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 ¨epigenética¨ del splicing alternativo durante la diferenciación neuronal

Fiszbein, Ana

2016-05-17

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:
Fiszbein, Ana. (2016-05-17). Regulación ¨epigenética¨ del splicing alternativo durante la diferenciación neuronal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Fiszbein, Ana. "Regulación ¨epigenética¨ del splicing alternativo durante la diferenciación neuronal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-05-17.

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 "epigenética" del *splicing* alternativo durante la diferenciación neuronal

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Ana Fiszbein

Director: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Consejera de estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias

Buenos Aires, 2016

REGULACIÓN "EPIGENÉTICA" DEL *SPLICING* ALTERNATIVO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Las modificaciones epigenéticas son cruciales para el establecimiento y mantenimiento de programas de diferenciación celular. Un posible mecanismo de regulación está determinado por el efecto de la estructura de la cromatina en los patrones de *splicing* alternativo. Las marcas epigenéticas pueden provocar cambios en la tasa de elongación de la ARN polimerasa II, así como afectar el reclutamiento de diversos factores y, de esta manera, modular los patrones de *splicing* alternativo. Aquí descubrimos el mecanismo por el cual el *splicing* alternativo de la molécula de adhesión celular neural (NCAM) es regulado durante la diferenciación neuronal mediante la estructura cromatínica. Por otra parte, nos centramos en la regulación del *splicing* alternativo de G9a, la enzima responsable de la dimetilación en lisina 9 de histona H3 (H3K9me2) en eucromatina de mamíferos. Demostramos que G9a es necesaria para la diferenciación de la línea celular neuronal de ratón N2a y que la inclusión de su exón alternativo (E10) aumenta la localización nuclear de G9a, probablemente debido a la mayor exposición de una secuencia de localización nuclear cercana. Por último, mostramos que la isoforma de G9a que incluye el E10 es necesaria para la diferenciación neuronal y que regula el patrón de *splicing* alternativo de su propio ARN mensajero precursor promoviendo una mayor inclusión del E10. Nuestros resultados indican que, mediante el control de su *splicing* alternativo, G9a promueve la diferenciación neuronal y gatilla un mecanismo de retroalimentación positiva que reafirma el compromiso a la diferenciación celular.

Palabras claves: Splicing alternativo, NCAM, G9a, polimerasa II, estructura cromatínica, diferenciación neuronal, epigenética.

"EPIGENETIC" REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING DURING NEURONAL DIFFERENTIATION

Epigenetic modifications are critical for the establishment and maintenance of differentiation programs. One possible mechanism of regulation is determined by the effect of chromatin structure on alternative splicing patterns. Epigenetic marks can cause changes in elongation rate of RNA polymerase II, as well as affect the recruitment of different factors, and thus modulate alternative splicing choices. Here we discovered the mechanism by which the alternative splicing of the neural cell adhesion molecule (NCAM) is regulated during neuronal differentiation by chromatin structure. Moreover, we focused on the regulation of G9a alternative splicing, the enzyme responsible for dimethylation of lysine 9 in histone H3 (H3K9me2) in mammalian euchromatin. We demonstrate here that the G9a methyltransferase is required for differentiation of the mouse neuronal cell line N2a and that inclusion of its alternative exon 10 (E10) increases during neuronal differentiation of cultured cells, as well as in the developing mouse brain. Although E10 inclusion greatly stimulates overall H3K9me2 levels, it does not affect G9a catalytic activity. Instead, E10 increases G9a nuclear localization, predictably due to higher exposure of a neighboring nuclear localization signal. We show that G9a inclusion of E10 isoform is necessary for neuron differentiation and regulates the alternative splicing pattern of its own pre-mRNA, enhancing E10 inclusion. Overall, our findings indicate that, by regulating its own alternative splicing, G9a promotes neuron differentiation and creates a positive feedback loop that reinforces the cellular commitment to differentiation.

Keywords: Alternative splicing, NCAM, G9a, RNA polymerase II, chromatin structure, neuronal differentation, epigenetics.

