

Tesis de Posgrado

Influencia de la elongación transcripcional sobre el splicing alternativo

Nogués, Guadalupe

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Nogués, Guadalupe. (2004). Influencia de la elongación transcripcional sobre el splicing alternativo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3707_Nogues.pdf

Cita tipo Chicago:

Nogués, Guadalupe. "Influencia de la elongación transcripcional sobre el splicing alternativo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3707_Nogues.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Tesis Doctoral

**Influencia de la elongación transcripcional
sobre el splicing alternativo**

Autora: Lic. Guadalupe Nogués

Director: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Lugar de Trabajo:
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
IFIBYNE-CONICET

Nº 3707.

-2004-

Resumen

El splicing alternativo de los pre-mRNAs es un mecanismo fundamental de las células eucariotas, que permite generar una gran diversidad proteica a partir de un número relativamente pequeño de genes. Desde hace unos años se sabe que las reacciones de procesamiento de los pre-mRNAs tales como la adición de una caperuza o cap en el extremo 5', el splicing de intrones, y el corte y poliadenilación en el extremo 3', no sólo ocurren cotranscripcionalmente, sino que todos estos procesos están acoplados funcionalmente entre sí. Esto llevó a proponer una posible influencia de la transcripción sobre todos ellos. En particular, nuestro grupo demostró en 1997 que si se cambian los promotores que dirigen la transcripción de un minigén de fibronectina humana, se modifica el patrón de splicing del exón alternativo EDI.

En esta tesis continuamos con esta línea de investigación, y nos preguntamos si la modulación de la capacidad de la RNA polimerasa II (Pol II) de elongar a través de pausas del molde, también llamada procesividad, puede modificar el splicing alternativo de EDI. Para responder esto, estudiamos el efecto, sobre el splicing alternativo, de distintos activadores transcripcionales capaces de estimular la iniciación y/o la elongación transcripcional. Además, investigamos indirectamente la influencia del factor de elongación P-TEFb, que posee una actividad kinasa capaz de convertir la Pol II a su isoforma procesiva. Por último, examinamos la influencia de la procesividad de la Pol II en el control del splicing alternativo en relación a la fuerza de los sitios de splicing.

Las evidencias obtenidas apoyan un modelo cinético de control del splicing alternativo, según el cual la transcripción mediada por una Pol II altamente procesiva favorecería la exclusión de un exón alternativo, debido probablemente a un menor reconocimiento del sitio subóptimo de splicing.

Abstract

In eukaryotic cells, pre-mRNA alternative splicing is an essential mechanism that generates a large protein diversity from a small number of genes. For the last few years, it has been known that pre-mRNAs processing reactions such as capping, splicing, and 3'-end processing not only occur cotranscriptionally, but they are functionally coupled to each other. This suggested the possibility of transcription affecting all these processes. In particular, our group demonstrated in 1997 that swapping of the promoters that drive transcription of a human fibronectin minigene alters splicing of the EDI alternative exon.

In this thesis we continued with this subject, and we asked ourselves if changes in RNA polymerase II (Pol II) ability to elongate through pauses in the template, quality also known as processivity, can modify EDI alternative splicing. To answer this, we studied the effect on alternative splicing of different transcriptional activators that stimulate transcriptional initiation and/or elongation. Besides, we examined indirectly the influence of the elongation factor P-TEFb, that exhibits a kinase activity that makes Pol II to become more processive. We also investigated the importance of Pol II processivity on the control of alternative splicing in relation to splice sites strength. The evidences obtained support an alternative splicing kinetic model in which transcription driven by a processive Pol II would favor alternative exon skipping, probably because of a poor recognition of the suboptimal splice site.

Agradecimientos

Una tesis de doctorado es un trabajo que involucra muchos años, mucha paciencia, y la colaboración, voluntaria o no, de mucha gente. Es imposible agradecer apropiadamente a todos los que tuvieron alguna participación en lograr que llegara hasta este punto pero, aún a costa de ser parcialmente injusta, quisiera agradecerle particularmente a algunas personas.

En primer lugar a Alberto Kornblihtt por la oportunidad que me da, desde hace muchos años, de trabajar a su lado. Fue y sigue siendo un privilegio poder aprender de él, y ver su compromiso y dedicación con todas las cosas que emprende. Poder participar día a día en un grupo de gente tan excepcional como el que Alberto logró reunir alrededor suyo hace de la vida de laboratorio algo muy estimulante. Además, quiero agradecerle particularmente el apoyo que me dio en momentos de crisis.

Anabella Srebrow estuvo siempre ahí para ayudarme, darme consejos, escucharme y retarme en los momentos más difíciles, y es en buena parte responsable de que haya logrado llegar hasta aquí.

En el tiempo que pasé en el laboratorio, conviví con tres generaciones sucesivas de becarios, a los que quiero agradecer. En la primera estuvieron Gustavo Pesce, Paula Cramer, Claudio Alonso, y Santiago Werbach. Todos ellos, y muy especialmente Gustavo, que me enseñó a distinguir una pipeta de un escritorio, me ayudaron y me enseñaron con una paciencia enorme. Después compartí mucho tiempo con Gustavo Melen y Sebastián Kadener. La compañía y capacidad de Gus, y la efervescencia de ideas de Sebas, fueron condimentos indispensables de esa etapa. En la actualidad, Manuel de la Mata, Juan Pablo Fededa, Manuel Muñoz, los anabellos Matías Blaustein y Federico Pelisch, y los chicos más nuevos que están entrando ahora, le dan a cada día una onda increíble, con muchísimo trabajo, discusión de ideas, ayudas mutuas, y la capacidad de encontrarle el lado divertido a todo lo que pasa. Y last but not least, Valeria Buggiano, que está siempre ahí, ayudándonos y no dejándonos enloquecer, siempre calma y de buen humor (¿cómo hacés?). Mil gracias a todos. Es

un honor, y un placer, poder trabajar con ustedes. Además, mucha otra gente del laboratorio me ayudó en diversos momentos, ya sea pasándome algún plásmido o protocolo, o compartiendo charlas catárticas.

También quiero agradecerle a Ana Bondia, que me ayudó a navegar los procelosos mares de la burocracia y se encargó de lograr que entregara, tarde o temprano, todos los informes y papeles que me permitieron llegar hasta aquí.

En estos enloquecedores años de tesis, que tuvieron subidas y bajadas, ilusiones y retrocesos, el apoyo incondicional de los amigos fue fundamental. María Courel y Natalia De Marco, desde el lejano norte, estuvieron a la distancia siempre conmigo, ayudando al progreso de las telecomunicaciones. Más cerca, Sabrina Buchovsky aguantó increíblemente mis ciclotimias, y las charlas y los mates compartidos fueron indispensables como apoyo espiritual. Alberto Carbia Nagashima y Damiana Giacomini compartieron conmigo muchos días de cine y foie gras, y ayudaron a que los días de trabajo fueran mucho más divertidos.

Mis padres, Silvia y Jorge, y mi hermana Paloma, desperdigados por el mundo, estuvieron, a pesar de eso, siempre presentes, siempre preguntándome y preocupándose por como iba eso de la tesis, aunque el tema les siga pareciendo ligeramente esotérico. Los quiero mucho, sin ustedes no hubiera podido. También quiero agradecerle a Gabi, Noemí, Gero y Fede, que en estos últimos años me adoptaron y se convirtieron en mi familia local.

No puedo enumerar todo lo que Sergio cambió en mi vida en estos años, pero quiero decir que es en gran parte responsable de mi felicidad actual. Para mencionar sólo las cosas que atañen a esta tesis, gracias por la paciencia, el apoyo cuando volvía muerta del laboratorio y las palabras de aliento. Te amo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Transcripción	6
a. Polimerasa II	6
b. Mecanismo general de transcripción	6
2. Splicing de pre-mRNAs	7
a. Mecanismo de splicing	7
b. Definición exónica	9
c. Proteínas SR y secuencias regulatorias de splicing	9
3. Splicing alternativo	10
a. Modelo estático	10
b. Splicing cotranscripcional	11
4. Acoplamiento	12
a. Acoplamiento entre diversos mecanismos	12
b. Importancia del CTD de Pol II en el acoplamiento	14
5. Acoplamiento entre transcripción y splicing	15
a. Transcripción: iniciación vs. elongación	15
b. Fosforilación del CTD	17
P-TEFb, principal kinasa de CTD	17
Mecanismo de la transactivación por Tat	19
TFIIH, otra de las kinasas de CTD	20
Proteínas que podrían funcionar como puentes	20
c. Acoplamiento: efecto de promotor	21
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Plásmidos	24
a. Plásmidos cedidos por otros investigadores o previamente generados en nuestro grupo	24
Plásmido HIV2-Gal4-CAT	24
Plásmidos reporteros de splicing	25
Plásmido CMV-βgal	25

Plásmido pBluescript II KS+	25
Activadores Gal4 y Tat	26
Proteínas SR	26
Mutantes de Pol II	26
Plásmido MAQ1/HEXIM1	26
b. Plásmidos generados para esta tesis	26
Plásmido HIV2-Gal4-EDI e-o-	26
Plásmido HIV2-Gal4-EDI e+o-	27
Plásmidos con minigén de ratón	27
Plásmidos con mutaciones puntuales en el 3'ss de EDI humano	28
Plásmido HIV2-Gal4-EDI ESS-	28
2. Transformación bacteriana, minipreps, maxipreps	29
a. Transformación de bacterias	29
b. Preparación de plásmidos a pequeña escala (minipreps)	29
c. Preparación de plásmidos a gran escala (maxipreps)	29
Por columna (Qiagen)	29
Por gradiente de cloruro de cesio	30
d. Cuantificación de los plásmidos	30
3. Líneas celulares	30
a. Mantenimiento de las líneas celulares	30
b. Células Hep3B	31
c. Células Cos-1	31
4. Transfecciones transitorias	31
5. Ensayo de actividad de β-galactosidasa	32
Soluciones utilizadas	32
6. Ensayo de actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CAT)	33
a. Preparación del extracto celular:	33
Soluciones utilizadas:	33
b. Ensayo CAT	33
7. Preparación de RNA	34
Soluciones utilizadas	36
8. RT-PCR	36
a. Transcripción reversa de mRNA poliadenilados	36
b. PCR de cDNA de minigén de fibronectina humana	37
c. PCR de cDNA de minigén de fibronectina de ratón	37
d. PCR de cDNA del gen endógeno de fibronectina humana: EDI	38
e. PCR de cDNA del gen endógeno de fibronectina humana: EDII	39
f. Observación y cuantificación de productos de PCR radiactiva	40
9. Reacción de protección a la RNasa (RPA)	41
a. Preparación del molde a partir del cual se transcribe la sonda	41

b.	Sondas: Transcripción in vitro, marcación y elución	41
	Soluciones utilizadas	42
c.	Protocolo de RPA	42
	Soluciones utilizadas	43
d.	Observación y cuantificación del resultado de la RPA	43
e.	Tamaños esperados	44
	Sonda proximal (A)	44
	Sonda distal (D)	44
10.	Tratamiento con DRB y α -amanitina	44
a.	DRB	44
b.	α -amanitina	44
	RESULTADOS	45
	CAPÍTULO 1: INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SOBRE EL SPLICING ALTERNATIVO	45
1.	Actividad transcripcional de las proteínas de fusión con Gal4	48
2.	Estrategia experimental para evaluar cambios en el splicing originados por modificaciones en la procesividad	50
3.	Efecto de VP16 y SW6 sobre el splicing de EDI	53
4.	Correlación entre capacidad elongadora de Pol II y efecto inhibitorio de VP16	58
5.	Efecto de la proteína Tat sobre el splicing alternativo	59
6.	Sinergia entre Tat y activadores que estimulan la iniciación de la transcripción	60
7.	Correlación entre la procesividad de Pol II y la inclusión de EDI	66
	Conclusiones del Capítulo 1	68
	CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE P-TEFB SOBRE EL SPLICING ALTERNATIVO	69
8.	Efecto de DRB, droga inhibidora de P-TEFb	70
9.	El efecto de DRB sobre el splicing depende del CTD de Pol II	73
10.	DRB dificulta la transactivación mediada por Tat	75

11.	El efecto de Tat depende del CTD de Pol II	77
12.	Efecto de MAQ1/HEXIM1 sobre el splicing alternativo	79
	Conclusiones del Capítulo 2	83
	CAPÍTULO 3: IMPORTANCIA DE LA FUERZA DE LOS SITIOS DE SPLICING EN LA SENSIBILIDAD A CAMBIOS EN LA ELONGACIÓN	84
13.	Efecto de la proteína SR SF2/ASF sobre el splicing alternativo	86
14.	Efecto de VP16 en presencia de SF2/ASF	87
15.	Efecto de 9G8, otra proteína SR, sobre el splicing alternativo	89
16.	Efecto de VP16 en presencia de 9G8	89
17.	Mutantes de sitios de splicing en minigén de ratón	92
18.	Efecto de VP16 sobre mutantes de sitios de splicing	94
19.	Mutaciones puntuales en el sitio de splicing 3' de EDI humano	97
20.	Efecto de VP16 sobre mutantes del tracto de polipirimidinas	99
21.	Efecto de VP16 sobre mutante del silencer de splicing exónico	101
22.	Correlación entre la fuerza del sitio 3'ss y el efecto de VP16	103
23.	Efecto de DRB sobre mutantes del tracto de polipirimidinas	104
24.	Correlación entre la fuerza del sitio 3'ss y el efecto de DRB	108
25.	Efecto de la sobreexpresión de SF2/ASF sobre mutantes del 3'ss	109
26.	Efecto de siRNA de SF2/ASF sobre mutantes del 3'ss	111
	Conclusiones del Capítulo 3	113
	CONCLUSIONES	114
	Capítulo 1: Influencia de los factores de transcripción sobre el splicing alternativo	114
	Capítulo 2: Influencia de P-TEFb sobre el splicing alternativo	114

Capítulo 3: Importancia de la fuerza de los sitios de splicing en la sensibilidad a cambios en la elongación.	115
DISCUSIÓN	117
1. Elongación transcripcional	117
2. Efecto de promotor	118
3. Influencia de factores de transcripción sobre el splicing alternativo	120
4. Modelo cinético de control del splicing alternativo	122
5. Otras evidencias que apoyan el modelo cinético	123
6. Efecto de DRB sobre el splicing alternativo	124
7. Minigenes vs. genes endógenos	125
8. Otras evidencias que sugieren la importancia de P-TEFb sobre el splicing alternativo	126
9. Importancia de la fuerza de los sitios de splicing en la sensibilidad a cambios en la elongación	127
10. Perspectivas	129
11. Para concluir...	130
BIBLIOGRAFÍA	132

ABREVIATURAS

5'ss y 3'ss: sitio de splicing 5' (dador) y 3' (aceptor), respectivamente

β -gal: β -galactosidasa

BP: *branch point* o punto de ramificación

CAT: cloranfenicol-acetil-transferasa

CTD: dominio carboxi-terminal de la Pol II

DRB: 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbencimidazol, inhibidor de la elongación

ESE: *enhancer* de splicing exónico

ESS: *silencer* de splicing exónico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero (maduro, ya procesado)

pb: pares de bases

PIC: complejo de preiniciación

Pol II: RNA polimerasa II

PPT: tracto de polipirimidinas

pre-mRNA: ácido ribonucleico mensajero (no procesado)

snRNA: RNA pequeño nuclear

RNP: ribonucleoproteína

RPA: ensayo de protección a la RNasa

RT-PCR: transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa

wt: *wild-type*, salvaje

INTRODUCCIÓN

Los metazoos son organismos extremadamente complejos en cuanto a su organización y su comportamiento. Esta complejidad probablemente se logró aumentando el número de componentes que los constituyen (por ejemplo proteínas) y/o elaborando o modificando relaciones entre dichos componentes (por ejemplo redes regulatorias).

El tamaño del proteoma de un organismo, es decir del conjunto completo de proteínas del genoma que son expresadas durante la vida de un organismo, puede ser expandido a lo largo de la evolución. Para lograr esto, se puede aumentar el número de genes, modificar mecanismos preexistentes que generan diversidad proteica, y/o crear nuevos mecanismos de generación de diversidad (Maniatis y Tasic, 2002). Un ejemplo de esto último es la aparición durante la evolución de los vertebrados del mecanismo de rearrreglo de DNA en células somáticas, por el cual se genera un número prácticamente ilimitado de anticuerpos y receptores de células T diferentes.

Los genes de mamíferos transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) son unidades genéticas de gran complejidad y versatilidad. Estos genes complejos, que codifican para la mayoría de las proteínas de una célula de mamífero, tienen decenas de miles de pares de bases (pb) de largo, lo cual les permite potencialmente guardar una gran cantidad de información regulatoria y estructural. Sin embargo, el gran tamaño de estos genes plantea un problema difícil en términos de síntesis y maduración de los transcritos nacientes.

La arquitectura de los genes transcritos por la Pol II está definida por la estructura de sus transcritos. El extremo 5' de estos RNAs, que es modificado por una caperuza o *cap* que consiste en una guanosina metilada, marca el sitio de la iniciación de la transcripción y también define por lo tanto la región que corresponde al promotor del gen, que se sitúa río arriba del mismo. Los transcritos nacientes o pre-mRNAs poseen dos tipos de secuencias: los exones, que quedarán en el transcripto maduro o mRNA, y los intrones, que son removidos durante la maduración del pre-mRNA. En casi cualquier transcripto de mamíferos se pueden encontrar tres tipos de exones: un

exón 5' terminal, situado entre el *cap* y una secuencia de splicing 5' consenso (5'ss), exones internos delimitados por una secuencia de splicing 3' (3'ss) y una 5', y un exón 3' terminal entre una secuencia de splicing 3' y el sitio de poliadenilación. Los intrones, que en mamíferos son generalmente mucho más largos que los exones, tienen en promedio 3000 bases de largo, pero frecuentemente pueden encontrarse intrones de decenas de kilobases. La definición y remoción de los intrones durante el proceso conocido como splicing de los pre-mRNAs, revela la arquitectura interna de los genes. El borde 3' del gen es descrito gracias a las secuencias que median la formación del extremo 3', lo que en general ocurre por corte y poliadenilación.

Estas tres reacciones de procesamiento del pre-mRNA, el *capping*, el splicing y la formación del extremo 3', representan soluciones al problema de la complejidad de la distribución de la información que se observa en los genes transcritos por la Pol II. Además, estos procesos otorgan una gran versatilidad, lo que podría explicar su valor adaptativo, frente al gran gasto de energía que requiere procesar estos transcritos. Para dar un ejemplo, el número de genes de humanos es sólo tres veces mayor que el de gusanos. Es poco probable que esta pequeña diferencia pueda explicar por sí sola las grandes diferencias de complejidad entre vertebrados e invertebrados. Esto sugiere que la gran complejidad de los vertebrados debe ser una consecuencia de la elaboración de mecanismos que aumentan el tamaño del proteoma y de la evolución de redes de regulación génica. La versatilidad dada por una relativamente pequeña cantidad de genes (aproximadamente 35.000 en humanos) debe ser absolutamente necesaria para el desarrollo y la función de los metazoos (Venter et al., 2001).

Los mecanismos que aumentan la diversidad proteica en metazoos incluye el uso de sitios de iniciación alternativos (Quelle et al., 1995), splicing alternativo de pre-mRNAs (Black, 2000; Cáceres y Kornblihtt, 2002; Goldstrohm et al., 2001; Graveley, 2001), poliadenilación alternativa (Gautheret et al., 1998), edición de pre-mRNAs (Keegan et al., 2001), y modificaciones post-traduccionales de las proteínas (Banks et al., 2000). De estos mecanismos, el splicing alternativo de pre-mRNAs es considerado la fuente más importante de diversidad en vertebrados. Más adelante, hablaremos más detalladamente de este mecanismo.

1. Transcripción

a. Polimerasa II

La Pol II es responsable de la síntesis de los pre-mRNAs en las células eucariotas. Es una enzima de aproximadamente 600 kDa compuesta por 12 subunidades, y se encuentra muy conservada de levaduras a mamíferos. La estructura de sus subunidades es similar a la de otras polimerasas de RNA ya que posee dos subunidades grandes de más de 100 kDa y varias subunidades más pequeñas. Sin embargo, la subunidad más grande de la Pol II es única debido a que tiene un dominio muy particular denominado dominio carboxi-terminal (CTD) que no está presente en otras polimerasas de RNA como la Pol I o la Pol III. Este dominio parece estar bastante separado del resto de la proteína, formando una “cola” (Cramer et al., 2001). El CTD consiste en múltiples repeticiones de un heptapéptido cuya secuencia consenso es YSPTSPS (Corden, 1990). Este consenso se encuentra muy conservado evolutivamente, aunque el número de repeticiones varía en distintas especies. Las levaduras poseen 26 repeticiones de este heptapéptido consenso, mientras que el CTD de mamíferos contiene 52. Además de poseer un gran número de repeticiones, el CTD es particular también porque puede sufrir ciclos reversibles de fosforilación y defosforilación durante la transcripción de un gen, ya que tanto la serina-2 como la serina-5 (subrayadas en la secuencia consenso) de cada una de las repeticiones pueden ser potencialmente fosforiladas (Dahmus, 1996). Más adelante discutiremos en detalle las kinasas que fosforilan el CTD *in vivo*.

b. Mecanismo general de transcripción

La transcripción puede ser dividida en las etapas de formación del complejo de preiniciación (PIC), iniciación, *clearance* del promotor, elongación y terminación. La transcripción comienza cuando la Pol II y los factores de transcripción generales son reclutados a un promotor, lo que forma el PIC (Cox et al., 1998; Hampsey, 1998). La iniciación de la transcripción ocurre con la formación de la primera polimerización del transcrito nascente. Luego, la Pol II comienza a moverse a lo largo del molde de DNA y el promotor es liberado de las proteínas asociadas. Mientras se mueve, el

complejo transcripcional pasa de ser un complejo de iniciación a ser uno de elongación.

2. Splicing de pre-mRNAs

a. *Mecanismo de splicing*

En mamíferos, el tamaño promedio de un pre-mRNA es de aproximadamente 28.000 nucleótidos (Venter et al., 2001). La mayor parte de estos nucleótidos corresponde a intrones, y sólo 2.500 aproximadamente a exones, que se verán reflejados en el mRNA. Por lo tanto, para que ocurra el splicing de un pre-mRNA, la maquinaria de splicing debe reconocer pequeñas secuencias exónicas que se encuentran dentro de grandes extensiones de RNA intrónico. El reconocimiento de los sitios de splicing es un problema fundamental. Si asumimos un promedio de ocho sitios de splicing 5' distribuidos homogéneamente, un sitio de splicing estará inmerso en aproximadamente 3.500 bases. Además, debemos considerar el enorme número de intrones que deben ser removidos de una población de pre-mRNAs en una célula en un momento dado (Goldstrohm et al., 2001). Por otra parte, los sitios "correctos" de splicing no están muy conservados, y los intrones contienen gran número de sitios crípticos, que se parecen a los sitios consenso. Estos sitios suelen ser evitados por la maquinaria de splicing, pero en ciertas situaciones, como por ejemplo cuando los sitios de splicing normales son alterados por mutaciones, pueden ser reconocidos (Roca et al., 2003). Por ejemplo, se sabe que más del 15% de las enfermedades genéticas humanas está causado por mutaciones que destruyen sitios de splicing funcionales, o que generan nuevos sitios (Cooper y Mattox, 1997). Todo esto nos sugiere que la especificidad del reconocimiento de los sitios de splicing y la eficiencia de la remoción de intrones deben ser indispensables para el normal funcionamiento de la célula.

La reacción de splicing de los pre-mRNAs es llevada a cabo por los "spliceosomas", que son grandes complejos ribonucleoproteicos que contienen RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y un gran número de proteínas asociadas (Zhou et al., 2002). Las señales que le indican a la maquinaria de splicing la presencia de un intrón que debe ser removido son las secuencias del sitio de splicing 5' (5'ss), el sitio de ramificación

o *branch point* (BP), y el sitio de splicing 3' (3'ss). La reacción de splicing ocurre en dos pasos. Primero, el extremo 5' del intrón se une a la adenina conservada del BP que se encuentra río arriba del 3'ss, lo que forma un intermediario ramificado con forma de lazo (*lariat*). En el segundo paso, los exones se unen entre sí y el *lariat* es liberado y posteriormente degradado (Moore y Sharp, 1993).

La mayor parte de las secuencias de los 5'ss se ajustan al consenso *AG/guragu*, donde las letras mayúsculas indican nucleótidos del exón y las minúsculas del intrón (*r* = purina), y las letras subrayadas denotan los residuos más conservados, de los cuales el duplete *gu* se encuentra extremadamente conservado. En la mayor parte de los intrones, el 5'ss es seguido, a veces miles de nucleótidos río abajo, por el BP. En humanos, el BP está degenerado. El consenso es *curay* (*r* = purina, *y* = pirimidina), pero sólo la *a* subrayada está altamente conservada. Por último, el sitio 3'ss, que define el borde 3' del intrón, está identificado por el consenso *(y)_nncag/G* (Zhang, 1998). Este sitio está compuesto por un tracto de polipirimidinas (PPT), marcado en la secuencia como *y_n*, río abajo del cual se encuentra el duplete conservado *ag*. El 3'ss está localizado inmediatamente después del BP en la mayor parte de los intrones. En un intrón promedio, el PPT consta de ocho bases y la distancia entre el 3'ss propiamente dicho y la *a* altamente conservada del BP es de dieciocho bases.

El reconocimiento del sitio 5'ss ocurre gracias a la interacción por apareamiento de bases entre la secuencia del sitio y la región 5' del RNA pequeño nuclear U1 (U1 snRNA). Este snRNA forma parte de una partícula ribonucleoproteica denominada U1 snRNP, que es uno de los componentes del "spliceosoma". Esta interacción puede además ser reforzada por otros factores de splicing. Por su parte, el BP, que puede encontrarse a varios miles de pb río abajo del 5'ss, es reconocido por el factor de splicing 1 (SF1), también llamado, en levaduras, proteína de unión al *branch point* (BBP) (Berglund et al., 1997). Dado que en mamíferos la unión de SF1 al BP no es muy específica, esta interacción se ve reforzada por la unión del factor heterodimérico U2AF al 3'ss. Este factor consta de dos subunidades, una de 65 kDa, que reconoce el tracto de polipirimidinas y es capaz de interactuar con SF1, y una de 35 kDa que se une al *ag* del 3'ss propiamente dicho (Moore, 2000).

b. Definición exónica

Un exón interno está flanqueado por un intrón situado río arriba (intrón -1) y un intrón situado río abajo (intrón +1). Por lo tanto, el sitio de splicing 3' (3'ss) del exón corresponde al 3'ss del intrón -1, y el sitio de splicing 5' (5'ss) del exón corresponde al 5'ss del intrón +1.

La definición exónica, o *exon definition* es un concepto que fue propuesto por primera vez por Berget en 1990 (Robberson et al., 1990). Los exones internos parecen estar “definidos” en metazoos por una interacción entre el complejo SF1-U2AF que reconoce su sitio de splicing 3' (3'ss), y el complejo U1 snRNP asociado a otros factores de splicing que se une a su sitio de splicing 5' (5'ss). Las primeras evidencias de que esto podía estar ocurriendo surgieron ante la observación de que mutaciones naturales que ocurrían en 5'ss de intrones internos provocaban la exclusión del exón situado río arriba y no la inclusión del intrón situado río abajo. Luego, estos resultados se extendieron y permitieron la generalización a todos los tipos de exones en mamíferos. La *exon definition* propone que una unión estable del complejo U1 snRNP al 5'ss del exón es capaz de estabilizar la interacción entre el U2AF y el PPT del 3'ss de dicho exón. Esto puede ser fundamental en los casos en los que el PPT es débil (Hoffman y Grabowski, 1992), lo cual está relacionado con experimentos realizados para esta tesis que son mostrados en la sección de Resultados.

c. Proteínas SR y secuencias regulatorias de splicing

Existen varios tipos de secuencias regulatorias en los pre-mRNAs. Puede haber enhancers de splicing, que estimulan la utilización de un sitio de splicing determinado, o silencers de splicing, que reprimen la selección de un sitio de splicing. Los enhancers de splicing pueden estar localizados tanto en los exones (ESE) como en los intrones (ISE), aunque es más frecuente que se encuentren en los exones (Blencowe, 2000). Lo mismo sucede con los silencers de splicing, que pueden ser exónicos (ESS) o intrónicos (ISS).

Las proteínas SR son un grupo de proteínas caracterizadas por poseer uno o dos dominios de unión al RNA (RBD) y un dominio rico en serinas (S) y argininas (R) llamado dominio RS (Graveley, 2000). Los dominios RS son importantes para mediar

la interacción con otros factores de splicing que contengan dominios RS. Estas proteínas son capaces de interactuar con proteínas de splicing como el U1 snRNP y el heterodímero U2AF, lo cual permite suponer que pueden ser capaces de generar un puente a través del exón, facilitando así la definición exónica (Wu y Maniatis, 1993). Otra forma en la cual las proteínas SR pueden promover la definición exónica es por medio de su unión a enhancers de splicing exónicos (ESE), lo que permite que recluten a la maquinaria de splicing a los 5'ss y 3'ss del exón (Graveley, 2000; Reed, 1996). Los diferentes ESEs son reconocidos por proteínas SR específicas, y no por cualquiera de ellas (Tacke y Manley, 1999). Es interesante notar que esto implica que los exones están sujetos a muchas restricciones evolutivas, no sólo porque deben codificar una proteína, sino también porque, cuando son transcritos, contienen secuencias regulatorias específicas de unión a proteínas SR.

3. Splicing alternativo

a. Modelo estático

El splicing alternativo de pre-mRNAs es el proceso por el cual a partir de un único pre-mRNA se pueden generar múltiples mRNAs por medio de la unión diferencial entre sitios de splicing 5' y 3'. En humanos, se calcula que el splicing alternativo se observa en casi el 60 % de los genes que codifican para proteínas (Black, 2003).

Se puede dividir al splicing alternativo en varias categorías. Los exones pueden ser acortados o extendidos, por la utilización de 5'ss o 3'ss alternativos, y tanto intrones como exones pueden ser incluidos o removidos. En algunos casos, los exones pueden ser incluidos en el mRNA de forma mutuamente excluyente.

No existen muchos ejemplos en los cuales se comprenda perfectamente el mecanismo de splicing alternativo. Sin embargo, en líneas generales se observa que existen proteínas regulatorias, capaces de unirse a secuencias regulatorias (ESEs, ISEs, ESSs, ISSs), y a los sitios 5'ss y 3'ss. Además, suele observarse que los sitios de splicing que son utilizados alternativamente suelen ser débiles, es decir, que no se ajustan fuertemente a la secuencia consenso. Esto usualmente significa que, cuando se observa splicing alternativo, existe un 3'ss débil, que en general tiene un PPT corto o interrumpido por purinas, y/o un 5'ss débil. La organización de las secuencias

regulatorias dentro del pre-mRNA, las proporciones relativas de las diferentes proteínas regulatorias, y la debilidad relativa de los sitios de splicing, determinan qué sitios de splicing serán utilizados. A su vez, esto determina qué exones serán incluidos en el mRNA.

b. Splicing cotranscripcional

En las secciones anteriores hablamos del splicing tanto constitutivo como alternativo como de un mecanismo estático, sin considerar los eventos regulatorios que pueden ocurrir durante la síntesis del transcrito. *In vivo*, el splicing no ocurre en transcritos presintetizados, sino que el sustrato verdadero para el reconocimiento de los sitios de splicing, la formación del “spliceosoma”, y el splicing propiamente dicho, es el transcrito naciente a medida que emerge de la Pol II.

Existen varios tipos de evidencias, tanto observacionales como funcionales, que muestran que el splicing de los transcritos ocurre cotranscripcionalmente. En el caso de las evidencias observacionales, podemos mencionar por ejemplo el hecho de que, en células HeLa que fueron infectadas con el adenovirus 2, se observa que algunos factores de splicing son reclutados a los sitios de transcripción viral activa (Jiménez-García y Spector, 1993). También se observó que sólo se puede detectar RNA con intrones muy cerca del origen del gen, mientras que los RNA con exones pueden ser detectados mucho más lejos (Zhang et al., 1994). Esto se observó por hibridación *in situ* y, como los transcritos sin intrones colocalizan con su gen correspondiente, sugiere que la remoción de los intrones ocurre muy cerca de los sitios de transcripción activa. Entre las evidencias funcionales de splicing cotranscripcional se observó que el splicing ocurre sólo si la transcripción es llevada a cabo por la Pol II. Si un pre-mRNA que contiene un intrón es transcrito *in vivo* por la Pol I (Smale y Tjian, 1985) o la Pol III (Sisodia et al., 1987), no ocurre splicing. Dado que la diferencia más conspicua entre estas polimerasas y la Pol II es que la última posee el CTD, estas evidencias llevaron a estudiar una variante de la Pol II cuyo CTD fue truncado. Fue muy interesante ver que cuando esta Pol II sin CTD transcribe *in vivo* el pre-mRNA, el splicing se encuentra muy inhibido (McCracken et al., 1997b; Misteli y Spector, 1999).

Se debe tener en cuenta que la cotranscripcionalidad no parece ser absolutamente indispensable para que ocurra el splicing. Si se inyecta pre-mRNAs en ovocitos de *Xenopus laevis* (Green et al., 1983), o se los incuba con extractos nucleares de células HeLa (Padgett et al., 1983), los intrones son removidos. Además, se observó en levaduras que el splicing puede ocurrir también en pre-mRNAs sintetizados a partir de la polimerasa III (Kohrer et al., 1990), la polimerasa del fago T7 (Dower y Rosbash, 2002), o de una polimerasa II cuyo CTD fue truncado (Licatalosi et al., 2002). En estos tres casos, no existe un CTD que facilite el splicing.

El hecho de que el splicing sea cotranscripcional introduce dos nuevos factores, ya que la interacción entre la transcripción y el splicing puede ser cinética y/o física. En primer lugar, los sitios de splicing y los elementos regulatorios aparecen en un orden 5' a 3' a medida que la Pol II va transcribiendo. Esto implica que, por ejemplo, en un intrón de 10 kb, su 5'ss aparecerá 5-10 minutos antes que su 3'ss. En humanos, un intrón promedio es transcripto en aproximadamente 3 minutos, mientras que un exón, que es mucho más pequeño que un intrón, es transcripto en sólo 30 segundos. Por otro lado, se observó en *Drosophila* que el reconocimiento de un sitio de splicing 3' lleva 48 segundos, y que la remoción del intrón ocurre 3 minutos después (Beyer y Osheim, 1988). Si esto fuera similar en humanos, significaría que, para cuando un 3'ss puede ser reconocido, el siguiente exón ya habría sido transcripto, y 3 minutos después, cuando el splicing podría ocurrir, el siguiente intrón ya habría sido completado. Esto presenta la interesante posibilidad de que exista competencia entre sitios de splicing, lo que tiene importancia para los trabajos de esta tesis. En segundo lugar, se debe tener en cuenta la proximidad espacial entre la maquinaria de splicing y la Pol II, que está formando un complejo elongador y se encuentra asociada a otras proteínas. Es probable entonces que estos dos grandes complejos interactúen entre sí y sean capaces de influenciarse mutuamente.

4. Acoplamiento

a. Acoplamiento entre diversos mecanismos

Como mencionamos antes, la expresión genética en eucariotas, especialmente en metazoos, es un proceso muy complejo que requiere de varias maquinarias celulares

multiproteicas que intervienen en la transcripción, el procesamiento del pre-mRNA y la exportación del mRNA al citoplasma. Además, existe un constante control de la calidad del RNA que elimina pre-mRNAs y mRNAs que fueron incorrectamente procesados o que mutaron. Quizás porque estos pasos aparentan ser muy diferentes entre sí, intuitivamente se consideró por muchos años que ocurrían uno después de otro, y sin afectarse mutuamente. Sin embargo, en las últimas dos décadas aproximadamente, se encontró que varios de estos procesos no sólo ocurren simultáneamente, sino que se encuentran estrechamente acoplados entre sí, lo que significa que, además de una conexión temporal, existe una conexión funcional. Recientemente se publicaron varios importantes *reviews* que discuten este tema (Bentley, 1999; Hirose y Manley, 2000; Neugebauer, 2002; Proudfoot, 2000; Proudfoot et al., 2002). Hasta el momento, se han descrito acoplamientos entre la transcripción, las tres reacciones de procesamiento de pre-mRNAs (*capping*, *splicing* y poliadenilación), la exportación del mRNA y el proceso de control de calidad denominado NMD (*non-sense mediated decay*) (Maniatis y Reed, 2002). Prácticamente todos ellos se encuentran acoplados entre sí.

El valor adaptativo de la existencia de acoplamiento probablemente se deba a una mayor eficiencia y regulación en el procesamiento del pre-mRNA gracias a que las distintas maquinarias pueden ser reclutadas al sitio de transcripción formando una “fábrica de mRNA” (Bentley, 2002), lo cual aumenta la tasa y la especificidad de las reacciones enzimáticas. En esta fábrica de mRNA, el CTD de la Pol II es fundamental, ya que funciona como una plataforma para que ocurra interacción con factores de procesamiento y otras proteínas. Más adelante profundizaremos en este tema.

Además, este acoplamiento podría ser importante en el transporte intranuclear de distintas maquinarias. Se sabe que los factores de *splicing* y transcripción están concentrados en dos tipos de regiones nucleares llamadas cuerpos de Cajal y *speckles* (Dundr y Misteli, 2001; Gall, 2001). Hay también evidencias de que estos factores se encuentran primero en los cuerpos de Cajal, y luego son almacenados en los *speckles* nucleares (Gall, 2001; Sleeman y Lamond, 1999). Durante la activación de la expresión genética, los componentes de transcripción y de procesamiento del pre-

mRNA se trasladan de los *speckles* al gen (Misteli et al., 1998; Misteli et al., 1997; Misteli y Spector, 1999). Así, los *speckles* parecen ser sitios de almacenamiento, o quizás de reclutamiento o reciclaje, de complejos de splicing, más que sitios donde ocurre un splicing activo.

b. Importancia del CTD de Pol II en el acoplamiento

Esta integración e influencia mutua entre dos o más mecanismos parece depender casi absolutamente de la Pol II y, en particular, de su CTD. Se observó que el CTD estimula el splicing en células humanas, independientemente de sus efectos sobre el *capping* o la formación el extremo 3' del mRNA (Fong y Bentley, 2001). Además, tanto la Pol II como el CTD son capaces de estimular el splicing *in vitro* (Hirose et al., 1999; Zeng y Berget, 2000), aunque aún no está claro el mecanismo por el cual sucede esto.

Hay varias evidencias que apoyan la hipótesis de que existen interacciones funcionales entre la Pol II, especialmente el CTD, y la maquinaria de splicing. Por ejemplo, los “spliceosomas” y el tri-snRNP U4/U6.U5 se asocian, directa o indirectamente, con la Pol II (Chabot et al., 1995). Por otra parte, se postuló que el CTD sería capaz de interactuar directamente con muchas proteínas, entre las cuales se encontrarían por ejemplo factores de *capping* y de splicing. Sin embargo, hasta el momento, el único factor de splicing que se sabe que puede unirse al CTD *in vitro*, es el factor de levaduras Prp40p, que es uno de los componentes del U1 snRNP (Morris y Greenleaf, 2000). Además, se encontró que el CTD también interactúa directamente con varios factores similares a las proteínas llamadas SR o *SR-like CTD-associated factors* (SCAFs) a través de un nuevo dominio de interacción (Patturajan et al., 1998; Yuryev et al., 1996). Además de este dominio, las SCAFs tienen un dominio de unión al RNA (RBD) y un dominio RS. Pero más allá de estas similitudes con proteínas SR, no se demostró aún que estas SCAFs sean capaces de funcionar como factores de splicing. Una posibilidad es que sean capaces de reclutar proteínas SR a través de su dominio RS, pero esto no está demostrado.

Entre las evidencias más fisiológicas de acoplamiento y de la importancia del CTD, se observó que pre-mRNAs sintetizados por una Pol II con su CTD truncado no se

procesan correctamente, ya que presentan deficiencias en *capping* (Cho et al., 1997; McCracken et al., 1997a), splicing (McCracken et al., 1997b; Misteli y Spector, 1999) y poliadenilación (Fong y Bentley, 2001). Además, la sobreexpresión *in vivo* de péptidos de CTD hiperfosforilado provoca una disminución de la eficiencia del splicing en células de mamífero en cultivo (Du y Warren, 1997; Yuryev et al., 1996). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se observó también que el transporte intranuclear de los componentes de splicing depende de la presencia de un CTD intacto (Misteli y Spector, 1999). Estos resultados apoyan la idea de que el CTD es necesario para reclutar factores de splicing a los sitios de transcripción, y que esto puede ser importante para la eficiencia del splicing. Aunque el mecanismo de transporte intranuclear no está totalmente dilucidado, aparentemente es necesario que las proteínas SR estén fosforiladas (Misteli et al., 1998) para poder salir de los *speckles*, luego de lo cual el movimiento de las proteínas SR dentro del núcleo es rápido e independiente de ATP (Phair y Misteli, 2000).

5. Acoplamiento entre transcripción y splicing

a. Transcripción: iniciación vs. elongación

La transcripción puede ser controlada mediante la regulación de la iniciación y/o de la elongación de los transcritos nacientes. Se sabe hace mucho que los promotores son importantes reguladores de la iniciación de la transcripción. Hace unos años, se encontró que también pueden modificar la capacidad elongadora de la Pol II (Blau et al., 1996; Brown et al., 1998; Sune y García-Blanco, 1999; Yankulov et al., 1994). Este control es probablemente ejercido, directa o indirectamente, a través de la modificación de la composición de los complejos de elongación y/o de la modificación del estado de fosforilación de la Pol II.

La transcripción por Pol II requiere los cinco factores generales de iniciación TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. Estos factores forman parte del PIC al comenzar la transcripción, y luego de transcribir 10-15 nucleótidos, se disocian de la Pol II. Curiosamente, algunos de estos factores generales de transcripción están involucrados no sólo en la estimulación de la iniciación, sino también en la de la elongación, como es el caso de TFIIE, TFIIF y TFIIH. Por ejemplo, TFIIF es capaz de disminuir la

frecuencia de transcripción abortiva durante el comienzo de la elongación (Price et al., 1989; Yan et al., 1999). Por su parte, TFIIF no sólo es necesario para separar las hebras del DNA en el sitio de iniciación de la transcripción gracias a su actividad helicasa, sino que también es importante para que la Pol II pueda escapar y pasar a la fase de elongación (Moreland et al., 1999; Tirode et al., 1999).

Luego de la iniciación de la transcripción, la elongación es fundamental para que la Pol II pueda llegar a transcribir un pre-mRNA completo.

La procesividad de la Pol II, o eficiencia de la elongación, está definida como la habilidad para elongar a través de sitios donde la polimerasa es propensa a pausar o incluso terminar abruptamente la transcripción. Las Pol II no procesivas se detienen y se “caen” en ciertas posiciones del molde, lo que genera un exceso de transcritos cortos. La procesividad es una cualidad que puede ser afectada no sólo por características del molde, como por ejemplo la presencia de pausas, sino también por señales externas.

