Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Regulación del splicing alternativo por la elongación de la ARN Polimerasa II

Lafaille, Celina

2013-11-29

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:
Lafaille, Celina. (2013-11-29). Regulación del splicing alternativo por la elongación de la ARN Polimerasa II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Lafaille, Celina. "Regulación del splicing alternativo por la elongación de la ARN Polimerasa II". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-11-29.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Regulación del *splicing* alternativo por la elongación de la ARN Polimerasa II

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Celina Lafaille

Director de tesis: **Dr. Alberto Rodolfo Kornblihtt**

Consejero de Estudios: **Dr. Alberto Rodolfo Kornblihtt**

Lugar de trabajo: IFIBYNE-CONICET; FCEyN-UBA

Buenos Aires, 2013

Regulación del *splicing* alternativo por la elongación de la ARN polimerasa II

El *splicing* alternativo amplía las posibilidades de expresión génica a partir de un número limitado de genes. El *splicing* está funcionalmente acoplado a la transcripción, y la velocidad de elongación de la ARN Polimerasa II (Pol II) regula algunos eventos de *splicing* alternativo. Se postula que una menor velocidad de elongación favorece el reconocimiento de sitios débiles por la maquinaria de *splicing* antes de la síntesis de sitios fuertes competidores río abajo. El exón alternativo EDI de fibronectina está río abajo de un sitio 3' subóptimo y su inclusión aumenta en situaciones de baja elongación; esto puede deberse a que el reconocimiento del sitio débil antes de la síntesis del sitio fuerte en el intrón siguiente lleva a la escisión del intrón con el sitio débil, forzando la posterior inclusión. Aplicamos una estrategia para estudiar del orden de remoción de los intrones que rodean a un exón determinado. Estudiamos un exón con inclusión reprimida por elongación (EDI), un exón que baja su inclusión a menor elongación (CFTR9), un exón alternativo que no responde a elongación (EDII) y un exón constitutivo (E28). El orden de remoción de intrones se modifica según la línea celular, la presencia de mutaciones en *cis* o la abundancia diferencial de factores reguladores, pero no se modifica por cambios en la elongación asociados a cambios en la inclusión de EDI. Los resultados sugieren un nuevo mecanismo de regulación de la inclusión de CFTR9 y nos obligan a replantearnos nuestro modelo de regulación cinética de EDI. Aplicamos un método para medir la elongación de Pol II *in vivo* en genes particulares, y comprobamos que la camptotecina baja la velocidad de transcripción de fibronectina. Medimos el reclutamiento de U2AF65 al sitio débil de EDI y al sitio fuerte río abajo en células tratadas con camptotecina y en células control y observamos un aumento de la unión de U2AF65 al sitio débil con respecto a la unión al sitio fuerte en las células tratadas. Comprobamos así que una menor elongación favorece el reconocimiento por la maquinaria de *splicing* del sitio débil a expensas del sitio fuerte, y la posterior inclusión del exón independientemente de la cinética de remoción de intrones.

Palabras clave: *SPLICING* ALTERNATIVO – ARN POLIMERASA II – ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL – ORDEN DE REMOCIÓN DE INTRONES – U2AF65

Alternative splicing regulation by RNA Polymerase II elongation

Alternative splicing broadens the scope of genic expression from a limited set of genes. Splicing is functionally coupled to transcription, and the rate of RNA Polymerase II (Pol II) elongation modifies the outcome of some alternative splicing events. A hypothesis holds that slower elongation favours the recruitment of the splicing machinery to weak regulatory sites before the synthesis of strong competing sites downstream of them. Human fibronectin alternative exon EDI starts downstream of a suboptimal 3' splite site, and its inclusion is enhanced under slow elongation; this may be due to an enhanced recognition of the weak site before the strong site is synthetised, leading to the excision of the upstream intron harbouring the weak splice site and ultimately to exon inclusion. We have used a strategy for determining the order of intron removal around a particular exon. We have studied an exon with a level of inclusion inversely proportional to elongation (EDI), an exon with lower inclusion in slow elongation (CFTR9), an alternative exon unresponsive to elongation (EDII) and a constitutive exon (FN E28). The order of intron removal changes with cell line, cis mutations or regulatory factor abundance, but it is not modified by changes in elongation rate associated with EDI inclusion enhancement. Our intron removal experiments have suggested the existence of a new mechanism for CFTR9 inclusion and they have also made us rethink our model of EDI kinetic regulation. We have successfully applied a method for measuring Pol II elongation rates in vivo in any endogenous gene, and we have found that, as it was expected, camptothecin treatment slows transcription rate on the fibronectin gene. We have measured U2AF65 recruitment to the weak splice site upstream of EDI in camptothecin treated versus control cells and we have detected an increase of U2AF65 binding to the weak site compared to the strong site in camptothecin treated cells. In this way we have ascertained that slower elongation favours the recognition of the weak splice site at the expense of the strong splice site, thereby favouring exon inclusion independently of intron removal kinetics.

Key words: ALTERNATIVE SPLICING – RNA POLYMERASE II –TRANSCRIPTIONAL ELONGATION – ORDEN OF INTRON REMOVAL – U2AF65

Abreviaturas

ADNc	Ácido dexoxiribonucléico copia
ARNm	ARN mensajero
CPT	camptotecina
DRB	5,6-dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol
DMSO	dimetilsulfóxido
ESE	*Exonic Splicing Enhancer*
ESS	*Exonic Splicing Silencer*
ETR3	*Elav-type RNA-binding protein 3*
hnRNP	*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*
ISE	*Intronic Splicing Enhancer*
ISS	*Intronic Splicing Silencer*
kDa	kiloDalton
pb	pares de bases
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
Pol II	ARN Polimerasa II
PTB	*Polypyrimidine tract Binding Protein*
pY	polipirimidina
RRM	*Rna Recognition Motif*
RS	Arginina Serina
SC35	*Splicing Component, 35 kDa*
SF2	*Splicing Factor 2*
siRNA	*small interfering RNA*
snRNA	*small nuclear RNA*
snRNP	*small nuclear ribonucleoprotein*
TDP43	*transactive response DNA binding protein 43 kDa*
TIA1	*T-Cell-Restricted Intracellular Antigen-1*
TSA	Tricostatina A
U2AF	*U2 Auxiliary Factor*

Índice

Introducción 1

1.1 El *Splicing* alternaltivo 1

1.2 Proteínas SR y hnRNP 5

1.3 Rol de Pol II en la regulación del procesamiento del pre-ARNm 7

1.4 Acoplamiento entre transcripción y *splicing* 7

1.5 El modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo 9

1.6 Regulación cinética del *splicing* alternativo en el gen de fibronectina 9

Objetivos 12

2.1 Objetivo General 12

2.2 Objetivos Específicos 12

Materiales y Métodos 13

3.1 Plásmidos 13

Minigenes reporteros de *splicing*: 13

Vectores para la sobreexpresión de factores de *splicing* o para la expresión de polimerasas mutantes 14

Preparación de plásmidos 15

Cuantificación de los plásmidos 15

Transformación de bacterias 15

3.2 Cultivo celular 16

Líneas celulares 16

Transfecciones con ADN 16

Transfecciones con ARN 17

Ensayos de *splicing* y orden de remoción de intrones con minigenes 17

3.3 Análisis del ARN 19

Purificación de ARN 19

Transcripción reversa (RT) 20

Análisis de la inclusión de distintos exones por RT-PCR 21

Análisis del orden de remoción de intrones..... 23

3.4 Medida de la elongación de Pol II 26

3.5 Experimentos de *RNA IP* 27

Creación de entrecruzamientos y lisado de las células 27

Fragmentación del ARN 28

Inmunoprecipitación 28

Cuantificación..... 29

Constatación de la inmunoprecipitación por *Western Blot*..... 29

Resultados 30

4.1 Orden de remoción de intrones: EDI 30

El orden de remoción de intrones alrededor de EDI se modifica en en minigenes con mutaciones que aumentan la inclusión. 32

La posición de EDI en el minigén no modifica el orden de remoción de intrones..... 33

El orden de remoción de intrones alrededor de EDI se modifica por la sobreexpresión o el silenciamiento de distintas proteínas SR 35

Distintos tratamientos que modifican la elongación de Pol II modifican el orden de remoción de intrones independientemente del efecto sobre el *splicing* de EDI 37

La transcripción por una RNA polimerasa lenta aumenta la inclusión de EDI sin alterar el orden de remoción de intrones..... 39

4.2 Orden de remoción de intrones en un exón alternativo insensible a la elongación: EDII 41

4.3 Orden de remoción de intrones en un exón constitutivo: FN E28..... 44

4.4 Orden de remoción de intrones en un exón alternativo de regulación cinética inversa: CFTR9 46

El orden de remoción de intrones se modifica en las distintas variantes del polimorfismo (TG)n Tm..... 47

La sobreexpresión de distintos reguladores de la inclusión de CFTR9 modifica el orden de remoción de intrones 47

4.5 Medida de la elongación de Pol II *in vivo* 51

La camptotecina disminuye la elongación de Pol II en el gen de fibronectina 54

La velocidad de transcripción en el gen de fibronectina es similar en las líneas celulares Hep3B y HCT116 56

4.6 Elongación de Pol II y Reclutamiento de U2AF65 58

Discusión 66

5.1 Medida de la elongación de Pol II 66

5.2 Orden de remoción de intrones 67

Orden de remoción de intrones según la línea celular, la mutación de secuencias reguladoras en *cis* y la expresión de distintos factores de *splicing* 68

Orden de remoción de intrones y elongación de RNA Polimerasa II 72

5.3 Reclutamiento de U2AF65 al sitio 3' río arriba de EDI en distintas condiciones de elongación transcripcional 74

Bibliografía 77

Introducción

1.1 El *Splicing* alternativo

La expresión de los genes que codifican proteínas es un proceso complejo y regulado en múltiples niveles. En las células eucariotas los genes codificadores de proteínas son transcriptos por la enzima ARN Polimerasa II (Pol II), y los transcriptos primarios o pre-ARNm deben ser procesados antes de ser exportados al citoplasma y traducidos. El extremo 5' de la molécula naciente es modificado por la adición de una caperuza que la protege de la degradación por exonucleasas, y del mismo modo el extremo 3' es protegido por una cola de poliA que es sintetizada río abajo de un sitio de corte. La maduración del pre-ARNm incluye también la eliminación de determinadas secuencias intercaladas en la molécula precursora, llamadas intrones, y el empalme de los tramos de secuencia que formarán el mensajero final, llamados exones. Este proceso de corte y empalme, llamado *splicing*, ocurre a través de dos reacciones de transesterificación: en la primera la unión fosfodiéster entre el último nucleótido del exón precedente y el primero del intrón es atacada por el grupo hidroxilo 2' de una adenosina particular en el intrón, generando un lazo en el intrón y un extremo libre en el exón río arriba; en la segunda el grupo hidroxilo 3' que forma el nuevo extremo libre de este exón ataca la unión fosfodiéster que marca el extremo 3' del intrón, uniendo ambos exones y liberando el intrón en forma de lazo (figura I1).

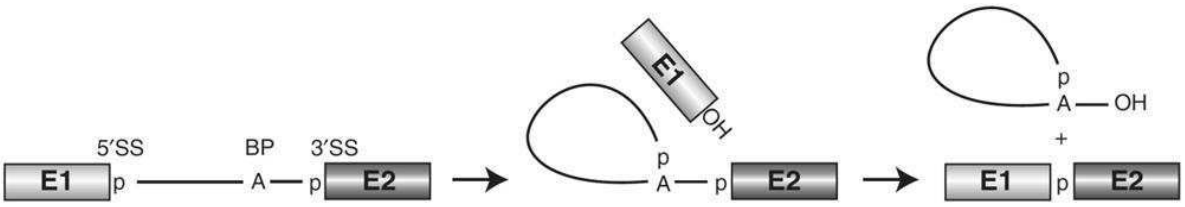

Figura I1. Reacción de *splicing*. Los rectángulos E1 y E2 representan exones y la línea que los une representa el intrón entre ambos. 5'SS: sitio 5' o dador; 3' SS: sitio 3' o aceptor; BP: sitio de ramificación; A: residuo de adenosina; p: fosfato. La adenosina ataca nucleofílicamente el fosfato entre el exón E1 y el intrón, dando lugar a una estructura de lazo en el intrón y un extremo 3'-OH en el exón río arriba (centro), que a su vez ataca nucleofílicamente el fosfato entre el intrón y el exón río abajo, liberando el intrón y uniendo ambos exones por un nuevo enlace fosfodiéster (derecha). Tomado de Will y Lührmann 2011.

Los dos pasos que llevan a la escisión del intrón y unión de los exones son catalizados por un megacomplejo en el que participan distintas proteínas y snRNPs, el "spliceosoma". Cada uno de los snRNPs es a su vez un complejo de siete proteínas y un ARN nuclear pequeño o snRNA. El spliceosoma no forma una organela estable, sino que los distintos módulos que lo componen se ensamblan siguiendo una serie de pasos a medida que reconocen distintas secuencias reguladoras en los intrones: el sitio 5' o dador, el sitio de ramificación, que contiene la adenosina que forma enlace con el primer nucleótido del intrón cerrando el lazo, y el sitio 3' o aceptor, que incluye el trecho de polipirimidinas y el dinucleótido AG (figura I2 A).

El primer paso en el ensamblado del spliceosoma es el reconocimiento del sitio 5' por el snRNP U1: el snRNA U1 forma pares de bases con la secuencia GURAGU que marca el comienzo de cada intrón y la unión es estabilizada por las proteínas del subcomplejo. Posteriormente el sitio 3' es reconocido por el heterodímero proteico U2AF (*U2 Auxiliary Factor*): la subunidad U2AF35 se une al dinucleótido AG que marca el extremo 3' del intrón y la subunidad U2AF65 se une a la secuencia rica en polipirimidinas río arriba. Al mismo tiempo el sitio de ramificación es reconocido por la proteína SF1, cuya unión al ARN es estabilizada por interacciones con U2AF65. Todas estas interacciones definen el complejo E (por *early*: temprano), en el cual los sitios 5' y 3' ya están yuxtapuestos (Kent y MacMillan 2002). El siguiente paso es la unión estable del snRNP U2 al sitio de ramificación desplazando a SF1; este paso es dependiente de ATP y marca la formación del complejo A. Luego se incorpora el snRNP U4/U6, único snRNP con dos moléculas de ARN, unido al snRNP U5. El complejo B resultante es catalíticamente inactivo y sufre rearreglos que incluyen la pérdida de U4 y U1; el complejo B* así modificado cataliza la primera reacción de transesterificación y se transforma en el complejo C. Nuevas modificaciones son necesarias para reposicionar los exones para el segundo ataque nucleofílico; una vez completada la reacción el complejo C se disocia liberando sus componentes. Estos pasos están esquematizados en la figura I2 B, tomada de Will y Lührmann 2010.

Existen modelos alternativos para las etapas iniciales de ensamblado del spliceosoma. El intrón promedio de *S. cerevisiae* ronda los 100 nucleótidos de largo (Spingola et al. 1999), y además las secuencias reguladoras de *splicing* están altamente conservadas; de esta manera se facilita el reconocimiento de los extremos de un mismo intrón por la maquinaria de *splicing*. En contraste, el intrón promedio de los vertebrados está en el orden de las kilobases (Gelfman et al. 2012) y está definido por secuencias reguladoras altamente degeneradas; los componentes del spliceosoma tienen que reconocer señales cortas y poco conservadas dentro de una larga secuencia en la que abundan los sitios crípticos (Wieringa et al. 1983). El mecanismo de definición exónica, por el cual la maquinaria de *splicing* reconoce los límites de un exón, permite sortear esta dificultad (Robberson et al. 1989). En los vertebrados los exones son generalmente muy cortos; el reconocimiento del extremo 3'de un exón (el sitio 5' del intrón río abajo) por U1 promueve la asociación de U2AF en el sitio 3' del intrón río arriba mediante interacciones con proteínas de la familia SR unidas a secuencias exónicas. Un aumento del largo del exón anula estas interacciones y disminuye la utilización del sitio 3' río arriba.

De esta manera se favorece el reconocimiento de un subconjunto de los posibles sitios reguladores de *splicing* a través de interacciones entre la maquinaria de *splicing* a ambos extremos de un exón. Una vez reconocidos los sitios se establecen las relaciones entre U1 y U2 en un mismo intrón; este paso de la definición exónica a la definición intrónica no está bien comprendido.

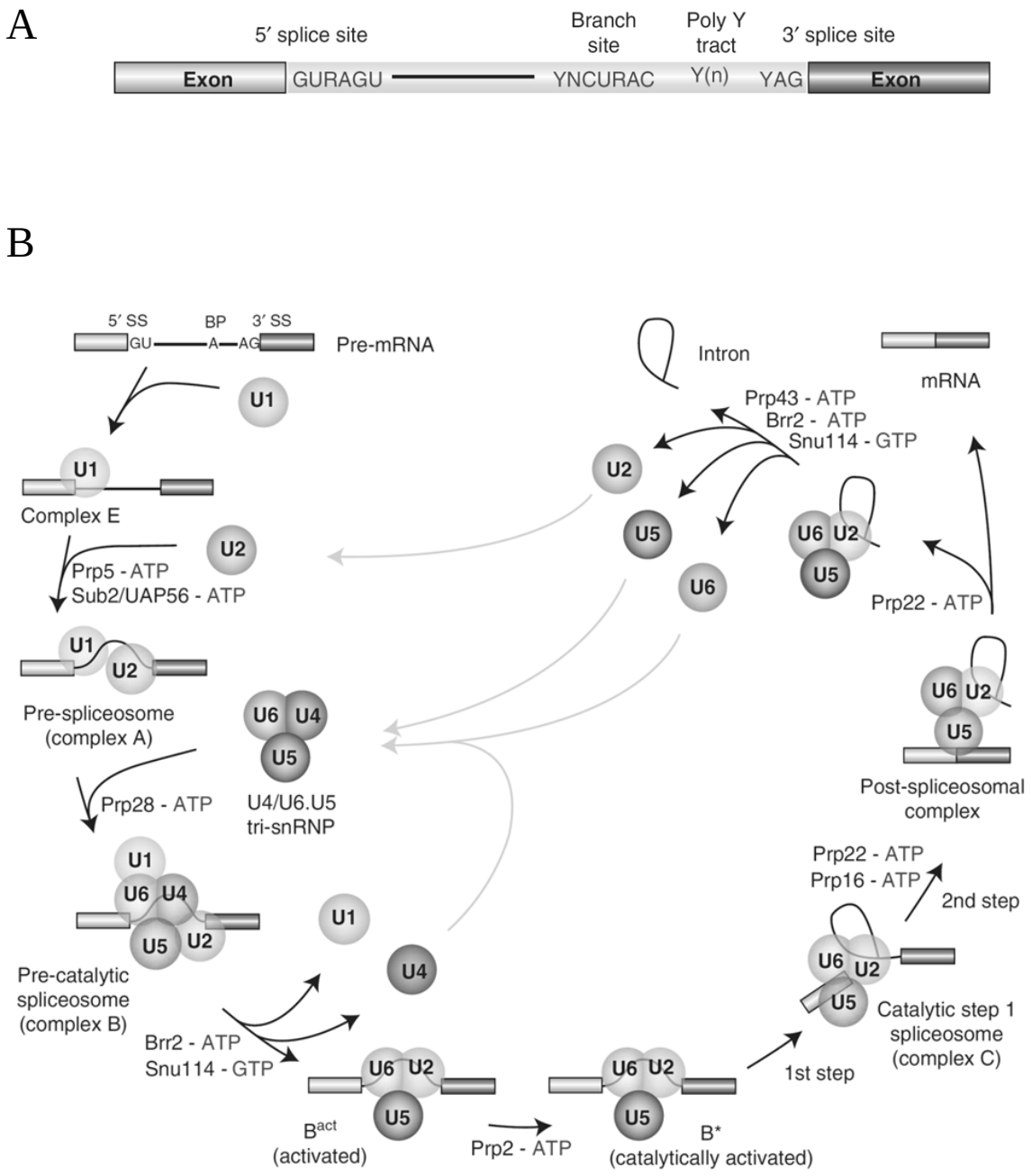

Figura I2. A: secuencias reguladoras del *splicing* para un intrón de vertebrados. 5' *splice site*: sitio 5' o dador; *branch site*: sitio de ramificación; *poly Y tract*: trecho de polipirimidinas; *3' splice site*: sitio 3' o aceptor. B: ciclo de ensamblado del spliceosoma y catálisis del *splicing*. Los distintos pasos se explican en la página previa. Tomado de Will y Lührmann 2011.

Aunque en su mayor parte los exones son incluidos en el ARNm de forma constitutiva, algunos exones en particular pueden ser excluidos, en su totalidad o parcialmente a través del uso de sitios 5' o 3' alternativos, en algunas de las moléculas de ARNm; del mismo modo algunos intrones pueden ser retenidos en el producto final (figura I3). Estas vías alternativas de *splicing* producen distintas especies de ARNm que se traducen en proteínas con diferencias de secuencia, potencialmente afectando su localización celular, estabilidad o función biológica; además el *splicing* alternativo puede originar diferentes secuencias 5' o 3' no traducidas, que afectan la estabilidad o localización de las moléculas de ARNm en sí mismas, o causar un corrimiento del marco de lectura, creando codones de stop prematuros que determinan su degradación por la vía NMD (*Nonsense Mediated Decay*), una vía que elimina específicamente mensajeros con codones de stop río arriba del exón terminal (Chang et al. 2007).

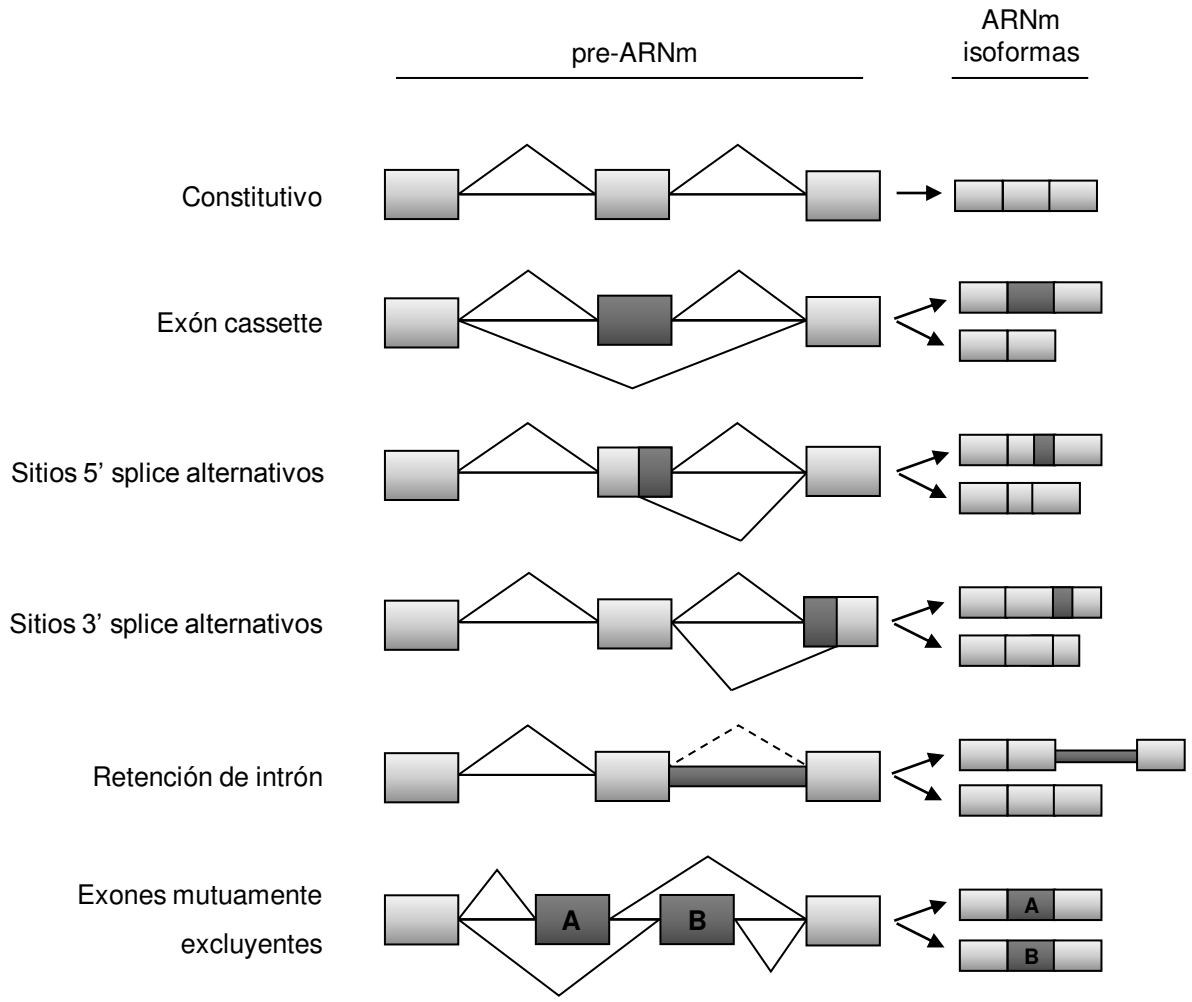

Figura I3. Distintas variedades de *splicing* alternativo. Las líneas horizontales representan los intrones, y las líneas diagonales unen las secuencias exónicas que van a ser ligadas; a la derecha se muestran las isoformas resultantes. Gris claro: segmentos de inclusión constitutiva; gris oscuro: segmentos alternativos. Tomado de Srebrow y Kornblihtt 2006.

La maquinaria celular hace uso de estas posibilidades de regulación de la expresión génica modificando el resultado de las reacciones de *splicing* ante estímulos determinados o durante el progreso por el ciclo celular; y en organismos multicelulares según el tejido o el estadío en el desarrollo. La regulación de las cantidades de las distintas isoformas debe ser lo suficientemente precisa como para asegurar la proporción adecuada en cada situación. Una estimación basada en el número de genes en *D. melanogaster* y en *C. elegans* predecía que un mamífero con un sistema nervioso complejo albergaría unos 80 000 genes (Spring 1997), sin embargo la secuenciación y anotación del genoma humano ha arrojado un número de 23 000 genes para nuestra especie (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004). La capacidad que brinda el *splicing* alternativo de codificar distintos polipéptidos a partir de un mismo gen unida al hecho de que más del 90% los genes humanos sufre *splicing* alternativo (Pan et al. 2008; Wang et al. 2008) señala la importancia de este proceso en la expansión del proteoma en organismos complejos.

1.2 Proteínas SR y hnRNP

Se han descripto varios factores proteicos que participan en la regulación del *splicing* alternativo; entre ellos predominan dos grupos, la familia de proteínas SR y las llamadas hnRNPs.

Las proteínas SR poseen uno o dos dominios RRM de unión al RNA hacia el N terminal y un dominio rico en argininas y serinas, del que toman su nombre, en el C terminal; este dominio RS media las interacciones con otras proteínas incluyendo componentes del spliceosoma. Generalmente tienen un efecto positivo sobre la inclusión, aunque una misma proteína SR puede tener efectos contrarios en distintos eventos de *splicing*. En muchos casos las proteínas SR son reclutadas a secuencias exónicas llamadas ESE (por *Exonic Splicing Enhancers*), desde donde participan en la definición exónica tanto en eventos alternativos como constitutivos interactuando con U1 en el sitio 5' río abajo y con U2 o con U2AF65 en el sitio 3' río arriba (Long y Cáceres 2009, Wahl et al. 2009). También se ha reportado la unión de proteínas SR a secuencias intrónicas que promueven la inclusión (Lim y Sharp 1998), generalmente llamadas ISE (por *Intronic Splicing Enhancers*), o más raramente a secuencias que promueven la exclusión, ya sea exónicas (ESS, *Exonic Splicing Silencers*) o intrónicas (ISS, *Intronic Splicing Silencers*). El reclutamiento de proteínas SR estabiliza la unión de U1 o U2AF a sitios 3' o 5' débiles promoviendo la inclusión de exones alternativos (Graveley et al. 2001, Zahler y Roth 1994).

El término ribonucleoproteína nuclear heterogénea, o hnRNP por su sigla en inglés, se aplica a diversos factores que se unen al ARN naciente de manera independiente de secuencia (Karn et al. 1977) y participan en la formación de una partícula de 30S observada en gradientes de densidad de

sacarosa (Piñol-Roma et al. 1988). Las hnRNPs A, B y C forman el núcleo de estas partículas que empaquetan el ARN naciente; están entre las proteínas más abundantes en las células, con un nivel de expresión comparable al de las histonas (Han et al 2010). Además de reconocer ARN de manera inespecífica, casi todas las proteínas del grupo se unen con mayor afinidad a distintas secuencias particulares. En su mayor parte las hnRNPs poseen dominios RRM, aunque ningún dominio proteico es compartido por todos los miembros del grupo.

Todas las hnRNPs canónicas han sido implicadas en la regulación del *splicing*, y en especial en la represión de la inclusión de varios exones. Uno de los moduladores negativos del *splicing* más estudiados es hnRNP I, también conocido como PTB. Esta proteína se une a motivos cortos ricos en pirimidinas e inhibe la inclusión de distintos intrones por varios mecanismos, como el bloqueo directo de la unión de U2AF65 al trecho de polipirimidinas (Saulière et al. 2006) o la multimerización a ambos lados del exón formando estructuras que impiden su procesamiento (Amir-Ahmady et al. 2005).

Las proteínas SR y las hnRNPs tienen muchas veces efectos antagónicos sobre el mismo evento de *splicing*, y la inhibición del reclutamiento de hnRNPs por proteínas SR ha sido propuesta como un mecanismo por el cual estas proteínas aumentan la inclusión de determinados exones (Zhu et al. 2001).

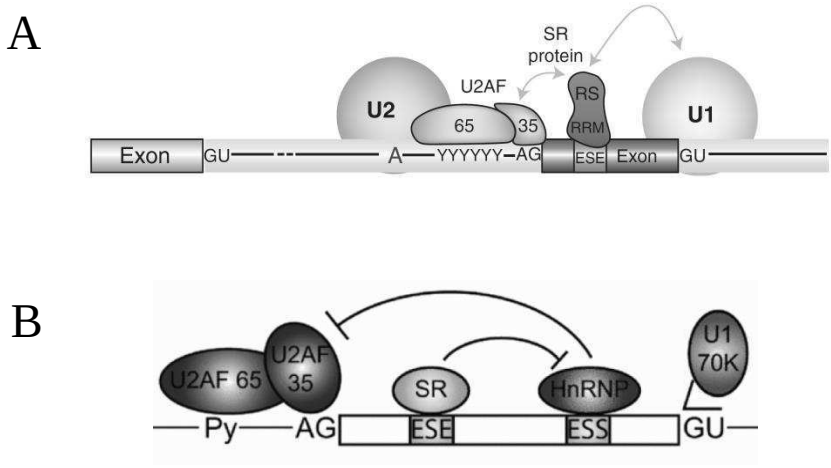

Figura I4. Rol de las proteínas SR. A: esquema de las interacciones durante la definición exónica. Una proteína SR unida a un activador exónico (ESE) por su dominio RRM estimula el reconocimiento del exón y su inclusión mediante interacciones positivas con U2AF en el sitio 3' del intrón río arriba y U1 en el sitio 5' río abajo. Tomado de Will y Lührmann 2011. B: estimulación indirecta de la inclusión por inhibición del reclutamiento de una proteína hnRNP a un represor exónico (ESS). Tomado de Long y Cáceres 2009.

1.3 Rol de Pol II en la regulación del procesamiento del pre-ARNm

Además de los factores de procesamiento y las secuencias reguladoras en cis, Pol II es en sí misma un actor clave en la maduración del pre-ARNm, en particular el dominio carboxiterminal, o CTD, de la subunidad mayor Rpb1. El CTD consiste en una serie de repeticiones de la secuencia consenso YSPTSPS (Corden et al. 1985), 26 en levadura y 52 en nuestra especie, que pueden sufrir una variedad de modificaciones post traduccionales incluyendo glicosilación, isomerización de prolinas, y crucialmente, fosforilación. Cinco de los siete residuos de cada repetición pueden ser fosforilados, y en particular la fosforilación de las serinas 2 y 5 tienen un papel importante en la transcripción por Pol II. La fosforilación en serina 5 por CDK7, una subunidad del factor de iniciación TFIIH, marca la salida del promotor y el comienzo de la transcripción; la fosforilación de la serina 2 por CDK9, la ciclina dependiente de quinasa de P-TEFb, o por CDK12 o CDK13 (Bartkowiak et al. 2010), prevalece en el cuerpo del gen y está asociada con elongación. La importancia del CTD en la elongación de Pol II se ve en la severa inhibición de la transcripción de genes endógenos en ausencia de este dominio (Meininghaus et al. 2000).

