular (modificado Tomita *et al.*, 2005).

Posible papel de la subunidad $CaV\gamma_2$ en la adhesión celular

Considerando la homología existente entre la secuencias de $CaV\gamma$ y las claudinas, se ha pensado en que esta proteína pudiera jugar algún papel en la sinapsis como componente de las adhesiones celulares (Kang & Campbell, 2003). Sin embargo, pocos son los estudios que han explorado esta posibilidad. Hasta ahora sólo se ha mostrado

que, en los fibroblastos, que normalmente no se adhieren entre sí, la transfección de $Ca_v\gamma_2$ favorece la formación de agregados celulares, un efecto similar al que se observa al transfectar con claudina (Price *et al.*, 2005; Fig. 7).

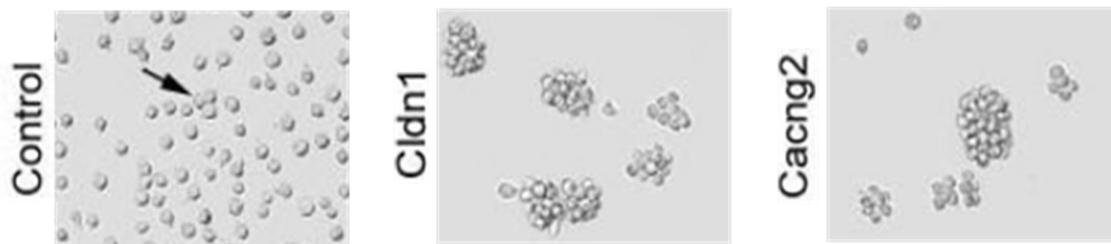


Figura 7. La expresión de claudina o $Ca_v\gamma_2$ promueve la agregación celular. La imagen muestra un cultivo de fibroblastos de ratón que se transfectaron con una clona de ADNc que codifica para claudina-1 (Cldn1) o $Ca_v\gamma_2$ (Cacng2), y que posteriormente se sometieron a ensayos de agregación. Los fibroblastos que expresaron cualquiera de las dos proteínas forman agregados celulares, en comparación con los fibroblastos no transfectados (control) que forman agregados de unas cuantas células (flecha).

La mutación de *stargazer*

Un modelo animal que ayuda a dimensionar la importancia que la subunidad $Ca_v\gamma_2$ tiene en el sistema nervioso es el ratón mutante *stargazer*. El defecto genético en estos animales consiste en la inserción de un transposón de ~6 kb en el intrón localizado entre los exones 2 y 3 del gen *CACNG2*, el cual codifica precisamente a la subunidad $Ca_v\gamma_2$ (Letts *et al.*, 1997; 1998).

Debido a la mutación, la expresión de la subunidad $Ca_v\gamma_2$ disminuye por completo en el cerebro anterior y en el cerebelo, y los animales tampoco expresan receptores AMPA funcionales en las células granulosas del cerebelo (Sharp *et al.*, 2001; Letts, 2005). Como resultado de los cambios en la expresión de la proteína, el ratón *stargazer* tiene un fenotipo particular caracterizado por arresto conductual (epilepsia con crisis de

ausencia), dificultad para caminar, y movimientos anormales de la cabeza. El análisis electroencefalográfico (EEG) muestra que los ratones *stargazer* tienen un patrón típico de descargas onda-pico (SWD; Letts *et al.*, 1998; 2003). Estas características hacen de estos animales, junto con dos alelos adicionales de *stargazer* llamados *waggler* y *stargazer 3Jackson* (3J) sean ampliamente utilizados como modelo para el estudio de varios padecimientos neuronales como la epilepsia con crisis de ausencia, la ataxia cerebelosa, algunos problemas en el sistema vestibular, y el déficit de aprendizaje, entre otros (Kang & Campbell, 2003; Letts, 2005). Lo anterior, reafirma la importancia de la subunidad $Ca_v\gamma_2$ en la señalización neuronal, y resalta las consecuencias fisiopatológicas que provoca su ausencia.

El gen *CACNG2* y su región promotora

En los humanos, el gen *CACNG2* tiene un tamaño aproximado de 140 kb, y se encuentra localizado en la cadena antisentido del brazo largo del cromosoma 22, específicamente en la banda 22q.12.3. Tiene un marco de lectura abierto con 4 exones, que dan lugar a un transcrito de ~2.4 kb (Black, 2003). El pre-mRNA es sujeto de *splicing* alternativo y una vez traducido da origen a la síntesis de la subunidad $Ca_v\gamma_2$, una proteína transmembranal de 363 aminoácidos con un peso molecular que ronda los 36 KDa.

Por otro lado, con anterioridad en nuestro laboratorio, a partir la clona BAC RP1-293L6, se clonó un fragmento de ~1.6 kb río arriba de la región 5'-UTR del gen *CACNG2*, que contiene a la región promotora. Para ello se empleó el vector de expresión pGL3-Basic, el cual contiene en su secuencia al gen reportero de luciferasa, ampliamente usado

en el estudio de la actividad transcripcional de diversos promotores. El fragmento mencionado se clonó tanto en el sentido de la transcripción como en la dirección antisentido (Calderón-Rivera, datos no publicados; Fig. 8).

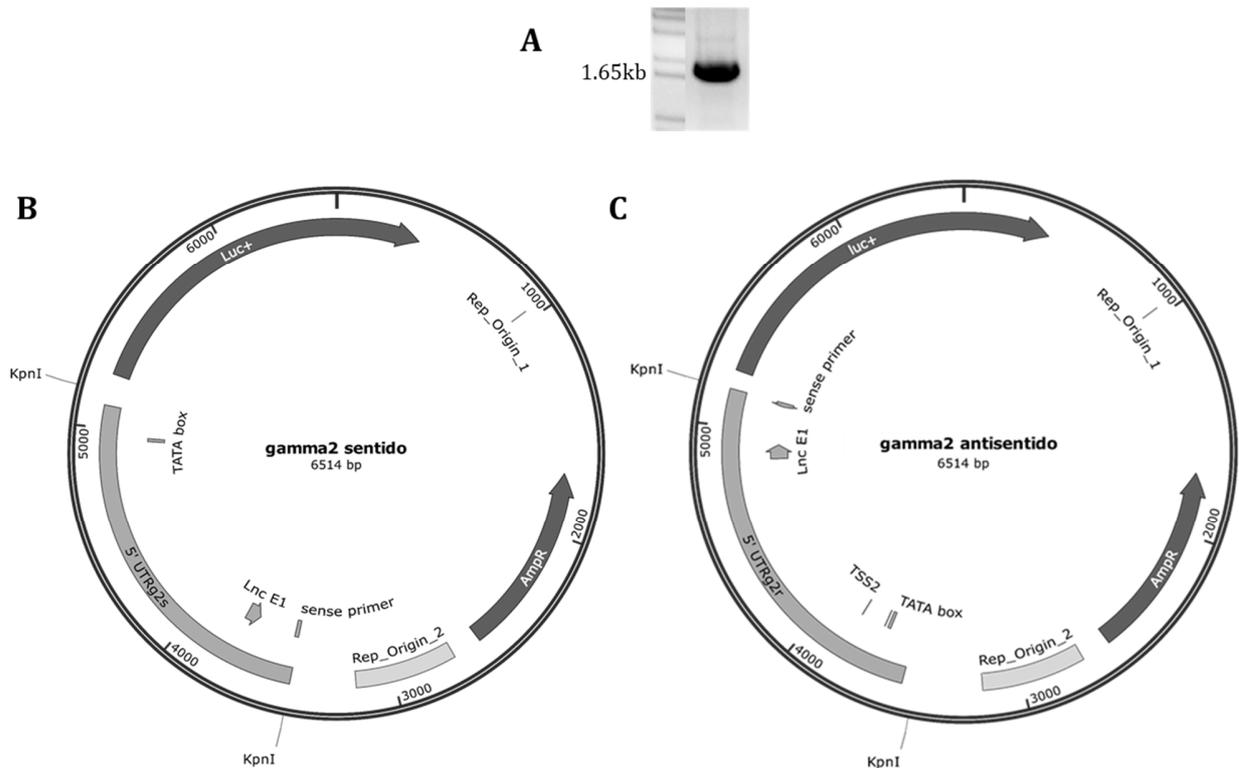


Figura 8. Clonación del gen *CACNG2* en el vector pGL3-Basic. A) La clonación se comprobó al analizar las construcciones con la enzima *KpnI*, lo que libera un fragmento de 1.6 kb (carril derecho del gel). En el carril izquierdo se muestra al marcador de peso molecular. B y C) Mapas de las construcciones en pGL3-Basic, se indica la posición del promotor en sentido (5'UTRg2s) y antisentido (5'UTRg2r).

Las construcciones se transfectaron en líneas celulares de neuroblastoma tanto de ratón (N1E-115) como de humano (SH-SY5Y), y posteriormente se realizaron los ensayos de quimioluminiscencia por luciferasa para conocer su actividad transcripcional.

Los resultados mostraron que el promotor presentaba actividad en ambas direcciones e incluso ésta era 4 veces mayor en la dirección antisentido (Calderón-Rivera, datos no publicados; Fig. 9).

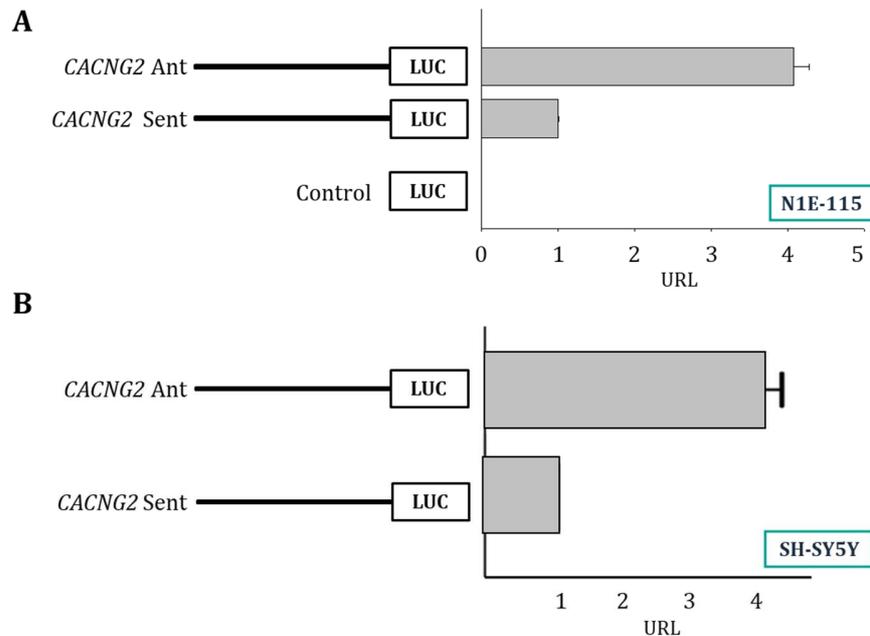


Figura 9. Actividad transcripcional del promotor del gen *CACNG2*. Las construcciones que contienen la secuencia del promotor del gen *CACNG2*, clonada en sentido y antisentido, se expresaron en células de neuroblastoma N1E-115 (A) y SH-5YSY (B). Posteriormente se realizaron ensayos de quimioluminiscencia por luciferasa con las proteínas extraídas. Se observó que existe actividad (medida en unidades relativas de luz, URL) en las dos direcciones, pero es mayor en antisentido.

Con esta evidencia experimental resultó entonces razonable plantearse que podría tratarse de un promotor bidireccional. Los promotores bidireccionales son regiones del genoma que inician la transcripción de genes en ambas orientaciones (Fig. 10). Diversos estudios sugieren que algunos promotores bidireccionales dirigen la transcripción en un sentido de genes codificantes de proteínas y hacia el otro sentido ARNs no codificantes (ncRNAs, por sus singlas en inglés; Wei *et al.*, 2011).

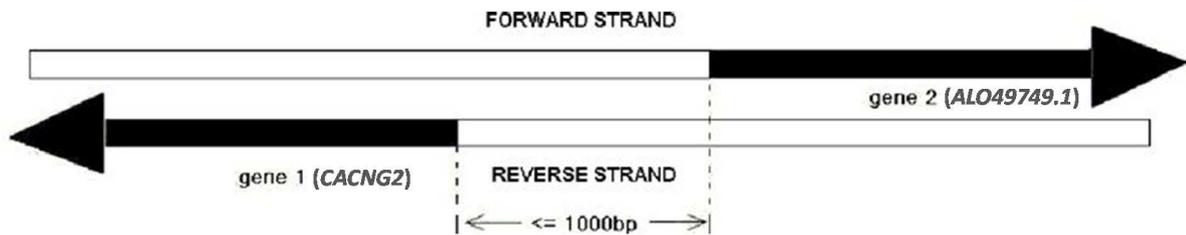


Figura 10. Esquema general de un promotor bidireccional. El gen 1 y el gen 2 están en el mismo cromosoma; el gen 1 (*CACNG2*) está en la cadena antiparalela (antisentido), mientras que el gen 2 (*ALO49749.1*) está en la cadena sentido de la transcripción. La distancia entre los sitios de inicio de transcripción (TSS) es <1 kb. El gen 1 y el gen 2 se denominan "genes bidireccionales" y el "promotor bidireccional" se refiere a la región intergénica que separa los "genes bidireccionales" (Modificado de Wang *et al.*, 2009).