A Boris

más tesis para más

PUBLICACIONES REFERIDAS A ESTA TESIS

Trabajos originales

- Fiszbein A, Giono LE, Quaglino A, Berardino BG, Sigaut L, von Bildering C, Schor IE, Pietrasanta L, Caramelo JJ, Srebrow A and Kornblihtt AR. *Alternative splicing in G9a regulates neuronal differentiation.* Cell Reports 2016 Mar 29; 14:2797–2808

- Schor IE*, Fiszbein A*, Petrillo E, Kornblihtt AR. *Intragenic epigenetic changes modulate NCAM alternative splicing upon neuronal differentiation.* EMBO Journal 2013 Ago 14; 32:2264-74 * Los autores contribuyeron de manera equivalente en este trabajo

Revisiones

- Gómez Acuña LI, Fiszbein A, Alló M, Schor IE, Kornblihtt AR. *Connections between chromatin signatures and splicing.* Wiley Interdisciplinary Reviews RNA 2012 Oct 16; 4:77-91

- Dujardin G, Lafaille C, Petrillo E, Buggiano V, Gómez Acuña LI, Fiszbein A, Godoy Herz MA, Nieto Moreno N, Muñoz MJ, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR. *Trasncriptional elongation and alternative splicing.* Biochim Biophys Acta 2012 Sep 7; 1829:134-40

Capitulos de libros

- Fiszbein A, Schor IE, Kornblihtt AR. *Fundamentals of NCAM expression, function and regulation of alternative splicing in neuronal differentiation.* Capitulo del libro *Neural surface antigens - from basic biology toward biomedical applications* publicado por Elsevier Science & Technology, ISBN 0128011262, 2015 Abril 29

- Fiszbein A, Godoy Herz MA, Gómez Acuña LI, Kornblihtt AR. *Interplay between chromatin and splicing. Capitulo del libro Chromatin Regulation and Dynamics*. Sera publicado por Elsevier Science & Technology, con referato. Actualmente en preparación en vísperas de publicarse a mediados de 2016

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

Abreviaturas

5aC: 5 aza-citidina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

AR: ácido retinoico

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensajero

BIX: BIX-01294

DMSO: dimetil-sulfóxido

dNTPs: desoxi-ribonucleósidos-trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

E10: exón 10 de G9a

E18: exón 18 de NCAM

G9a: Eukaryotic histone methyl-transferase protein type 2

GLP: G9a-like protein

NCAM: Neural cell adhesion molecule

nChIP: inmunoprecipitación nativa de la cromatina

nt: nucleótidos

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pre-RNAm o pre-mRNA: RNA mensajero precursor

RNAPII: RNA polimerasa II

RNA-seq: Secuenciación de RNA

RT: retrotranscripción

TSA: tricostatina A

Nomenclatura

La nomenclatura común para las modificaciones de las histonas es:

- a. El nombre de la histona (H1, H2A, H2B, H3, H4, y variantes)
- b. Abreviatura del aminoácido modificado siguiendo el codigo IUPAC de una letra
- c. La posición que ocupa el aminoácido modificado desde el extremo N-terminal
- d. El tipo de modificación (me: metil, ph: Fosfato, ac: Acetil, ub: Ubiquitina)
- e. En el caso de las metilaciones, representa el número de grupos metilo anñdidos (1: monometilación, 2: dimetilación, 3: trimetilación)

Por ejemplo:

$$\mathrm{H3}_{(a)}\mathrm{K}_{(b)}9_{(c)}\mathrm{me}_{(d)}2_{(e)}$$

denota una dimetilacion de la lisina nueve de la histona H3.

Índice general

Resumen I

Abstract III

Agradecimientos V

Dedicatoria IX

Publicaciones referidas a esta tesis XI

Abreviaturas y nomenclatura XIII

1. Introducción 1

1.1. La estructura de la cromatina 2

1.1.1. Modificaciones de histonas 3

1.1.2. Combinación de marcas en la cromatina y enzimas reponsables 6

1.2. La regulación del *splicing* alternativo 8

1.2.1. Generación y procesamiento de RNAm en los organismos eucariotas 9

1.2.2. *Splicing* cotranscripcional 10

1.3. De la estructura de la cromatina al *splicing* alternativo 14

1.4. El sistema nervioso como modelo de trabajo 16

1.4.1. Estructura de la cromatina en el sistema nervioso 17

1.4.2. *Splicing* alternativo en el sistema nervioso 18

1.4.3. Líneas celulares neuronales como modelo de estudio 19

1.5. El splicing alternativo del exón 18 de NCAM 20

1.5.1. La proteína NCAM 20

1.5.2. La regulación del *splicing* alternativo de NCAM 21

1.6. El splicing alternativo de G9a 24
1.6.1. La enzima G9a 24
1.6.2. G9a, GLP y complejos de metiltransferasas 25
1.6.3. G9a en diferenciación celular y sistema nervioso 25
1.6.4. G9a como regulador transcripcional 27
1.6.5. Las isoformas de G9a 28

2. Objetivos 31

3. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal 33
3.1. Sistema de trabajo: cultivo de células que se diferencian a neuronas . 33
3.2. Modelo de estudio: *splicing* alternativo del exón 18 de NCAM 36
3.3. El *splicing* alternativo de NCAM es regulado por la estructura cromatínica en neuronas maduras 36
3.4. Durante la diferenciación neuronal aumentan las marcas cromatínicas asociadas a la represión transcripcional en el gen NCAM 39