El canal de salida del ARN es próximo al CTD, que recluta varios factores de procesamiento incluyendo las enzimas que agregan la caperuza 5’ y los complejos de procesamiento 3’ CPCF y CstF. Tanto el procesamiento en el extremo 5’ como el corte y poliadenilación en el extremo 3’ están abolidos *in vivo* en ausencia del CTD (McCracken et al. 1997 a y b). Crucialmente, se ha reportado que varios factores de *splicing* son reclutados por el dominio CTD de pol II; las implicancias de este hecho se analizarán más adelante en esta introducción.

1.4 Acoplamiento entre transcripción y *splicing*

La ARN polimerasa II viaja a lo largo del gen en sentido 5’-3’, transcribiendo alternadamente exones e intrones con sus sitios regulatorios. Estos sitios son susceptibles de ser reconocidos por la maquinaria de *splicing* desde que son sintetizados, lo que crea la posibilidad de que el *splicing* ocurra cotranscripcionalmente. La primera evidencia de que este fenómeno ocurre fue presentada por Bayer y Osheim en 1988 con sus fotografías de microscopía electrónica de frotis de cromatina de Drosophila, que muestran lo que puede interpretarse como ensamblado del spliceosoma, formación del lazo y escisión del intrón en estructuras identificadas como cadenas de ARN nacientes unidas al ADN que las codifica. Posteriormente la aislación por microdisección de ARN asociado a anillos de Balbiani o libre en el nucleoplasma en embriones de *Xenopus* demostró que la eliminación de un intrón puede ser

previa a la liberación del transcripto (Baurén et al. 1994). Poco tiempo después Tennyson et al. observaron por RT-PCR que luego de la inducción transcripcional la eliminación de los intrones proximales en el gen de la distrofina humana eran eliminados antes de que Pol II alcanzara el extremo 3' de este gen excepcionalmente largo (Tennyson et a. 1995). A partir de ese punto se sucedieron los trabajos que demostraban primero el reclutamiento cotranscripcional de los factores de *splicing* a los sitios de transcripción activa (Listerman et al. 2006), y luego la eliminación cotranscripcional de los intrones. En todos los eucariotas estudiados hasta el momento, la mayor parte de los intrones es eliminada antes del corte en el sitio poliA y liberación de los transcriptos, aunque el procesamiento cotranscripcional es algo menos probable para los intrones cercanos al extremo 3' o que rodean exones alternativos (revisado en Dujardin et al. 2012).

La proximidad espacial y temporal entre transcripción y *splicing* abre la posibilidad de interconexiones entre ambos fenómenos, y un cúmulo creciente de evidencia demuestra que en efecto están funcionalmente acoplados. Quizá la instancia más interesante del acoplamiento entre transcripción y *splicing* está en el hecho de que la transcripción puede afectar el resultado de reacciones de *splicing* alternativo. La evidencia más temprana en esta dirección fue aportada por Eperon y colegas, que descubrieron que el uso de un sitio 5' alternativo embebido en la base de una estructura secundaria de tallo que impedía su reconocimiento *in vitro* estaba inhibido *in vivo* sólo si la estructura era corta. Los autores razonaron que *in vivo* los tallos más largos tardan más tiempo en formarse, dando tiempo a su reconocimiento por los factores de *splicing*, ya que Pol II debe transcribir una secuencia más larga hasta llegar a los nucleótidos que se hibridan con el sitio 5'. De esta manera el uso del sitio alternativo está determinado por las tasas de reclutamiento de factores que lo reconocen y de elongación de pol II (Eperon et al 1988). Una década más tarde un trabajo de nuestro laboratorio demostró que la tasa de inclusión del exón alternativo modelo EDI del gen de fibronectina humana es dependiente del promotor utilizado para la transcripción del minigén. Los autores propusieron que las distintas secuencias promotoras pueden producir un reclutamiento diferencial de factores de *splicing* a Pol II, que luego viajan a lo largo del gen asociados al dominio CTD y modifican el balance entre inclusión y exclusión (Cramer et al. 1997). Una alternativa a este modelo de reclutamiento es el llamado modelo cinético, que propone que la tasa de elongación de Pol II condiciona el reclutamiento de los factores de *splicing* a sitios competidores (Roberts et al. 1998). Estos dos modelos no son mutuamente excluyentes.

En los últimos años se multiplicaron los ejemplos de regulación transcripcional del *splicing* alternativo, en algunos casos por reclutamiento de factores asociados a la polimerasa (Gu et al. 2013) y en otros casos por regulación cinética. Explicaremos brevemente el modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo antes de pasar a nuestro modelo experimental.

1.5 El modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo

Smith y colegas observaron un aumento en la inclusión del exón 3 de α-tropomiosina en minigenes con sitios de pausa río arriba de un elemento regulador negativo en el intrón 3, o con una mayor distancia entre el intrón y este sitio regulador; ni los sitios de pausa ni las secuencias espaciadoras producían cambios en el *splicing in vitro*. Esto los llevó a postular que el mayor tiempo entre la síntesis del exón y la síntesis del sitio regulador negativo río abajo permitía el reconocimiento del exón por la maquinaria de *splicing* antes del reclutamiento del represor de la inclusión al sitio regulador negativo (Roberts et al. 1998). Generalizando este caso particular se llega al modelo cinético de regulación del *splicing*, según el cual una baja velocidad de transcripción o la presencia de secuencias de pausa puede favorecer el uso de un sitio regulador débil antes de la aparición de otro sitio ubicado río abajo con efecto contrario en la regulación del evento alternativo. En cambio una alta velocidad de transcripción produce una aparición más simultánea de los sitios competidores, lo que favorece el uso del sitio más fuerte río abajo.

En los últimos años publicaciones de nuestro laboratorio y de otros grupos dan ejemplos de mecanismos que afectan la tasa de elongación de Pol II en células en cultivo y al mismo tiempo modifican el *splicing* alternativo. Distintos estímulos que modifican la estructura de la cromatina haciéndola más permeable o más resistente a la transcripción por Pol II producen cambios en la tasa de inclusión de exones que son coherentes con las predicciones del modelo cinético (Schor et al. 2009; Alló et al. 2009). Del mismo modo, el tratamiento con agentes que causan daño al ADN como la luz ultravioleta produce una extensiva hiperfosforilación del CTD asociada a una baja velocidad de transcripción, que a su vez modifica el *splicing* de un conjunto de genes (Muñoz et al. 2009). Resulta interesante el caso de algunos factores de *splicing* caracterizados recientemente, que regulan conjuntos de eventos de *splicing* modificando localmente las propiedades de elongación de Pol II o la estructura de la cromatina (Montes et al. 2012; Close et al. 2012; Zhou et al. 2011).

1.6 Regulación cinética del *splicing* alternativo en el gen de fibronectina

La fibronectina humana es una proteína de alto peso molecular y de gran abundancia tanto en matriz extracelular como en plasma sanguíneo. Tiene una estructura modular, con tres tipos de repeticiones: tipo I, de 40 aminoácidos, tipo II, de 60 aminoácidos, y tipo III, de 90 aminoácidos. Las distintas repeticiones están en registro con los exones que las codifican; mientras que en su mayor

parte cada uno de los módulos tipo I y II es codificado por un solo exón, 12 de las 17 repeticiones tipo III están codificadas por dos exones.

Existen tres regiones de *splicing* alternativo en fibronectina: el exón 25, llamado EDII, EDB o EIIIB, el exón 33, conocido como EDI, EDA o EIIIA, y la región IIICS, de inclusión alternativa en su conjunto y además con sitios 5' y 3' alternativos. EDII y EDI codifican cada uno una repetición tipo III completa. La inclusión de estos exones es mayor en tejidos embrionarios que en tejidos adultos, y aumenta en heridas cutáneas y en transformaciones malignas; no se detectan isoformas de inclusión en plasma sanguíneo.

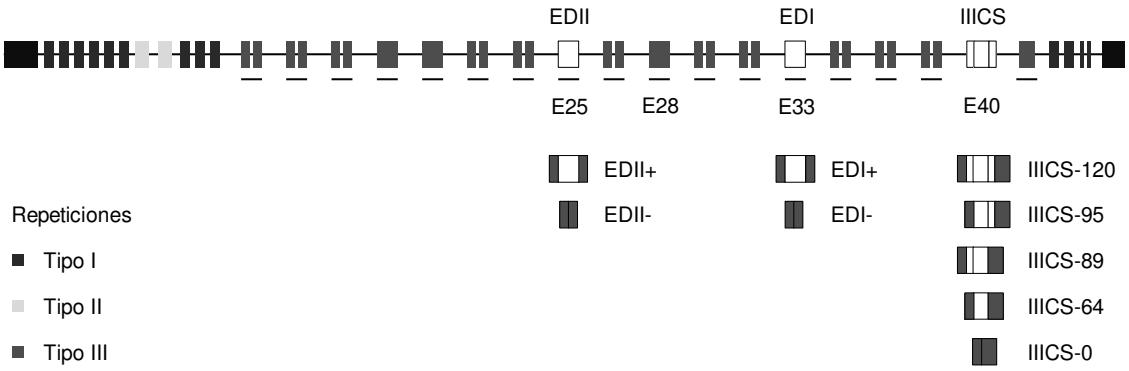

Figura I5. Esquema del gen de fibronectina humano FN1. Cada línea horizontal señala un módulo de tipo III en la secuencia de la proteína. Los rectángulos blancos indican exones o fragmentos alternativos; debajo de cada región de *splicing* alternativo se grafican las distintas isoformas a que da lugar. El exón constitutivo 28 es similar en tamaño a EDI y EDII y será analizado en esta tesis.

En experimentos de transfección de minigenes la inclusión de EDI varía según el promotor que recluta Pol II. Aunque inicialmente este resultado fue explicado en el marco del modelo de reclutamiento, nuevos experimentos mostraron que la inclusión de EDI sube en condiciones que promueven la replicación y cromatinización de los plásmidos transfectados, y baja con la transfección de un transactivador que promueve la elongación (Kadener et al 2001). Estos resultados muestran una correlación inversa entre elongación e inclusión de EDI. Dos purinas en el trecho de polipirimidinas río arriba de EDI vuelven subóptimo el sitio 3', bajando su afinidad por U2AF65 (Nogués et al. 2003); las condiciones que promueven una menor elongación de Pol II aumentan las probabilidades de que este sitio débil sea reconocido por el heterodímero U2AF antes de que el sitio 3' en el intrón río abajo de EDI sea sintetizado.

En contraste con EDI, EDII no cambia su nivel de inclusión al variar el promotor o al transfectar una Pol II mutante lenta (de la Mata 2003). En cambio, distintas proteínas SR regulan positivamente su inclusión al unirse a secuencias cortas en el intrón río abajo (Du et al. 1997; Lim y

Sharp 1998). La inclusión de EDI también es regulada positivamente por proteínas SR, que son reclutadas a un ESE muy bien caracterizado (Buratti et al. 2004).

La regulación cinética de EDI ha sido demostrada por medio de experimentos de transfección de mutantes de Rpb1 de elongación más lenta (de la Mata et al. 2003); en esas condiciones aumenta la inclusión de EDI, de acuerdo con el modelo propuesto. Además la inclusión de EDI aumenta ante la inhibición del factor de elongación P-TEFb (de la Mata et al. 2010) o la creación de cromatina más compacta (Kadener et al. 2001, Schor et al. 2009, Alló et al. 2009).

El mecanismo exacto de la regulación cinética de EDI no ha sido demostrado experimentalmente. Hasta el comienzo de este trabajo no existían pruebas de que la elongación afecta de manera directa el reconocimiento del sitio 3' débil. Tampoco teníamos forma de comprobar que los métodos que utilizamos para disminuir la elongación de Pol II funcionan eficientemente en nuestros sistemas experimentales. Algunas de estas cuestiones serán abordadas en la presente tesis.

Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo más general de esta tesis es el estudio de los mecanismos por los cuales la elongación de la ARN Polimerasa II modifica el *splicing* alternativo. Los objetivos específicos son los siguientes:

2.2 Objetivos Específicos

- El análisis del orden de remoción de los intrones que rodean a un exón alternativo en distintas condiciones de elongación.
- El estudio sistemático del orden de remoción de intrones en distintos exones alternativos y constitutivos y su relación con la regulación del *splicing* de estos exones.
- La obtención de medidas de la velocidad de transcripción de Pol II *in vivo* en el gen endógeno de fibronectina en distintas líneas celulares y en presencia de tratamientos que inhiben la elongación transcripcional.
- La medida del reclutamiento de la proteína U2AF65 al sitio 3' río arriba del exón alternativo EDI en el gen de fibronectina y en el sitio competidor río abajo en distintas condiciones de elongación.

Materiales y Métodos

3.1 Plásmidos

Minigenes reporteros de *splicing*:

El minigén pUHC EDI reprimible por tetraciclina ha sido descripto previamente (de la Mata el al. 2006). Brevemente, el fragmento reportero de luciferasa del plásmido pUHC13.3 ha sido removido con la enzima de restricción *Xba*I y reemplazado por el fragmento *Bss*HII-*Pvu*II de 3910 pb de pSVEDA Tot (Caputi et al. 1994) para producir pUHC EDI. Los mutantes pUHC EDI DM, GT (de la Mata et al. 2010) y AT (Manuel de la Mata) han sido construidos reemplazando el fragmento *Hind*III-*Nco*I por el fragmento equivalente en pSVEDA/FN DM (doble mutante), GT o AT respectivamente (Nogués et al. 2003). pUHC EDI ΔDRE ha sido construido por deleción del fragmento *Nco*I-*Nde*I (de la Mata et al. 2010). Los minigenes pFN EDI^{WT}/IIICS y pFN EDI^{C}/IIICS consisten en dos copias del gen de α-globina humana clonados en tándem; en el sitio *Bst*EII de la copia río arriba se encuentra clonado un fragmento de 3087 pb del gen de fibronectina humana con el exón EDI y sus intrones y exones flanqueantes, ya sea WT o con la doble mutación; en el sitio *Bst*EII de la copia río abajo se encuentra clonado un fragmento de 2685 pb del gen murino de fibronectina con la región alternativa IIICS y sus intrones y exones flanqueantes (Fededa et al. 2005).

Para construir el minigén pUHC E28 ligamos el fragmento que va desde el sitio *Acc*I en el exón 27 de fibronectina hasta el final del exón 29 de fibronectina en el producto de PCR pUHC ΔEDI, amplificado con los *primers* αgl e3F: 5'-GTGACCCTGGCCGC-3' y αgl e3R: 5'-ACCAGCAGGCAGTGGC-3' a partir de pUHC EDI.

Para construir el minigén pUHC EDII restituimos por mutagénesis dirigida el sitio *Bst*EII río arriba del inserto de fibronectina en pUHC EDI, produciendo el plásmido pUHC EDI *Bst*EII, y reemplazamos el fragmento *Bst*EII de 3091 pb por el fragmento *Bst*EII de 2923 pb del plásmido pSVEDBXho (Muro et al. 1999).

Para construir el minigén pUHC CFTR TG11T5 reemplazamos el fragmento *Bst*EII de 3091 pb en pUHC EDI *Bst*EII por el fragmento BstEII de 2385 pb del plásmido pSV40 CFTR TG11T5 (Pagani et al. 2000).

Los minigenes pSV40 CFTR TG11T5, TG11T9 y ΔTG T5 han sido descriptos previamente (Zuccato et al. 2004); el minigén pFN CFTR TG11T5 ha sido construido reemplazando el promotor de SV40 por el promotor de fibronectina (Gwendal Dujardin).

Los minigenes reprimibles por tetraciclina que usamos en este trabajo (pUHC EDI y sus derivados) poseen un promotor mínimo P_{hCMV}*, virtualmente silencioso en ausencia de transactivadores, y siete operadores *tet*O clonados río arriba. El plásmido pUHD 15.1 codifica una proteína de fusión entre el represor *tet*R, que se une a los operadores *tet*O en ausencia de tetraciclina, y el transactivador viral VP16, que produce una estimulación robusta del promotor mínimo (Gossen et al. 1992). El tratamiento de las células con tetraciclina reprime la transcripción de los minigenes, y el lavado de la tetraciclina induce rápidamente la transcripción (figura M1).

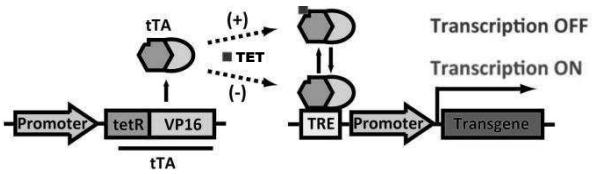

Figura M1. Sistema TET-off. El plásmido pUHD 15.1 codifica la proteína de fusión tTA-VP16 bajo un promotor constitutivo. En presencia de tetraciclina (TET), tTA-VP16 no puede unirse a los operadores tetO (TRE o Tetracycline Response Elements en el esquema) en el plásmido derivado de pUHC 13.3, y no se activa el promotor mínimo (arriba). En ausencia de tetraciclina, tTA-VP16 es reclutada a los operadores tetO activando el promotor (abajo). (Tomado de Suzuki y Suzuki, 2011).

Vectores para la sobreexpresión de factores de *splicing* o para la expresión de polimerasas mutantes

Los plásmidos g10 SF2/ASF (Cáceres et al. 1997), g10 SRp20, g10 Sc35, g10 9G8, g10 SRp55 o g10 SRp40 (Cramer et al. 1999) codifican los ADNc de las proteínas SR homónimas y ya han sido descriptos. Los plásmidos pcDNA 3.1-nV5-ETR3 y pcDNA 3.1-TDP-43-V5-His codifican los ADNc de las proteínas ETR3 y TDP-43 respectivamente y han sido descriptos (Dujardin et al. 2010). El plásmido pHI codifica el ADNc de la proteína hnRNP PTB (Ghetti et al. 1992); el plásmido pTIA1 (Del Gatto-Konczak et al. 2000) codifica el ADNc de la proteína TIA1.

El plásmido pAT7h1 codifica el ADNc de la subunidad mayor de Pol II humana Rpb1 *Wild Type* sensible a la α-amanitina (WT^S); el plásmido pAT7h1αAm^r codifica una variante de Rpb1 con la mutación N792D que le confiere resistencia a la α-amanitina (WT^R) (Nguyen et al. 1996). El plásmido pAT7h1αAm^rR749H (de la Mata et al. 2003) codifica una Rpb1 humana mutante que además de la sustitución N792D posee la sustitución R749H, equivalente a la sustitución R741H en la polimerasa mutante C4 de *Drosophila melanogaster*, de baja tasa de elongación (Coulter y Greenleaf 1985). El plásmido HA Δ5 (Gerber et al. 1995) codifica una Rpb1 que sólo posee 5 de las 52 repeticiones del dominio carboxiterminal (mutante ΔCTD).

Preparación de plásmidos

Preparación de plásmidos a pequeña escala o minipreps

Se utiliza esta técnica para producir una pequeña cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de unos pocos mililitros, con el objetivo de, por ejemplo, constatar mediante mapeo de restricción o secuenciación si los clonados realizados habían generado el plásmido de interés. Se utilizó un protocolo estándar adaptado utilizado y cuando la aplicación subsiguiente demandaba una más alta calidad del plásmido, se utilizó un *kit* de Invitrogen (*PureLink HiPure Plasmid Miniprep*).

Preparación de plásmidos a gran escala o maxipreps

Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100 µg de DNA plasmídico (columnas tip 100) o 500 µg (columnas tip 500). También se utilizaron *kits* de Invitrogen (*PureLink HiPure Plasmid Maxiprep*) para la obtención de grandes cantidades de plásmido libres de endotoxinas. En todos los casos, se realizó el protocolo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Cuantificación de los plásmidos

Para conocer la concentración de ADN o ARN en solución se midió absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (NanoDrop). Como alternativa se midieron concentraciones por fluorometría, utilizando el lector Qubit y los reactivos Quant-iT RNA y dsDNA BR (Invitrogen). Paralelamente, para cuantificar fragmentos de ADN se realizó una cuantificación por electroforesis, corriendo alícuotas en un gel de agarosa con bromuro de etidio y comparando con estándares de masa (*High Mass* y *Low Mass Ladders*, Invitrogen).

Transformación de bacterias

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en $CaCl_2$ y otras sales. Con este protocolo, se generan bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10^6 UFC/µg. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan (Hanahan, 1983).

Alternativamente, se prepararon bacterias electrocompetentes en los casos en que se necesitó una mayor eficiencia de transformación (1.10^7-1.10^9 UFC/µg DNA).

3.2 Cultivo celular

Líneas celulares

Las células Hep3B (ACTT #HB-8064) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomicina). Las células HCT-116 (ATCC #CCL-247) y N2a (ATCC #CCL-131) fueron mantenidas de la misma manera pero en medio suplementado con 4,5 g/L glucosa; las células HEK293T (ATCC #CRL-11268) fueron mantenidas en este medio DMEM rico en glucosa pero con la adición de piruvato de sodio (110 mg/L concentración final). Ocasionalmente, para utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agregó también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/L. Antes de que las células alcanzaran la confluencia total, se aspiró el medio de cultivo y se colocó 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a 37°C unos dos o tres minutos, se detuvo la reacción con 9 ml de medio completo, se replaqueó entre 1/3 y 1/10 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se llevó a 12 ml de volumen final con medio completo. Las células fueron congeladas en N_2 líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales.

Transfecciones con ADN

Las células Hep3B fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos de 35 mm con una densidad de 2 x 10^5 células por pocillo y 24 h más tarde fueron transfectadas usando el reactivo Lipofectamina (Invitrogen #18324). Las células HCT-116, HEK293T o N2a fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos (35 mm diámetro) con una densidad de 5 x 10^5 células por pocillo, o en placas de cultivo de 12 pocillos (22 mm diámetro) con 2,5 x 10^5 células por pocillo y 24 h más tarde fueron transfectadas usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen #11668). Para las placas de 6 pocillos transfectamos 2 µg de ADN con 6 µl de reactivo por pocillo; para las placas de 12 pocillos transfectamos 1 µg de ADN con 3 µl de reactivo por pocillo. Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente (se ejemplifica utilizando las cantidades de los reactivos adecuadas para pocillos de 35mm):

Se coloca 2 µg totales de ADN plasmídico en un tubo *eppendorf* que contiene 100 µl de OptiMEM (Invitrogen).

Se coloca 6 µl de lipofectamina en un tubo de polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 100 µl de OptiMEM y se incuba por 5 min.

Se transfiere el contenido del tubo *eppendorf* al tubo con lipofectamina y se mezcla.

Se incuba 20 minutos para que se formen los complejos entre el poli-catión y el ADN.

Se lavan las células con PBS para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiban la transfección, y se dejan en 1,8 ml de medio sin suero ni antibióticos.

Se agregan por goteo 200 µl de los complejos en cada pocillo.

Se dejan las células en el incubador durante 4 a 24 h para que ocurra la transfección.

Luego se aspira el medio para eliminar la lipofectamina, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.

En el caso de las placas de 12 pocillos todas las masas y volúmenes se reducen a la mitad.

Transfecciones con ARN

Para los experimentos de ARN de interferencia, las células HCT-116 ($5x10^5$) fueron transfectadas en placas de cultivo de 12 pocillos con 3 µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 250 ng siRNA. El procedimiento es el mismo que el detallado para la transfección con ADN. La secuencia de los siRNAs se detalla a continuación:

siLUC: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA(dT)(dT)-3' (Elbashir et al., 2001).
siSRp20: 5'-GGACUGUAAGGUUUAUGUAGGCAAU-3' (*Stealth* siRNA)
siSC35: 5'-UCGCCUUCGUUCGCUUUCACGACAA-3' (Blaustein et al 2005)
siSRp55: 5'- GGCACAGAAAUAAAUGGCAGAAAUA-3' (Matías Blaustein)
siSRp75: 5'- GGCAGGAGAAGUGACUUAUGCAGAU -3' (Matías Blaustein)

Ensayos de *splicing* y orden de remoción de intrones con minigenes

Transfección de minigenes mutantes inducibles; sobreexpresión o silenciamiento de proteínas SR

Transfectamos pocillos de 35 mm con la densidad adecuada según la línea celular con 70 ng de minigén inducible *wild type* o mutante y 600 ng del plásmido pUHD 15.1 que codifica el transactivador tTA-VP16; alternativamente transfectamos placas de 22 mm con 35 ng de minigén inducible y 300 ng de pUHD 15.1. En los experimentos de sobreexpresión transfectamos junto con el minigén inducible y el plásmido que codifica el transactivador 100 ng de vector que codifica para proteína SR por pocillo de 35 mm, exceptuando en la figura R7 A-B, en la que fueron transfectados 200 ng por pocillo, o 50 ng por pocillo de 22 mm. En todos los casos transfectamos el vector comercial pBluescript II KS+ (Agilent) hasta completar la masa indicada en la sección *transfecciones con ADN*. 16 h más tarde aspiramos el medio de cultivo y lisamos las células con el reactivo TRI

Reagent (MRC) para extraer ARN total. En los experimentos de silenciamiento transfectamos pocillos de 22 mm con las masas arriba indicadas de minigén y plásmido que codifica el transactivador junto con 250 ng de cada siRNA; 24 o 48 h más tarde lisamos las células en TRI Reagent. Para cada combinación de minigén y tratamiento transfectamos pocillos por triplicado; además cada resultado se comprobó en experimentos independientes.

Tratamiento con fármacos que modifican la elongación transcripcional

Transfectamos células en cultivo con los minigenes inducibles indicados en cada caso y el plásmido que codifica el transactivador según se explica arriba, y 24 h más tarde aspiramos el medio y agregamos medio fresco con los fármacos 5,6-dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol o DRB (Sigma, concentración inicial 50 mM en DMSO o etanol), camptotecina o CPT (Sigma, 20 mM en DMSO), flavopiridol (Sigma, 1 mM en DMSO), o tricostatina A o TSA (Sigma, 5 mg/ml en etanol), en las concentraciones finales indicadas en cada figura, o con los vehículos DMSO o etanol en el volumen máximo usado en cada experimento. 24 h más tarde lisamos las células en TRI Reagent. Este protocolo breve fue el más efectivo para el estudio del orden de remoción de intrones.

Para maximizar los efectos de los fármacos sobre el *splicing* transfectamos las células y 4 h más tarde aspiramos el medio con los complejos y agregamos medio fresco con tetraciclina 1 μg/ml para reprimir la transcripción del minigén transfectado. 24 h más tarde reemplazamos el medio con tetraciclina por medio con distintas concentraciones de los fármacos. Luego de 8-9 h de tratamiento lisamos las células en TRI Reagent.

Transfección de polimerasas mutantes

Transfectamos células en cultivo con los minigenes inducibles y el plásmido que codifica el transactivador según se explicó, y 1,33 o 0,665 μg (según se haya tratado de pocillos de 35 mm o de 22 mm) de plásmido que codifica una de las 4 variantes de la subunidad mayor de Pol II. 4 h más tarde aspiramos el medio con los complejos y agregamos medio fresco con tetraciclina 1 μg/ml para reprimir la transcripción del minigén transfectado. 16 h más tarde aspiramos el medio y agregamos medio con tetraciclina 1 μg/ml y α-amanitina 7,5 μg/ml, y 24 h más tarde cambiamos a medio sin tetraciclina y con 10 μg/ml α-amanitina, permitiendo la transcripción del minigén. 24 h más tarde lisamos las células en TRI Reagent.

Transfección de minigenes no inducibles

Cultivos de células HCT116 o HEK293T fueron transfectados con 500 ng de minigén pFN CFTR TG11T5 y 16 h el medio fue reemplazado con medio con CPT 6 μM o DMSO; 6 h más tarde el medio fue aspirado y las células fueron lisadas con TRI Reagent.

En los experimentos de sobreexpresión los minigenes pFN CFTR TG11T5 o pSV40 CFTR en sus variantes TG11T5, TG11T9 y ΔTG T5 fueron transfectados junto con 500 ng de vectores que expresan los factores ETR3, TDP43, TIA1, PTB, o SF2; 16 h post transfección el medio fue aspirado y las células fueron lisadas con TRI Reagent.

3.3 Análisis del ARN

Purificación de ARN

Para obtener ARN de las células transfectadas, utilizamos 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 células cultivadas en un pocillo de 35 mm de diámetro. Utilizamos el reactivo TRI Reagent (MRC) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. 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 para luego agregar 1ml de TRI Reagent a cada pocillo con células. A continuación, se levanta el lisado de células con pipeta y se las transfiere a un tubo *eppendorf*. Se agrega 1/5 de volumen (200 μl) de cloroformo y se agita vigorosamente. Se centrifuga 15 min a 12 000 g en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se toma la fase acuosa (superior) y se la pasa a un nuevo tubo eppendorf. Se precipita con un volumen (500 μl) de isopropanol y se agita con un vórtex. Luego de incubar al 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga 10 min a 12 000 g en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se descarta el sobrenadante por volcado y se agregan 1 ml de etanol 75% v/v para lavar el precipitado. Se centrifuga 5 minutos a 7 500 g en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se vuelca el sobrenadante y se aspira bien para que no queden restos de etanol. Se seca el *pellet* al aire, se agregan 20 μl de agua y se congela a -20°C. Para resuspender el RNA, se descongela en un baño de agua a 50°C durante 5 min y se agita vigorosamente con un vórtex. 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.

Transcripción reversa (RT)

El protocolo para la obtención de ADN copia a partir de ARN se detalla a continuación. El mismo consiste en el protocolo provisto por el fabricante de la enzima Transcriptasa Reversa, MMLV-RT o Superscript III según el caso (Invitrogen). Protocolo para MMLV:

Se prepara la mezcla de reacción 1, que está compuesta de la siguiente manera:
1-5 µg de ARN
100 ng de *random primers* (N_{10}), o bien 0,2 µl de oligonucleótido específico 10 µM
H2O c.s.p. 11 µl.

Se desnaturaliza la mezcla 1 colocándola 5 min a 65°C.
Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la renaturalización.
Se agregan 9 µl de mezcla de reacción 2 a cada tubo.

La mezcla de reacción 2 está compuesta de la siguiente manera:
4 µl de *buffer* de RT 5X.
2 µl de DTT 100 mM.
1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
1 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl.
1 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl.

Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligonucleótido pueda hibridarse al ARN. Este paso puede ser omitido si se utiliza un oligo específico.
Se incuba 1 h a 37°C para que ocurra la reacción.
Se detiene la reacción incubando 15 min a 75°C.

El protocolo utilizado con la enzima Superscript III difiere del arriba descripto en que el volumen de mezcla 1 por reacción es de 12 µl y el volumen de DTT 100 mM es de 1 µl, y además en que la reacción se realiza a 50ºC.

Análisis de la inclusión de distintos exones por RT-PCR

PCR de punto final

La inclusión de los distintos exones alternativos o constitutivos en los minigenes transfectados fue analizada por RT con *random primers* o con el oligo específico pSVcDNA: 5'-GGTATTTGGAGGTCAGCA-3' seguida de PCR competitiva fría o radiactiva semicuantitativa. En el caso del exón alternativo EDI también utilizamos qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real).

Los *primers* utilizados para la PCR competitiva hibridan las junturas 5' y 3' entre la secuencia de fibronectina clonada en los minigenes y la secuencia de α-globina en la cual está insertada (exceptuando α-23, que hibrida secuencias en el gen de α-globina), dando lugar a dos productos de PCR por reacción, uno más largo correspondiente a la isoforma de inclusión y otro más corto correspondiente a la isoforma de exclusión (esquematizados para EDI en la figura M2 A). Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa para evaluar la presencia de las distintas isoformas de modo cualitativo; en donde se indica cuantificamos la intensidad de las bandas gráficamente con el programa ImageJ a partir de las fotografías obtenidas. En el caso de las reacciones de PCR radiactivas corrimos los productos en geles nativos de poliacrilamida, los secamos, cortamos las bandas y cuantificamos la radiación de Cherenkov por medio de un contador de centelleo.

Utilizamos el ADNc contenido en 2 µl de reacción de RT como molde para cada reacción de PCR. Agregamos a cada tubo 23 µl de mezcla de PCR, compuesta de la siguiente manera:

2,5 µl de *buffer* de PCR sin $MgCl_2$
0,75 µl de $MgCl_2$ 50 mM (1,5 µl para el caso de E28)
0,5 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
2,5 µl de *primer forward* 10 µM
2,5 µl de *primer reverse* 10 µM
0,75 µl de DMSO (dimetilsulfóxido)
0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen)
H_2O c.s.p. 23 µl.
En las PCRs radiactivas agregamos 0,05 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol).

La reacción de PCR consistió en: 1) 3 min a 94°C, 2) 30 ciclos de 45 s a 94°C, 1 min a 63°C y 30 s a 72°C. Utilizamos los siguientes pares de *primers*:

EDI:
pSV5'j: 5´-CACTGCCTGCTGGTGACTCGA-3´;
pSV3'j: 5´-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3´. (Caputi et al. 1994.)

EDII y CFTR9:

α-23: 5'-CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC-3';

Bra2: 5'-TAGGATCCGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA-3'. (Pagani et al. 2000.)

E28:

E285j: 5'-CTGCTGGTCGACTTTAAAATC-3';

E283j: 5'-ACCGCAGGGGTGAACTC-3'.