No sólo algunos factores generales de transcripción son capaces de favorecer la transición hacia la fase de elongación. Existen varios activadores transcripcionales que son capaces de modificar la procesividad. Algunos de ellos sólo estimulan la elongación sin estimular la iniciación, como por ejemplo la proteína Tat del virus HIV (Kao et al., 1987; Marciniak y Sharp, 1991), mientras que otros estimulan ambos procesos simultáneamente, como las proteínas VP16 y E1a (Yankulov et al., 1994).

Si el CTD de la Pol II no está modificado por fosforilación, se la denomina IIA mientras que, si se encuentra hiperfosforilado, se la llama II0. Estas dos isoformas en las que se puede encontrar el CTD tienen distintos roles en la transcripción. La forma IIA se asocia preferencialmente al PIC que se forma en el promotor. La fosforilación del CTD está catalizada por kinasas de CTD, lo que transforma la Pol II en la forma II0 que es la responsable de catalizar la fase de elongación de la transcripción (Dahmus, 1996).

De esta manera, la transición a un complejo de elongación está marcada por una hiperfosforilación del CTD. Estos dos fenómenos no sólo ocurren a la vez, sino que el primero es dependiente del segundo. El CTD funciona así como una plataforma a la cual se asocian factores de iniciación y de elongación, y la hiperfosforilación del CTD

actúa como un interruptor molecular que reconfigura la composición del complejo transcripcional.

b. Fosforilación del CTD

P-TEFb, principal kinasa de CTD

El inhibidor de kinasas DRB (5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbencimidazol) actúa como inhibidor de la elongación por Pol II (Chodosh et al., 1989). En *Drosophila*, el establecimiento de un complejo de elongación estable depende de la existencia de actividad kinasa, como lo demuestra el hecho de que el DRB impide la producción de transcritos largos (Marshall y Price, 1992; Marshall y Price, 1995).

El estudio del mecanismo de acción del inhibidor de la elongación DRB permitió obtener mucha información acerca del proceso de elongación transcripcional. El tratamiento de células de mamífero con DRB por períodos prolongados es letal, pero el efecto inicial es una gran reducción en los niveles de mRNA (Sehgal et al., 1976). El tratamiento con DRB provoca la formación de transcritos cortos, lo que sugirió por primera vez que la procesividad de la Pol II podía estar afectada (Tamm et al., 1980).

Habíamos mencionado antes que la elongación puede ser afectada por factores capaces de regularla positiva o negativamente. Dentro de estos, existen factores de elongación positivos (P-TEFs) o negativos (N-TEFs) (Price, 2000). Luego de iniciar la transcripción, la Pol II es controlada por los N-TEFs, lo que provoca que entre en una elongación abortiva, evidenciada por la formación de transcritos cortos (Marshall y Price, 1992). Por su parte, los P-TEFs son necesarios para escapar de la acción de los N-TEFs. Como ejemplos de factores que afectan negativamente la elongación, se purificaron a partir de extractos nucleares de células HeLa dos factores necesarios para que DRB pueda ejercer su acción inhibitoria sobre la elongación *in vitro* (Wada et al., 1998a; Yamaguchi et al., 1999). Estos factores son el factor inductor de sensibilidad a DRB o DSIF, y el factor negativo de elongación o NELF. El DSIF humano es un heterodímero de hSpt4 y hSpt5. NELF y DSIF reprimen la elongación por Pol II cooperativamente.

Dado que NELF y DSIF no tienen actividad kinasa, pero median la inhibición de la elongación por DRB, se postuló que debía existir al menos un factor que fuera el blanco directo de DRB. Este factor es aparentemente el factor b positivo de elongación o P-TEFb. P-TEFb es el único P-TEF que se conoce hasta el momento. Este factor de elongación ha demostrado ser fundamental en el acoplamiento con la elongación transcripcional.

P-TEFb es un heterodímero entre la kinasa dependiente de ciclinas Cdk9 (también llamada PITALRE en humanos) y una ciclina T que en mamíferos es generalmente la T1, aunque también la T2 puede asociarse a Cdk9 para formar P-TEFb (Peng et al., 1998a; Peng et al., 1998b). Las evidencias que hay hasta la fecha indican que la principal kinasa de CTD *in vivo* es la Cdk9 de P-TEFb (Price, 2000). Se realizaron análisis cinéticos que mostraron que P-TEFb fosforila preferentemente CTDs que ya están parcialmente fosforilados, lo que sugiere la existencia de otras kinasas de CTD (Marshall et al., 1996). Además, la subunidad Cdk9 de P-TEFb puede ser inhibida por DRB en bajas concentraciones. Todo esto indica que la fosforilación del CTD por P-TEFb es necesaria para impedir que la Pol II se detenga irreversiblemente al comienzo de la transcripción.

Además de su función como kinasa del CTD, P-TEFb puede fosforilar otro factor de elongación, el hSpt5, uno de los componentes de DSIF, (Kim y Sharp, 2001; Wada et al., 1998b) que, por ejemplo, es capaz a su vez de interactuar con, y activar a, la enzima de *capping* (Wen y Shatkin, 1999). Esto añade otro nivel al acoplamiento entre transcripción y *capping*.

Existe un snRNA, llamado 7SK, al que hasta hace poco no se le conocía función. Recientemente, dos grupos encontraron independientemente que este RNA pequeño es capaz de asociarse a P-TEFb, lo que provoca una inhibición en la actividad kinasa de la Cdk9 (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Todo esto indica que varios snRNP pueden regular la transcripción positiva o negativamente, a través de asociaciones con el factor de elongación P-TEFb.

Estas evidencias muestran que P-TEFb tiene una función muy importante en el acoplamiento entre diversos procesos y en la regulación de la elongación transcripcional.

Mecanismo de la transactivación por Tat

La proteína Tat es una proteína pequeña codificada por el virus HIV y otros lentivirus, que es necesaria para activar el promotor que se encuentra dentro del LTR del virus (Karn, 1999; Rana y Jeang, 1999; Taube et al., 1999). A su vez, el factor de transcripción Tat de HIV es un estimulador de la elongación transcripcional que depende de la presencia de P-TEFb (Mancebo et al., 1997). Tat reconoce la secuencia de RNA llamada TAR, presente en la región 5' del pre-mRNA de HIV, y se une a la ciclina T1, reclutando así a P-TEFb (Wimmer et al., 1999). De esta manera, P-TEFb puede fosforilar el CTD de la Pol II que está transcribiendo en ese momento, lo que la transforma en la isoforma II0 que es capaz de elongar eficientemente (Yankulov y Bentley, 1998).

Es interesante notar que P-TEFb por sí solo fosforila preferencialmente la serina-2 de las héptadas del CTD, pero que, en presencia de Tat, su especificidad de sustrato puede ser modificada para fosforilar tanto la serina-2 como la serina-5 (Zhou et al., 2000).

La transcripción dependiente de Tat necesita además otros factores, como el factor de elongación TAT-SF1 (Parada y Roeder, 1999). Existen evidencias recientes que sugieren que el efecto del CTD sobre la eficiencia de splicing podría deberse a una interacción indirecta entre snRNPs y factores de elongación, en particular TAT-SF1 (Fong y Zhou, 2001). Este complejo podría estimular tanto la transcripción como el splicing. Estas interacciones revelan otro posible rol de P-TEFb en el acoplamiento. Específicamente, P-TEFb, que es reclutado a los promotores celulares a través de factores de transcripción (Barboric et al., 2001), reclutaría a, y/o sería reclutado por, TAT-SF1 a través del dominio carboxi-terminal de la ciclina T1 (Kim et al., 1999). A su vez TAT-SF1 reclutaría factores de splicing al pre-mRNA naciente (Fong y Zhou, 2001). De esta manera, podría existir una estimulación recíproca entre la transcripción y el splicing.

TFIIH, otra de las kinasas de CTD

Además de P-TEFb existe otra kinasa de CTD importante para la estimulación de la transcripción. Esta es la actividad kinasa de CTD de TFIIH. Esta actividad se debe a la presencia de CAK (*Cdk-activating-kinase*), que es un complejo formado por Cdk7, que es la kinasa propiamente dicha, la ciclina H y la proteína Mat1 (Akoulitchev et al., 1995). A diferencia de P-TEFb, CAK fosforila al CTD de Pol II preferentemente en las serina-5, y esta fosforilación es necesaria para el reclutamiento de enzimas de *capping* a los extremos 5' de los transcriptos nacientes (Komarnitsky et al., 2000; Ramanathan et al., 2001; Schroeder et al., 2000).

Aparentemente, TFIIH fosforila al CTD poco después de la iniciación de la transcripción, y es importante para la transición a la etapa de elongación transcripcional. Estos experimentos fueron realizados mayoritariamente en levaduras, y no existen muchas evidencias en mamíferos. Por ejemplo, no está muy claro que TFIIH sea fisiológicamente importante en cambiar las propiedades de la Pol II en cuanto a su procesividad. Está demostrado que el TFIIH que contiene CAK es capaz de fosforilar el CTD de Pol II con una eficiencia comparable a la de P-TEFb, pero de estas dos kinasas, sólo P-TEFb le otorga claramente propiedades elongadoras a la Pol II (Marshall et al., 1996).

Por otra parte, dado que TFIIH está presente en el PIC y luego se retira de los complejos de elongación tempranos (Ping y Rana, 1999; Zawel et al., 1995), y dado que P-TEFb funciona durante la elongación, una posibilidad es que estas dos kinasas actúen secuencialmente. Esto está apoyado por experimentos donde se vio que P-TEFb fosforila preferencialmente CTDs que ya se encuentran parcialmente fosforilados (Marshall et al., 1996; Yankulov y Bentley, 1998).

Proteínas que podrían funcionar como puentes

Además de la importancia de la elongación sobre el splicing, existen otras evidencias de que la transcripción está acoplada al splicing. En los últimos años se encontró por ejemplo que existen interacciones físicas y a veces funcionales entre el PIC y las proteínas SR, mecanismo por el cual ciertos factores de transcripción serían capaces de reclutar proteínas SR a la maquinaria de transcripción (Ge et al., 1998; Lai et al.,

1999; Martínez et al., 2001; Monsalve et al., 2000). A su vez, la proximidad de estas proteínas al pre-mRNA naciente podría favorecer el splicing. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencias del todo claras que apoyen esta posibilidad.

c. Acoplamiento: efecto de promotor

Dado que la mayor parte de las reacciones de splicing ocurre cotranscripcionalmente, surgió la pregunta de si diferentes complejos de elongación son capaces de afectar diferencialmente las reacciones de splicing alternativo. Las primeras evidencias de que esto era así surgieron en nuestro grupo con los trabajos de Paula Cramer (Cramer et al., 1997; 1999). El splicing del exón alternativo EDI de un pre-mRNA de fibronectina cambia cuando la transcripción es dirigida por diferentes promotores. Además, EDI contiene un enhancer de splicing exónico que reconoce las proteínas SR SF2/ASF y 9G8. La sobreexpresión de estas proteínas estimula fuertemente la inclusión de EDI, pero el efecto de estas proteínas es modulado por el promotor (Cramer et al., 1999). Estos efectos dependen exclusivamente de la identidad del promotor, ya que se demostró que los efectos no se deben ni a diferencias en la fuerza del promotor, ni a la modificación del sitio de iniciación de la transcripción.

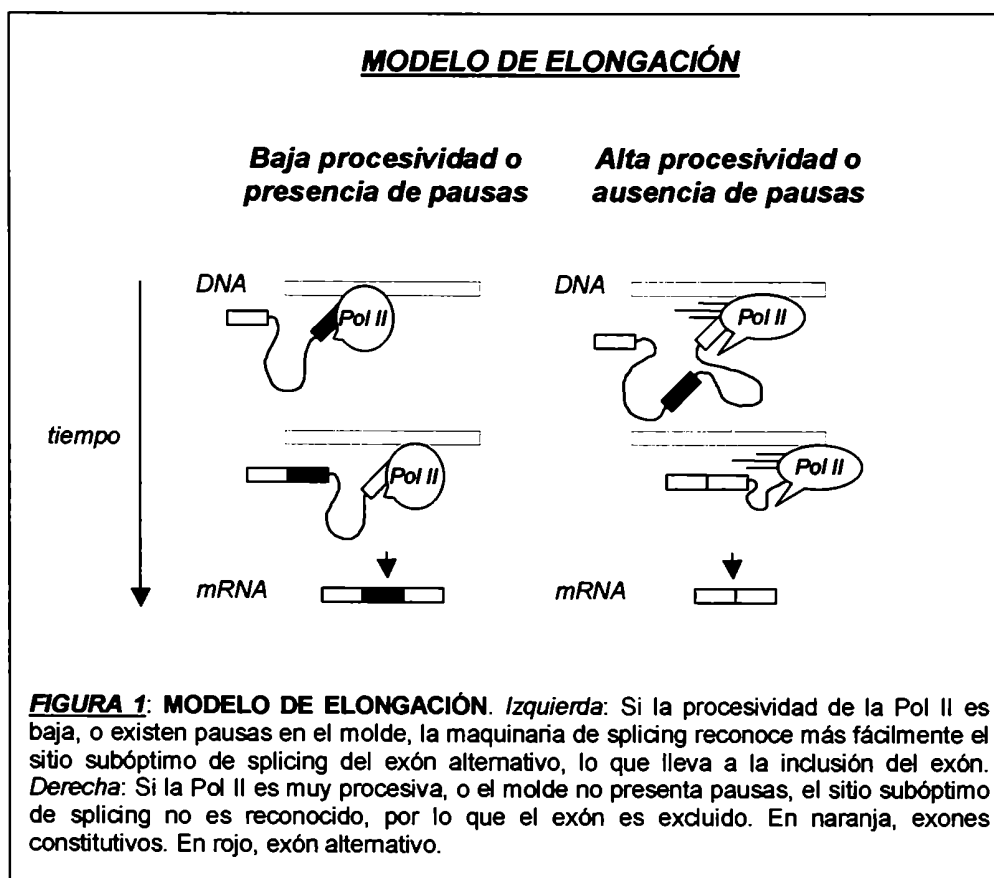
Se plantearon entonces dos modelos posibles, no mutuamente excluyentes, para explicar el efecto de promotor sobre el splicing alternativo. Un primer modelo sería un “modelo de reclutamiento”, según el cual el promotor sería el responsable de reclutar factores de splicing, como por ejemplo proteínas SR, al sitio de transcripción, posiblemente a través de factores de transcripción que se unen al promotor o a enhancers transcripcionales. Un segundo modelo sería el “modelo de elongación”, en el cual los promotores controlarían el splicing alternativo a través de la regulación de la procesividad de la Pol II. En este caso, dependiendo de la tasa de elongación, se generarían distintas estructuras secundarias del pre-mRNA que, a su vez, determinarían la accesibilidad de las secuencias de splicing a la maquinaria de splicing.

El modelo de elongación es consistente con la observación de que el patrón de splicing alternativo es distinto, según si la maquinaria de splicing actúa sobre un pre-

mRNA previamente sintetizado, o si el splicing ocurre cotranscripcionalmente (Eperon et al., 1988).

Con estas evidencias previas, nos enfocamos en este modelo, que está esquematizado en la Figura 1. En este caso, la tasa de elongación transcripcional determinaría el resultado de dos reacciones de splicing que ocurren cotranscripcionalmente y que por lo tanto compiten entre sí. De esta manera, una transcripción muy procesiva favorecería la exclusión del exón alternativo, debido a que la maquinaria de splicing no dispondría de tiempo suficiente para reconocer el sitio subóptimo de splicing del exón alternativo (Figura 1, derecha), mientras que una transcripción menos procesiva llevaría a una mayor inclusión del exón (Figura 1, izquierda).

Los experimentos realizados en esta tesis intentan dilucidar, al menos en parte, si existen más evidencias para apoyar esta hipótesis.



OBJETIVOS

- Estudiar la influencia sobre el splicing alternativo de distintos factores de transcripción capaces de estimular la iniciación y/o la elongación de la transcripción.
- Estudiar si el factor de elongación P-TEFb, que al hiperfosforilar el dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II es capaz de volverla más procesiva, puede modificar el patrón de splicing alternativo.
- Estudiar si la fuerza de los sitios de splicing puede afectar al control del splicing mediado por cambios en la elongación transcripcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se enumeran los materiales y métodos utilizados en esta tesis. Se mencionan en detalle los protocolos que fueron desarrollados o modificados en nuestro laboratorio. Se omiten o mencionan brevemente aquellos protocolos de uso corriente en cualquier laboratorio de biología molecular.

Cabe aclarar que, aunque cada experimento fue realizado al menos cuatro veces para asegurar que el resultado observado fuera reproducible, por simplicidad se muestra sólo un experimento representativo de cada tipo.

1. Plásmidos

Todos los plásmidos utilizados en esta tesis son resistentes a ampicilina, excepto aquellos derivados del vector pSVEDA Tot (Caputi et al., 1994) que contiene el minigén reportero utilizado para evaluar el splicing alternativo. Estos plásmidos son resistentes al antibiótico tetraciclina.

a. Plásmidos cedidos por otros investigadores o previamente generados en nuestro grupo

Plásmido HIV2-Gal4-CAT

Este plásmido, llamado pBL2lex₄gal₅CAT, fue cedido por el Dr. David Bentley y expresa la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa a partir del promotor mínimo de HIV2 al que se le agregaron 4 sitios de unión a la proteína lexA en tándem, y 5 sitios de unión a la proteína Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* en tándem. A partir de este plásmido, Paula Cramer, de nuestro laboratorio, generó el plásmido HIV2-Gal4-EDI e^{+o+}.

Plásmidos reporteros de splicing

Plásmido HIV2-Gal4-EDI e+o+: Este plásmido fue generado por Paula Cramer y fue denominado pSVEDA-HIV2. Expresa el promotor mínimo de HIV2 con sitios de unión a la proteína Gal4 proveniente del plásmido HIV2-Gal4-CAT, río arriba de un minigén que funciona como reportero de splicing y que contiene el exón alternativo EDI del gen de la fibronectina humana y partes de sus exones flanqueantes, inmersos en el gen de α -globina humana. Este plásmido genera transcritos que contienen la secuencia TAR en sus extremos 5', la cual es un sitio de unión a la proteína Tat. Contiene además el enhancer (e+) y el origen de replicación (o+) del virus SV40.

Plásmido mFN-EDI: Denominado pSVEDA-mFN, contiene el minigén de fibronectina bajo el control del promotor de fibronectina mutante que tiene mutados los sitios CRE y CCAAT (Cramer et al., 1999).

Plásmido CMV-EDI: Denominado pSVEDA-CMV, contiene el minigén de fibronectina bajo el control del promotor de citomegalovirus.

Plásmido α -gb-EDI: Denominado pSVEDA- α -gb, contiene el minigén de fibronectina bajo el control del promotor de α -globina humana.

Plásmido CMV- β gal

Este plásmido expresa la proteína β -galactosidasa a partir del promotor viral fuerte de citomegalovirus (CMV). Este plásmido fue cotransfectado en todos los casos con el objetivo de tener un control de transfección interno. Mediante la realización de ensayos de β -galactosidasa que cuantifican la actividad de la enzima, podemos estimar el nivel de transfección.

Plásmido pBluescript II KS+

Este plásmido (Stratagene) fue utilizado como “plásmido de relleno”. Esto significa que cuando la cantidad de los plásmidos utilizados para la transfección de un pocillo de células no llegaba a los 2 μ g totales requeridos por el protocolo, agregamos este plásmido, que no expresa en principio nada que pueda afectar nuestros resultados, para completar la cantidad de DNA y llevarla a 2 μ g totales.

Activadores Gal4 y Tat

Los plásmidos que expresan las proteínas de fusión con el dominio de unión al DNA del factor de levaduras Gal4 fueron cedidos por David Bentley e incluyen a Gal4-VP16-(410-490), Gal4-SW6, Gal4-Sp1B-(263-499), Gal4-CTF-(399-499), Gal4-p53-(1-93), y Gal4-(1-147) (Blau et al., 1996). El plásmido que expresa la proteína viral Tat también nos fue otorgado por David Bentley.

Proteínas SR

El plásmido g10 SF2/ASF, expresa la proteína SF2/ASF (Cáceres et al., 1997), y el plásmido g10 9G8 expresa la proteína 9G8.

Mutantes de Pol II

Los plásmidos que expresan variantes de Pol II resistentes a la droga α -amanitina fueron cedidos por David Bentley. El plásmido que expresa la variante *wild-type* (Pol WT) de la subunidad mayor (Rpb1) de la RNA polimerasa II humana (pAT7Rpb1 α Am_r) lleva la mutación N792D que la vuelve resistente a α -amanitina (Nguyen et al., 1996). Una mutante de este plásmido, denominada $\Delta 0$ (Pol $\Delta 0$), expresa una Pol II carente del dominio carboxi-terminal (CTD), ya que posee una delección de la región que contiene las 52 héptadas de dicho dominio (McCracken et al., 1997b).

Plásmido MAQ1/HEXIM1

El plásmido que expresa la proteína MAQ1/HEXIM1 nos fue cedido por Olivier Bensaude (Michels et al., 2003).

b. Plásmidos generados para esta tesis

A continuación se describe a grandes rasgos la estrategia utilizada para generar nuevos plásmidos. Los clonados, chequeo de clones positivos, etc. fueron realizados por métodos tradicionales (Sambrook y Russell, 2000).

Plásmido HIV2-Gal4-EDI e-o-

Este plásmido fue generado a partir del plásmido pSVEDA-Tot e-o- que posee el minigén bajo el control del promotor de α -globina y carece de la región enhancer-origen de SV40. Se le eliminó a este plásmido el promotor de α -globina, que fue

reemplazado por un fragmento EcoRI-HindIII del plásmido HIV2-Gal4-CAT, que contiene el promotor mínimo de HIV2 con 5 sitios de unión a la proteína Gal4.

Plásmido HIV2-Gal4-EDI e+o-

Para realizar este plásmido, se cortó con las enzimas únicas SspI y BamHI los plásmidos HIV2-Gal4-EDI e+o+ y pSVEDA-CMV e+o-. Luego de eluirlos, se ligó el fragmento grande generado en HIV2-Gal4-EDI e+o+, que incluye la resistencia a tetraciclina, el minigén y el promotor HIV2, con el fragmento pequeño de la restricción de pSVEDA-CMV e+o-, que incluye la región enhancer de SV40 pero carece del origen.

Plásmidos con minigén de ratón

Los plásmidos que contienen el minigén de fibronectina de ratón son el pSVED-mEDA *wild-type*, pSVED-mEDA 5'ss cons, y pSVED-mEDA 3'ss (A) cons, que corresponden, respectivamente, a la versión *wild-type* del minigén de fibronectina de ratón, y a las mutantes en los sitios de splicing 5' y 3' flanqueantes al exón EDA o EDI (Muro et al., 1998). Estas mutantes poseen los sitios de splicing mutados para ser sitios consenso, y todos los plásmidos están bajo el control del promotor de α -globina. Para colocar estos minigenes de ratón bajo el control de nuestro promotor mínimo de HIV2 con sitios Gal4, cortamos los plásmidos que llevan los minigenes murinos con las enzimas de restricción BssHII y ScaI, generando así distintos vectores de clonado, y el plásmido HIV2-Gal4-CAT con las enzimas EcoRI y HindIII, lo que genera el inserto de clonado, que contiene al promotor. Luego de realizar un *fill in* con Klenow, ligamos y obtuvimos los plásmidos mHIV2-EDI, mHIV2-EDI 5'ss y mHIV2-EDI 3'ss. Estos plásmidos poseen la región enhancer-origen de SV40. Para eliminarla y generar las variantes e-o-, cortamos con la enzima Sall estos tres plásmidos. Esta enzima corta en dos sitios, uno dentro del promotor HIV2-Gal4, y otro a unas 1.500 pb río arriba. Con la misma enzima cortamos el plásmido HIV2-Gal4-EDI e-o-. Así, generamos un fragmento grande que contiene al minigén, y otro más pequeño que contiene la región enhancer-origen. Luego, eluimos el fragmento grande de mHIV2-EDI, mHIV2-EDI 5'ss y mHIV2-EDI 3'ss, y el fragmento pequeño de HIV2-Gal4-EDI e-o-, ligamos y, luego de seleccionar los clones positivos por un mapeo de

restricción, obtuvimos los plásmidos que utilizamos en esta tesis: mHIV2-EDI e-o-, mHIV2-EDI 5'ss e-o- y mHIV2-EDI 3'ss e-o-.

Plásmidos con mutaciones puntuales en el 3'ss de EDI humano

Las mutaciones G→T en la posición -9 del sitio de splicing 3' de EDI, A→T en la posición -5, y la mutación doble G→T y A→T, fueron generadas por mutagénesis dirigida por PCR. Se utilizaron *primers* complementarios que contenían las mutaciones de interés, y *primers* que anclaban a ambos lados sobre sitios únicos de corte por las enzimas de restricción SnaBI (aproximadamente a 1260 pb río arriba del sitio de mutación) y XhoI (aproximadamente a 120 pb río abajo del sitio de mutación). Luego se realizaron PCR sucesivas con la enzima Pfu Turbo (Stratagene) que posee la cualidad de ser incluso más procesiva que la Taq polimerasa, y de copiar con alta fidelidad gracias a su actividad 3'→5' *proofreading*. Cuando se obtuvo el producto final de 1,4 kpb que contenía las mutaciones introducidas por los *primers*, se lo cortó con SnaBI y XhoI y se lo insertó en plásmidos con el minigén de fibronectina que previamente habían sido digeridos con las mismas enzimas. De esta manera generamos los plásmidos HIV2-Gal4-EDI GT, HIV2-Gal4-EDI AT y HIV2-Gal4-EDI DM a partir de la versión *wild-type* HIV2-Gal4-EDI e-o-, a la cual llamamos HIV2-Gal4-EDI WT en los experimentos donde utilizamos estos plásmidos mutantes. Como este plásmido no posee la región enhancer-origen de SV40, los mutantes tampoco la poseen. Una vez generadas estas mutaciones puntuales, cortamos con SnaBI y XhoI los plásmidos HIV2-Gal4-EDI GT, HIV2-Gal4-EDI AT y HIV2-Gal4-EDI DM, y cortamos con las mismas enzimas los plásmidos mFN-EDI e-o- y α-gb-EDI e-o-. Luego intercambiamos los fragmentos *wild-type* por los fragmentos mutados. Así obtuvimos los plásmidos mFN-EDI GT, AT y DM a partir del *wild-type* mFN-EDI e-o-, y α-gb-EDI GT, AT y DM a partir del *wild-type* α-gb-EDI e-o-.

Todos estos plásmidos fueron secuenciados para confirmar que llevaran las mutaciones deseadas. Se utilizó para ello el kit "fmol" de Promega.

Plásmido HIV2-Gal4-EDI ESS-

Andrés Muro nos había cedido previamente el plásmido pSVEDA ΔStu, que lleva una mutación puntual en el splicing silencer situado en el exón EDI que lo vuelve inactivo (Caputi et al., 1994). Para llevar esta mutación (ESS-) a nuestro plásmido

HIV2-Gal4-EDI e-o-, cortamos ambos plásmidos con las enzimas de corte único XhoI y PvuII, lo que genera un fragmento de unas 2060 pb aproximadamente. Eluimos el fragmento grande de HIV2-Gal4-EDI e-o- y el fragmento pequeño de pSVEDA ΔStu y los ligamos. Luego, chequeamos que el plásmido resultante fuera el que contiene la mutación disruptiva ESS- por medio de un mapeo de restricción, ya que la versión *wild-type* es cortada en dos lugares distintos por la enzima de restricción StuI, mientras que el HIV2-Gal4-EDI ESS- sólo puede ser cortado una vez, porque la mutación anula el segundo sitio de corte de esta enzima.

2. Transformación bacteriana, minipreps, maxipreps

a. Transformación de bacterias

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl₂ y otras sales. Con este protocolo, se generan bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10⁶ UFC/μg. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan (Hanahan, 1983).

b. Preparación de plásmidos a pequeña escala (minipreps)

Se utiliza esta técnica para producir una pequeña cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de unos pocos ml, con el objetivo de, por ejemplo, chequear mediante mapeo de restricción o secuenciación si los clonados realizados habían generado el plásmido de interés. No se detalla esta técnica debido a que es realizada en cualquier laboratorio de biología molecular.

c. Preparación de plásmidos a gran escala (maxipreps)

Por columna (Qiagen)

Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100 μg de DNA plasmídico (columnas tip 100) o 500 μg (columnas tip 500). Se realiza el protocolo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Por gradiente de cloruro de cesio

Con este protocolo se pueden obtener 5-10 mg de plásmido a partir de 500 ml de un cultivo saturado de *E. coli* que creció toda la noche en agitación en medio rico (*Terrific broth*) en presencia del antibiótico de selección.

d. Cuantificación de los plásmidos

Para conocer la concentración aproximada, los plásmidos fueron cuantificados en todos los casos con un espectrofotómetro (“GeneQuant”) que mide la absorción a 260 nm (ultravioleta). Luego, las concentraciones fueron ajustadas corriendo alícuotas en un gel de agarosa con bromuro de etidio y comparando con estándares de masa.

3. Líneas celulares

a. Mantenimiento de las líneas celulares

Para las transfecciones transientes realizadas en esta tesis se utilizaron dos líneas celulares distintas, Hep3B y Cos-1. Estas líneas celulares son mantenidas en placas de plástico de 10 cm de diámetro con medio completo, en un incubador para células con temperatura controlada (37 °C) y en presencia de 5% de CO₂. El medio completo consiste en D-MEM baja o alta glucosa respectivamente (Invitrogen), al cual se le agrega 10% v/v de suero fetal bovino, antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomycin). Ocasionalmente, si se quiere utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agrega también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/ml.

Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a temperatura ambiente unos dos o tres minutos, se detiene la reacción con unos mililitros de medio completo, se replaquea entre 1/4 y 1/8 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 8 ml de volumen final con medio completo.

Las células son congeladas en N₂ líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales.

b. Células Hep3B

La línea celular de hepatoma humano Hep3B es utilizada desde hace muchos años en nuestro laboratorio. Proviene de un carcinoma hepatocelular y es una línea celular adherente con morfología epitelial (para más información ver <http://www.atcc.org>). El medio usado para estas células era D-MEM baja glucosa.

c. Células Cos-1

La línea celular de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) Cos-1 es adherente y de morfología fibroblástica (para más información ver <http://www.atcc.org>). Esta línea fue elegida porque fue transformada con el virus SV-40 y presenta una única inserción del gen del antígeno T del virus, que reconoce el origen de replicación de SV-40 presente en ciertos plásmidos. Esto nos permitió observar la influencia de la replicación plasmídica en nuestros experimentos. El medio usado para estas células era D-MEM alta glucosa.

4. Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias fueron realizadas con el reactivo Lipofectamine (Invitrogen). Se siguió en principio el protocolo recomendado por los fabricantes, aunque algunas modificaciones fueron introducidas en nuestro laboratorio.

Se plaquean las células en placas de plástico de 6 pocillos (cada pocillo tiene un diámetro aproximado de 3,5 cm) el día anterior a realizar la transfección. En el caso de las células Hep3B, se siembran 200.000 células por pocillo, y en el caso de las células Cos-1, que suelen crecer más rápido, se siembran 180.000 células. Se lleva a 2 ml por pocillo con medio completo y se deja crecer hasta el día siguiente.

Para poder medir la eficiencia de transfección, se cotransfecta un plásmido que expresa la proteína β -galactosidasa (β -gal) y se realizan ensayos de actividad de dicha enzima. Como no podemos preparar RNA (para medir efectos sobre el splicing) y un extracto proteico (para medir eficiencia de transfección por β -gal) a partir de las células presentes en un mismo pocillo, ya que el RNA se degrada con relativa facilidad, realizamos transfecciones en duplicado, de manera de obtener RNA de un pocillo y el extracto proteico para la medición de actividad β -gal de otro.

Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente:

- Se coloca 2 μg totales de DNA plasmídico en un tubo eppendorf que contiene 100 μl de D-MEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se coloca 6 μl de Lipofectamine en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 100 μl de D-MEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se transfiere el contenido del tubo eppendorf al tubo con Lipofectamine.
- Se incuba 30-45 minutos para que se formen los complejos entre el polícatión y el DNA.
- Se lava 2 veces con PBS 1X (Invitrogen) las células a transfectar para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiben la transfección.
- Se deja las células en el incubador unas 5 hs aproximadamente para que ocurra la transfección.
- Luego se aspira el medio para eliminar la Lipofectamine, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.
- Se deja las células en el incubador 48 hs, y luego se prepara RNA o un extracto proteico a partir de las mismas.

5. Ensayo de actividad de β -galactosidasa

Para realizar este ensayo, primero se debe realizar un extracto proteico. Para ello, se lava las células dos veces con PBS IX, se escurre bien, y se colocan 150 μl de buffer de lisis. Se transfiere el lisado a un tubo eppendorf y se elimina el debris celular centrifugando 10 min a 12 krpm. Luego se transfieren 50 μl del sobrenadante, donde se encuentra la enzima β -gal, a un tubo eppendorf nuevo, y se le agrega 50 μl de buffer β -gal 2X, que contiene ONPG como sustrato. La actividad de la enzima β -gal se evidencia como aparición de color amarillo por acumulación del producto ONP. Se detiene la reacción con 100 μl de Na_2CO_3 1M. Por último, se cuantifica la actividad de la enzima midiendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

Soluciones utilizadas

- PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 , H_2O c.s.p. 1 litro.

- Buffer de lisis 1X: 100 mM buffer fosfato de potasio pH 7,8 + 0,2 % Triton X-100.
- Buffer β -gal 2X: 0,2 M buffer fosfato de sodio, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 M β -mercaptoetanol, 1,33 mg/ml ONPG.

6. Ensayo de actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CAT)

a. Preparación del extracto celular:

- Se descarta el medio de las células y se lava dos veces con PBS 1X.
- Se agrega 1 ml de TNE y se deja unos momentos para que se despeguen las células.
- Se toma el líquido con las células utilizando un “rubber policeman” y se pasa a un tubo eppendorf.
- Se centrifuga 2 min a 6.000 rpm para que las células formen un pellet.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en 100 μ l de buffer Tris-HCl 0,2 M.
- Para romper las células y generar el extracto celular, se congela en N_2 líquido y se descongela bruscamente en un baño a 37 °C. Se realiza esto 3 veces.
- Se centrifuga 10 min a 12.000 rpm para eliminar el debris celular.
- Se pasa el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
- Se calienta el extracto celular 10 min a 60 °C para desnaturalizar las deacetilasas endógenas que pueden perjudicar el ensayo CAT.
- Se centrifuga 2 min a 12.000 rpm para eliminar el precipitado de proteínas desnaturalizadas.
- Se pasa el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Este sobrenadante contiene la enzima CAT, que no se ve afectada por la desnaturalización y permanece activa.

Soluciones utilizadas:

- PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 , H_2O c.s.p. 1 litro.
- TNE: Tris-HCl 40 mM pH 7,5-8, EDTA 1mM pH8, NaCl 150 mM.

b. Ensayo CAT

- Para cada tubo se realiza la siguiente “mix”:

2 µl de cloranfenicol-¹⁴C 0,05 µCi/µl

5 µl de butiril-CoA 5 mg/ml

4 µl de Tris-HCl 1 M pH 7,8

9 µl de H₂O

- Para que los extractos utilizados estén ajustados por su eficiencia de transfección, se realiza previamente un ensayo β-gal en paralelo y se relativiza según esto para que todos los tubos de la misma transfección posean la misma actividad β-gal, de modo que las diferencias observadas en actividad CAT se deban sólo a diferencias en niveles de actividad del promotor que la expresa y no a distintas eficiencias de transfección. Entonces se toma de cada tubo la cantidad de extracto adecuada, y se lleva a 80 µl totales con Tris-HCl 0,2 M.
- A estos 80 µl se agregan los 20 µl de la mix preparada en el primer paso.
- Se deja a 37 °C durante toda la noche para que ocurra la reacción.
- Al día siguiente se agrega 200 µl de una mezcla 2:1 TMPD:Xylenes (TMPD: 2, 6, 10, 14 tetrametilpentadecano, Xylenes: mezcla de xilenos; ambos reactivos de Sigma) que se utiliza para detener la reacción y separar el producto de la reacción (cloranfenicol butirilado por la enzima CAT) del sustrato (cloranfenicol).
- Se agita la mezcla con un “vortex” y se centrifuga 2 min para separar las fases.
- Se toman 150 µl de los 200 µl de la fase superior (productos) y 10 µl de los 100 µl de la fase inferior (sustrato), se agrega líquido de centelleo y se cuenta en un contador beta.
- Se calcula la actividad CAT como el % de conversión: $\text{cpm prod} \times 100 / (\text{cpm prod} + \text{cpm sustr})$.

7. Preparación de RNA

Para obtener el RNA de las células transfectadas, se utiliza una adaptación del protocolo original de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). Con este protocolo se pueden obtener aproximadamente 5-10 µg de RNA a partir de un pocillo de 35 mm de diámetro. Cabe aclarar que todos los reactivos utilizados deben estar libres de RNasas, lo que se logra autoclavando las soluciones o utilizando stocks con cuidado.

- Se descarta el medio de las células y se aspira bien para que no queden restos de líquido.
- Se agrega 500 μ l de solución D, que ya contiene β -mercaptoetanol y glucógeno, a cada pocillo con células.
- Se levanta el lisado de células con pipeta y se las transfiere a un tubo eppendorf.
- Se agrega 1/10 de volumen (50 μ l) de AcONa pH 4,2 2M y se mezcla por inversión.
- Se agrega un volumen (500 μ l) de fenol ácido saturado en agua y se agita con un "vortex".
- Se agrega 1/5 de volumen (100 μ l) de una mezcla 49:1 de cloroformo:alcohol isoamílico y se agita vigorosamente con un "vortex".
- Se deja 30 min en hielo.
- Se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C.
- Se toma la fase acuosa (superior) y se la pasar a un nuevo tubo eppendorf.
- Se precipita con un volumen (500 μ l) de isopropanol y se agita con un "vortex".
- Se deja al menos 2 hs a -20°C.
- Se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C.
- Se vuelca el sobrenadante.
- Se agrega 500 μ l de etanol 80% v/v y se agita con un "vortex" para lavar bien el precipitado.
- Se deja unos 15 min a temperatura ambiente.
- Se centrifuga 20 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente para disminuir la cantidad de sales precipitadas.
- Se vuelca el sobrenadante y se aspira bien para que no queden restos de etanol.
- Se seca el pellet al aire.
- Se agrega 20 μ l de agua y se congela a -20 °C o -80°C.
- Para resuspender bien el RNA, se descongela en un baño de agua a 50 °C durante 5 min y se agita vigorosamente con un "vortex".

Se puede controlar la integridad del RNA extraído corriéndolo en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje relativamente alto y por poco tiempo, para disminuir la

degradación durante la corrida. En una preparación buena de RNA, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA.

Soluciones utilizadas

- Solución D o desnaturizante: A 234 ml de H₂O mQ se le agregan 200 g de isotiocianato de guanidinio, 14 ml de citrato de sodio pH7 0,75 M y 21,2 ml de sarcosil 10 %. Antes de usar se agrega 7 µl de β-mercaptoetanol y 40 µg de glucógeno por cada ml de solución desnaturizante.

8. RT-PCR

Con el objetivo de evaluar el splicing del mRNA transcrito, se realiza una RT-PCR, es decir, una reacción de transcripción reversa (RT) para producir cDNA a partir del RNA, que servirá a su vez como molde de una reacción posterior de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se amplificará el fragmento de interés utilizando *primers* específicos.

a. Transcripción reversa de mRNA poliadenilados

- Se desnaturiza 5 µl de RNA colocándolo 5 min a 65 °C.
- Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la renaturalización.
- Se agrega 15 µl de “mix” a cada tubo. La “mix” está compuesta de la siguiente manera:

4 µl de buffer de RT 5X.

0,2 µl de DTT 100 mM.

0,24 µl de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl.

0,5 µl de oligo dT 100 µM (oligo de 12-18 nucleótidos).

1,5 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl.

H₂O c.s.p. 15 µl.

- Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo dT pueda aparearse a las colas de poliA de mRNAs poliadenilados.

- Se incuba 1h a 35 °C para que ocurra la reacción.
- Se detiene la reacción incubando 5 min a 95 °C.

b. PCR de cDNA de minigén de fibronectina humana

Primers

pSV5'j: 5'-CACTGCCTGCTGGTGACTCGA-3'

pSV3'j: 5'-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3'

Reacción de PCR radiactiva

- Se utilizan 2 µl de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR.
- A cada tubo de cDNA se le agregan 48 µl de "mix" que estará compuesta de la siguiente manera:

5 µl de buffer de PCR sin MgCl₂

3 µl de MgCl₂ 25 mM

1,5µl de DMSO (dimetil sulfóxido)

2,5 µl de *primer* pSV5'j 20 µM

2,5 µl de *primer* pSV3'j 20 µM

1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl

0,1 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol)

H₂O c.s.p. 48 µl

- Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo.

- Reacción de PCR:

45" a 94 °C }
1' a 63 °C } 30 ciclos
30" a 72 °C }

c. PCR de cDNA de minigén de fibronectina de ratón

Primers

αG-FN dir: 5'-CACTGCCTGCTGGTGACGTAC-3'

α G-FN rev: 5'-TGGGCGGCCAGGGTCACGGC-3'

Reacción de PCR radiactiva

- Se utilizan 2 μ l de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR.
- A cada tubo de cDNA se le agregan 48 μ l de "mix" que estará compuesta de la siguiente manera:

5 μ l de buffer de PCR sin MgCl₂

3 μ l de MgCl₂ 25 mM

1,5 μ l de DMSO (dimetil sulfóxido)

2,5 μ l de *primer* α G-FN dir 20 μ M

2,5 μ l de *primer* α G-FN rev 20 μ M

1 μ l de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

0,3 μ l de Taq polimerasa 5 U/ μ l

0,1 μ l de dCTP radiactivo (10 μ Ci/ μ l, act. esp.: 3000 Ci/mmol)

H₂O c.s.p. 48 μ l

- Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo

- Reacción de PCR:

45" a 92 °C
45" a 60 °C
45" a 72 °C

} 30 ciclos

d. PCR de cDNA del gen endógeno de fibronectina humana: EDI

Primers

hFN dir4860: 5'-AGCCCCGCAAGCAGCAAGCC-3'

hFN rev5758: 5'-GTAGCATCTGTCACACGAG-3'

Reacción de PCR radiactiva

- Se utilizan 2 μ l de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR.