Para conocer la identidad del posible producto codificado en resultado de la transcripción dirigida por el promotor antisentido de *CACNG2*, a continuación, se realizó una búsqueda bioinformática en las bases de datos Ensembl, NCBI y UCSC genome Browser, con el fin de identificar posibles genes ubicados río arriba de la región promotora. Los resultados de este análisis señalan la existencia de un gen que en la base de datos Ensembl recibe el nombre de *ALO49749.1* y que tiene un número de acceso ENSG00000234688 (Fig. 11A). Por su parte, en la base de datos UCSC genome Browser este mismo gen recibe el nombre de la clona BAC en la que se identificó inicialmente, RP1-293L6 (Fig. 11B), mientras que en la base de datos del NCBI se hace referencia a su locus, LOC105373021 (Fig. 11C). Sin embargo, se trata del mismo ya que en los tres casos la secuencia tiene las mismas características.

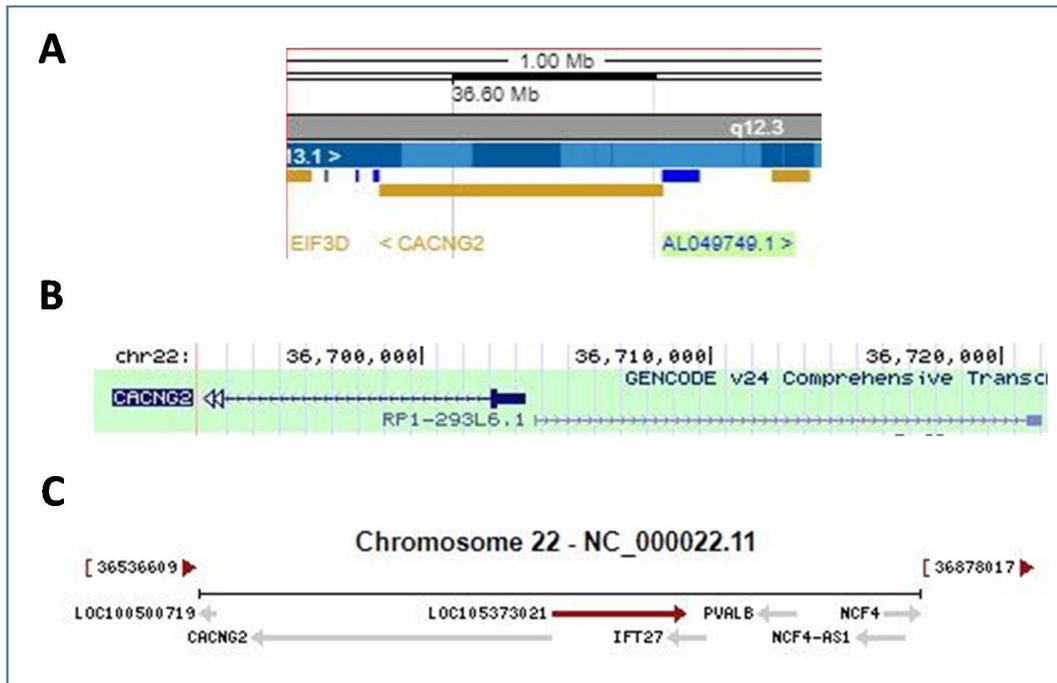


Figura 11. Análisis bioinformático del promotor del gen *CACNG2* en antisentido. En la base de datos de Ensembl (A) se reporta la existencia de un gen con el nombre *ALO49749.1* (de color azul) en dirección antisentido a *CACNG2* (de color dorado). En UCSC genome Browser (B) al mismo gen se le refiere como RP1-293L6 (línea punteada gris). Por otro lado, en NCBI (C) el gen es llamado LOC105373021 (línea café).

Como se muestra en las Figs. 10 y 11, el gen *ALO49749.1* se encuentra localizado en la cadena sentido del genoma, es no codificante, tiene un tamaño de ~17.5 kb, consta de un intrón y dos exones (75 y 557 pb), y da origen a un transcrito maduro de 632 pb (Fig. 12).



Figura 12. Características del transcrito del gen *AL049749.1*. El resumen de resultados de Ensembl señala que el gen se encuentra en la cadena sentido del genoma y consta de ~17.5 kb (flecha negra). Su transcrito maduro tiene un tamaño de 632 pb y consta de dos exones no codificantes (recuadro rojo; la posición de los exones se representa con los recuadros azules). El gen es de tipo antisentido (recuadro verde), indicando que en la dirección opuesta se encuentra una región que regula la transcripción de un gen codificante (*CACNG2*).

Características y funciones generales de los lncRNAs

Por las características mencionadas en la sección precedente, el transcrito del gen *AL049749.1* podría ser un ARN largo no codificante (lncRNA, del inglés *long non-coding RNA*). Éstas por lo general son moléculas de al menos 200 pb que carecen de la capacidad de sintetizar proteínas. Al igual que los ARN mensajeros se sintetizan a partir de un promotor, contienen una región poli-A y son el blanco de *splicing* alternativo y *capping*.

Pese a haberse reportado una abundancia de entre 5 y más de 10 mil transcritos de lncRNA en humanos, aún se desconocen las anotaciones genómicas exactas y la significancia funcional de muchos de estos lncRNAs (Djebali *et al.*, 2012). Sin embargo, se sabe que la función de los lncRNA podría depender de su localización subcelular (Fig. 13). En el núcleo, estas moléculas ayudarían a mantener los territorios cromosómicos y actuarían como reguladores transcripcionales por diferentes mecanismos. Por otro lado, en el citoplasma estarían actuando directamente sobre los ARNm inhibiendo su traducción o acelerando su degradación (Hombach & Kretz, 2016).

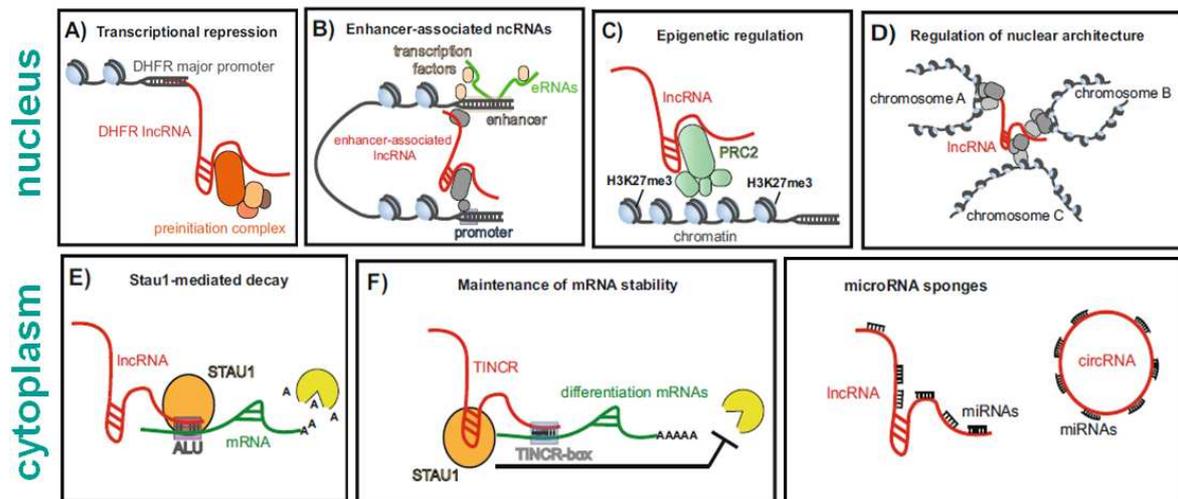


Figura 13. Posibles funciones de los lncRNAs. En el núcleo los lncRNAs podrían reprimir o potencializar la transcripción, regular el genoma a nivel epigenético (interactuando indirectamente con las histonas) y la arquitectura nuclear (manteniendo los territorios cromosómicos). En el citoplasma podrían jugar un papel en la síntesis de proteínas, al participar en los mecanismos de degradación, estabilización o silenciamiento del ARNm.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La subunidad $Ca_v\gamma_2$ juega un papel muy relevante en la señalización nerviosa dado que se asocia con los canales de Ca^{2+} y con los receptores AMPA. Se sabe que alteraciones en su expresión pueden dar lugar a trastornos neurológicos devastadores como la epilepsia. Sin embargo, hasta ahora no existen reportes que indiquen los mecanismos implicados en su regulación a nivel transcripcional. Una estrategia, para comenzar a abordar esta incógnita, es la caracterización de la región promotora del gen *CACNG2*.

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio con el promotor de *CACNG2*, muestran que esta región presenta actividad transcripcional en ambas direcciones del genoma. Asimismo, un análisis bioinformático reveló la existencia de un gen en dirección opuesta hacia donde se transcribe el gen subunidad $Ca_v\gamma_2$.

HIPÓTESIS

Dado que la construcción antisentido de una secuencia río arriba de la región 5'UTR del gen *CACNG2* muestra actividad transcripcional, resulta razonable proponer que la secuencia contiene un promotor bidireccional.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la actividad transcripcional de la región promotora antisentido del gen *CACNG2*.

Objetivos específicos

1. Realizar la caracterización *in silico* de la región promotora antisentido del gen *CACNG2*.
2. Caracterizar experimentalmente la actividad transcripcional de la construcción antisentido de *CACNG2* clonada en el vector pGL3-Basic.
3. Localizar al promotor mínimo mediante análisis por eliminaciones secuenciales de la región clonada.
4. Identificar la presencia de regiones funcionales en el promotor (TSS(s) y caja TATA).
5. Evaluar si el producto resultado de la transcripción dirigida por la construcción antisentido de *CACNG2* afecta la expresión de la subunidad Cav γ 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis bioinformático

Inicialmente se realizó un análisis bioinformático de una secuencia río arriba de la región 5'UTR del gen *CACNG2* que codifica a la subunidad auxiliar $Ca_v\gamma_2$ de los canales HVA. Para delimitar las bases que forman parte de la posible región promotora del gen *ALO49749.1* (lncRNA), se realizó el alineamiento de la secuencia del gen con la del promotor de *CACNG2* en antisentido utilizando el programa Align Sequences Nucleotide BLAST® del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponible gratuitamente en la dirección electrónica blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

A continuación, se realizó el análisis del promotor del gen *CACNG2*, clonado en antisentido, usando también bases de datos y herramientas bioinformáticas de acceso libre en internet. Para localizar los probables sitios de inicio de la transcripción se empleó la herramienta llamada "Neural Network Promoter Prediction" disponible en sitio web del Berkeley Drosophila Genome Project, en la dirección electrónica http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html. Después, se buscó la presencia de la caja TATA con el programa Gene Promoter Miner (GPMiner), disponible en la dirección electrónica <http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/>. El contenido de secuencias ricas en GC se determinó con el programa CpGFinder de Softberry, disponible en la dirección electrónica <http://www.softberry.com/berry.phtml>. Asimismo, para determinar la presencia de una posible secuencia Kozak, tanto en el promotor como en la secuencia del gen, se empleó el programa ATGpr-Translation initiation site prediction (<http://atgpr.dbcls.jp/>). Finalmente, la localización de posibles sitios de unión a factores

de transcripción y otros elementos de importancia en la secuencia del promotor se realizó con la herramienta MatInspector de Genomatix (<https://www.genomatix.de/>).