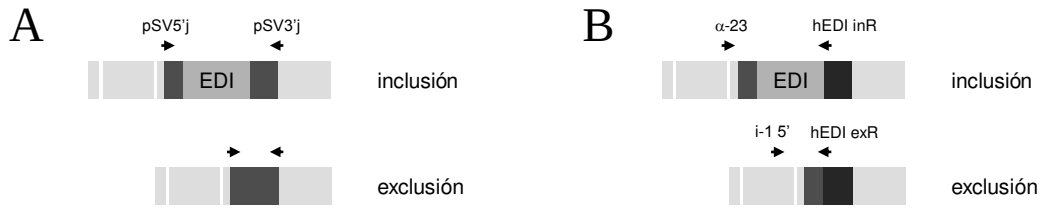

Figura M2. Inclusión/exclusión de EDI transcripto a partir de minigenes. A: estrategia de PCR tiempo final. Gris claro: exones de α-globina; gris oscuro, exones constitutivos de fibronectina, gris medio, exón alternativo de fibronectina EDI. Las flechas indican la posición de los *primers*. B: cuantificación por qPCR. Arriba y abajo se grafica la posición de los primers para medir la isoforma de inclusión o exclusión respectivamente.

PCR en tiempo real

Analizamos la inclusión de EDI endógeno y transfectado por PCR cuantitativa en tiempo real. Para cada muestra utilizamos dos reacciones diferentes, la primera para amplificar la isoforma de inclusión y la segunda para la isoforma de exclusión. En ambos casos el *primer reverse* hibrida una juntura específica para la isoforma cuantificada (Figura M2 B). Utilizamos 5 µl de una dilución 1:8 del ADNc obtenido por retrotranscripción con *random primers* y 20 µl de la siguiente mezcla de reacción:

2,5 µl de *buffer* de PCR sin $MgCl_2$

2 µl de $MgCl_2$ 50 mM en el caso de EDI de minigén o 1,5 µl de $MgCl_2$ 50 mM para EDI endógeno

0,5 µl de dNTPs 10 mM

1 µl de *primer forward* 10 µM

1 µl de *primer reverse* 10 µM

0,025 µl del agente intercalante SYBR Green (Roche) diluido 1:30 en DMSO

0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen)

H_2O c.s.p. 20 µl.

Utilizamos los siguientes pares de *primers*:

Inclusión EDI minigén:

α-23: 5'-CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC-3' (Pagani et al. 2000.);

hEDI inR: 5'-AGTTGGTGCAGGAATAGCTG-3' (Alló et al. 2009).

Exclusión EDI minigén:

i-1 5': 5'- TGGACCCGGTCAACTTCAAG-3' (Kadener et al. 2002);

hEDI exR: 5'- AGTTGGTGCAGGAATAGTGG-3' (Alló et al. 2009).

Inclusión EDI endógeno:

AMPL5L: 5'- GCAGCCCACAGTGGAGTATG-3' (de la Mata et al. 2010);

hEDI inR: 5'-AGTTGGTGCAGGAATAGCTG-3'.

Exclusión EDI endógeno:

hEDI exF: 5'-TGACTATTGAAGGCTTGCAG-3' (Alló et al. 2009);

hEDI exR: 5'- AGTTGGTGCAGGAATAGTGG-3'.

Corrimos el siguiente programa de PCR: 1) 2 min a 95ºC 2) 40 ciclos de 15 s a 95ºC, 15 s a 64ºC y 15 s a 72ºC 3) curva de *melting* para constatar la identidad de los amplicones. Utilizamos una termocicladora Mastercycler ep realplex S (Eppendorf).

Además de las muestras experimentales corrimos diluciones seriadas de ADNc para crear una curva de calibración para cada reacción; estas curvas son relativas ya que desconocemos las cantidades de cada isoforma en los ADNc diluidos. Sin embargo, siempre que las eficiencias de las dos reacciones sean similares se puede cuantificar una misma reacción según una u otra curva y obtener un coeficiente crudo para comparar los valores obtenidos en las dos cuantificaciones. Considerando este aspecto solamente tuvimos en cuenta aquellas corridas en las que la eficiencia de las dos reacciones difirió en menos de 0,1.

Análisis del orden de remoción de intrones

Cuantificamos por PCR en tiempo real los intermediarios de la vía de inclusión α y β descriptos en la sección *Resultados*. La posición de los *primers* se grafica en la figura M3 para el caso de EDI transfectado; el diseño fue el mismo para todos los exones estudiados (EDI endógeno; EDI, EDII, FN E28, o CFTR9 transfectados). Amplificamos ADNc producido por retrotranscripción con *random primers* o con el oligo pSVcDNA ya descripto en la siguiente mezcla de reacción:

2,5 µl de *buffer* de PCR sin $MgCl_2$

1,5-2 µl de $MgCl_2$ 50 mM

0,5 µl de dNTPs 10 mM

1,25 µl de *primer forward* 10 µM

1,25 µl de *primer reverse* 10 µM

0,025 µl de SYBR Green 1:30 en DMSO

0,475 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen)

H_2O c.s.p. 20 µl.

5 µl dilución de ADNc 1:4 a 1:10

Los pares de primers que utilizamos fueron:

EDI α endógeno:

AMPL5L: 5'- GCAGCCCACAGTGGAGTATG-3' (de la Mata et al. 2010);

DonR 2: 5'- GCTCCCATGGGCACCTG-3'.

EDI β endógeno:

PyF 2: 5'- TCACAACTTGCTTTCACATAAC-3'(de la Mata et al. 2010);

FN E34R: 5'- CTGTCAGGAGCAAGGTTGATTTC-3' (de la Mata et al. 2010).

EDI α transfectado:

pSV5'j: 5´-CACTGCCTGCTGGTGACTCGA-3´ (Caputi et al. 1994.);

DonR 2: 5'- GCTCCCATGGGCACCTG-3'.

EDI β transfectado:

PyF 2: 5'- TCACAACTTGCTTTCACATAAC-3' (de la Mata et al. 2010);

EDI 3j: 5'- GCCAGGGTCACGATCCAG-3'.

EDII α:

EDII 5j2: 5'-CTGGTGACCTGCACTTTTG-3';

EDII α1R: 5'-CACCCTATCTGAATCTTTGG-3'.

EDII β:

EDII β1F: 5'-CAGTTCAAATTGTACCCTTTAAG-3';

EDII 3j2: 5'-GATCCAGGTCACCAGGAAG-3'.

E28 α:

E28 5j: 5'-CTGCTGGTCGACTTTAAAATC-3';

E28 DonR: 5'-CTGGGTAGGAAAGTCTTCTGAG-3'.

E28 β:

E28 PyF: 5'-CACTTCCTAAACTGGTGGTGTC-3';

E28 3j: 5'-ACCGCAGGGGTGAACTC-3'.

CFTR α:

EDII 5j2: 5’-CTGGTGACCTGCACTTTTG-3’;

CFTRαR3: 5’-CCCATACATTCTCCTAATGCTC-3’.

CFTR β:

CFTRβF2: 5’-GGCCATGTGCTTTTCAAAC-3’;

EDII 3j2: 5’-GATCCAGGTCACCAGGAAG-3’.

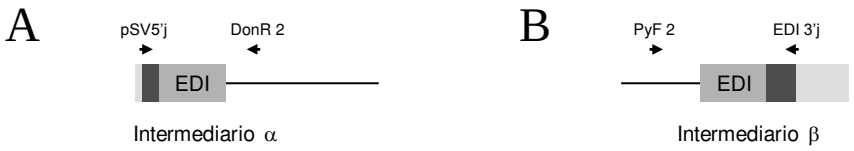

Figura M3. Esquema de los precursores cuantificados para medir el orden de remoción de intrones, ejemplificado para EDI transfectado. Gris claro: exones de α-globina; gris oscuro, exones constitutivos de fibronectina, gris medio, exón EDI. A: el intermediario α corresponde a las moléculas que eliminaron el intrón río arriba de EDI pero no el intrón río abajo. B: el intermediario β corresponde a las moléculas que eliminaron el intrón río abajo de EDI pero no el intrón río arriba.

Para el caso de EDI endógeno o transfectado cuantificamos los precursores *proximal* y *distal* a partir del mismo ADNc utilizado para cuantificar α y β, y con los primers:

Endógeno Proximal:

hEDI exF: 5’-TGACTATTGAAGGCTTGCAG-3’ (Alló et al. 2009);

i-1 3’2: 5’-GCATTCAGACACCCAAGAAC-3’ (de la Mata et al. 2003).

Endógeno Distal:

i33BasF: 5’-CCTAGCCCAACAAGAACAATCC-3’ (Alló et al. 2009);

FN E34R: 5’- CTGTCAGGAGCAAGGTTGATTTC-3’ (de la Mata et al. 2010).

Minigén Proximal:

CFTRe3F: 5’-TAAGCCACTGCCTGCTGG-3’ (Manuel de la Mata);

EDA-1R1: 5’-ACCAACAAGTTCACTTTCCCTATG-3’ (Alló et al. 2009).

Minigén Distal:

i33BasF- 5’-CCTAGCCCAACAAGAACAATCC-3’;

EDI 3j: 5’- GCCAGGGTCACGATCCAG-3’.

3.4 Medida de la elongación de Pol II

Tratamos cultivos confluentes de células Hep3B o HCT116 en pocillos de 35 mm con DRB 300 μM por 4,5 h. Dejamos 3 pocillos excluidos del tratamiento con DRB. Lavamos cada pocillo 2 x con PBS, agregamos medio fresco e incubamos a 37ºC por los tiempos indicados. Con intervalos de 5 min aspiramos el medio de grupos de 3 pocillos y lisamos las células con TRI Reagent (para cada grupo de tres pocillos el tiempo fue computado de manera independiente a partir del lavado del DRB en ese triplicado). Preparamos ARN total de cada pocillo resuspendiendo en 16 μl H_2O y digerimos con DNasa I libre de RNasas (Sigma). Cuantificamos el ARN por Nanodrop y retrotranscribimos 1 μg de ARN de cada pocillo con *random primers*. Cuantificamos los precursores *1, 29, 35* y *46* por qPCR con los siguientes primers:

FNe1F: 5'-TGGCTGTCAGTCAAAGCAAG-3';
FNi1R: 5'-CAGCTGGTTTCTCTCAGTAAAGC-3'. (*1*)
FNi29F: 5'-CTCACACTCTGAACTAACCCTTTTTC-3';
FNe30R 5'-GCTGATGGTAGCTGTAGACTTGC-3'. (*29*)
FNe35F 5'-CCAAATATGAAGTGAGTGTCTATGC-3';
FNi35R 5'-CAGAAGGTTTGTCCATATGAAGAC-3'. (*35*)
FNúltimoF 5'-CTATAAGCAGCTGTCATGAGTC-3';
FNúltimoR 5'-GCACTCAATTGGGCAATTAAC-3'. (*46*)

Para cada amplicón relativizamos el resultado obtenido en cada punto de tiempo al valor obtenido en las células no tratadas con DRB y graficamos los resultados en función del tiempo.

En los experimentos con camptotecina cambiamos el medio de las células con DRB a medio con 6 μM CPT y 300 μM DRB 15 min antes de cambiar a medio con 6 μM CPT; luego tomamos las muestras a intervalos regulares como en el caso anterior. Los experimentos con y sin camptotecina fueron realizados en paralelo y los valores obtenidos para las muestras con CPT fueron relativizados a los valores para las muestras que no fueron tratadas con DRB ni con camptotecina.

3.5 Experimentos de *RNA IP*

Creación de entrecruzamientos y lisado de las células

Partimos de cultivos confluentes de células Hep3B en placas de 10 cm de diámetro. Creamos entrecruzamientos reversibles agregando 270 µl de formaldehído 37% a los 10 ml de medio de cultivo e incubando las células 5 min a 37ºC. Inactivamos el formaldehído con 500 µl de glicina 2,5 M, lavamos 2 x con PBS frío y levantamos las células en 1 ml PBS. Alternativamente, lisamos las células en *buffer* de lisis celular (BLC) y *buffer* de lisis nuclear (BLN), o en buffer de lisis de iCLIP (BLiC).

En el primer caso centrifugamos las células 4 min a 700 g a 4ºC y resuspendimos en aproximadamente 400 µl de BLC.

Buffer de lisis celular: BLC:
PIPES pH 8,0 5 mM
KCl 85 mM
NP-40 o equivalente 0,5%
inhibidores de proteasas
inhibidores de RNasas

Incubamos 10 min en hielo y centrifugamos por 5 min a 550 g a 4ºC. Resuspendimos los núcleos en un volumen similar de *buffer* de lisis nuclear.

Buffer de lisis nuclear: BLN:
SDS 1%
EDTA 10 mM
Tris-HCl pH 8,0 50 mM
inhibidores de proteasas
inhibidores de RNasas

Incubamos por 10 min en hielo y procedimos a la fragmentación del ARN o congelamos en nitrógeno líquido y guardamos a -80ºC.

En el segundo caso centrifugamos a velocidad máxima por pocos segundos a 4ºC, secamos los precipitados celulares y los pesamos. Congelamos los pellets rápidamente en nitrógeno líquido y los guardamos a -80ºC, o los resuspendimos en *buffer* de lisis de iCLIP de modo de obtener una densidad de 10 mg/ml.

Buffer de lisis de iCLIP: BLiC:

Tris-HCl pH 7,4 50 mM

NaCl 100 mM

NP-40 o equivalente 1%

SDS 0,1%

Desoxicolato de sodio 0,5%

inhibidores de proteasas

inhibidores de RNasas

Fragmentación del ARN

Sonicación

Sonicamos los lisados en tubos tipo *eppendorf* en un sonicado Bioruptor (Life Technologies) a alta potencia (200 W) y por pulsos de 30 segundos espaciados entre sí por 30 segundos. Probamos protocolos de 3 a 15 minutos.

Digestión con RNasa H

Sonicamos los lisados brevemente con dos pulsos de 10 segundos y digerimos con 2-20 U RNasa H (New England Biolabs) y con 0,3-6 μM oligos antisentido. Lisamos las células en un *buffer* BLiC modificado en el que reemplazamos el NaCl por KCl, con y sin agregado de DTT o $MgCl_2$.

Digestión con RNasa I

Sonicamos los lisados brevemente con dos pulsos de 10 segundos y digerimos con una dilución 1:1000 de RNasa I 100 U/μl (Ambion) con agregado de DNasa I libre de RNasas (Sigma) por 3 min a 37ºC. También probamos diluciones 1:500 y 1:2000. Luego de los 3 min enfriamos rápidamente en hielo, centrifugamos por 10 min a velocidad máxima a 4ºC y procedimos a la inmunoprecipitación del sobrenadante.

Inmunoprecipitación

Acoplamos 10 μg del anticuerpo monoclonal MC3 dirigido contra U2AF65 (Sigma) a 50 μl de *beads* magnéticos (Protein A Dynabeads, Life Technologies) previamente lavados 2x en BLiC. Rotamos los anticuerpos a temperatura ambiente por 1 h hasta terminar con la digestión de los lisados. Lavamos 3x y agregamos 10 mg de lisado celular en 1 ml por tubo. Como control agregamos lisado

celular a tubos con bolitas magnéticas no acopladas a anticuerpo. Incubamos hasta el día siguiente a 4ºC con rotación. Juntamos el sobrenadante como control no precipitado (*unbound*) y procedimos con los lavados. Lavamos 2x con BLiC y 2x con BLiC alto en sal (con 500 mM NaCl en lugar de 100 mM). Extrajimos el ARN con TRI Reagent, tanto de los *beads* magnéticos como de una alícuota (1/5) de la fracción no precipitada.

Cuantificación

Retrotranscribimos todo el ARN obtenido de las inmunoprecipitaciones con la enzima Superscript III y *random primers*. Cuantificamos por qPCR los amplicones EDI pY y E34 pY. Calculamos el enriquecimiento de la inmunoprecipitación con respecto a la fracción no precipitada y obtuvimos el cociente del enriquecimiento en EDI pY sobre el enriquecimiento en E34 pY.

EDI pY:

EDI pY F2: 5'-GTGGGTTAATTGGACTTCATC-3'

EDI pY R1: 5'-CAGTGAATGCCAGTCCTTTAG-3'

E34 pY:

E34 pY F2: 5'-CCTAGCCCAACAAGAACAATC-3'

E34 pY R2: 5'-AGGTCAGTTGGTGCAGGAATAG-3'

Constatación de la inmunoprecipitación por *Western Blot*

Tomamos alícuotas de 15 µl del lisado antes de la inmunoprecipitación y de la fracción no precipitada luego de la IP. Las muestras proteicas obtenidas antes y después de la IP fueron corridas en geles de poliacrilamida 10% con SDS y posteriormente transferidas a membranas de polivinilidenofluoruro (PVDF, GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas por una hora en una solución que contenía 5% leche descremada en TBS más 0,1% tween-20 (TTBS). Posteriormente agregamos una dilución 1:200 del anticuerpo primario Ab Cam 37483-100 (anticuerpo anti U2AF65 policlonal IgG de conejo), en la misma solución de bloqueo e incubamos 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo, acoplado a peroxidasa (Biorad) en solución de bloqueo. Luego de 4 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con el reactivo *ECL plus* y expuestas a films *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare).

Resultados

4.1 Orden de remoción de intrones: EDI

El nivel de inclusión del exón alternativo EDI es sensible a la modulación de la elongación de Pol II. Cuando se sobreexpresan moduladores positivos de la elongación la inclusión de EDI baja, y cuando la elongación de Pol II es afectada negativamente la inclusión sube. Por otro lado, la inclusión de EDI no es constitutiva en parte porque el trecho de polipirimidinas (pY) del sitio 3' río arriba de EDI es débil: su secuencia se aparta del consenso, posiblemente desfavoreciendo la unión de la proteína U2AF65. La mutación de dos nucleótidos específicos restituye una secuencia consenso y elimina la isoforma de exclusión.

Esto permite plantearnos la hipótesis de que en condiciones en las que la velocidad de transcripción de Pol II es alta el sitio 3' fuerte río abajo de EDI es transcripto con poca diferencia de tiempo con el sitio débil de EDI, y esta síntesis casi simultánea favorece la unión de U2AF65 al sitio fuerte y la exclusión de EDI; en cambio, una menor velocidad de transcripción da más tiempo al reclutamiento de U2AF65 al sitio débil río arriba de EDI, favoreciendo la formación de un "spliceosoma" entre EDI y el exón 32 río arriba y la eliminación del intrón entre ambos y por lo tanto llevando a la inclusión de EDI.

Para poner a prueba esta hipótesis utilizamos una estrategia ya descripta de análisis de orden de remoción de intrones alrededor de un exón (Kessler et al. 1993). Cuando un exón determinado es incluido, puede suceder que el intrón río arriba sea eliminado antes que el intrón río abajo, siguiendo su secuencia de síntesis; pero también puede suceder que el intrón río abajo sea eliminado antes que el intrón río arriba. La figura R1 A muestra estas dos vías y los intermediarios para cada vía, que hemos llamado α y β respectivamente. La formación cotranscripcional de complejos de *splicing* favorece la eliminación secuencial de los intrones, sin embargo para cada gen hay un orden preferencial de eliminación de intrones que no siempre coincide con su orden de síntesis. El orden de remoción de intrones puede obtenerse mediante la cuantificación por RT y PCR cuantitativa de los intermediarios de cada vía: una prevalencia de α indica que la eliminación del intrón río arriba precede a la eliminación del intrón río abajo en la mayoría de las moléculas, y una prevalencia de β marca el patrón inverso. Los pares de *primers* utilizados para cuantificar α y β están diagramados en la figura R1 A; como puede observarse, estos *primers* amplifican los intermediarios de *splicing* pero también potencialmente el pre-ARNm en el cual ninguno de los dos intrones ha sido eliminado. Sin embargo, en este último caso los amplicones resultantes son mucho más largos ya que incluyen un intrón completo, y las condiciones de PCR pueden ajustarse para obtener sólo los productos α o β.

Estudiamos el orden de remoción de intrones alrededor de EDI en el gen de fibronectina humana en las líneas celulares Hep3B y HEK293T, dos líneas con muy distinto nivel de inclusión de EDI. En Hep3B prevalece la isoforma de exclusión mientras que la inclusión es mayoritaria en HEK293T (figura R1). Observamos que α es mayoritaria en HEK293T mientras que β lo es en Hep3B. Aunque en ambas líneas los intermediarios medidos corresponden a la isoforma de inclusión, las vías que prevalecen en uno u otro caso son diferentes, indicando que las moléculas que incluyen EDI lo hacen por mecanismos moleculares distintos, y que el orden de remoción de intrones es sensible a estos mecanismos.

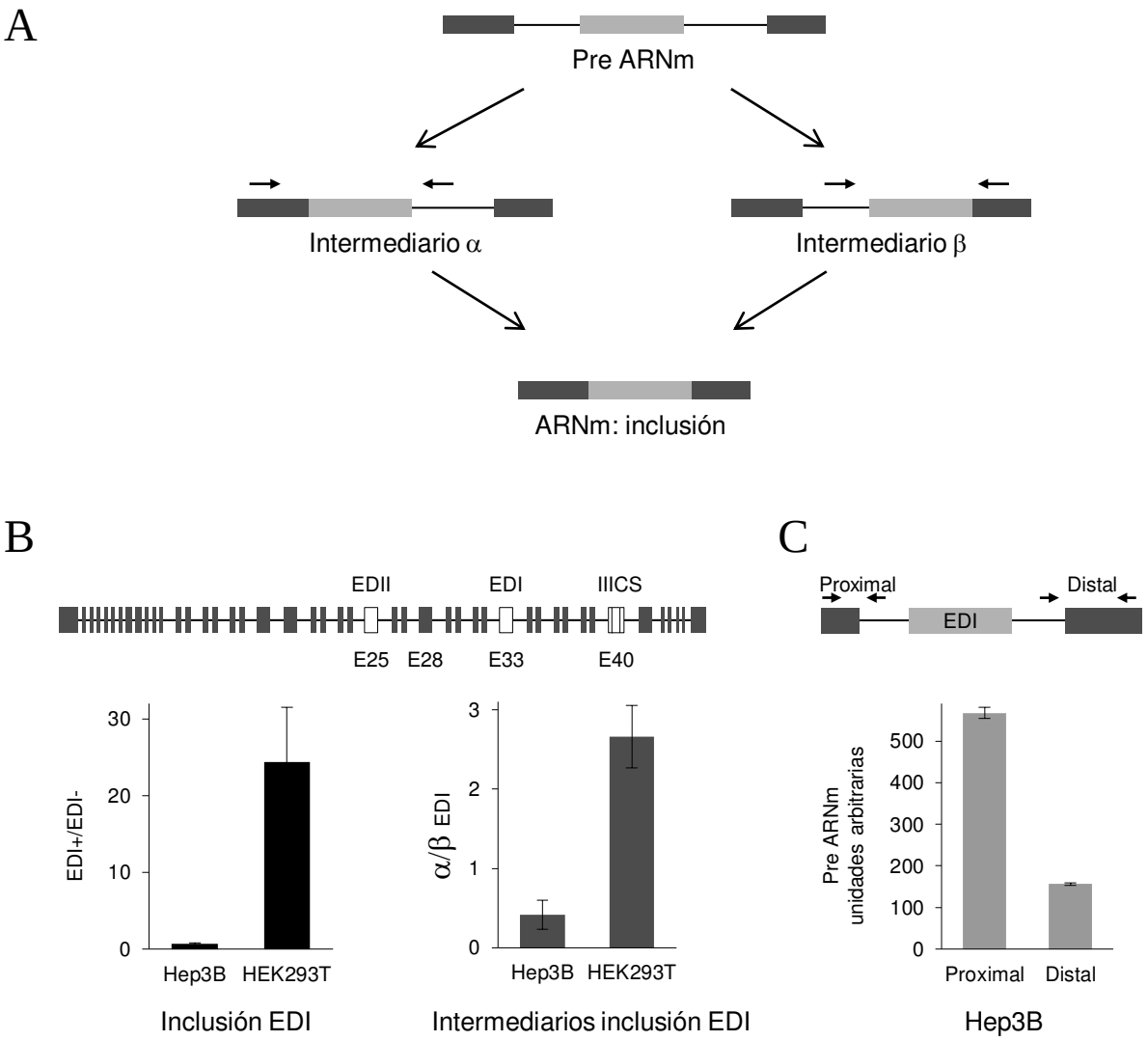

Figura R1. A: intermediarios de inclusión de un exón según el orden de eliminación de los intrones circundantes. Flechas: posición de los *primers* usados para la cuantificación de los intermediarios. B: arriba: esquema del gen de fibronectina humana. Gris: exones constitutivos. Blanco: exones alternativos. Se indica la posición del exón constitutivo 28, analizado en este trabajo. Abajo: cuantificación por RT-qPCR del cociente inclusión/exclusión del exón EDI en fibronectina endógena (negro) y del cociente de los intermediarios de inclusión α/β (gris). Análisis de ARN total extraído de células Hep3B o HEK293T. C: Posición de los intermediarios Proximal y Distal en fibronectina endógena y cuantificación por RT-qPCR en ARN aislado de células hep3B (gris claro).

Como control de este resultado cuantificamos otros intermediarios de *splicing* que llamamos *proximal* y *distal* (figura R1 C). El intermediario distal amplifica moléculas transcriptas al menos hasta el exón 34 que no han eliminado el intrón 33: esto incluye todos los intermediarios α más las moléculas que aún no han eliminado ninguno de los dos intrones. El intermediario proximal amplifica moléculas que no han eliminado el intrón 32: esto incluye todos los intermediarios β más las moléculas que aún conservan los dos intrones más los transcriptos incompletos que no alcanzaron el exón 34 ni eliminaron el intrón 32. Suponiendo que este último grupo sea minoritario, una prevalencia de α se correspondería con una mayor cantidad de precursor distal con respecto al proximal, y lo opuesto sucedería si β fuera mayoritario. En correspondencia con esto, el intermediario proximal es más abundante que el distal en células Hep3B en las que β es mayoritario.

El orden de remoción de intrones alrededor de EDI se modifica en minigenes con mutaciones que aumentan la inclusión.

Las líneas celulares Hep3B y HEK293T muestran diferencias tanto en su nivel de inclusión de EDI como en el orden de remoción de los intrones que lo rodean. Para tratar de establecer si existe alguna relación entre grado de inclusión y orden de remoción de intrones nos valimos de distintos métodos para modificar el *splicing* de EDI. La inclusión de EDI se ve afectada por elementos en *cis* que reclutan factores de *splicing*, por factores reguladores en *trans* como proteínas SRs o hnRNPs, y por la elongación de Pol II. Para estudiar la incidencia de las secuencias en *cis* en el orden de remoción de intrones utilizamos minigenes pUHC EDI, WT o con distintas mutaciones (de la Mata et al. 2010). Estos minigenes poseen un fragmento del gen de fibronectina desde el exón 32 hasta el exón 34 interrumpiendo el exón 3 de α-globina, bajo un promotor TET-off (figura R2 A). Los mutantes GT y AT presentan sustituciones puntuales en el trecho de polipirimidinas río arriba de EDI que lo vuelven más parecido al consenso, y el doble mutante tiene una secuencia consenso perfecta. Los minigenes fueron transfectados en células HCT116. La figura R2 B muestra el efecto de las mutaciones en el *splicing* alternativo de EDI, tanto por PCR en tiempo final como por qPCR, y la figura R2 C muestra la cuantificación de los intermediarios α y β en las mismas muestras.

Todas las mutaciones del sitio 3' vuelven mayoritaria la inclusión de EDI, que se hace prácticamente total en el doble mutante, y apenas menor a 100% en el mutante AT. Esto se correlaciona con un aumento en el precursor α, que pasa de ser minoritario en el minigén WT a ser más abundante que β en AT y DM (figura R2 C, izquierda). Las mutaciones del sitio 3' del intrón río arriba de EDI favorecen el reclutamiento de U2AF65, lo que a su vez promueve el procesamiento de este intrón llevando a la inclusión de EDI. En contraposición, no se conoce ningún mecanismo por el

cual estas mutaciones afecten la eliminación del intrón río abajo. De modo que el aumento observado del intermediario α es coherente con el mecanismo de aumento de inclusión de EDI en los mutantes.

La secuencia intrónica DRE río abajo de EDI promueve la exclusión de EDI; de acuerdo con esto, la inclusión de EDI aumenta en el minigén mutante Δ DRE (figura R2 B, derecha). A su vez, el intermediario β aumenta aún más en este mutante, indicando que el aumento de inclusión se da por un mecanismo diferente del que opera en los otros mutantes (figura R2 C, derecha).

Corroborando estos resultados, para todos estos minigenes los cambios en el orden de eliminación de intrones se ven reflejados en el cociente distal/proximal (figura R2 F). Además, consistentemente con ser este cociente el resultado de α sumado al no procesado sobre β sumado nuevamente al no procesado, los resultados son más cercanos a la unidad en todos los minigenes.

La posición de EDI en el minigén no modifica el orden de remoción de intrones

La definición del exón terminal depende de la interacción de los factores de *splicing* en el sitio aceptor y los factores de procesamiento 3' en el sitio de corte y poliadenilación, y la mutación de este sitio inhibe el *splicing* del intrón terminal. En todos los minigenes pUHC EDI analizados el intrón río abajo de EDI es el último intrón del transcripto, mientras que en el gen endógeno existen varios exones e intrones río abajo y la maquinaria de corte y poliadenilación no tiene incidencia en el procesamiento de EDI. Para ver hasta qué punto este hecho influye en nuestras medidas de remoción de intrones utilizamos el minigén pFN EDI/IIICS, que posee varios intrones y exones río abajo de EDI incluyendo la región alternativa IIICS murina (Fededa et al. 2005); comparamos este minigén en versión WT con la variante pFN EDI^{C}/IIICS, con la misma doble mutación que pUHC EDI DM. Transfectamos células Hep3B y analizamos la inclusión de EDI por cuantificación de las bandas obtenidas por PCR radiactiva y en paralelo medimos los intermediarios α y β. Los resultados se muestran en la figura R2, D y E. Se obtuvo una inclusión del 40% para ambos minigenes WT, que se transformó en un 100% en los dobles mutantes, indicando que la regulación del *splicing* de los minigenes de EDI no se ve afectada por la maquinaria de poliadenilación. Asimismo se obtuvo el mismo efecto de la doble mutación sobre el cociente α/β, validando los resultados previos.

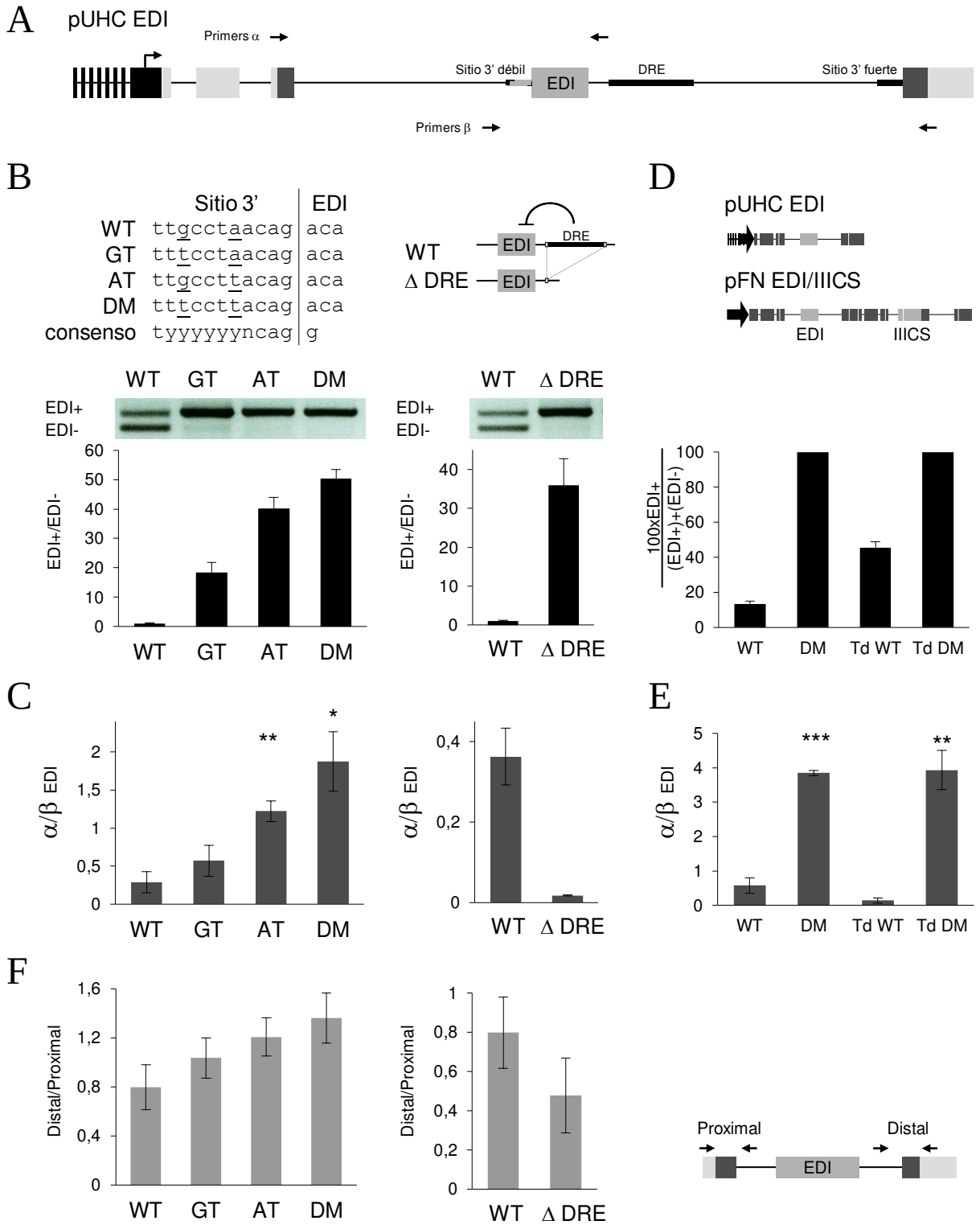

Figura R2. A: minigén pUHC EDI. Negro, promotor CMV con 7 operadores TET. Gris claro, secuencias α globina, gris oscuro, secuencias FN, gris medio, exón alternativo EDI. B: esquema de mutantes pUHC EDI en el sitio 3' y Δ DRE, PCR tiempo final y cuantificación por RT-qPCR de inclusión de EDI en células HCT116 transfectadas con los minigenes indicados. C: cociente α/β para los mutantes transfectados en B, RT-qPCR. D: efecto de la mutación DM en pUHC EDI (WT vs. DM) y en el minigén tándem pFN EDI/IIICS (Td WT y Td DM) en células Hep3B. Porcentaje de inclusión de EDI por PCR radiactiva. E: cociente α/β para los minigenes usados en D, RT-qPCR. F: Cociente del precursor distal sobre el proximal en células HCT116 transfectadas con los distintos mutantes (RT-qPCR), y esquema de los amplicones. Escala de grises como en A. Para todas las figuras de la sección *resultados*, * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001.