- A cada tubo de cDNA se le agregan 48 µl de “mix” que estará compuesta de la siguiente manera:

5 µl de buffer de PCR sin MgCl₂

3 µl de MgCl₂ 25 mM

1,5µl de DMSO (dimetil sulfóxido)

2,5 µl de *primer* hFN dir 20 µM

2,5 µl de *primer* hFN rev 20 µM

1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl

0,1 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol)

H₂O c.s.p. 48 µl

- Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo

- Reacción de PCR:

3' a 94 °C

1' a 94 °C
1' a 62 °C
2' a 72 °C

} 26 ciclos

10' a 72 °C

e. PCR de cDNA del gen endógeno de fibronectina humana: EDII

Primers

hEDB dir: 5'-GCATCTGGAGGCAAACCCTGAC-3'

hEDB rev: 5'-GTCAATGCCAGTTGGGGAATCAAG-3'

Reacción de PCR radiactiva

- Se utilizan 2 µl de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR.
- A cada tubo de cDNA se le agregan 48 µl de “mix” que estará compuesta de la siguiente manera:

5 µl de buffer de PCR sin MgCl₂

3 µl de MgCl₂ 25 mM

2,5 µl de *primer* EDB dir 20 µM

2,5 µl de *primer* EDB rev 20 µM

1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl

0,1 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp: 3000 Ci/mmol)

H₂O c.s.p. 48 µl

- Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo

- Reacción de PCR:

3' a 94 °C

1' a 94 °C

1' a 63 °C

1' 40" a 72 °C

5' a 72 °C

} 30 ciclos

f. Observación y cuantificación de productos de PCR radiactiva

Al finalizar la reacción de PCR radiactivas, se procede a separar los productos corriendo en un gel de poliacrilamida 6% nativo. Luego de la corrida, se seca el gel sobre un papel Whatmann y se lo expone a una película con orientadores para generar una autoradiografía. De esta manera, se puede observar las bandas correspondientes al producto de PCR que incluye el exón y al que lo excluye. Para cuantificar estos productos, se orienta la película sobre el gel utilizando los orientadores, se recorta las bandas correspondientes a los productos de interés (con y sin exón alternativo), y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador beta. Debido a que utilizamos el isótopo ³²P, que es un emisor beta de alta energía, podemos evitar el uso de líquido de centelleo para amplificar la señal, y contamos la radiactividad con el método Cherenkov, que es en seco. La eficiencia de este método en seco es algo menor que utilizando un líquido de centelleo pero, por otra parte, es más rápido y se evita el manipuleo de tolueno.

9. Reacción de protección a la RNasa (RPA)

a. Preparación del molde a partir del cual se transcribe la sonda

- Se linealiza los plásmidos (sondas A y D) con HindIII.
- Se agrega proteinasa K hasta 0,1 mg/ml y se incuba 30 min a 37 °C.
- Se extrae 2 veces con un volumen de PIC (fenol:cloroformo:isoamilico 25:24:1).
- Se extrae con cloroformo.
- Se precipita con 0,2 vol de NH₄OAc 10 M y 2,5 vol de etanol.
- Se lava con etanol 75 % v/v y se deja secar.
- Se resuspende en 10 mM Tris-HCl pH 7.
- Se realiza la transcripción *in vitro* con RNA polimerasa T7.

b. Sondas: Transcripción in vitro, marcación y elución

- Se mezcla en un tubo los siguientes reactivos para la transcripción *in vitro*:
5 µl de buffer de transcripción TSC 5X
2 µl de DTT 100 mM
1 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl
4,5 µl de rATP, rCTP, rGTP 2,5 mM cada uno
2,4 µl de rUTP 100 µM
6 µl de rUTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol)
1 µl de RNA polimerasa T7 20 U/µl
500 ng de plásmido molde previamente linealizado
H₂O c.s.p. 26,1 µl
- Se incuba una hora a 37 °C para que ocurra la reacción.
- Se agrega 0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl y, para digerir el molde de DNA, se agrega DNAsa RQ1 a una concentración final de 1 U/µg de molde.
- Se incuba 15 min a 37 °C.
- Se agrega 37,5 µl de buffer de siembra (aprox. 1,5 volúmenes).
- Se calienta 5 min a 90 °C para desnaturalizar el RNA, y se pasa a hielo inmediatamente.

- Se siembra en un gel preparativo 6% de acrilamida:bisacrilamida, 42% urea (desnaturalizante) y se corre a 300 V. De esta manera se separa la sonda de interés de productos espurios y/o semidegradados de la transcripción *in vitro*.
- Luego de correr el gel, se lo expone a una película autoradiográfica para detectar la presencia de las moléculas radiactivas. Orientando bien, se procede a cortar la banda con la ribosonda de interés (corresponde al transcripto de mayor tamaño) y se la pasa a un tubo eppendorf.
- Se agrega 1 ml de buffer de elución con tRNA que funcionará de *carrier*.
- Se incuba toda la noche a 37 °C.
- Al día siguiente se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se cuenta en contador beta de centelleo una alícuota para estimar la actividad específica de la ribosonda.
- Utilizar aproximadamente 10^5 cpm de ribosonda (unos 2 μ l aprox.) para cada reacción de protección a la RNasa.

Soluciones utilizadas

- Buffer de siembra: A 485 μ l de formamida deionizada se le agregan 5 μ l de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 5 μ l de SDS 10 % p/v, y 5 μ l de azul de bromofenol 0,5 % p/v.
- Buffer de elución: NH_4OAc 2 M, SDS 1 % p/v, tRNA 25 $\mu\text{g/ml}$.

c. Protocolo de RPA

- Se agrega a cada muestra de RNA (5-10 μg) el equivalente a 10^5 cpm de ribosonda (actividad específica $2-3 \times 10^8$ cpm/ μg) en buffer de elución.
- Se precipita agregando NH_4OAc hasta 0,5 M final (solución stock 5 M por ej.) y 2,5-3 vol de etanol.
- Se incuba 20 min a -20 °C y se centrifuga 15 min a velocidad máxima.
- Se retira el sobrenadante con pipeta y, sin dejar secar el pellet, se resuspende cada pellet en 25 μ l de buffer de hibridación (tomar el buffer 5X y diluir una parte en 4 partes de formamida en el momento de usar).
- Se agita con un "vortex", se centrifuga brevemente, se calienta 5 min a 60 °C, se vuelve a agitar con un "vortex", se desnaturaliza 5 min a 90 °C, se agita con un

“vortex” por última vez, se centrifuga brevemente y se incuba toda la noche en un baño a 45 °C.

- Al día siguiente, se agrega 300 µl de solución de RNasa a cada muestra y se incuba 30 min a 30 °C para que ocurra la digestión de las hebras de RNA simple cadena.
- Se agrega 10 µl de SDS 20 % p/v y 3 µl de proteinasa K 10 mg/ml (aprox 100 X) a cada muestra.
- Se incuba 15 min a 37 °C.
- Se extrae con un volumen de PIC (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1).
- Se agrega 1 µl de tRNA 10 mg/ml como carrier.
- Se agrega 1 ml de etanol y se incuba 30 min a -20 °C.
- Se centrifuga 15 min y se resuspende el pellet en 10 µl de buffer de siembra.
- Se calienta 5 min a 90 °C y se siembra inmediatamente en un gel desnaturizante de acrilamida 6%.
- Se corre a 60 W aproximadamente.

Soluciones utilizadas

- Buffer de hibridación: PIPES pH 6,7 200 mM, NaCl 2M, EDTA 5 mM. Se congela a -20 °C, y antes de usar se diluye 1:4 en formamida deionizada.
- Solución de RNasa: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM, NaCl 0,2 M, LiCl 0,1 M. Se mantiene a -20 °C y, antes de usar, se agrega las RNasas a partir de la siguiente solución stock 250 X: 500 µg/ml de RNasa A y 10.000 U/ml de RNasa T1.

d. Observación y cuantificación del resultado de la RPA

Una vez corrido el gel, se lo seca sobre un papel Whatmann y se lo expone a una película autoradiográfica. De esta manera se visualiza el resultado de la RPA, que puede ser escaneado. La cuantificación se realiza recortando las bandas de interés luego de orientar la película sobre el gel por medio de orientadores fluorescentes, y colocándolas en un contador beta de centelleo.

e. Tamaños esperados

Sonda proximal (A)

La sonda total mide 330 nucleótidos. El fragmento de RNA protegido por esta sonda tiene 177 nucleótidos si el RNA es maduro, y 268 si se trata del transcrito primario.

Sonda distal (D)

La sonda total mide 400 nucleótidos. El fragmento de RNA protegido por esta sonda tiene 248 nucleótidos si el RNA es maduro, y 320 si se trata del transcrito primario.

10. Tratamiento con DRB y α -amanitina

a. DRB

La droga DRB (5, 6-diclorobencimidazol ribósido o 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbencimidazol) es una molécula de Mr 319,2 y fórmula molecular $C_{12}H_{12}Cl_2N_2O_4$. Es un fuerte inhibidor de elongación transcripcional ya que inhibe a P-TEFb (Price, 2000).

Se utilizó el DRB provisto por ICN Biomedicals Inc. Se realizó una solución stock 50 mM en etanol que se mantuvo a -20 °C. En el momento de usar se tomaba una alícuota, se diluía en medio completo a la concentración final deseada, y se reemplazaba con este medio el medio de las células.

b. α -amanitina

La droga α -amanitina (Sigma) fue disuelta a una concentración final de 1 mg/ml (solución stock). Antes de usar, se tomaba una alícuota, se diluía en medio completo a una concentración final de 2,5-10 μ g/ml, y se reemplazaba con este medio el medio de las células.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Influencia de los factores de transcripción sobre el splicing alternativo

Como se menciona en la Introducción (pág. 21), algunas evidencias sugerían una posible influencia de la procesividad de la RNA polimerasa II (Pol II) sobre el splicing alternativo. Además, existían resultados de nuestro laboratorio que apuntaban en la misma dirección (Kadener et al., 2001; 2002). Esto implicaría que la célula podría regular el splicing alternativo de determinado mRNA modificando la procesividad de la Pol II que lo transcribe. Las consecuencias posibles de esto son muy interesantes. En primer lugar, significaría que la regulación de este proceso debe ser extremadamente fina para que los mRNAs resultantes sean procesados de manera adecuada. Además, esto representaría otra forma de modificar el splicing alternativo ante distintos requerimientos, mediante señales internas o externas a la célula que lleven a un cambio en el patrón de splicing a través de una modificación en la procesividad de la Pol II.

Por todo esto, nos propusimos estudiar este tema en más detalle. Para ello, necesitábamos una estrategia diferente a las utilizadas con anterioridad, preferentemente una que nos permitiera controlar mejor el sistema y sacar conclusiones claras. Los experimentos realizados previamente en nuestro grupo por Paula Cramer, con los cuales se demostró que cambiando el promotor que dirige la transcripción se modifica el splicing alternativo, eran muy claros (Cramer et al., 1997; 1999). Sin embargo, en la naturaleza los promotores no son cambiados, por lo que nos interesó plantear una estrategia algo más fisiológica.

Como se explica en la Introducción (pág. 15), la transcripción puede ser controlada tanto mediante la regulación de su iniciación, como mediante la regulación de la elongación. Esto puede ser llevado a cabo por proteínas que actúan como factores de transcripción, y que tienen la particularidad de estimular el proceso de iniciación, de elongación, o de ambos.

Los dominios de transactivación de factores de transcripción denominados de tipo I estimulan la **iniciación** por Pol II (Blau et al., 1996). A esta clase pertenecen los factores de transcripción Sp1 y NFI/CTF, entre otros. Los factores de tipo IIA, como la proteína Tat del virus HIV de tipo 1, estimulan predominantemente la **elongación**. Tat no es un factor de transcripción común ya que no interacciona con el promotor (DNA) sino con una región llamada TAR que se encuentra en la región 5' no codificante del transcrito nascente y que, por lo tanto, surge sólo una vez que comenzó la transcripción del mismo. Una tercera clase de activadores son los factores de tipo IIB, entre los cuales se encuentran las proteínas VP16, p53 y E2F1, que son capaces de estimular tanto **iniciación** como **elongación**.

Curiosamente, una cuádruple mutación puntual de fenilalanina a alanina en las posiciones 442, 473, 475 y 479 de la proteína VP16 logra transformarla en un activador de tipo I. Este nuevo factor de transcripción, que fue denominado SW6, ya no posee prácticamente la capacidad de estimular la elongación, aunque su acción como activador de la iniciación no se ve afectada (Walker et al., 1993). Esto es una gran herramienta para estudiar la importancia de ambos procesos por separado en la regulación del splicing alternativo.

Como primer objetivo nos planteamos entonces transfectar plásmidos que expresaran estas proteínas junto con un plásmido reportero de splicing. Como nuestra intención era utilizar un sistema en el cual pudiéramos controlar bien lo que sucedía, sin perder su significación *in vivo*, no podíamos utilizar estas proteínas en su forma *wild-type*, ya que habrían sido capaces de unirse a distintos promotores y no habríamos sabido si los efectos observados eran directos o indirectos.

Para superar esto, decidimos entonces utilizar plásmidos que expresan proteínas de fusión entre los dominios de activación de los factores de transcripción y el dominio de unión al DNA de la proteína Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajando entonces con un plásmido reportero que tiene sitios de unión a Gal4, dentro de un promotor mínimo, podemos entonces considerar que los efectos observados son directos, ya que la proteína Gal4 no puede unirse a otros sitios dentro del genoma de una célula de mamífero. Con respecto a la proteína Tat, no fue necesario utilizar una proteína de fusión con Gal4, ya que Tat sólo es capaz de unirse a la región TAR de

mensajeros nacientes del genoma del virus HIV2. Dado que nuestras líneas celulares no están infectadas con este virus, podemos utilizar un plásmido reportero que posea la región TAR de modo que los efectos de Tat sean directos.

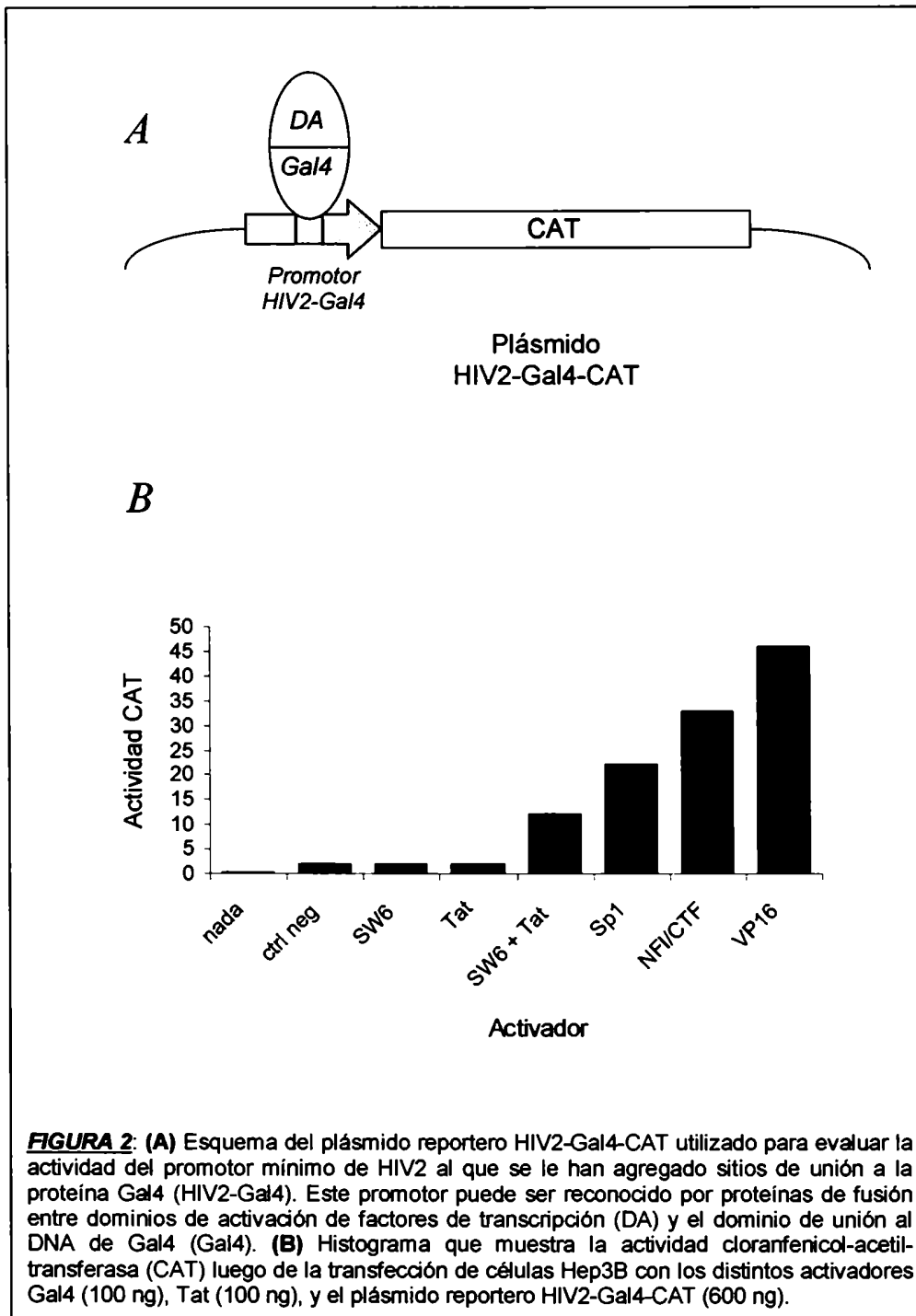
La gran ventaja de este sistema es que nos permitiría estudiar los efectos de diferentes transactivadores sobre un único promotor, lo cual es más fisiológico que cambiar en el plásmido reportero el promotor que dirige la transcripción.

1. Actividad transcripcional de las proteínas de fusión con Gal4

Teniendo los plásmidos que expresan proteínas de fusión entre el dominio de unión al DNA del factor de transcripción de levaduras Gal4 y varios dominios de transactivación distintos, y un plásmido que expresa la proteína Tat, procedimos a evaluar en primera instancia si estos factores eran funcionales en nuestro sistema. Para ello transfectamos transitoriamente células de hepatoma humano Hep3B (ver Materiales y Métodos para más detalles) con estos plásmidos y con el plásmido reportero HIV2-Gal4-CAT, que contiene el gen que codifica para la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) río abajo de un promotor mínimo de HIV2 con cinco sitios de unión a la proteína Gal4 en tándem. La Figura 2A esquematiza este plásmido. En la región 5' no codificante del transcripto producido a partir de HIV2-Gal4-CAT se encuentra la región TAR de unión a la proteína Tat. Luego de 48 hs (ver Materiales y Métodos para detalles del protocolo de transfección) se cosecharon las células y se realizó un extracto proteico a partir de ellas. Se utilizó este extracto como fuente de enzima CAT y se realizó un ensayo CAT (ver Materiales y Métodos), en el cual se mide la actividad de la enzima mediante el porcentaje del sustrato cloranfenicol marcado con ^{14}C que fue butirilado con el otro sustrato de la reacción, butiril-CoA, dando lugar al producto de la reacción, el butiril-cloranfenicol ^{14}C .

De esta manera, si el promotor HIV2-Gal4 fue muy activo, esperamos que se haya producido una gran cantidad de enzima CAT por lo que el % de conversión de cloranfenicol a cloranfenicol butirilado será alto. De esta forma podemos medir cuán activado estaba el promotor en estudio.

La Figura 2B muestra los resultados obtenidos en el ensayo CAT a partir de extractos de células transfectadas con las distintas proteínas de fusión. Se puede ver que en ausencia de activadores fusionados a Gal4, la actividad transcripcional es muy baja. Esto se debe a que se trata de un promotor mínimo de HIV2 que carece de regiones regulatorias y por lo tanto no puede ser activado por proteínas propias de la célula.



Como control negativo de las proteínas de fusión (“ctrl neg” en la Figura 2B) se utilizó un vector que expresa sólo el dominio de unión al DNA de Gal4 sin dominio de transactivación, y se ve que posee un poco de actividad transcripcional, probablemente porque al unirse al DNA es capaz de cambiar la conformación del promotor de manera que la transcripción aumenta levemente. La proteína mutante SW6 y la proteína elongadora Tat no difieren del control negativo en este tipo de ensayo, lo que nos indica que activando la iniciación (SW6) o la elongación (Tat) por separado, no se observa un gran efecto sobre la transcripción en su conjunto. Sin embargo, se puede observar que al sobreexpresar ambas proteínas a la vez, existe un efecto sinérgico. Este efecto sinérgico entre activadores de tipo I y de tipo IIA ya había sido descrito en otro sistema (Blau et al., 1996; Yankulov et al., 1994). Por otra parte, las proteínas iniciadoras Sp1 y NFI/CTF aumentan la transcripción, pero menos que la proteína VP16 que, a diferencia de ellas, también es capaz de estimular la elongación.

2. Estrategia experimental para evaluar cambios en el splicing originados por modificaciones en la procesividad

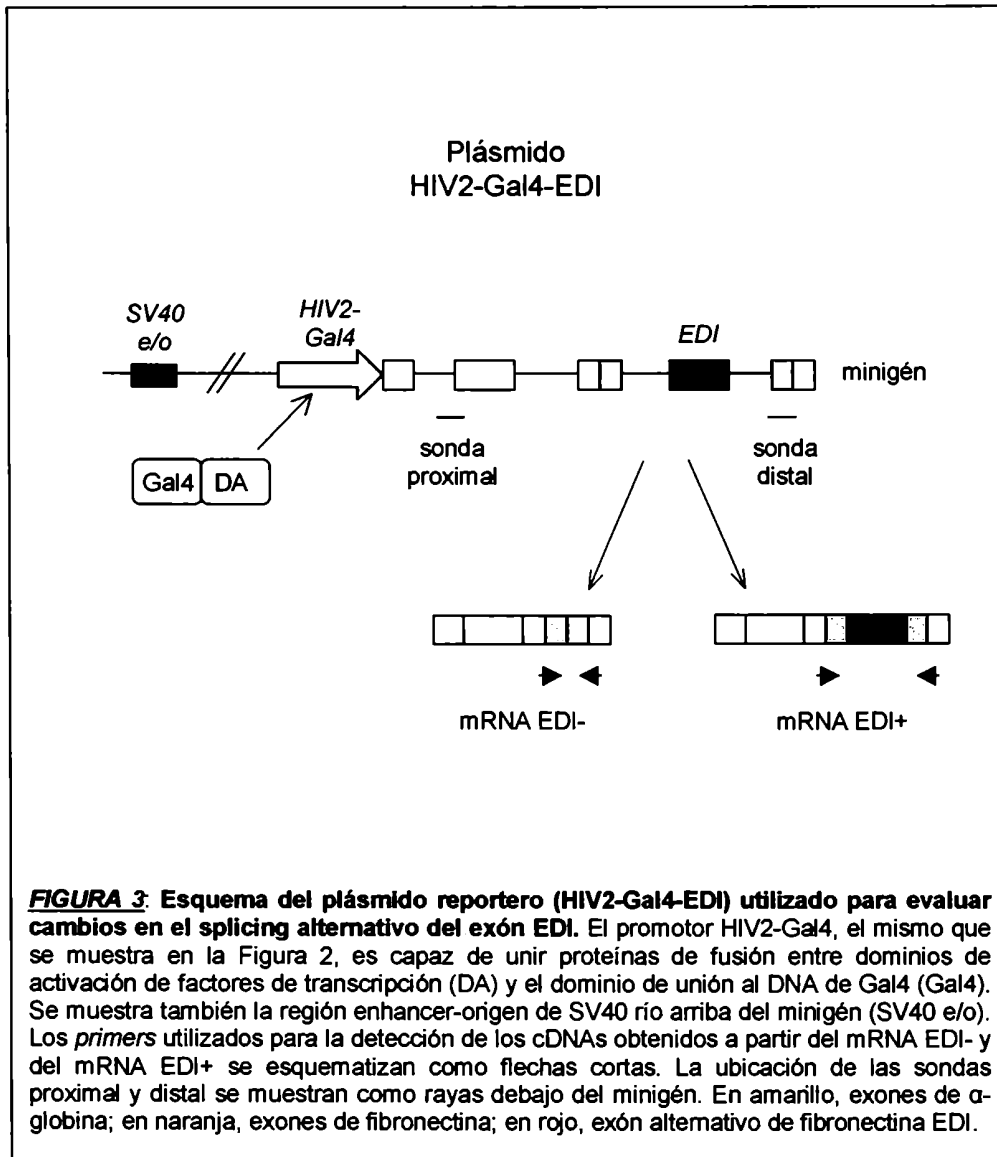
Con el objetivo de evaluar las influencias de los distintos tratamientos o de las distintas proteínas sobre el splicing alternativo, utilizamos como reportero un plásmido que contiene un minigén compuesto por el exón alternativo EDI del gen de la fibronectina humana y sus regiones flanqueantes, inmersos en el gen de α -globina humana. El promotor mínimo de HIV2-Gal4 que habíamos utilizado en la Figura 2 fue clonado río arriba de este minigén para poder utilizar la proteína Tat y las proteínas de fusión con Gal4 como modo de modificar la procesividad de la Pol II. La Figura 3 esquematiza este plásmido reportero, y muestra además las dos variantes de mRNA que se pueden obtener con esta construcción: una que contiene al exón alternativo EDI (forma llamada EDI+) y una que carece de él (EDI-). Para averiguar cuál es la proporción de mRNA EDI+ y de EDI-, se prepara RNA total de las células transfectadas y se realiza una reacción de transcriptasa reversa con oligodT que

hibrida con las colas de poliA de los mRNA (para más detalles de este protocolo, ver Materiales y Métodos). De esta manera, los mRNA poliadenilados presentes en las células son convertidos en cDNA. Luego se realiza una reacción de polimerasa en cadena (PCR) con *primers* específicos, que en la Figura 3 están esquematizados como flechas, que aparean en la zona intermedia de exón de globina y exón de FN. Esto tiene la ventaja de que no se amplifica la región EDI endógena, ya que es una zona en la que el gen endógeno y el minigén difieren. Esta PCR se realiza en presencia de cantidades equimolares de los 4 dNTPs pero además se agrega una pequeña proporción de dCTP marcado radiactivamente en su fosfato alfa. De esta manera, los productos de PCR quedan radiactivos por incorporación de un isótopo marcado. Para separar los productos de PCR EDI+ y EDI- se realiza una corrida electroforética en geles nativos de poliacrilamida 6%.

La PCR es un método semi-cuantitativo. Esto significa que hay una relación entre la cantidad de mRNA original, de cDNA más exactamente, y la cantidad de producto obtenido en la reacción, pero esta relación no es totalmente lineal y no permite por lo tanto cuantificar la cantidad de mRNA que dio origen al producto que se observa. Entonces, para cuantificar con mayor exactitud la cantidad de mRNA producido a partir de este minigén, realizamos ensayos de protección a la RNasa (RPA). Esto se logra hibridando el RNA con una sonda marcada radiactivamente (distal en la Figura 3) y sometiénolo luego a una digestión por RNasa que degrada RNA simple cadena. La región protegida por la sonda (RNA doble cadena) no es digerida y puede ser luego desnaturizada y corrida en un gel desnaturizante de poliacrilamida. A diferencia de la PCR, en este caso la cantidad de moléculas de RNA se corresponde una a una con la cantidad de moléculas de sonda que lo protegieron (para más detalles de este protocolo, ver Materiales y Métodos).

Esta misma técnica permite además realizar una cuantificación aproximada de cuanto elonga la Pol II. Si además de la sonda distal respecto del promotor utilizamos una sonda proximal (ver Figura 3), podemos tener una idea de la cantidad de RNA cortos y largos que fueron producidos. Así, por ejemplo, una relación alta de la sonda proximal con respecto a la distal indica que la Pol II elonga pobremente, ya que predominan los mensajeros cortos.

De esta manera, teniendo estos plásmidos como herramientas, y con estas técnicas en nuestro poder, nos dispusimos a evaluar si cambios en la procesividad causados por proteínas que se unen al promotor, son capaces de modificar el patrón de splicing alternativo.



3. Efecto de VP16 y SW6 sobre el splicing de EDI

Existían evidencias previas de que la elongación era importante en la modulación del splicing alternativo por trabajos de nuestro grupo (Kadener et al., 2001; 2002). En ese caso, se demostró que la presencia del enhancer del virus SV40 en el plásmido reportero de splicing estimula la exclusión del exón alternativo, presumiblemente porque provoca un aumento en la procesividad de la Pol II (Yankulov et al., 1994). Además, la replicación del plásmido, debida a la presencia del origen de replicación de SV40 situado al lado del enhancer, tiene el efecto contrario de inhibir la procesividad (Nahreini y Mathews, 1995; Williams et al., 1996). Esto parece deberse a que, cuando el plásmido es capaz de replicar, los nucleosomas se reordenan formando una estructura más compacta y más similar a la cromatina (Cereghini y Yaniv, 1984; Gruss et al., 1990). Así, cuando la Pol II recorre el molde sintetizando RNA, lo hace con más dificultad cuando este molde está cromatinizado luego de la replicación.

Las transfecciones mostradas en la Figura 2 fueron realizadas en células Hep3B, que son un buen modelo de línea celular humana. Como nuestro propósito fue estudiar en primera instancia el efecto de los activadores que estimulan iniciación o elongación pero en combinación con los efectos de enhancer y origen de SV40, debimos utilizar la línea celular de riñón de mono Cos-1. Estas células tienen la particularidad de que expresan constitutivamente el antígeno T del virus SV40 (AgT) necesario para el reconocimiento de la región origen de replicación de los plásmidos que lo poseen. Si el AgT no está presente, como es el caso de las células Hep3B, el plásmido es incapaz de replicar aún si posee el origen de replicación.

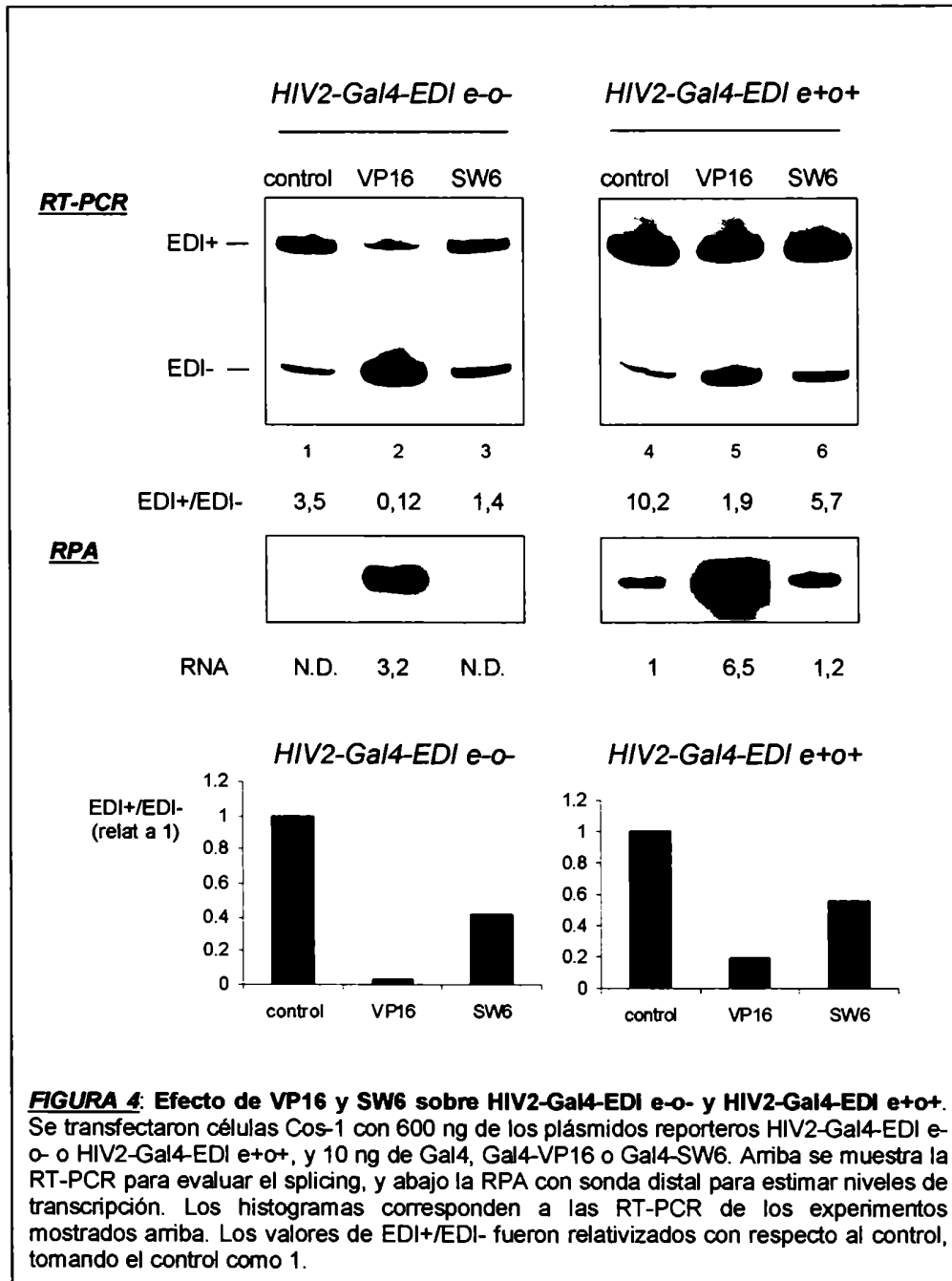
La Figura 4 muestra los efectos de VP16, activador de tipo IIB que estimula tanto iniciación como elongación, y de su mutante SW6, que se comporta como un activador de tipo I que activa predominantemente iniciación, sobre dos plásmidos reporteros, uno que contiene la región enhancer-origen de SV40 (HIV2-Gal4-EDI e+o+), y otro que carece de la misma (HIV2-Gal4-EDI e-o-).

Los respectivos efectos de VP16 y SW6 sobre el splicing alternativo se observan igual, más allá de si el plásmido es capaz de replicar (Figura 4, derecha) o no (Figura 4, izquierda). VP16 provoca un gran aumento de la exclusión del exón alternativo EDI, mientras que SW6 tiene un efecto mucho más débil. Según el modelo cinético de elongación mencionado en la Introducción (Figura 1, pág. 22), una explicación posible de esto sería que VP16, como gran activador transcripcional que activa tanto elongación como iniciación, podría estar produciendo el aumento en la exclusión debido a que la procesividad de la Pol II es tan alta que la maquinaria de splicing no llega a reconocer el sitio aceptor de splicing subóptimo de EDI (3'ss de EDI). En cambio SW6, que tiene muy disminuida su capacidad de estimular elongación, tiene un efecto mucho más moderado. Como estamos trabajando con proteínas que tienen un efecto directo sobre el minigén ya que no interaccionan en principio con otros promotores, la evidencia es mucho más poderosa. De esta manera, podemos deducir que es el aumento en la elongación lo que provoca un mayor splicing del exón, y no otro proceso relacionado.

Una posibilidad alternativa para explicar estos resultados podría ser que el aumento de la transcripción por VP16 es tan alto que se secuestran factores de splicing, etc, y que el efecto que estamos viendo de aumento de exclusión no se deba a un aumento en la elongación sino a una incapacidad de la célula de procesar tantos transcritos a la vez. Sin embargo, esto no puede ser así, ya que si observamos los resultados de la RPA mostrada en la Figura 4, que cuantifica la cantidad de transcripto de minigén presente en las células transfectadas, podemos ver que la construcción que contiene el enhancer de SV40 y que es capaz de replicar transcribe mucho más que la que carece del enhancer y que no replica, y sin embargo también tiene una mayor proporción de exón incluido. Con esto, descartamos una influencia de la cantidad de transcripto en las decisiones tomadas por la Pol II.

También se observa en la Figura 4 que la construcción que posee el enhancer y el origen de SV40 (a la derecha) parece tener menos sensibilidad a un aumento en la elongación que la que no tiene enhancer ni origen (a la izquierda), ya que VP16 aumenta 29 veces la exclusión en la construcción HIV2-Gal4-EDI e-o- (calles 1 y 2)

mientras que en la HIV2-Gal4-EDI e⁺o⁺ el efecto sólo es de 5 veces (calles 4 y 5). Es muy interesante ver que el efecto de VP16 depende de características del molde.



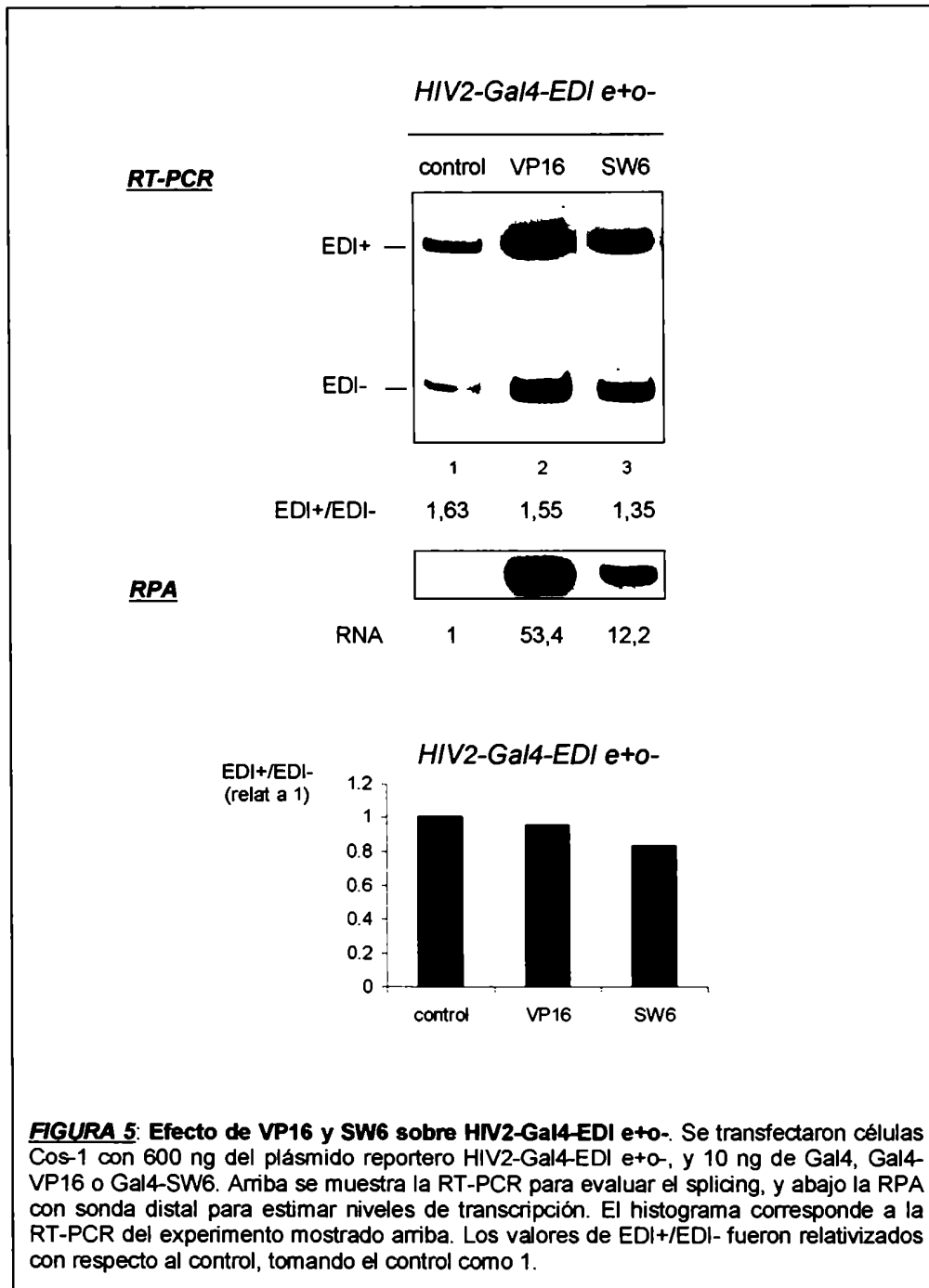
Con esto, se refuerza el “modelo de elongación” esquematizado en la Figura 1. Tanto el enhancer de SV40 como VP16 estimulan la elongación, mientras que la replicación plasmídica dependiente del AgT la inhibe. Planteamos entonces la hipótesis de que la capacidad de elongar de la Pol II, en una situación basal que depende en gran parte de características del molde, correlaciona con la sensibilidad del splicing a cambios en la elongación.

Para poner a prueba esta hipótesis construimos el plásmido HIV2-Gal4-EDI e+o- y evaluamos el efecto de VP16 y de SW6 sobre el mismo. Nuestro razonamiento fue que este plásmido, que posee el enhancer de SV40 pero que al carecer del origen de replicación no puede replicar, debería ser muy elongador. En esta situación, esperaríamos que el efecto de VP16 fuera muy pequeño o incluso despreciable.

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos cuando evaluamos el efecto de las proteínas VP16 o SW6 sobre el splicing del pre-mRNA generado a partir del plásmido HIV2-Gal4-EDI e+o-. Este plásmido debe ser más procesivo que sus contrapartes e+o+ y e-o-, ya que en este caso la mayor procesividad está dada tanto por la presencia del enhancer de SV40, como por la ausencia del origen de replicación que impide la replicación.

Se puede ver en la Figura 5 que a pesar de que VP16 provoca un gran aumento de la transcripción, evidenciado por los resultados de la RPA, no hay un cambio significativo en la relación inclusión/exclusión del exón alternativo (calles 1 y 2). SW6 tampoco tiene un efecto significativo (calle 3), lo cual era de esperar viendo los resultados con VP16.

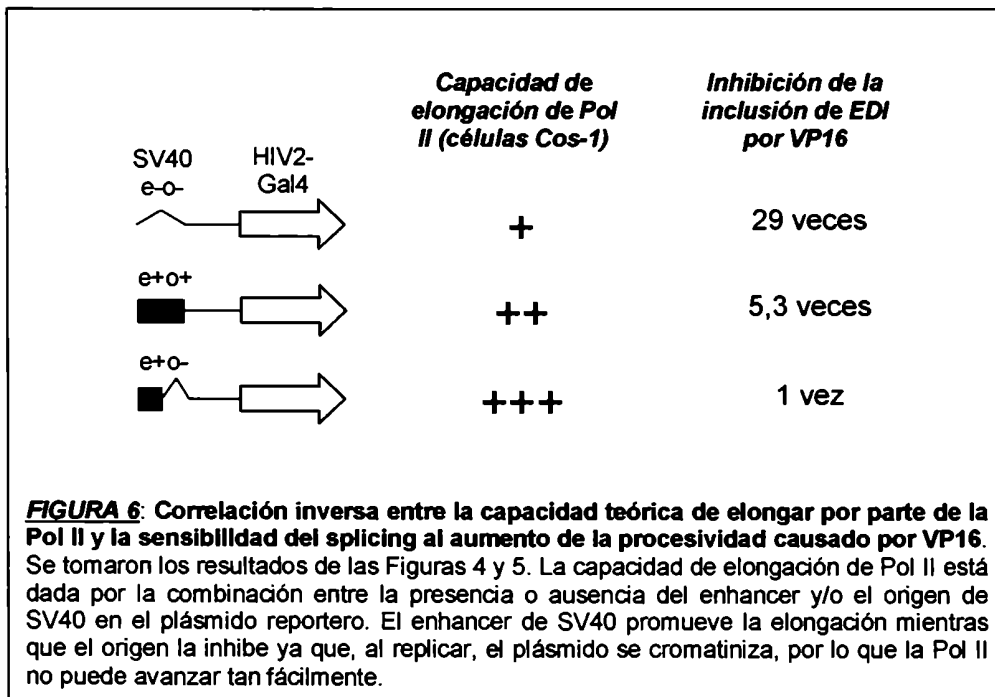
Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que una Pol II muy procesiva no es sensible a un factor de transcripción que estimula aún más la elongación, lo cual apoya nuestro modelo cinético de control del splicing alternativo.