Del mismo modo, se realizó el análisis *in silico* del gen *ALO49749.1* para comenzar a aclarar si el producto de su transcripción es un lncRNA. Para identificar los posibles marcos de lectura abiertos (ORFs), toda la secuencia exónica del gen se examinó con el programa ORFinder del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), y el alineamiento de las secuencias candidatas también se realizó con herramientas disponibles en el NCBI. La estructura secundaria del posible lncRNA se determinó a partir de la secuencia del transcrito maduro de *ALO49749.1* con la herramienta RNAfold web server, disponible en el sitio web de la Universidad de Viena (<http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Construcción de los plásmidos reporteros

Para estudiar la posible funcionalidad de los sitios de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés), así como de la caja TATA encontrados por en análisis bioinformático, se clonó y analizó la actividad funcional de un fragmento del promotor de 1238 pb (al que llamaré en adelante Fragmento D), que no contenía la región en donde se localizaron los TSS y la caja TATA. Para lograrlo, la región promotora de *CACNG2* en antisentido clonada en pGL3-Basic (Fig. 8C), se analizó con la enzima *EcoRI* y se visualizó en un gel de agarosa. La banda liberada con mayor número de bases se extrajo del gel con el paquete comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), y después se recircularizó usando ~100 ng del ADN, 1 μ L de la ligasa T4 DNA Ligase (Roche), 2 μ L del *buffer* de la ligasa y el agua necesaria para llevar la mezcla a un volumen final de 15 μ L.

La mezcla se incubó por 16 h a 16°C y el resultado de la reacción de ligación se empleó para transformar bacterias *Escherichia coli* competentes DH5 α F $^{-}$ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K $^{-}$,m_K $^{+}$) *phoA supE44* λ^{-} *thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen).

El protocolo para la transformación de las bacterias es el siguiente. Brevemente, el producto de la ligación se depositó en un tubo con 200 μ L de bacterias competentes. El tubo se incubó a 4°C durante 30 min, agitando cada 8 min. Después se incubó a 42°C por 1 min y a continuación se volvió a incubar a 0°C durante 2 min. Posteriormente se agregaron 800 μ L de medio Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C por 1 h. Para finalizar, se sembraron 200 μ L de las bacterias en cajas con LB agar con 100 μ g/ml de ampicilina las cuales se incubaron a 37°C durante 16 h. Las colonias que crecieron se resembraron en 3 mL medio LB con ampicilina y se dejaron creciendo por 16 h a 37°C.

El plásmido se extrajo por lisis alcalina (miniprep) y el producto se incubó durante toda la noche con la enzima *KpnI*. A continuación, el producto de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La liberación de un fragmento de 1280 pb acreditó la clonación correcta de la secuencia.

Para analizar la aportación individual de los TSS y la caja TATA a la actividad transcripcional del promotor, a continuación, se realizaron eliminaciones de dichas secuencias por medio de mutagénesis sitio dirigida usando oligonucleótidos específicos (Tabla 2) y el paquete comercial QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Para ello se mezclaron 3.75 μ L de *buffer* de reacción (10X), \sim 100ng del promotor antisentido de *CACNG2* clonado en el vector pGL3-Basic, 2 μ L de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*), 1.25 μ L de la mezcla de dNTPs (10 mM), 2 μ L del

reactivo QuikSolution, 1 μ L de polimerasa (*PfuUltra* High Fidelity DNA polymerase) y el agua necesaria para llevar el volumen a 25 μ L.

Región funcional		Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')
TSS1	Sentido	GGAGGTAAGAAAGCTCACGGGTGTAAATTATAAAGATCACA
	Antisentido	TGTGATCTTTATAATTTACACCCGTGAGCTTTCTTACCTCC
TTS2	Sentido	CCCCACCCCCCAAGTGCCTTAATCT
	Antisentido	AGATTAAGGCACTTGGGGGGGTGGGGG
TATA	Sentido	ATGAATAGAGAATATGGAGAGAAGGGAGGTAAGAAAGCTCAC
	Antisentido	GTGAGCTTTCTTACCTCCCTTCTCTCCATATTCTTATTCAT

Tabla 2. Oligonucleótidos para la mutación sitio dirigida.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador de PCR (Thermo Scientific) de acuerdo con el protocolo resumido en la Tabla 3. Para verificar presencia de las eliminaciones deseadas, los productos amplificados se enviaron a secuenciación automática al Departamento de Genética y Biología Molecular (DGBM) del Cinvestav.

Mutagénesis sitio dirigida (Δ TSS1, Δ TSS2 y Δ TATA)				
	Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	1	95	2 min
Ciclo térmico	Desnaturalización		95	30 seg
	Alineamiento	25	55	1 min
	Extensión		68	14 min
	Extensión final	1	68	10 seg
	Final	1	4	∞

Tabla 3. Programa del termociclador usando durante los ensayos de mutagénesis sitio dirigida.

Con el objetivo de encontrar al promotor mínimo del gen del lncRNA, a continuación, se clonaron segmentos de su promotor en el vector pGL3-Basic, siguiendo dos estrategias tal y como se describe a continuación.

a) Eliminaciones secuenciales. En primer lugar, la región promotora antisentido de *CACNG2* clonada en el vector pGL3-Basic se incubó por separado con las enzimas *EcoRI* y *SmaI*. Como ya se mencionó como resultado de la acción de *EcoRI*, el vector originó dos secuencias linearizadas que al analizarse en un gel de agarosa se observan como dos bandas de 6098 y 416 pb. La banda más grande se utilizó para clonar, por recircularización, al segmento del promotor que se denominó fragmento D. Por otro lado, el uso de la enzima *SmaI* liberó 3 bandas de 5490, 401 y 623 pb. Nuevamente, la banda de mayor tamaño se clonó por recircularización y recibió el nombre de fragmento E, mientras que las bandas de 401 y 623 pb, se extrajeron del gel y se ligaron al vector pGL3-Basic linearizado con *SmaI* para obtener los fragmentos F y G, respectivamente. Con esta misma estrategia y a partir de las construcciones en que se habían eliminado los posibles sitios funcionales, se clonó al fragmento E. La identidad molecular de las secuencias clonadas se corroboró por análisis de restricción usando las endonucleasas que liberaban los fragmentos de interés. Los productos de dichas reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1%, en donde el fragmento liberado se observó como una banda del tamaño esperado. Para comprobar la clonación del fragmento D (1280 pb) se usó la enzima *KpnI*; en el caso del fragmento E (669 pb) se empleó *HindIII*, para el fragmento F (859 pb) se utilizaron *SacII* y *SphI*, mientras que el fragmento G (623 pb) se liberó del vector empleando la enzima *KpnI*.

b) Amplificación y ligación. Gracias al análisis bioinformático del promotor en sentido se localizó la secuencia del promotor en dirección antisentido (~1.3 kb). Por esta razón se planteó una segunda estrategia que únicamente consideró al promotor del lncRNA. Para ello se amplificó al promotor por PCR en secciones (fragmentos A, B y C) o combinaciones de estas (AB, BC y AC), usando oligonucleótidos específicos (Tabla 4), empleando como templado la secuencia del promotor en antisentido clonada en el vector pGL3-Basic.

Fragmento		Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')
A	Sentido	TTTTTCTCGAGCACCCAACCGACTTCTGGTT
	Antisentido	TTTTTAAGCTTATGGTGTTGAGAATTCGGCT
B	Sentido	TTTTTCTCGAGTTCTCATGGTCGGGACCTAGACA
	Antisentido	TTTTTAAGCTTGCCCACCCTGCAGCAAGACG
C	Sentido	TTTTTCTCGAGCGCGCGCCTGCCCCCACTC
	Antisentido	TTTTTAAGCTTCTCTGGGCACGTAGAGATGG
AB	Sentido	TTTTTCTCGAGCACCCAACCGACTTCTGGTT
	Antisentido	TTTTTAAGCTTGCCCACCCTGCAGCAAGACG
BC	Sentido	TTTTTCTCGAGTTCTCATGGTCGGGACCTAGACA
	Antisentido	TTTTTAAGCTTCTCTGGGCACGTAGAGATGG
AC	Sentido	TTTTTCTCGAGCACCCAACCGACTTCTGGTT
	Antisentido	TTTTTAAGCTTCTCTGGGCACGTAGAGATGG

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para clonar fragmentos del promotor del lncRNA.

Para la reacción de amplificación, se mezclaron 10 µL del *buffer* de la enzima (10X), 2 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM), 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de cada uno de los oligonucleótidos (10 µM), 1 µL de la enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µL) (Invitrogen), 1000 ng del templado y el agua necesaria para completar un volumen final de 100 µL. Para amplificar los fragmentos BC y AC se añadieron de 4 µL de DMSO (al 50%; Stratagene), que favorece la reacción, por lo que resultó necesario estandarizar las condiciones de amplificación, de acuerdo a las condiciones que se muestran en la Tabla 5.

Fragmentos A, B, C y AB				
Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	1	95	3 min	
Ciclo térmico	Desnaturalización	95	30 seg	
	Alineamiento	55	30 seg	
	Extensión	68	1 min	
Extensión final	1	68	10 min	
Final	1	4	∞	
Fragmentos BC y AC				
Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	1	95	3 min	
Ciclo térmico	Desnaturalización	95	30 seg	
	Alineamiento	60	30 seg	
	Extensión	68	2 min	
Extensión final	1	68	10 min	
Final	1	4	∞	

Tabla 5. Programa del termociclador usado para amplificar los fragmentos del promotor clonados mediante la segunda estrategia.

Los productos amplificados se ligaron en el vector de tránsito pCRTM2.1-TOPO, empleando el paquete comercial TA Cloning Kit (Invitrogen). Brevemente, en un tubo se mezclaron 2 μ L del vector pCR2.1 (25 ng/ μ L), 2 μ L del *buffer* de la ligasa T4, 1 μ L de la ExpressLink T4 DNA Ligase (5 U), la cantidad de amplificado necesario para alcanzar una relación 1:3 con el vector y la cantidad de agua necesaria para llevar el volumen final a 10 μ L. La mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente.

El producto de reacción de ligación se usó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α competentes de las cuales posteriormente se extrajo el ADN. Las construcciones se analizaron con las endonucleasas *HindIII* y *XhoI* y se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, donde la liberación de productos del tamaño esperado (401, 462, 453, 888, 897 y 1316 pb), confirmó la clonación de los fragmentos A, B, C, AB, BC y AC, respectivamente. Para reafirmar la identidad de los fragmentos, las construcciones se enviaron a secuenciación automática al DGBM del Cinvestav.

Asimismo, mediante el empleo del paquete comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) los fragmentos de interés se extrajeron de los geles donde habían sido separados por electroforesis. Una vez purificados y siguiendo la metodología ya descrita, se procedió a la ligación de cada uno de ellos en el vector pGL3-Basic (linearizado con *HindIII* y *XhoI*). Con las nuevas construcciones se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes y se extrajo el ADN. Para verificar la clonación y orientación correcta los fragmentos, las construcciones se analizaron una vez más con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* y también se enviaron a secuenciación automática.

Secuenciación automática de las construcciones

Como se describió en la sección precedente, la clonación de la mayoría de los fragmentos de interés se corroboró por secuenciación automática. Para ello se empleó el paquete comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Brevemente, en primer lugar, las construcciones de interés se extrajeron de las bacterias *E. coli* DH5 α competentes transformadas usando el paquete comercial PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), y posteriormente se amplificaron usando 500 ng de la construcción, 8 μ L del BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 1 μ L de oligonucleótido (100 ng/ μ L) y el agua necesaria para alcanzar un volumen final de 20 μ L. El vector de la construcción determinó el oligonucleótido (Tabla 6) y programa usado en el termociclador (Tabla 7).

Vector	Oligonucleótido	Marca comercial	Secuencia (5' → 3')
pGL3-Basic	ASP-pGL3-SEQ	SIGMA	TTATGTTTTTGGCGTCTTC
pCR™2.1-TOPO®	M13 Reverse	Invitrogen	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para secuenciación.

Fragmentos clonados en pGL3-Basic				
	Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	1	96	1 min
Ciclo térmico	Desnaturalización	40	96	10 seg
	Alineamiento		55	5 seg
	Extensión		60	4 min
	Final	1	4	∞
Fragmentos clonados en pCR™2.1-TOPO®				
	Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	1	96	1 min
Ciclo térmico	Desnaturalización	40	96	10 seg
	Alineamiento		52	5 seg
	Extensión		60	4 min
	Final	1	4	∞

Tabla 7. Programas del termociclador usados para amplificar los fragmentos que se secuenciaron.

Conviene recordar que antes de secuenciar es necesario precipitar los productos amplificados. Para ello, el volumen de la amplificación se mezcló con 5 µl de EDTA (125 mM) y 60 µl de etanol (al 100%). La mezcla se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a máxima velocidad por 20 min a 4°C. A continuación se retiró el sobrenadante y se agregaron 60 µl de etanol (al 70%). Después se centrifugó a máxima velocidad por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron nuevamente 60 µl de etanol (al 70%). Una vez más se centrifugó a máxima velocidad por 5 min y se desechó el sobrenadante. Finalmente, el tubo se dejó reposando durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la evaporación del solvente. Las muestras se

mandaron secuenciar al DGBM del Cinvestav-IPN. Una vez obtenidos los resultados, se analizaron con el *software* Vector NTI Advance 11.5 (Thermo Fisher Scientific).