4. El *splicing* alternativo de G9a regula la diferenciación neuronal . 45
4.1. G9a es necesaria para la diferenciación neuronal 45
4.2. El pre-RNA mensajero de G9a sufre *splicing* alternativo durante la diferenciación neuronal 47
4.3. La secuencia del E10 de G9a está altamente conservada 50
4.4. La inclusión del E10 de G9a es necesaria para la diferenciación neuronal 50
4.5. Los niveles de H3K9me2 aumentan durante la diferenciación neuronal y son estimulados por la inclusión del E10 de G9a 53
4.6. La inclusión del E10 no afecta la actividad catalítica intrínseca de G9a 54
4.7. Funcionalidad diferencial de las isoformas de G9a y tendencia al desorden de cada aminoácido 55
4.8. La localización subcelular de G9a se modifica durante la diferenciación neuronal 58

4.9. La inclusión del E10 promueve la localización nuclear de G9a 60
4.10. La inclusión del E10 está regulada por la estructura de la cromatina . 63
4.11. G9a regula su propio *splicing* durante la diferenciación neuronal . . . 65

5. Discusión 73
5.1. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal 73
5.2. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de G9a durante la diferenciación neuronal 76

6. Conclusiones 83
6.1. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal 83
6.2. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de G9a durante la diferenciación neuronal 83

7. Materiales y Métodos 85
7.1. Cultivos celulares y tratamientos 85
7.1.1. Cultivos celulares y diferenciación neuronal 85
7.1.2. Tratamientos celulares con inhibidores farmacológicos 86
7.1.3. Transfección transitoria de células 87
7.2. Animales 87
7.3. Vectores utilizados y preparación de plásmidos 88
7.3.1. Vectores utilizados 88
7.3.2. Preparación de plásmidos en pequeña escala y gran escala . . 89
7.3.3. Cuantificación de plásmidos 90
7.3.4. Transformación de bacterias competentes 90
7.4. Extracción de RNA, RT y PCR 90
7.4.1. Extracción de RNA 90
7.4.2. Retrotranscripción 91
7.4.3. PCR semi-cuantitativa 91

7.4.4. Evaluación de los patrones de *splicing* alternativo por RT-PCR 92
7.4.5. PCR en tiempo real 93
7.5. Técnicas de inmunofluorescencia y anticuerpos utilizados 94
7.6. Western Blot y anticuerpos utilizados 95
7.7. Ensayos de determinación de modificaciones post-traduccionales de histonas 95
7.7.1. Inmunoprecipitación nativa de la cromatina (nChIP) 95
7.7.2. Western blot contra H3K9me2 98
7.8. FRET 99
7.9. Oligonucleótidos y siRNAs utilizados 99
7.9.1. PCR semicuantitativa 99
7.9.2. PCR en tiempo real 100
7.9.3. siRNAs 101

Bibliografía 101

1. INTRODUCCIÓN

Los distintos tipos de células que se encuentran en organismos multicelulares muestran grandes diferencias en el fenotipo, la función y la respuesta a estímulos externos. Sin embargo, todos derivan de la misma célula cigótica y comparten un material genético idéntico. Esta diversidad surge como resultado de un proceso de diferenciación muy complejo que requiere la activación e inactivación de diversos programas transcripcionales. Además de conjuntos específicos de factores de transcripción, se ha hecho evidente que los mecanismos epigenéticos son críticos tanto para la creación de programas de diferenciación como para el mantenimiento de fenotipos diferenciados adquiridos [1].

El término "epigenética" es utilizado en referencia a diversos procesos. Su fundador, Hal Waddington, lo introdujo por primera vez en 1942 para hacer referencia a todas las vías moleculares que modulan la expresión del genotipo dando lugar a un determinado fenotipo. Sin embargo, con el transcurso de los años, la definición se fue diversificando y en este momento resulta necesario aclarar a qué nos referimos con "epigenética". El uso actual más extendido de la palabra hace mención al estudio de los cambios heredables y transitorios en la expresión génica que no implican un cambio en la secuencia primaria de DNA [2]. En este trabajo tomaremos una definición amplia del uso del término haciendo especial hincapié en las modificaciones que sufren las histonas y el DNA generando cambios en la estructura de la cromatina que puedan, a su vez, provocar cambios en la expresión génica sin alterar la secuencia del DNA, independientemente de si hay prueba de que sean cambios heredables. A continuación, se introducirán los conceptos fundamentales necesarios para comprender este trabajo de investigación centrándonos principalmente en la definición y presentación de los antecedentes de los temas fundamentales. Introduciremos las bases de las modificaciones epigenéticas abarcando las modificaciones post-traduccionales de histonas, la regulación del *splicing* alternativo y su relación

con la estructura de la cromatina. Pondremos estos temas en contexto con la presentación del sistema nervioso como un modelo de estudio y ejemplificaremos con los genes protagonistas de esta historia.