4. Correlación entre capacidad elongadora de Pol II y efecto inhibitorio de VP16

Los resultados de las Figuras 4 y 5 nos llevaron a proponer un modelo en el cual la procesividad, o capacidad de elongar por parte de la Pol II, correlaciona con la inhibición de la inclusión de EDI por parte de VP16. Por otra parte, como vimos que la cantidad de transcripto no está relacionada con la modificación en la inclusión de EDI, podemos concluir que no existe un efecto de titulación de factores de procesamiento.

La Figura 6 muestra la correlación propuesta. En esta Figura se volcaron los resultados mostrados en las Figuras 4 y 5, y se consideró la capacidad elongadora teórica de la Pol II, tomando en cuenta las características del molde de DNA.



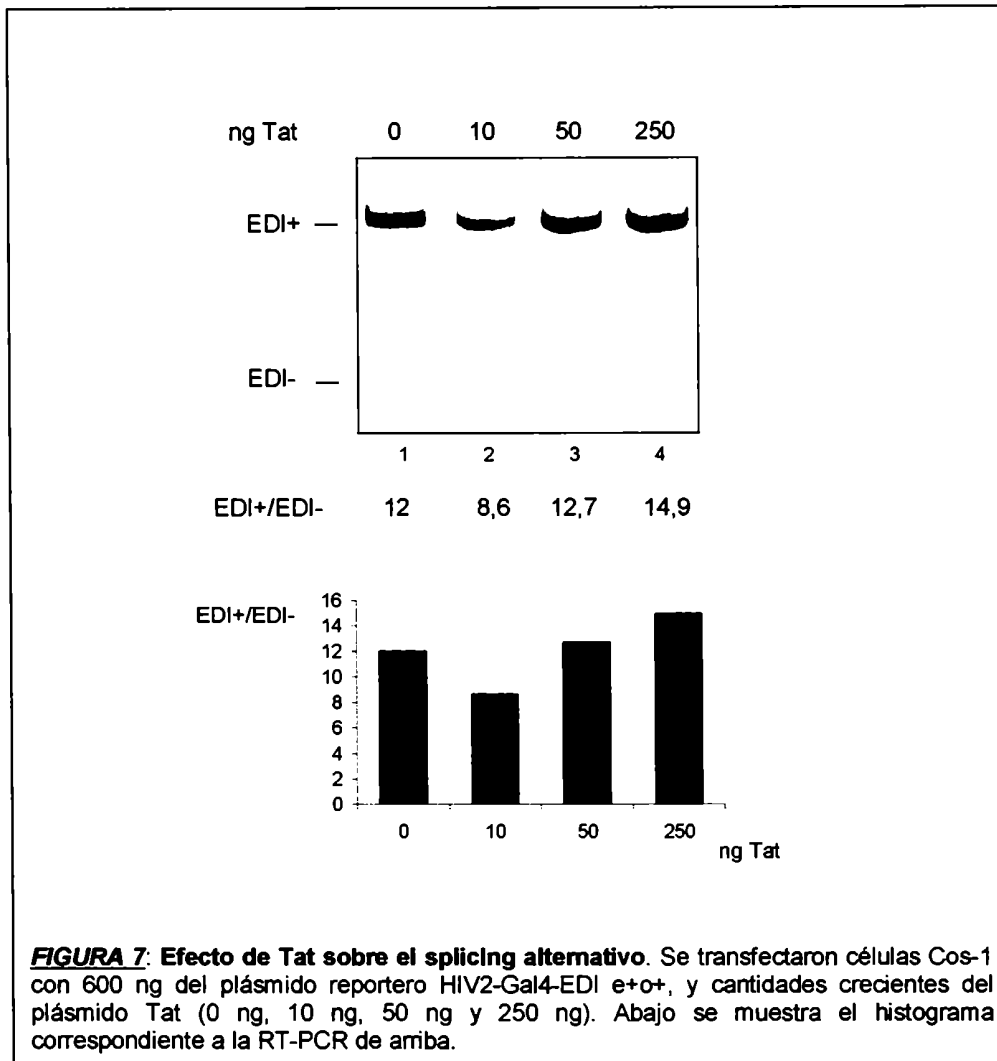
5. Efecto de la proteína Tat sobre el splicing alternativo

Hasta ahora estudiamos los efectos sobre el splicing de una proteína que estimula sólo la iniciación de la transcripción (SW6) y de otra que estimula tanto la elongación como la iniciación (VP16), y concluimos que la procesividad de la Pol II es capaz de modificar el splicing alternativo en transcritos originados a partir de moldes que por sí solos no otorgan a la Pol II una gran procesividad inicial.

Quisimos evaluar entonces qué efecto tendría una proteína que sólo estimulara elongación. Como mencionamos antes, el mejor ejemplo de este grupo es la proteína Tat del virus HIV, que reconoce la región TAR del RNA que aparece en la región 5' de transcritos recién iniciados. A diferencia de otros factores, el mecanismo de la acción de Tat fue dilucidado en gran parte. Esta proteína recluta P-TEFb a la zona de transcripción activa. P-TEFb es una kinasa dependiente de ciclina que fosforila el CTD de la Pol II y lo vuelve procesivo (ver Introducción, pág. 17).

En la Figura 7 se muestra un experimento representativo realizado en células Cos-1, para el caso del plásmido HIV2-Gal4-EDI e⁺o⁺, que posee el enhancer de SV40 y que es capaz de replicar. Se puede ver que Tat por sí sola no tiene un gran efecto sobre el splicing alternativo. Algo similar sucede con los plásmidos que no pueden replicar (o⁻), posean (e⁺) o no (e⁻) el enhancer de SV40 (resultados no mostrados).

Esto puede interpretarse de la siguiente manera: si no existe una estimulación de la iniciación de la transcripción junto con la estimulación de la elongación, como sucede en el caso de VP16, no se observa un aumento de la exclusión del exón alternativo.



6. Sinergia entre Tat y activadores que estimulan la iniciación de la transcripción

Hace varios años se describió que Sp1 y Tat son capaces de cooperar entre sí para activar la transcripción procesiva del genoma de HIV (Kamine y Chinnadurai, 1992; Southgate y Green, 1991). Por otra parte, ni VP16 ni E1a cooperan con Tat en ausencia de sitios de unión para Sp1, probablemente porque ambas proteínas son capaces de activar por sí mismas una transcripción procesiva (Yankulov et al., 1994).

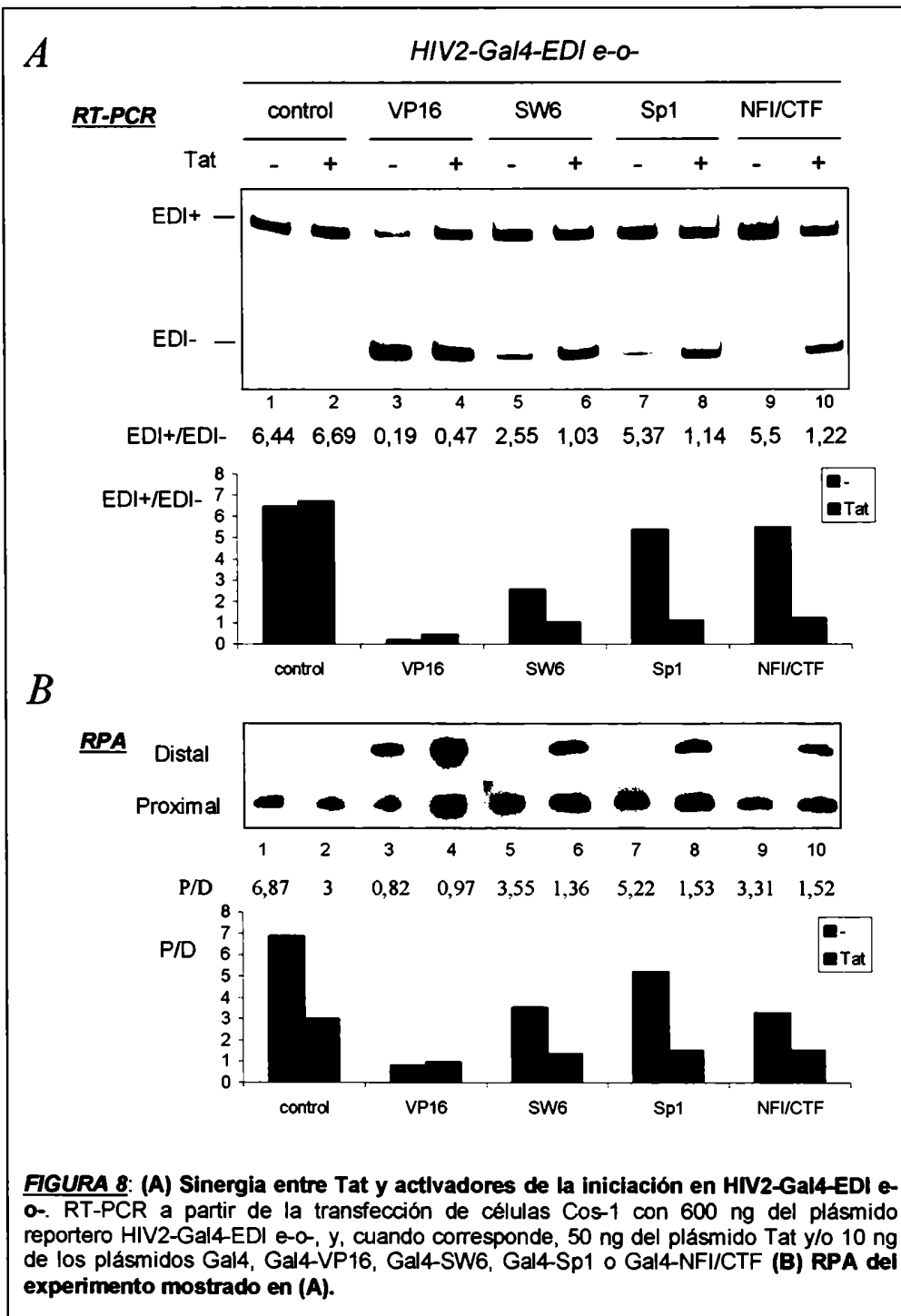
Además, ya se había demostrado que los activadores de tipo I, que estimulan la iniciación, y los de tipo IIA, que estimulan la elongación, pueden actuar sinérgicamente en la activación de la transcripción, pero no lo hacen con los activadores de tipo IIB, que estimulan ambos procesos. Esta observación implica que la sinergia puede ser el resultado de la acción concertada entre factores que estimulan dos pasos distintos de la transcripción: la iniciación y la elongación (Blau et al., 1996).

Con estos antecedentes, decidimos investigar si existe sinergia a nivel del splicing alternativo entre Tat y activadores de la iniciación como SW6, Sp1 y NFI/CTF.

La Figura 8A muestra los efectos de Tat sobre el splicing tanto en la situación basal (calles 1 y 2), como en las activaciones con VP16 (calles 3 y 4), SW6 (calles 5 y 6), Sp1 (calles 7 y 8) y NFI/CTF (calles 9 y 10). Se utilizó como reportero de splicing un plásmido que lleva el minigén bajo el control del promotor HIV2-Gal4, y que no posee el enhancer de SV40 ni es capaz de replicar (HIV2-Gal4-EDI e-o-).

En primer lugar, se ve que Tat por sí solo no tiene efecto sobre el splicing (calles 1 y 2), tal como habíamos observado en la Figura 7. Por otro lado, VP16 provoca un gran aumento de la exclusión de EDI (más de 30 veces, comparar la calle 3 con la 1), mientras que el efecto de su mutante SW6 es mucho menor (comparar la calle 5 con la 1). En el caso de las proteínas Sp1 y NFI/CTF, que estimulan la iniciación, prácticamente no existe efecto en absoluto (calles 7 y 9, respectivamente, comparadas con la calle 1).

En presencia de Tat, SW6, Sp1 o NFI/CTF (calles 6, 8 y 10 respectivamente), provocan un gran aumento de la exclusión del exón EDI. Esto no sucede cuando Tat está solo ni en presencia de VP16. Es más, en el caso de VP16, la presencia de Tat parece provocar un leve aumento en la inclusión, lo que parecería indicar, basándonos en nuestros resultados previos, que la presencia de Tat haría disminuir de algún modo la capacidad de VP16 de estimular la elongación, quizás por la interferencia entre dos mecanismos distintos. El hecho de que Tat no sea capaz de actuar en forma sinérgica con VP16 sobre el splicing alternativo, es consistente con el hecho de que ambas proteínas tampoco son capaces de actuar sinérgicamente a nivel transcripcional, como se demostró previamente (Blau et al., 1996).



Curiosamente, SW6, Sp1 y NFI/CTF son activadores transcripcionales pertenecientes a distintas familias que no guardan relación entre sí. Los dominios de transactivación de estas tres proteínas son de naturaleza muy diferente. SW6 es una cuádruple mutante de VP16, factor de transcripción con un dominio de transactivación constituido por regiones ácidas cortas. Por otra parte, el dominio de transactivación de Sp1 pertenece a la familia de los que son ricos en glutamina y el de NFI/CTF a los ricos en prolina. Lo interesante de esto es que el efecto es cualitativamente el mismo a pesar de que los mecanismos de acción involucrados son distintos. Ninguno de ellos es capaz de modificar apreciablemente el splicing alternativo por sí solo. En cuanto a la sinergia que se observa en presencia de Tat, también el efecto es similar, ya que en los tres casos se observa un notable aumento en la exclusión del exón alternativo. Por lo tanto, suponemos que este efecto de sinergia se debe al hecho de que todos ellos aumentan la iniciación, lo cual es una cualidad extrínseca al mecanismo particular de cada activador.

Para confirmar esta hipótesis, realizamos un ensayo de protección a la RNasa (RPA) para medir, al menos de una forma aproximada, cuán procesiva es la Pol II en cada caso. Como se explicó en el esquema de la Figura 3, se utilizó una ribosonda proximal, con respecto al promotor, que es complementaria a una región del mRNA situada cerca del extremo 5' (P) y una ribosonda distal que se aparea con la región 3' del mRNA (D). Si la Pol II no es procesiva, se detiene en las pausas del molde e incluso la transcripción puede terminar prematuramente, lo que genera transcriptos cortos, mientras que si la Pol II es procesiva, es capaz de superar dichas pausas y proseguir la transcripción. La proporción entre las sondas protegidas de la digestión por RNasas gracias a la unión al mRNA del minigén es por lo tanto un indicador de la procesividad de la Pol II, medida en el estado estacionario.

La Figura 8B muestra la RPA realizada con las sondas P y D para el experimento mostrado en la Figura 8A. Podemos ver que la proporción de sonda proximal protegida es mucho menor en presencia de Tat que en su ausencia para los activadores SW6, Sp1 y NFI/CTF, por lo que concluimos que la procesividad es mayor en estos casos. Curiosamente, Tat solo no provoca cambios en el splicing, aunque la RPA muestra que aumenta la procesividad. Esto nos sugiere la posibilidad

de que Tat podría estar afectando negativamente la exclusión, a través de un mecanismo independiente del control de la elongación. Sin embargo, no tenemos evidencias para apoyar esta hipótesis.

El hecho de que la relación P/D sea menor cuando Tat actúa en forma sinérgica con un activador de tipo I es consistente con el hecho de que la sinergia con Tat provoca principalmente un aumento en la elongación (Blau et al., 1996). Es interesante también notar la gran similitud entre los patrones de los dos histogramas, el correspondiente a la RT-PCR y el correspondiente a la RPA, en la Figura 8.

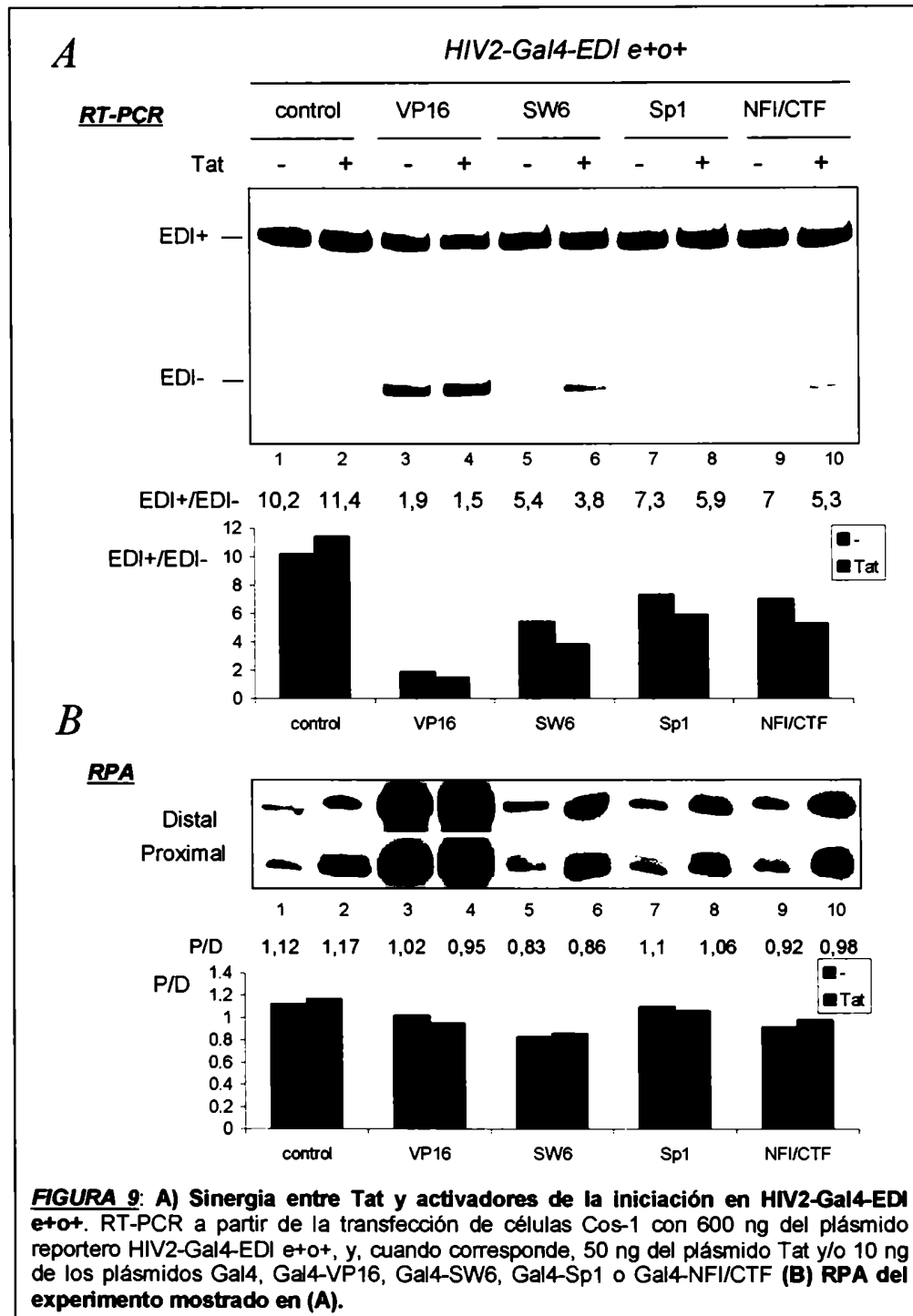
De esta manera, comprobamos que la sinergia observada entre estos activadores y Tat, que ya había sido reportada previamente para la transcripción, también se observa a nivel del splicing, y que los resultados obtenidos apoyan el modelo propuesto.

Luego de esto, quisimos extender estos resultados de sinergia entre Tat y activadores transcripcionales que estimulan la iniciación por Pol II. Para confirmar que este efecto no era particular de un plásmido reportero que no puede replicar, como es el caso del utilizado en la Figura 8, utilizamos como reportero de splicing un plásmido que también lleva el minigén bajo el control del promotor HIV2-Gal4, pero que posee el enhancer de SV40 y además es capaz de replicar (HIV2-Gal4-EDI e+o+).

Realizamos entonces el mismo esquema experimental de la Figura 8, con este plásmido. Como habíamos observado en la Figura 4 que este plásmido también responde a VP16 pero es menos sensible a cambios en la elongación, probablemente debido a que basalmente es un molde más elongador, esperábamos ver también menor sensibilidad al resto de los factores de transcripción utilizados.

La Figura 9A muestra que el efecto sinérgico de Tat con SW6, Sp1 y NFI/CTF, existe, pero es extremadamente débil. Los resultados de la RPA (Figura 9B) no muestran ninguna diferencia. Esto no significa que no haya cambios en la elongación, sino que puede deberse a una falta de sensibilidad del método, que sólo es capaz de medir cantidades de RNA en estado estacionario. Además, con este experimento también comprobamos que efectivamente el molde HIV2-Gal4-EDI e+o+ otorga a la Pol II mayor procesividad que el molde HIV2-Gal4-EDI e-o-, ya que, la proporción

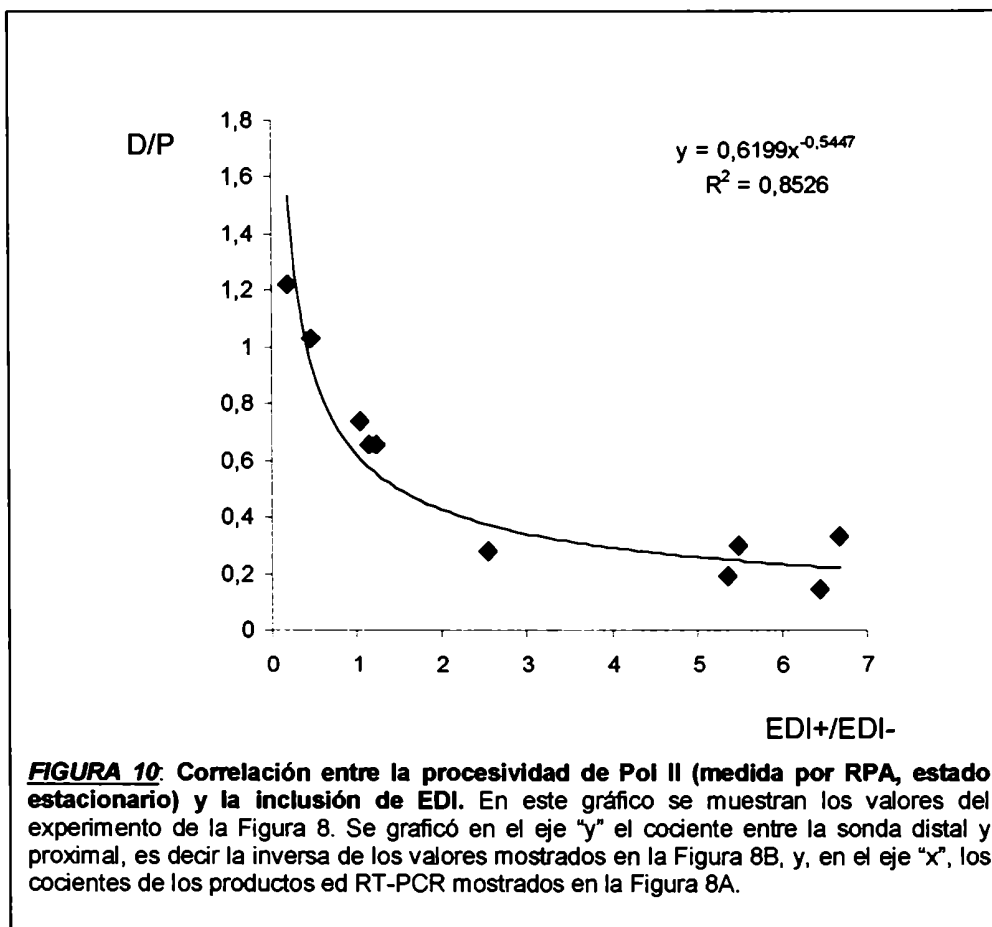
P/D en la situación basal (calle 1) es en el primer caso 1,12, mientras que en el segundo es 6,87.



7. Correlación entre la procesividad de Pol II y la inclusión de EDI

Con estos resultados, nos interesó entonces ver si existía una correlación cuantitativa entre la inclusión del exón EDI y la procesividad de Pol II. Para ello, procedimos a graficar los datos obtenidos en la Figura 8.

El gráfico de la Figura 10 muestra en el eje "y" el cociente entre la sonda distal y la proximal de la RPA (D/P), es decir la inversa de los valores de la Figura 8B, y en el eje "x" el cociente entre la cantidad de producto de RT-PCR EDI+ y EDI-, mostrados en la Figura 8A. Se puede observar que existe una correlación inversa entre la procesividad de Pol II, medida como D/P, y la inclusión de EDI.



Examinando la Figura 10 en más detalle, podemos ver que se puede separar el gráfico en una zona de respuesta, donde existe una clara correlación inversa entre ambos parámetros, y una zona más plana donde el splicing cambia pero estos cambios no se ven evidenciados por cambios en la procesividad. Probablemente, esto se deba a las limitaciones de este método para medir procesividad, en donde las concentraciones de mRNA que se cuantifican mediante la RPA corresponden al estado estacionario.

Más allá de esto, la observación de la existencia de esta correlación apoya nuestro modelo de que cuanto mayor es la procesividad, el reconocimiento del exón alternativo es menor, por lo que es incluido en menor proporción. Esto es particularmente muy interesante, ya que se trata por primera vez de una situación controlada, más fisiológica que el cambio de promotores, y utilizando factores que unen el DNA reportero en forma directa sin tener, en principio, efectos indirectos.

Conclusiones del Capítulo 1

En este Capítulo de Resultados, demostramos que existen activadores transcripcionales que modifican el splicing alternativo de un exón tipo “cassette”. En particular, los activadores capaces de realizar esto son aquellos que favorecen la procesividad de Pol II. Además, encontramos una correlación cuantitativa entre la capacidad de elongar de la Pol II, medida en estado estacionario por medio de un ensayo de RPA, y el grado de inclusión o exclusión del exón alternativo. Observamos que a mayor procesividad de Pol II se produce una menor inclusión del exón alternativo debido probablemente a un deficiente reconocimiento del mismo.

Estas evidencias apoyan el modelo cinético de control del splicing alternativo que describimos en la Introducción (Figura 1, pág. 22).

CAPÍTULO 2: Influencia de P-TEFb sobre el splicing alternativo

Con los resultados obtenidos en el Capítulo 1, nos preguntamos entonces cuáles podrían ser los verdaderos efectores de la respuesta del splicing alternativo a la elongación transcripcional.

Los factores de transcripción utilizados en el Capítulo 1 actúan, con excepción de la proteína Tat, por mecanismos aún no del todo esclarecidos. Nuestra hipótesis era que estos factores pueden intervenir en el reclutamiento al promotor de proteínas que aumentan la capacidad de elongar de la Pol II. Como dijimos en la Introducción (pág. 17), P-TEFb es la proteína involucrada en elongación cuyo mecanismo se conoce mejor. Se sabe que fosforila el CTD de Pol II y que esta fosforilación es lo que la vuelve procesiva. En cuanto al reclutamiento de P-TEFb a la zona de transcripción, habíamos mencionado que puede ser reclutada por Tat. No está muy claro si existen activadores transcripcionales específicos que también sean capaces de reclutar esta proteína, pero lo más probable es que los promotores sean capaces de reclutarla diferencialmente (Price, 2000).

Por lo tanto, nos enfocamos en esta proteína y nos preguntamos si está involucrada, en nuestro sistema, en la regulación del splicing alternativo a través de una modificación en la elongación.

Como estrategias experimentales, estudiamos el efecto de la droga inhibidora DRB, la dependencia del CTD de Pol II y, por último, el efecto de la proteína MAQ1/HEXIM1, que al unirse a P-TEFb lo vuelve inactivo.

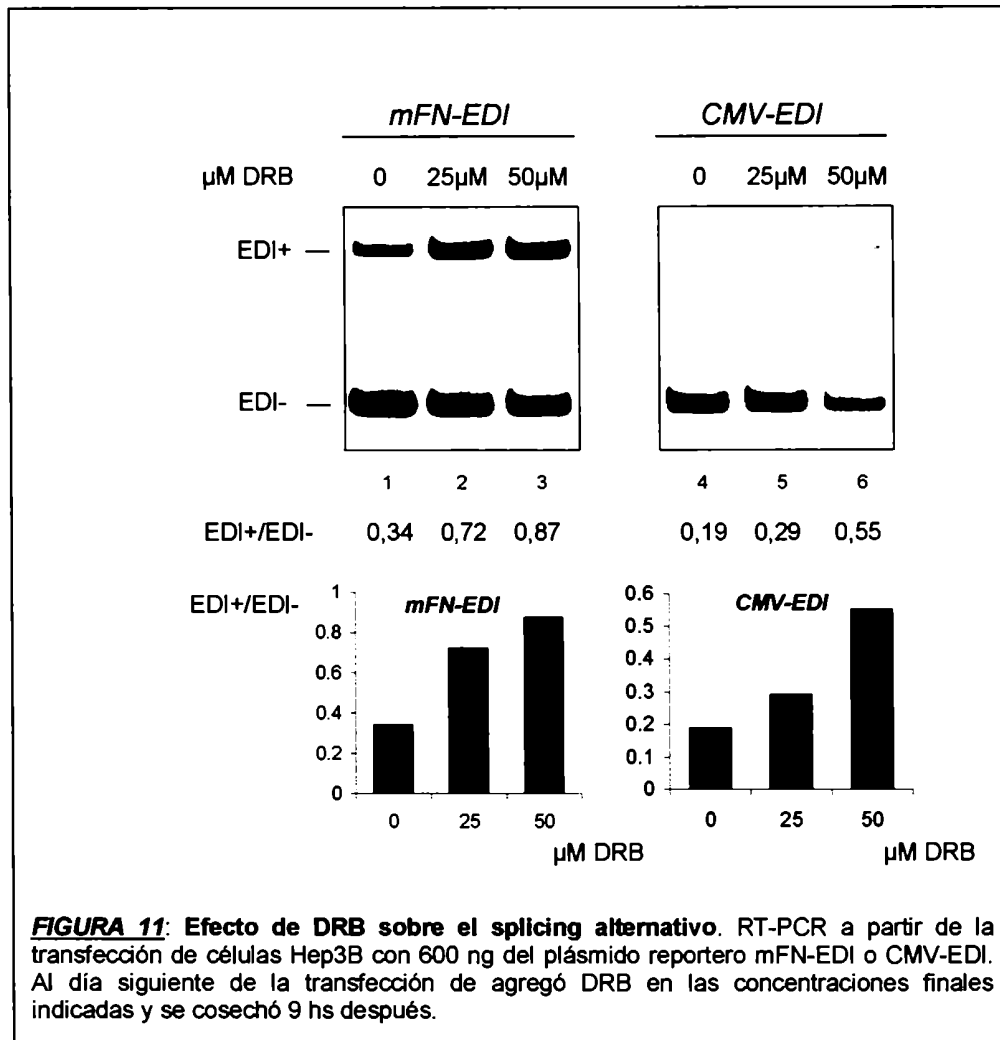
8. Efecto de DRB, droga inhibidora de P-TEFb

Como mencionamos antes, quisimos estudiar si el dímero P-TEFb podría estar involucrado en los efectos descritos en el Capítulo 1. Nuestra hipótesis era que el reclutamiento de P-TEFb por parte de un promotor es diferente según la identidad del mismo, ya que se sabe que la fosforilación de la Pol II por P-TEFb está involucrada en la estimulación de la elongación por activadores (Mancebo et al., 1997). De esta manera, al reclutar P-TEFb, el CTD de Pol II se hiperfosforila debido a la acción kinasa de CTD de la subunidad Cdk9 de P-TEFb y, por consiguiente, la Pol II se vuelve más procesiva, modificando consiguientemente el splicing del exón alternativo.

La droga 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbencimidazol (DRB) es un inhibidor específico de P-TEFb en bajas concentraciones (Price, 2000). Las concentraciones de DRB utilizadas en esta tesis fueron 25 μ M y 50 μ M final, dado que a concentraciones mayores, DRB deja de ser específico en la inhibición de la fosforilación del CTD, y comienza a actuar como inhibidor de otras kinasas (Chodosh et al., 1989). Al día siguiente de la transfección, se agrega DRB al medio de cultivo de las células, y se cosecha la transfección, según el caso, 9 hs después o al día siguiente.

Dado que DRB es un inhibidor de la procesividad, si nuestro modelo era correcto esperábamos ver con esta droga una mayor inclusión de EDI. En efecto, esto es lo que ocurre en células Hep3B. La Figura 11 muestra que ya sea que el promotor que dirige la transcripción del minigén sea mFN (calles 1 a 3) o CMV (calles 4 a 6), DRB provoca un aumento de la inclusión del exón alternativo. Por lo tanto, esto sugiere que P-TEFb podría estar siendo reclutado a estos promotores, probablemente a través de factores de transcripción que, al unirse al promotor, funcionan como puente.

Estos efectos fueron observados en células Hep3B. Curiosamente, en células Cos-1 la adición de DRB no provocó cambios en el splicing alternativo (resultados no mostrados). Esto podría deberse a diferencias mecánicas entre estos dos tipos celulares, o a que DRB es incapaz de ingresar a estas células, o ingresa pero es degradado.

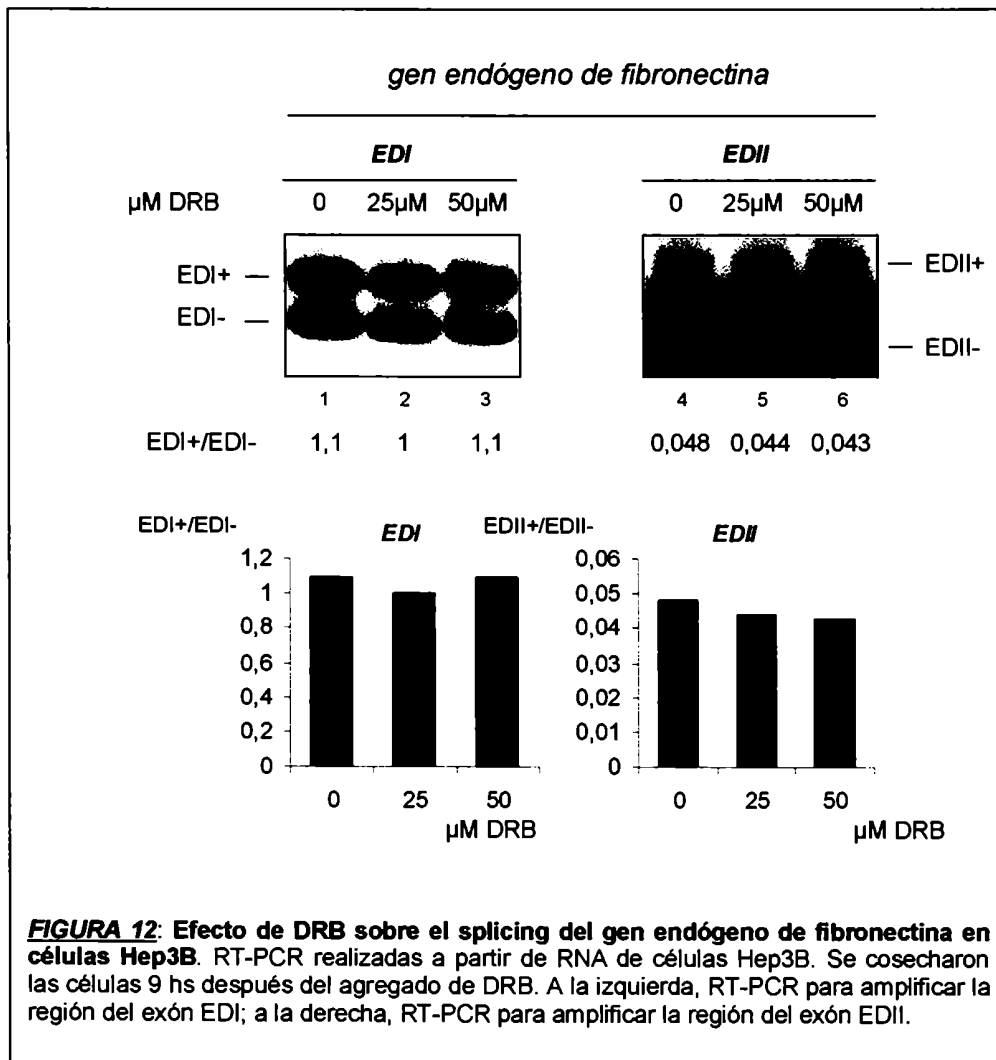


Habíamos visto que los transcritos generados a partir de los plásmidos transfectados son sensibles a DRB (Figura 11), pero nos resultó interesante averiguar si un gen endógeno, que tiene una arquitectura y cromatinización muy diferentes, es también capaz de responder a DRB. Entonces, elegimos al gen endógeno de fibronectina, ya que ya habíamos demostrado que ese promotor respondía a DRB en un contexto de minigén inmerso en un plásmido.

Como se ve en la Figura 12, el splicing alternativo del gen endógeno de fibronectina no responde a DRB. Esto es así para el caso del exón alternativo EDI, que estudiamos en nuestro minigén y que sabemos que es sensible a cambios de promotor y de

elongación, y también para el exón EDII, que no responde a estos cambios (Kadener et al., 2001; Pagani et al., 2003).

Esto nos sugiere que el efecto de DRB depende no sólo de la línea celular, sino también de la arquitectura del molde a partir del cual se transcribe el mRNA. En la Discusión volveremos sobre este tema.



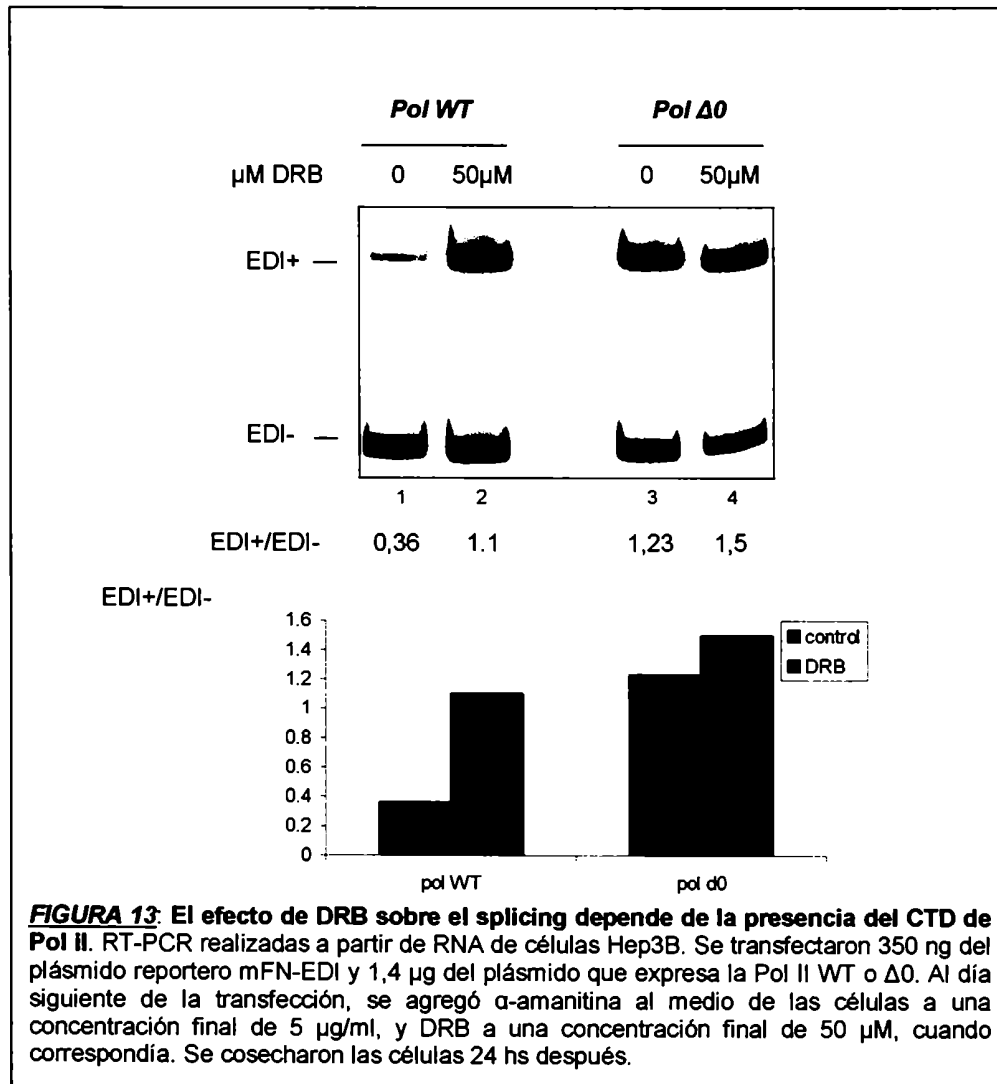
9. El efecto de DRB sobre el splicing depende del CTD de Pol II

Como dijimos antes, DRB inhibe la procesividad de Pol II actuando sobre P-TEFb, que fosforila al CTD. Además, experimentos utilizando Pol II con y sin CTD mostraron que sólo aparecen transcritos sensibles a DRB si el CTD está intacto (Marshall et al., 1996). Con estas evidencias, nos preguntamos si el efecto de DRB también depende del CTD en nuestro sistema.

Para ello utilizamos una construcción que expresa la subunidad mayor (Rpb1) de la RNA polimerasa II humana carente de CTD. Esta construcción es denominada $\Delta 0$ (ver Materiales y Métodos para más detalles). Para favorecer la utilización de esta enzima en detrimento de la endógena, se le introdujo a esta construcción una mutación (N792D) que la volvió resistente a la droga α -amanitina. De esta manera, agregando α -amanitina al medio al día siguiente de la transfección, la enzima endógena es inhibida mientras que la transfectada no lo es (Gerber et al., 1995). Para controlar adecuadamente las transfecciones con este plásmido, se utilizó en paralelo un plásmido que expresa la Rpb1 humana *wild-type* (WT) pero que también lleva la resistencia a α -amanitina. De este modo nos aseguramos de que los efectos observados se deben a la ausencia o no de CTD exclusivamente, y no a la mutación que provee la resistencia, o a diferencias en niveles de expresión causadas por la sobreexpresión del plásmido.