Ensayos de bioluminiscencia

Los ensayos de bioluminiscencia son ampliamente utilizados para estudiar el control que tienen secuencias específicas de ADN sobre la expresión genética. Consisten básicamente en medir la actividad transcripcional de un promotor en función de la actividad de un gen reportero. Para ello es necesario clonar la posible región promotora en un vector como pGL3-Basic, el cual carece de promotor, pero contiene la secuencia que codifica para la enzima luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Fig. 14).

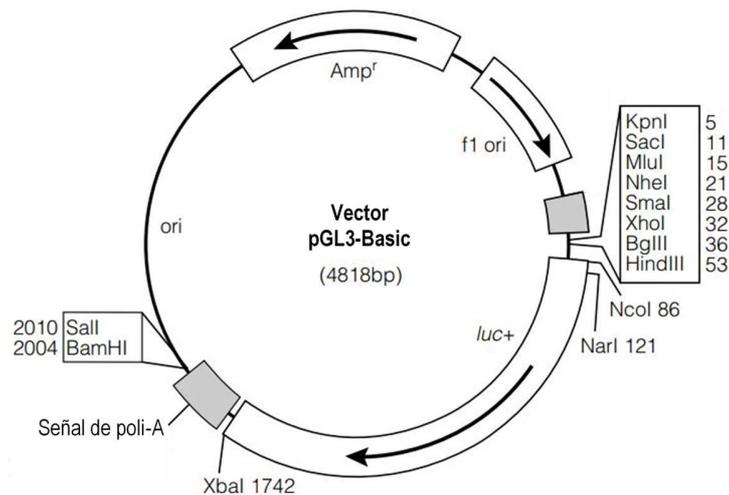


Figura 14. Mapa del vector de expresión pGL3-Basic. Amp^r es el gen que confiere resistencia a la ampicilina; f1 ori es el sitio de inicio de la replicación derivado del fago filamentososo; ori es el sitio de la replicación en *E. coli*; luc⁺ representa la secuencia de ADN que codifica para la luciferasa de la luciérnaga, y la señal de poli-A da estabilidad al transcrito. La flecha en luc⁺ y Amp^r señala la dirección de la transcripción, mientras que en f1 ori indica el sentido en que se sintetiza el ADN de cadena sencilla. Los recuadros indican sitios de clonación en el vector.

De esta forma, la producción de luciferasa se iniciará sólo en el caso de que la secuencia clonada en el vector tenga actividad promotora. La luciferasa sintetizada catalizará la reacción de la luciferina a oxiluciferina emitiendo luz a 560 nm (Fig. 15A), que se puede medir de manera rutinaria mediante un luminómetro.

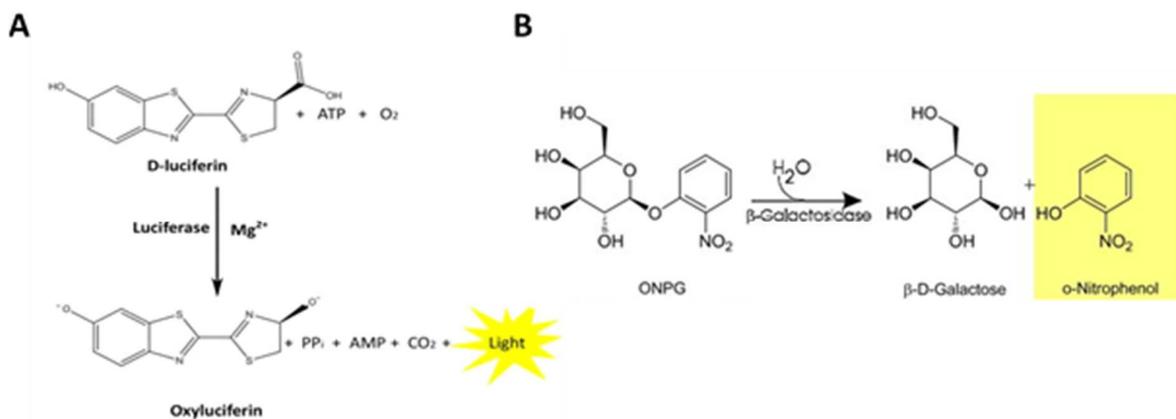


Figura 15. Reacción de bioluminiscencia. A) La reacción de la D-luciferina a oxiluciferina es catalizada por la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* emitiendo luz a 560 nm. B) Ensayo de actividad de la β-galactosidasa. Durante el proceso de hidrólisis que se realiza a través de la acción de la enzima β-galactosidasa, el ONPG se divide en dos residuos, galactosa y o-nitrofenol. ONPG es un compuesto incoloro, mientras que el o-nitrofenol es amarillo, proporcionando evidencia visual de la hidrólisis.

Cultivo celular y transfección transitoria

La mayoría de los experimentos presentados en el presente trabajo de tesis se realizaron empleando la línea celular N1E-115 (ATCC) como sistema modelo, la cual derivada de un neuroblastoma de ratón. Las células se mantuvieron en cajas Petri de 35 y 100 mm de diámetro en medio DMEM suplementado con 25 mM de glucosa (DMEM-HG), 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, estreptomicina (100 µg/mL) y

penicilina (100 U/mL), a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Asimismo, algunos de los experimentos se realizaron en la línea celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y (ATCC). En este caso, las células se sembraron en cajas de Petri de 35 mm de diámetro y se mantuvieron en las condiciones estándar de cultivo en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, estreptomina (100 µg/mL) y ampicilina (50 µg/mL).

En las células N1E-115 la transfección se realizó por triplicado con las construcciones del promotor clonado en pGL3-Basic 48 h antes de realizar el ensayo de bioluminiscencia. Para ello, las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm de diámetro, se llevaron a una confluencia del ~80% y posteriormente se realizó la transfección con ayuda del paquete comercial *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen). Brevemente, por cada transfección en un tubo de 1.5 mL se depositaron 100 µL de medio DMEM sin suplementos y 5 µL del reactivo de transfección (*Lipofectamine 2000*). Mientras tanto, en un segundo tubo se colocaron 100 µL de medio DMEM sin suplementos, 2 µg del plásmido que contenía al promotor clonado y 400 ng del plásmido pRSV-βgal (Promega). El vector pRSV-βgal contiene la secuencia codificante de la enzima β-galactosidasa, cuya actividad se utilizó para normalizar los datos y así eliminar la eficiencia de la transfección como una variable.

Los tubos se incubaron por separado durante 5 min y después se mezclaron. La mezcla se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 30 min, tiempo necesario para la formación de los complejos ADN-Lipofectamina. Durante la incubación se preparó la caja con las células N1E-115 retirando el medio de cultivo y lavando las células con 1 mL de PBS. Posteriormente se añadieron 800 µL de medio DMEM sin suplementos. Terminada incubación de la mezcla, se colocaron 200 µL en la caja y se incubó durante 6 h a 37°C en

una atmosfera con 5% de CO₂. Transcurridas las 6 h de transfección se agregó 1 mL de DMEM suplementado a la caja de cultivo y 24 h después de haber comenzado la transfección se cambió el medio de las cajas sustituyéndolo por 2 mL de medio fresco (DMEM suplementado).

Con anterioridad en nuestro laboratorio, se clonó la secuencia exónica del gen *ALO49749.1* (secuencia del lncRNA) a partir de una clona BAC (RP1-293L6) en el vector de expresión pAdTrack-CMV, que tiene codificada la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). Esta construcción se utilizó para transfectar células SHSY-5Y sembradas en cajas Petri de 60 mm de diámetro a una confluencia de ~80%, usando el reactivo *Lipofectamine 2000* siguiendo los pasos descritos a continuación. El medio se retiró de la caja y se sustituyó por 2 mL de medio DMEM sin suplementos. Las células se mantuvieron bajo las condiciones estándar de cultivo, mientras se preparaba el resto de los reactivos. En un tubo de 1.5 mL se colocó medio DMEM sin suplementos (250 µL) y el reactivo de transfección (20 µL), mientras que en un segundo tubo se puso DMEM sin suplementos (250 µL) y el vector con la secuencia clonada (12 µg). Ambos tubos se incubaron por separado durante 5 min y después se mezclaron. La mezcla se mantuvo reposando durante 5 min y luego se agregó a la caja de cultivo. Las células se incubaron por 5 h, al término de las cuales se completó el medio de cultivo con 2.5 mL de medio DMEM suplementado y se incubaron 48 h a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂.

Ensayos de actividad del promotor

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células N1E-115 se trataron con 200 μL de *buffer* de lisis (1X), del paquete comercial *Luciferase Assay System* (Promega) y dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 min. El lisado celular se recolectó en un tubo de 1.5 mL, se agitó (vórtex 15 s) y se centrifugó a 12000 x g (1 min). El sobrenadante se colocó en otro tubo y la concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA), para eliminar la cantidad de proteína como una variable. La medición de la actividad de la luciferasa se realizó en un tubo de 1.5 mL añadiendo 20 μg de proteínas y 100 μL del sustrato de la luciferasa (luciferina). La mezcla se colocó en el luminómetro (Modulus-Turner Biosystems) para medir las unidades relativas de luz (URLs), producto de la reacción catalizada por la luciferasa. La cantidad de luz producida es proporcional a la actividad transcripcional de la secuencia promotora clonada.

Con los extractos de proteínas se determinó la actividad de la β -galactosidasa. Esta enzima hidroliza al O-Nitro- β -D-galactósido (ONPG); si la reacción sucede en solución acuosa se produce una coloración amarilla (Fig. 15B). La medición se realizó en una caja de cultivo de 96 pozos en cada uno de los cuales se colocaron 20 μg de proteínas de las muestras y se llevaron a un volumen final de 50 μL con agua. A continuación, en cada pozo se añadieron 50 μL de ONPG (2X) e incubaron a 37°C hasta que el contenido adoptara la coloración amarilla característica. Para detener la reacción se añadieron 150 μL de carbonato de sodio (1M) y finalmente la absorbancia se midió a 420 nm. Con los datos obtenidos se normalizó la medición de la actividad de la luciferasa y así eliminar la

eficiencia de la transfección como una variable del ensayo de medición de la actividad transcripcional dirigida por el promotor de interés.

Western blot semicuantitativo

Para el análisis semicuantitativo por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) en primer lugar se extrajeron las proteínas de las células SH-SY5Y transfectadas con la secuencia exónica del lncRNA. Las células se lavaron con PBS (1 mL), y posteriormente se incubaron en *buffer* de lisis RIPA (150 μ L) durante 30 min en hielo. A continuación, la muestra se centrifugó a 15,000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se depositó en un tubo nuevo y la concentración de proteínas, presentes en el sobrenadante, se cuantificó con el método de Bradford. Posteriormente, 60 μ g de las proteínas se mezclaron con *buffer* Laemmli y se calentaron por 5 min a 95°C y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10% en donde se separaron por electroforesis. A continuación, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF, la cual se lavó con TBST (1X) y se bloqueó con leche en solución (5%). Finalmente, la membrana se incubó durante toda la noche con los anticuerpos primarios anti Cav γ ₂ (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) o anti-actina (dilución 1:200; generosamente donado por el Dr. Manuel Hernández; DBC, Cinvestav). Al siguiente día las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución 1:5000; anti-mouse) a temperatura ambiente por 1 h. La señal de quimioluminiscencia emitida se observó con el equipo Odyssey Fc (LI-COR).

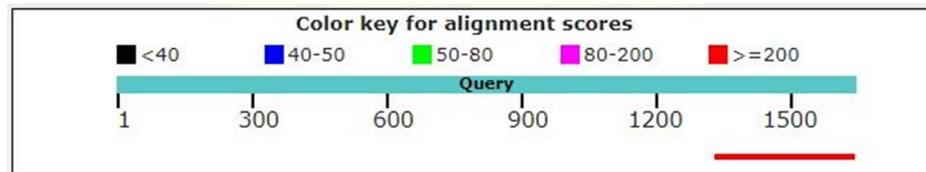
Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el programa Sigma Plot 12.3 (Systat Software Inc.). Las gráficas presentan la media \pm el error estándar de los datos obtenidos. Se estableció que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el valor de P resultaba <0.05 , utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

RESULTADOS

Características del promotor del lncRNA

Como ya mencionó anteriormente, en experimentos previos del laboratorio se logró la clonación de una secuencia río arriba de la región UTR-5' del gen *CACNG2* que codifica para la subunidad $Ca_v\gamma_2$ de los canales de Ca^{2+} de tipo HVA. Esta secuencia corresponde al promotor de *CACNG2* en dirección antisentido, tiene un tamaño de ~1.6 kb y posiblemente se trata de un promotor para la transcripción de un lncRNA. Sin embargo, el análisis bioinformático inicial reveló que las últimas 312 pb de la secuencia clonada incluían a la primera parte de la secuencia del gen *CACNG2* (Fig. 16), específicamente la región donde se localiza el primer exón, de tal suerte que la región promotora del gen que codifica para el lncRNA, tendría un tamaño aproximado de ~1.3 kb. En este trabajo la región de ~1.3 kb se clonó mediante una estrategia basada en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligonucleótidos específicos. Ambas construcciones, el promotor en dirección antisentido del gen para *CACNG2* (~1.6 kb) y la secuencia de ~1.3 kb a la que en adelante se llamará promotor del gen para el lncRNA, se analizaron y compararon tanto bioinformática como experimentalmente tal y como se describe en las secciones siguientes.