El orden de remoción de intrones alrededor de EDI se modifica por la sobreexpresión o el silenciamiento de distintas proteínas SR

Posteriormente sobreexpresamos en células HCT116 distintas proteínas SR que afectan la inclusión de EDI y analizamos el orden de remoción de intrones en el minigén pUHC EDI. Las secuencias que codifican para las distintas SRs están clonadas en el mismo plásmido de base y responden al mismo promotor; la transfección se hizo con la misma cantidad de plásmido y simultáneamente para todas las SRs, de modo que asumimos un nivel similar de sobreexpresión para todos los factores. Las proteínas SF2, SC35, 9G8, SRp55 y SRp40, ahora llamadas SRSF1, SRSF2, SRSF7, SRSF6 y SRSF5 respectivamente, promueven la inclusión de EDI, mientras que SRp20, ahora llamada SRSF3, la inhibe (figura R3 A); observamos que las proteínas SR que aumentan la inclusión también favorecen la escisión del intrón río arriba antes que el río abajo (figura R3 B). En el resto de este trabajo mantenemos la nomenclatura antigua, que facilita la comparación de nuestros resultados con trabajos previos.

SF2 se une a una secuencia activadora en EDI y promueve el reconocimiento del sitio 3' débil; consistentemente con este mecanismo, su sobreexpresión aumenta el intermediario α. Salvo en el caso de 9G8, que da un resultado más marginal, las otras proteínas SR que aumentan la inclusión de EDI también aumentan α, dando un indicio de que pueden estar actuando por un mecanismo similar. En contraste, la sobreexpresión de SRp20 baja tanto la inclusión de EDI como el cociente α/β; esto puede deberse a una inhibición de la eliminación del intrón río arriba o a una estimulación del procesamiento del intrón río abajo, aunque este último mecanismo es improbable ya que favorecería la inclusión de EDI.

El mismo análisis se repitió en células transfectadas con siRNAs para silenciar la expresión de SRp20, SC35, SRp55 y SRp75, ahora llamada SRSF4. El silenciamiento de SRp20 produce un aumento de la inclusión de EDI y un aumento del intermediario α, en concordancia con los resultados de sobreexpresión. Se ha reportado (Buratti et al. 2004) que SRp75 se une a la secuencia activadora en EDI, y en la figura R3 C observamos que el siRNA contra SRp75 baja la inclusión de EDI, adjudicando a esta proteína un rol positivo en la inclusión. Sin embargo el mecanismo de acción parece diferir del de SF2, ya que el silenciamiento de SRp75 produce un leve aumento del intermediario α, aunque este aumento no es significativo (figura R3 D). La transfección de siSC35 también baja la inclusión de EDI pero el efecto es sutil (aunque reproducible) y no está acompañado de un cambio en el orden de remoción de intrones.

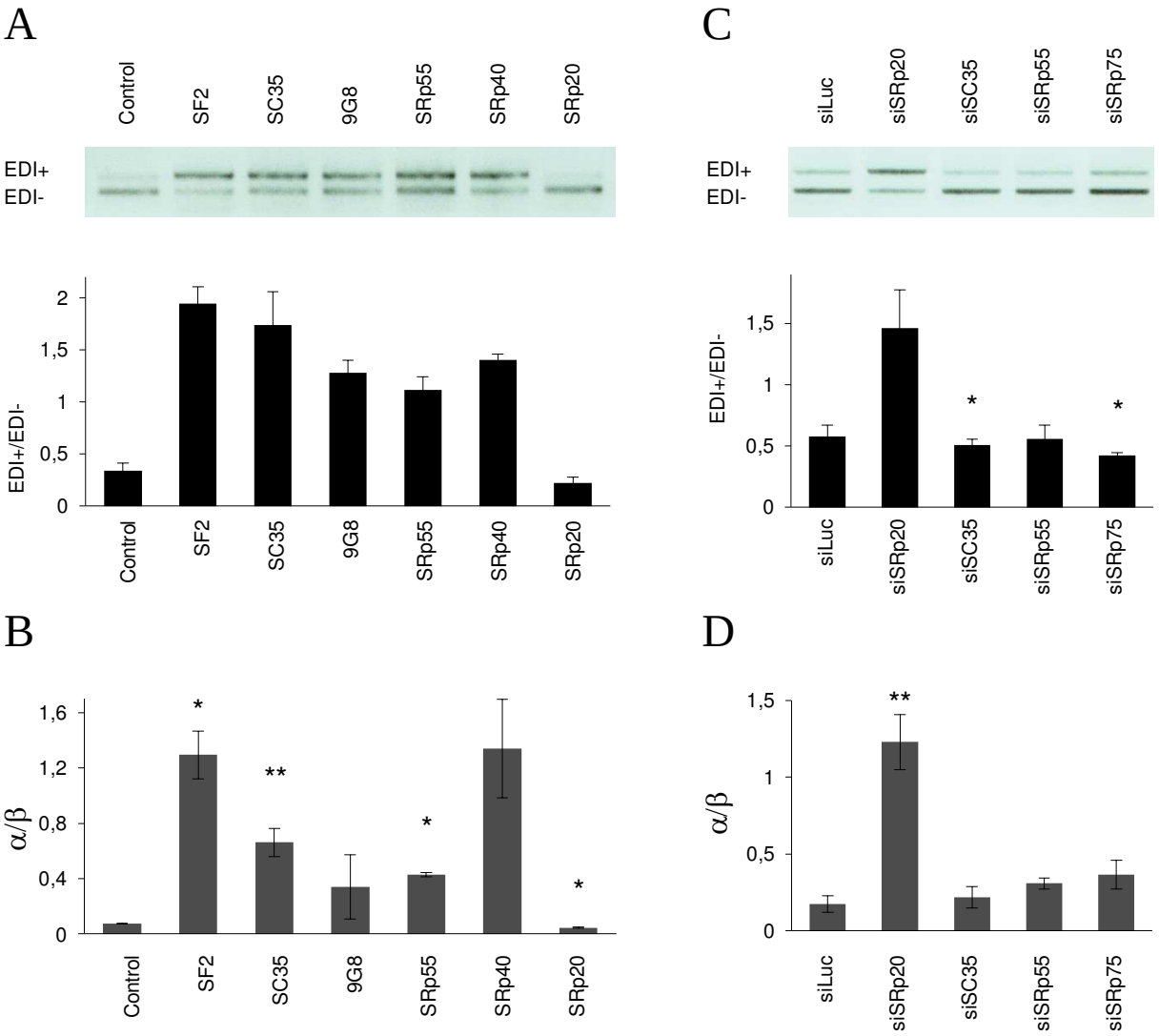

Figura R3. Efecto de distintas proteínas SR sobre el *splicing* de EDI. A: sobreexpresión de SRs en células HCT116. Las células fueron transfectadas con el minigén pUHC EDI y con vectores que expresan las proteínas indicadas o con vector vacío. Análisis de la inclusión de EDI por RT- PCR tiempo final y cuantificación por RT-qPCR. B: cuantificación de los intermediarios α/β por RT-qPCR en las muestras usadas en A. C: silenciamiento de SRs. Transfección de células HCT116 con pUHC EDI y siRNAs contra las proteínas indicadas. Inclusión de EDI como en A. D: cuantificación por RT-qPCR de los intermediarios α/β en las muestras de C.

Distintos tratamientos que modifican la elongación de Pol II modifican el orden de remoción de intrones independientemente del efecto sobre el *splicing* de EDI

Los resultados anteriores demuestran que el orden de remoción de los intrones que rodean a EDI se modifica en magnitudes detectables por distintos factores que cambian el nivel de inclusión. Volviendo a nuestra hipótesis inicial, quisimos comprobar si la modificación de la elongación de Pol II se ve reflejada en un cambio en el cociente α/β, en particular, si bajar la velocidad de transcripción se traduce en un aumento de la escisión del intrón río arriba de EDI antes del procesamiento del intrón río abajo. Para ello utilizamos distintos fármacos que modifican la elongación de Pol II. La tricostatina A (TSA) inhibe las deacetilasas de histonas creando un estado relajado de la cromatina que facilita la elongación por Pol II. El modelo cinético predice una disminución de la inclusión de EDI en condiciones de alta velocidad de transcripción, y el tratamiento con TSA disminuye la inclusión de exones regulados por elongación en minigenes cromatinizados (Nogués et al. 2002) o en genes endógenos (Schor et al, 2009). El 5,6-dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) es un inhibidor de P-TEFb, la quinasa dependiente de ciclina que fosforila la serina 2 de los heptámeros del CTD de Pol II; se ha demostrado *in vivo* que el DRB inhibe la elongación por Pol II (Darzacq et al. 2007). El flavopiridol es un inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas que afecta la elongación de Pol II a través de su efecto negativo sobre P-TEFb (Chao et al. 2001). La camptotecina (CPT) inhibe la ADN topoisomerasa I y es un modulador negativo de la elongación por Pol II (Ljungman et al. 1996).

Analizamos el grado de inclusión de EDI y el orden de remoción de intrones en células HCT116 transfectadas con pUHC EDI y tratadas por 6 h con TSA, DRB, camptotecina o flavopiridol. La tricostatina A produjo una disminución reproducible pero muy leve de la inclusión de EDI, de acuerdo con la baja cromatinización de los minigenes transfectados (Cereghini y Yaniv 1984), y no afectó significativamente el cociente α/β. Observamos un aumento de los intermediarios α con respecto a β para las dosis más altas de CPT y flavopiridol, de acuerdo con nuestra hipótesis (figura R4 B). Sin embargo, el mismo resultado no se ve para DRB. Como tanto DRB como flavopiridol afectan la elongación de Pol II a través de su inhibición de P-TEFb, el efecto del flavopiridol sobre el orden de remoción de intrones probablemente se deba a la inhibición de otros complejos ciclina-quinasa no afectados por DRB y sea independiente de la cinética de transcripción. Además, ninguno de los tratamientos produjo un cambio significativo en el nivel de inclusión de EDI (figura R4 A). Esto puede deberse a la persistencia de cantidades significativas de ARNm transcriptos antes del inicio de los tratamientos que diluyen el efecto de los distintos fármacos. Los cambios en α y β pueden observarse porque estos intermediarios tienen una vida media mucho más breve que los ARNm maduros, de modo que pocas horas después del agregado de los fármacos prácticamente todos los intermediarios detectados son producto de la transcripción durante el tratamiento.

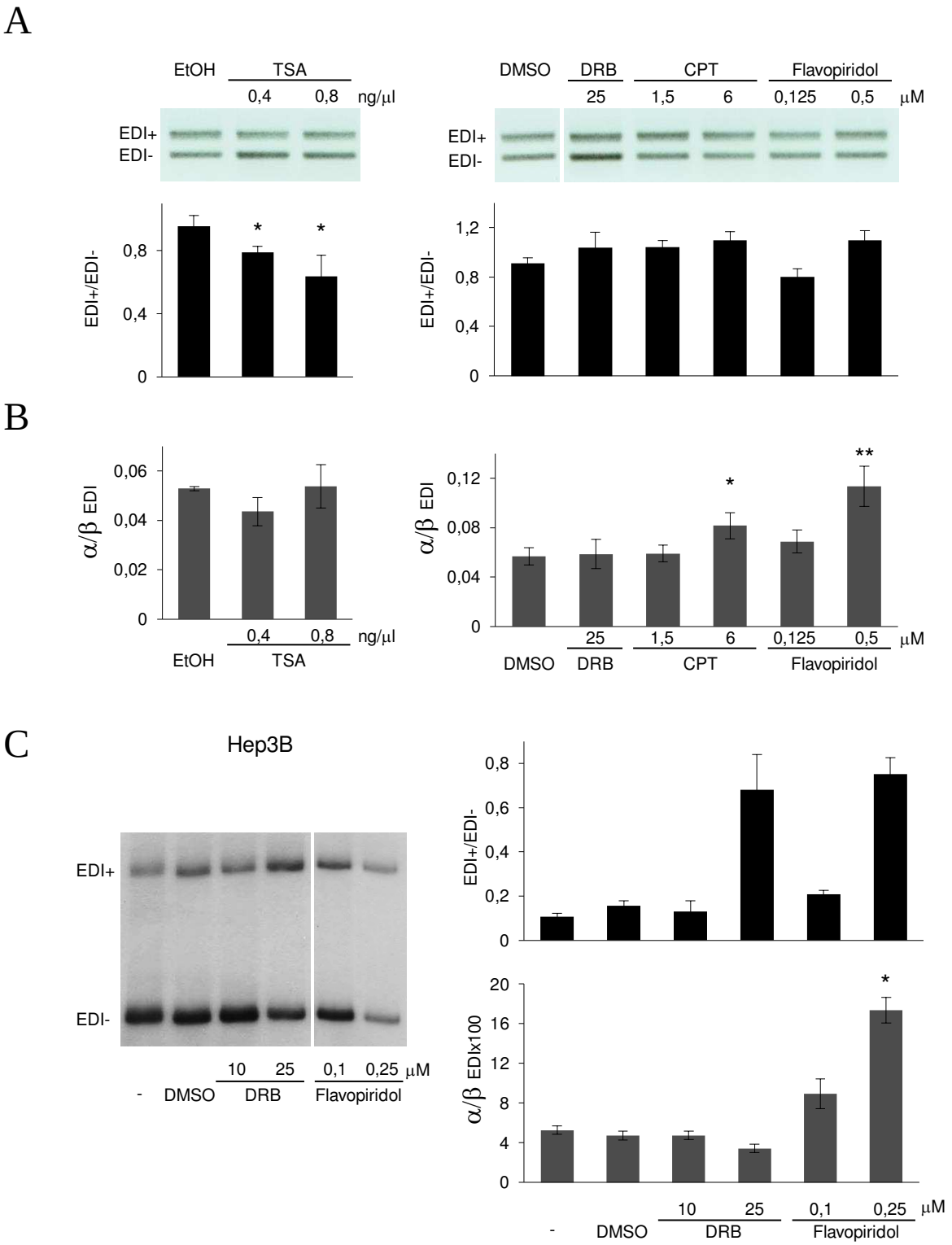

Figura R4. A: células HCT116 fueron transfectadas con pUHC EDI y 24 h más tarde fueron tratadas con TSA, DRB, CPT o flavopiridol en las concentraciones indicadas, o con los vehículos etanol o DMSO; 6 h más tarde se extrajo el RNA total y se analizó por RT-qPCR el nivel de inclusión de EDI. Los geles muestran el *splicing* de EDI según PCR competitiva tiempo final. B: análisis del orden de remoción de intrones para A. C: células Hep3B fueron transfectadas con pUHC EDI en presencia de tetraciclina. 24 h más tarde el medio con tetraciclina fue reemplazado por medio con DRB, Flavopiridol o DMSO. Luego de 9 h el RNA fue aislado y la inclusión de EDI fue medida por RT-PCR radiactiva (derecha, arriba) y los intermediarios α y β fueron cuantificados por RT-qPCR (derecha, abajo). Izquierda, gel de poliacrilamida.

Se ha reportado que 9 horas de incubación con DRB 25 μM producen un aumento de la inclusión de EDI en células Hep3B (Nogués et al. 2002). La falta de efecto en células HCT116 puede deberse a un mayor efecto de este fármaco en las células Hep3B, que tienen un nivel de inclusión basal de EDI algo más bajo. Repetimos el experimento en condiciones que aumentan la posibilidad de detectar cambios en el *splicing* de EDI. Transfectamos células Hep3B con el plásmido TET-off pUHC EDI bloqueando la transcripción del minigén con tetraciclina, y 24 h más tarde lavamos la tetraciclina y administramos DRB, CPT o flavopiridol; de esta manera la mayor parte de los transcriptos es producida en presencia de las drogas. En la figura R4 C se observa un aumento de más de cuatro veces en la inclusión de EDI con respecto al vehículo tanto para DRB 25 μM como para flavopiridol 250 ng, indicando un posible efecto cinético. Las células Hep3B con las que contamos tiene una muy baja eficiencia de transfección, y los tratamientos que inhiben la elongación de Pol II disminuyen considerablemente la abundancia de α y β, normalmente unas 1000 veces menor a la de las isoformas de inclusión y exclusión, de modo que el análisis del orden de remoción de intrones se dificulta con este protocolo. Sin embargo volvimos a detectar un aumento del intermediario α luego del tratamiento con flavopiridol y un cociente α/β similar al del vehículo luego del tratamiento con DRB, en todas las repeticiones del experimento. En cambio el tratamiento con CPT produjo resultados diferentes en cada repetición. Nuevamente la falta de cambio en el cociente α/β luego del tratamiento con DRB apunta a un efecto pleiotrópico del flavopiridol sobre el orden de remoción de intrones. De esta manera no podemos establecer una relación causal entre una menor velocidad de transcripción y la remoción preferencial del intrón río arriba para ninguno de los tratamientos.

La transcripción por una RNA polimerasa lenta aumenta la inclusión de EDI sin alterar el orden de remoción de intrones

La mutación C4 descripta en *Drosophila* consiste en la sustitución R741H en Rpb1, la subunidad mayor de Pol II. Esta polimerasa mutante posee una menor tasa de elongación *in vitro* (Coulter y Greenleaf 1985) e *in vivo* (Chen et al. 1996). La mutación equivalente R749H en Rpb1 humana (de la Mata et al. 2003), referida como C4 en el resto de este trabajo, tiene el mismo efecto sobre la elongación de Pol II *in vivo*, como se comprobó en experimentos de FRAP (Boireau et al. 2007). Transfectamos células HCT116 con el minigén inducible pUHC EDI y plásmidos que codifican para Rpb1 R749WT o R749H que además tienen otra mutación que las vuelve resistentes a la α-amanitina. Como control, transfectamos un plásmido que codifica para Rpb1 sensible a la α-amanitina; además, transfectamos un plásmido que codifica para Rpb1 con una deleción que abarca 47

de las 52 repeticiones del CTD (ΔCTD). Inhibimos con tetraciclina la transcripción de pUHC EDI y permitimos la transcripción y traducción de las polimerasas mutantes por 16 h antes de agregar α-amanitina. Mantuvimos las células con α-amanitina y tetraciclina por otras 24 h para asegurar la degradación de la Pol II endógena y luego desreprimimos el minigén. Este protocolo tiene como finalidad que la mayor parte de los transcriptos del minigén sean el producto de las polimerasas transfectadas; sin embargo, como se puede ver en el gel de la figura R5 B, es posible detectar algo de transcripción en el control transfectado con la polimerasa sensible a α-amanitina. A pesar del ruido que puede generar la transcripción por polimerasas WT remanentes, la transcripción del minigén por la polimerasa lenta aumenta la inclusión de EDI al doble. Sin embargo, este efecto no se ve reflejado en un cambio en el orden de remoción de intrones (figura R5 C).

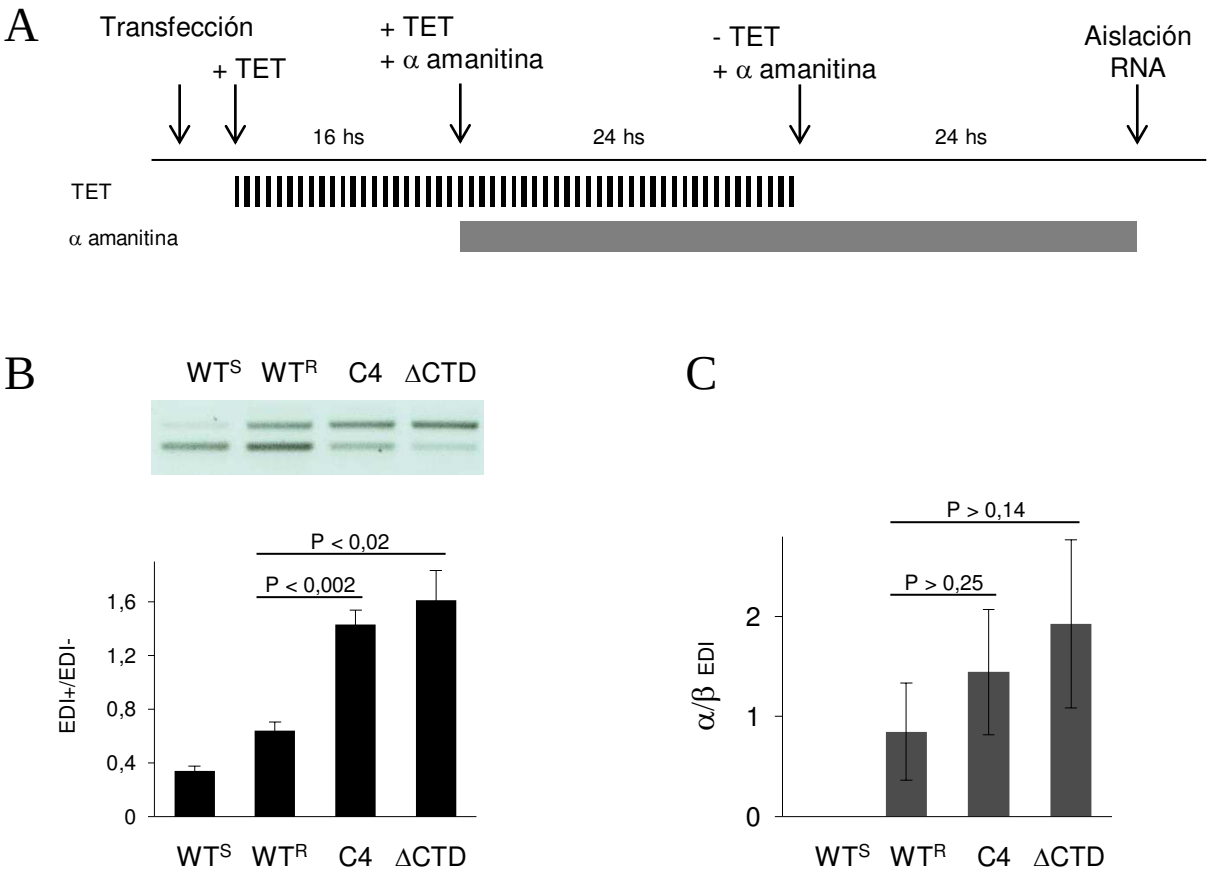

Figura R5. Efecto de distintas polimerasas mutantes. A: protocolo utilizado. Células HCT116 fueron transfectadas con el minigén reprimible por tetraciclina pUHC EDI y con minigenes que codifican para Rpb1 con las mutaciones indicadas; 4 h después se agregó medio con tetraciclina. 16 h más tarde las células fueron cambiadas a medio con tetraciclina y α-amanitina, y 24 h más tarde se cambió a medio con α-amanitina sin tetraciclina. El ARN fue aislado y procesado 24 h más tarde. B: efectos de las polimerasas en la inclusión de EDI: PCR tiempo final y resultado de RT-qPCR. WT^S, Rpb1 WT sensible a α-amanitina; WT^R, C4 y ΔCTD resistentes. C: cuantificación de los intermediarios de inclusión por RT-qPCR.

Este resultado, sumado a la falta de efecto sobre el cociente α/β de tratamientos más indirectos para bajar la elongación como DRB, cuestiona nuestra hipótesis inicial, según la cual una menor velocidad de transcripción favorece la eliminación del intrón río arriba de EDI antes de la síntesis del sitio competidor 3' río abajo forzando la inclusión. En la sección 4.6 veremos resultados que fortalecen una hipótesis diferente sobre el efecto de la reducción de la elongación en la tasa de inclusión de EDI.

La inhibición de la inclusión de EDI por SRp20 está mediada por el CTD de Pol II y la transfección con la polimerasa ΔCTD sube la inclusión de EDI (de la Mata et al 2006 y figura R5 B). En la figura R5 C podemos ver que la mutante ΔCTD tampoco cambia significativamente el orden de remoción de intrones.

4.2 Orden de remoción de intrones en un exón alternativo insensible a la elongación: EDII

Para tratar de entender mejor la relación entre la regulación del *splicing* alternativo y el orden de remoción de intrones, hicimos un estudio más sistemático de los cocientes α/β en distintos eventos de *splicing*. Decidimos analizar un evento de *splicing* alternativo sin regulación cinética, el exón EDII de fibronectina, un evento de *splicing* con regulación cinética inversa a la que se da en EDI (es decir, un evento en el que una mayor elongación aumenta la inclusión), CFTR E9, y un evento de inclusión constitutiva, el exón 28 de fibronectina. Comenzamos por el exón 25 de fibronectina, o EDII, un exón alternativo cuya inclusión no está regulada por elongación. Para ello construimos el minigén pUHC EDII, que tiene un fragmento de FN1 desde el exón 24 hasta el exón 26 en lugar del fragmento FN32-FN34 en pUHC EDI.

No hay pruebas de acoplamiento cinético entre transcripción y *splicing* de EDII. El nivel de inclusión de EDII es el mismo para la transcripción con Pol II WT y C4 en experimentos con minigenes con promotor de α-globina o CMV (de la Mata 2003). En estos experimentos la transcripción de los minigenes por Pol II endógena antes de la adición de α-amanitina puede haber dificultado la detección de cambios en la inclusión de EDII. Utilizamos el minigén reprimible pUHC EDII en células Hep3B para comparar la inclusión de EDII con Pol II WT y C4 minimizando la incidencia de la transcripción previa. También analizamos el efecto de los factores inhibidores de la elongación de Pol II DRB, CPT y flavopiridol siguiendo la misma estrategia. La figura R7 A muestra que ni la polimerasa lenta ni los inhibidores de elongación modifican la inclusión de EDII, confirmando los resultados previos.

La baja eficiencia de transfección de las células Hep3B, la marcada prevalencia de la isoforma de exclusión de EDII en esta línea celular y la disminución en la abundancia de los precursores que producen los inhibidores de elongación y la α-amanitina dificultan la cuantificación de α y β. Repetimos el experimento de transfección de polimerasas en células HCT116, de mayor eficiencia de transfección, y utilizando idéntico diseño de *primers* que para pUHC EDI pudimos obtener el cociente α/β. Igual que sucede con EDI, la polimerasa C4 no cambia el orden de remoción de intrones. Asimismo, la mutante ΔCTD tampoco muestra cambios significativos, aunque se ve una leve baja de α con respecto a β.

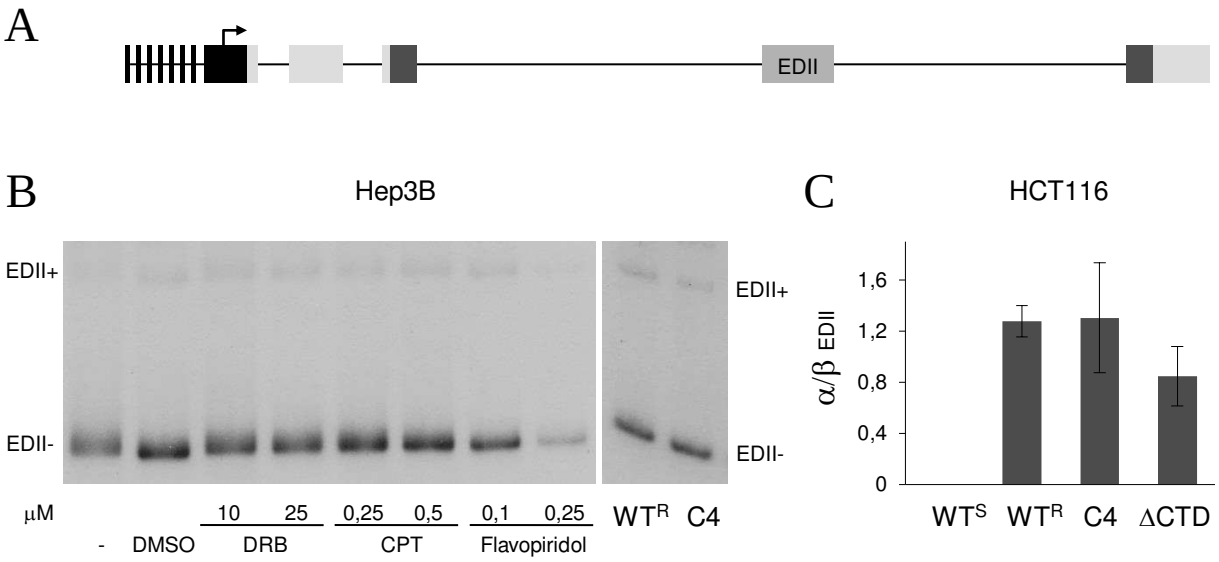

Figura R6. A: esquema del minigén pUHC EDII. Clave de colores como en R2 A. B: elongación de Pol II y *splicing* de EDII. Izquierda: células Hep3B fueron transfectadas con pUHC EDII en presencia de tetraciclina. 24 h más tarde el medio con tetraciclina fue reemplazado por medio con DRB, Flavopiridol o DMSO. Luego de 8 h el ARN fue aislado y la inclusión de EDII fue analizada por RT-PCR. Derecha: células Hep3B fueron transfectadas con pUHC EDII y las polimerasas indicadas. 4 h después se agregó medio con tetraciclina. 16 h más tarde las células fueron cambiadas a medio con tetraciclina y α-amanitina, y 24 h más tarde se cambió a medio con α-amanitina sin tetraciclina. El ARN fue aislado y procesado 24 h más tarde; se muestra inclusión y exclusión de EDII en gel de poliacrilamida. C: Células HCT116 fueron transfectadas con pUHC EDII y las polimerasas indicadas y se siguió con el mismo protocolo que en B, derecha. Los precursores α y β fueron cuantificados por RT-qPCR.

A continuación quisimos saber si la sobreexpresión de proteínas SR influye en el orden de remoción de intrones en este evento de *splicing* alternativo. Transfectamos células Hep3B con pUHC EDII solo o con vectores de expresión de distintas proteínas SR, analizamos el nivel de inclusión de EDII y cuantificamos el cociente α/β. Como vimos en la figura anterior, el grado basal de inclusión es despreciable en esta línea celular. A diferencia de lo publicado en trabajos previos (Kadener et al. 2001), ninguna de las proteínas SR volvió mayoritaria la inclusión de EDII, posiblemente por la

brevedad de los tratamientos, aunque en todos los casos se detectó un pequeño aumento (figura R7 A). En contraste, en todos los casos encontramos cambios significativos en el orden de remoción de intrones (figura R7 B). Observamos que en esta línea celular el intrón río arriba de EDII es eliminado antes que el intrón río abajo, y que todas las proteínas SR utilizadas bajan el cociente α/β, con un efecto mayor para la sobreexpresión de SC35 y SRp55.

Repetimos el experimento en condiciones en que la inclusión de EDII prevalece. Transfectamos células de la línea murina N2A con pUHC EDII y vectores que expresan las proteínas SR y analizamos el *splicing* de EDII y el orden de remoción de intrones. En esta línea celular la isoforma de exclusión es prácticamente indetectable, y la sobreexpresión de las proteínas SR no altera este patrón (figura R7 C).

El análisis del orden de remoción de intrones muestra que el intermediario β prevalece en esta línea celular, en contraste con nuestros resultados en células Hep3B. Esto es consistente con la regulación positiva de la inclusión de EDII por repeticiones en el intrón río abajo que estimulan el uso del sitio 5' débil en este intrón. La sobreexpresión de las distintas SR tiene menor efecto en el orden de remoción de intrones que en células Hep3B, con un aumento del intermediario α relativo a β para SF2 y un aumento de β para SRp55 (figura R7 D).