En la Figura 13 se muestra un experimento representativo en el cual se transfectaron las polimerasas resistentes a α -amanitina, WT y $\Delta 0$ junto con el plásmido reportero de splicing dirigido por el promotor de mFN. Se eligió este promotor como ejemplo de promotor que responde a DRB en células Hep3B (ver Figura 11). Vemos en las calles 1 y 2 que este plásmido responde a DRB con un efecto de 3 veces cuando la polimerasa que transcribe es la WT. Sin embargo, si la polimerasa que transcribe el minigén es la $\Delta 0$, el efecto es mucho menor, de apenas 1,2 veces. Por lo tanto, concluimos que DRB depende de la presencia del CTD de Pol II para ejercer su efecto sobre el splicing. Esto es, como decíamos antes, consistente con lo que se conoce del mecanismo de acción de DRB, y es una prueba más de que P-TEFb podría

estar involucrado. Es más, si comparamos la calle 3 con la calle 1, vemos que cuando la transcripción es llevada a cabo por la polimerasa $\Delta 0$, se produce un aumento de la inclusión de 3,4 veces. Esto es lógico si pensamos que en ausencia del CTD, P-TEFb no puede volver procesiva a la Pol II mediante la hiperfosforilación de dicho dominio, lo que conllevaría, en nuestro modelo, a un mejor reconocimiento del exón alternativo EDI por la maquinaria de splicing.



10. DRB dificulta la transactivación mediada por Tat

Hasta ahora estudiamos la importancia de P-TEFb sobre el splicing alternativo a través de la utilización de la droga DRB, utilizando plásmidos reporteros dirigidos por distintos promotores, en particular el promotor de mFN. DRB no tiene efecto sobre el splicing del mRNA transcrito a partir de nuestro minigén reportero cuando el promotor es HIV2 (resultado no mostrado). Esto era esperable, ya que se trata de un promotor mínimo sin sitios de unión a proteínas que puedan reclutar P-TEFb.

Quisimos investigar entonces si P-TEFb está involucrado en los efectos de Tat sobre el splicing alternativo. Se sabe que Tat actúa como una proteína elongadora gracias a que recluta P-TEFb al transcripto naciente y, de ese modo, ubica a P-TEFb en la cercanía de la Pol II que está transcribiendo dicho molde, lo que permite que ocurra la fosforilación del CTD (Wimmer et al., 1999). Además, de manera consistente con esta dependencia de P-TEFb, se demostró que DRB es capaz de inhibir la transactivación mediada por Tat (Marciniak y Sharp, 1991; Zhu et al., 1997).

En nuestro sistema, habíamos observado que Tat actúa sinérgicamente con activadores de la iniciación (Figura 8) pero que por sí sola no es capaz de modificar el splicing alternativo en células Cos-1 (Figura 7). Dado que no pudimos observar un efecto de DRB en las células Cos-1, nos vimos obligados a trabajar en las células Hep3B.

Transfectamos células Hep3B con Tat, sola o en combinación con VP16, proteína que activa tanto iniciación como elongación, o con NFI/CTF como ejemplo de proteína que activa sólo iniciación. Utilizamos como plásmido reportero el plásmido HIV2-Gal4-EDI e-o-, que había demostrado ser más sensible a cambios en la elongación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.

Analizando la situación sin DRB, podemos observar que, a diferencia de lo que ocurre en las células Cos-1 (Figura 8), en estas células Tat por sí solo tiene efecto sobre el splicing (calles 1 y 2) y es capaz de provocar una mayor exclusión del exón. Este efecto es de 1,9 veces en este experimento. Como era de esperarse, VP16 no es afectado por la presencia de Tat (calles 3 y 4), mientras que NFI/CTF sí lo es (calles 5

y 6). En este caso, a diferencia de lo que ocurre en las células Cos-1, debido al gran efecto de Tat sobre el basal, la sinergia entre un activador de la iniciación y Tat no es tan conspicua. Sin embargo, podemos ver que a pesar de que Tat tiene un efecto de 1,9 veces sobre el basal, la adición de Tat a NFI/CTF provoca un efecto mucho mayor, de 3,25 veces.

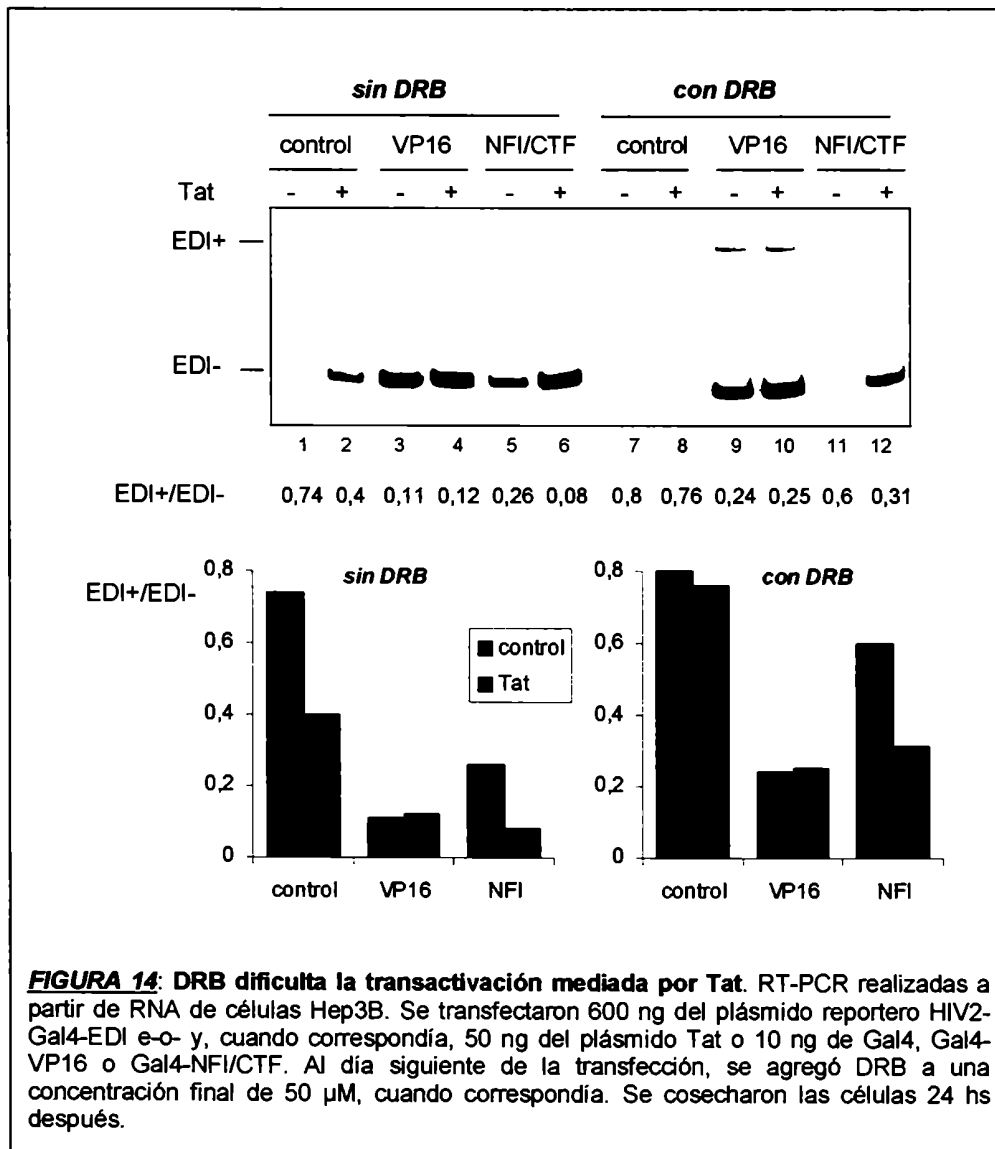


FIGURA 14: DRB dificulta la transactivación mediada por Tat. RT-PCR realizadas a partir de RNA de células Hep3B. Se transfectaron 600 ng del plásmido reportero HIV2-Gal4-EDI e-o- y, cuando correspondía, 50 ng del plásmido Tat o 10 ng de Gal4, Gal4-VP16 o Gal4-NFI/CTF. Al día siguiente de la transfección, se agregó DRB a una concentración final de 50 μ M, cuando correspondía. Se cosecharon las células 24 hs después.

Cuando DRB está presente vemos que el efecto de Tat sobre el basal prácticamente desaparece (comparar calles 7 y 8 con 1 y 2), por lo que suponemos que DRB está inhibiendo la acción de Tat sobre el splicing debido a la inhibición de la actividad kinasa de P-TEFb. Como era de esperarse, VP16 no es afectado de manera apreciable por DRB, lo que nos sugiere que el mecanismo por el cual estimula la elongación es independiente de P-TEFb (comparar calles 9 y 10 con 3 y 4).

Curiosamente, pese a que DRB impidió casi en su totalidad la acción de Tat sobre el basal (calles 7 y 8), cuando se cotransfecta NFI/CTF (calles 11 y 12) el efecto de Tat sobre NFI/CTF no disminuye tanto. Esto podría hacer pensar que el mecanismo de acción de Tat en este caso no depende exclusivamente del reclutamiento de P-TEFb. Sin embargo, no existen hasta el momento evidencias de la bibliografía que apoyen esta hipótesis.

Por otra parte, es interesante notar que en ausencia de DRB se observa un efecto de NFI/CTF de 2,85 veces (comparar calles 1 y 5), lo que nos hace pensar que existe un leve aumento de la elongación, pequeño en relación con el provocado por VP16, con este factor que en principio estimula mayormente la iniciación de la transcripción. Curiosamente, en presencia de DRB, este efecto disminuye a sólo 1,3 veces (comparar calles 7 y 11). Esto podría indicarnos que el leve aumento de la elongación que suponemos se produce debido a la unión de NFI/CTF al promotor, está mediado por P-TEFb.

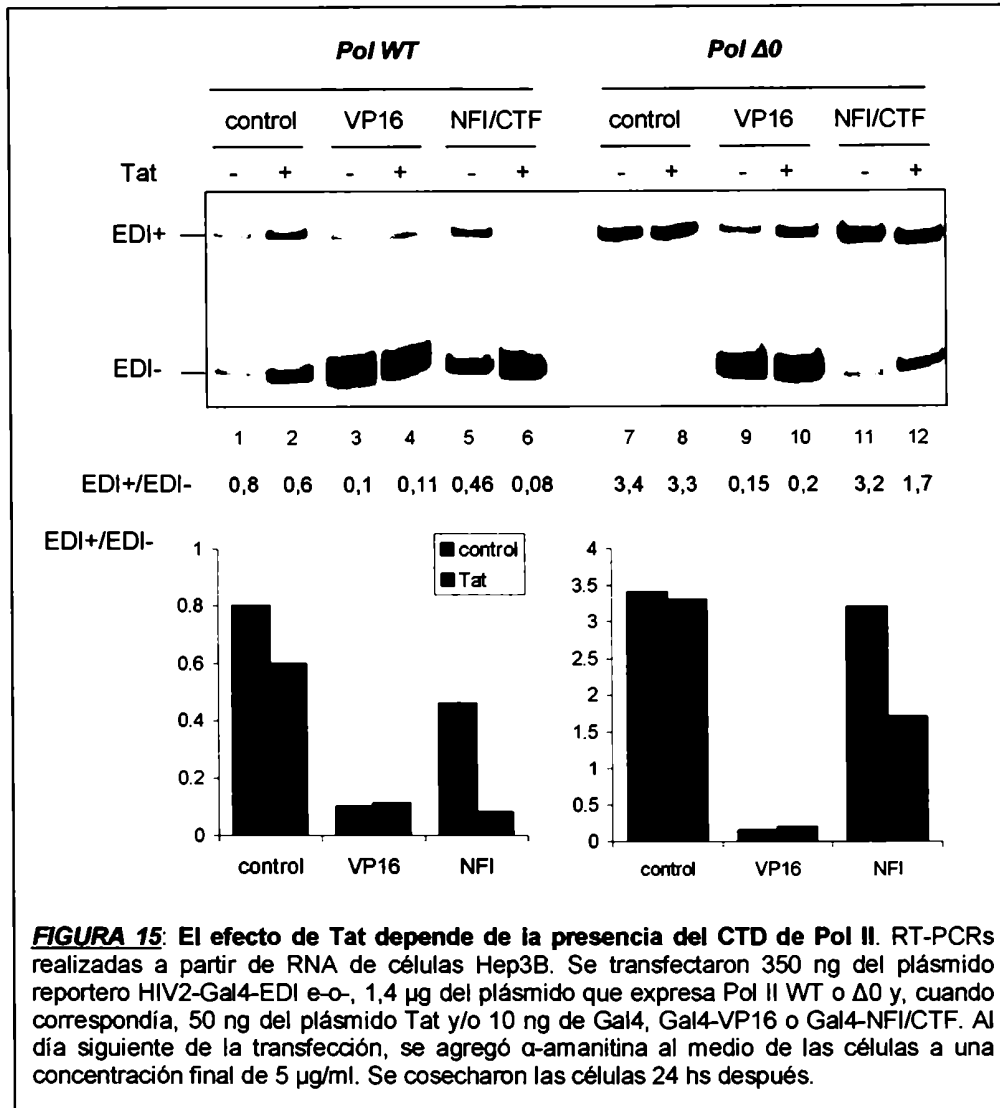
11. El efecto de Tat depende del CTD de Pol II

Lo siguiente que quisimos investigar, para concluir con la conexión P-TEFb-Tat-CTD en nuestro sistema, era ver si efectivamente Tat depende de la presencia del CTD para actuar sobre el splicing alternativo.

Para ello, realizamos un experimento similar al de la Figura 13, en el cual transfectamos plásmidos que expresan Pol II resistentes a α -amanitina en su variante WT (*wild-type*) y $\Delta 0$ (con delección del dominio carboxi-terminal), y evaluamos si el

efecto de Tat sobre el basal, sobre VP16 o sobre NFI/CTF es diferente cuando la transcripción es llevada a cabo por la Pol II WT o por la Pol II $\Delta 0$.

La Figura 15 muestra los resultados de este experimento.



Como en la Figura 14, vemos que Tat provoca un pequeño aumento en la exclusión de EDI en el basal (calles 1 y 2) y no afecta a VP16 (calles 3 y 4). Sin embargo, es capaz de actuar sinérgicamente con NFI/CTF ya que el aumento de la exclusión es mucho mayor, de 5,75 veces (calles 5 y 6). Pero si la polimerasa que dirige la

transcripción del minigén carece del CTD (Pol $\Delta 0$), se puede observar que el efecto de Tat sobre el basal desaparece (calles 7 y 8) y el efecto de Tat sobre NFI/CTF disminuye notablemente, ya que pasa a ser de sólo 1,9 veces (calles 11 y 12).

De manera similar a lo que ocurre en la Figura 14, vemos también que NFI/CTF prácticamente no afecta al splicing alternativo cuando la transcripción está dada por la Pol $\Delta 0$ (calles 7 y 11), mientras que sí lo hace cuando la polimerasa que transcribe es la Pol II WT (calles 1 y 5). Por lo tanto, esto apoya lo que propusimos en la Figura 14. El pequeño efecto “elongador” de NFI/CTF parece depender de P-TEFb, o por lo menos, para ser más rigurosos, de la presencia del CTD (Figura 15), y parece ser sensible a la droga DRB (Figura 14).

Como en la Figura 13, se ve además que cuando la Pol $\Delta 0$ transcribe el minigén, se produce un aumento en la inclusión del exón de 4,25 veces (calles 1 y 7), presumiblemente debido a que P-TEFb no puede actuar a través del CTD estimulando la elongación de la transcripción.

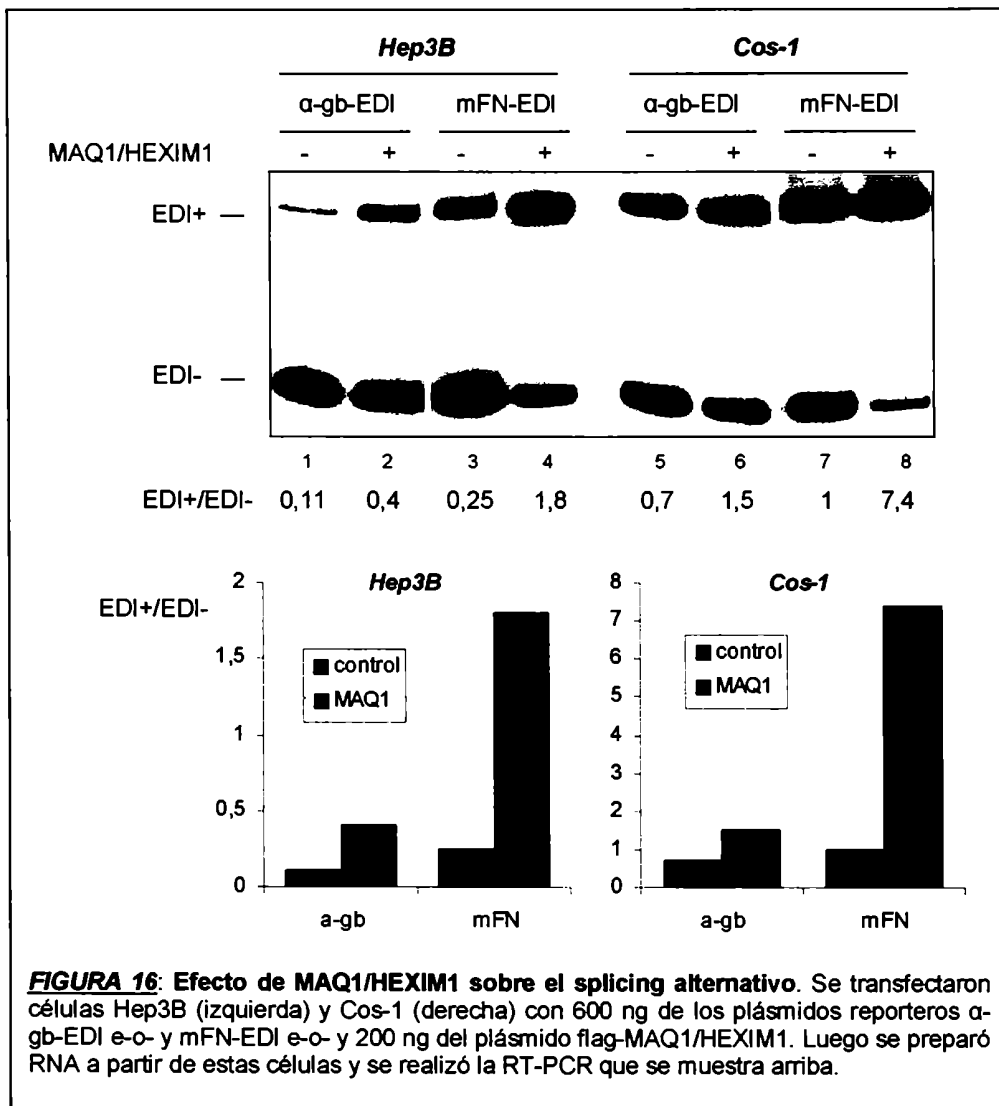
12. Efecto de MAQ1/HEXIM1 sobre el splicing alternativo

Otra forma de abordar la pregunta de si P-TEFb está involucrado en el aumento de la elongación, es utilizando la proteína MAQ1/HEXIM1 (Michels et al., 2003). Se describió que esta proteína es capaz de unirse a P-TEFb y que esa unión impide que P-TEFb interaccione, por ejemplo, con la proteína Tat, causando por lo tanto una inhibición en la acción de P-TEFb. MAQ1/HEXIM1 fue muy estudiada en relación con el sistema de HIV2 y Tat, pero nuestra hipótesis era que si el mecanismo de acción de MAQ1/HEXIM1 se debe a que secuestra a P-TEFb, debería ser lo mismo si lo que hace es impedir la unión de P-TEFb a Tat, o la unión de P-TEFb a otras proteínas como factores de transcripción, etc, que los experimentos anteriores nos sugirieron que puede existir.

Si esto fuera así, deberíamos observar, en nuestro modelo, un aumento en la inclusión del exón alternativo en presencia de MAQ1/HEXIM1, debido a la disminución del

reclutamiento de P-TEFb por parte de las secuencias regulatorias del promotor del minigén.

La Figura 16 muestra que al cotransfectar un plásmido que expresa MAQ1/HEXIM1 con los plásmidos reporteros que contienen el minigén bajo el promotor de α -globina o de mFN, se produce un fuerte aumento de la inclusión en todos los casos, ya sea que se trate de células Hep3B o Cos-1. Esto apoya fuertemente nuestra hipótesis y resalta la importancia de P-TEFb y su control de la elongación en el splicing alternativo.



Demostramos entonces que MAQ1/HEXIM1 tiene efecto sobre el splicing del pre-mRNA transcripto por los promotores de α -gb y de mFN (Figura 16). A continuación, nos preguntamos si la sobreexpresión de esta proteína también tiene efecto sobre Tat, ya que es el mecanismo que más se estudió en relación con MAQ1/HEXIM1. Para ello transfectamos células Hep3B con el plásmido HIV2-Gal4-EDI e-o- y cotransfectamos el plásmido que expresa MAQ1/HEXIM1 en presencia o ausencia de Tat o VP16. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos.

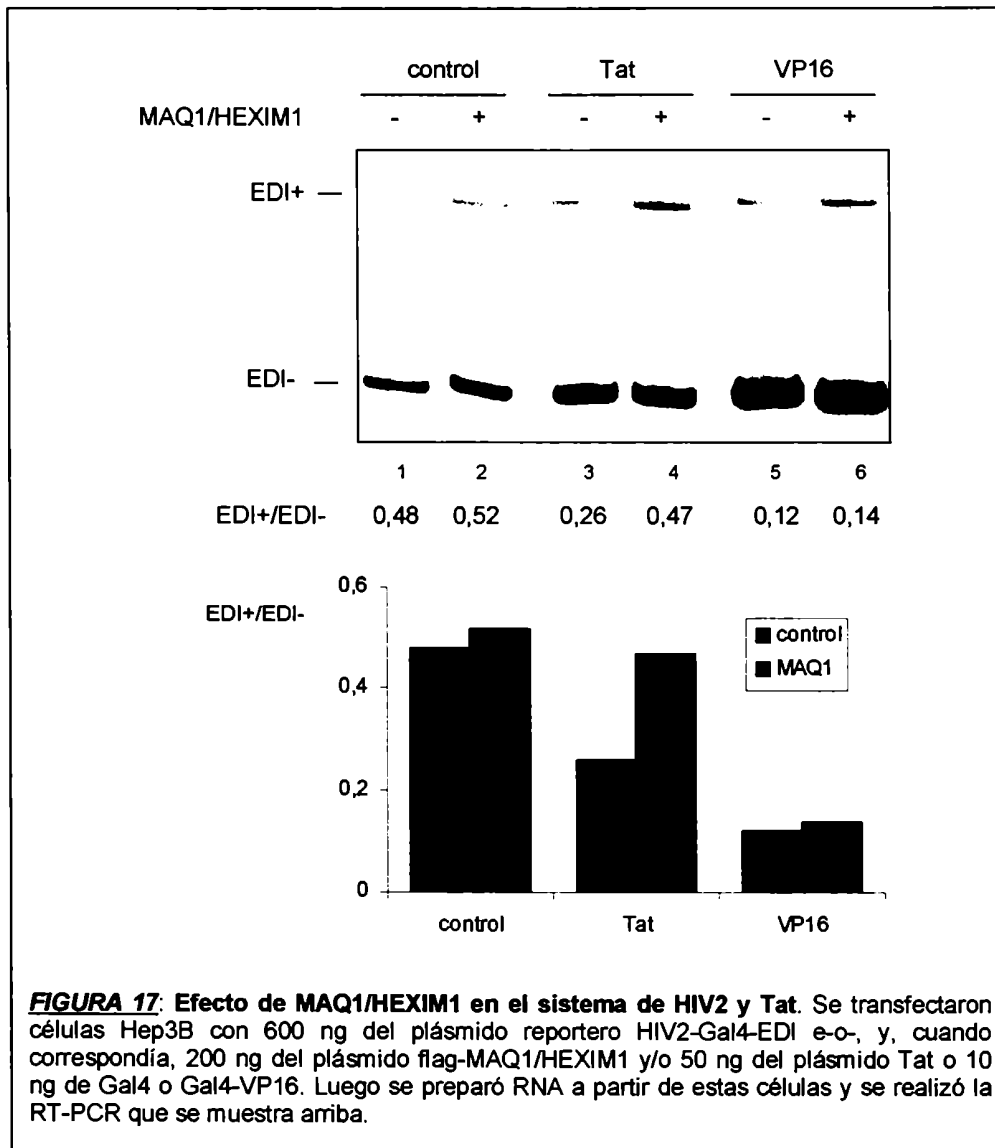


FIGURA 17: Efecto de MAQ1/HEXIM1 en el sistema de HIV2 y Tat. Se transfectaron células Hep3B con 600 ng del plásmido reportero HIV2-Gal4-EDI e-o-, y, cuando correspondía, 200 ng del plásmido flag-MAQ1/HEXIM1 y/o 50 ng del plásmido Tat o 10 ng de Gal4 o Gal4-VP16. Luego se preparó RNA a partir de estas células y se realizó la RT-PCR que se muestra arriba.

Si observamos las calles 1, 3 y 5 de la Figura 17, podemos ver que Tat tiene efecto sobre el basal, ya que hace disminuir la inclusión unas 1,8 veces, mientras que el efecto de VP16 es de 4 veces en este experimento en particular.

Sin embargo, en presencia de MAQ1/HEXIM1 ocurre algo muy interesante. La calle 2 muestra que MAQ1/HEXIM1 no afecta al basal. Esto tiene sentido si pensamos que se trata de un promotor mínimo que prácticamente no posee sitios de unión a factores de transcripción endógenos, que además demostró ser muy poco elongador en otros experimentos, y que, por lo tanto, suponemos que es incapaz de reclutar P-TEFb. Contrariamente a esto, la calle 4 muestra que en presencia de MAQ1/HEXIM1, desaparece el efecto de Tat. Esto coincide plenamente con lo que se conoce de MAQ1/HEXIM1 y su interferencia de la unión de P-TEFb a Tat. De manera similar a lo que sucedió en los experimentos anteriores de este capítulo de resultados, el efecto de VP16 no es modificado por la presencia de MAQ1/HEXIM1 (calles 5 y 6).

Conclusiones del Capítulo 2

En líneas generales, de este Capítulo podemos concluir que existen fuertes evidencias de la importancia de P-TEFb en provocar un aumento en la elongación que causa un cambio en el splicing alternativo. Esto fue demostrado por la sensibilidad a DRB, por la dependencia del dominio carboxi-terminal de la Pol II, y porque MAQ1/HEXIM1 también es capaz de modificar el splicing. Todo esto refuerza aún más nuestro modelo cinético de regulación del splicing alternativo.

CAPÍTULO 3: Importancia de la fuerza de los sitios de splicing en la sensibilidad a cambios en la elongación

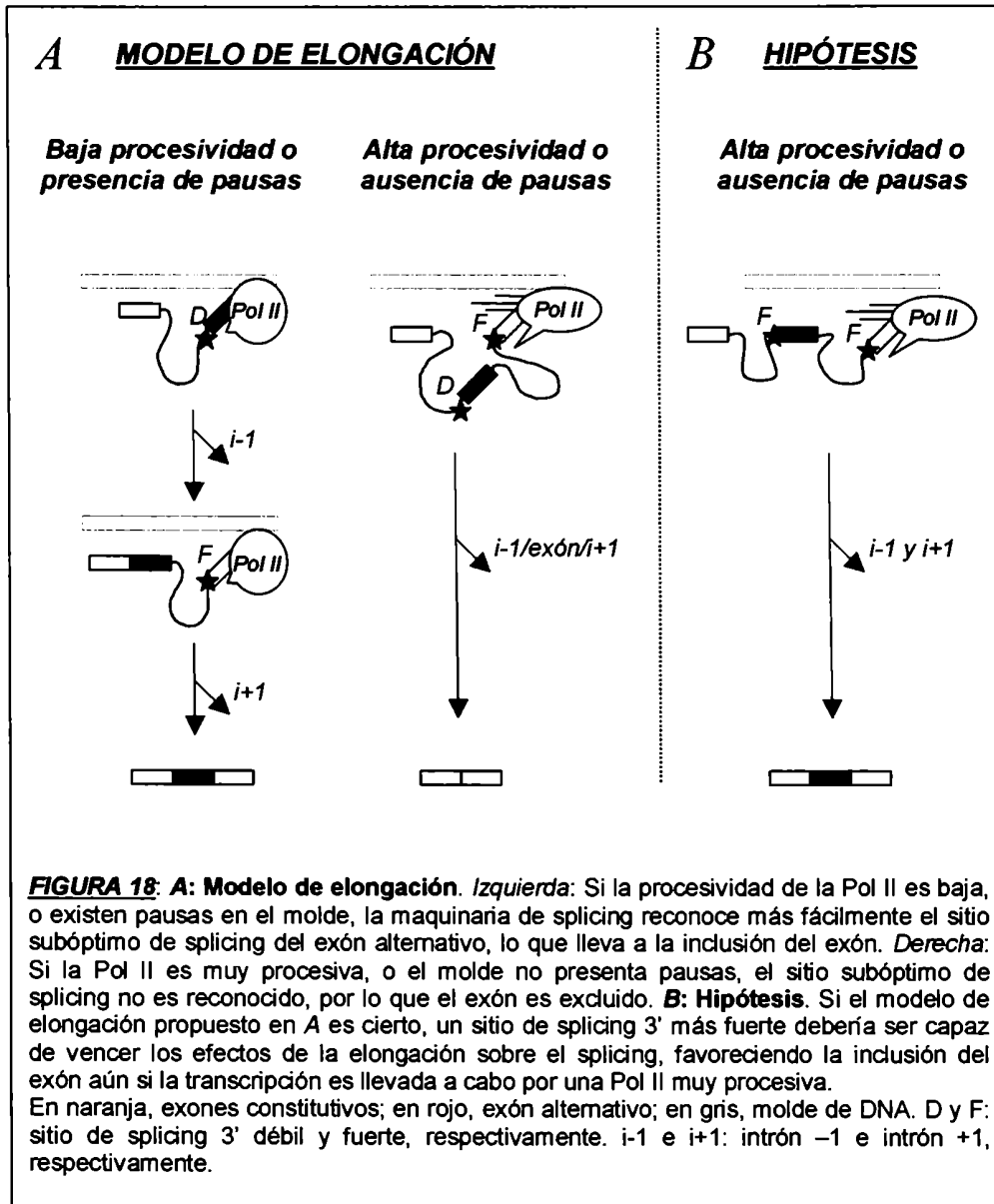
El modelo de elongación que proponemos (Figura 1, pág. 22) asume que la exclusión de EDI ocurre porque el sitio de splicing 3' del intrón situado río arriba del exón alternativo (3'ss de EDI) es subóptimo comparado con el del intrón río abajo. Una Pol II altamente procesiva favorece la presentación simultánea de ambos intrones y, en esta situación, los dos sitios de splicing 3' compiten entre sí. Dado que el sitio río abajo es más fuerte, la maquinaria de splicing lo elige preferencialmente, lo que lleva a la exclusión del exón alternativo.

En este tercer y último Capítulo, nos planteamos entonces la siguiente hipótesis. A nivel de la secuencia primaria del pre-mRNA, el modelo anterior se basa casi exclusivamente en la debilidad del 3'ss de EDI. Por lo tanto, este modelo puede ser puesto a prueba modificando la fuerza de este sitio de splicing. Si fortalecemos el 3'ss de EDI podríamos afectar la competencia entre ambos sitios, lo que debería causar una mayor inclusión del exón y, predecimos, una menor sensibilidad a cambios en la elongación.

Para modificar la fuerza de este sitio, utilizamos tres estrategias experimentales distintas. En primer lugar, sobreexpresamos proteínas SR (SF2/ASF y 9G8) que sabemos son capaces de unirse al enhancer de splicing exónico (ESE) de EDI y causan una mayor inclusión del exón al acercar la maquinaria de splicing al sitio subóptimo de splicing, lo que favorece el reconocimiento. En segundo lugar, utilizamos minigenes que llevan mutaciones en la secuencia de este sitio de splicing que lo transforman en un sitio más similar al consenso descrito. Estas dos estrategias fortalecen el 3'ss de EDI. Para debilitar este sitio, utilizamos como tercer estrategia un RNAi diseñado contra el RNA de SF2/ASF, gracias al cual podemos disminuir los niveles endógenos de la proteína SF2/ASF.

Nuestro modelo y la hipótesis que queremos estudiar están esquematizados en la Figura 18. El modelo de elongación en la Figura 18A es esencialmente el mismo que en la Figura 1, pero aquí ponemos énfasis en la fuerza de los sitios de splicing 3'

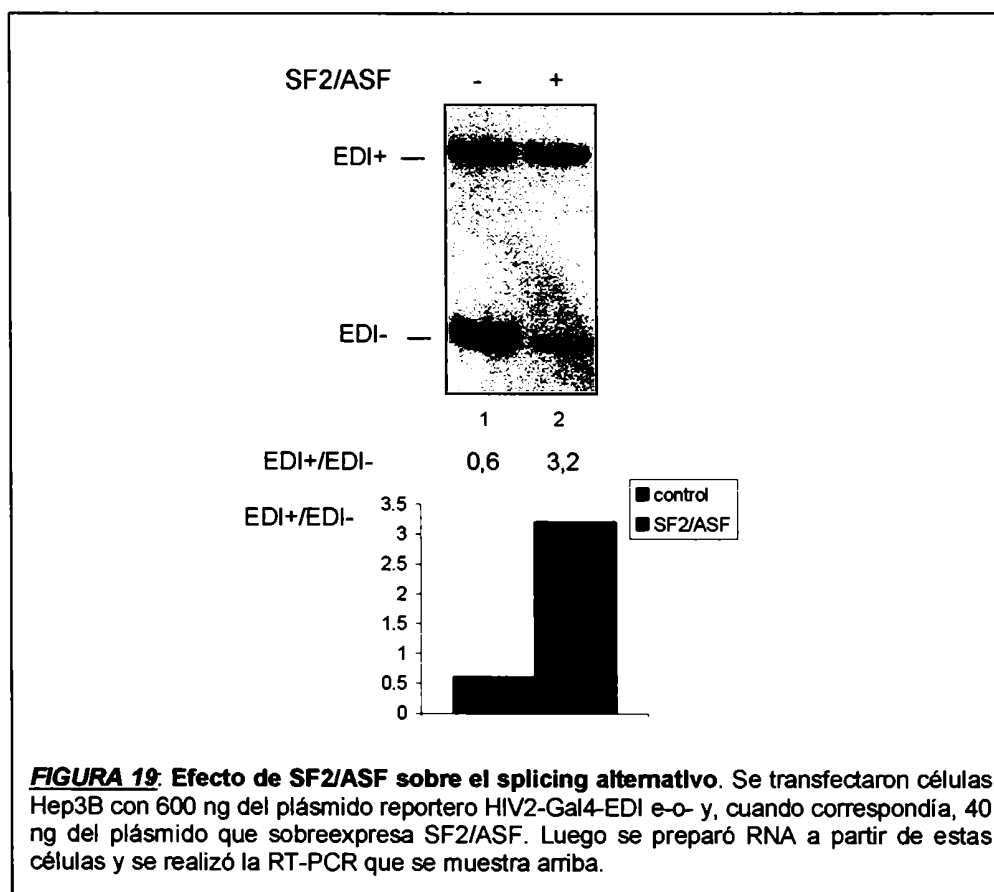
(3'ss), que están señalados como débiles (D) o fuertes (F), según el caso. En la Figura 18B mostramos nuestra hipótesis, según la cual en una situación en la que el primer 3'ss es más fuerte, incluso una Pol II muy procesiva no logrará provocar la exclusión del exón.



13. Efecto de la proteína SR SF2/ASF sobre el splicing alternativo

Como dijimos antes, para fortalecer el sitio de splicing 3' del intrón situado río arriba (intrón -1) de EDI, que de ahora en adelante será llamado 3'ss de EDI, podemos modificar los niveles de proteínas SR que, se sabe, se unen al enhancer exónico de splicing (ESE) del exón EDI y facilitan así el reconocimiento del sitio débil por parte de la maquinaria de splicing. SF2/ASF es una proteína SR que se une al ESE de EDI y provoca un aumento en la inclusión (Caputi et al., 1994; Cramer et al., 1999; Lavigne et al., 1993; Tacke y Manley, 1995).

La Figura 19 muestra un experimento en el cual se sobreexpresó SF2/ASF en células Hep3B y se evaluó su efecto sobre el splicing alternativo.



Podemos ver que SF2/ASF provoca un aumento de 5,3 veces en la inclusión del exón, cuando el transcripto es generado a partir de un minigén que se encuentra bajo el control del promotor HIV2-Gal4.

14. Efecto de VP16 en presencia de SF2/ASF

Una vez demostrado el efecto de SF2/ASF sobre el splicing en células Hep3B, nos preguntamos qué sucedería si VP16 también estuviera presente. Vimos que VP16 provoca una disminución en la inclusión, debido a que aumenta la elongación. Por otra parte, SF2/ASF mejora el reconocimiento del 3'ss de EDI por parte de la maquinaria de splicing, lo que favorece la inclusión del exón. Nuestra intención era ver si un mecanismo era capaz de interferir al otro.

Para ello transfectamos células Hep3B con pequeñas cantidades del plásmido que expresa VP16, tanto en ausencia como en presencia del plásmido que expresa SF2/ASF. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 20. De las calles 1 a la 4 se ve el efecto que tiene sobre el splicing una curva creciente de cantidad del plásmido VP16. Podemos ver que incluso a cantidades muy pequeñas del plásmido de expresión, VP16 provoca un fuerte aumento en la exclusión del exón. Las calles 5 a 8 son iguales a las 1 a 4, pero con la diferencia de que se cotransfectó además el plásmido de expresión de SF2/ASF. Comparando las calles 1 y 5, se ve que la sobreexpresión de SF2/ASF en ausencia de VP16 provoca un aumento de la inclusión de 5,3 veces aproximadamente, como se veía en la Figura 19. Sin embargo, algo muy interesante sucede cuando agregamos VP16 en presencia del plásmido SF2/ASF. Esperábamos ver que, a partir de este basal más alto, VP16 continuara teniendo el mismo efecto de aumentar la exclusión. Sin embargo, vemos que en la calle 6 tiene el efecto contrario. En la calle 6, la adición de pequeñas cantidades del plásmido que expresa VP16, en una situación donde existe sobreexpresión de SF2/ASF, aumenta la inclusión de EDI aún más que en ausencia de VP16 (calle 5). Sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de VP16 (calles 7 y 8), el efecto

elongador de VP16 vuelve a predominar, provocando un descenso en la inclusión del exón.

Esta fue la primera evidencia indirecta que tuvimos de que un fortalecimiento del 3'ss de EDI, que aquí es logrado por la sobreexpresión de SF2/ASF, provoca una menor sensibilidad del splicing alternativo a cambios en la elongación.

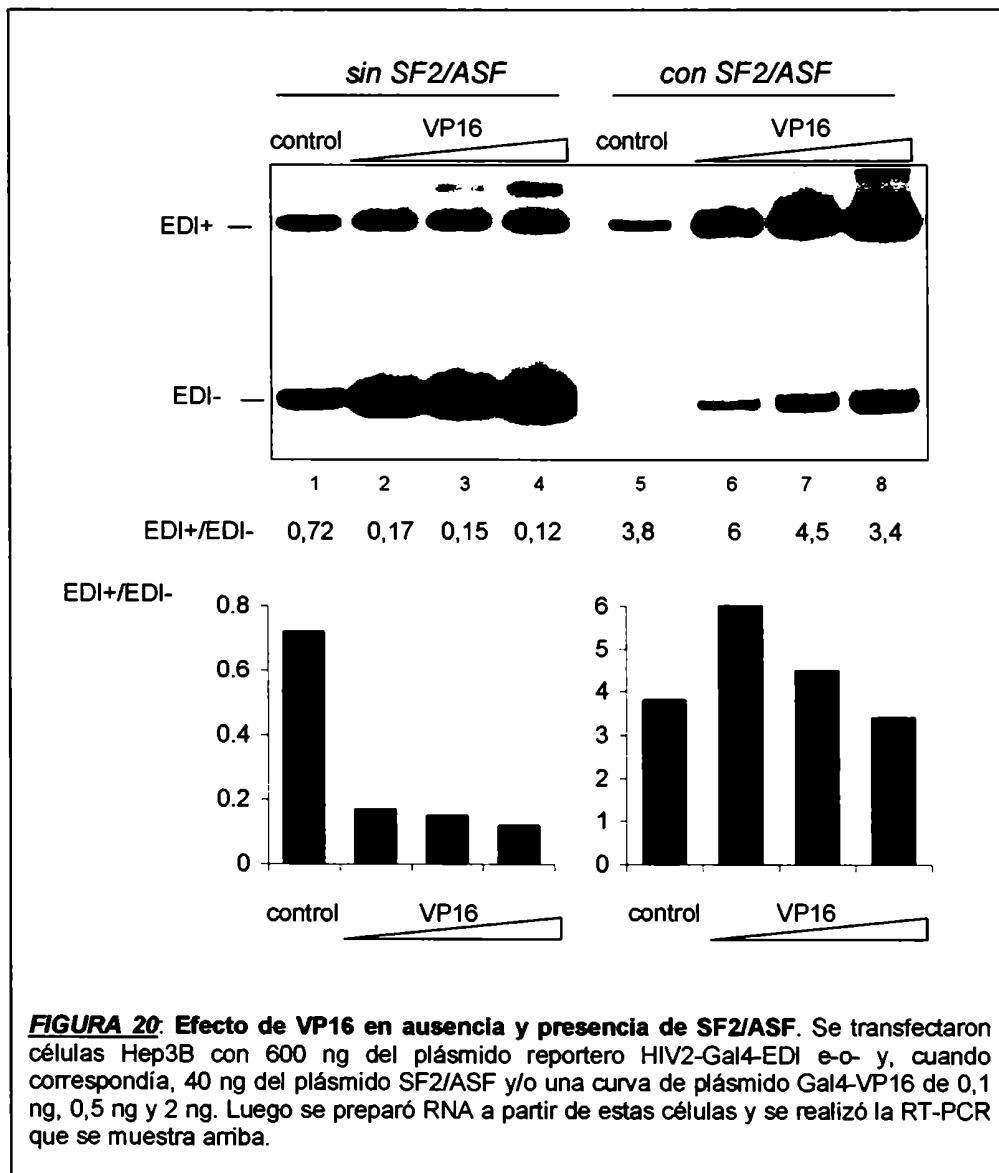


FIGURA 20: Efecto de VP16 en ausencia y presencia de SF2/ASF. Se transfectaron células Hep3B con 600 ng del plásmido reportero HIV2-Gal4-EDI e-o- y, cuando correspondía, 40 ng del plásmido SF2/ASF y/o una curva de plásmido Gal4-VP16 de 0,1 ng, 0,5 ng y 2 ng. Luego se preparó RNA a partir de estas células y se realizó la RT-PCR que se muestra arriba.