A**B**

```

Query 1324 ATCACAGTCAGACGGGCACAAAACCTTCAACCAGCCGTTTCTCTGCCTGGAAGCGGCGAAC 1383
Sbjct 1 ATCACAGTCAGACGGGCACAAAACCTTCAACCAGCCGTTTCTCTGCCTGGAAGCGGCGAAC 60
Query 1384 ATGTAACCTGGACGGGTAATTACAAACACGTCtttatgtgttttttaaatcattgttttc 1443
Sbjct 61 ATGTAACCTGGACGGGTAATTACAAACACGTCtttatgtgttttttaaatcattgttttc 120
Query 1444 accttgctttgctggggatttgttttatttttettgTCCGTTAGATGTATCTTCTTTCGG 1503
Sbjct 121 ACTTTGCTTTGCTGGGGATTGTTTTATTTTGTGGTCCGTTAGATGTATCTTCTTTCGG 180
Query 1504 TTTTCctctctctctctcttttgcctctctctctgcttaccagggggtgctgattgctctgtg 1563
Sbjct 181 TTTTCCTCTCTCTTCTCTTTGTCTCTCTCTGGCTTACCAGGGGGTGTGCATTGCTCTGTG 240
Query 1564 tctctctgtAGTTTTCCGTGAAATTCCAAATCTTGCTTCTACAAGCAGACATTTTGGGAA 1623
Sbjct 241 TCTCTCTGTAGTTTTCCGTGAAATTCCAAATCTTGCTTCTACAAGCAGACATTTTGGGAA 300
Query 1624 GATTATTCGTGG 1635
Sbjct 301 GATTATTCGTGG 312

```

Figura 16. Alineamiento de la secuencia del gen del lncRNA y el promotor de *CACNG2* en dirección antisentido. A) Las últimas bases del promotor antisentido de *CACNG2* (Query) son las mismas que se localizan en la primera parte de la secuencia del lncRNA (línea roja, Sbjct). B) Un análisis más detallado indica que las secuencias coinciden en ~300 pb, por lo que promotor podría tener un tamaño de ~1.3 kb.

Asimismo, el análisis *in silico* de la secuencia del promotor de *CACNG2* en dirección antisentido, muestra la presencia de 3 nucleótidos (en las posiciones 168, 304 y 1132), con altas posibilidades de ser sitios de inicio de la transcripción (Fig. 17A). Además, se identificaron algunas secuencias reguladoras como la presencia de una caja TATA (entre las bases 136 y 141) y una isla CpG (entre los nucleótidos 639 y 1072), así como una secuencia Kozak que inicia en la posición 1108 (Fig. 17B). Todos los elementos se encuentran en la cadena sentido de la secuencia. Por su posición es probable que, de ser funcionales, los primeros TSS (TSS1 y TSS2) sean regulados por la caja TATA. La transcripción en el tercer sitio (TSS3) puede ser controlada por una isla CpG (Fig. 17C).

promotor antisentido del gen *CACNG2* y del lncRNA. Los promotores tienen ~1.6 kb (promotor antisentido del gen *CACNG2*, *CACNG2* Ant) y ~1.3kb (promotor del gen para el lncRNA). Ambos presentan 3 posibles sitios de inicio de la transcripción, caja TATA, isla CpG y secuencia Kozak. De lado derecho se indica la posición en la secuencia del promotor.

Clonación y análisis del promotor del gen que codifica para el lncRNA

Con la estrategia de amplificación y ligación (véase sección de Materiales y Métodos) se clonó la secuencia de 1.3 kb (Fragmento AC), correspondiente al promotor del gen para el lncRNA (Fig. 18A). Empleando esta nueva construcción y la del promotor antisentido gen *CACNG2*, previamente clonado en el laboratorio, se realizaron ensayos de bioluminiscencia con el objetivo de determinar la actividad transcripcional de ambas construcciones. Los datos normalizados muestran que no existen diferencias significativas entre la actividad transcripcional de ambas secuencias (Fig. 18B).

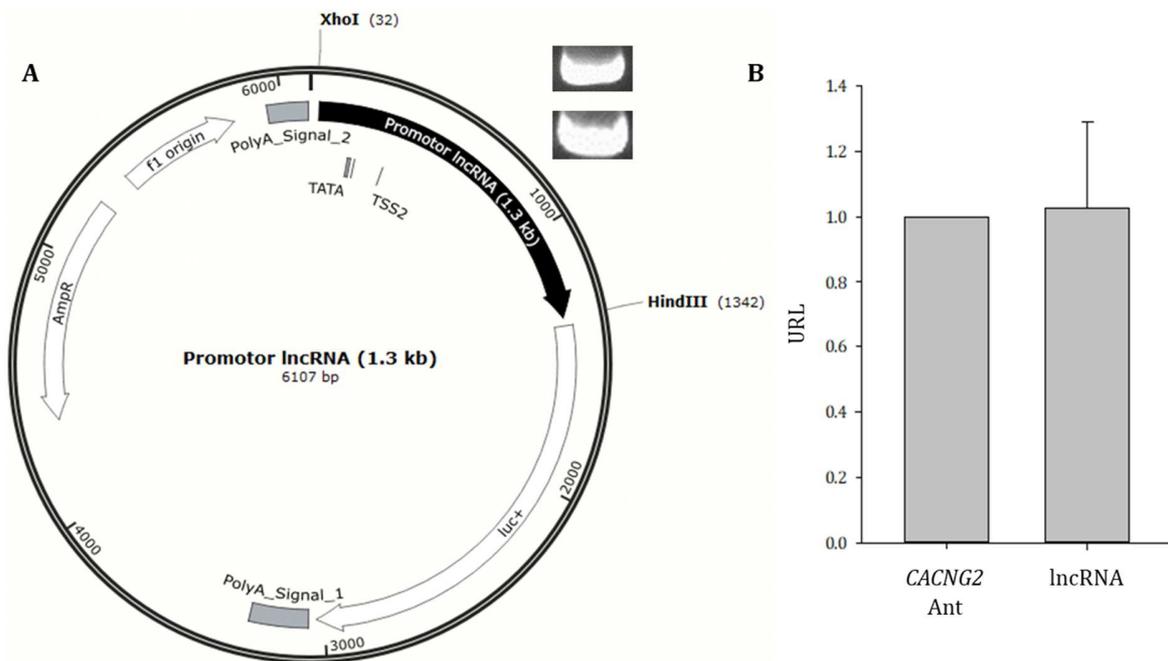


Figura 18. Clonación en el vector pGL3-Basic y análisis funcional del promotor del gen para el lncRNA. A) Mapa del vector de expresión pGL3-Basic; en negro se indica la localización y dirección de la secuencia del promotor del gen para el lncRNA. Para obtener la construcción, el amplificado de la secuencia se ligó en el vector de tránsito pCR2.1-TOPO, y la clonación se corroboró mediante el uso de las enzimas *XhoI* y *HindIII* (inserto superior). La clonación del promotor del gen para el lncRNA se comprobó con la liberación de dicho fragmento con las endonucleasas *XhoI* y *HindIII* (inserto inferior). B) Análisis de la actividad del promotor del lncRNA. Comparación entre la actividad transcripcional del promotor del gen para el lncRNA y la secuencia antisentido del promotor de *CACNG2* expresada en células N13-115 (n=3).

Con la finalidad de determinar experimentalmente la funcionalidad de los dominios reguladores identificados en el promotor del gen para el lncRNA (TSS1, TSS2 y la caja TATA; Fig. 17), a continuación, se clonó a un fragmento del promotor al que se llamó Fragmento D, en la cual se eliminó la región que contiene los sitios funcionales (Fig. 19). Los resultados de este análisis muestran que la actividad transcripcional del promotor

del gen para el lncRNA se abate por completo al eliminar los dos primeros TSS y la caja TATA.

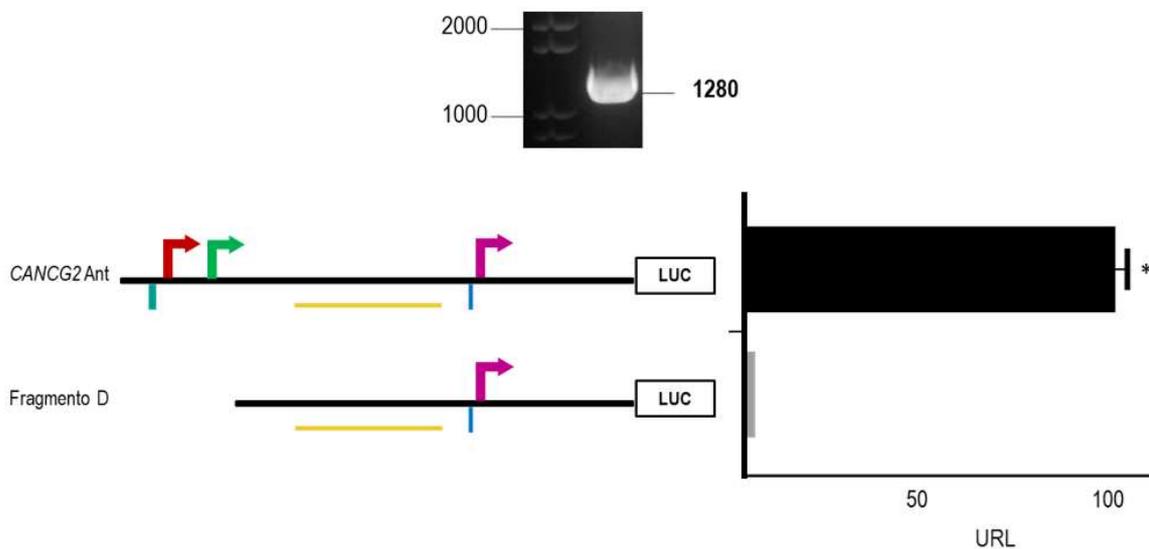


Figura 19. Efecto de la eliminación de algunos sitios reguladores sobre la actividad transcripcional del promotor antisentido de *CACNG2*. A partir del promotor antisentido de *CACNG2* se clonó el fragmento D en el vector pGL3-Basic, lo cual se corroboró por la liberación de una banda de 1280 pb al incubar con *KpnI* (inserto). La comparación de los resultados de los ensayos de bioluminiscencia muestra una disminución drástica en la actividad transcripcional cuando no están presentes los TSS1 (flecha roja), TSS2 (flecha verde) y la caja TATA (línea verde).

La aportación individual de los TSS1, TSS2 y la caja TATA a la actividad transcripcional se analizó a continuación mediante su eliminación por mutagénesis sitio dirigida. La presencia de las mutaciones se corroboró mediante secuenciación automática y posterior alineamiento de las secuencias de interés (Fig. 20A). Los resultados de estos ensayos muestran que la actividad transcripcional se ve disminuida significativamente al eliminar tanto los 2 TSS como la caja TATA (Fig. 20B). Estos datos corroboran los resultados previos usando fragmento D (Fig. 19), una construcción en la que se eliminan conjuntamente los TSS y la caja TATA. Interesantemente, la disminución

en la actividad transcripcional del fragmento D es aún mayor que el que presentan las construcciones con las mutaciones individuales (Fig. 20B).