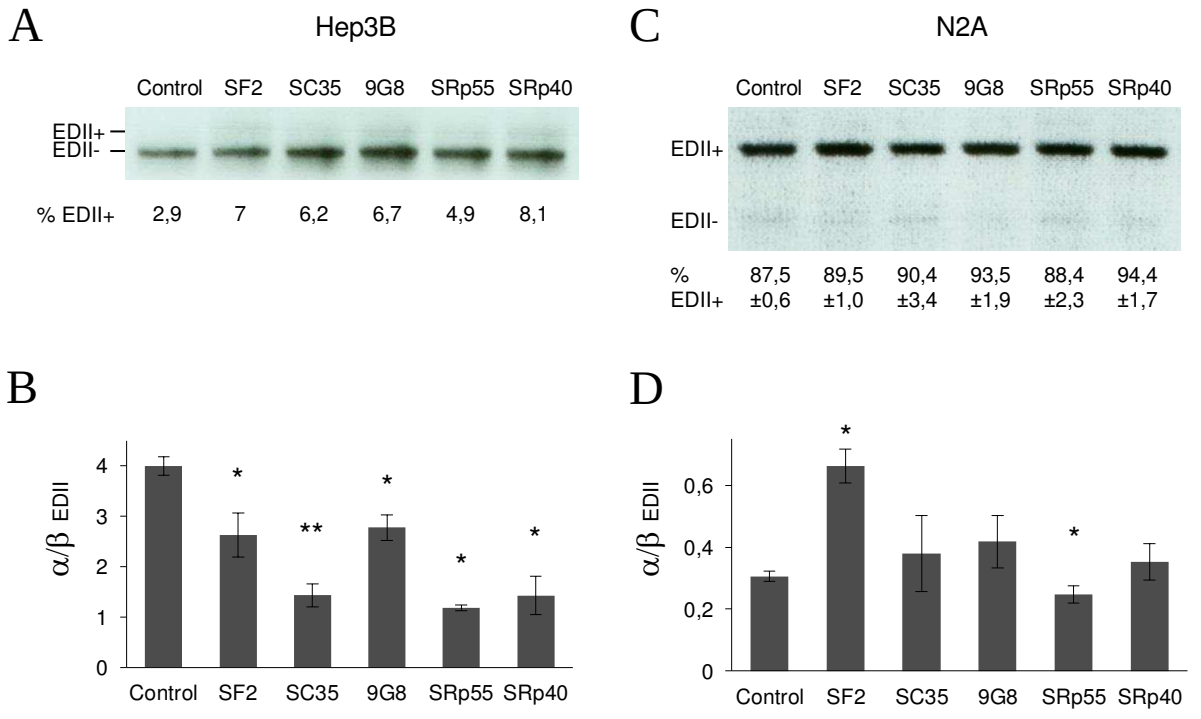

Figura R7. Sobreexpresión de SRs y orden de remoción de intrones alrededor de EDII. A: transfección de pUHC EDII y 200 ng de vector de expresión para las proteínas SR indicadas en células Hep3B. Análisis del *splicing* de EDII por RT-PCR y cuantificación gráfica del nivel de inclusión. B, cuantificación del cociente α/β por RT-qPCR. C: transfección de células N2A con pUHC EDII y las proteínas SR indicadas (100 ng de vector). *Splicing* de EDII analizado por RT-PCR y cuantificación gráfica del nivel de inclusión a partir de un gel con triplicados biológicos. D: cuantificación del cociente α/β como en B.

4.3 Orden de remoción de intrones en un exón constitutivo: FN E28

La fibronectina es una proteína modular, con tres tipos de unidades repetidas a lo largo de su secuencia. Las repeticiones tipo III, de 90 aminoácidos, son las más numerosas, y están codificadas en su mayoría por dos exones contiguos. Los exones alternativos EDI y EDII, de 270 y 273 pb respectivamente, codifican cada uno una repetición de tipo III íntegra y están rodeados de exones menores que codifican media repetición. Con 270 pb, y flanqueado por exones de 90 y 117 pb, el exón constitutivo 28 es el único otro exón en el gen que presenta esa configuración. Construimos el minigén pUHC E28, con el fragmento de E27 a E29 clonado en el exón 3 de α-globina y bajo el promotor TET-off (figura R8 A). Transfectamos células Hep3B con pUHC E28 y evaluamos su *splicing* por RT-PCR. Se detecta una sola banda correspondiente a la isoforma de inclusión (figura R8 B control).

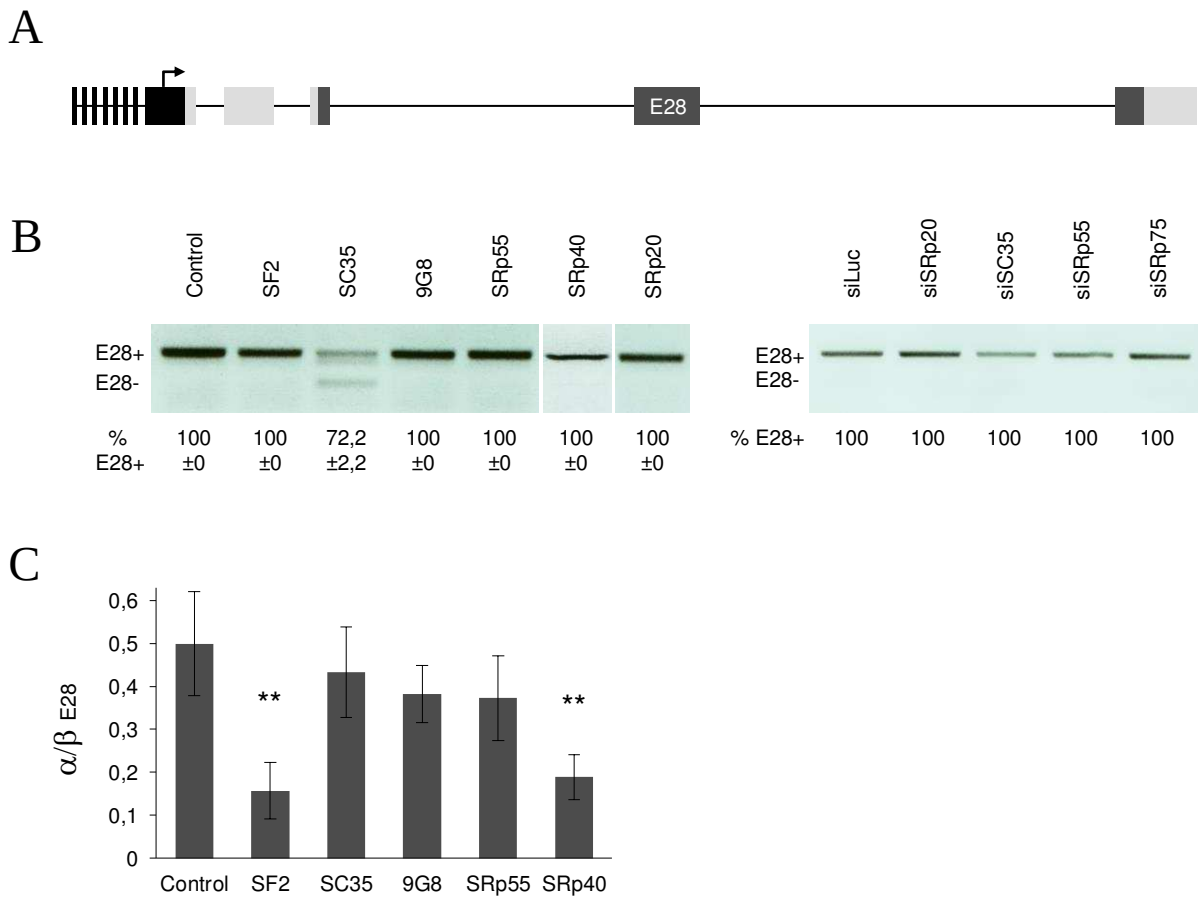

Figura R8. A: minigén pUHC E28. Negro, promotor CMV con 7 operadores TET; gris claro: exones de α-globina. Gris oscuro: exones constitutivos de FN. B: Inclusión de E28 por RT-PCR. Células Hep3B fueron transfectadas con pUHC EDI y 100 ng de plásmidos que expresan las proteínas indicadas (derecha) o con los siRNAs indicados, y 24 h más tarde fueron levantadas en TRI Reagent y las isoformas de *splicing* fueron amplificadas por RT-PCR y corridas en geles de agarosa. El nivel de inclusión fue cuantificado gráficamente. C: Células Hep3B fueron transfectadas con pUHC E28 y 100 ng de los plásmidos indicados, y 24 h más tarde fueron levantadas en TRI Reagent y los intermediarios α y β fueron cuantificados por RT-qPCR.

A continuación modificamos el nivel de expresión de distintas proteínas SR y analizamos el *splicing* por RT-PCR. La sobreexpresión de SF2, 9G8, SRp55, SRp40 o SRp20 o el silenciamiento de SRp20, SRp55 o SRp75 no bajan el nivel de inclusión, como esperábamos para un exón alternativo.

La cuantificación de los intermediarios α y β nos muestra una eliminación preferencial del intrón río abajo de E28 antes del intrón río arriba. La sobreexpresión de SF2 y SRp40 refuerza esta tendencia, reduciendo el cociente α/β a menos de la mitad.

La sobreexpresión de SC35 no modifica el orden de remoción de intrones alrededor del exón 28. Sorprendentemente, tanto en Hep3B como en HCT116 la sobreexpresión de SC35 produce la aparición de una banda de unos 250 pares de bases, consistente con los 245 pb de la isoforma de exclusión. Desconocemos las causas de este fenómeno totalmente inesperado que no hemos analizado en más detalle. Más allá de la naturaleza de la banda detectada o de su relevancia, nos interesó mostrar el contraste entre el efecto sobre el *splicing* y el orden de remoción de intrones. La transfección de siSC35 no tiene efecto sobre el *splicing* del exón 28.

Incubamos células Hep3B transfectadas con pUHC E28 con distintas dosis de DRB, CPT o flavopiridol y analizamos los resultados por RT-PCR. Ninguno de estos tratamientos baja la inclusión de FN E28 (figura R9 A). En cambio, el tratamiento con DRB aumenta el intermediario α con respecto a β (figura R9 B). Resultados análogos se obtienen en células HCT116. Usando el mismo procedimiento que para EDI y EDII, medimos los intermediarios α y β y el nivel de inclusión de E28 en células HCT116 transfectadas con polimerasa WT, C4 o ΔCTD. No observamos cambios con respecto a Pol II WT, ni a nivel de inclusión ni de orden de remoción de intrones (figura R9 C y D).

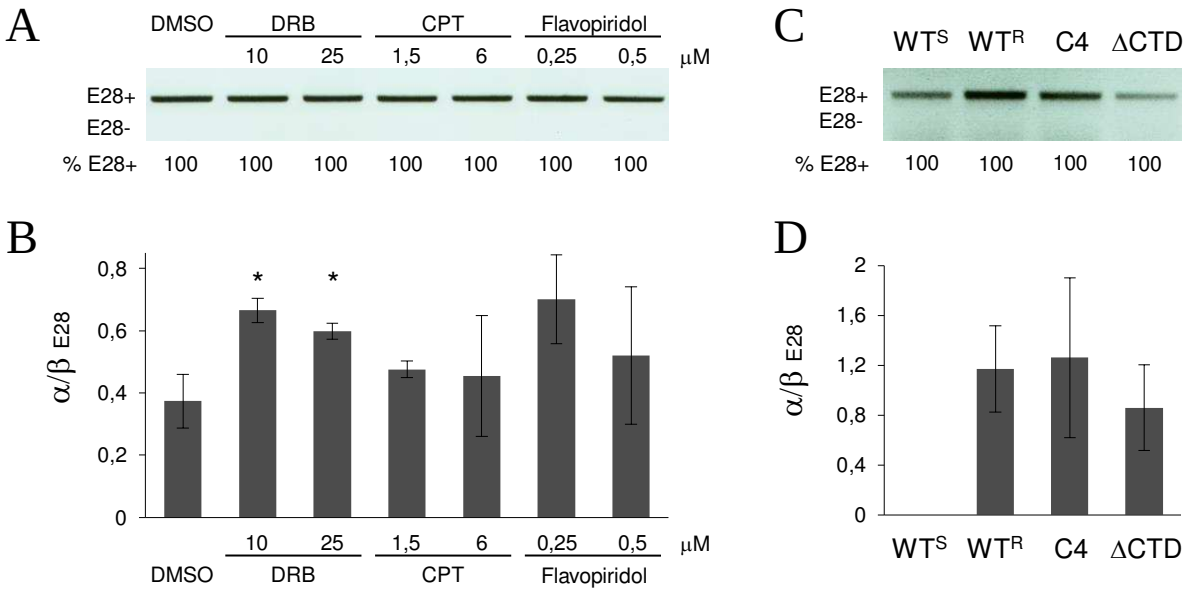

Figura R9. *Splicing* de FN E28 y elongación de Pol II. A: RT-PCR de FN E28 en células Hep3B transfectadas con pUHC E28 y tratadas por 8 h con las dosis indicadas de DRB, CPT o flavopiridol. B: cociente α/β por qPCR para A. C: inclusión de E28 en células HCT116 transfectadas con pUHC E28 y las polimerasas indicadas; se siguió el procedimiento de la figura R5 A. Resultado de RT-PCR. D: cociente α/β por qPCR para C.

4.4 Orden de remoción de intrones en un exón alternativo de regulación cinética inversa: CFTR9

Por último, extendimos nuestro análisis de precursores de inclusión al exón 9 del gen CFTR humano. Al igual que EDI, este exón es regulado por la velocidad de transcripción de Pol II. Pero mientras que la inclusión de EDI aumenta si se obstaculiza la elongación, en las mismas condiciones la inclusión de CFTR9 baja. Esta regulación cinética depende del reclutamiento del regulador negativo de la inclusión ETR3 al intrón río arriba; la sobreexpresión de este factor anula el efecto de bajar la elongación en la inclusión de CFTR9. ETR3 se une a las repeticiones UG de la secuencia polimórfica (UG)nUm en el intrón 8 y desplaza a U2AF65 de las repeticiones Um *in vitro* (Dujardin et al 2010). Un mayor número de repeticiones UG baja la inclusión del exón 9 mientras que un mayor largo de la secuencia Um permite la unión de U2AF65 independientemente de ETR3. Utilizamos distintos minigenes que poseen el último tramo del intrón 8, el exón 9 y el primer tramo del intrón 9 rodeados de los intrones y exones que flanquean a EDII. Medimos el orden de remoción de intrones alrededor de CFTR9 en un minigén con el promotor de fibronectina y con la variante TG11T5 del polimorfismo. Tanto en células HEK293T como en HCT116 la inclusión del exón es casi total con este promotor, y el intermediario β es mayoritario. También en ambas líneas, la sobreexpresión de ETR3 aumenta tanto la isoforma de exclusión como el cociente α/β (figura R10 B y C y no mostrado).

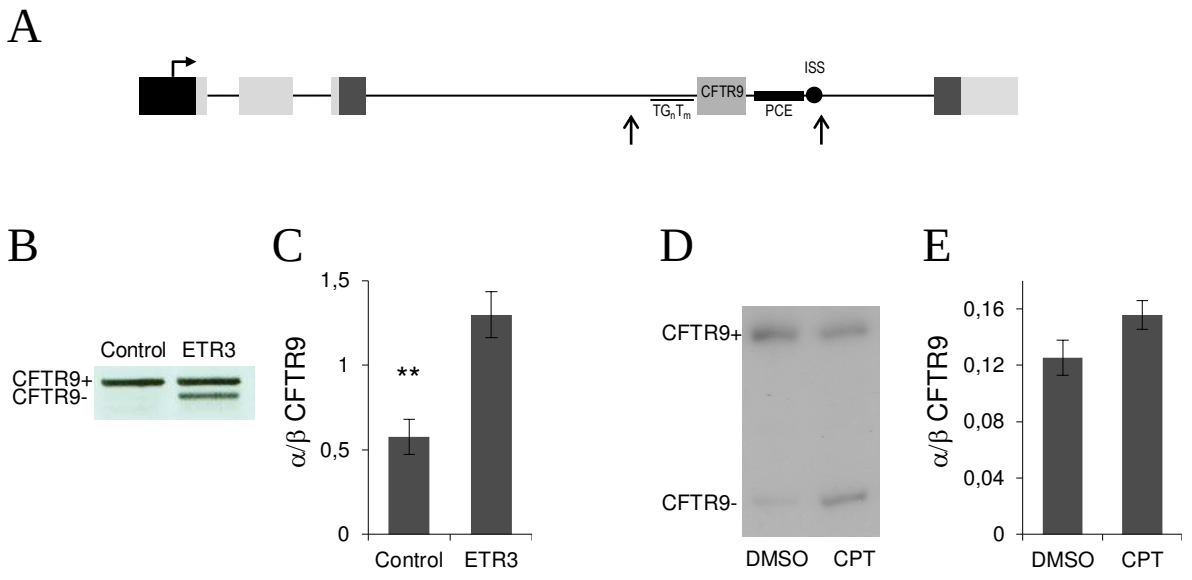

Figura R10. A: esquema de los minigenes CFTR. Negro, promotor FN o SV40; gris claro, secuencias de a-globina; gris oscuro, exones 24 y 26 de fibronectina; gris medio, CFTR9; flechas, límites del inserto de CFTR en el minigén de EDII. Se señala la posición de las secuencias intrónicas reguladoras TGnTm y PCE e ISS. B-E: resultados para el minigén pFN CFTR TG11T5. B: lnclusión y exclusión de CFTR9 en células HCT116 transfectadas con pFN CFTR y con o sin un plásmido que codifica para ETR3; análisis por RT-PCR. C: cuantificación de la tasa α/β para B. D: inclusión y exclusión en células HCT116 transfectadas con el minigén y tratadas con 6 μM CPT o con vehículo y analizadas por RT-PCR. E: cuantificación de α/β por qPCR para D.

El tratamiento de las células con camptotecina produce un aumento de la exclusión de CFTR E9, en concordancia con el modelo cinético; tratamos células transfectadas con pFN CFTR TG11T5 con 6 μM CPT y medimos el orden de remoción de intrones. No se detectan cambios en la tasa α/β (figura R10 E) pero se observa una fuerte disminución de ambos precursores (no mostrado). Además, el cociente α/β es el mismo en células HCT116 transfectadas con el vector TET-off pUHC CFTR TG11T5 (similar a pFN CFTR TG11T5 pero con el promotor reprimible por tetraciclina) si se sobreexpresa la polimerasa WT o la mutante C4 y se sigue el protocolo de la figura R5.

El orden de remoción de intrones se modifica en las distintas variantes del polimorfismo (TG)n Tm

Proseguimos el análisis de los intermediarios de inclusión en minigenes bajo el promotor SV40. Utilizamos los vectores pSV40 CFTR TG11T5, pSV40 CFTR TG11T9 y pSV40 CFTR ΔTG T5, que difieren entre sí sólo en el locus polimórfico río arriba del exón 9. En la variante TG11T9 la inclusión es total ya que el reclutamiento de U2AF65 puede ser simultáneo con el de los factores inhibidores; en el caso de ΔTG estos reguladores negativos no tienen sitio de unión al ARN. Podemos observar que en células HCT116 tanto TG11T9 como ΔTG aumentan su tendencia a eliminar el intrón río arriba primero (figura R11 B), un resultado coherente con un mayor reclutamiento de U2AF65.

La sobreexpresión de distintos reguladores de la inclusión de CFTR9 modifica el orden de remoción de intrones

Además de ETR3 se han identificado varios factores que regulan la inclusión de CFTR9, como TDP43, PTB, SF2 y TIA1. De todos ellos, solamente TIA1 aumenta la inclusión del exón, siendo todos los otros reguladores negativos. Al igual que ETR3, TDP43 se une a las secuencias UG e inhibe la inclusión de CFTR9 (Buratti et al. 2001); sin embargo no está implicado en la regulación cinética. SF2 es reclutado al elemento ISS en el intrón 9 (Buratti et al. 2007) y TIA1 y PTB se unen al elemento PCE (Zucatto et al. 2004). Sobreexpresamos estos reguladores en células HCT116 transfectadas con pSV40 CFTR TG11T5 y analizamos la inclusión de CFTR9 y el orden de remoción de intrones. Los resultados se muestran en la figura R11, C y D. Al igual que cuando la transcripción está iniciada en el promotor FN, la sobreexpresión de ETR3 sube el cociente α/β; aunque el efecto es mucho menor con el promotor SV40, es estadísticamente significativo. TIA1 baja el cociente α/β, un

efecto consistente con su mecanismo de acción, la estimulación del sitio débil 5' del intrón 9. Se ha postulado que PTB inhibe la inclusión de CFTR9 mediante su multimerización a lo largo de varios sitios en el exón y en el intrón río abajo, y observamos una disminución de la eliminación del intrón río abajo luego de su sobreexpresión. En contraste, TDP43 actúa inhibiendo el reconocimiento del sitio 3' en el intrón río arriba, y el cociente α/β muestra una baja relativa en el intermediario que eliminó este intrón. La sobreexpresión de SF2 baja el cociente α/β, indicando una inhibición de la eliminación del intrón río arriba. Tal como se esperaba, ETR3 y PTB bajan la inclusión de CFTR9, mientras que TIA1 la aumenta; este último efecto es apenas detectable debido al alto nivel de inclusión basal. En contraste, es más evidente el aumento del uso de un sitio críptico de *splicing* en el exón CFTR9, que da lugar a un producto de inclusión más corto, luego de la sobreexpresión de TIA1. Como se ha descripto previamente (Dujardin et al. 2010), la sobreexpresión de TDP43 no produjo una baja significativa de la inclusión para este minigén (figura R11 C).

A continuación transfectamos el minigén TG11T9 y comparamos el cociente α/β en células que sobreexpresan ETR3 y en células control. ETR3 apenas baja el nivel de inclusión en este minigén (figura R11 E), pero en contraste su efecto sobre el orden de remoción de intrones se mantiene (figura R11 F).

Por último analizamos la sobreexpresión de distintos factores en el *splicing* del minigén ΔTG. Aunque la isoforma de exclusión es indetectable tanto en el control como en la sobreexpresión de TIA1 y PTB, estas proteínas tienen el mismo efecto en el orden de remoción de intrones que observamos para el minigén TG11T9 (figura R11 H). Esto puede deberse a que la mutación ΔTG favorece el reclutamiento de U2AF65 al intrón río arriba, aumentando el procesamiento de este intrón y así volviendo mayoritaria la inclusión, pero inicialmente no modifica el procesamiento del intrón río abajo, que es estimulado por TIA1 e inhibido por PTB. Las moléculas que escindieron el intrón río arriba pero que no eliminaron el intrón río abajo debido a la inhibición de PTB son intermediarios α y eventualmente se terminan de procesar dando la isoforma de inclusión.

Observamos que la sobreexpresión de ETR3 sigue teniendo efecto en el orden de remoción de intrones (figura R11 H) y aumentando la exposición de los geles detectamos una pequeña banda de exclusión (figura R11 G, derecha). Esto puede ser un indicio de que ETR3 es reclutado al mutante ΔTG, aunque ineficientemente.

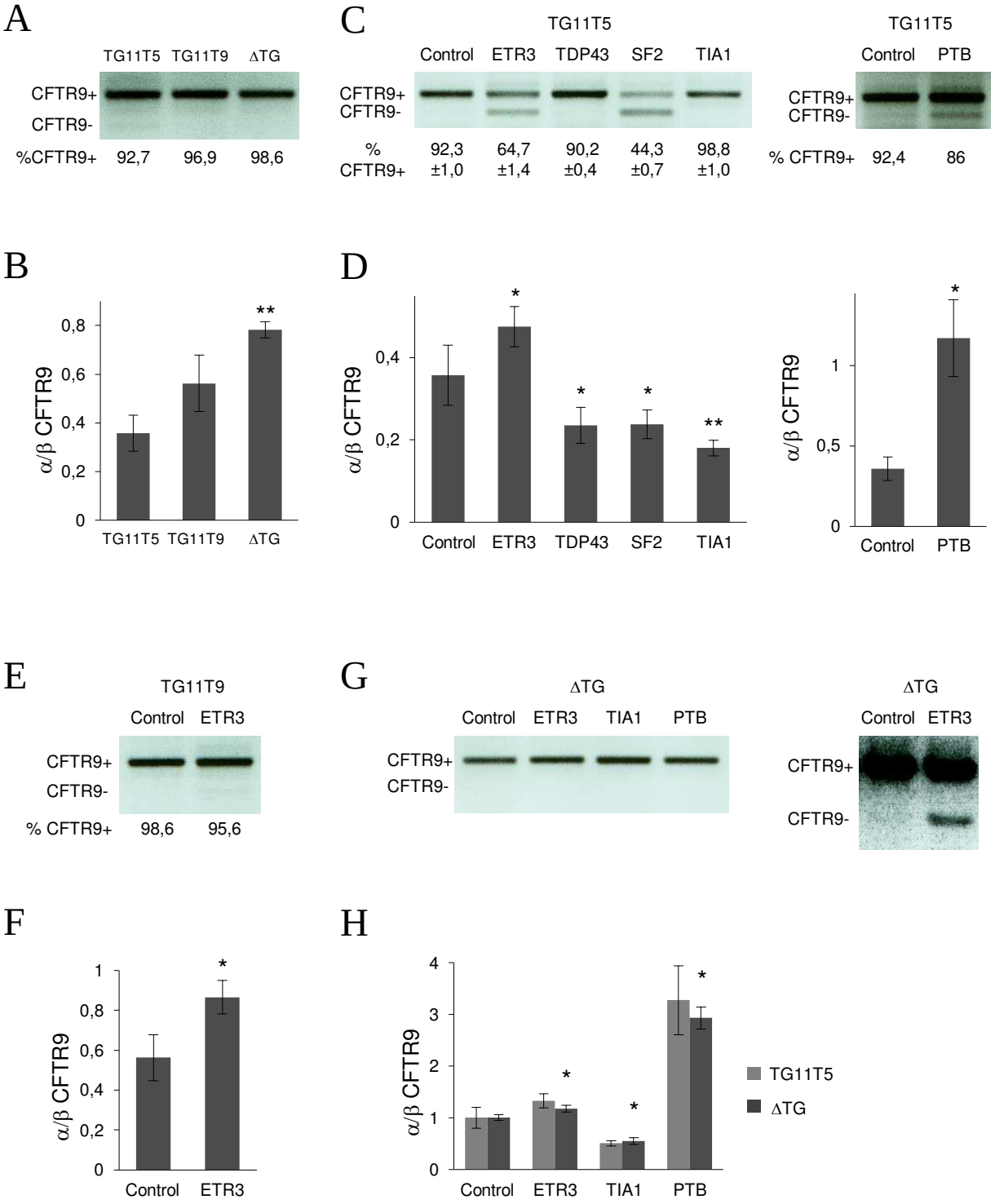

Figura R11. Transfección de minigenes CFTR con el promotor SV40. Células HCT116 fueron transfectadas con un minigén pSV40 CFTR con el polimorfismo indicado (A-H) y con vectores para la sobreexpresión de los factores indicados (C-H). El ARN fue aislado, la tasa de inclusión de CFTR9 fue analizada por RT-PCR (A; C; E; G) y cuantificada gráficamente (A; C; E); el cociente α/β fue determinado por RT-qPCR (B; D; F; H). A y B: comparación de los polimorfismos TG11T5, TG11T9 y ΔTG. C y D: Análisis para TG11T5 y ETR3, TDP43, SF2, TIA1 o PTB, o control. E y F: Análisis para TG11T9 y ETR3 o control. G y H: Análisis para ΔTG: el cociente α/β se grafica relativizado al control, junto con los resultados para TG11T5 para su comparación. Arriba derecha, imagen sobreexpuesta de gel de agarosa mostrando el aumento de la isoforma de exclusión con ETR3. Esta foto corresponde a un gel distinto del de la izquierda.

ETR3 y TIA1 presentan efectos opuestos tanto en la inclusión de CFTR9 como en el cociente α/β. Para saber si estos efectos están directamente correlacionados, transfectamos células HCT116 con 500 ng de vector que expresa ETR3 y cantidades crecientes de vector de TIA1, o 500 ng de vector de TIA1 y cantidades crecientes de vector de ETR3, y analizamos la inclusión de CFTR9 y los intermediarios de inclusión.

La figura R12 muestra que tanto TIA1 como ETR3 pueden revertir en alguna medida el efecto del otro factor en la inclusión de CFTR9. En contraste, el patrón de remoción de intrones de TIA1 prevalece en todos los casos en los que esta proteína es transfectada independientemente de la cantidad de ETR3. Esto no es tan sorprendente visto que en este experimento particular ETR3 por sí solo casi no tuvo efecto sobre el orden de remoción de intrones. Sin embargo, su efecto sobre la tasa de inclusión es evidente. No existe por lo tanto una correlación directa entre el efecto sobre el *splicing* y el efecto sobre el orden de remoción de intrones.

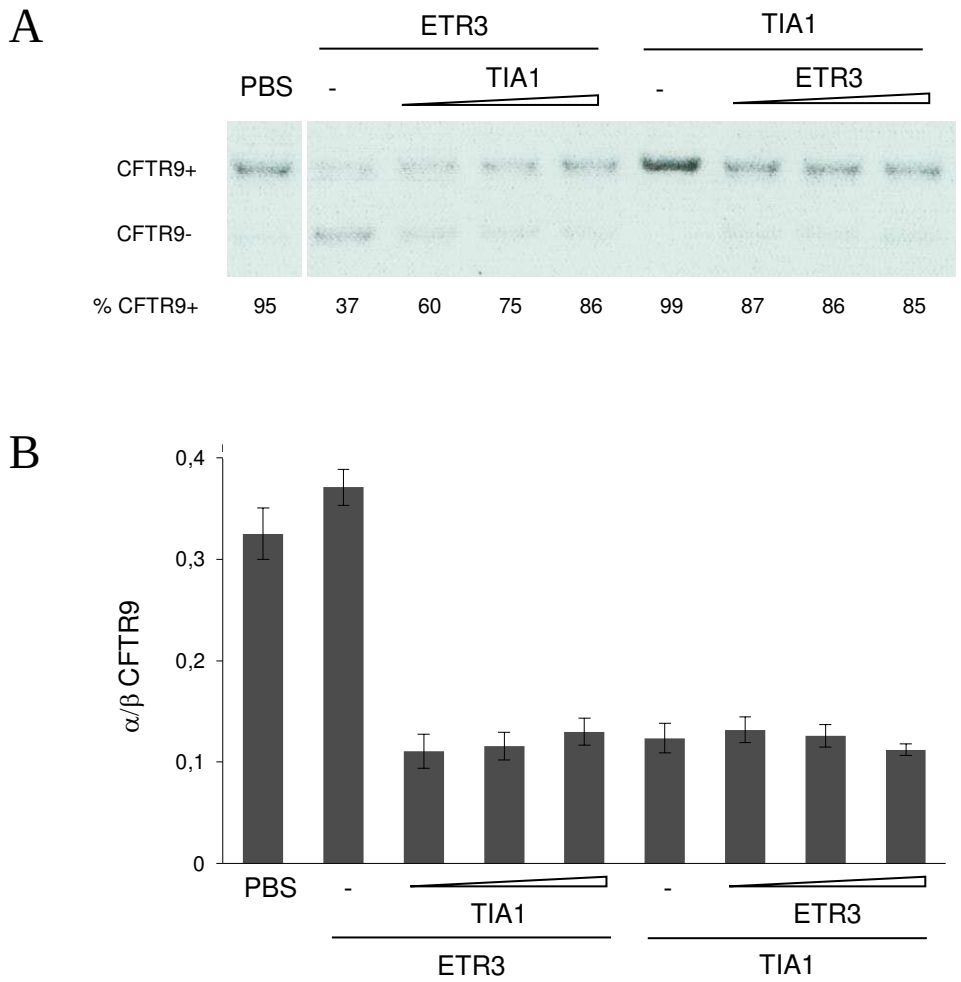

Figura R12: A: células HCT 116 fueron transfectadas con pSV40 CFTR TG11T5 y 500 ng de ETR3 y cantidades crecientes de TIA1 o viceversa. 24 h más tarde el ARN fue extraído y el *splicing* del minigén fue analizado por RT-PCR. Abajo, cuantificación gráfica del porcentaje de inclusión. B: cuantificación por RT-qPCR de los intermediarios α y β en el ARN obtenido en A.