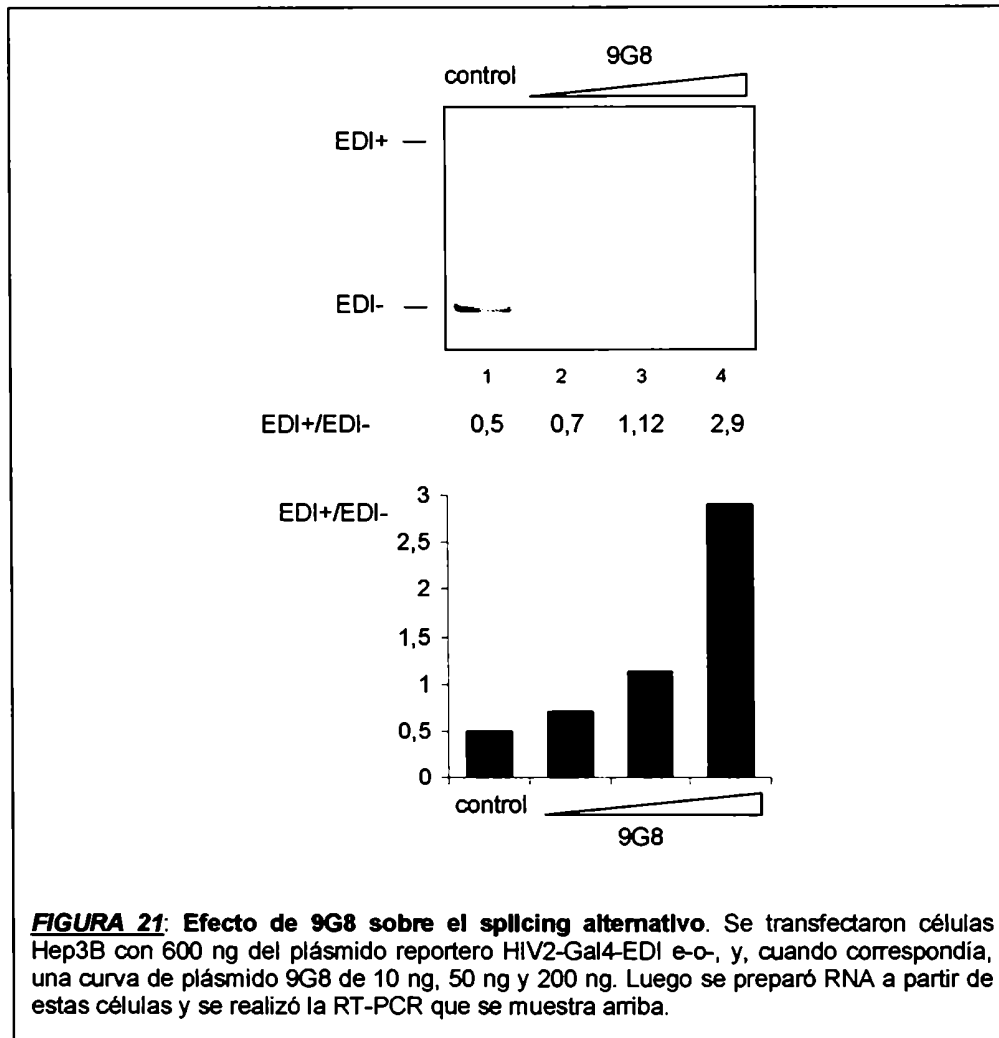
15. Efecto de 9G8, otra proteína SR, sobre el splicing alternativo

Habiendo demostrado en células Hep3B el efecto de SF2/ASF sobre el splicing alternativo (Figura 19), y el efecto que tiene en combinación con pequeñas cantidades de VP16 (Figura 20), nos preguntamos si esto era un fenómeno particular de SF2/ASF, o si era algo más general que abarca otras proteínas SR que son capaces de unirse al ESE de EDI, como por ejemplo la proteína 9G8 (Cramer et al., 1999).

Para ello, evaluamos en primera instancia si la sobreexpresión de 9G8 es capaz de modificar el splicing cuando la transcripción del minigén es dirigida por el promotor HIV2-Gal4. En la Figura 21, vemos que sucede algo similar a lo que sucede con SF2/ASF en la Figura 19. La calle 1 muestra la situación basal, y las calles 2 a 4 muestran el efecto de una curva creciente de cantidad del plásmido que expresa 9G8. Podemos ver que existe un efecto dependiente de la dosis, ya que a medida que aumenta la cantidad del plásmido 9G8, aumenta la inclusión de EDI. Esto demuestra que el splicing de un transcripto generado a partir de un minigén bajo el control del promotor HIV2-Gal4 responde a proteínas SR que se sabe interaccionan con el ESE presente en el exón EDI.

16. Efecto de VP16 en presencia de 9G8

Lo siguiente que quisimos estudiar fue si el efecto de VP16 que se observa en presencia de SF2/ASF, donde pequeñas cantidades del plásmido que expresa VP16 provocan un aumento en vez de un descenso en la inclusión de EDI, también ocurría con 9G8. Esto nos iba a permitir saber si estábamos ante un fenómeno particular de SF2/ASF, o si era algo más general que involucraba a ambas proteínas SR.



La Figura 22 muestra un experimento representativo similar al de la Figura 20, pero con 9G8 en vez de con SF2/ASF. Aquí vemos, en las calles 1 a 5, que una curva creciente de cantidad de plásmido de expresión de VP16 provoca una progresiva disminución en la inclusión del exón, como ya habíamos observado en la Figura 20. Cuando analizamos las calles 6 a 10, donde vemos el efecto de la cotransfección de una cantidad fija de 9G8 y la misma curva creciente de VP16 que en las calles 1 a 5, vemos que, de manera similar a lo que sucedía con SF2/ASF, a pequeñas cantidades del plásmido VP16 (calles 7 y 8) se produce un aumento de la inclusión de EDI en

vez de un desdenso. A cantidades mayores de VP16 (calles 9 y 10), parece volver a predominar el efecto elongador de VP16, ya que la inclusión del exón baja.

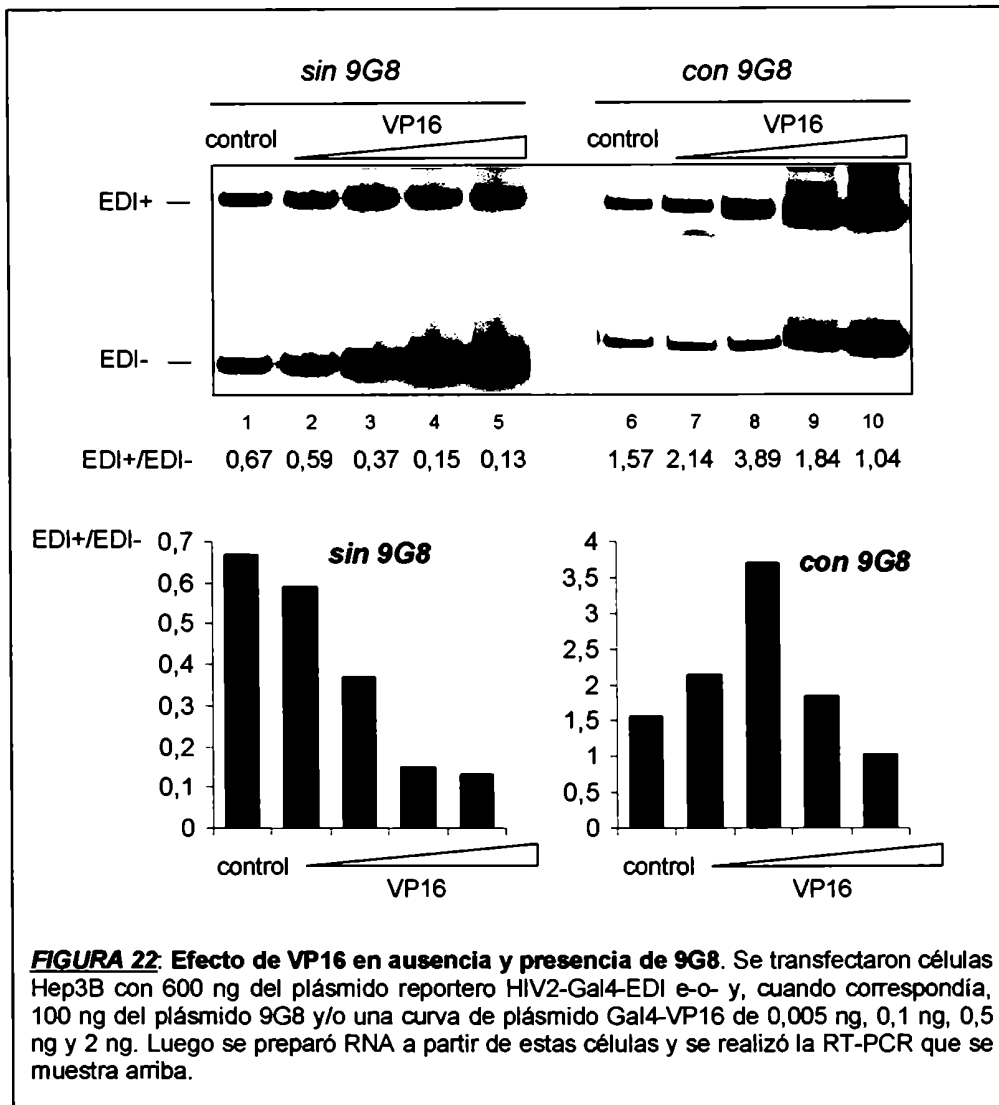


FIGURA 22: Efecto de VP16 en ausencia y presencia de 9G8. Se transfectoron células Hep3B con 600 ng del plásmido reportero HIV2-Gal4-EDI e-o- y, cuando correspondía, 100 ng del plásmido 9G8 y/o una curva de plásmido Gal4-VP16 de 0,005 ng, 0,1 ng, 0,5 ng y 2 ng. Luego se preparó RNA a partir de estas células y se realizó la RT-PCR que se muestra arriba.

Nos preguntamos entonces a qué podía deberse esto. Las proteínas SR, como SF2/ASF o 9G8, provocan una mayor inclusión de EDI ya que, al unirse al ESE del exón, son capaces de reclutar a la maquinaria de splicing que, de ese modo, se sitúa

más cerca del 3'ss de EDI, lo que favorece el reconocimiento del dicho sitio (Cramer et al., 1999). Por lo tanto, la presencia de estas proteínas sobre el ESE del RNA naciente parece estar simulando una situación en la cual el sitio 3'ss de EDI es más fuerte y es capaz de reclutar a la maquinaria de splicing por sí mismo. Podríamos entonces considerar que esto una forma de aumentar la fuerza del sitio de splicing 3'ss de EDI en *trans*, ya que no es una fuerza derivada de una secuencia del sitio de splicing más similar a la secuencia consenso, sino que es debida a la unión de una proteína río abajo del mismo.

Si realmente estas dos situaciones, sobreexpresar una proteína SR (en *trans*) o poseer una secuencia del 3'ss más similar a la secuencia consenso (en *cis*), son similares, quizás lo que ocurre con VP16 también ocurriría sobre un mutante que posea un sitio de splicing más fuerte. Si esto fuera así, la ausencia del efecto de VP16 de aumentar la exclusión, trascendería el hecho de que sucede exclusivamente en presencia de la sobreexpresión de proteínas SR, y pasaría a ser un fenómeno dependiente de fortalecer el sitio de splicing, ya sea en *trans* o en *cis*.

Por lo tanto, nos preguntamos si mutantes del sitio de splicing 3' de EDI, además de incluir más el exón alternativo, son menos sensibles a cambios en la elongación.

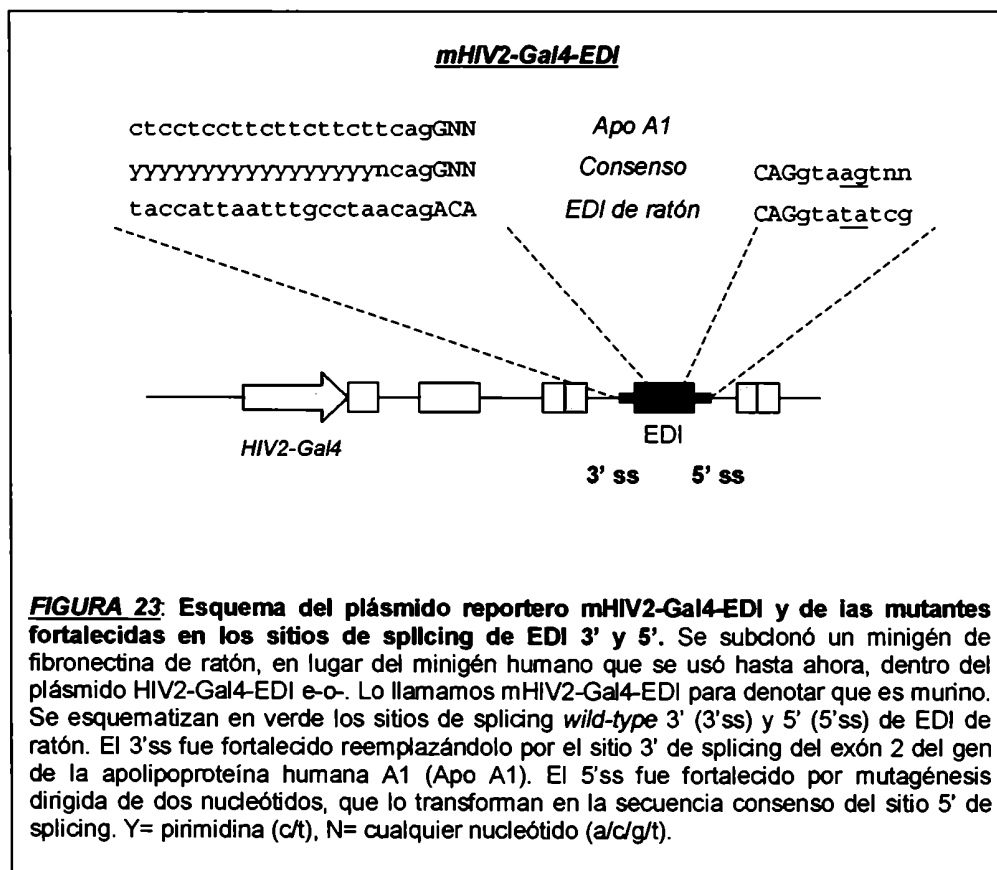
17. Mutantes de sitios de splicing en minigén de ratón

Quisimos estudiar entonces qué sucedía con respecto a la sensibilidad a VP16 en una situación en la cual los sitios de splicing de EDI son sitios consenso. Para ello, utilizamos plásmidos que ya contenían mutaciones en los sitios de splicing de EDI, generadas en un minigén similar al que utilizamos hasta ahora, pero de fibronectina de ratón.

La Figura 23 esquematiza las mutantes de minigén de ratón con los sitios de splicing fortalecidos. El mutante de splicing 5' fue creado convirtiendo la secuencia *wild-type* CAG/gtatat en la secuencia consenso CAG/gtaagt por mutagénesis dirigida por PCR. Con respecto al sitio de splicing 3' *wild-type*, parece ser subóptimo por la presencia de varias purinas que interrumpen el tracto de polipirimidinas. Esto se puede ver

comparándola con la secuencia consenso que se muestra en la Figura 23. Para generar el mutante de splicing 3', el sitio *wild-type* de EDI fue reemplazado completamente por el sitio de splicing 3' del segundo exón del gen de la apolipoproteína humana A1 (Apo A1). Estas dos mutantes ya habían demostrado provocar inclusión total del exón EDI cuando fueron transfectadas en células NIH3T3, cuando la transcripción era dirigida por el promotor de α -globina (Muro et al., 1998).

Con estos antecedentes, utilizamos esas mismas mutantes en nuestro sistema, sabiendo ya que fortalecen los sitios de splicing de EDI. Subclonamos el minigén de ratón *wild-type* y sus dos mutantes río abajo del promotor HIV2-Gal4, y llamamos a estos plásmidos mHIV2-Gal4-EDI, donde la "m" denota que el minigén es murino. La variante *wild-type* es mHIV2-Gal4-EDI, la mutante del sitio de splicing 3' fue denominada mHIV2-Gal4-EDI 3'ss, y la del sitio 5' mHIV2-Gal4-EDI 5'ss.



18. Efecto de VP16 sobre mutantes de sitios de splicing

Teniendo entonces estas 3 construcciones, mHIV2-Gal4-EDI, mHIV2-Gal4-EDI 3'ss y mHIV2-Gal4-EDI 5'ss, procedimos a transfectarlas en presencia o ausencia del plásmido que expresa VP16.

Como primera aproximación, transfectamos células Cos-1 con estos plásmidos. En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos. Podemos ver que VP16 modifica el splicing del pre-mRNA transcrito a partir de la versión *wild-type* del minigén murino, aumentando la exclusión del exón EDI (calles 1 y 2). En este caso, el efecto de VP16 es de unas 6 veces y es similar, aunque menor, al observado con el minigén humano. Cuando el sitio de splicing 3' (3'ss) está fortalecido (calles 3 y 4) se ve que, como esperábamos, la inclusión basal es mayor (comparar calles 1 y 3) y vemos además que el efecto de VP16 se ha reducido a la mitad, ya que en este caso provoca un aumento de la exclusión de sólo 2,8 veces. Por lo tanto, se está comprobando nuestra hipótesis de que cuanto más fuerte es el sitio de splicing del exón alternativo, menos sensible es el splicing a cambios en la elongación. El fortalecimiento del sitio de splicing 5' (5'ss) causa un gran aumento en la inclusión del exón (comparar calles 1 y 5) y, curiosamente, la adición de VP16 al sistema aumenta la inclusión en vez de disminuirla.

En base a estos resultados, hipotetizamos que, a una determinada “fuerza” del sitio de splicing, el efecto de VP16 se revierte. Probablemente, si el exón es reconocido suficientemente bien por la maquinaria de splicing, la elongación ya no es importante para modular el splicing alternativo. Nos sorprendió también ver cuán distintas eran las consecuencias de fortalecer el sitio 3' o el 5'. Creemos que fortalecer el sitio 5' es más efectivo a la hora de favorecer el reconocimiento del exón alternativo debido a la “*exon definition*” (ver Introducción, pág. 9), es decir a la cualidad de aumentar la definición del exón. Esto significa que fortalecer el sitio 5' provocaría también de algún modo un fortalecimiento del sitio 3'.

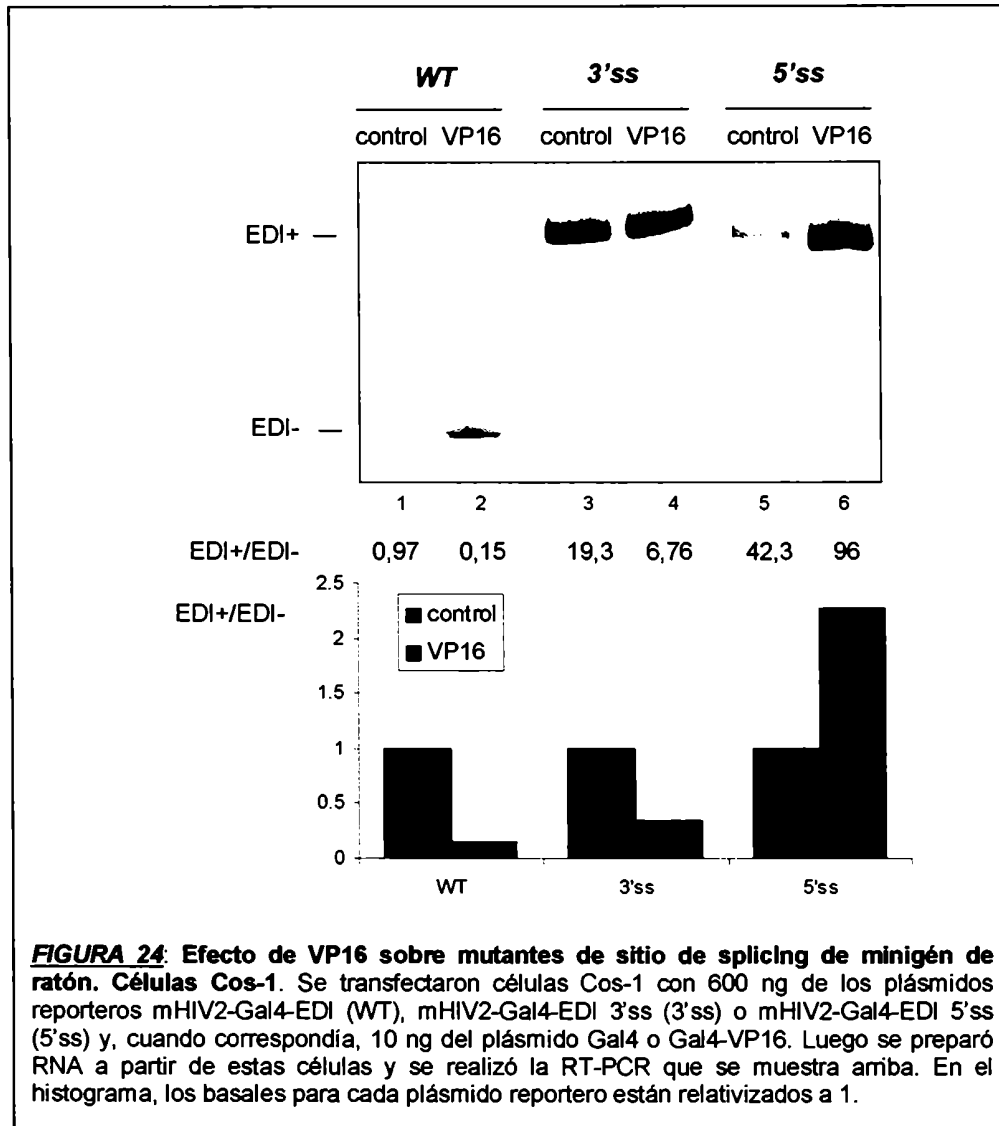


FIGURA 24. Efecto de VP16 sobre mutantes de sitio de splicing de minigén de ratón. Células Cos-1. Se transfectoron células Cos-1 con 600 ng de los plásmidos reporteros mHIV2-Gal4-EDI (WT), mHIV2-Gal4-EDI 3'ss (3'ss) o mHIV2-Gal4-EDI 5'ss (5'ss) y, cuando correspondía, 10 ng del plásmido Gal4 o Gal4-VP16. Luego se preparó RNA a partir de estas células y se realizó la RT-PCR que se muestra arriba. En el histograma, los basales para cada plásmido reportero están relativizados a 1.

Habiendo observado en células Cos-1 que aparentemente existe una disminución en la sensibilidad a VP16 cuando el reconocimiento del exón está aumentado, nos preguntamos si lo mismo sucedía en células Hep3B. Además, como habíamos visto que el exón ya es muy fuerte, prácticamente constitutivo, en la mutante con el 5'ss fortalecido, y el efecto de VP16 incluso se revierte, decidimos enfocarnos en el comportamiento de la mutante con el 3'ss fortalecido.

La Figura 25 muestra la respuesta del splicing alternativo a VP16 para el caso de las construcciones que llevan el minigén murino en su versión *wild-type* (mHIV2-Gal4-EDI) o fortalecida en el 3'ss (mHIV2-Gal4-EDI 3'ss), en transfecciones de células Hep3B. Podemos ver que el splicing del pre-mRNA del minigén murino también responde a VP16 en estas células, con un efecto de unas 4 veces aproximadamente (calles 1 y 2). Como se había observado en las células Cos-1, aquí también la construcción con el 3'ss fortalecido incluye más el exón que su correspondiente versión *wild-type* (comparar calles 1 y 3), y es menos sensible a VP16 (calles 3 y 4).

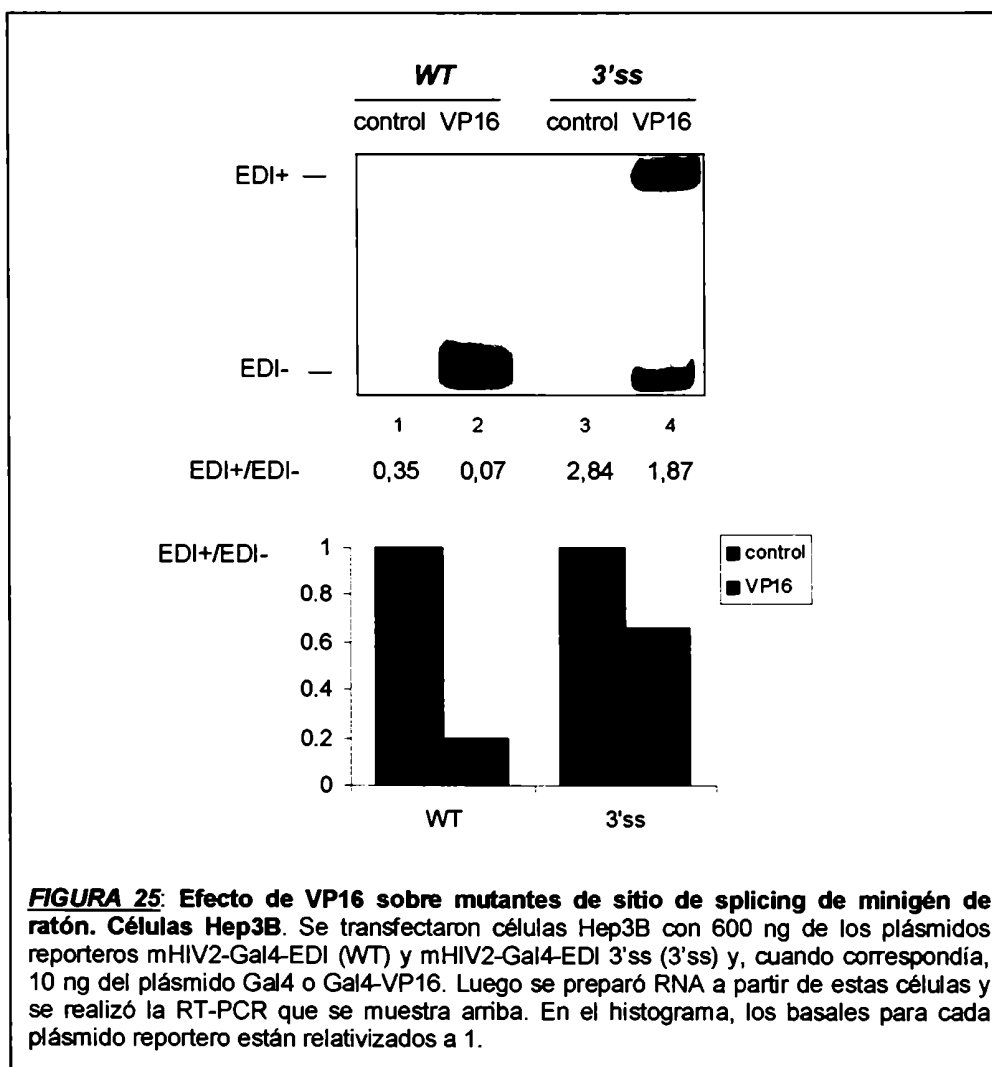


FIGURA 25. Efecto de VP16 sobre mutantes de sitio de splicing de minigén de ratón. Células Hep3B. Se transfectaron células Hep3B con 600 ng de los plásmidos reporteros mHIV2-Gal4-EDI (WT) y mHIV2-Gal4-EDI 3'ss (3'ss) y, cuando correspondía, 10 ng del plásmido Gal4 o Gal4-VP16. Luego se preparó RNA a partir de estas células y se realizó la RT-PCR que se muestra arriba. En el histograma, los basales para cada plásmido reportero están relativizados a 1.

Por lo tanto, demostramos que cuando el sitio subóptimo de splicing 3' de EDI está fortalecido, no sólo aumenta la inclusión, lo cual era de esperarse, sino que también disminuye fuertemente la sensibilidad a VP16, lo cual comprueba en principio la hipótesis que nos habíamos planteado para este Capítulo de la tesis (Figura 18, pág. 85).

Sin embargo, nos preguntamos cuán válidos eran estos resultados, debido al hecho de que el sitio de splicing 3' natural de EDI fue reemplazado en su totalidad por otro sitio de splicing exógeno, lo cual puede ser una situación altamente disruptiva. Nos propusimos entonces realizar mutaciones puntuales en el sitio de splicing 3' de EDI en el minigén humano, de manera de afectar exclusivamente y con pequeños cambios, el sitio de splicing. Esto nos permitiría controlar mejor la situación y tener varias construcciones con distintos grados de inclusión, es decir de fuerza del sitio, que nos podrían confirmar si realmente existía una correlación inversa entre la fortaleza del sitio y la sensibilidad a cambios en la elongación.

19. Mutaciones puntuales en el sitio de splicing 3' de EDI humano

Nuestro objetivo era entonces realizar mutaciones puntuales en el sitio de splicing 3' de EDI (3'ss de EDI) en el minigén humano. Una de las ventajas de una mutación puntual frente al reemplazo total del sitio de splicing que habíamos utilizado en los experimentos anteriores reside en que, por ejemplo, las distancias entre las secuencias importantes para el reconocimiento del sitio por parte de la maquinaria de splicing, como el sitio de ramificación o *branch point*, la zona rica en pirimidinas, o el dinucleótido conservado del sitio 3', no se ven afectados.

Al analizar la secuencia, el 3'ss de EDI de fibronectina humana parecía subóptimo debido a la presencia de varias purinas en el tracto de polipirimidinas (PPT). Basándonos en la utilización preferencial de cada nucleótido según la posición que ocupa dentro del sitio de splicing, nos propusimos mutar a T dos purinas presentes en esta región: la G situada en la posición -9 y la A de la posición -5.

Aquí abajo se muestran los consensos para el sitio de splicing 3' de genes humanos, con los porcentajes de utilización de cada nucleótido según su posición (Zhang, 1998).

Sitios de splicing 3'. Zonas de alta concentración de GC.

	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2
A	6	6	4	8	8	7	6	19	2	100	0	21	19
C	38	43	42	46	49	54	45	38	82	0	0	13	21
G	13	12	13	14	10	8	8	26	0	0	100	58	29
T	43	39	41	32	33	31	41	17	16	0	0	8	31

Sitios de splicing 3'. Zonas de baja concentración de GC.

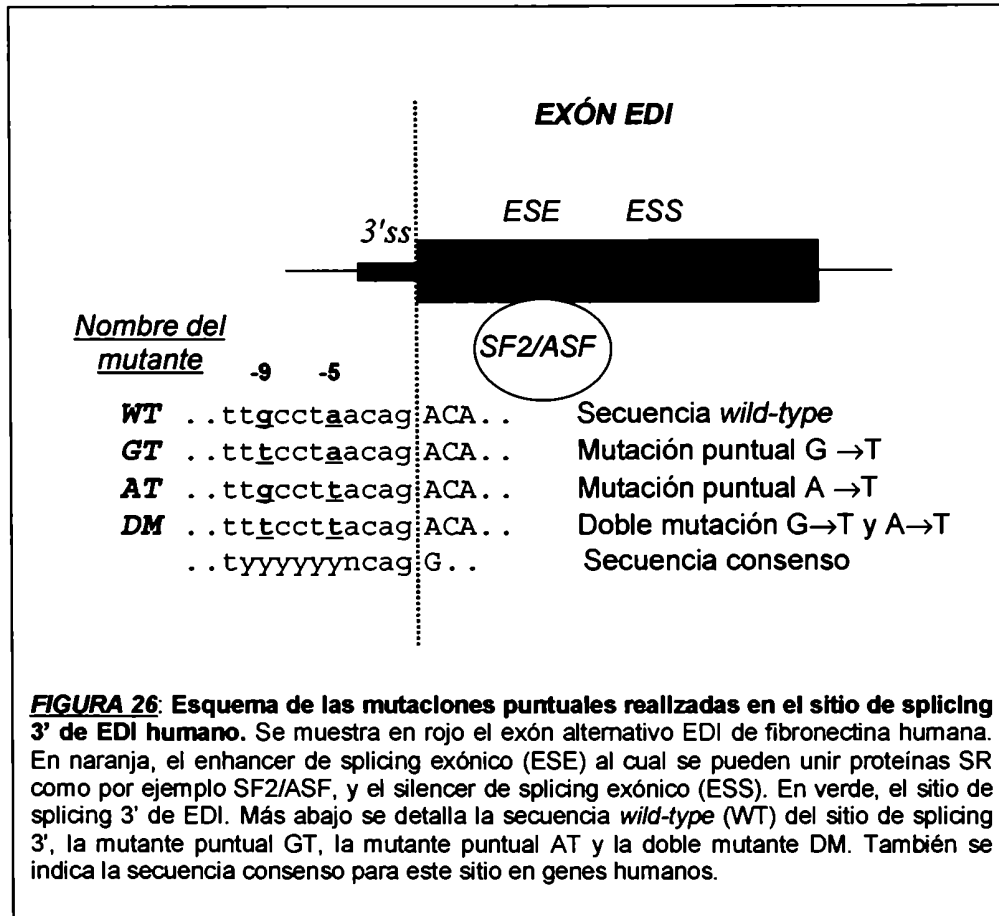
	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2
A	10		11	12	13	11	10	26	7	100	0	26	24
C	21	22	25	28	28	25	22	25	55	0	0	11	15
G	10	9	10	10	8	5	5	15	1	0	100	50	20
T	59	59	54	50	51	59	63	33	37	0	0	13	41

Realizamos estas mutaciones por PCR (ver Materiales y Métodos para más detalles). Cabe aclarar que todas las mutaciones fueron verificadas por secuenciación para asegurarnos de que la mutación estaba presente y de que además no se habían introducido accidentalmente mutaciones no esperadas.

La Figura 26 muestra un esquema con las mutaciones y los nombres que recibieron. A la mutación puntual en la posición -9 la llamamos GT, porque mutamos una G por una T. De la misma manera, la mutación en -5 fue denominada AT. Luego, realizamos la doble mutación en -9 y -5, por lo que fue llamada DM, por doble mutante. Estos minigenes mutantes fueron luego colocados bajo el control del promotor mínimo HIV2-Gal4, del promotor de fibronectina mutante (mFN), o del promotor de α -globina (α -gb).

Con estas nuevas herramientas, procedimos a evaluar su comportamiento en cuanto a inclusión basal del exón, lo que nos daría una idea de la fuerza de la mutación,

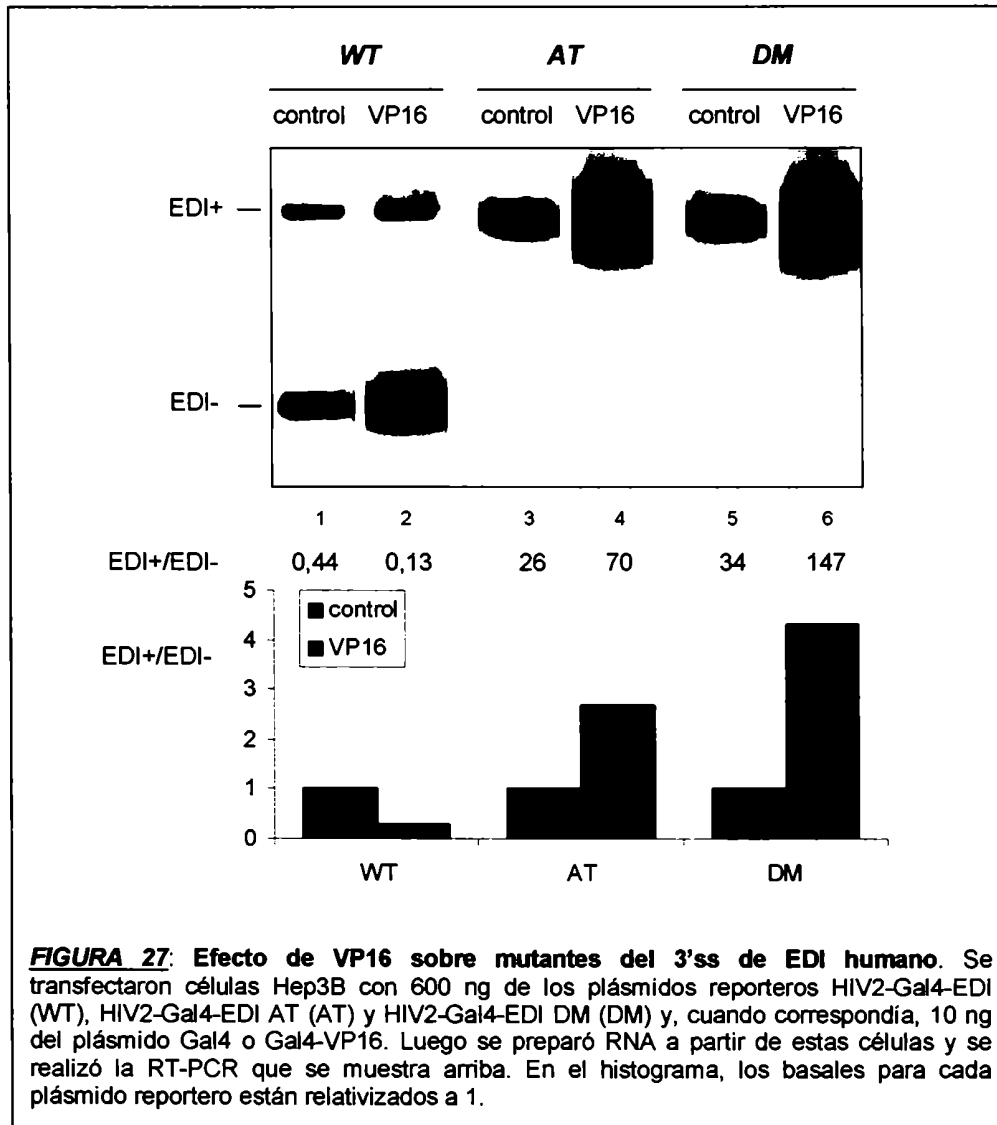
sensibilidad a VP16 como manera de aumentar la elongación, y sensibilidad a DRB, como manera de disminuirla.



20. Efecto de VP16 sobre mutantes del tracto de polipirimidinas

Nuestro modelo predice que si el 3'ss de EDI es fortalecido, tratamientos que aumenten la tasa de elongación de Pol II deberían tener poco o ningún efecto en promover la exclusión del exón alternativo. Los resultados obtenidos con los minigenes mutantes de ratón apoyan esta hipótesis.

Quisimos entonces evaluar en primer lugar el efecto de la proteína activadora de la elongación VP16 sobre estas construcciones con mutaciones puntuales en el tracto de polipirimidinas (PPT) del 3' ss de EDI humano. La Figura 27 muestra los resultados obtenidos.



Como veíamos antes, VP16 provoca una mayor exclusión del exón alternativo en pre-mRNAs transcritos a partir de una construcción WT bajo el control del promotor

HIV2-Gal4 (calles 1 y 2). Como esperábamos, las construcciones AT y DM que llevan las mutaciones en el PPT tienen una gran inclusión basal del exón alternativo, de 59 y 77 veces respectivamente (calles 3 y 5, comparadas con la calle 1). Esto refleja un mejor reconocimiento del exón EDI por parte de la maquinaria de splicing. Sorprendentemente, al igual que ocurría con la construcción murina mHIV2-Gal4-EDI 5'ss en la Figura 24, VP16 no provoca un aumento en la exclusión del exón en los transcritos mutados, sino que produce un aumento en la inclusión (calles 4 y 6). Esto parece indicar que este efecto de VP16 de aumentar, en vez de disminuir, la inclusión, cuando el 3'ss está fortalecido en *trans* por proteínas SR (Figuras 20 y 22), o en *cis* por mutaciones (Figuras 24 y 27), es totalmente reproducible, aunque por el momento no podemos explicarlo.

21. Efecto de VP16 sobre mutante del silenciador de splicing exónico

Para descartar que los resultados observados en la Figura 27 hubieran sido causados por efectos indirectos de las mutaciones y no por su efecto de mejorar el reconocimiento del exón EDI, quisimos evaluar qué sucedía en un minigén en el cual el silenciador de splicing exónico (ESS, esquematizado en la Figura 26) estuviera mutado. La idea general era ver que en ausencia de este sitio se produjera un fortalecimiento en *trans* del sitio 3'ss de EDI, de manera similar a lo que sucede al sobreexpresar SF2/ASF, y que esto nos permitiera ver la respuesta a VP16 sobre una construcción que no posee una mutación directamente sobre 3'ss de EDI.

En la Figura 28 se puede observar que la eliminación del ESS de EDI provocó una estimulación de la inclusión basal del exón de 15 veces (calles 1 y 3) como consecuencia de mejorar el reconocimiento de EDI a través de una estrategia diferente de la mutagénesis sobre el tracto de polipirimidinas. Consistentemente sin embargo con los resultados de dichas mutantes, VP16 no produjo un aumento en la exclusión del exón en el mutante ESS- (calles 3 y 4).