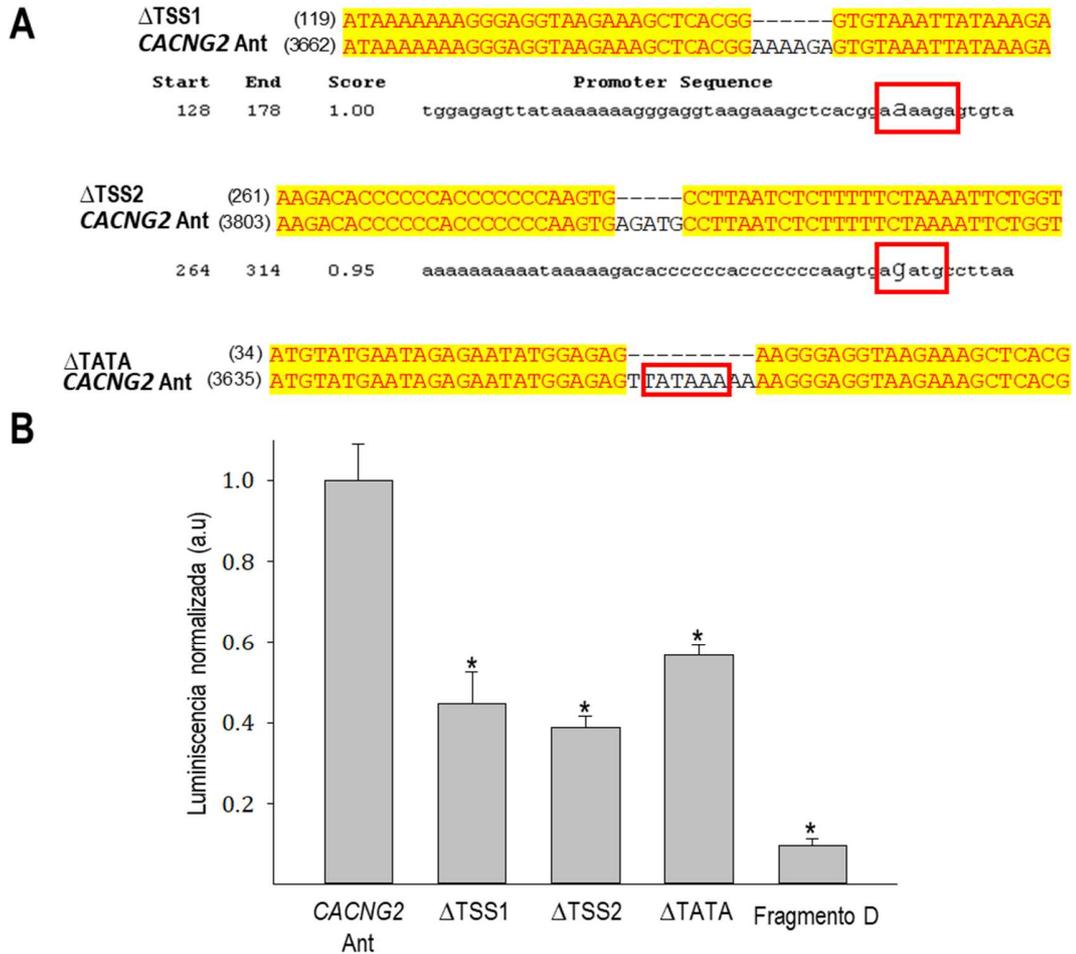


Figura 20. La ausencia de los sitios TSS1, TSS2 y la caja TATA disminuye la actividad transcripcional del promotor. A) La eliminación de los sitios TSS 1 (Δ TSS1), TSS2 (Δ TSS2) y la caja TATA (Δ TATA) se realizó por mutagénesis dirigida en la secuencia antisentido del promotor del gen *CACNG2*. B) Comparación de los resultados de los ensayos de bioluminiscencia usando las construcciones indicadas en (A) así como el fragmento D. La eliminación de los sitios reguladores provoca una disminución en la actividad transcripcional del promotor. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; $n = 3$).

Para analizar con más detalle la estructura y función del promotor, a continuación, mediante la estrategia de eliminaciones secuenciales se planteó clonar los fragmentos E, F y G del promotor antisentido de *CACNG2* tal y como muestra en la Figura 21. Una vez obtenidas las construcciones, se procedió a realizar los ensayos de bioluminiscencia. Cabe recordar que en el fragmento D se eliminó una región que contiene los 3 sitios TSS y la caja TATA; en el fragmento E también se eliminaron por mutagénesis sitio dirigida los sitios TSS1, TSS2 y la caja TATA. Las construcciones F y G corresponden a la eliminación de regiones de mayor tamaño en el promotor. Es importante mencionar aquí que se logró la clonación y expresión de todas las construcciones con excepción del fragmento G (Fig. 21B), en el cual se continúa trabajando.

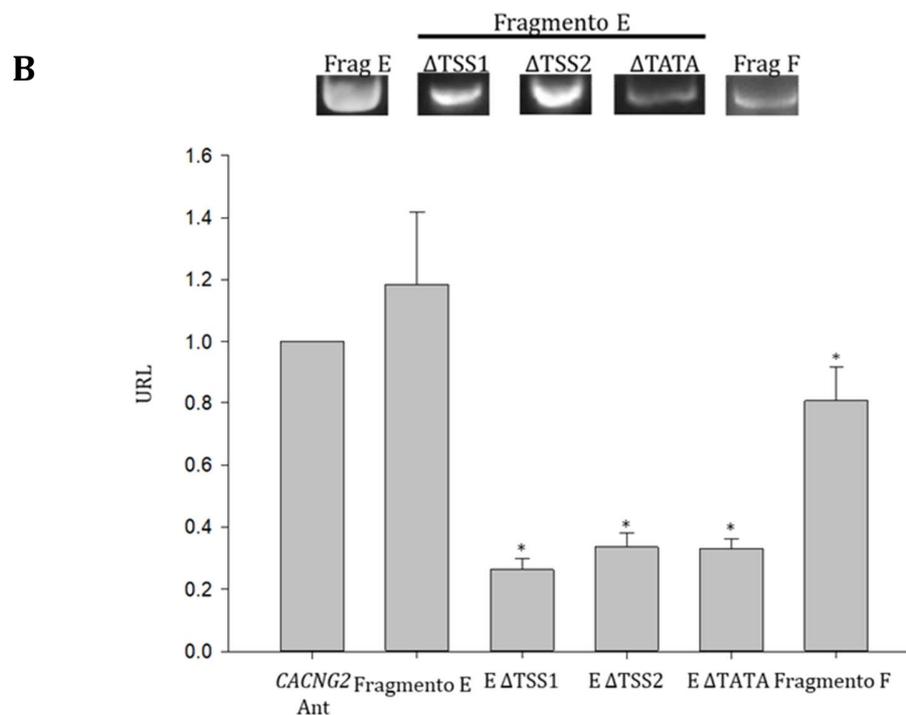
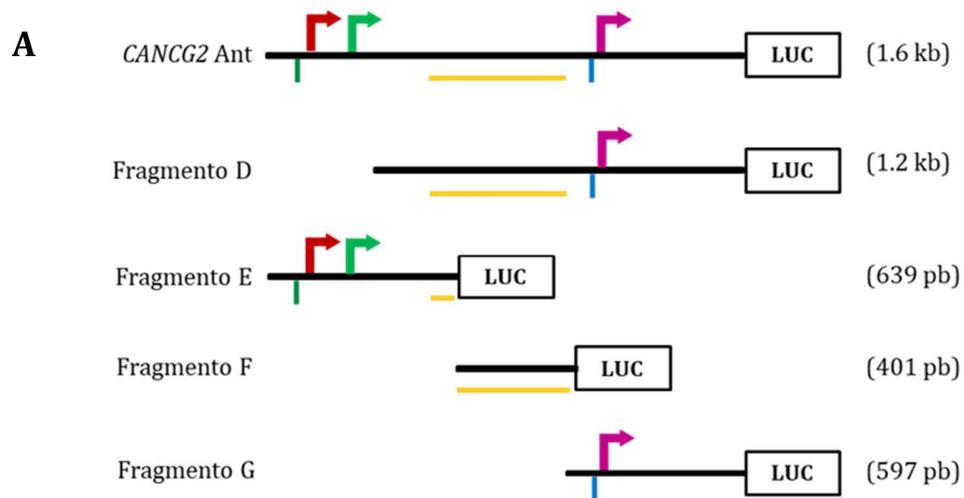


Figura 21. Clonación y análisis de fragmentos obtenidos por eliminaciones secuenciales del promotor antisentido del gen *CACNG2*. A) Esquema de las construcciones del promotor. B) Actividad transcripcional de los fragmentos clonados por eliminaciones secuenciales. Con excepción de la clonación del fragmento G, todas las construcciones se obtuvieron y se verificaron mediante el uso de la enzima *Hind*III (fragmento E), *Sac*II y *Sph*I (fragmento F). Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; $n = 3$).

Los resultados de los ensayos de bioluminiscencia muestran que no existen diferencias significativas entre la actividad transcripcional del promotor antisentido del gen *CACNG2* y del Fragmento E silvestre, es decir cuando no se realizan mutaciones puntuales en los TSS y la caja TATA (Fig. 21B). Sin embargo, su actividad disminuye drásticamente al eliminar los sitios funcionales. Estos datos sugieren que el promotor mínimo del gen se localiza en esta región de 639 pb. Cabe mencionar aquí que, contrario a lo que se esperaba, el fragmento F presentó una actividad transcripcional importante pese a carecer de los sitios funcionales mencionados. La explicación para esta discrepancia aún no se conoce pero pudiera estar relacionada con la eliminación de algún sitio de unión a uno o algunos factores de transcripción inhibidores presentes en la región del promotor eliminada. Esta es una pregunta interesante que motivará estudios futuros.

Por su parte, la actividad transcripcional del posible promotor del gen para el lncRNA se analizó clonándolo en fragmentos con la estrategia de amplificación y ligación descrita (Fig. 22). Brevemente, primero se amplificó cada uno de los fragmentos de interés, y después los fragmentos se clonaron primero en el vector pCR2.1-TOPO y posteriormente en pGL3-Basic.

De las construcciones planteadas (Fig. 22A), hasta la fecha se han logrado obtener tres de ellas, que corresponden a los fragmentos C, AC y BC, en el vector de expresión pGL3-Basic. A continuación, se procedió a realizar los ensayos de bioluminiscencia de los fragmentos C, AC y BC. Los resultados de este análisis indican que las 3 construcciones presentan una actividad transcripcional similar o mayor que el promotor antisentido de *CACNG2* (Fig. 23).

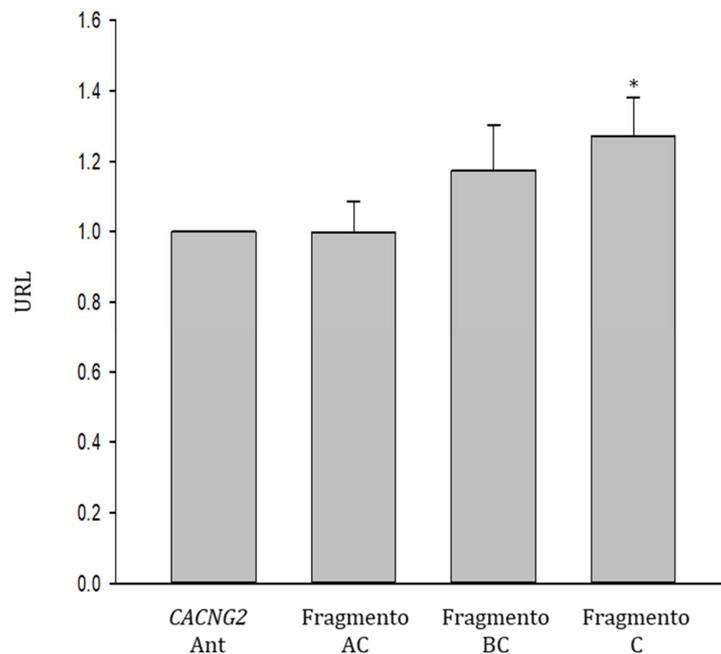


Figura 23. Actividad transcripcional de los fragmentos clonados por amplificación y ligación. Las construcciones, obtenidas con esta estrategia, presentan actividad transcripcional igual o incluso mayor que el promotor *CACNG2* en dirección antisentido. En el caso del fragmento C, el aumento es estadísticamente significativo ($p < 0.05$; $n = 3$).

Un análisis bioinformático más detallado del promotor señaló que cerca de los TSS existen sitios de unión a distintos factores de transcripción y otros elementos que no habían sido considerados en los análisis anteriores realizados en el laboratorio, y que

podrían estar modificando la actividad transcripcional (Tabla 8). Entre ellos se encuentran sitios de unión de los factores de choque térmico y los factores de transcripción ZF5, PAX-2, EGR, TGF- β , entre otros. Es importante resaltar que también se reveló la presencia de una señal de transducción y de activación de la transcripción en las mismas bases donde se localiza el TSS3.