4.5 Medida de la elongación de Pol II *in vivo*

En la sección anterior aplicamos un número de métodos para cambiar la tasa de elongación de Pol II. Experimentos de FRAP demuestran que la tasa de elongación es menor *in vivo* para la polimerasa mutante que para la WT (Boireau et al. 2007), y para células tratadas con CPT que para células control (Boireau et al. 2007; Darzacq et al. 2007). El FRAP permite evaluar la movilidad de moléculas marcadas fluorescentemente, y consiste en una medida de la recuperación de la fluorescencia en un punto dado luego de la destrucción con láser de los fluoróforos en ese punto. Los experimentos de FRAP dan información de la cinética de transcripción sólo para genes reporteros con repeticiones de sitios de unión a fluoróforos transfectados establemente a células, lo cual no permite evaluar la elongación en el gen que uno está estudiando como modelo. Recientemente, Singh y Padgett desarrollaron un método que permite medir la tasa de elongación promedio a lo largo de cualquier gen endógeno *in vivo* (Singh y Padgett, 2009). El mismo consiste en el bloqueo del paso de iniciación a elongación con una fuerte dosis del inhibidor de P-TEFb DRB; las polimerasas ya fosforiladas y en elongación procesiva no son afectadas por el bloqueo, aunque su tasa de elongación baje, y continúan transcribiendo hasta la terminación de la transcripción. El lavado del DRB permite un rápido desbloqueo de Pol II, que entra en fase de elongación. Luego del lavado se toman muestras a intervalos regulares y las células son lisadas con TRI Reagent para obtener RNA. Distintos precursores que no sufrieron *splicing* a lo largo del gen de interés son cuantificados por RT-qPCR; la aparición de estos precursores en el transcurso del tiempo permite monitorear el avance de Pol II. El protocolo se esquematiza en la figura R13. El tiempo de incubación con DRB se ajusta para asegurar que los transcriptos sintetizados antes de su lavado sean procesados antes del desbloqueo.

La modulación de la elongación es central para el modelo de acoplamiento cinético entre *splicing* y transcripción. Quisimos comprobar directamente el efecto inhibidor de nuestros tratamientos sobre la elongación de Pol II en fibronectina. En la publicación original los distintos amplicones dentro de un mismo gen están separados por cientos de kilobases, mientras que nuestros minigenes tienen apenas 4 kb, una distancia que no esperamos que el método pueda resolver debido a que la tasa de transcripción de Pol II ha sido estimada en 2-4 kb/min (Singh y Padgett, 2009). Decidimos entonces medir elongación en el gen endógeno de fibronectina, de 74 kb. Diseñamos amplicones en los extremos del gen, que llamamos *1* y *46* respectivamente y también en intrón 29-exón 30 y en exón 35-intrón 35 (de aquí en adelante llamados *29* y *35*), con el objetivo de tratar de obtener medidas en una región más acotada alrededor de EDI. Incubamos células Hep3B con DRB 100 o 300 μM por 3 h, 4,5 h o 6 h y monitoreamos la desaparición de los productos de PCR. En ninguno de los casos observamos la desaparición total de los pre-ARNm no espliceados, pero para 300 μM y 4h 30’ su abundancia se reduce por un factor cercano a diez en todos los amplicones. Una

incubación de 6 h reduce un poco más los productos de PCR *29*, *35* y *46* pero produce un ligero aumento del producto *1*, de manera que nos decidimos por un tratamiento de 5 h.

De acuerdo con esto, incubamos células confluentes Hep3B con 300 μM DRB por 5 h. En el tiempo 0 del experimento lavamos el DRB con PBS dos veces y agregamos medio fresco sin DRB, e incubamos las células a 37ºC por distintos períodos de tiempo hasta el lisado con TRI Reagent. Tomamos muestras cada 5 minutos haciendo triplicados de cada punto de tiempo. Luego aislamos y digerimos con DNasa I el ARN y retrotranscribimos 1 μg de cada replicado con *random primers*. Cuantificamos por *real time* PCR los distintos amplicones y graficamos las abundancias de los precursores en función del tiempo, relativizadas a un control no tratado con DRB.

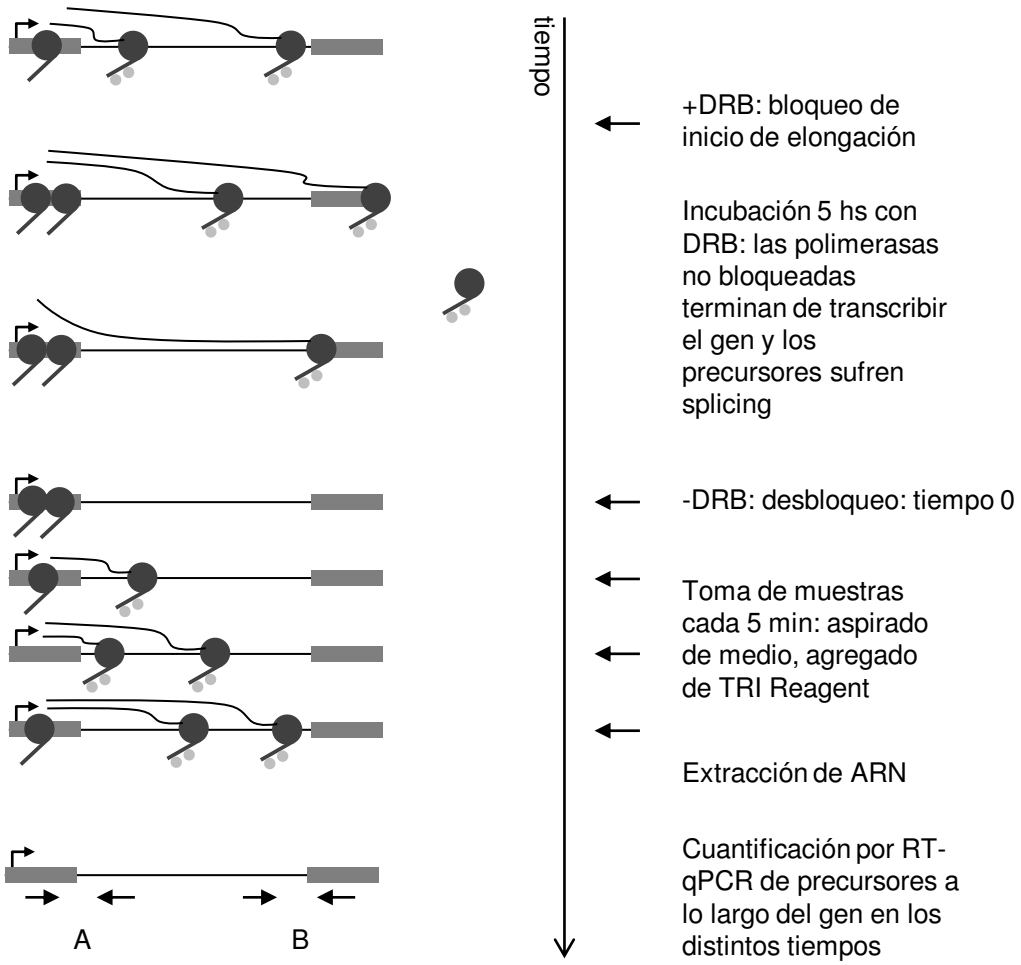

Figura R13: método de Singh y Padgett para medir la elongación de Pol II. Derecha, diseño experimental. Izquierda, gen hipotético y Pol II bloqueada o en elongación activa en las fases del experimento descriptas a la derecha; el tiempo transcurre de arriba abajo. Círculos grises: fosforilación en serina 2 del CTD de Pol II. Abajo, posición de los amplicones .

La figura R14 A muestra los resultados obtenidos para los amplicones *1*, *29* y *35*. El producto *1* empieza a detectarse por encima del nivel basal para t = 10 min, y alcanza su abundancia máxima en t = 35 min, luego de lo cual entra en una meseta y vuelve a bajar; esta bajada parcial se debe muy probablemente al *splicing* del intrón 1. El producto *29* empieza a detectarse a los 25-30 min y *35* a los 30 min; ninguno de ellos llega a la meseta en los 50 min del experimento. Pol II tarda entonces aproximadamente 15-20 min para transcribir 51 kb entre los amplicones *1* y *29*, y 20 min para transcribir 58 kb hasta el amplicón *35*. Promediando los valores de las tres estimaciones posibles, tenemos una tasa de elongación de 2,9 ± 0,4 kb/min, un valor similar a los 3,8 kb/min obtenidos por Singh y Padgett pero ligeramente más bajo.

Las curvas de amplificación de *29* y *35* son prácticamente indistinguibles, indicando que una separación de 7 kb entre amplicones está por debajo del límite de resolución del método. Esto nos impide analizar cambios en la elongación de Pol II en una zona más acotada alrededor de EDI.

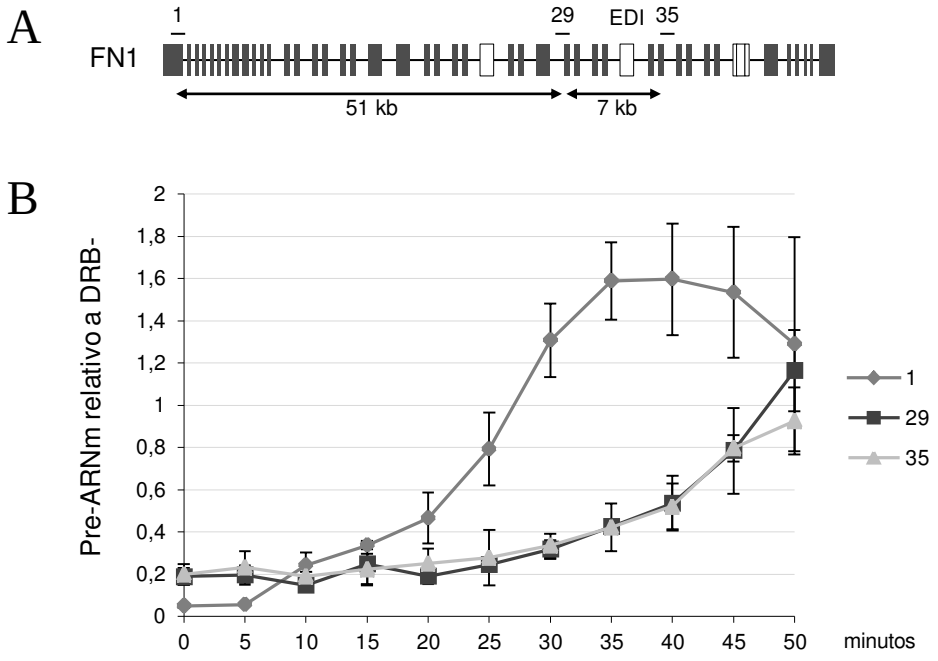

Figura R14: transcripción de fibronectina endógena en células Hep3B. A: posición de los amplicones analizados en FN1 y distancias en kb. B: La elongación de nuevos transcriptos fue bloqueada en células Hep3B confluentes con 300 μM DRB por 5 h. El medio con DRB fue lavado dos veces con PBS y nuevo medio fue agregado. Las células fueron incubadas a 37ºC y a los tiempos indicados el medio fue reemplazado por TRI Reagent. La aparición de los distintos precursores fue medida por RT-qPCR y se grafica relativizada a la cantidad de los mismos precursores en células no tratadas con DRB.

La camptotecina disminuye la elongación de Pol II en el gen de fibronectina

En paralelo llevamos a cabo el experimento en presencia de camptotecina. Llevamos a cabo el procedimiento descripto pero 15 min antes del desbloqueo cambiamos a medio con 6 μM CPT y 300 μM DRB; el medio agregado luego del lavado del DRB también contenía 6 μM CPT. La camptotecina no modifica la aparición del precursor *1*, que empieza a detectarse en t = 10 min (figura R15 B). Esto indica que el fármaco no afecta de manera sensible la iniciación de la transcripción ni el paso a elongación procesiva. En contraste, los productos de PCR *29* y *35* no llegan a levantar en los 50 min del experimento (figura 15 C y D), mientras que en el experimento control eran detectados a los 30 min. Esto es consistente con una menor velocidad de elongación debida al tratamiento.

La camptotecina baja la abundancia de los precursores, como observamos en el gráfico que compara el producto *1* en células control o tratadas con CPT (figura R15 B). Los experimentos con y sin camptotecina fueron realizados en simultáneo con la misma densidad de células por placa y están relativizados al mismo control, de modo que las diferencias en los números obtenidos reflejan la diferente abundancia de los precursores en las células. En los experimentos de orden de remoción de intrones también notamos una disminución de los precursores α y β luego del tratamiento con CPT (no mostrado). Adjudicamos este efecto a una baja en la procesividad. Consistentemente con esta hipótesis, CPT induce la formación de complejos covalentes de ADN - topoisomerasa I (Hsiang et al. 1985) que provocan la terminación prematura de la transcripción *in vitro* (Bendixen et al. 1990).

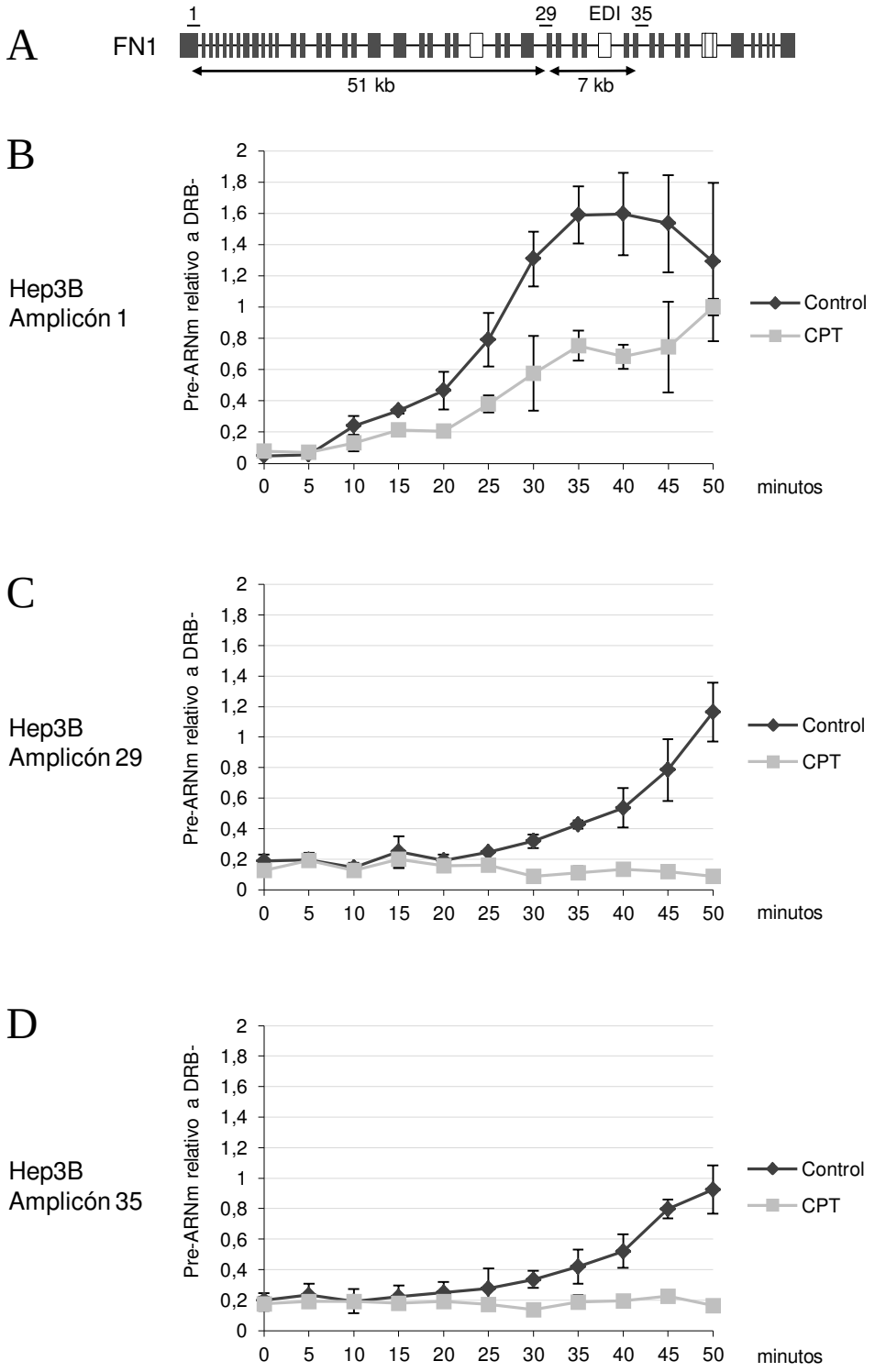

Figura R15. Elongación de Pol II con o sin camptotecina. Se siguió el procedimiento indicado en la figura R14; para CPT, las células fueron tratadas con 6 mM CPT 15 min. antes del lavado de DRB y durante la incubación post lavado. A: esquema de amplicones. B, C y D: comparación de la aparición de los productos de PCR con y sin tratamiento con CPT.

La velocidad de transcripción en el gen de fibronectina es similar en las líneas celulares Hep3B y HCT116

Repetimos el análisis de elongación en otro tipo celular, HCT116, en células control y en células tratadas con camptotecina. En la figura R16 A vemos que para el control el producto de PCR *1* nuevamente es detectable a los 10 min, mientras que el producto *46* aparece a los 45 min. Pol II necesita entonces unos 35 min para transcribir 74 kilobases, una tasa de elongación de 2,1 kb/min que es similar a la calculada para Hep3B. Notamos además que después de su aparición inicial el producto *1* entra en una meseta hasta t = 20 min, un patrón también observado en células Hep3B y que quizá se deba a algún tipo de ciclo de iniciación.

La expresión de fibronectina endógena parece ser menor en HCT que en Hep3B; por ejemplo, la detección de los intermediarios α y β de fibronectina endógena en esta línea nunca funcionó en nuestras manos. Los precursores que medimos en este experimento son asimismo menos abundantes que en células Hep3B, lo que disminuye la señal con respecto al ruido. Esto es especialmente problemático en el caso de células tratadas con camptotecina. En la figura R15 B podemos observar que el producto de PCR *1* sigue esencialmente la misma curva en células control y en células tratadas con 6 μM CPT; sin embargo, la poca abundancia de *1* en células tratadas con CPT hace que todos los puntos anteriores a t = 45 min caigan dentro del ruido. Finalmente, al igual que sucede en Hep3B para *29* y *35*, el precursor *46* no se detecta por arriba del nivel basal en células tratadas con CPT.

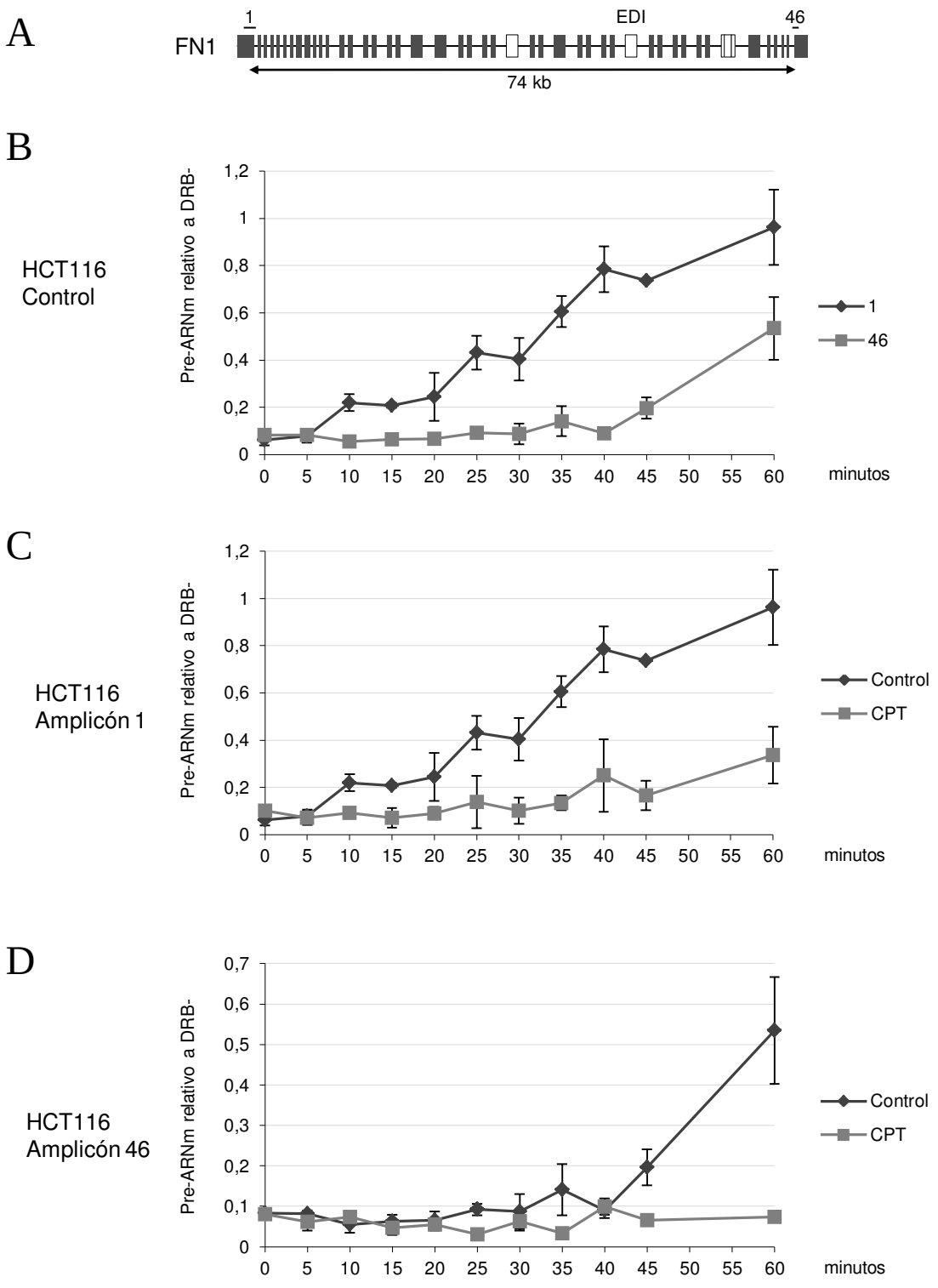

Figura R16: transcripción de fibronectina endógena en células HCT116. A: posición de los amplicones analizados en FN1 y distancias en kb. B: Aparición de precursores a distintos tiempos luego del lavado de DRB en células HCT116 confluentes siguiendo el procedimiento detallado en R14 B. C: comparación de la aparición del amplicón con y sin y con tratamiento con CPT como se describe en R14 C. D: comparación de la aparición del amplicón 46 con y sin tratamiento con CPT.

4.6 Elongación de Pol II y Reclutamiento de U2AF65

Está ampliamente documentado en la literatura que una menor elongación de Pol II aumenta la inclusión de EDI. Por otra parte, comprobamos en secciones anteriores que la disminución de la elongación de Pol II no aumenta la eliminación del intrón río arriba de este exón. Por lo tanto debe existir un mecanismo de aumento de la inclusión de EDI que no implique cambios en el patrón de escisión de los intrones. La hipótesis más sencilla es una ligera variante de nuestra propuesta inicial. Una menor velocidad de transcripción crea una ventana de tiempo antes de la síntesis del sitio 3' río abajo de EDI para que el sitio débil río arriba se una a U2AF65 y forme el complejo A con el sitio dador, comprometiendo al pre-ARNm a la inclusión de EDI. Sin embargo, la cinética de los pasos siguientes es lenta, y el intrón río abajo es reconocido y eliminado antes de que el intrón río arriba se termine de procesar.

Según esta nueva hipótesis, una disminución de la elongación de Pol II debe resultar en un mayor reclutamiento de U2AF65 al sitio débil río arriba de EDI en detrimento del sitio fuerte río abajo. Decidimos comprobar si éste es el caso mediante inmunoprecipitación del ARN unido a proteínas de interés, la técnica llamada en inglés *RNA IP* (inmunoprecipitación del ARN). Esta técnica detecta la unión *in vivo* de proteínas específicas a secuencias determinadas de ARN de manera análoga a la inmunoprecipitación de la cromatina en el caso del ADN. Las células vivas son tratadas con un reactivo que produce entrecruzamientos covalentes entre proteínas y ácidos nucleicos; luego son lisadas y el ADN es digerido. El ARN es fragmentado, y el lisado es inmunoprecipitado con un anticuerpo contra la proteína en estudio; las secuencias de ARN unidas a esta proteína también precipitan. El ARN en el precipitado es extraído y las secuencias de interés son cuantificadas; la cantidad de estas secuencias en el inmunoprecipitado es proporcional a su unión a la proteína *in vivo*.

Se muestra un esquema de la técnica en la figura R17.

Este método nunca había sido utilizado en el laboratorio y su puesta a punto constituyó una parte sustancial de este trabajo de tesis que redundó en un aporte significativo para varios proyectos del grupo.

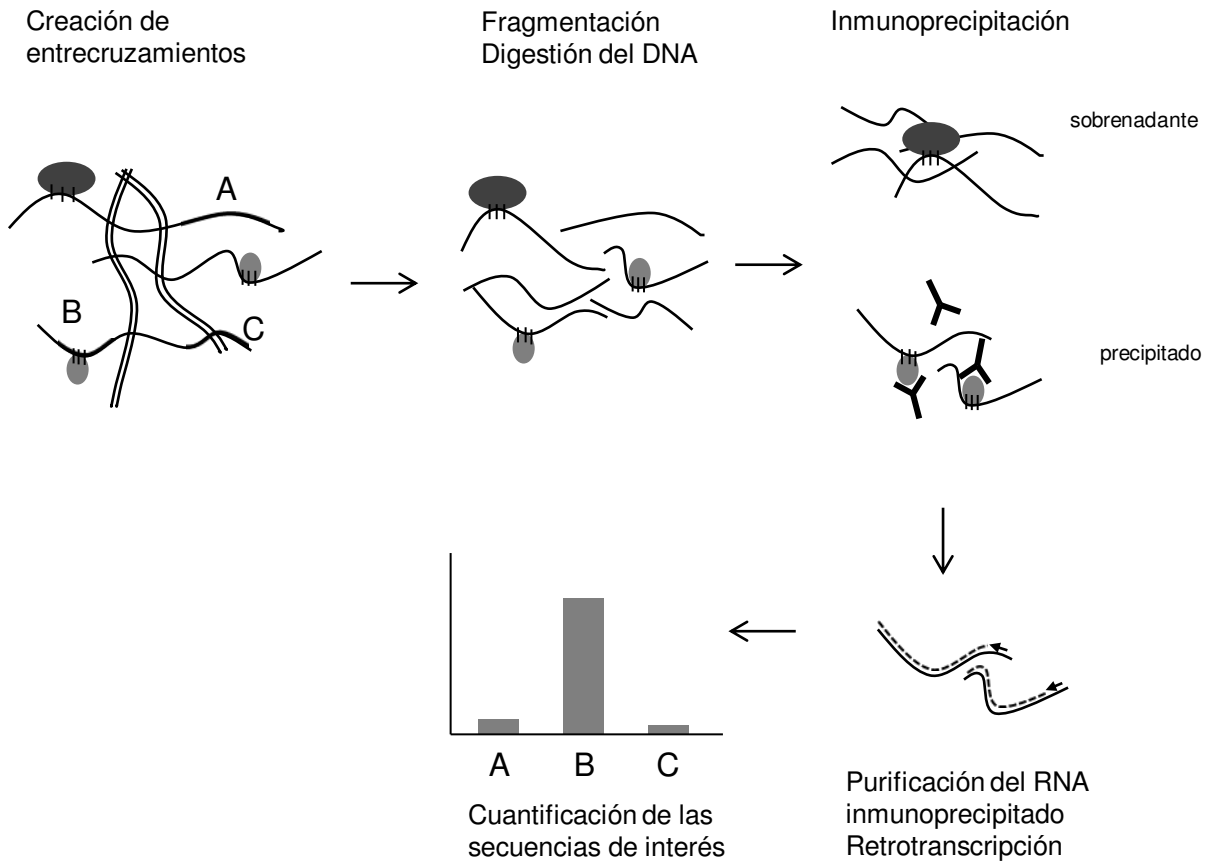

Figura R17. Inmunoprecipitación del ARN. En un cultivo celular se crean entrecruzamientos entre ácidos nucleicos y proteínas. Luego de la lisis celular, se digiere el ADN y se fragmenta el ARN por métodos físicos o enzimáticos. Se precipitan la proteína de interés y las secuencias de ARN unidas a ella. Se revierte el entrecruzamiento, se extrae el ARN y se lo analiza por RT-PCR cuantitativa. La proporción de una secuencia determinada en el inmunoprecipitado con respecto al *input* es igual a la proporción de esa secuencia unida a la proteína *in vivo* con respecto a la cantidad total de la secuencia en la célula. Líneas triples: entrecruzamientos. Líneas sencillas: ARN. Líneas dobles: ADN. Líneas punteadas: ADNc. Líneas más gruesas: secuencias de interés A, B y C.

Diseñamos dos amplicones. EDI pY abarca el sitio 3' débil río arriba de EDI, y E34 pY abarca el sitio 3' fuerte río arriba del exón 34. A continuación buscamos las condiciones óptimas de reversión de los entrecruzamientos. Los protocolos de ChIP generalmente incluyen una incubación de varias horas a 65ºC en presencia de proteinasa K. El ADN es mucho más estable que el ARN y sobrevive incubaciones prolongadas a altas temperaturas; aplicar en ARN las condiciones usadas para ADN implica un riesgo de degradación. Encontramos en la literatura tres protocolos básicos de reversión de entrecruzamiento para ARN. El primero consiste en la incubación 1 h a 42ºC con proteinasa K seguida de 5 h o más a 65ºC y es similar al seguido en ChIP; el segundo usa condiciones más suaves, sólo 2 h a 62ºC con proteinasa K; el último consiste en una incubación a más alta temperatura (70ºC) pero por corto tiempo, 1 h o menos, con o sin proteinasa K. Además existen variantes con un paso breve a

95ºC. Pusimos a prueba estos protocolos en células Hep3B y células HaCaT en las que indujimos entrecruzamiento con formaldehído y luego purificamos el ARN con TRI Reagent y lo corrimos en un gel nativo de agarosa 1%. En este tipo de gel el ARN no corre según su tamaño; sin embargo las preparaciones de ARN total dan siempre el mismo patrón de bandas de ARN ribosomal, que se ven con nitidez y corren siempre con el mismo peso aparente. Como lo que nos interesaba era evaluar la cantidad e integridad del ARN luego de la reversión del entrecruzamiento, el uso de geles desnaturalizantes no ofrecía ventajas.

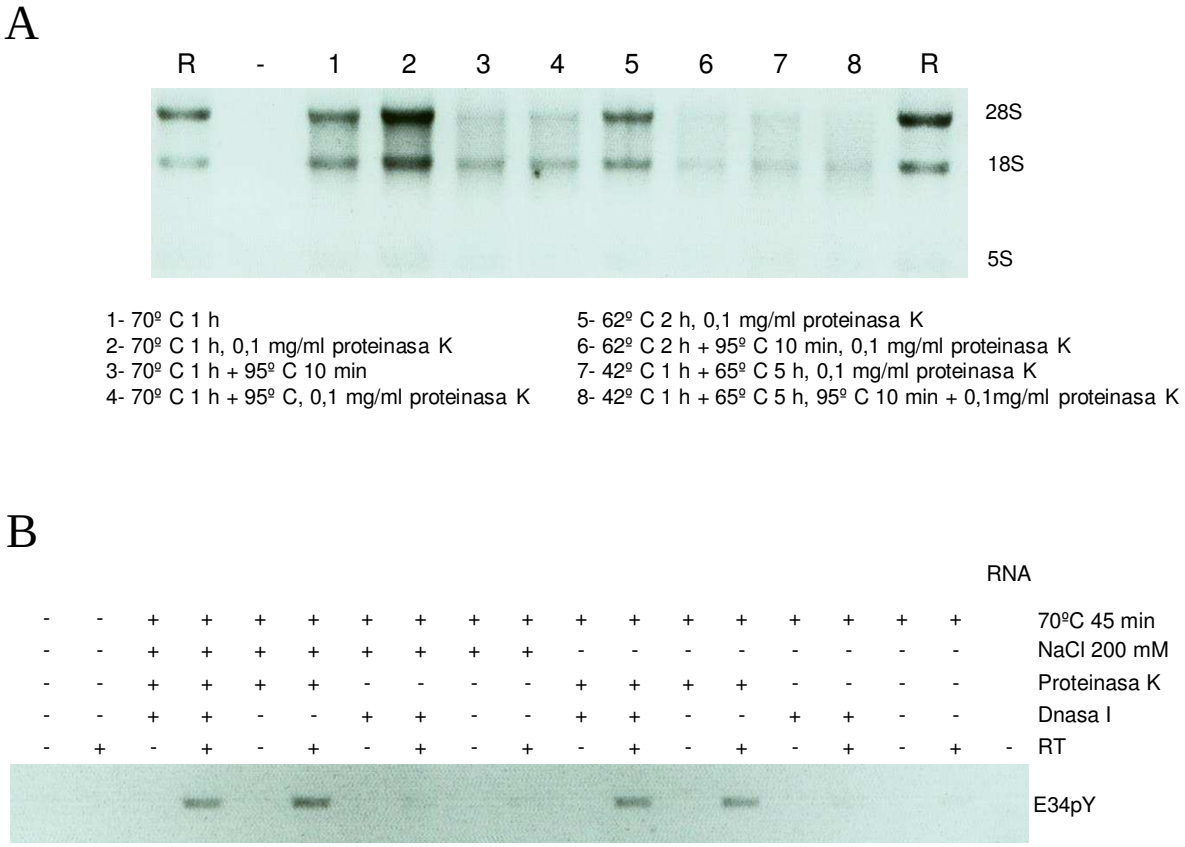

Figura R18. Condiciones de reversión del entrecruzamiento. A: comparación de distintos protocolos de reversión. 1 placa confluente de células HaCaT fue tratada con formaldehído y lisada con BLC y los núcleos a su vez lisados con 400 ml BLN. Alícuotas de 20 ml fueron sometidas a distintos procesos de reversión del entrecruzamiento, el ARN fue purificado con TRI Reagent y corrido en un gel nativo de agarosa. R: ARN control. N: ARN de lisado no tratado para revertir el entrecruzamiento. 1 a 8: tratamientos de reversión del entrecruzamiento. B: RT-PCR luego de revertir el entrecruzamiento con distintos protocolos. 1 placa confluente de células Hep3B fue tratada con formaldehído y lisada como en A, y 20 ml fueron tratados como se indica en cada calle. El ARN fue extraído y la secuencia 3' de *splicing* río arriba del exón FN34 fue amplificada por RT-PCR (E34pY). La composición de los *buffers* se da en *materiales y métodos*.