1.1. La estructura de la cromatina

Dentro de la célula, el DNA se encuentra específicamente ordenado. El primer nivel de compactación es la formación de nucleosomas. Un nucleosoma está formado por un octámero de histonas compuesto por un tetrámero de histonas H3 y H4, flanqueado por dos dímeros de histonas H2A y H2B sobre el cual se enrollan 146 pares de bases de DNA. Las histonas son pequeñas proteínas básicas que poseen una región central altamente estructurada que forma el corazón del nucleosoma, y extremos amino y carboxilo terminales que sobresalen de la superficie del nucleosoma sin adoptar una estructura definida (Figura 1.1). Cobran especial interés las modificaciones post-traduccionales covalentes que puede sufrir la porción amino terminal de las histonas debido a su importancia en el control de la expresión génica.

Siguiendo con los niveles de compactación que adopta el DNA, durante mucho tiempo se aseguró que los nucleosomas se empaquetan en fibras de 30 nm de diámetro. Sin embargo, trabajos más recientes cuestionaron la existencia de esta organización *in vivo* y propusieron que las fibras de nucleosomas existen como polímeros desordenados [3]. Sí se acepta que el DNA alcanza el máximo grado de compactación formando cromosomas. Es posible distinguir dos tipos diferentes de cromatina según el grado de empaquetamiento: zonas de eucromatina que corresponden a regiones menos compactadas, y zonas de heterocromatina, o sea, regiones de elevada compactación. Dichos niveles de compactación afectan el grado de exposición del DNA a las maquinarias de transcripción, replicación, reparación y diferentes procesos biológicos. Por ende, el grado de empaquetamiento se correlaciona con diferentes niveles de actividad transcripcional entre otros mecanismos y mientras que las zonas de eucromatina están asociadas a una transcripción activa, las regiones heterocromatinizadas suelen estar trasncripcionalmente reprimidas. El acceso al DNA, de esta

manera, queda regulado por diversos procesos entre los que se encuentran las modificaciones que sufren las colas de las histonas, el remodelamiento de nucleosomas y el uso de diferentes variantes de histonas.

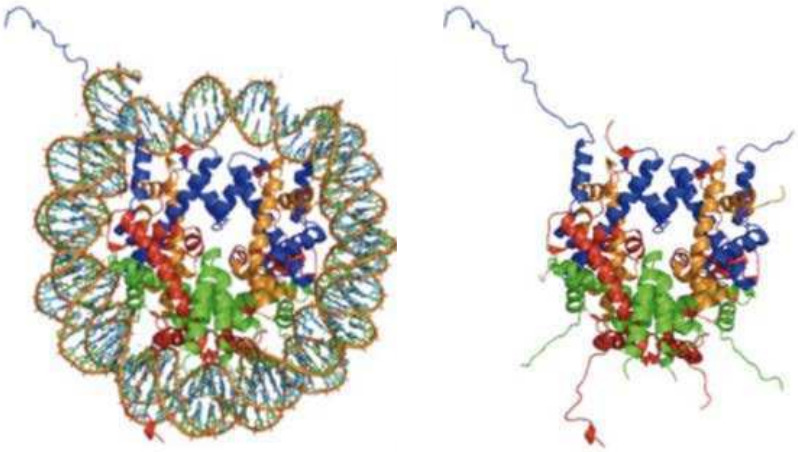

Fig. 1.1: Estrucutra cristalográfica de un nucleosoma. La estructura cristalográfica de un octámero de histonas (PDB: 1AQI) muestra cómo se ensamblan dos histonas H3 (azul) con dos histonas H4 (naranja) con dos dímeros de histonas H2A (rojo) y H2B (verde). La estructura desordenada de las colas de histonas sobresale por fuera de la estructura dejándolas expuestas a diferentes maquinarias biológicas.

1.1.1. Modificaciones de histonas

Sobre la base de las diversas modificaciones químicas descriptas que pueden sufrir las histonas, se ha postulado la existencia de un código de histonas según las consecuencias de cada modificación. Estas alteraciones constituyen otro nivel de regulación y la combinación de las distintas modificaciones aporta un mayor grado de complejidad. Las modificaciones covalentes de histonas se producen en el dominio amino terminal por fuera de la estructura nucleosomal. También llamada cola de histonas, este dominio es una región de aproximadamente 40 aminoácidos sin estructura tridimensional definida [4] que resulta una herramienta fundamental para el almacenamiento de información y una superficie expuesta que facilita la interacción con otras proteínas [4, 5]. Existen diversos tipos de modificaciones de histonas entre los que se encuentran la acetilación, la metilación y la fosforilación.