Sitio funcional	Información detallada	Base de inicio	Base final	Sitio de anclaje
TSS1	Heat shock factors	142	166	154
	Heat shock factors	184	208	196
	Krueppel like transcription factors	136	154	145
	PAX-2 binding sites	205	227	216
	TGF-beta induced apoptosis proteins	27	33	30
TSS2	TGF-beta induced apoptosis proteins	170	176	173
	PAX-2 binding sites	205	227	216
	PAX-2 binding sites	235	257	246
TSS3	TGF-beta induced apoptosis proteins	170	176	173
	E2F-myc activator/cell cycle regulator	892	908	900
	E2F-myc activator/cell cycle regulator	967	983	975
	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	1059	1077	1068
	Myc associated zinc fingers	1007	1019	1013
	PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	976	994	985
	ZF5 POZ domain zinc finger	891	905	898
	ZF5 POZ domain zinc finger	968	982	975
	ZF5 POZ domain zinc finger	1010	1024	1017
	ZF5 POZ domain zinc finger	1106	1120	1113
Signal transducer and activator of transcription	1131	1149	1140	
Human and murine ETS1 factors	1132	1152	1142	

Tabla 8. Factores de transcripción y elementos reguladores cercanos a los TSS. Se muestran los factores que en teoría se unen en los 200 pb río arriba de cada TSS y que podrían estar alterando la actividad transcripcional del promotor.

Caracterización *in silico* de la secuencia del lncRNA

La caracterización del lncRNA inició con la búsqueda de posibles marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *open reading frames*) y de secuencias Kozak en la secuencia completa del gen *AL049749.1* (Fig. 24). Ninguno de los ORFs encontrados tiene un

tamaño >400 pb y 3 de ellos presentan secuencias Kozak, lo cual sugiere que podrían traducirse y dar lugar a péptidos pequeños. Las secuencias de aminoácidos de los 3 ORFs se buscaron en la base de datos del NCBI, pero no se encontraron coincidencias con secuencias peptídicas reportadas en las bases de datos.

Label	Strand ↕	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF51	+	2	13802	14200	399 132
ORF45	+	2	7463	7825	363 120
ORF73	+	3	7542	7898	357 118
ORF68	+	3	5430	5786	357 118
ORF89	+	3	17193	17486	294 97
ORF60	+	3	2175	2456	282 93
ORF71	+	3	6972	7250	279 92
ORF21	+	1	11317	11580	264 87
ORF26	+	1	13627	13857	231 76
ORF46	+	2	9011	9241	231 76

No. of ATG from 5' end	Reliability	Frame	Identity to Kozak rule A/GXXATGG	Start (bp)	Finish (bp)	ORF Length (aa)	Stop codon found?	Sequence
127	0.28	3	GXXATGG	6972	7247	92	Yes	METVRCQTPTWASKVERGHRMALHGLVTRLSPLTAPLSCLPSSQISLPLSLDPGLPTQGLDITVSPGPRISWHRARALFPTGVCSEPN
34	0.21	3	AXXATGc	2175	2453	93	Yes	MHSISVGFLSFLLPSTSKLASSFSSSSSPPPPSSSSPSSSSSSSSSSSSSSFFLFFLFFLMGSPCITQAGVQWHDLGSTPSPGFK
111	0.20	1	cXXATGc	6070	6288	73	Yes	MLEHPLQKGLDGAVGPGAGREGDVMRWQVLLLTSGNCPENLREPQDLMPKEAGVVGRAGLTKLRKMDVLKGS
138	0.20	3	GXXATGG	7542	7895	118	Yes	MAWLEYPRRAGLELCTGRTMGS LGEDNGWLQRSLGRVPEVVKREETEGT SFHVDVGRSRRRCQDCWQPCRLGSGSWGSGSSLMQASIVASSDNLRS HWPCLENGGSITCLEVLF
119	0.19	3	GXXATGa	6459	6662	68	Yes	MRFPKLNYSKENS DSKLITKLQIRKNEIKNVHIKMQRSKKNMISWPGV VAHTCNPSTLGGGRQIT

Figura 24. Análisis de la secuencia del gen para el lncRNA. El análisis muestra los ORFs presentes en la secuencia del posible lncRNA. Ninguno de ellos tiene un tamaño mayor a 400 pb. Existen 3 ORFs (ORF73, ORF60 y ORF71) con secuencia Kozak.

Por otro lado, a partir de la secuencia exónica del gen *ALO49749.1* se determinó la estructura secundaria teórica del lncRNA (Fig. 25). El análisis bioinformático indicó que la energía libre de la secuencia es de -173.60 kcal/mol, mientras que para el caso de la estructura secundaria más estable el valor es de -185.43 kcal/mol. Dado que en ambos

casos la cifra es negativa, es probable que las estructuras sean termodinámicamente estables y pudieran existir *in vivo*.

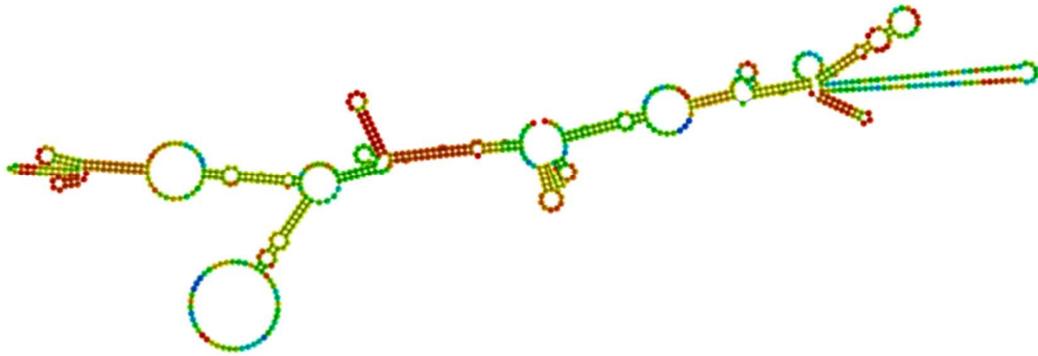


Figura 25. Estructura secundaria del lncRNA determinada *in silico*. El análisis bioinformático señala que la secuencia exónica gen *ALO49749.1* y su estructura secundaria tienen una energía libre de -173.60 kcal/mol y -185.43 kcal/mol, respectivamente. Ya que los valores son negativos, las moléculas son termodinámicamente estables. Los puntos rojos indican la probabilidad de que una base se localice en dicha posición.

Efecto del lncRNA sobre la expresión de la subunidad $Ca_v\gamma_2$

Por último, se decidió estudiar si la expresión del lncRNA podía tener algún efecto sobre la expresión de la subunidad $Ca_v\gamma_2$. Para ello, la secuencia exónica del gen *ALO49749.1* (lncRNA) se clonó en el vector pAdTrack-CMV y se transfectó en células SHSY-115, para posteriormente medir la expresión de la subunidad $Ca_v\gamma_2$ de los canales de calcio mediante *Western blot*. De manera interesante, los resultados de este análisis sugieren que la presencia del lncRNA induce un aumento significativo (~75%) en la expresión de $Ca_v\gamma_2$ (Fig. 26).

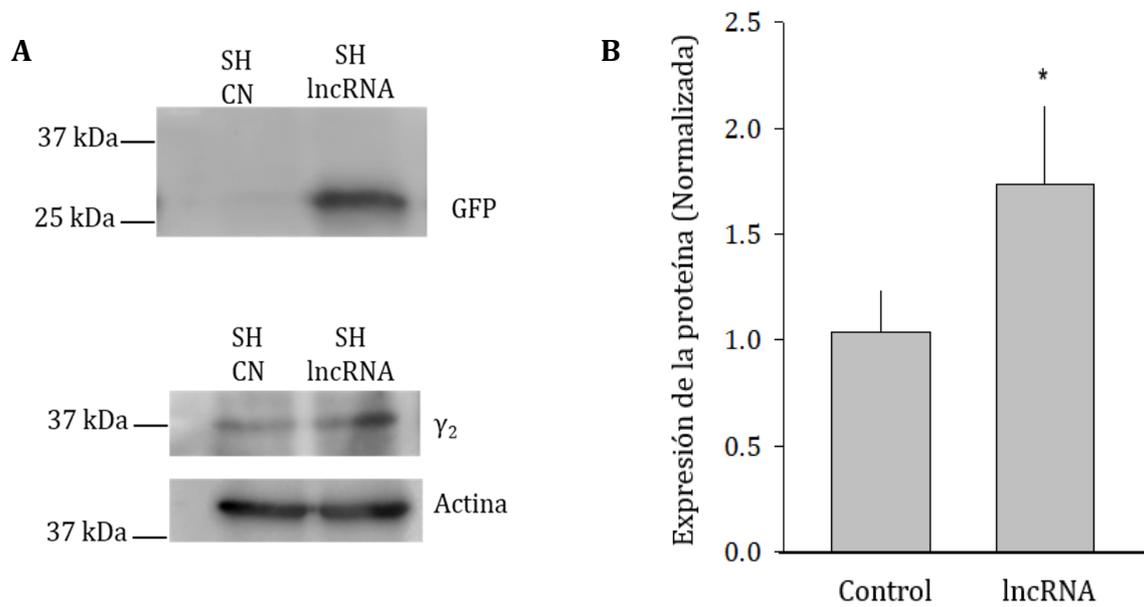


Figura 26. El lncRNA regula la expresión de la subunidad $\text{Ca}_V\gamma_2$. A) El análisis por *Western blot* muestra una mayor expresión de $\text{Ca}_V\gamma_2$. (γ_2) en las células en que se coexpresa el lncRNA con respecto a la condición control (CN) en ausencia del lncRNA. La expresión de GFP, codificada en el vector pAdTrack-CMV, sirvió como control de transfección y la actina como control de carga. B) Comparación del nivel de expresión de $\text{Ca}_V\gamma_2$ en ausencia y en presencia del lncRNA. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; $n = 5$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se presentan las primeras evidencias experimentales sobre la identificación y caracterización del promotor proximal de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\gamma_2$ de los canales de Ca^{2+} HVA. Anteriormente, en nuestro laboratorio se aisló y clonó una secuencia de ~1.6 kb de la región no traducida 5' del gen *CACNG2*, en dirección tanto sentido como antisentido. Los ensayos de bioluminiscencia iniciales revelaron que ambas construcciones presentaban actividad transcripcional e incluso ésta era mayor en la dirección antisentido. Con estos datos, resultó razonable plantear la interesante hipótesis de que se trataba de un promotor bidireccional. Una búsqueda en bases de datos Ensembl reveló que en dirección opuesta a la posición de *CACNG2*, se localiza el gen *ALO49749.1* de 2 exones que da lugar a un transcrito de 632 pb sin función aún conocida.

Debido a las características de su transcrito, el producto génico de *ALO49749.1* podría ser un lncRNA. Como se mencionó con anterioridad, los lncRNA son secuencias de ARN que no codifican proteínas, pero que se encuentran principalmente involucradas en la regulación de la transcripción y traducción de los ARN mensajeros (Hombach & Kretz, 2016). El objetivo central del trabajo fue caracterizar al promotor proximal del posible lncRNA codificado en la región 5'UTR río arriba del gen *CACNG2* de la subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2$ de los canales de Ca^{2+} .

Hallazgos principales

El promotor del lncRNA abarca una región de ~1.3 kb. El análisis bioinformático indicó la presencia de 3 sitios probables de inicio de la transcripción (TSS1, TSS2 y TSS3), en las posiciones 168, 304 y 1132, respectivamente. Cerca de los primeros dos primeros TSS se identificó una caja TATA (entre las bases 136 y 141), que podía estar involucrada en la transcripción de estos dos sitios. Además de una isla CpG entre las bases 639 y 1072. Las islas CpG son regiones del genoma ricas en cisteínas y guaninas, de ~1000 pb, que en muchos casos regulan la transcripción del genoma en promotores que carecen de caja TATA (Deaton & Bird, 2011). Por la posición de la isla identificada en el promotor del lncRNA, ésta podría estar regulando la actividad de TSS3.

Asimismo, aquí se muestra evidencia experimental de que los primeros 639 pb del promotor del lncRNA (donde se localizan TSS1, TSS2 y la caja TATA) pueden actuar como promotor mínimo. Esta inferencia se basa en el hecho de que al eliminar individualmente estos sitios o la región que los contiene, la actividad transcripcional se ve disminuida o se pierde por completo. Sin embargo, cabe hacer notar que fragmentos del promotor que conservan al TSS3 también presentan actividad transcripcional. En este contexto, el análisis bioinformático reveló la existencia de una señal activadora de la transcripción cerca de este sitio (Tabla 8). Además, la existencia de la isla CpG sugiere que el TSS3 podría ser funcional, ya que se ha reportado la existencia de promotores con varios sitios de inicio de la transcripción. Un ejemplo es el caso del gen *CACNA1G*, en cuyo promotor de ~1.3 kb existen dos TSS funcionales activados por SP1 (Bertolesi *et al.*, 2003; González-Ramírez *et al.*, 2014).