Los resultados se muestran en la figura R18 A. Usamos como marcador ARN fresco aislado de células no tratadas con formaldehído. Observamos que la incubación a alta temperatura por poco tiempo es la que permite recuperar la mayor cantidad de ARN (comparar 1 y 2 con 5 y 7). La incubación prolongada da poco rendimiento y además resulta en más degradación, como se puede ver en la calle 7 por la mayor intensidad de 18S con respecto a 28S. Además, en todos los casos el paso a 95ºC produce degradación. En el lisado que no fue tratado para revertir el entrecruzamiento no detectamos bandas.

A continuación evaluamos la aptitud del ARN recuperado para ser amplificado por RT-PCR. Revertimos el entrecruzamiento a 70ºC 45 min en distintas alícuotas de lisado, con o sin proteinasa K, DNasa o agregado de NaCl, extrajimos el ARN y lo usamos en RT con *random primers*, y levantamos E34 pY por PCR. Además comparamos células Hep3B y HaCaT. Probamos células HaCaT porque muestran un aumento de la inclusión de EDI endógeno con la polimerasa C4, algo que es difícil de detectar en otras líneas. Para Hep3B observamos una banda correspondiente a E34 pY en las células tratadas con proteinasa K, que se hace casi indetectable si no se agrega esta enzima. Por otro lado, ni el aumento de concentración de sal ni el agregado de DNasa modifican los resultados; en particular, no se observa ninguna banda en las calles sin RT (RT-) en ausencia de tratamiento con DNasa (figura R18 B). Incluimos el control de agregado de sal porque la reversión del entrecruzamiento de ADN generalmente se hace en 200 a 300 mM NaCl, mientras que los lisados de núcleos que usamos fueron hechos en un *buffer* con sólo Tris HCl, EDTA, detergente e inhibidores. Aunque el ARN recuperado de células HaCaT luego de la reversión del entrecruzamiento no muestra signos de degradación y luce similar en gel de agarosa al obtenido en células Hep3B, no obtuvimos amplificación de E34 pY en lisados de células HaCaT para ninguna de las condiciones (no mostrado), posiblemente por una baja expresión de fibronectina en estas células. Continuamos con los controles sólo en células Hep3B.

Pasamos luego a poner a punto las condiciones de fragmentación del ARN. Este paso es especialmente importante porque buscábamos comparar la señal entre dos sitios en la misma molécula y separados por sólo 1,7 kb. Además era necesario distinguir el sitio pY río arriba de EDI del sitio anterior en el intrón 31 (1,3 kb de distancia) y el sitio río arriba del exón 34 del sitio siguiente en el intrón 34 (1,1 kb), de modo que la señal en un sitio no fuera producida por moléculas precipitadas por la unión de U2AF65 en otro sitio vecino.

Probamos tres estrategias de fragmentación: la sonicación, la digestión con RNasa H y la digestión parcial con RNasa I. En todos los casos los resultados tuvieron algo o mucho de frustrantes. Resultó difícil encontrar un método que asegurase la correcta separación de los sitios sin disminuir la cantidad de los precursores que queríamos amplificar, de por sí escasos y seguramente mucho más en la fracción inmunoprecipitada.

En primer lugar intentamos la sonicación. Para evaluar la fragmentación del ARN corrimos geles desnaturalizantes, pero además seguimos una estrategia de PCR para constatar la separación de los sitios 3'. Diseñamos amplicones que van desde un sitio 3' al siguiente, y otros amplicones

progresivamente más cortos dentro de ellos (figura R19 A). Una fragmentación adecuada debe abolir los productos de RT-PCR largos entre sitios sin afectar los amplicones EDI pY y E34 pY; los amplicones más cortos se usan para evaluar el grado de fragmentación y comparar distintas condiciones de sonicado.

La sonicación no funcionó bien en nuestras manos. En todas las condiciones probadas los amplicones EDI pY y E34 pY disminuyeron considerablemente, casi en igual medida que los amplicones control. En la figura R18 B podemos ver que el amplicón 5 no baja mucho más que EDI pY con la sonicación; lo mismo sucede para el amplicón 4, que va desde EDI pY hasta E34 pY. Además los resultados fueron muy variables: por ejemplo, en la figura R18 B las calles A y B corresponden a la misma cantidad del mismo lisado sonicada siguiendo exactamente el mismo procedimiento, aunque en rondas diferentes.

Seguidamente intentamos digerir el ARN con RNasa H. Esta enzima sólo digiere secuencias de ARN hibridadas a ADN, de modo que la digestión puede ser dirigida a sitios específicos con desoxioligonucleótidos complementarios. Utilizamos oligos antisentido que se hibridan al ARN en mitad de la secuencia correspondiente a los amplicones 3, 6 y 8. Contrariamente a lo esperado, volvimos a observar una baja similar en los productos de PCR de control de la fragmentación y en los productos EDI pY y E34 pY. Esta inespecificidad quizá se deba a la presencia de ADN nuclear remanente que se hibrida al ARN que codifica y dirige su digestión. El tratamiento previo con DNasa crea el riesgo de la degradación posterior de los desoxioligonucleótidos necesarios para crear los sitios de corte. La inactivación de la DNasa debe hacerse a 70ºC en presencia de un quelante ya que el ARN se degrada a esa temperatura en presencia de cationes divalentes y la DNasa I necesita Mg^{++}. La RNasa H nuevamente necesita Mg^{++}, pero luego de la inactivación de la DNasa los lisados tienen exceso de quelante, de modo que hay que calibrar la cantidad de Mg^{++} a agregar. Finalmente la RNasa H debe inactivarse por calor, y nuevamente hay que encontrar la cantidad de quelante que proteja al ARN. Estas consideraciones y la falta de resultados favorables nos hicieron abandonar la estrategia.

Por último probamos la digestión con RNasa I. Esta endonucleasa degrada el ARN sin preferencia de secuencia y no posee la gran estabilidad de otras RNasas, siendo desactivada irreversiblemente por SDS 0,1%. Creamos entrecruzamientos en células Hep3B, las lisamos, sonicamos los lisados muy brevemente para facilitar el acceso de las enzimas a la cromatina, y digerimos con DNasa I y tres diluciones distintas de RNasa I 100 U/µl por tres minutos a 37ºC. Revertimos los entrecruzamientos y analizamos la digestión por RT-PCR. Salvo para 1.500, EDI pY y E34 pY se amplificaron al mismo nivel que el control no digerido, y lo mismo ocurrió para el amplicón 6, de menos de 200 pb. En contraste, no obtuvimos señal para ninguno de los otros amplicones, de más de 300 pb, ni siquiera en el control no digerido. Obviamente la falta de señal en este control pone en duda el valor de la falta de señal en las otras calles, pero considerando que la PCR no anduvo selectivamente para los siete amplicones largos y que la mezcla de PCR fue la misma, exceptuando los *primers*, para todos los amplicones, nos inclinamos a pensar que el problema estaba

en el molde del control. Decidimos utilizar RNasa I 1:1000 para el experimento de *RNA IP*. Aún si esta enzima no funcionó en absoluto, este tratamiento sigue siendo mejor a la sonicación, que produce una considerable pérdida de EDI pY a cambio de un modesto enriquecimiento con respecto a los controles de fragmentación.

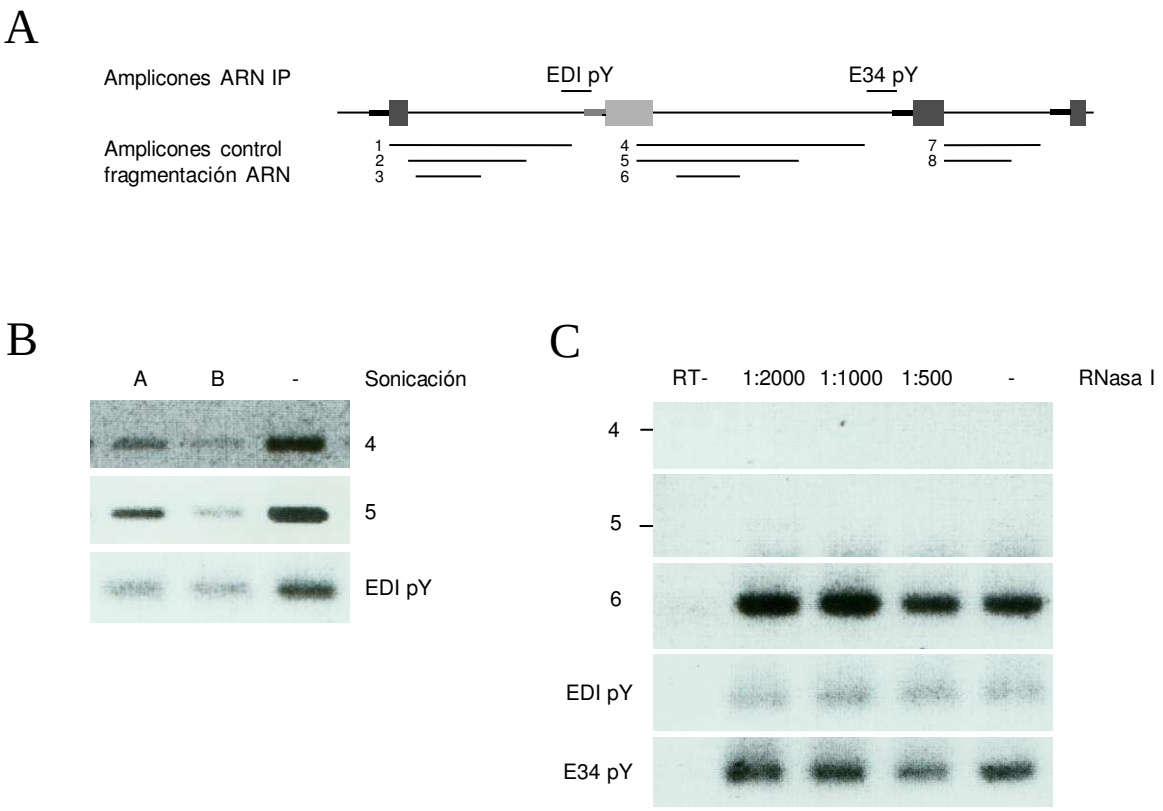

Figura R19. Fragmentación del ARN. A: esquema de pre ARNm de FN desde fin de intrón 31 hasta principio de intrón 35; EDI (exón 33) se muestra en gris más claro. Se indican los sitios de unión de U2AF65 al ARN: fuertes (▬ río arriba de exones 32, 34 y 35) y débil (▬ río arriba de EDI). Arriba, amplicones para detectar por ARN IP U2AF65 unido al intrón río arriba de EDI (EDI pY) o unido al sitio competidor río abajo (E34 pY). Abajo: amplicones para evaluar la fragmentación del ARN. B: sonicación del ARN. Células Hep3B confluentes fueron tratadadas con formaldehído, lisadas en BLC y los núcleos en BLN. 0,2 ml de lisado fueron separados como control no sonicado y 2 tubos de 1ml fueron sonicados independientemente por 5 min. El entrecruzamiento fue revertido en alícuotas de cada sonicación y del control, el ARN fue extraído y analizado por RT-PCT. Se muestra el resultado para los amplicones 4, 5 y EDI pY. A y B: ARN de 1º o 2º sonicación; -: ARN de extracto no sonicado. C: Digestión con RNasa I. Células Hep3B confluentes fueron tratadas para crear entrecruzamiento y lisadas en BLiC. El extracto fue sonicado 2 x 10 seg y alícuotas fueron digeridas con RNasa I por 3 min en las diluciones indicadas y luego tratadas para revertir el entrecruzamiento. El ARN fue extraído y analizado por RT-PCR. Se muestran los resultados para los amplicones 4, 5 ,6 , EDI pY y E34 pY. La composición de los *buffers* se da en *materiales y métodos*.

Procedimos luego con las condiciones de inmunoprecipitación. El anticuerpo policlonal anti-U2AF65 ab37483 precipita otras bandas además de la banda de 65 kDa de peso aparente, en cambio el anticuerpo monoclonal MC3 sólo reconoce la banda correcta. Además 10 μg depletan efectivamente U2AF65 de los extractos (figura R19 B). Inmunoprecipitamos lisados de células Hep3B con 10 μg de anticuerpo MC3 o IgG control acoplados a 12,5 o 25 μl de *beads* de proteína A sefarosa o 50 μl de suspensión de *beads* magnéticos asociados a proteína G, lavamos, descroslinqueamos los *beads* y amplificamos por RT y qPCR los amplicones EDI pY y E34 pY. Obtuvimos enriquecimiento con respecto al anticuerpo control solamente en el caso de los *beads* magnéticos.

A continuación decidimos la línea celular y el método para modular la elongación de Pol II. La transfección de minigenes con EDI fue descartada porque multiplica el riesgo de contaminación con ADN: se ha calculado que entran a cada célula transfectada unas 300 moléculas de plásmido, a comparación de las pocas copias del gen endógeno en el genoma aun teniendo en cuenta las aberraciones cromosómicas de las líneas celulares. Decidimos usar células Hep3B porque al menos en nuestras manos transcriben más el gen de fibronectina que las células HCT116 o las células HaCaT y en contraste con las células HEK293T tienen un nivel bajo de inclusión de EDI. El método menos pleiotrópico de bajar la velocidad de transcripción es sin duda la transfección de polimerasas mutantes. Sin embargo, la transfección es muy ineficiente en células Hep3B, de modo que la mayor parte de las células no adquiere la polimerasa mutante y en cambio sí posee las copias endógenas de fibronectina, creando ruido en el experimento. La irradiación con luz UV produce una hiperfosforilación del CTD de Pol II asociada a menor elongación y mayor inclusión de EDI (Muñoz et al. 2009); en nuestras manos, este tratamiento produjo una baja considerable de los productos de RT-PCR EDI pY y E34 pY. La camptotecina también produjo una baja de nuestros productos de PCR, aunque menor, de modo que nos decidimos por este último método. El tratamiento prolongado con CPT produce un aumento en la inclusión de EDI en minigenes (Figura R19 A); además nuestro análisis de elongación de Pol II nos confirma su efecto negativo sobre la velocidad de Pol II (Figura R14). La acción de camptotecina sobre la elongación es detectable luego de 15 min de tratamiento, en cambio los cambios en la proporción de isoformas son lentos porque dependen de la degradación de los mensajeros producidos con anterioridad. En nuestro caso nos interesa la unión de U2AF65 a las regiones reguladoras en condiciones de baja elongación, independientemente de la ventana de tiempo en la que se llega a ver el cambio en el *splicing*.

Comparamos por *RNA IP* la unión de U2AF65 en el sitio río arriba de EDI y en el sitio competidor río abajo, en condiciones de elongación normal y en condiciones de baja velocidad de transcripción.

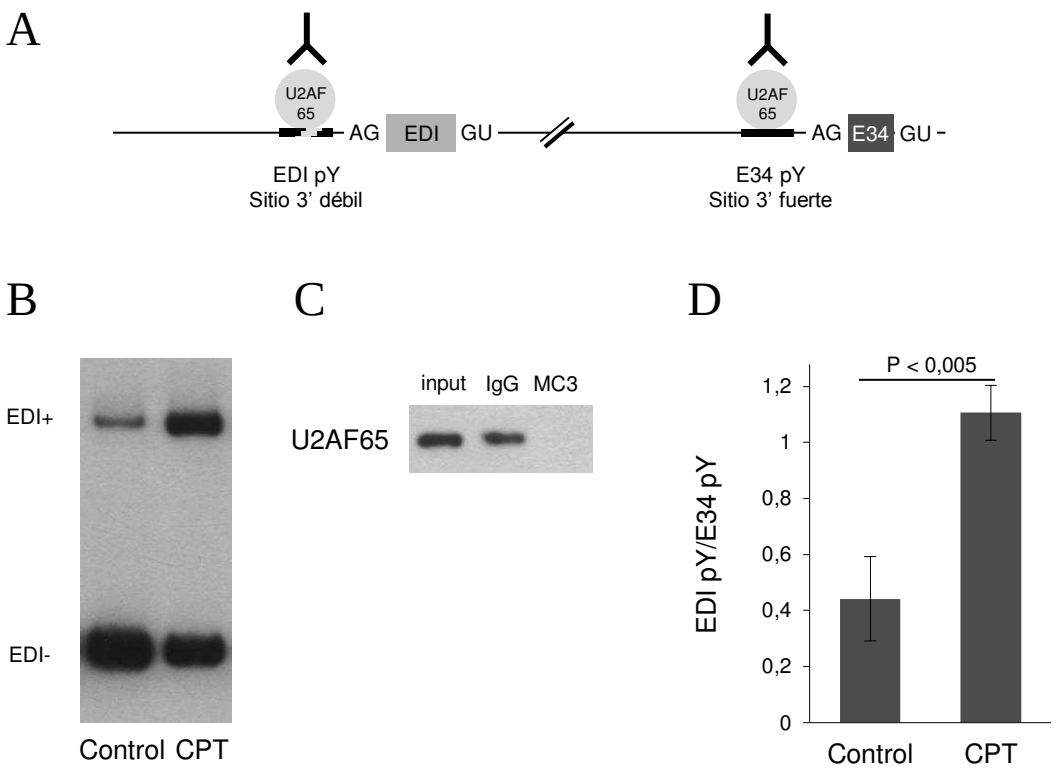

Figura R20. Reclutamiento de U2AF65 al sitio 3' río arriba de EDI. A: esquema de las secuencias reguladoras de *splicing* río arriba de EDI y del exón 34 inmunoprecipitadas junto con U2AF65. B: células hep3B fueron transfectadas con el minigén pUHC EDI y tratadas por 16 h con 1 μM CPT. Se extrajo el ARN y se analizó la inclusión de EDI por RT-PCR radiactiva. C: células Hep3B fueron tratadas para crear entrecruzamientos y lisadas en *buffer* BLiC; 10 mg de lisado fueron inmunoprecipitados con 10 μg de IgG control o MC3. Se corrió una alícuota (0,5%) del *input* y la misma cantidad de la fracción no precipitada (calles IgG y MC3) y se analizó por western blot con el anticuerpo ab37483. D: *RNA IP*. Células Hep3B tratadas con 6 μM CPT o DMSO por 7 h fueron lisadas en BLiC, sonicadas 2 x 10 seg y digeridas con DNasa I y RNasa I. Alícuotas de 10 mg de lisado celular fueron inmunoprecipitadas con 10 μg de anticuerpo MC3. El ARN fue extraído de la fracción inmunoprecipitada y de una alícuota de la fracción no precipitada (sobrenadante). Los amplicones EDI pY (sitio débil río arriba de EDI) y E34 pY (sitio fuerte río arriba de FN E34) fueron cuantificados en la IP y relativizados al sobrenadante; se grafica el cociente EDI pY/E34 pY para cada tratamiento.

Inmunoprecipitamos lisados de células Hep3B tratadas con CPT o vehículo con el anticuerpo anti U2AF65 MC3 y cuantificamos EDI pY y E34 pY en la fracción inmunoprecipitada y en el sobrenadante. Tanto para el control como para CPT el sobrenadante tiene igual cantidad de EDI pY y E34 pY (no mostrado). En las células control el enriquecimiento de E34pY con respecto al sobrenadante es mayor que el enriquecimiento de EDI pY, con un cociente EDI pY/E34 pY menor a 1 (figura R19 C, columna control), esta relación se invierte en las células tratadas con CPT, demostrando que la camptotecina aumenta el reclutamiento de U2AF65 al sitio débil río arriba de EDI con respecto al sitio competidor. De este modo comprobamos experimentalmente una de las predicciones más importantes del modelo cinético de regulación del *splicing* de EDI.

Discusión

Como se ha demostrado en multitud de trabajos en las últimas décadas, el procesamiento de los transcriptos producidos por la RNA polimerasa II (Pol II) comienza y en gran medida se completa antes de la terminación de la transcripción. Esta simultaneidad entre procesamiento y transcripción hace posible la influencia recíproca entre los procesos; un ejemplo clásico de esta interacción se da en el reclutamiento de factores de *capping* o de *splicing* al ARN naciente por intermedio del dominio CTD de Pol II. Trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros autores demuestran que un conjunto de eventos de *splicing* alternativo está regulado en parte por las propiedades de elongación de Pol II; así, por ejemplo, la inclusión del exón alternativo EDI en el gen de fibronectina humana aumenta al disminuir la elongación transcripcional. Para explicar este fenómeno, se ha postulado el modelo cinético de regulación, según el cual una baja velocidad de transcripción aumenta el tiempo que dista entre la síntesis de un sitio regulatorio débil y otro sitio regulatorio fuerte ubicado río abajo; de esta manera se favorece el reconocimiento por la maquinaria de *splicing* del sitio débil antes de la aparición del sitio fuerte competidor y se altera el balance entre las isoformas resultantes del uso de uno u otro sitio. En el presente trabajo hemos investigado tres aspectos relacionados con la regulación cinética del *splicing*, que lo dividen en tres secciones bien diferenciadas: el orden de remoción de los intrones que rodean a un exón determinado, la velocidad de elongación de Pol II, clave para la regulación cinética del *splicing*, y el reclutamiento de un factor específico a un sitio regulador en distintas condiciones de elongación. Comenzaremos esta discusión analizando los resultados de las medidas de la velocidad de elongación de Pol II para el gen de fibronectina humana, continuaremos con los resultados para el orden de remoción de intrones y los interrogantes que plantean sobre la regulación cinética de la inclusión del exón EDI, y concluiremos abordando esos interrogantes mediante el análisis del reclutamiento de la proteína U2AF65 al sitio 3' río arriba de EDI *in vivo*.

5.1 Medida de la elongación de Pol II

El modelo cinético de acoplamiento entre transcripción y *splicing* postula que la tasa de elongación de Pol II afecta el patrón de unión de los factores reguladores a secuencias en *cis* al modular la ventana temporal en la que estos factores pueden ser reclutados. Muchos de los experimentos que llevamos a cabo se basan en modificar la velocidad de transcripción de Pol II. Resulta de primordial importancia, por lo tanto, poder medir esta tasa de elongación en nuestros

sistemas experimentales. Aplicamos con éxito la metodología de Singh y Padgett para medir la tasa de elongación en el gen de fibronectina en dos líneas celulares diferentes. Esta metodología se basa en la aparición de distintos productos de RT-PCR a lo largo del gen a distintos tiempos luego de la desrepresión de la elongación de Pol II, previamente bloqueada en un sitio de pausa cerca del promotor. Obtuvimos valores de 2,9 y 2,1 kb/min para células Hep3B o HCT116 respectivamente (figura R14 B; figura R16 B). Estos números son similares a los 3,3 a 4,1 kb/min obtenidos en otros genes en el trabajo original, y a los 2 a 4,3 kb/min obtenidos en distintas mediciones por FRAP (Darzacq et al. 2007; Boireau et al. 2007).

Pudimos observar una disminución importante en la tasa de elongación luego del tratamiento con camptotecina (figura R15), confirmando el efecto de este fármaco en nuestro gen de estudio. Además, las curvas obtenidas con CPT indican una baja en la procesividad de Pol II, un efecto compatible con su mecanismo de acción. Sin embargo, no llegamos a obtener una medida de la tasa de elongación con camptotecina, para la cual sería necesario medir tiempos más largos. Tampoco logramos discriminar entre dos amplicones separados por 7 kb, el amplicón *29* río arriba de EDI y el amplicón *35* río abajo de este exón, lo que señala un límite en el poder de resolución del método y de su detección de cambios locales en la elongación. En confirmación de esto último, no detectamos diferencias en la aparición del producto de PCR *29* y la del producto *35* en células Hep3B transfectadas con un siRNA dirigido contra el intrón río abajo de EDI, que causa un aumento local en marcas de heterocromatina y una mayor inclusión de EDI (Alló et al. 2009) (no mostrado).

Llevamos a cabo estos experimentos en dos líneas celulares con baja inclusión basal de EDI, en las cuales la inhibición de la tasa de elongación tiene un efecto en el *splicing* de EDI. Sería interesante ver si la tasa de elongación para fibronectina es diferente en otras líneas celulares en las que predomina la inclusión sobre la exclusión.

5.2 Orden de remoción de intrones

El hecho de que el *splicing* es un proceso mayormente cotranscripcional puede hacernos suponer que los intrones son eliminados a medida que son transcriptos siguiendo un orden estricto 5’ - 3’. Sin embargo, trabajos previos demuestran que cada gen sigue una secuencia preferida en la remoción de sus intrones que puede apartarse de este orden. De esta manera cuando un exón es incluido en el mensajero el intrón río arriba puede ser eliminado antes que el intrón río abajo, siguiendo el orden en que fueron transcriptos, o puede ser eliminado después que el exón río abajo, siguiendo el camino inverso. Llevamos a cabo un estudio sistemático del orden de remoción de intrones alrededor de distintos tipos de exones mediante la cuantificación de los intermediarios en los

que sólo uno de los intrones ha sido eliminado, que hemos llamado α y β respectivamente. Estudiamos un exón regulado negativamente por la elongación (EDI), un exón regulado positivamente (CFTR9), un exón que no responde a elongación (EDII) y un exón constitutivo (FN E28). Los resultados obtenidos confirman mecanismos de regulación ya bien estudiados, dan pruebas adicionales sobre hipótesis previas o, como veremos en esta sección, crean hipótesis nuevas sobre la regulación de algunos eventos de *splicing*.

Orden de remoción de intrones según la línea celular, la mutación de secuencias reguladoras en *cis* y la expresión de distintos factores de *splicing*

Analizamos el orden de remoción de intrones alrededor de cada uno de los exones en distintas condiciones que pueden modificar su nivel de inclusión, como la sobreexpresión de proteínas reguladoras o la mutación de secuencias en *cis*, y comparamos los cambios obtenidos a nivel de *splicing* con los cambios observados en el cociente α/β. En la mayor parte de los casos encontramos que los cambios en el cociente α/β se corresponden con los mecanismos propuestos de regulación del *splicing*.

Con una sola excepción (ver más abajo), tanto para EDI como para EDII los cambios en el cociente entre los dos precursores α y β son coherentes con los mecanismos conocidos de la regulación de la inclusión. Así, la eliminación del intrón río arriba de EDI aumenta al favorecer el reconocimiento del sitio subóptimo en este mismo intrón, por mutaciones que hacen más fuerte el sitio (figura R2) o por la sobreexpresión de proteínas SR que estimulan su uso (figura R3). Del mismo modo, en células Hep3B la eliminación del intrón río abajo de EDII sube con la sobreexpresión de distintas proteínas SR, que se unen a él y favorecen el uso de su sitio 5' débil (figura R7 B). Además la eliminación de este intrón antes que el intrón río arriba prevalece en células N2A, que tienen un alto nivel de inclusión de EDII, nuevamente relacionando el uso del sitio 5' débil con la inclusión del exón (figura R7 D). De modo análogo, la mayor inclusión de EDI endógeno en células HEK293T con respecto a la observada en células Hep3B se ve acompañada de un aumento de la eliminación del intrón río arriba, indicando un mayor uso del sitio 3' débil de EDI (Figura R1 B).

La sobreexpresión de algunos factores que modifican la inclusión del exón 9 del gen CFTR también produce cambios en el cociente α/β que pueden ser explicados por los mecanismos de acción descriptos para estos factores (figura R11 D). Así, la proteína TIA1 aumenta la inclusión de CFTR9 debido a su efecto positivo sobre el sitio 5' débil del intrón río abajo. TIA1 se une a la secuencia rica en uridinas PCE río abajo del sitio 5' y estabiliza la unión del snRNP U1 (Zuccato et al. 2004). Consistentemente con eso, la eliminación de este intrón aumenta con respecto al intrón río arriba. En contraste, PTB, que también se une al intrón río abajo, provoca una disminución tanto de la inclusión

del exón 9 como de la eliminación del intrón al que se une. PTB se une a múltiples motivos cortos ricos en pirimidinas embebidos en regiones más largas e inhibe la inclusión de una amplia variedad de exones. Zuccato et al. demostraron que PTB puede desplazar a TIA1 de la región PCE *in vitro*, potencialmente disrumpiendo el efecto positivo de TIA1 sobre la unión de U1 al sitio débil; además, su capacidad de unirse en varios sitios a lo largo del ARN y de formar multímeros puede resultar en un enmascaramiento del intrón. TDP43 se une a las repeticiones UG del polimorfismo TGnTm inmediatamente río arriba del exón CFTR9 y promueve la exclusión del exón 9, posiblemente a través de la inhibición de la unión de U2AF65 al trecho Um del polimorfismo (Buratti et al. 2001). La disminución del intermediario en el que se eliminó el intrón río arriba luego de su sobreexpresión es consistente con este mecanismo.

La relación entre orden de eliminación de intrones y mecanismos de regulación de la inclusión no es en todos los casos tan lineal como los ejemplos anteriores parecen indicar. Encontramos algunos ejemplos en los cuales la cuantificación de los intermediarios arrojó resultados inesperados. Así, la sobreexpresión de las proteínas SR SF2 y SRp40 baja el cociente α/β para el exón constitutivo 28 de fibronectina sin afectar su inclusión, mientras que la sobreexpresión de SC35 baja el nivel de inclusión sin producir cambios en el orden preferido de procesamiento (figura R8). La sobreexpresión de SF2 en células N2A sube el intermediario que eliminó el intrón río arriba, α, en el minigén EDII (figura R7 D), un efecto difícil de reconciliar con la estimulación por esta proteína del uso del sitio 5' subóptimo en el intrón río abajo. El análisis del orden de remoción de intrones también muestra resultados anómalos en el gen CFTR. TDP43 tiene un alto nivel de expresión en células HCT116; consistentemente con eso su sobreexpresión en estas células produce un efecto mínimo en la exclusión de CFTR9. Sin embargo, vemos en la figura R11 D que su efecto en el orden de remoción de intrones es robusto. Aunque SF2 reprime la inclusión de CFTR9 mediante su unión al ISS en el intrón río abajo, su sobreexpresión sube la proporción de β, el intermediario que elimina este intrón primero.

Más interesante es el caso de ETR3, la proteína implicada en la regulación cinética de CFTR9. ETR3 se une a las repeticiones UG río arriba de CFTR9 con mayor afinidad que U2AF65 *in vitro*, y se ha detectado por coinmunoprecipitación una interacción indirecta entre ambos factores *in vivo* (Dujardin et al. 2010). La inhibición por ETR3 del reclutamiento de U2AF65 a las repeticiones Um es la explicación más directa de este fenómeno. Esta inhibición tendría por consecuencia una disminución del procesamiento del intrón río arriba de CFTR9. Sin embargo nuestros experimentos demuestran lo contrario. Dependiendo del promotor, ETR3 produce un aumento más fuerte o más modesto pero siempre reproducible del intermediario α con respecto a β (figura R10 C, figura R11 D). Esto indica una inhibición de la escisión del intrón río abajo, que es más fuerte que la inhibición del procesamiento del intrón río arriba debida a su interacción con U2AF65. ETR3 puede estar inhibiendo el uso del sitio 5' subóptimo del intrón río abajo, ya sea directamente o a través de un efecto negativo sobre TIA1. Esta nueva hipótesis es además más consistente con el modelo cinético de regulación de

la exclusión de CFTR9. Los sitios de unión al ARN de U2AF65 y ETR3 son inmediatamente contiguos, de modo que su síntesis es casi simultánea aún en condiciones de baja elongación. En cambio las repeticiones UG a las que se une ETR3 y el sitio 5' del intrón río abajo están separadas por casi 200 pb, de modo que una menor velocidad de transcripción puede incidir más en la ventana de tiempo para el reclutamiento de ETR3 antes del reconocimiento del sitio 5' y el establecimiento de un compromiso para la isoforma de inclusión.