Ocurren en distintos residuos y traen aparejadas diversas consecuencias. En la Figura 1.2 se ejemplifican las modificaciones que puede sufrir la cola N-terminal de la histona H3.

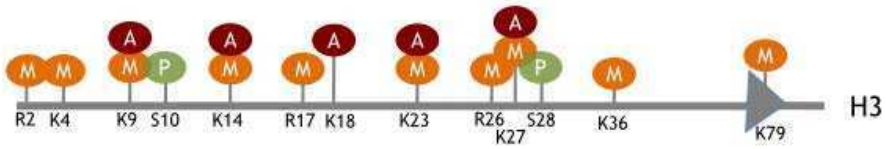

Fig. 1.2: Modificaciones covalentes en la histona H3. Se muestran las distintas modificaciones que pueden sufrir la histona H3 en cada uno de sus residuos pertenecientes al dominio amino terminal. Cada residuo se indica con el código de una letra, mientras que A hace referencia a una posible acetilación, M a una posible metilación y P a una posible fosforilación.

Se estudió extensamente cómo estas modificaciones covalentes pueden afectar procesos fundamentales como la estructura de la cromatina y la expresión génica. Por un lado se ha propuesto que las modificaciones de histonas pueden alterar las interacciones electrostáticas entre el DNA y los residuos de la cola de histonas [6] y así variar el grado de compactación de la cromatina [7, 8]. Las interacciones que se dan entre el DNA ácido y los residuos básicos de las histonas se podrían alterar traduciéndose en un cambio de afinidad en la estructura del nucleosoma. Por otra parte, otros trabajos han propuesto que las modificaciones de las histonas podrían servir como plataforma de señalización para el reclutamiento de diversas proteínas responsables del cambio en la compactación entre otros procesos [9]. Actualmente, se sabe también que distintos patrones de modificaciones actúan secuencialmente, o en combinación y son leídos por otras proteínas [10]. Los "lectores"del código actuarían como intérpretes y podrían ser, en parte, responsables de los cambios en la estructura de la cromatina [11]. De este modo, la modificación covalente de las colas de histonas

resultó ser un punto de convergencia de múltiples vías de señalización y es una forma de incorporar un código epigenético adicional superpuesto al código genético [12, 13].

Una de las modificaciones más estudiadas es la metilación de histonas en lisinas o argininas. Distintas lisinas metiladas se asocian a distintos procesos, y el nivel de metilación (mono-, di- o tri-metilación) afecta el reconocimiento de la marca. Distintas metilaciones pueden estar involucradas tanto en la activación como en la represión de la transcripción (Figura 1.3). Una de las funciones clásicas en las que participa la metilación de histonas es en la formación de heterocromatina. La heterocromatina se distingue en constitutiva y facultativa según la reversibilidad de las marcas epigenéticas que la constituyen. Las zonas que adquieren una organización de heterocromatina facultativa dependen del tipo celular y del momento del desarrollo, son reversibles y están enriquecidas en secuencias repetitivas de tipo LINE (por *long interspersed element*). Por el contrario, las zonas de heterocromatina constitutiva son las mismas en todos los tipos celulares de un organismo, incluyen las regiones centroméricas y teloméricas y son ricas en secuencias repetidas en tandem. A pesar de que las marcas en la heterocromatina constituva son más estables que las encontradas en la facultativa, ambas comparten importantes propiedades como la represión transcripcional mediada por una hipoacetilación y una hipermetilación tanto de las histonas como del DNA. En metazoos, se encuentra un enriquecimiento particular de la tri-metilación en lisina 9 de H3 (H3K9me3) en las regiones de heterocromatina pericentromérica [14].

Por el contrario, las zonas de eucromatina se encuentran enriquecidas en mono- y di-metilación de H3(H3K9me1 y H3K9me2) [14]. De esta manera, en zonas eucromáticas, la inactivación génica se asocia a altos niveles de H3K9me2 junto con una elevada tri-metilación en lisina 27 (H3K27me3) [14, 15]. En cuanto a genes activos, las marcas más comúnmente asociadas son la di- y tri-metilación en lisina 4 de histona H3 y la tri-metilación en lisina K36 de histona H3; la primera se encuentra en las regiones más proximales al promotor, mientras que la última crece a medida que nos alejamos del mismo y es alta en las regiones distales del gen [16].