Entre los factores de transcripción que teóricamente podrían estarse uniendo en regiones cercanas a los TSS y regular su actividad, destacan los miembros de la familia PAX, importantes en el desarrollo embrionario del sistema nervioso central y otros tejidos (Blake & Ziman, 2014). Otro ejemplo es ZF5, que se sabe reprime la expresión del protooncogén *c-Myc* (Numoto *et al.*, 1999). Asimismo, se sabe que el factor de transcripción EGR interacciona con el promotor del gen *CACNA1H* favoreciendo la transcripción de la subunidad $Ca_v\alpha_1$ en los canales $Ca_v3.2$ (van Loo *et al.*, 2012).

Por otro lado, la secuencia Kozak señala el sitio de inicio de la traducción de proteínas en el ARN mensajero de eucariontes, está conformada por unos cuantos nucleótidos río arriba del codón de inicio (ATG) y el primer nucleótido río abajo (Kozak, 1999). De manera interesante, el análisis *in silico* reveló la existencia de una secuencia Kozak en el promotor del gen para el lncRNA. Sin embargo, ésta se localiza antes del TSS3, y el fragmento que presuntamente traduce no coincide con la secuencia del primer exón del lncRNA (Fig. 19 y 21), lo que sugiere que dicho sitio podría no ser funcional.

Asimismo, en la secuencia del gen *ALO49749.1* se encontraron 3 marcos de lectura abiertos (ORFs), cuya localización coincide con la presencia de las secuencias Kozak. Sin embargo, no tienen más de 400 pb y su secuencia de aminoácidos no coincide con ninguna secuencia de las proteínas reportadas en las bases de datos consultadas. Estos datos sugieren que el producto de la transcripción dirigida por el promotor bajo estudio no es una proteína. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que la secuencia exónica del gen es, al menos en teoría, capaz de formar estructuras secundarias de ARN termodinámicamente estables.

En la actualidad se sabe que muchos de los promotores bidireccionales dan origen a ARNs no codificantes y a un mensajero codificante de proteínas. Existe evidencia experimental que señala que el ARN no codificante podría modificar la expresión de la proteína codificada en dirección antisentido (Wei *et al.*, 2011). Los resultados aquí mostrados sugieren fuertemente que la secuencia del lncRNA provoca un aumento en la expresión de la subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2$, con lo que se refuerza la idea de que el promotor de *CACNG2* es bidireccional y que uno de sus productos génicos es un ARN no codificante.

Desde el punto de vista funcional, un aumento en la expresión de la subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2$ podría tener importantes implicaciones fisiológicas. En la membrana presináptica $\text{Ca}_v\gamma_2$ interacciona con la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, provocando una reducción en las corrientes de Ca^{2+} (Sandoval *et al.*, 2007a). En consecuencia tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de neurotransmisores (incluido el glutamato) en la hendidura sináptica. Las propiedades inhibitorias de $\text{Ca}_v\gamma_2$ se verían intensificadas por la presencia del lncRNA. Por otra parte, en la membrana postsináptica, $\text{Ca}_v\gamma_2$ aumenta la activación y expresión de los receptores AMPA (Tomita *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007), lo que contribuye a la despolarización de la neurona postsináptica. Así, $\text{Ca}_v\gamma_2$ podría tener un efecto autorregulatorio en la sinapsis.

A partir de estos datos se puede inferir que un aumento la expresión de $\text{Ca}_v\gamma_2$, provocada por la presencia del lncRNA, resulta en una sobreexpresión de los receptores AMPA. Sin embargo, no se ha comprobado experimentalmente el efecto del lncRNA sobre estos receptores. Hasta ahora se sabe que, en el ratón *stargazer*, una disminución en la expresión de $\text{Ca}_v\gamma_2$ va acompañada de una pérdida en la cantidad de receptores AMPA funcionales y la aparición de un fenotipo muy particular que hace de este animal un

modelo muy útil para el estudio de padecimientos neuronales como la epilepsia (Kang & Campbell, 2003; Letts *et al.*, 2003; Letts, 2005).

Perspectivas

En este trabajo se presentan los primeros resultados de caracterización del promotor del gen *CACNG2* en dirección antisentido. A corto plazo se pretende obtener todas las construcciones del promotor que originalmente se habían planteado, y corroborar experimentalmente la funcionalidad del tercer sitio de inicio de la transcripción (TSS3), haciendo la eliminación de las bases que lo conforman. Además, se desea determinar cuáles son los factores de transcripción que pudieran estar involucrados en la regulación de la expresión del lncRNA por medio de ensayos de cambios en la movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés) o por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés).

En el largo plazo, se planea clonar al promotor del gen *CACNG2* en la dirección sentido y caracterizarlo siguiendo una estrategia similar a la planteada en este trabajo. Además se planea clonar la región promotora en el vector pGL4Luc-RLuc (Adgene) lo cual permitirá estudiar en qué dirección está favorecida la transcripción. Ya que hasta ahora nuestros estudios se han enfocado en el análisis del promotor sólo en una de las dos direcciones posibles. También se pretende determinar la localización celular del lncRNA y de esta forma comenzar a dilucidar el mecanismo involucrado en la regulación en la expresión de la subunidad $Cav\gamma_2$, así como el posible efecto que tiene el lncRNA sobre los niveles del receptor AMPA.

REFERENCIAS

- Bannister RA, Beam KG. (2013) Cav1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca²⁺ channel. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1587-1597.
- Bertolesi G, Jollimore C, Shi C, Elbaum L, Denovan-Wright E, Barnes S, Kelly M. (2003) Regulation of α 1G t-type calcium channel gene (CACNA1G) expression during neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 17, 1802-1810.
- Black J. (2003) The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr* 35, 649-60.
- Blake J, Ziman, M. (2014) Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* 141, 737-751.
- Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG. (2001) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol* 21, 235-252.
- Calderón-Rivera A, Andrade A, Hernández-Hernández O, González-Ramírez R, Sandoval A, Rivera M, Gomora JC, Felix R. (2012) Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca²⁺ channel α 2 δ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium* 51, 22-30.
- Catterall WA. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1-17.
- Catterall WA, Wisedchaisri G, Zheng N. (2017) The chemical basis for electrical signaling. *Nat Chem Biol* 13, 455-463.
- Chater T, Goda Y. (2014) The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front Cell Neurosci* 8, 1-14.

- Chen RS, Best PM. (2009) A small peptide inhibitor of the low voltage-activated calcium channel Cav3.1. *Mol Pharmacol* 75, 1042-1051.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408, 936-943.
- Chen RS, Deng TC, Garcia T, Sellers ZM, Best PM. (2007) Calcium channel γ subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem Biophys* 47, 178-186
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltran C. (2005) Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 243, 79-172.
- Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC. (2010) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 1654-1659.
- Deaton A, Bird A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, *et al.* (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101-108.
- Dolphin AC. (2012) Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13, 542-555.
- Dolphin AC. (2013) The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1541-1549.
- Dolphin AC. (2016) Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J Physiol* 594, 5369-5390.

- Felix R, Calderón-Rivera A, Andrade A (2013) Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2, 207-220.
- Gandini MA, Sandoval A, Felix R (2014) Patch-clamp recording of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Cold Spring Harb Protoc*, 329-334.
- González-Ramírez R, Martínez-Hernández E, Sandoval A, Felix R. (2014) Transcription factor Sp1 regulates T-type Ca²⁺ channel Cav3.1 gene expression. *J Cell Physiol* 229, 551-560.
- Green PJ, Warre R, Hayes PD, McNaughton NC, Medhurst AD, Pangalos M, Duckworth DM, Randall AD. (2001) Kinetic modification of the α_{1I} subunit-mediated T-type Ca²⁺ channel by a human neuronal Ca²⁺ channel gamma subunit. *J Physiol* 533, 467-478.
- Hille B. (2001) Ion channels of excitable membranes. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinás RR. (1991) Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7076-7080.
- Hombach S, Kretz M. (2016) Non-coding RNAs: classification, biology and functioning. *Adv Exp Med Biol* 937, 3-17.
- Jackson AC, Nicoll RA. (2011) Stargazin (TARP gamma-2) is required for compartment-specific AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity in cerebellar stellate cells. *J Neurosci* 31, 3939-3952.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. (2013) *Principles of Neuronal Science* (5th ed). USA. McGraw-Hill.

- Kang MG, Campbell KP. (2003) γ subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 278, 21315-21318.
- Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts V, Frankel W, Mori Y, Campbell KP. (2001) Biochemical and biophysical evidence for γ_2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 276, 32917-32924.
- Kozak M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 187-208.
- Lacinova L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24, 1-78.
- Letts VA. (2005) Stargazer -a mouse to seize! *Epilepsy Curr* 5, 161-165.
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN. (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel gamma subunit. *Nat Genet* 19, 340-347.
- Letts VA, Kang MG, Mahaffey CL, Beyer B, Tenbrink H, Campbell KP, Frankel WN. (2003) Phenotypic heterogeneity in the stargazin allelic series. *Mamm Genome* 14, 506-513.
- Letts VA, Valenzuela A, Kirley JP, Sweet HO, Davisson MT, Frankel WN. (1997) Genetic and physical maps of the stargazer locus on mouse chromosome 15. *Genomics* 43, 62-68.
- Lin Z, Witschas K, Garcia T, Chen RS, Hansen JP, Sellers ZM, Kuzmenkina E, Herzig S, Best PM. (2008) A critical GxxxA motif in the gamma6 calcium channel subunit mediates its inhibitory effect on Cav3.1 calcium current. *J Physiol* 586, 5349-5366.
- Nimmrich V, Gross G. (2012) P/Q-type calcium channel modulators. *Br J Pharmacol* 167, 741-759.

- Numoto M, Yokoro K, Koshi J. (1999) ZF5, which is a Kruppel-type transcriptional repressor, requires the zinc finger domain for self-association. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 573-578.
- Pirotte B, Francotte P, Goffin E, de Tullio P. (2013) AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 23, 615-628.
- Price M, Davis C, Deng F, Burgess D (2005) The α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor trafficking regulator "stargazin" is related to the claudin family of proteins by its ability to mediate cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 280, 19711-19720.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Costantin JL, Stefani E, Birnbaumer L. (1998) Unique regulatory properties of the type 2a Ca^{2+} channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4690-4695.
- Randall A, Tsien RW. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15, 2995-3012.
- Richards MW, Leroy J, Pratt WS, Dolphin AC. (2007) The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of $Ca_v\beta$ subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation. *Channels (Austin)* 1, 92-101.
- Sandoval A, Andrade A, Beedle A, Campbell K, Felix R. (2007a) Inhibition of recombinant N-type Ca_v channels by the γ_2 subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. *J Neurosci* 27, 3317-3327.
- Sandoval A, Arikath J, Monjaraz E, Campbell KP, Felix R. (2007b) γ_1 -dependent down-regulation of recombinant voltage-gated Ca^{2+} channels. *Cell Mol Neurobiol* 27,901-908.

- Sharp AH, Black JL, Dubel SJ, Sundarraj S, Shen JP, Yunker AM, Copeland TD, McEnery MW. (2001) Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. *Neuroscience* 105, 599-617.
- Shuja Z, Colecraft HM. (2018) Regulation of microdomain voltage-gated L-type calcium channels in cardiac health and disease. *Curr Opin Physiol* 2, 13-18.
- Stojilkovic SS. (2012) Molecular mechanisms of pituitary endocrine cell calcium handling. *Cell Calcium* 51, 212-221.
- Sumioka A. (2013) Auxiliary subunits provide new insights into regulation AMPA receptor trafficking. *J Biochem* 153, 331-337.
- Sweatt J. (2010) *Mechanisms of Memory* (2nd ed). London, UK: Elsevier.
- Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS. (2005). Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 435, 1052-1058.
- Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA, Brecht, DS. (2003) Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 161, 805-816.
- van Loo K, Schaub C, Pernhorst K, Yaari Y, Beck H, Schoch S, Becker A. (2012) Transcriptional regulation of t-type calcium channel $Ca_v3.2$. *J Biol Chem* 287, 15489-15501.
- Walker D, De Waard M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21, 148-154.

- Wang Q, Wan L, Li D, Zhu L, Qian M, Deng M. (2009) Searching for bidirectional promoters in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinformatics* 10Suppl 1, S29.
- Wei W, Pelechano V, Järvelin A, Steinmetz L. (2011) Functional consequences of bidirectional promoters. *Trends Genet* 27, 267-276.
- Weiss N, Zamponi GW. (2017) Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signaling* 1, 1-16.