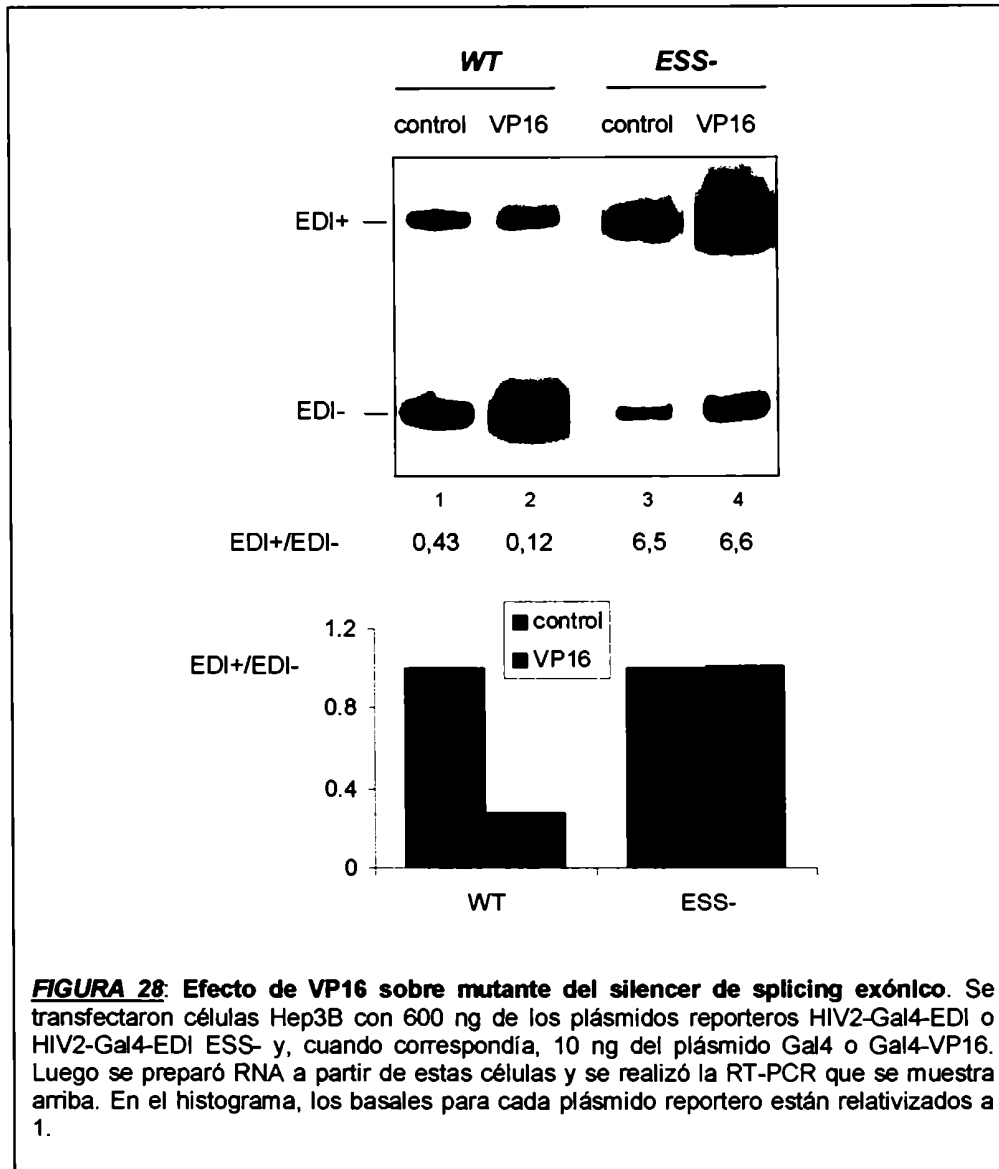


FIGURA 28: Efecto de VP16 sobre mutante del silenciador de splicing exónico. Se transfectaron células Hep3B con 600 ng de los plásmidos reporteros HIV2-Gal4-EDI o HIV2-Gal4-EDI ESS- y, cuando correspondía, 10 ng del plásmido Gal4 o Gal4-VP16. Luego se preparó RNA a partir de estas células y se realizó la RT-PCR que se muestra arriba. En el histograma, los basales para cada plásmido reportero están relativizados a 1.

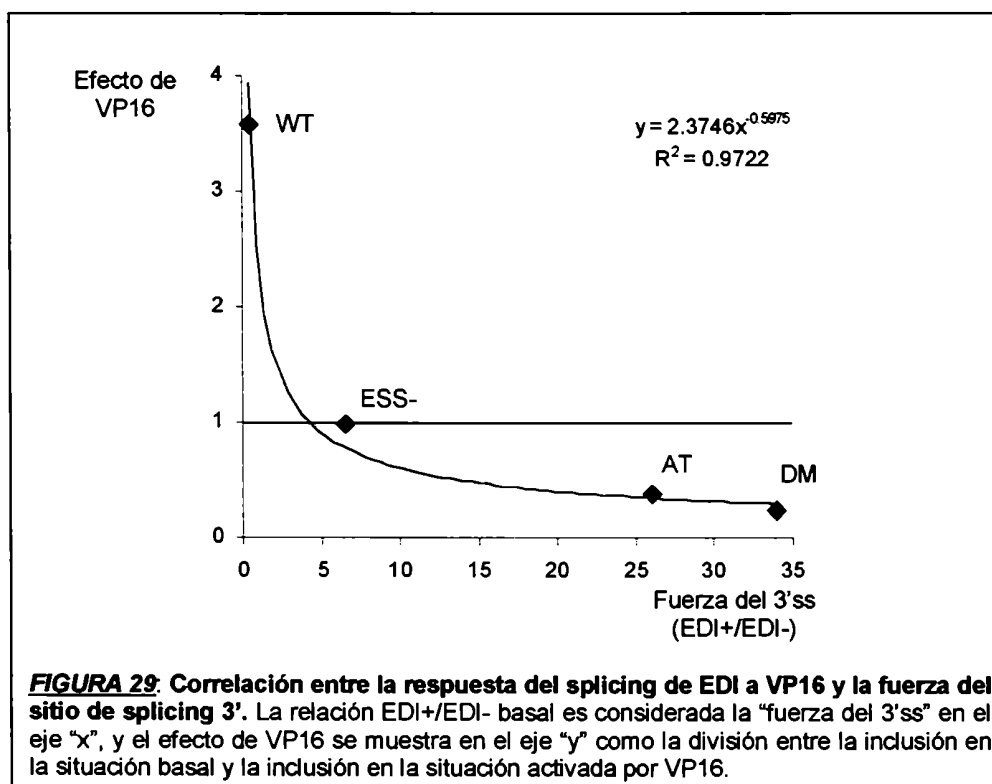
Asumimos que el nivel de inclusión basal de EDI para cada construcción refleja indirectamente la fuerza del 3'ss. Entonces, al menos en este caso, el mutante ESS- sería más fuerte que el WT pero menos que los mutantes AT o DM. Estos mutantes del PPT muestran que estas mutaciones puntuales mejoran fuertemente el reconocimiento del exón casi como si se tratara de un exón constitutivo. Por otro lado, la eliminación del sitio ESS pudo haber tenido un efecto más débil quizás

debido al hecho de que actuó indirectamente con respecto al 3'ss como un modo de fortalecer dicho sitio. Sin embargo, podemos concluir que más allá de esto, los efectos de estas dos estrategias son cualitativamente similares.

22. Correlación entre la fuerza del sitio 3'ss y el efecto de VP16

Al ver el comportamiento de las mutantes del tracto de polipirimidinas AT y DM, y de la mutante en el sitio ESS, nos preguntamos si existe una correlación cuantitativa entre la fuerza del sitio de splicing 3' y el efecto de VP16.

En la Figura 29 graficamos en el eje de las "x" la fuerza del 3'ss, evidenciada por la inclusión basal de EDI, y en el eje de las "y" el efecto de VP16 sobre la exclusión del exón. Podemos ver que efectivamente existe una correlación inversa entre ambos parámetros, con las construcciones WT, ESS-, AT y DM.

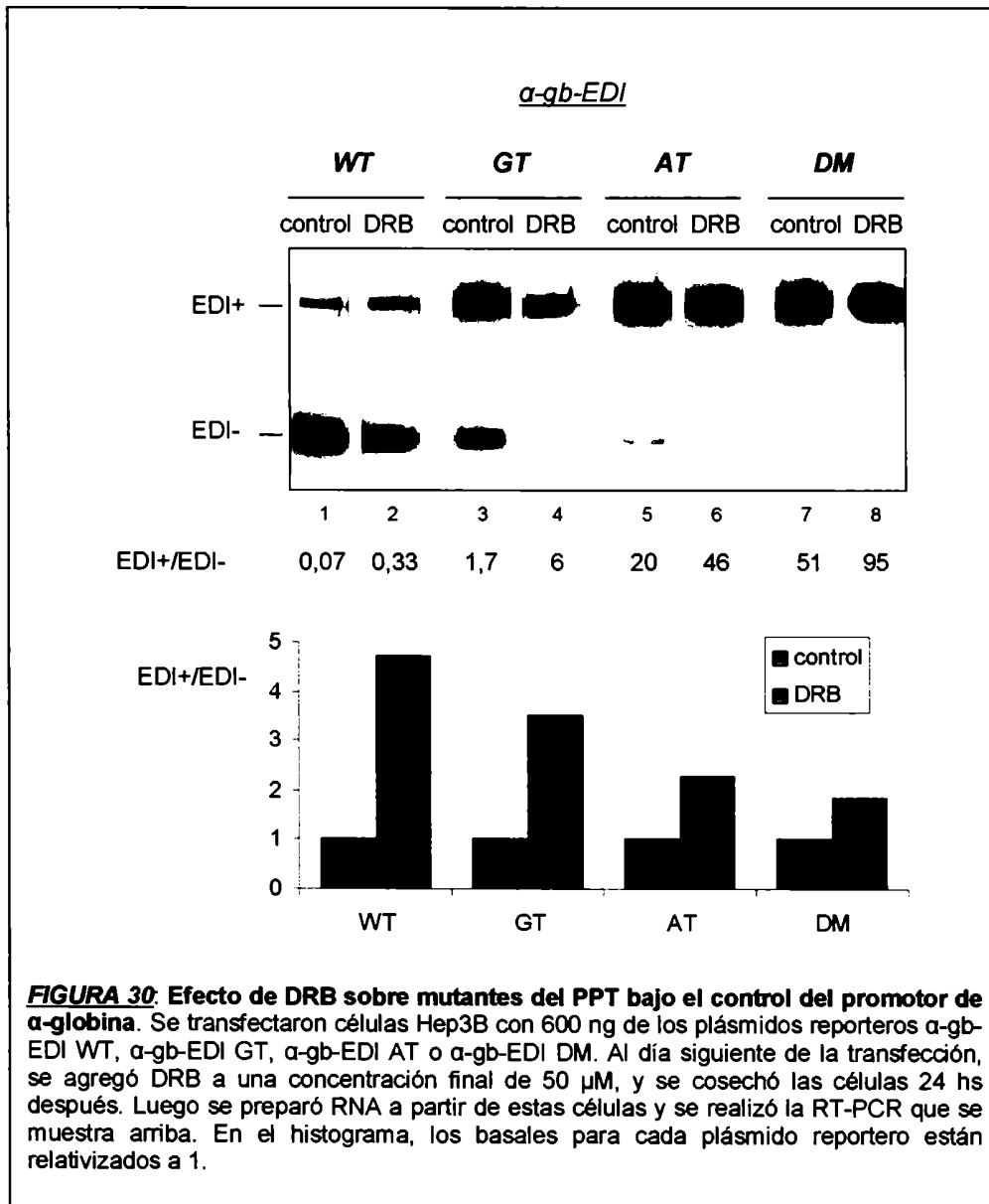


23. Efecto de DRB sobre mutantes del tracto de polipirimidinas

Habiendo comprobado con los experimentos anteriores que la fuerza del 3'ss correlaciona con una menor sensibilidad a un aumento en la elongación producido por VP16, nos preguntamos si sucede algo similar con un descenso en la tasa de elongación. Para ello, utilizamos la droga DRB que ya habíamos demostrado que es capaz de disminuir la procesividad por Pol II en nuestro sistema y de modificar el splicing alternativo.

En la Figura 14 habíamos visto que el promotor mínimo HIV2-Gal4 no responde a DRB. Sin embargo, otros promotores utilizados sí lo hacen. Por lo tanto, decidimos evaluar el efecto de DRB sobre el splicing de transcritos producidos a partir de dos promotores que se comportan de manera muy diferente. En primer lugar, utilizamos el promotor de α -globina (α -gb), que en principio determina de por sí una alta tasa de elongación, reflejado por una muy baja inclusión basal del exón. Además, utilizamos el promotor mutante de fibronectina (mFN), que ya fue muy caracterizado por experimentos en esta tesis y en otros trabajos de nuestro grupo.

Podemos ver en la Figura 30 el efecto de DRB sobre las mutantes del PPT del 3'ss de EDI, bajo el control del promotor de α -gb. En primer lugar vemos que, como esperábamos, las mutantes GT, AT y DM, provocan una mayor inclusión basal que el WT, de 24, 285 y 728 veces respectivamente (comparar calles 3, 5, y 7, con la 1). La magnitud de estos cambios es muy sorprendente, ya que el RNA transcrito a partir de este promotor en particular incluye el exón en muy poca proporción y, cuando el PPT es más parecido a la secuencia consenso, logra pasar a ser prácticamente constitutivo. Es interesante ver también que pese a que tanto la mutación GT como la AT son mutaciones puntuales, aparentemente la primera no logra transformar al sitio 3'ss en un sitio tan fuerte como lo hace la segunda.



Con respecto a la sensibilidad a DRB, vemos que la construcción WT es la más sensible, con un aumento de la inclusión de 4,7 veces (calles 1 y 2). Por otro lado, las mutantes del 3'ss de EDI responden mucho menos, y podemos ver que cuanto más fuerte es el sitio, evidenciado por la inclusión del exón en la situación basal, menor es la sensibilidad a DRB.

Como modo de asegurarnos de que los efectos observados con los mutantes del PPT bajo el control del promotor de α -gb no fueran exclusivos de dicho promotor (Figura 30), realizamos experimentos equivalentes pero con el promotor de fibronectina dirigiendo la transcripción.

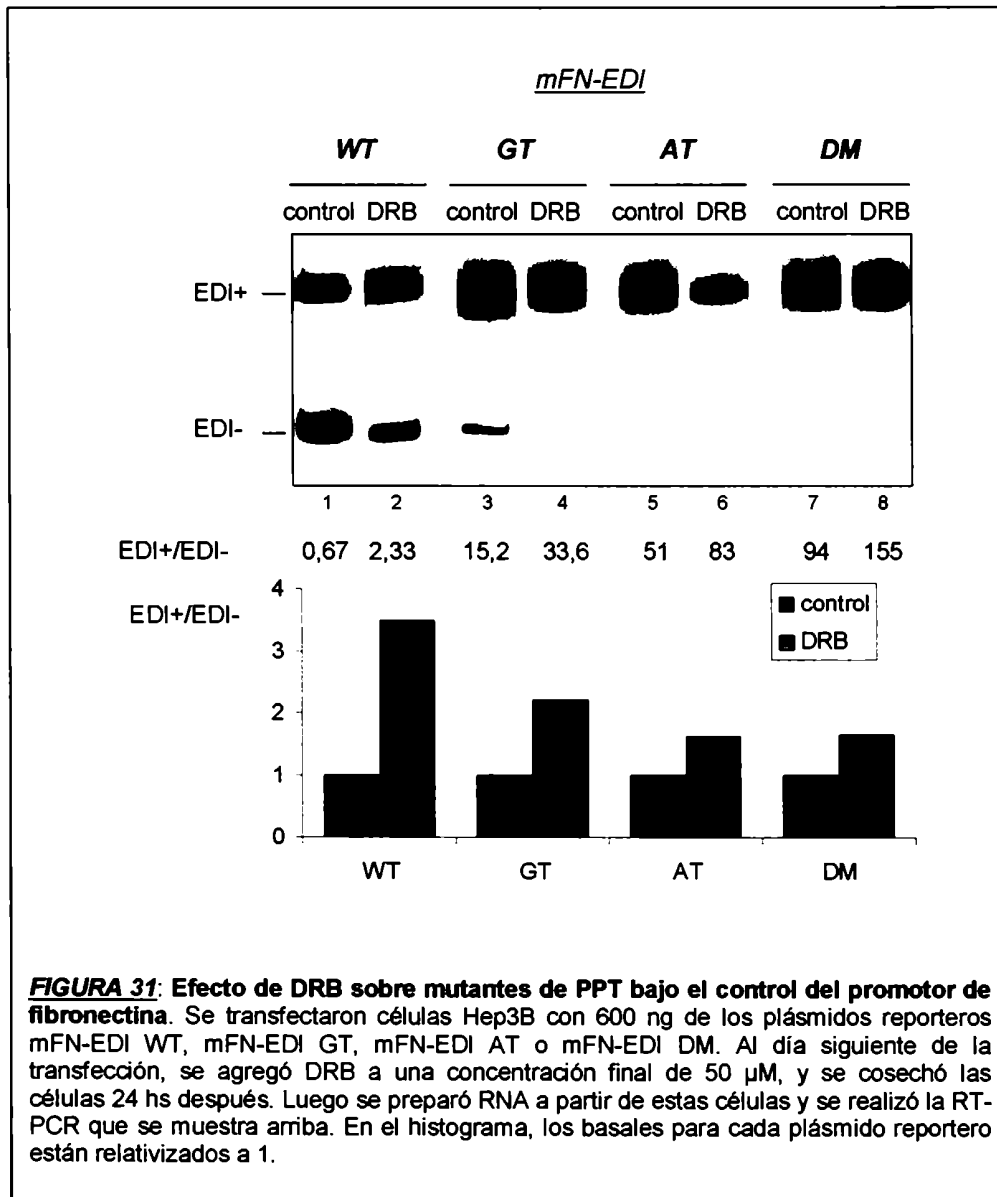
La Figura 31 muestra que se obtienen cualitativamente los mismos resultados con ambos promotores. En primer lugar, las distintas mutantes se ordenan de la misma manera en cuanto a la fuerza del sitio 3'ss, evidenciado por la inclusión basal de EDI. Con las mutantes GT, AT y DM se observa un aumento de la inclusión de 23, 76 y 140 veces respectivamente cuando el promotor que dirige la transcripción es mFN (calles 1, 3, 5 y 7). Al igual que lo que sucede cuando el promotor de α -gb dirige la transcripción, de las mutantes, la mutante puntual GT es más débil que la mutante AT, pese a que ambas son mutantes puntuales, y la doble mutante DM es más fuerte que las otras. Por lo tanto, los efectos de estas mutaciones sobre el reconocimiento del exón trascienden la identidad del promotor que dirige la transcripción.

Con respecto a DRB vemos que también con este promotor se observa una menor sensibilidad a este inhibidor de la elongación a medida que aumenta la fuerza del sitio de splicing 3' de EDI. DRB tuvo un efecto de 3,5 veces sobre la construcción WT (calles 1 y 2), pero este efecto decrece progresivamente cuando el minigén reportero lleva las mutaciones en el PPT (calles 3 a 8).

Con estos resultados, estamos en condiciones de decir que si el sitio 3'ss es más fuerte, el splicing alternativo es menos sensible a cambios en la elongación, ya sea a un aumento (VP16) como a una disminución (DRB). Además de esto, es interesante notar que lo que llamamos "efecto de promotor", es decir, cuán diferentes son las inclusiones basales de EDI cuando se transcribe a partir de, por ejemplo en este caso, α -gb o mFN, también parece ser menor a medida que aumenta la fuerza del sitio 3'ss. Así, la inclusión basal de mFN WT es 9,6 veces mayor que la de α -gb WT, pero esta relación disminuye a 8,9 veces con la mutante GT, y a tan poco como 2,5 veces con la mutante AT, o 1,8 veces con la doble mutante DM.

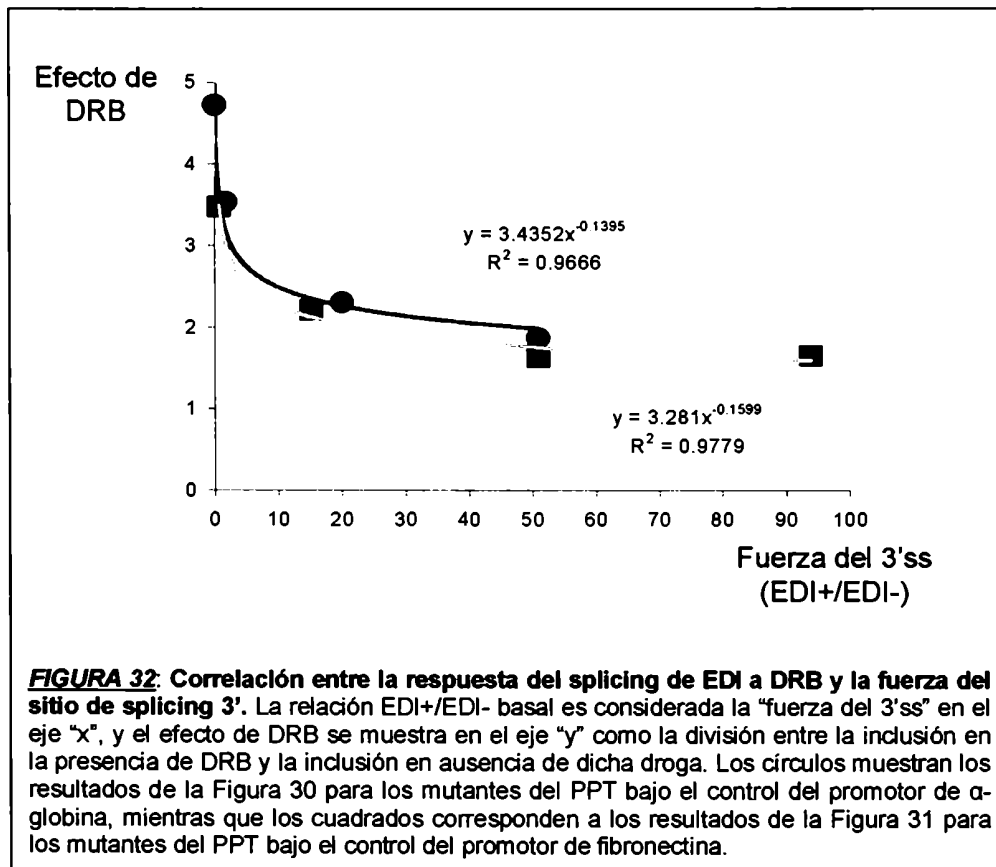
Curiosamente, el efecto de DRB no es totalmente abolido incluso en las construcciones DM. Aparentemente, al menos con estos dos promotores, se alcanza

un *plateau*, puesto que las construcciones AT y DM no difieren significativamente en su comportamiento.



24. Correlación entre la fuerza del sitio 3'ss y el efecto de DRB

Vimos entonces que el efecto de DRB sobre el splicing de los pre-mRNAs generados a partir del minigén disminuye a medida que se fortalece el 3'ss de EDI por medio de mutaciones puntuales en el PPT. Esto fue observado para el caso de minigenes dirigidos por el promotor de α -globina (Figura 30) y fibronectina (Figura 31). En el caso de un aumento de la elongación provocado por VP16, comprobamos que existe una correlación inversa entre la fuerza del 3'ss de EDI y el efecto de VP16 de aumentar la exclusión del exón (Figura 29). De la misma manera, nos preguntamos si para el caso de una disminución en la elongación, provocada por la droga DRB, se observa una correlación similar.



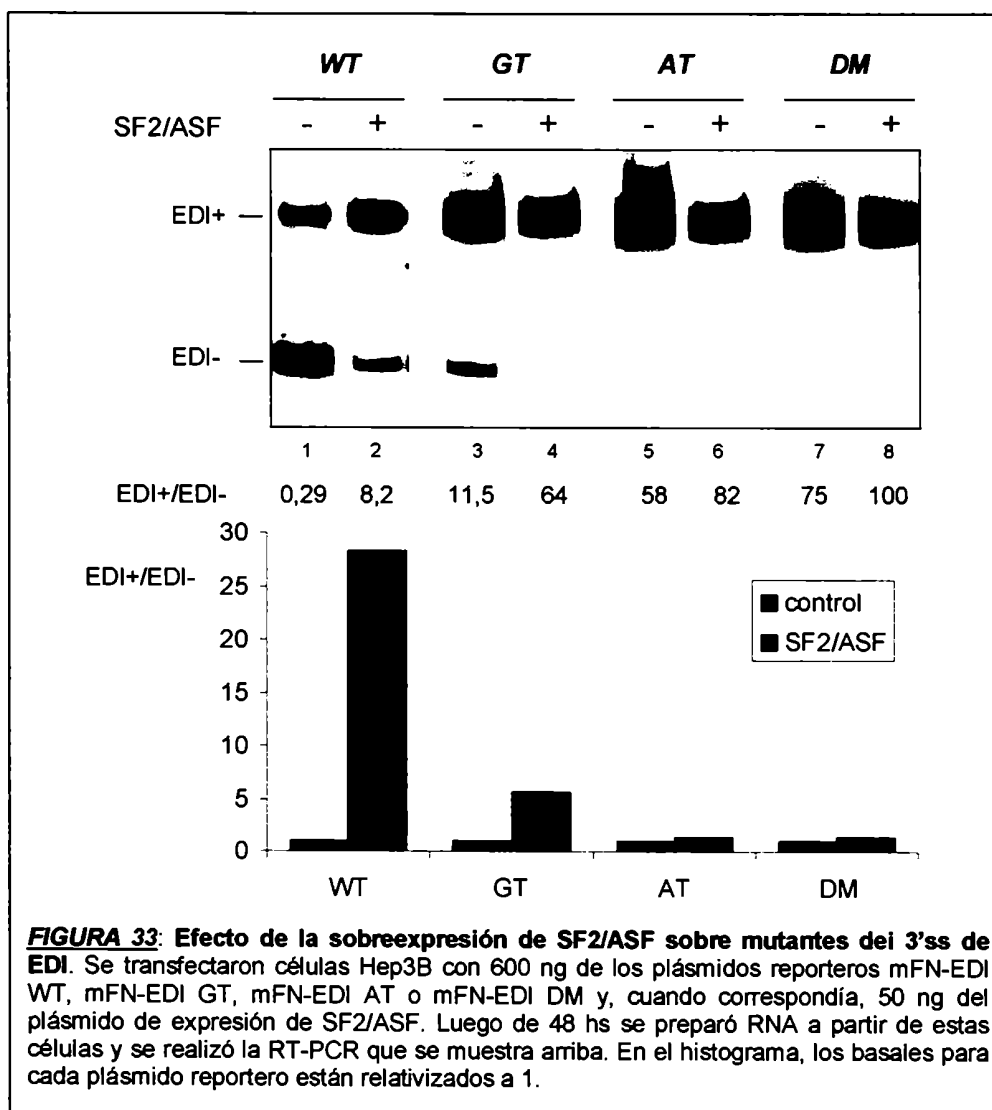
En la Figura 32 graficamos en el eje de las “x” la fuerza del 3’ss, evidenciada por la inclusión basal de EDI, y en el eje de las “y” el efecto de DRB sobre la inclusión del exón, con los resultados obtenidos a partir de los minigenes de α -globina (círculos) y de fibronectina (cuadrados). Podemos ver que efectivamente existe una correlación inversa entre estos dos parámetros, para el caso de ambos promotores, con las construcciones WT, GT, AT y DM. Además, ambas curvas son similares, lo cual nos indica que este comportamiento trasciende la identidad del promotor que dirige la transcripción.

25. Efecto de la sobreexpresión de SF2/ASF sobre mutantes del 3’ss

Se sabe que un sitio de splicing 3’ es reconocido o no según una combinación entre el sitio de ramificación, el tracto de polipirimidinas y elementos enhancer de splicing. Los enhancers de splicing pueden compensar a un tracto de polipirimidinas o un sitio de ramificación débiles (Buvoli et al., 1997). Cuando se requiere una regulación de la selección de un sitio de splicing determinado, las células pueden modular la producción de distintos mRNAs a través de la expresión diferencial de proteínas SR que se unen a los enhancers de splicing. Por ejemplo, en el pre-mRNA de la tropomiosina beta, es posible prevenir la exclusión inapropiada de un exón gracias a un exceso de la proteína SR SF2/ASF (Mayeda et al., 1993).

Ya habíamos mencionado que SF2/ASF reconoce el ESE presente en EDI, lo que provoca una estimulación de la utilización del sitio de splicing subóptimo en 3’ que lleva a una mayor inclusión del exón (Figura 19). Así, la unión de SF2/ASF al ESE fortalece funcionalmente el reconocimiento del exón en *trans* al facilitar el ensamblado de la maquinaria de splicing sobre el sitio de splicing 3’, que sigue siendo intrínsecamente débil. Por lo tanto, el efecto de SF2/ASF es de algún modo equivalente a mutar el sitio 3’ para volverlo más similar a la secuencia consenso. Además, ya se había demostrado que la sensibilidad a SF2/ASF dependía de la *exon definition* (Pagani et al., 2003).

Teniendo en cuenta esto, decidimos evaluar el efecto de la sobreexpresión de SF2/ASF sobre nuestros mutantes del sitio de splicing 3' de EDI. La Figura 33 muestra los resultados obtenidos. Mientras que SF2/ASF aumentó la inclusión de EDI en más de 28 veces en la construcción WT (calles 1 y 2), en la construcción GT su efecto fue de sólo 5,5 veces (calles 3 y 4). En las otras dos mutantes, AT y DM, la sobreexpresión de esta proteína SR no tuvo prácticamente efecto alguno (calles 5-8). Una vez más, la mutante GT parece ser más débil que la AT, que a su vez se comporta como la DM, al igual que en las Figuras 30 y 31.



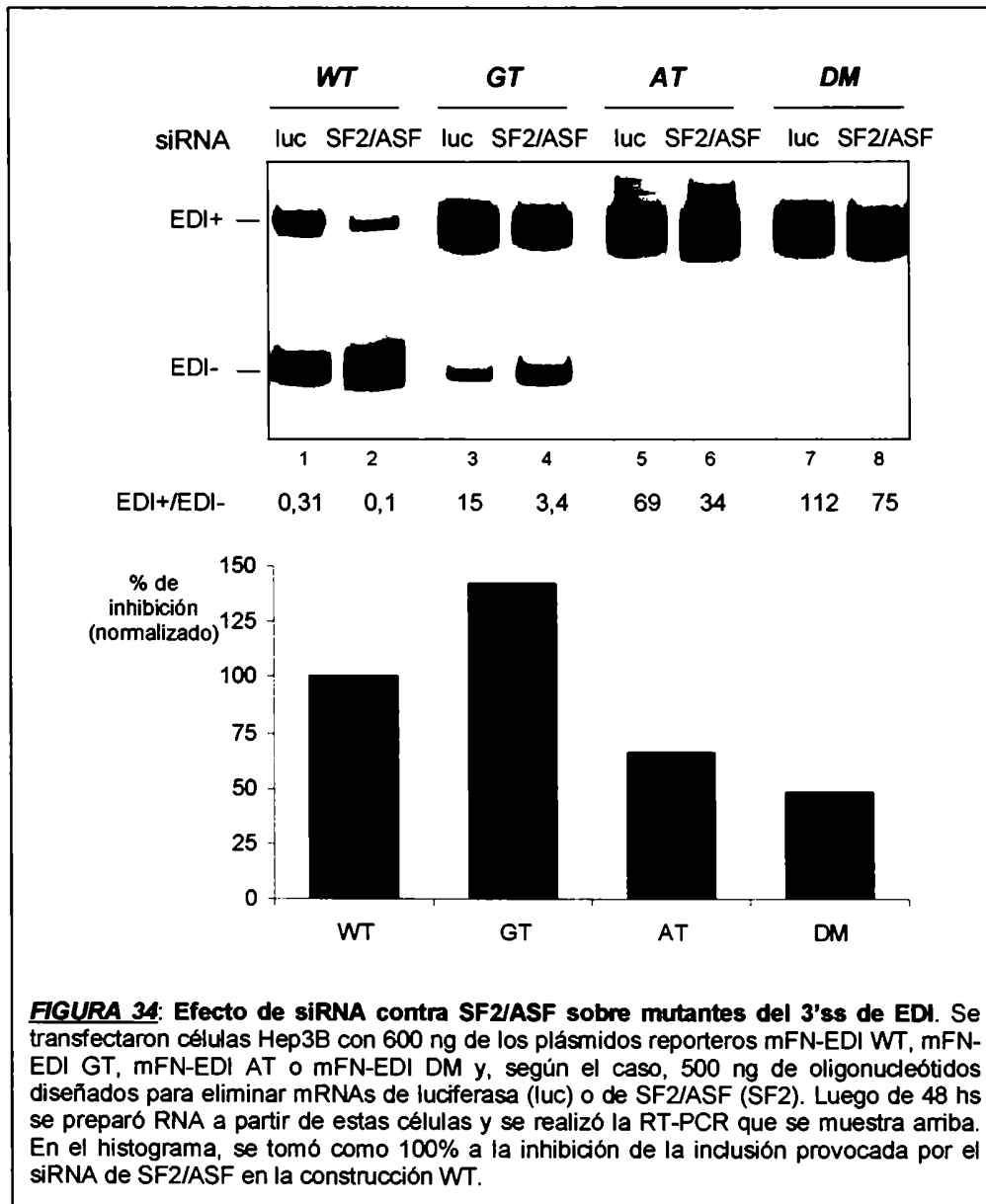
26. Efecto de siRNA de SF2/ASF sobre mutantes del 3'ss

Habiendo visto los resultados mostrados en la Figura 33, nos preguntamos si se observaría lo mismo disminuyendo los niveles endógenos de la proteína SF2/ASF por medio de la cotransfección de un RNA pequeño de interferencia (siRNA) diseñado específicamente contra el RNA de SF2/ASF. La sobreexpresión de una proteína puede potencialmente perturbar el comportamiento celular normal ya que podría comprometer a las maquinarias de transcripción y de traducción a trabajar en su producción, en detrimento de otras proteínas de la célula. Por lo tanto, quisimos utilizar la técnica de siRNA como modo de controlar que esto no estuviera sucediendo. En nuestro laboratorio ya se había demostrado, por experimentos de *western blot*, que la cotransfección de siRNA contra SF2/ASF logra abolir completamente la expresión de esta proteína (de la Mata et al., 2003).

En la Figura 34 se observa el resultado de la utilización de esta técnica sobre los distintos mutantes del PPT. Como control se utilizó siRNA contra luciferasa, como proteína control no relacionada. Podemos ver que en el WT, la inhibición de la inclusión del exón producida por la inhibición de la expresión de SF2/ASF en las células es de aproximadamente 3 veces (calles 1 y 2). La mutante GT, curiosamente, no es menos sensible que el WT (calles 3 y 4). Sin embargo, como habíamos visto antes, las construcciones AT y DM son muy similares entre sí, y el efecto de inhibición provocado por la presencia de siRNA contra SF2/ASF es menor que en el WT (calles 5 a 8).

Con esto, podemos concluir que la proteína SF2/ASF no logra aumentar apreciablemente la inclusión en los mutantes del 3'ss de EDI cuando el plásmido reportero de splicing lleva las mutaciones fuertes (AT y DM). Es interesante notar además que la sobreexpresión de esta proteína, y su eliminación específica por la utilización de siRNAs, no son técnicas equivalentes.

La independencia de SF2/ASF que se observa en las mutantes AT y DM del PPT demuestra que estas mutaciones le otorgan efectivamente una mayor fuerza al 3'ss de EDI.



Conclusiones del Capítulo 3

En líneas generales, en este Capítulo demostramos que la respuesta de la exclusión del exón a la elongación transcripcional es inversamente proporcional a la fuerza del sitio de splicing 3'. Esto significa que cuanto mayor es el reconocimiento del exón alternativo por parte de la maquinaria de splicing, menor es la influencia de la elongación sobre el grado de inclusión.

Además, demostramos experimentalmente que el splicing alternativo del exón EDI de fibronectina ocurre efectivamente porque el tracto de polipirimidinas de su sitio de splicing 3' es subóptimo. Al mutar el tracto de polipirimidinas en dos posiciones diferentes, ya sea individualmente o en combinación, y al disrumpir el silencer de splicing exónico de EDI, generamos minigenes con diversos grados de inclusión del exón. La mayor fuerza del 3'ss de EDI en las mutantes fue evidenciada tanto por una mayor inclusión del exón, como por una independencia de la proteína SF2/ASF.

Las evidencias obtenidas en este Capítulo comprueban la hipótesis propuesta en la Figura 18B, lo que refuerza aún más nuestro modelo cinético de regulación del splicing alternativo.

CONCLUSIONES

Capítulo 1: Influencia de los factores de transcripción sobre el splicing alternativo

- El factor de transcripción VP16, que estimula tanto la iniciación como la elongación transcripcional, provoca un fuerte aumento en la exclusión del exón alternativo EDI en un minigén de fibronectina humana.
- El factor de transcripción SW6, que es una mutante de VP16 que sólo estimula la iniciación de la transcripción, prácticamente no tiene efecto sobre el splicing de EDI.
- Parece existir una correlación en la cual cuanto mayor es la capacidad elongadora teórica de la RNA polimerasa II, menor es el efecto de VP16 sobre el splicing alternativo.
- La sinergia a nivel transcripcional, previamente reportada entre proteínas activadoras de la iniciación de la transcripción como SW6, Sp1 y NFI/CTF, y la proteína estimuladora de la elongación Tat, también se observa a nivel del splicing alternativo.
- Existe una correlación en la cual cuanto mayor es la capacidad elongadora de la RNA polimerasa II, medida en el estado estacionario por medio de un ensayo de protección a la RNasa, menor es la inclusión del exón alternativo EDI.

Capítulo 2: Influencia de P-TEFb sobre el splicing alternativo

- La droga DRB, que inhibe la elongación transcripcional al inhibir la actividad kinasa de P-TEFb, provoca un aumento de la inclusión del exón alternativo EDI.

- El efecto de DRB sobre el splicing depende de la presencia del dominio carboxi-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II, lo que apoya la hipótesis de que la modulación de la procesividad causada por P-TEFb, que es la principal kinasa de CTD in vivo, estaría involucrada en el control del splicing.
- El efecto de la proteína elongadora Tat de aumentar la exclusión del exón, ya sea sola o en presencia de un activador de la iniciación, disminuye notablemente en presencia de DRB. Esto apoya también la importancia de P-TEFb en nuestro sistema, ya que se sabe que Tat aumenta la elongación transcripcional debido a que recluta a P-TEFb.
- En concordancia con lo anterior, el efecto de Tat sobre el splicing depende de la presencia del CTD de la RNA polimerasa II.
- La proteína MAQ1/HEXIM1, que al unirse a P-TEFb lo vuelve inactivo, provoca un aumento de la inclusión de EDI y revierte el efecto de Tat sobre el splicing alternativo.

Capítulo 3: Importancia de la fuerza de los sitios de splicing en la sensibilidad a cambios en la elongación.

- El efecto de VP16 de estimular la exclusión de EDI se anula e incluso se revierte en presencia de SF2/ASF, una proteína SR activadora de la inclusión de EDI.
- En presencia de 9G8, otra proteína SR activadora de la inclusión de EDI, también se anula el efecto de VP16 sobre el splicing alternativo.
- Estos resultados sugieren que el fortalecimiento del sitio de splicing 3' de EDI a partir de la unión de proteínas SR al enhancer de splicing exónico provoca una menor sensibilidad a un aumento de la elongación causado por la proteína VP16.
- Cuando se fortalece el sitio de splicing 3' de EDI de un minigén de fibronectina humana mediante mutaciones puntuales, el efecto de VP16 sobre el splicing se invierte.

- Algo similar ocurre cuando se fortalece el sitio de splicing 3' de EDI de un minigén de fibronectina humana mediante una mutación disruptiva en el silencer de splicing exónico. En este caso, VP16 no modifica el splicing de EDI.
- Establecimos una correlación en la cual la sensibilidad del splicing a un aumento en la elongación por VP16 es inversamente proporcional a la fuerza del sitio de splicing 3' de EDI.
- La droga inhibidora de la elongación DRB aumenta la inclusión del exón. Cuando el sitio de splicing 3' de EDI de un minigén de fibronectina humana es fortalecido mediante mutaciones puntuales, la inhibición de la exclusión de EDI mediada por DRB es menor. Esto sucede de manera similar ya sea que la transcripción esté dirigida por el promotor de α -globina o por el promotor de fibronectina, lo que demuestra que este comportamiento es independiente del promotor.
- Como se observa con VP16, existe una correlación en la cual, cuanto mayor es la fuerza del sitio de splicing 3' de EDI, menor es el efecto de la inhibición de la elongación transcripcional por DRB sobre el splicing de EDI.
- La sobreexpresión de la proteína SR SF2/ASF estimula el reconocimiento del sitio de splicing 3' de EDI, lo que provoca la inclusión del exón. En los mutantes en los cuales el sitio de splicing se encuentra fortalecido, este efecto deja de observarse. Como antes, esto correlaciona con la fuerza del sitio de splicing.
- Como se esperaba, RNAi contra SF2/ASF provoca un aumento de la exclusión del exón EDI. Los mutantes en los cuales el sitio de splicing se encuentra fortalecido presentan menor respuesta que el *wild-type* a la depleción de SF2/ASF.



DISCUSIÓN

1. Elongación transcripcional

La transcripción puede ser modulada modificando la capacidad de la RNA polimerasa II (Pol II) de iniciar y/o de elongar eficientemente. La iniciación de la transcripción ocurre cuando se ensambla correctamente el complejo de preiniciación sobre el promotor de un gen, gracias al reclutamiento de factores generales de splicing. Esto puede ser facilitado por la acción de diversas proteínas que se unen a secuencias específicas del promotor (factores de transcripción), o que son reclutadas por medio de proteínas que actúan como “puente”.

Sin embargo, el hecho de que la Pol II comience a transcribir un gen no garantiza que pueda completar el proceso. Usualmente, la Pol II se detiene brevemente luego de transcribir unos pocos nucleótidos, y si la elongación no prosigue, la transcripción termina abruptamente, generando transcritos cortos que luego serán degradados. Esta detención es provocada, al menos en parte, por la acción de proteínas como el factor negativo de elongación o NELF, y el factor inductor de sensibilidad a DRB o DSIF (ver Introducción, pág. 17).

Existen características de la Pol II y del molde de DNA cuya modificación puede favorecer la elongación. Con respecto a la Pol II, su procesividad, o capacidad de elongar, puede ser incrementada por la hiperfosforilación de su dominio carboxi-terminal (CTD) por parte de kinasas específicas. Estas kinasas, en particular P-TEFb, pueden ser reclutadas al promotor por proteínas “elongadoras”, o al transcrito nascente, como es el caso del transactivador Tat. En cuanto a las características del molde, pueden existir secuencias que forman estructuras secundarias, generalmente “loops”, que constituyen un impedimento mecánico al avance de la Pol II. Estas secuencias son denominadas “pausas”. No existen en principio secuencias consenso que permitan reconocer estas pausas en una secuencia dada, sino que lo más frecuente es que sean localizadas mediante ensayos funcionales. Si la Pol II es procesiva, puede

superar estas pausas y continuar la transcripción. Por otra parte, otra característica del molde que puede dificultar el paso de la Pol II es la cromatinización del DNA. *In vivo*, el DNA no se encuentra como una molécula aislada sino que se encuentra asociada a histonas y otras proteínas, formando la cromatina.

Existen grandes complejos de remodelación que pueden reorganizar la cromatina. Estos complejos generan modificaciones covalentes en la cromatina que pueden afectar la elongación transcripcional (Gerber y Shilatifard, 2003). El estado de modificación de las histonas puede modular tanto el acceso de la maquinaria de transcripción a las regiones regulatorias del DNA, como la eficiencia de la cromatina como molde para la síntesis de RNA. Se cree que estas modificaciones pueden estabilizar a la cromatina al contrarrestar las interacciones entre nucleosomas, lo que facilitaría el acceso de la Pol II. Además, el complejo de elongación transcripcional puede reclutar metiltransferasas de histonas de manera dependiente del estado de fosforilación del CTD (Hampsey y Reinberg, 2003), lo que demuestra que existe una influencia mutua entre ambos mecanismos. Existen también evidencias que sugieren que la Pol II en su isoforma procesiva podría intervenir directamente en la acetilación de histonas, al llevar asociada a su CTD a una actividad acetiltransferasa (Travers, 1999).

Con esto, vemos que el control de la elongación transcripcional es un proceso muy complejo, sujeto a gran variedad de influencias de otros mecanismos celulares. Todavía no están del todo esclarecidos los mecanismos bioquímicos de la elongación y de su regulación, pero en los últimos años se avanzó mucho en la comprensión de esta importante etapa de la transcripción.