Fig. 1.3: Significado de modificaciones post-traduccionales de la histona H3. Se muestran las consecuencias esperadas de algunas típicas modificaciones covalentes que puede sufrir la histona H3

1.1.2. Combinación de marcas en la cromatina y enzimas reponsables

La gran variedad de modificaciones de histonas ofrece muchas posibilidades para el control estricto de la estructura de la cromatina. Sin embargo, un nivel de complejidad adicional existe debido al *cross-talk* entre diferentes modificaciones [12]. La combinación de marcas y su regulación conjunta puede ocurrir a través de múltiples mecanismos. Por ejmplo, puede haber competencia entre las modificaciones si estas son sobre el mismo residuo. Esto es de particular importancia para las lisinas que pueden ser acetiladas, metiladas o incluso ubicitinadas. Por otra parte, puede ocurrir que una modificación sea dependiente de otra, como en el caso de la metilación en H3K4 y H3K79 que dependen de la previa ubicitinación de H2BK123 en *Saccharomyces cerevisiae* [17]. Más aun, la unión de una proteína a una modificación particular puede ser interrumpida por una modificación adyacente. Este es el caso de HP1 cuya unión a H3K9me2 y H3K9me3 se ve interrumpida durante la mitosis debido a la fosforilación de H3S10 [18]. También existe la cooperación entre modificaciones con el fin de reclutar eficientemente factores específicos. Por ejemplo, PHF8

se une específicamente a H3K4me3, y esta interacción es más fuerte cuando H3K9 y H3K14 también están acetiladas en la misma H3 [19].

La identificación de las enzimas responsables de las modificaciones en las histonas ha sido el foco de intensa actividad durante los últimos años y se han caracterizado las enzimas responsables de las principales modificaciones conocidas en distintas especies. Se sabe que la mayoría de las modificaciones son dinámicas y, en casi todos los casos, se han identificado también las enzimas que eliminan dichas modificaciones [20]. La tabla 1.4 presenta a las enzimas responsables de incorporar las marcas cromatínicas más conocidas. La caracterización bioquímica y estructural de las enzimas modificadoras de histonas ha producido importantes avances en sus respectivos mecanismos catalíticos y ha sido de fundamental importancia para comprender las especificidades de sustrato y sus mecanismos de regulación [21].

	Enzimas responsables	Actividad transcripcional asociada	Distribución génica relativa
H3/H4Ac	HAT1, CBP/p300, PCAF/GCN5, TIP60	Activación	Promotores de genes activos
H3K27me3	EZH2	Represión	Loci inactivos
H3K9me2, me3	Suv39h, G9a, Eu-HMTase I, ESET, SETBD1	Represión	Loci inactivos y en regiones intragénicas de genes activos
H3K4me3	MLL/WRD5, SET1, ASH1	Activación	Promotores y regiones 5´ de genes activos
H3K36me3	HYPB, SMYD2, NSD1	Represión de la iniciación interna.	Intragénica, aumento hacia el 3´ de genes activos
H3K79me1	Dot1	Activación	Regiones intragénicas de genes activos

Fig. 1.4: Enzimas responsables de marcas de histonas. Se muestran algunas de las modificación de histonas típicas junto con su papel en la actividad transcripcional y su distribución génica relativa. Para cada marca, se informan las enzimas responsables. Tomado de [22].

1.2. La regulación del *splicing* alternativo

El *splicing* es el proceso de eliminación de intrones del pre-mRNA y unión de exones que media la expresión de la mayoría de los genes en eucariotas superiores. El *splicing* conduce al *splicing* alternativo, el proceso por el cual las moléculas de pre-mRNA pueden sintetizarse dando lugar a múltiples isoformas de RNAm partiendo de un único gen. Se cree que el *splicing* alternativo es uno de los mecanismso principales por el cual se logró la expansión de transcriptomas y proteomas en eucariotas multicelulares, lo cual permite su complejidad fenotípica [23, 24]. Se estima que el *splicing* alternativo afecta a casi el 95 por ciento de los genes humanos, y se sabe que es más la regla que una excepción [25]. Más aún, se ha descripto que más del 60 por ciento de eventos de *splicing* alternativo en humanos están regulados diferencialmente entre distintos tejidos [26] y es esperable que sean modulados específicamente en todas las etapas de desarrollo.