En el minigén pSV40 CFTR TG11T9 el reclutamiento de U2AF65 a la secuencia U9 no es abolido por los reguladores negativos TDP43 y ETR3 y la isoforma de inclusión es la única que detectamos (figura R11 A). La sobreexpresión de ETR3 prácticamente no cambia este patrón de *splicing*; sin embargo el intermediario β vuelve a bajar con respecto a α (figura R11 E-F). Esto es consistente con una inhibición por ETR3 del reconocimiento del sitio débil 5', que produce un retraso en la eliminación del intrón río abajo. Al mismo tiempo, el reclutamiento de U2AF65 a la secuencia U9 lleva a la eliminación del intrón río arriba comprometiendo al pre-ARNm a la inclusión, de modo que luego no queda otra posibilidad que la eliminación del intrón río abajo.

Los resultados del experimento de competencia entre ETR3 y TIA1 también pueden interpretarse en este marco (figura R12). Según postulamos, ETR3 y TIA1 tienen efectos antagónicos sobre el sitio 5' del intrón río abajo. En la doble transfección, en las moléculas en las que sólo TIA1 es reclutado se favorece la unión de U1 al sitio débil y el intrón es eliminado; de esta manera se genera un precursor β y se aumenta la inclusión (Figura D1 C). En cambio el reclutamiento de ETR3 en moléculas a las que no se ha unido TIA1 inhibe el reclutamiento de U1 al sitio débil, eliminando posibles precursores β, aunque también inhibe el reclutamiento de U2AF65, impidiendo que se generen precursores α. La inhibición de U2AF65 por ETR3 es algo más débil que la inhibición de la unión de U1, de modo que la disminución de β es mayor que la de α y se produce un pequeño aumento en el cociente α/β (figura D1 A). En las moléculas a las que se unen tanto ETR3 como TIA1, en las que además prevalece la inhibición de ETR3 sobre el reclutamiento de U1 (algo imposible si el efecto de ETR3 sobre el sitio 5' es mediado por inhibición del reclutamiento de TIA1) la exclusión aumenta sobre todo por inhibición de posibles precursores β, que deben ser mayoritarios entre las moléculas que reclutaron TIA1 (figura D1 B). Por último, en las moléculas que reclutan tanto ETR3 como TIA1 pero en las que prevalece el efecto positivo de TIA1 sobre el uso del sitio débil 5' aumentan los precursores β pero además se mantiene la inhibición de U2AF65 por parte de ETR3, disminuyendo aún más el cociente α/β (figura D1 D). De este modo el efecto neto en células que sobreexpresan tanto ETR3 como TIA1 tiende a ser la disminución del cociente α/β.

La hipótesis de que ETR3 inhibe el uso del sitio 5' río abajo del exón 9 explica en parte la diferencia entre los efectos de esta proteína y TDP43, el otro factor inhibidor de la inclusión reclutado a las repeticiones UG. Ni la sobreexpresión ni el silenciamiento de TDP43 modifican el efecto de la polimerasa C4 o de la camptotecina sobre la exclusión (Dujardin et al., manuscrito en preparación), y

esta falta de participación en el efecto cinético se entiende más claramente si ETR3 inhibe la inclusión por otra vía además del bloqueo de U2AF65 postulado para ambas proteínas. Consistentemente con este nuevo mecanismo, el efecto de la sobreexpresión de ETR3 sobre la inclusión de CFTR9 disminuye notablemente en células transfectadas con un snRNA U1 mutante perfectamente complementario al sitio 5' débil río abajo (Dujardin et al., manuscrito en preparación). La transfección del U1 mutante también disminuye el efecto de la polimerasa C4 sobre el *splicing* de CFTR9 (Dujardin, comunicación personal), reforzando la relevancia del nuevo mecanismo sobre la regulación cinética de la inclusión de este exón.

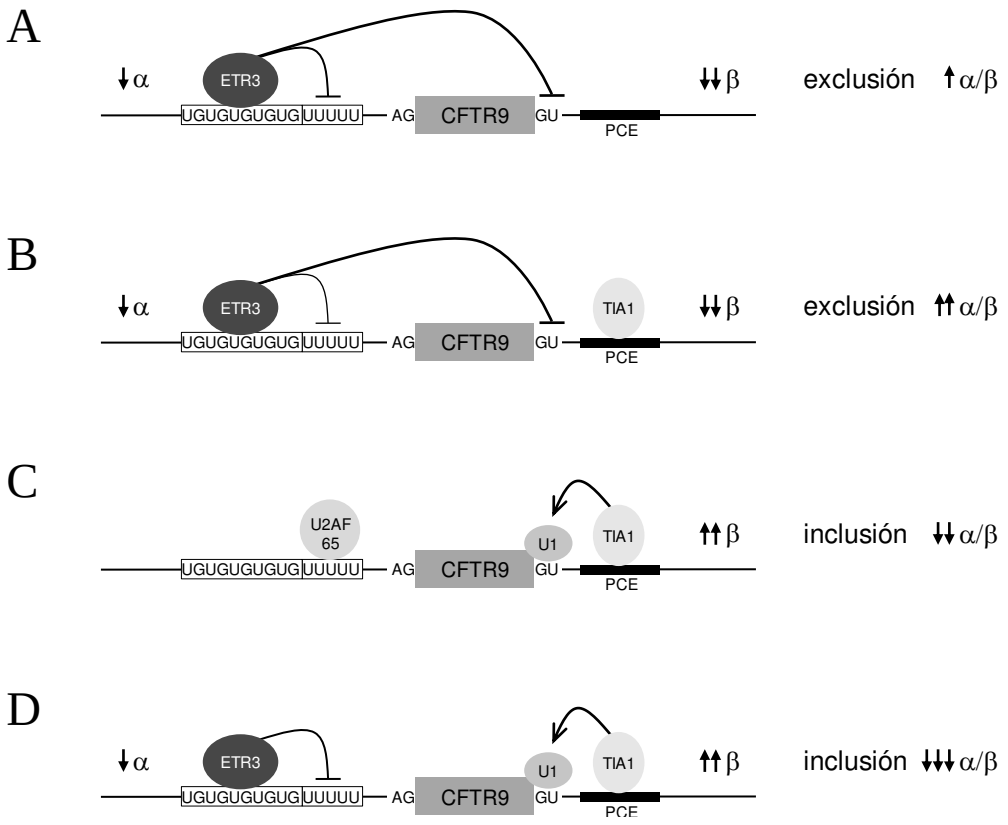

Figura D1. Efectos del reclutamiento de ETR3 y de TIA1 sobre el nivel de inclusión de CFTR9 y el orden de remoción de los intrones que lo rodean. A: moléculas que reclutan sólo ETR3. B: moléculas que reclutan ambos factores, en las que prevalece la inhibición del reclutamiento de U1 por ETR3. C: moléculas que reclutan sólo TIA1. D: moléculas que reclutan ambos factores, en las que prevalece el efecto positivo de ETR3 sobre el reclutamiento de U1. El caso B sólo puede darse si el efecto de ETR3 sobre el reclutamiento de U1 no está mediado por inhibición de TIA1.

Orden de remoción de intrones y elongación de RNA Polimerasa II

Estudiamos también el orden de remoción de intrones en condiciones de baja elongación de Pol II. Tratamos cultivos celulares con los inhibidores del factor de elongación P-TEFb DRB y flavopiridol o con el inhibidor de Topoisomerasa I camptotecina o transfectamos una polimerasa mutante de elongación más lenta. Encontramos cambios en el cociente α/β para algunos de los tratamientos. El intermediario α para FN E28 aumenta luego del tratamiento con DRB, y de modo menos reproducible con flavopiridol (figura R9 B). Aunque estos inhibidores de quinasas pueden estar actuando por otras vías, el cambio observado es compatible con un efecto cinético por el cual la menor velocidad de transcripción favorece el procesamiento del intrón río arriba.

El uso de un minigén reprimible nos permitió confirmar una vez más que EDII no aumenta su inclusión al bajar la elongación. Tal como esperábamos, la polimerasa lenta tampoco alteró el cociente α/β para este exón (figura R6).

Partiendo de la hipótesis de que una menor velocidad de transcripción estimula la inclusión de EDI a través de un aumento de la eliminación del intrón río arriba, que tiene más tiempo para ser reconocido antes de la síntesis de sitios competidores en el intrón río abajo (figura D2), utilizamos distintos métodos para bajar la elongación de Pol II y medimos el orden de remoción de los intrones que rodean a este exón (figura R4). Encontramos que la camptotecina y el flavopiridol suben el cociente α/β en células HCT116, lo que va de acuerdo con nuestra hipótesis, pero estos cambios no estuvieron asociados a un aumento en la inclusión del exón. La camptotecina no produjo efectos reproducibles en células Hep3B. El flavopiridol mantuvo su efecto sobre el orden de remoción de intrones en esta línea celular, y además produjo un aumento de la isoforma de inclusión. Sin embargo como ya explicamos resulta poco probable que los cambios en el orden de remoción de intrones se hayan debido a la inhibición de la elongación. En el mismo experimento una dosis de DRB que produce un efecto similar sobre la inclusión de EDI no afecta el orden preferido de remoción de intrones. Como DRB y flavopiridol inhiben la elongación de Pol II por la misma vía, el efecto del flavopiridol sobre el orden de remoción de intrones es probablemente independiente de su efecto sobre la elongación. Podemos concluir que en ningún caso pudimos encontrar que la inhibición de la transcripción produjera cambios en el orden de remoción de intrones asociados a cambios en la inclusión de EDI.

Transfectamos una RNA polimerasa II mutante intrínsecamente lenta e inhibimos la polimerasa endógena con α-amanitina (figura R5). Con este método directo para bajar la velocidad de transcripción obtuvimos un aumento en la inclusión de EDI, como se ha reportado previamente (de la Mata et al. 2003). Sin embargo, no observamos un aumento de la eliminación del intrón río arriba de EDI, como la interpretación más simple de nuestro modelo dictaría. Esto nos llevó a replantearnos el modelo cinético de regulación de EDI. Una transcripción más lenta o más interrumpida por pausas

aumenta la ventana de tiempo entre la síntesis del trecho de polipirimidinas subóptimo río arriba de EDI y la síntesis del trecho consenso río abajo; el modelo cinético predice que ese mayor tiempo es suficiente para favorecer el reclutamiento de U2AF65 al sitio débil y crear un compromiso para la isoforma de inclusión. Luego la cinética de remoción del intrón río arriba puede ser suficientemente lenta como para hacer indetectable esa ventaja inicial en una medida del orden de remoción de intrones. De esta manera, la verdadera prueba para la validez de nuestra hipótesis no se encuentra en una medida del orden de remoción de intrones alrededor de EDI sino de la unión de U2AF65 al sitio 3' débil río arriba de este exón alternativo.

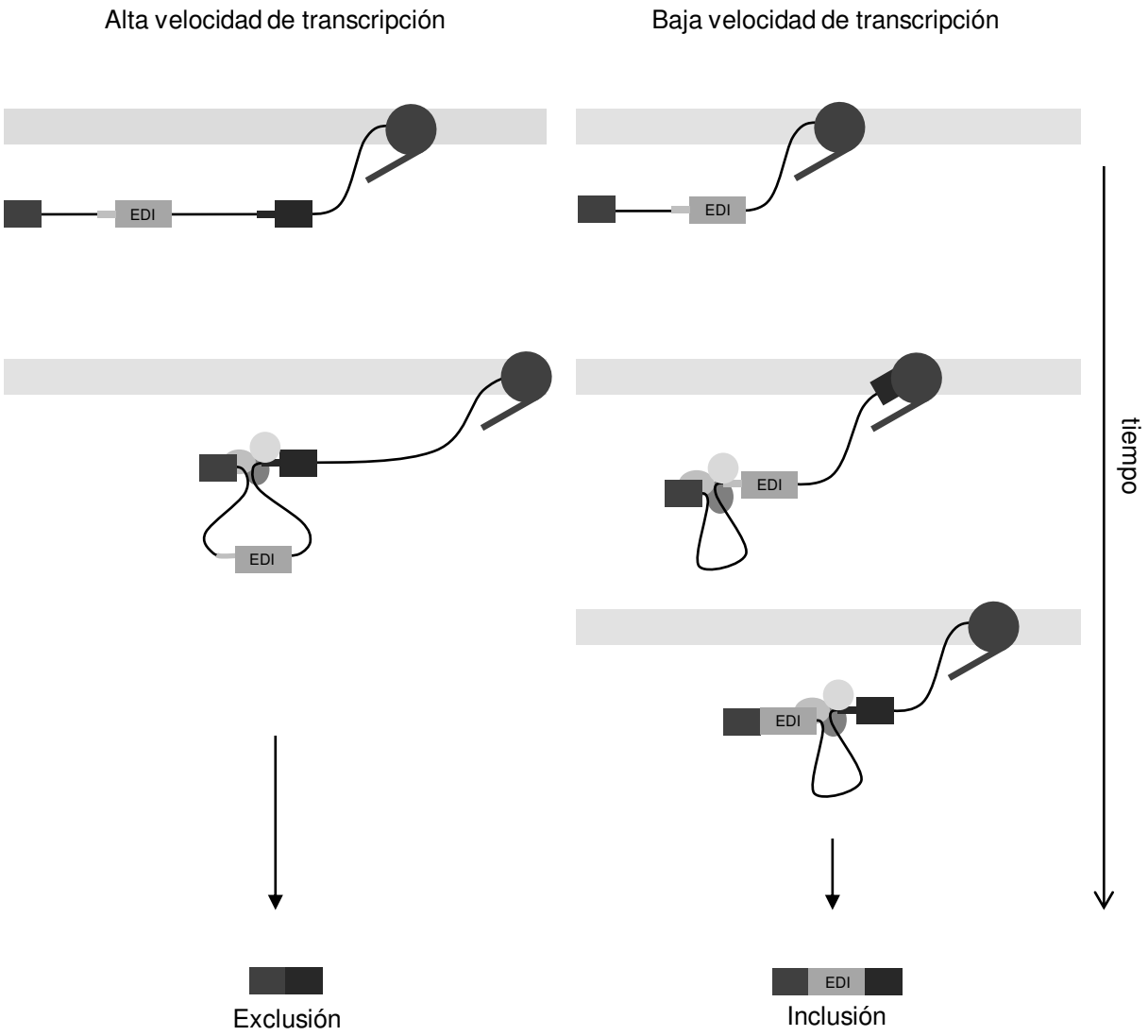

Figura D2. Modelo previo de regulación cinética de la inclusión de EDI, según el cual una alta tasa transcripcional favorece la competencia ente los dos sitios, con prevalencia del sitio fuerte (izquierda) mientras que una baja velocidad de transcripción favorece el reconocimiento y la escisión del intrón río arriba de EDI antes de la síntesis del sitio fuerte río abajo (derecha).

5.3 Reclutamiento de U2AF65 al sitio 3' río arriba de EDI en distintas condiciones de elongación transcripcional

Por último, pusimos a punto en nuestro laboratorio un método para estudiar interacciones ARN-proteína *in vivo*, el *RNA IP*. Encontramos que la aplicación de este método está plagada de dificultades técnicas. En nuestro caso, la necesidad de fragmentar el ARN para distinguir entre dos sitios no muy lejanos en la misma molécula unida a la gran inestabilidad del ARN conspiraban contra la obtención de suficiente material y con suficiente separación entre los distintos amplicones como para obtener resultados. Eventualmente encontramos las condiciones para llevar a cabo el experimento (figuras R18-R19), que ahora otros miembros del laboratorio están aplicando con éxito.

Llevamos a cabo experimentos de RNA IP en células Hep3B tratadas con vehículo o con camptotecina, un fármaco que produce una disminución de la velocidad de transcripción de Pol II en el gen de fibronectina en esta misma línea celular, como hemos comprobado experimentalmente (figura R15). Medimos el reclutamiento de U2AF65 al sitio débil río arriba de EDI y al sitio fuerte competidor río abajo. Encontramos que en condiciones de elongación normal (en las células tratadas con sólo vehículo) el reclutamiento de U2AF65 es mayor en el sitio competidor fuerte río abajo que en el sitio débil que regula la inclusión de EDI, por un factor 2 aproximadamente. En cambio luego del tratamiento con camptotecina aumenta el reclutamiento de U2AF65 al sitio débil río arriba: ambos sitios muestran un enriquecimiento similar en moléculas unidas a U2AF65, con un ligero predominio del reclutamiento de EDI (figura R20). Este resultado fue obtenido en dos experimentos independientes. De esta manera pudimos corroborar una predicción crucial para la validez de nuestro modelo: el aumento de la unión de U2AF65 al trecho de polipirimidinas débil río arriba de EDI en condiciones de baja elongación de Pol II.

El modelo que se consolida con este resultado sostiene que en condiciones de baja elongación se favorece el reclutamiento de U2AF65 al sitio débil río arriba de EDI porque el sitio fuerte competidor aparece más tardíamente. Una vez que esta proteína es reclutada el intrón río arriba de EDI queda comprometido a escindirse, y es este compromiso y no la escisión en sí misma lo que a su vez crea el compromiso para la inclusión de EDI antes de la síntesis del sitio competidor fuerte. Esta nueva variante del modelo cinético se grafica en la figura D3.

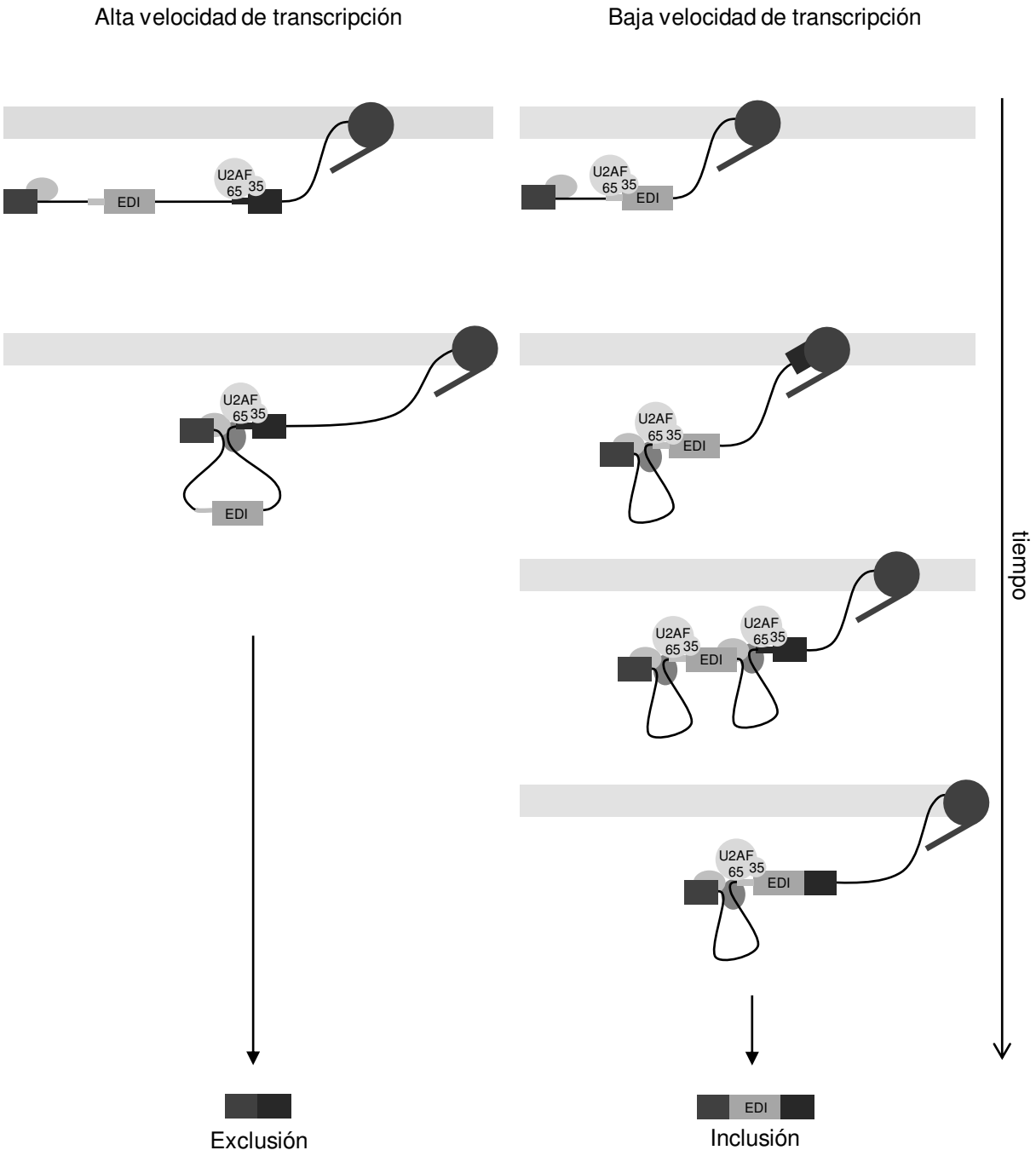

Figura D3. Modificación al modelo de regulación cinética de EDI. Una baja tasa de elongación favorece el reclutamiento de U2AF65 al sitio 3' débil río arriba de EDI y el ensamblado de estadios iniciales de ensamblado del spliceosoma estableciendo un compromiso para la escisión del intrón río arriba y la inclusión de EDI.

Podemos resumir las conclusiones de este trabajo en los siguientes puntos:

- El orden preferido de remoción de los intrones que rodean a un exón en particular se modifica según la línea celular, el promotor a partir del cual se transcribe el gen, la presencia de mutaciones en *cis* o la abundancia diferencial de factores reguladores.
- Los cambios en el nivel de inclusión de EDI o CFTR9 provocados por la modificación de la tasa de elongación de Pol II no están relacionados con cambios en el orden de remoción de intrones.
- Pol II transcribe el gen de fibronectina humana a una tasa de aproximadamente 2,9 kb/min en células Hep3B y de 2,1 kb/min en células HCT116.
- El tratamiento con el inhibidor de topoisomerasa I camptotecina disminuye la elongación de Pol II en el gen de fibronectina humana en células Hep3B.
- El tratamiento con camptotecina en células Hep3B aumenta el reclutamiento del factor basal de splicing U2AF65 al sitio 3' no consenso inmediatamente río arriba de EDI en comparación con el reclutamiento al sitio 3' fuerte río abajo, de acuerdo con las predicciones más generales del modelo de regulación cinética del *splicing*.

Bibliografía

Alló M, Borgiano V, Federa JP, Potrillo E, Chor I, de la Mata M, Aguirre E, Plazas M, Eyrás E, Elela SA, Klinck R, Chabot B, Kornblihtt AR. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. Nat Struct Mol Biol. 2009; 16(7):717-24.

Amir-Ahmady B, Boutz PL, Markovtsov V, Phillips ML, Black DL. Exon repression by polypyrimidine tract binding protein. RNA. 2005; 11(5):699-716.

Baurén G, Wieslander L. Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. Cell. 1994; 76(1):183-92.

Bendixen C, Thomsen B, Alsner J, Westergaard O. Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription. Biochemistry. 1990; 29(23):5613-9.

Beyer AL, Osheim YN. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. Genes Dev. 1988; 2(6):754-65.

Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, Coso OA, Srebrow A. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. Nat Struct Mol Biol. 2005; 12(12):1037-44.

Boireau S, Maiuri P, Basyuk E, de la Mata M, Knezevich A, Pradet-Balade B, Bäcker V, Kornblihtt A, Marcello A, Bertrand E. The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. J Cell Biol. 2007; 179(2):291-304.

Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. EMBO J. 2001; 20(7):1774-84.

Buratti E, Muro AF, Giombi M, Gherbassi D, Iaconcig A, Baralle FE. RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon. Mol Cell Biol. 2004; 24(3):1387-400.

Buratti E, Stuani C, De Prato G, Baralle FE. SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. Nucleic Acids Res. 2007; 35(13):4359-68.

Cáceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. Science. 1994; 265(5179):1706-9.

Caputi M, Casari G, Guenzi S, Tagliabue R, Sidoli A, Melo CA, Baralle FE. A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. Nucleic Acids Res. 1994; 22(6):1018-22.

Cereghini S, Yaniv M. Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication. EMBO J. 1984; 3(6):1243-53.

Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. Annu Rev Biochem. 2007; 76:51-74.

Chao SH, Price DH. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. J Biol Chem. 2001; 276(34):31793-9.

Chen Y, Chafin D, Price DH, Greenleaf AL. Drosophila RNA polymerase II mutants that affect transcription elongation. J Biol Chem. 1996; 271(11):5993-9.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987; 162(1):156-9.

Close P, East P, Dirac-Svejstrup AB, Hartmann H, Heron M, Maslen S, Chariot A, Söding J, Skehel M, Svejstrup JQ. DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. Nature. 2012; 484(7394):386-9.

Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM Jr, Dahmus ME. A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82(23):7934-8.

Coulter DE, Greenleaf AL. A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro. J Biol Chem. 1985; 260(24):13190-8.

Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblihtt AR. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(21):11456-60.

Cramer P, Cáceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, Kornblihtt AR. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on

an exonic splicing enhancer. Mol Cell. 1999; 4(2):251-8.

Darzacq X, Shav-Tal Y, de Turris V, Brody Y, Shenoy SM, Phair RD, Singer RH. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(9):796-806.

de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. Mol Cell. 2003; 12(2):525-32.

de la Mata M, Kornblihtt AR. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. Nat Struct Mol Biol. 2006; 13(11):973-80.

de la Mata M, Lafaille C, Kornblihtt AR. First come, first served revisited: factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. RNA. 2010; 16(5):904-12.

Del Gatto-Konczak F, Bourgeois CF, Le Guiner C, Kister L, Gesnel MC, Stévenin J, Breathnach R. The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. Mol Cell Biol. 2000; 20(17):6287-99.

Du K, Peng Y, Greenbaum LE, Haber BA, Taub R. HRS/SRp40-mediated inclusion of the fibronectin EIIIB exon, a possible cause of increased EIIIB expression in proliferating liver. Mol Cell Biol. 1997; 17(7):4096-104.

Dujardin G, Buratti E, Charlet-Berguerand N, Martins de Araujo M, Mbopda A, Le Jossic-Corcos C, Pagani F, Ferec C, Corcos L. CELF proteins regulate CFTR pre-mRNA splicing: essential role of the divergent domain of ETR-3. Nucleic Acids Res. 2010; 38(20):7273-85.

Dujardin G, Lafaille C, Petrillo E, Buggiano V, Gómez Acuña LI, Fiszbein A, Godoy Herz MA, Nieto Moreno N, Muñoz MJ, Alló M, Schor IE, Kornblihtt AR. Transcriptional elongation and alternative splicing. Biochim Biophys Acta. 2013; 1829(1):134-40.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. EMBO J. 2001; 20(23):6877-88.

Eperon LP, Graham IR, Griffiths AD, Eperon IC. Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? Cell.

1988; 54(3):393-401.

Fededa JP, Petrillo E, Gelfand MS, Neverov AD, Kadener S, Nogués G, Pelisch F, Baralle FE, Muro AF, Kornblihtt AR. A polar mechanism coordinates different regions of alternative splicing within a single gene. Mol Cell. 2005; 19(3):393-404.

Gelfman S, Burstein D, Penn O, Savchenko A, Amit M, Schwartz S, Pupko T, Ast G. Changes in exon-intron structure during vertebrate evolution affect the splicing pattern of exons. Genome Res. 2012; 22(1):35-50.

Gerber HP, Hagmann M, Seipel K, Georgiev O, West MA, Litingtung Y, Schaffner W, Corden JL. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. Nature. 1995; 374(6523):660-2.

Ghetti A, Piñol-Roma S, Michael WM, Morandi C, Dreyfuss G. hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. Nucleic Acids Res. 1992; 20(14):3671-8.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(12):5547-51.

Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. RNA. 2001 Jun; 7(6):806-18.

Gu B, Eick D, Bensaude O. CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II in vivo. Nucleic Acids Res. 2013; 41(3):1591-603.

Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. Biochem J. 2010; 430(3):379-92.

Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol. 1983; 166(4):557-80.

Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. J Biol Chem. 1985; 260(27):14873-8.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the

human genome. Nature. 2004; 431(7011):931-45.

Kadener S, Cramer P, Nogués G, Cazalla D, de la Mata M, Fededa JP, Werbajh SE, Srebrow A, Kornblihtt AR. Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. EMBO J. 2001; 20(20):5759-68.

Kadener S, Fededa JP, Rosbash M, Kornblihtt AR. Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(12):8185-90.

Karn J, Vidali G, Boffa LC, Allfrey VG. Characterization of the non-histone nuclear proteins associated with rapidly labeled heterogeneous nuclear RNA. J Biol Chem. 1977; 252(20):7307-22.

Kessler O, Jiang Y, Chasin LA. Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA. Mol Cell Biol. 1993; 13(10):6211-22.

Lim LP, Sharp PA. Alternative splicing of the fibronectin EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats. Mol Cell Biol. 1998; 18(7):3900-6.

Listerman I, Sapra AK, Neugebauer KM. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. Nat Struct Mol Biol. 2006; 13(9):815-22.

Ljungman M, Hanawalt PC. The anti-cancer drug camptothecin inhibits elongation but stimulates initiation of RNA polymerase II transcription. Carcinogenesis. 1996; 17(1):31-5.

Long JC, Cáceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. Biochem J. 2009; 417(1):15-27.

McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M, Bentley DL. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. Nature. 1997; 385(6614):357-61.

McCracken S, Fong N, Rosonina E, Yankulov K, Brothers G, Siderovski D, Hessel A, Foster S, Shuman S, Bentley DL. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. Genes Dev. 1997; 11(24):3306-18.

Meininghaus M, Chapman RD, Horndasch M, Eick D. Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription. J Biol Chem. 2000; 275(32):24375-82.

Montes M, Cloutier A, Sánchez-Hernández N, Michelle L, Lemieux B, Blanchette M, Hernández-Munain C, Chabot B, Suñé C. TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription. Mol Cell Biol. 2012 Feb; 32(4):751-62.

Muñoz MJ, Pérez Santangelo MS, Paronetto MP, de la Mata M, Pelisch F, Boireau S, Glover-Cutter K, Ben-Dov C, Blaustein M, Lozano JJ, Bird G, Bentley D, Bertrand E, Kornblihtt AR. DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. Cell. 2009; 137(4):708-20.

Muro AF, Caputi M, Pariyarath R, Pagani F, Buratti E, Baralle FE. Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display. Mol Cell Biol. 1999; 19(4):2657-71.

Nogues G, Kadener S, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. J Biol Chem. 2002; 277(45):43110-4.

Nogués G, Muñoz MJ, Kornblihtt AR. Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength. J Biol Chem. 2003; 278(52):52166-71.

Nguyen VT, Giannoni F, Dubois MF, Seo SJ, Vigneron M, Kédinger C, Bensaude O. In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. Nucleic Acids Res. 1996; 24(15):2924-9.

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D, Baralle FE. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. J Biol Chem. 2000; 275(28):21041-7.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nat Genet. 2008; 40(12):1413-5.

Piñol-Roma S, Choi YD, Matunis MJ, Dreyfuss G. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. Genes Dev. 1988; 2(2):215-27. Erratum in: Genes Dev 1988; 2(4):490.

Robberson BL, Cote GJ, Berget SM. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. Mol Cell Biol. 1990; 10(1):84-94.

Roberts GC, Gooding C, Mak HY, Proudfoot NJ, Smith CW. Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. Nucleic Acids Res. 1998; 26(24):5568-72.

Saulière J, Sureau A, Expert-Bezançon A, Marie J. The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. Mol Cell Biol. 2006; 26(23):8755-69.

Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Alló M, Kornblihtt AR. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(11):4325-30.

Singh J, Padgett RA. Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. Nat Struct Mol Biol. 2009; 16(11):1128-33.

Spingola M, Grate L, Haussler D, Ares M Jr. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in Saccharomyces cerevisiae. RNA. 1999; 5(2):221-34.

Spring J. Vertebrate evolution by interspecific hybridisation--are we polyploid? FEBS Lett. 1997; 400(1):2-8.

Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. J Cell Sci. 2006; 119(Pt 13):2635-41.

Suzuki Yasutsugu, Suzuki Youichi. Gene Regulatable Lentiviral Vector
System. En Viral Gene Therapy, Dr. Ke Xu (Ed.). 2011. ISBN: 978-953-307-539-6.

Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. Nat Genet. 1995; 9(2):184-90.

Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell. 2009; 136(4):701-18.

Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtukova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature. 2008; 456(7221):470-6.

Wieringa B, Meyer F, Reiser J, Weissmann C. Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit beta-globin gene. Nature. 1983; 301(5895):38-43.

Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011; 3(7).

Zahler AM, Roth MB. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(7):2642-6.

Zhou HL, Hinman MN, Barron VA, Geng C, Zhou G, Luo G, Siegel RE, Lou H. Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(36):E627-35.

Zhu J, Mayeda A, Krainer AR. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. Mol Cell. 2001; 8(6):1351-61.

Zuccato E, Buratti E, Stuani C, Baralle FE, Pagani F. An intronic polypyrimidine-rich element downstream of the donor site modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 alternative splicing. J Biol Chem. 2004; 279(17):16980-8.