2. Efecto de promotor

Ya habíamos mencionado en la Introducción que la estrategia de cambiar el promotor que dirige la transcripción de un minigén de fibronectina había sido muy útil para determinar la importancia del control transcripcional sobre el splicing alternativo (Cramer et al., 1997; 1999).

El “efecto de promotor” no es exclusivo del exón alternativo EDI, sino que se obtuvieron independientemente resultados similares en otros genes. Los grupos de O’Malley y Berget clonaron minigenes reporteros cuyos productos sufren splicing alternativo en los genes de CD44 y de CGRP, bajo el control de promotores sensibles a esteroides (MMTV y promotores sintéticos que contienen elementos de respuesta a progesterona o a estrógenos), o bajo el control de promotores que no responden a hormonas esteroideas (CMV y TK). En este caso, las hormonas esteroideas provocaron cambios en el splicing alternativo sólo en el caso de los pre-mRNAs transcritos a partir del primer tipo de promotores. Como en el caso del exón EDI de fibronectina, los efectos de las hormonas sobre el splicing alternativo dependen del promotor, pero no son consecuencia de un aumento en la tasa de transcripción o de una saturación de la maquinaria de splicing (Auboeuf et al., 2002).

También se observaron cambios dependientes del promotor en el splicing alternativo de minigenes reporteros que contienen el exón 9 de CFTR. En este caso, la sobreexpresión de la proteína SR SF2/ASF estimula la exclusión del exón 9, y este efecto es modulado por el promotor, como en el caso del exón EDI de fibronectina (Pagani et al., 2003).

El hecho de que la estructura del promotor sea importante para el splicing alternativo sugiere que los factores que regulan el splicing alternativo podrían estar actuando a través de los promotores. Además, el splicing alternativo dependiente del tipo celular podría ser consecuencia no sólo de la abundancia diferencial de las diversas proteínas SR, sino de un proceso más complejo que involucre una ocupación diferencial del promotor en cada tipo celular. Sin embargo, en la naturaleza los promotores no son intercambiados y, dado que la mayor parte de los genes tiene un único promotor, la única manera posible por la cual la arquitectura del promotor podría tener importancia en el control del splicing alternativo *in vivo*, debería ser una ocupación diferencial de los promotores por parte de factores de transcripción. Por lo tanto, un modo de investigar el mecanismo de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo es utilizando distintos activadores transcripcionales que actúan sobre un único promotor.

3. Influencia de factores de transcripción sobre el splicing alternativo

En el Capítulo 1 de Resultados evaluamos la influencia de distintos factores de transcripción sobre el splicing alternativo del exón EDI de un minigén de fibronectina.

Como vimos (pág. 46), los factores de transcripción pueden ser separados en tres clases funcionales según su capacidad de estimular predominantemente la iniciación transcripcional, como SW6, Sp1 y NFI/CTF; la elongación transcripcional, como es el caso de la proteína Tat; o ambos procesos, como sucede por ejemplo con VP16. En el mismo capítulo demostramos que, independientemente de la naturaleza de sus dominios de activación, las proteínas SW6 (acídica), Sp1 (rica en glutaminas) y NFI/CTF (rica en prolinas), las cuales promueven predominantemente la iniciación transcripcional, tienen muy poco efecto sobre el splicing de EDI (Figuras 8 y 9). Por otro lado, VP16 (acídico), que promueve iniciación y elongación, estimula fuertemente la exclusión del exón EDI (Figura 4). El elongador Tat, que en ausencia de otros activadores prácticamente no tiene efecto sobre la transcripción, no provoca cambios en el splicing (Figura 7). Se puede reconstituir la estimulación simultánea de la iniciación y la elongación gracias a la sinergia que se observa entre Tat y activadores de la iniciación (Blau et al., 1996). Consistentemente con esto, encontramos que Tat actúa sinérgicamente con SW6, Sp1 y NFI/CTF, pero no con VP16, en promover la elongación transcripcional y, por consiguiente, en inhibir la inclusión de EDI (Figura 8; Kadener et al., 2001; Nogués et al., 2002).

Esto nos permite inferir que el proceso transcripcional involucrado en la modulación del splicing es la elongación. Las proteínas utilizadas en esta tesis son muy distintas entre sí, lo que sugiere que sus mecanismos de acción también lo son. Sin embargo, observamos una correlación entre sus actividades a nivel transcripcional y sus efectos sobre el splicing alternativo. Además, se debe tener en cuenta que todas estas proteínas actúan en nuestro sistema de forma directa gracias a que se encuentran fusionadas al dominio de unión al DNA del factor de transcripción de levaduras Gal4, y a que evaluamos el efecto sobre un minigén cuya transcripción está dirigida por un promotor mínimo al que se le han agregado sitios de unión a dicho factor. Por lo

tanto, podemos descartar la posibilidad de que el efecto de los factores de transcripción sobre el splicing sea indirecto.

En eucariotas, lo más frecuente es que las proteínas activadoras de la transcripción estimulen la iniciación, gracias al reclutamiento de factores generales de transcripción que forman el complejo de pre-iniciación. Sin embargo, existen también varios ejemplos de activadores que intervendrían en la regulación de la elongación transcripcional. Ya mencionamos a P-TEFb y a los factores negativos NELF y DSIF. También se implicó en el control de la elongación a factores generales de iniciación, como TFIIE, TFIIF y TFIIH, y a otras proteínas como SII, Elongin (SIII) y ELL (Conaway et al., 2000; Reines et al., 1996). Sin embargo, aún no se conoce en detalle el mecanismo por el cual estas proteínas actuarían sobre la elongación transcripcional. La proteína Tat del virus HIV estimula la elongación transcripcional porque recluta a P-TEFb, una quinasa de CTD, al transcripto naciente, pero no actúa sobre la iniciación. Resulta muy interesante ver que la sinergia descrita a nivel transcripcional entre Tat y activadores de la iniciación (Blau et al., 1996; Yankulov et al., 1994), también se observa a nivel del splicing. Además, nuestros ensayos de protección a la RNasa nos permiten realizar una estimación de cuánto elonga la Pol II en cada caso, y los resultados obtenidos muestran que, en presencia del elongador Tat, los factores que estimulan iniciación provocan mayor elongación que en su ausencia (Figura 8).

VP16 pertenece a la familia de activadores ricos en regiones acídicas cortas. Los dominios de activación acídicos no presentan una estructura terciaria definida, sino que organizan su estructura sólo al interactuar específicamente con otra proteína (Shen et al., 1996; Uesugi et al., 1997). En el caso de VP16, se describió que es capaz de unirse a TFIIH (Yankulov et al., 1994) y a otros factores generales de transcripción. Además, se demostró en levaduras que VP16 sería capaz de interactuar directamente con las maquinarias de remodelación de la cromatina como el complejo Swi/Snf y con el complejo de acetilasas de histonas SAGA (Neely et al., 1999; Vignali et al., 2000; Ikeda et al., 1999). Sin embargo, pese a todas las interacciones proteicas descritas, aún no se conoce el mecanismo por el cual VP16 favorece la elongación.

Sp1, en cambio, pertenece a la familia de factores de transcripción cuyo dominio de activación es rico en glutaminas. Sp1 es un factor de transcripción que reconoce secuencias ricas en GC que están presentes en gran variedad de promotores y enhancers transcripcionales. Se describió su interacción con proteínas de la maquinaria general de transcripción como TBP y diversos TAFs (Suske, 1999).

Por último, NFI/CTF es un factor de transcripción que posee dominios ricos en prolina. Estas proteínas actuarían a través de una interacción directa con proteínas del aparato basal como TFIIB o TBP. Otro mecanismo propuesto involucra el desplazamiento de histonas represoras por parte de NFI/CTF (Gronostajski, 2000). También es probable que existan interacciones específicas entre estas proteínas y diversos coactivadores como el TAFII55, que a su vez interacciona con otros factores de transcripción como Sp1 y Tat (Chiang y Roeder, 1995).

4. Modelo cinético de control del splicing alternativo

En esta tesis demostramos la importancia del control de la elongación transcripcional sobre el splicing alternativo. Las evidencias obtenidas apoyan un modelo cinético de acoplamiento temporal y funcional entre la transcripción y el splicing. Según este modelo (ver Figura 1), una baja procesividad de la Pol II o la presencia de pausas internas, favorecería la inclusión de exones alternativos gobernados por un mecanismo de “salteado de exones” o *exon skipping*. Por otra parte, una Pol II muy procesiva, o la ausencia de pausas, favorecería la exclusión de este tipo de exones. El mecanismo por el cual la tasa de elongación podría afectar al splicing alternativo es una consecuencia de la secuencia del pre-mRNA. En el caso del exón EDI, la exclusión del exón ocurre porque el sitio de splicing 3' del intrón río arriba (intrón -1) es subóptimo comparado con el sitio de splicing 3' del intrón río abajo (intrón +1). Si la Pol II se detiene entre estos sitios, sólo puede ocurrir la eliminación del intrón -1. Una vez que la pausa es superada o la polimerasa prosigue la transcripción, la maquinaria de splicing sólo puede eliminar el intrón +1, lo que lleva a la inclusión de EDI. Una Pol II muy procesiva, o la ausencia de pausas internas, favorecería la presentación simultánea de ambos intrones a la maquinaria de splicing, una situación

en la cual el 3'ss más fuerte, perteneciente al intrón +1 prevalecería sobre el 3'ss del intrón -1, lo que resultaría en la exclusión del exón.

5. Otras evidencias que apoyan el modelo cinético

Los resultados que obtuvimos en esta tesis se vieron fortalecidos por otras líneas de investigación de nuestro grupo.

Los promotores y los enhancers transcripcionales son elementos que actúan en *cis* que controlan la expresión de genes a través de complejas redes de interacciones proteína-proteína y proteína-DNA. Los promotores intervienen en el correcto posicionamiento de la Pol II, y tanto los promotores como los enhancers controlan la iniciación y elongación transcripcionales. Se había informado anteriormente que la presencia del enhancer de SV40 cerca de un promotor estimula la elongación por parte de la Pol II (Yankulov et al., 1994). Consistentemente con nuestro modelo cinético, la eliminación del enhancer de SV40 provoca una reducción de la exclusión del exón de 3-10 veces, independientemente del promotor a partir del cual se transcribe el minigén (Kadener et al., 2002).

Por otra parte, el antígeno T de SV40 (AgT) activa la replicación plasmídica 2 veces pero activa la transcripción 25 veces. La replicación mediada por AgT, que inhibe la elongación por Pol II presumiblemente debido a que genera un estado de cromatinización del plásmido (Nahreini y Mathews, 1995; Williams et al., 1996; Cereghini y Yaniv, 1984), provoca un aumento en la inclusión del exón EDI de 10-30 veces. El efecto de AgT es específico del exón, ocurre en *cis*, y depende exclusivamente de la replicación del DNA y no de la transformación celular. Por otro lado, vimos en esta tesis que VP16 tiene un efecto similar sobre la transcripción, pero el efecto contrario sobre el splicing, ya que en este caso la inclusión es inhibida unas 30 veces aproximadamente. Fue interesante ver que tanto el AgT como VP16 promueven la colocalización del mRNA con los speckles nucleares que contienen la proteína SR SF2/ASF, que se comporta como un regulador positivo de la inclusión de EDI. Esto demuestra que la colocalización de los transcritos y de los speckles no es suficiente para estimular la inclusión de EDI (Kadener et al., 2001).

Estas observaciones, tomadas en conjunto, vuelven a apoyar el modelo cinético que habíamos propuesto.

Recientemente, se agregó evidencia aún más poderosa apoyando el modelo de elongación. La mutación puntual C4 de la subunidad mayor de la Pol II de *Drosophila* le otorga a la enzima una menor procesividad, por lo que se comporta como una polimerasa “lenta”. La expresión de un equivalente humano de la Pol II C4 de *Drosophila* en células humanas en cultivo, afecta el splicing alternativo del exón EDI de fibronectina y del pre-mRNA de E1a. Es más, en embriones de *Drosophila* mutantes para C4, se observa que se estimula el “resplicing” del gen Hox Ultrabithorax, lo que demuestra el control transcripcional del splicing alternativo en un gen endógeno (de la Mata et al., 2003). Estos resultados constituyen la primera prueba directa de la existencia de un control de la elongación sobre el splicing alternativo.

6. Efecto de DRB sobre el splicing alternativo

En el Capítulo 2 de Resultados de esta tesis, agregamos evidencias que apoyan el modelo de control del splicing alternativo a través de un control de la elongación transcripcional.

El factor de elongación P-TEFb convierte la Pol II de una forma no procesiva a una forma procesiva, lo cual es consistente con el hecho de que inhibidores de esta kinasa como DRB inhiben la elongación por Pol II (Price, 2000). Demostramos en la Figura 11 de esta tesis que células transfectadas con minigenes reporteros de splicing y tratadas con DRB muestran un aumento de aproximadamente 3 veces en la inclusión de EDI, comparando con células no tratadas (Nogués et al., 2002). Es interesante notar que el efecto de DRB sobre el splicing parece ser específico del tipo celular, ya que lo observamos en células Hep3B y no en células Cos-1, y específico de la arquitectura del molde, puesto que los minigenes de fibronectina responden a DRB, independientemente del promotor que dirige la transcripción, mientras que no se modifica el splicing del mismo exón alternativo EDI en el contexto del gen endógeno de fibronectina. Esto nos plantea la pregunta de cuán fisiológico es el estudio de estos

procesos a través de la utilización de plásmidos que contienen minigenes y que son transfectados transitoriamente en líneas celulares. Podemos decir que este es un modelo válido para investigar muchos de estos mecanismos, pero que las conclusiones que se extraen deben ser confirmadas en un contexto más fisiológico, con genes endógenos.

7. Minigenes vs. genes endógenos

Un gen endógeno difiere en dos aspectos importantes de un minigén inserto en un plásmido. En primer lugar, a pesar de que se describió que los plásmidos transfectados en células eucariotas adquieren una organización nucleosomal, y que esta estructura se vuelve aun más compacta y específica si el plásmido es capaz de replicar dentro de la célula eucariota (Cereghini y Yaniv, 1984), es poco probable que esta “cromatinización” posea la complejidad, en cuanto a sus componentes y organización, de la cromatina nativa. Mencionamos anteriormente que los complejos de remodelación de histonas están involucrados en el control de la elongación, y que los factores de transcripción ejercen su efecto, al menos en parte, a través de cambios en la estructura cromatínica. Éstos son sólo dos ejemplos, pero existe gran cantidad de evidencias que muestran que la cromatina es de gran importancia en el control de la transcripción y la replicación del DNA. En segundo lugar, otra gran diferencia entre un gen endógeno y un minigén es la longitud del DNA y la ubicación relativa de las diversas secuencias que regulan la transcripción y el splicing. En un minigén, se eligen intrones naturalmente cortos o se acorta los largos, el promotor que dirige la transcripción tiene, como mucho, unos pocos cientos de pares de bases y, usualmente, no están presentes todos los exones del gen endógeno. Además, muchas veces se combinan fragmentos de varios genes distintos en un único minigén. Estas características permiten generar plásmidos pequeños factibles de ser transfectados eficientemente, y facilitan la realización de todo tipo de mutaciones que permiten poner a prueba las hipótesis de trabajo. Esta maleabilidad constituye una gran ventaja en la mayor parte de los casos. Sin embargo, no debemos olvidar que en los minigenes se pierden elementos regulatorios de la transcripción como las zonas más

distales del promotor y los enhancer transcripcionales, se eliminan secuencias regulatorias de splicing (silencers y enhancers), en especial las intrónicas y, en general, se afectan todas las distancias relativas entre estos elementos.

Teniendo estos dos aspectos en mente, podemos ver que los resultados obtenidos con minigenes deben ser validados en genes endógenos para adquirir más fuerza. En nuestro sistema, como mencionamos antes, ya obtuvimos en el caso de los embriones de *Drosophila* que poseen la mutación C4 una evidencia de que la elongación transcripcional es capaz de modificar el splicing *in vivo* (de la Mata et al., 2003). Sin embargo, queda aún mucho por hacer para validar nuestras conclusiones en un contexto más fisiológico, y nuestro grupo se encuentra actualmente embarcado en este proyecto.

8. Otras evidencias que sugieren la importancia de P-TEFb sobre el splicing alternativo

Además del efecto de DRB sobre el splicing, otras evidencias obtenidas en esta tesis sugieren que el control de la elongación mediado por P-TEFb está involucrado en la regulación del splicing alternativo. En primer lugar, el efecto de la elongación sobre el splicing depende de presencia del dominio carboxi-terminal de la Pol II (Figuras 13 y 15). Además, la proteína MAQ1/HEXIM1, que es un regulador negativo de P-TEFb, también es capaz de modificar el splicing, ya que su sobreexpresión provoca un aumento de la inclusión de EDI en nuestros minigenes (Figura 16).

Con respecto a esto, podemos decir que los resultados mostrados en el Capítulo 2 de esta tesis concuerdan en señalar a P-TEFb como uno de los efectores más importantes del control de la elongación transcripcional sobre el splicing. Sin embargo, estas evidencias son aún bastante indirectas. Tenemos planeado continuar con el estudio de la influencia de P-TEFb en nuestro sistema utilizando herramientas más poderosas, con el objetivo de fortalecer los experimentos realizados hasta ahora. Entre estas herramientas podemos mencionar la utilización de RNAi diseñado contra la ciclina T y la Cdk9, los dos componentes de P-TEFb, y la utilización de plásmidos que expresen mutantes negativas de estas proteínas que, por ejemplo, no puedan

interaccionar entre sí. Además, seguimos en colaboración con el Dr O. Bensaude para continuar con el estudio de la importancia de la proteína MAQ1/HEXIM1 en nuestro sistema. Por último, nos interesa encontrar al menos un gen endógeno en el cual podamos demostrar que P-TEFb modifica directamente el splicing de un exón alternativo.

9. Importancia de la fuerza de los sitios de splicing en la sensibilidad a cambios en la elongación

En el Capítulo 3 de Resultados demostramos que la influencia de la procesividad de la Pol II sobre el splicing alternativo depende de la fuerza de los sitios de splicing. El exón EDI del gen de la fibronectina humana es alternativo porque su sitio de splicing 3' es subóptimo, debido a que el tracto de polipirimidinas (PPT) se encuentra interrumpido por dos purinas. Al mutar estas purinas a pirimidinas, independientemente o ambas a la vez, generamos minigenes en los que el exón es progresivamente mejor reconocido por la maquinaria de splicing. El mejor reconocimiento del exón fue evidenciado por una mayor inclusión basal del mismo y porque la inclusión se volvió independiente de la proteína SR SF2/ASF (Figuras 33 y 34). Estos minigenes mutados fueron transfectados en células humanas en cultivo, y nos permitieron estudiar la respuesta del splicing alternativo de EDI a la activación de la elongación transcripcional por VP16 (Figura 27) y a la inhibición provocada por DRB (Figuras 30 y 31). Los resultados obtenidos muestran que la respuesta a la elongación de la exclusión del exón es inversamente proporcional a la fuerza del sitio de splicing 3' (Figuras 29 y 32, Nogués et al., 2003). Esto significa que cuanto mayor es el reconocimiento del exón alternativo, menor es la influencia de la elongación transcripcional sobre el grado de inclusión del mismo.

Estos resultados apoyan el modelo de elongación propuesto para el control del splicing alternativo, ya que según este modelo, esperábamos que el fortalecimiento del sitio subóptimo de splicing produjera una menor sensibilidad a cambios en la elongación transcripcional (Figura 18).

Ya se había demostrado que el fortalecimiento de los sitios de splicing 3' y 5' de EDI mejoraba el reconocimiento del exón en un minigén de fibronectina de ratón (Muro et al., 1998), pero sin relacionarlo con el control por la elongación transcripcional. Los mismos mutantes murinos fueron utilizados en esta tesis para evaluar la sensibilidad a un aumento de la elongación causado por VP16. Los resultados obtenidos (Figuras 24 y 25) coinciden cualitativamente con los de las mutaciones puntuales en el PPT del 3'ss de EDI en un minigén humano.

Recientemente se utilizó una estrategia similar en levaduras para demostrar la conexión entre elongación y reconocimiento del exón. En levaduras, el splicing alternativo no es muy común. La mutación del *branch point* situado río arriba del exón interno constitutivo del gen DYN2 provoca que este exón se vuelva alternativo. El grupo de Manuel Ares logró revertir parcialmente la exclusión de este exón en presencia de inhibidores de la elongación, y también en levaduras que llevan una mutación que vuelve “lenta” a la Pol II (Howe et al., 2003). Esto apoya la hipótesis de que el equilibrio entre la exclusión y la inclusión del exón está modulado por las tasas relativas de formación del “spliceosoma” y la procesividad de la Pol II.

La regulación del splicing alternativo por factores que actúan en *trans* también depende de la presencia de sitios subóptimos de splicing. La proteína TRA-2 es regulada en la línea germinal de los machos de *Drosophila* a través de un mecanismo de *feedback* negativo en el cual una isoforma específica de TRA-2 reprime el splicing del intrón M1 en el pre-mRNA de TRA-2. Esta represión depende de la presencia de un sitio de splicing 3' débil. La sustitución de este sitio por un sitio fuerte provoca que el splicing se vuelva independiente de TRA-2. Esto implica que la baja eficiencia del splicing es importante para que exista regulación (Chandler et al., 2001).

El modo en que la fuerza de los sitios de splicing puede ser modulada *in vivo* es a través de la unión diferencial de proteínas SR a enhancers de splicing exónicos (ESEs). En este contexto es posible especular, desde un punto de vista evolutivo, que la aparición de los ESEs no sólo compensa a las mutaciones que debilitan los sitios de splicing, sino que también permite una sintonía fina de la regulación del splicing a través del control simultáneo de la abundancia de las proteínas SR y la modulación de la elongación transcripcional. Esta estrategia de regulación dual parece otorgar una

ventaja adaptativa a los metazoos, en los cuales los intrones son normalmente más largos que en otros eucariotas y donde los sitios de splicing y las secuencias de los *branch points* se encuentran altamente degenerados.

10. Perspectivas

El splicing alternativo es un importante mecanismo generador de diversidad en los metazoos. El splicing alternativo del exón EDI del gen de la fibronectina está controlado por la procesividad de la Pol II y por la unión del factor de splicing SF2/ASF al enhancer de splicing exónico (ESE) que se encuentra en el EDI. En esta tesis, pusimos a prueba en *cis* nuestro modelo de elongación, al fortalecer el sitio de splicing 3' subóptimo. Recientemente, este modelo también fue puesto a prueba en *trans*, al observar el efecto que tiene la transcripción mediada por una Pol II "lenta" sobre el splicing alternativo (de la Mata et al., 2003). En este caso, la transcripción mediada por la Pol II "lenta" no sólo inhibe la exclusión de EDI, sino que afecta también al splicing alternativo de otros genes como el de E1a de adenovirus y el de Ultrabithorax de *Drosophila*.

Actualmente, nuestro grupo continúa con el estudio de este tema. Juan Pablo Fededa preparó minigenes que contienen dos regiones EDI dispuestas en tándem bajo el control de un único promotor. Los resultados preliminares indican que el splicing alternativo del EDI más cercano al promotor influencia al splicing alternativo del EDI más lejano. Este efecto tiene una polaridad, ya que la disrupción del ESE del EDI más lejano no afecta el splicing del primer EDI, lo que sugiere una fuerte dependencia de la transcripción.

Por otra parte, el coactivador transcripcional CA150 provoca una disminución de la elongación transcripcional al interactuar con el CTD de la Pol II. Manuel Muñoz obtuvo resultados preliminares consistentes con nuestro modelo, al observar que la sobreexpresión de CA150 causa un aumento de la inclusión de EDI de unas 4 veces. Paradójicamente, la reducción de los niveles endógenos de CA150 por la utilización de RNAi también aumenta la inclusión de EDI, lo que indicaría que esta proteína posee actividades duales.

11. Para concluir...

En esta tesis, nos enfocamos en el estudio de la regulación del splicing alternativo del exón EDI del gen de la fibronectina humana, que responde claramente al control transcripcional. Sin embargo, es interesante remarcar que no todos los exones alternativos responden de esta manera. Dentro del mismo gen de fibronectina, el splicing del exón EDII o EDB no es afectado por el cambio del promotor que dirige la transcripción ni por la activación por factores de transcripción. Tampoco es influenciado por la Pol II que lleva la mutación C4 y que se comporta como una polimerasa “lenta”. Sin embargo, el splicing de este exón no es insensible a todo tipo de influencia, ya que sí es capaz de responder a la sobreexpresión de la proteína SR Srp40 (Du et al., 1997). Esto muestra que el control del splicing alternativo por parte de las proteínas SR puede coexistir o no con el control transcripcional.

Por otra parte, la respuesta del splicing alternativo a la elongación transcripcional puede depender no sólo de factores que afectan la procesividad de la Pol II en general, como por ejemplo la organización cromatínica (Kadener et al., 2001), la acetilación de histonas (Nogués et al., 2002), o la fosforilación del CTD (Nogués et al., 2002), sino también de la arquitectura de pausado, es decir, del número, fuerza y distribución de las pausas transcripcionales a lo largo del molde de DNA (Roberts et al., 1998), y de la presencia de intrones largos en las regiones que sufren splicing alternativo (Hatton et al., 1998).

Estamos interesados en continuar con el estudio de la regulación del splicing alternativo, extendiéndonos a otros sistemas e incorporando nuevas técnicas. En particular, queremos estudiar la regulación del splicing de otros exones alternativos que no respondan al modelo de *exon skipping*. Además, queremos comprender la importancia de la cromatina en esta regulación, para lo cual nos abocaremos al estudio de genes endógenos. Por último, creemos que es indispensable investigar esto en un contexto más celular, donde podamos abordar el estudio de a qué se deben las diferencias observadas en distintos tipos celulares, a qué señales externas e internas

responde fisiológicamente el splicing y, finalmente, cómo son regulados tan finamente estos mecanismos en la célula.

BIBLIOGRAFÍA

Akoulitchev, S., Makela, T. P., Weinberg, R. A., y Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 377, 557-560.

Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S. M., y O'Malley, B. W. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298, 416-419.

Banks, R. E., Dunn, M. J., Hochstrasser, D. F., Sánchez, J. C., Blackstock, W., Pappin, D. J., y Selby, P. J. (2000). Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 356, 1749-1756.

Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., y Peterlin, B. M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 8, 327-337.

Bentley, D. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* 11, 347-351.

Bentley, D. (2002). The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr Opin Cell Biol* 14, 336-342.

Berglund, J. A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., y Rosbash, M. (1997). The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* 89, 781-787.

Beyer, A. L., y Osheim, Y. N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev* 2, 754-765.

Black, D. L. (2000). Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 103, 367-370.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336.

- Blau, J., Xiao, H., McCracken, S., O'Hare, P., Greenblatt, J., y Bentley, D. (1996). Three functional classes of transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 16, 2044-2055.
- Blencowe, B. J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25, 106-110.
- Brown, S. A., Weirich, C. S., Newton, E. M., y Kingston, R. E. (1998). Transcriptional activation domains stimulate initiation and elongation at different times and via different residues. *EMBO J* 17, 3146-3154.
- Buvoli, M., Mayer, S. A., y Patton, J. G. (1997). Functional crosstalk between exon enhancers, polypyrimidine tracts and branchpoint sequences. *EMBO J* 16, 7174-7183.
- Cáceres, J. F., y Kornblihtt, A. R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18, 186-193.
- Cáceres, J. F., Misteli, T., Sreaton, G. R., Spector, D. L., y Krainer, A. R. (1997). Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol* 138, 225-238.
- Caputi, M., Casari, G., Guenzi, S., Tagliabue, R., Sidoli, A., Melo, C. A., y Baralle, F. E. (1994). A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acids Res* 22, 1018-1022.
- Cereghini, S., y Yaniv, M. (1984). Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication. *EMBO J* 3, 1243-1253.
- Chabot, B., Bisotto, S., y Vincent, M. (1995). The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* 23, 3206-3213.
- Chandler, D. S., McGuffin, M. E., y Mattox, W. (2001). Functionally antagonistic sequences are required for normal autoregulation of *Drosophila* tra-2 pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 29, 3012-3019.

- Chiang, C. M., Roeder, R. G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531-536.
- Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R., y Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.
- Chodosh, L. A., Fire, A., Samuels, M., y Sharp, P. A. (1989). 5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *J Biol Chem* 264, 2250-2257.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A., y Conaway, R. C. (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 25, 375-380.
- Cooper, T. A., y Mattox, W. (1997). The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am J Hum Genet* 61, 259-266.
- Corden, J. L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 15, 383-387.
- Cox, J. M., Kays, A. R., Sanchez, J. F., y Schepartz, A. (1998). Preinitiation complex assembly: potentially a bumpy path. *Curr Opin Chem Biol* 2, 11-17.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., y Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.
- Cramer, P., Cáceres, J. F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A. F., Baralle, F. E., y Kornblihtt, A. R. (1999). Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 4, 251-258.
- Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., y Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11456-11460.

- Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 271, 19009-19012.
- de la Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., y Kornblihtt, A. R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell* 12, 525-532.
- Dower, K., y Rosbash, M. (2002). T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export. *RNA* 8, 686-697.
- Du, K., Peng, Y., Greenbaum, L. E., Haber, B. A., y Taub, R. (1997). HRS/SRp40-mediated inclusion of the fibronectin EIIIB exon, a possible cause of increased EIIIB expression in proliferating liver. *Mol Cell Biol* 17, 4096-4104.
- Du, L., y Warren, S. L. (1997). A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 136, 5-18.
- Dundr, M., y Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356, 297-310.
- Eperon, L. P., Graham, I. R., Griffiths, A. D., y Eperon, I. C. (1988). Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? *Cell* 54, 393-401.
- Fong, N., y Bentley, D. L. (2001). Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD. *Genes Dev* 15, 1783-1795.
- Fong, Y. W., y Zhou, Q. (2001). Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* 414, 929-933.
- Gall, J. G. (2001). A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett* 498, 164-167.
- Gautheret, D., Poirot, O., López, F., Audic, S., y Claverie, J. M. (1998). Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. *Genome Res* 8, 524-530.

- Ge, H., Si, Y., y Wolffe, A. P. (1998). A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell* 2, 751-759.
- Gerber, H. P., Hagmann, M., Seipel, K., Georgiev, O., West, M. A., Litingtung, Y., Schaffner, W., y Corden, J. L. (1995). RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* 374, 660-662.
- Gerber, M., y Shilatifard, A. (2003). Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J Biol Chem* 278, 26303-26306.
- Goldstrohm, A. C., Greenleaf, A. L., y Garcia-Blanco, M. A. (2001). Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene* 277, 31-47.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197-1211.
- Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17, 100-107.
- Green, M. R., Maniatis, T., y Melton, D. A. (1983). Human beta-globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in *Xenopus* oocyte nuclei. *Cell* 32, 681-694.
- Gronostajski, R. M. (2000). Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249, 31-45.
- Gruss, C., Gutiérrez, C., Burhans, W. C., DePamphilis, M. L., Koller, T., y Sogo, J. M. (1990). Nucleosome assembly in mammalian cell extracts before and after DNA replication. *EMBO J* 9, 2911-2922.
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 465-503.
- Hampsey, M., y Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429-432.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

- Hatton, A. R., Subramaniam, V., y Lopez, A. J. (1998). Generation of alternative Ultrabithorax isoforms and stepwise removal of a large intron by resplicing at exon-exon junctions. *Mol Cell* 2, 787-796.
- Hirose, Y., y Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* 14, 1415-1429.
- Hirose, Y., Tacke, R., y Manley, J. L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 13, 1234-1239.
- Hoffman, B. E., y Grabowski, P. J. (1992). U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon. *Genes Dev* 6, 2554-2568.
- Howe, K. J., Kane, C. M., y Ares, M. Jr. (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9, 993-1006.
- Ikeda, K., Steger, D. J., Eberharter, A., y Workman, J. L. (1999). Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* 19, 855-863.
- Jiménez-García, L. F., y Spector, D. L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogués, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J. P., Werbajh, S. E., Srebrow, A., y Kornblihtt, A. R. (2001). Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J* 20, 5759-5768.
- Kadener, S., Fededa, J. P., Rosbash, M., y Kornblihtt, A. R. (2002). Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8185-8190.
- Kamine, J., y Chinnadurai, G. (1992). Synergistic activation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the viral Tat protein and cellular transcription factor Sp1. *J Virol* 66, 3932-3936.

- Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., y Peterlin, B. M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330, 489-493.
- Karn, J. (1999). Tackling Tat. *J Mol Biol* 293, 235-254.
- Keegan, L. P., Gallo, A., y O'Connell, M. A. (2001). The many roles of an RNA editor. *Nat Rev Genet* 2, 869-878.
- Kim, J. B., y Sharp, P. A. (2001). Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem* 276, 12317-12323.
- Kim, J. B., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., y Sharp, P. A. (1999). Tat-SF1 protein associates with RAP30 and human SPT5 proteins. *Mol Cell Biol* 19, 5960-5968.
- Kohrer, K., Vogel, K., y Domdey, H. (1990). A yeast tRNA precursor containing a pre-mRNA intron is spliced via the pre-mRNA splicing mechanism. *EMBO J* 9, 705-709.
- Komarnitsky, P., Cho, E. J., y Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14, 2452-2460.
- Lai, M. C., Teh, B. H., y Tarn, W. Y. (1999). A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem* 274, 11832-11841.
- Lavigueur, A., La Branche, H., Kornblihtt, A. R., y Chabot, B. (1993). A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev* 7, 2405-2417.
- Licatalosi, D. D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J. B., y Bentley, D. L. (2002). Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Mol Cell* 9, 1101-1111.

- Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., y Flores, O. (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* *11*, 2633-2644.
- Maniatis, T., y Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* *416*, 499-506.
- Maniatis, T., y Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* *418*, 236-243.
- Marciniak, R. A., y Sharp, P. A. (1991). HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J* *10*, 4189-4196.
- Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., y Price, D. H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* *271*, 27176-27183.
- Marshall, N. F., y Price, D. H. (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* *12*, 2078-2090.
- Marshall, N. F., y Price, D. H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* *270*, 12335-12338.
- Martínez, E., Palhan, V. B., Tjernberg, A., Lymar, E. S., Gamper, A. M., Kundu, T. K., Chait, B. T., y Roeder, R. G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylation transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* *21*, 6782-6795.
- Mayeda, A., Helfman, D. M., y Krainer, A. R. (1993). Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol* *13*, 2993-3001.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., y Bentley, D. L. (1997a). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* *11*, 3306-3318.

- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., y Bentley, D. L. (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.
- Michels, A. A., Nguyen, V. T., Fraldi, A., Labas, V., Edwards, M., Bonnet, F., Lania, L., y Bensaude, O. (2003). MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol* 23, 4859-4869.
- Misteli, T., Cáceres, J. F., Clement, J. Q., Krainer, A. R., Wilkinson, M. F., y Spector, D. L. (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J Cell Biol* 143, 297-307.
- Misteli, T., Cáceres, J. F., y Spector, D. L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527.
- Misteli, T., y Spector, D. L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3, 697-705.
- Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., y Spiegelman, B. M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 6, 307-316.
- Moore, M. J. (2000). Intron recognition comes of AGE. *Nat Struct Biol* 7, 14-16.
- Moore, M. J., y Sharp, P. A. (1993). Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* 365, 364-368.
- Moreland, R. J., Tirode, F., Yan, Q., Conaway, J. W., Egly, J. M., y Conaway, R. C. (1999). A role for the TFIIF XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 274, 22127-22130.
- Morris, D. P., y Greenleaf, A. L. (2000). The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275, 39935-39943.
- Muro, A. F., Iaconcig, A., y Baralle, F. E. (1998). Regulation of the fibronectin EDA exon alternative splicing. Cooperative role of the exonic enhancer element and the 5' splicing site. *FEBS Lett* 437, 137-141.

- Nahreini, P., y Mathews, M. B. (1995). Effects of the simian virus 40 origin of replication on transcription from the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* 69, 1296-1301.
- Neely, K. E., Hassan, A. H., Wallberg, A. E., Steger, D. J., Cairns, B. R., Wright, A. P., y Workman, J. L. (1999). Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol Cell* 4, 649-655.
- Neugebauer, K. M. (2002). On the importance of being co-transcriptional. *J Cell Sci* 115, 3865-3871.
- Nogués, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., y Kornblihtt, A. R. (2002). Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J Biol Chem* 277, 43110-43114.
- Nogués, G., Muñoz, M. J., y Kornblihtt, A. R. (2003). Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength. *J Biol Chem* 278, 52166-52171.
- Nguyen, V. T., Giannoni, F., Dubois, M. F., Seo, S. J., Vigneron, M., Keding, C., y Bensaude, O. (1996). In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* 24, 2924-2929.
- Nguyen, V. T., Kiss, T., Michels, A. A., y Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322-325.
- Padgett, R. A., Hardy, S. F., y Sharp, P. A. (1983). Splicing of adenovirus RNA in a cell-free transcription system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5230-5234.
- Pagani, F., Stuani, C., Zuccato, E., Kornblihtt, A. R., y Baralle, F. E. (2003). Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping. *J Biol Chem* 278, 1511-1517.
- Parada, C. A., y Roeder, R. G. (1999). A novel RNA polymerase II-containing complex potentiates Tat-enhanced HIV-1 transcription. *EMBO J* 18, 3688-3701.

- Patturajan, M., Wei, X., Berezney, R., y Corden, J. L. (1998). A nuclear matrix protein interacts with the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 18, 2406-2415.
- Peng, J., Marshall, N. F., y Price, D. H. (1998a). Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb. *J Biol Chem* 273, 13855-13860.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J. T., y Price, D. H. (1998b). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12, 755-762.
- Phair, R. D., y Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-609.
- Ping, Y. H., y Rana, T. M. (1999). Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes. *J Biol Chem* 274, 7399-7404.
- Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 20, 2629-2634.
- Price, D. H., Sluder, A. E., y Greenleaf, A. L. (1989). Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor y RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 9, 1465-1475.
- Proudfoot, N. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 25, 290-293.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., y Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., y Sherr, C. J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- Ramanathan, Y., Rajpara, S. M., Reza, S. M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M. B., y Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem* 276, 10913-10920.
- Rana, T. M., y Jeang, K. T. (1999). Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* 365, 175-185.

- Reed, R. (1996). Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev* 6, 215-220.
- Reines, D., Conaway, J. W., y Conaway, R. C. (1996). The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem Sci.* 21, 351-355.
- Robberson, B. L., Cote, G. J., y Berget, S. M. (1990). Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* 10, 84-94.
- Roberts, G. C., Gooding, C., Mak, H. Y., Proudfoot, N. J., y Smith, C. W. (1998). Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res* 26, 5568-5572.
- Roca, X., Sachidanandam, R., y Krainer, A. R. (2003). Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res* 31, 6321-6333.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2000). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., y Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-2440.
- Sehgal, P. B., Darnell, J. E., Jr., y Tamm, I. (1976). The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 9, 473-480.
- Shen, F., Triezenberg, S. J., Hensley, P., Porter, D., y Knutson, J. R. (1996). Transcriptional activation domain of the herpesvirus protein VP16 becomes conformationally constrained upon interaction with basal transcription factors. *J Biol Chem* 271, 4827-4837.
- Sisodia, S. S., Sollner-Webb, B., y Cleveland, D. W. (1987). Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. *Mol Cell Biol* 7, 3602-3612.

Sleeman, J. E., y Lamond, A. I. (1999). Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol* 9, 1065-1074.

Smale, S. T., y Tjian, R. (1985). Transcription of herpes simplex virus tk sequences under the control of wild-type and mutant human RNA polymerase I promoters. *Mol Cell Biol* 5, 352-362.

Southgate, C. D., y Green, M. R. (1991). The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev* 5, 2496-2507.

Sune, C., y García-Blanco, M. A. (1999). Transcriptional cofactor CA150 regulates RNA polymerase II elongation in a TATA-box-dependent manner. *Mol Cell Biol* 19, 4719-4728.

Suske, G. The Sp-family of transcription factors. (1999). *Gene* 238, 291-300.

Tacke, R., y Manley, J. L. (1995). The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *EMBO J* 14, 3540-3551.

Tacke, R., y Manley, J. L. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol* 11, 358-362.

Tamm, I., Kikuchi, T., Darnell, J. E., Jr., y Salditt-Georgieff, M. (1980). Short capped hnRNA precursor chains in HeLa cells: continued synthesis in the presence of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole. *Biochemistry* 19, 2743-2748.

Taube, R., Fujinaga, K., Wimmer, J., Barboric, M., y Peterlin, B. M. (1999). Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology* 264, 245-253.

Tirode, F., Busso, D., Coin, F., y Egly, J. M. (1999). Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell* 3, 87-95.

Travers, A. (1999). Chromatin modification by DNA tracking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13634-13637.

Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A. J., y Verdine, G. L. (1997). Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science* 277, 1310-1313.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Vignali, M., Steger, D. J., Neely, K. E., y Workman, J. L. (2000). Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J* 19, 2629-2640.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., *et al.* (1998a). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12, 343-356.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., y Handa, H. (1998b). Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J* 17, 7395-7403.

Walker, S., Greaves, R., y O'Hare, P. (1993). Transcriptional activation by the acidic domain of Vmw65 requires the integrity of the domain and involves additional determinants distinct from those necessary for TFIIB binding. *Mol Cell Biol* 13, 5233-5244.

Wen, Y., y Shatkin, A. J. (1999). Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* 13, 1774-1779.

Williams, R. D., Lee, B. A., Jackson, S. P., y Proudfoot, N. J. (1996). Activation domains of transcription factors mediate replication dependent transcription from a minimal HIV-1 promoter. *Nucleic Acids Res* 24, 549-557.

Wimmer, J., Fujinaga, K., Taube, R., Cujec, T. P., Zhu, Y., Peng, J., Price, D. H., y Peterlin, B. M. (1999). Interactions between Tat and TAR and human

immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b. *Virology* 255, 182-189.

Wu, J. Y., y Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 1061-1070.

Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., y Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41-51.

Yan, Q., Moreland, R. J., Conaway, J. W., y Conaway, R. C. (1999). Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 274, 35668-35675.

Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K., y Zhou, Q. (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 414, 317-322.

Yankulov, K., y Bentley, D. (1998). Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation. *Curr Biol* 8, R447-449.

Yankulov, K., Blau, J., Purton, T., Roberts, S., y Bentley, D. L. (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell* 77, 749-759.

Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R. V., Gentile, C., Gebara, M., y Corden, J. L. (1996). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6975-6980.

Zawel, L., Kumar, K. P., y Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 9, 1479-1490.

Zeng, C., y Berget, S. M. (2000). Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 20, 8290-8301.

Zhang, G., Taneja, K. L., Singer, R. H., y Green, M. R. (1994). Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.

Zhang, M. Q. (1998). Statistical features of human exons y their flanking regions. *Hum Mol Genet* 7, 919-932.

Zhou, M., Halanski, M. A., Radonovich, M. F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D. H., y Brady, J. N. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol.* 20, 5077-86.

Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P., y Reed, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419, 182-185.

Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B., y Price, D. H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* 11, 2622-2632.