El *splicing* alternativo no sólo es la fuente más importante de diversidad de RNA mensajeros y proteínas sino que además, contribuye en gran medida a los patrones de expresión específicas de tejido y de especie en eucariotas multicelulares [27–29]. El *splicing* alternativo desempeña un papel fundamental en diversos procesos normales y patológicos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, así como el cáncer y numerosas enfermedades [30–32]. El compromiso a sufrir *splicing* de los pre-mRNA se produce generalmente de forma cotranscripcional, pero la reacción de *splicing* en sí misma puede ocurrir tanto co- como post-transcripcionalmente [33]. Un trabajo muy reciente, utiliza estrategias de *RNA-seq* de molécula única para determinar que el *splicing* de los pre-mRNAs nacientes se produce tan pronto como la RNAPII transcribe los intrones [34]. Por primera vez, se determinó directamente el progreso de la catálisis del *splicing* como una función de la posición de la RNAPII en levaduras y se demostró que el *splicing* se completa al 50 % cuando la RNAPII se encuentra 45 nt río abajo del extremo 3' del intrón recién sintetizado. Este tipo de estudios favorecen la visión de que la comprensión del tiempo que transcurre entre la progresión de la RNAPII y el *splicing* proporciona conocimientos sobre los meca-

nismos operantes en la regulación de la expresión génica. Esta cotranscripcionalidad permite interacciones entre los mecanismos de transcripción y *splicing* [29].

La regulación del *splicing* alternativo no sólo depende de la interacción de factores de *splicing*, factores de transcripción y elementos regulatorios sino también de diversas señales extracelulares e intracelulares. Por otra parte, al igual que otras reacciones de procesamiento de pre-mRNA, el *splicing* está también acoplado a los cambios que puedan ocurrir en el DNA. Dado que no es lo mismo caminar sobre una superficie plana que sobre una carretera rocosa, la transcripción puede dar lugar a diferentes opciones de *splicing* en función de la estructura de la cromatina. Por lo tanto, la regulación del *splicing* alternativo incluye el estado de la estructura de la cromatina, los cambios en los factores de accesibilidad, las modificaciones de las histonas y la tasa de elongación de la RNA polimerasa II (RNAPII) [22, 35].

1.2.1. Generación y procesamiento de RNAm en los organismos eucariotas

El término intrón se refiere a secuencias no codificantes que no se incluyen en el RNAm maduro. En contraposición, los exones se refieren a las secuencias que permanecen una vez que los intrones se han eliminado. La mayoría de las veces, los exones se incluyen en el RNAm maduro y los intrones son excluidos. Sin embargo, cuando el *splicing* alternativo entra en juego la interpretación es más compleja. En las células humanas, en general, el 90 por ciento del pre-mRNA se retira como intrones, mientras que 10 por ciento representa secuencias exónicas.

La enzima responsable de la transcripción del RNAm es la RNAPII. La transcripción se inicia en el nucleótido +1 identificado por ser el primer nucleótido sintetizado y termina río abajo del sitio de corte y poliadenilación. El RNA precursor es reconocido por una partícula llamada *spliceosoma*, que tiene sitios específicos de unión en cada uno de los intrones a ser eliminados. El spliceosoma consiste en una megapartícula ribonucleoproteica que comprende cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (U1, U2, U4, U5 y U6 snRNPs) y un conjunto de proteínas auxiliares.

Es una estructura muy dinámica; la variación de su conformación y la composición permite precisión y flexibilidad al mismo tiempo.

Secuencias cortas altamente conservadas en el sitio de *splicing* (ss) 5', 3' y en el sitio de ramificación en el RNAm recién sintetizado contribuyen al reconocimiento por el *spliceosoma* y a la definición entre exones e intrones. En los eucariotas más complejos, el sitio de ramificación es seguido por otro sitio de reconocimiento conocido como trecho de polipirimidinas. En la primera etapa U1 es reclutado al sitio 5'ss mientras que los factores auxiliares SF1 y U2AF interactúan con el sitio de ramificación y el tracto de polipirimidina, respectivamente. Después, U2 reconoce el sitio de ramificación y, posteriormente, U4/U6 con U5 son reclutados (Figura 1.5). Algunos reordenamientos en las interacciones RNA-RNA y RNA-proteína provocan una desestabilización de los snRNPs U1 y U4, dando lugar a la forma activada del spliceosoma [36]. A continuación, el spliceosoma activado elimina intrones del pre-mRNA por dos reacciones de transesterificación consecutiva y es liberado, disociándose de los snRNPs, que pueden participar en rondas adicionales de *splicing*.

1.2.2. *Splicing* cotranscripcional

Durante las últimas décadas se hizo evidente que las interacciones funcionales y físicas entre las maquinarias de transcripción y de *splicing* constituyen un nuevo nivel de regulación del *splicing* alternativo. Uno de los trabajos fundacionales del campo demostró que diferentes promotores regulando la misma unidad transcripcional da lugar a diferentes proporciones de dos isoformas de *splicing* [37]. En conjunto, se acepta actualmente que a pesar de estar regulados por dos maquinarias distintas, la transcripción y el *splicing* no son procesos independientes. Se sabe que el ensamblado del spliceosoma es cotranscriptional *in vivo* y el *splicing* se puede producir tanto durante la transcripción, como también una vez que se haya completado. Se cree que algunos intrones podrían ser procesados cotranscripcionalmente, mientras que otros podrían serlo de forma post-transcripcional y no se sabe si el mismo intrón siempre se procesa de la misma manera.

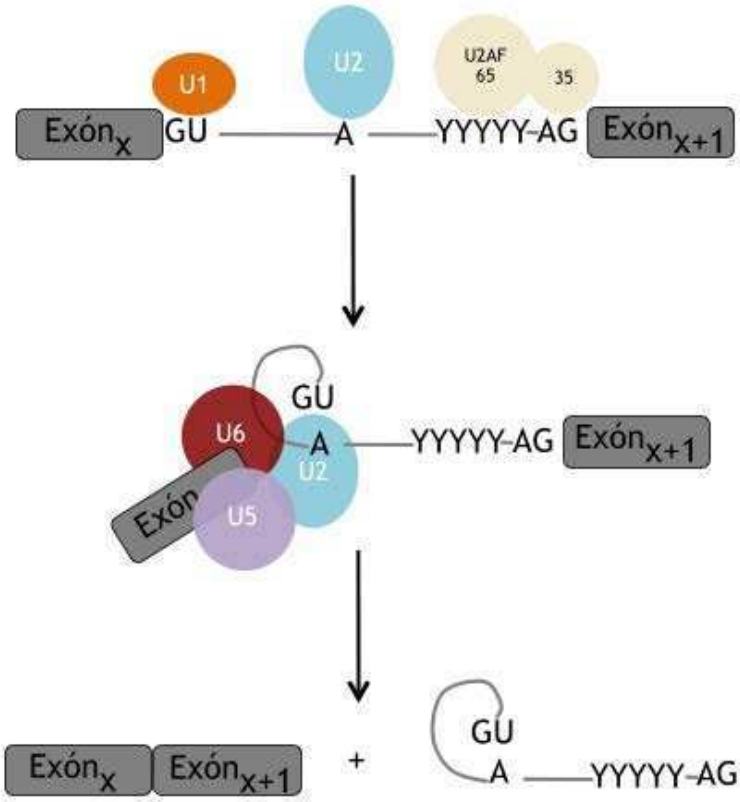

Fig. 1.5: Regiones del RNA que participan en el proceso de splicing en metazoos y algunos de los factores que las reconocen. El esquema muestra dos exones (cajas grises) flanqueando un intrón. Se aclaran los sitios 3' y 5' de splicing y el sitio de ramificación con sus secuencias consenso. Se muestran los distintos factores que participan en el reconocimiento de dichas secuencias y cómo secuencialmente se forman los diferentes complejos con funciones en el proceso de *splicing*.

Con el fin de explicar la influencia de la transcripción sobre el *splicing* alternativo, dos modelos posibles, que no son excluyentes y podrían actuar en conjunto, han sido propuestos [38].

El modelo de reclutamiento

Este modelo plantea que la maquinaria transcripcional podría reclutar factores de *splicing* o coactivadores transcripcionales con funciones regulatorias del *splicing* al RNAm nasciente. Este reclutamiento podría darse en forma diferencial en distintos contextos celulares, dando así lugar a diferentes resultados de los eventos de *splicing*.

Se conocen diferentes coactivadores transcripcionales que son capaces de regular el *splicing* alternativo de ciertos genes, y en algunos casos se ha demostrado que esta regulación es dependiente de su reclutamiento al promotor [39–41]. Uno de los casos más extensamente estudiados corresponde al efecto dependiente del dominio C-terminal de la RNAPII (CTD) de la proteína SRp20 sobre el *splicing* alternativo del exón EDI del gen de fibronectina [42].

El modelo cinético

El modelo cinético plantea que la velocidad de elongación de la polimerasa afecta el momento en el cual los sitios constitutivos y regulatorios de *splicing* son presentados al spliceosoma, favoreciendo o desfavoreciendo su reconocimiento. Las primeras evidencias a favor de este modelo sugirieron que la velocidad de síntesis del RNA puede regular el *splicing* y afectar la competencia de sitios de *splicing* débiles contra sitios fuertes [43] o la aparición de elementos regulatorios [44].

Un ejemplo típico lo constituye un caso en el que el sitio 3' de *splicing* del intrón río arriba de un exón alternativo es más débil en comparación con el sitio 3' del intrón río abajo. Una RNAPII rápida o sin pausas expondría ambos sitios 3' a los componentes del spliceosoma casi al mismo tiempo, dando lugar a una competencia entre ellos. Esta competencia privilegiará el uso del sitio más fuerte. Por el contrario, una RNAPII más lenta o con pausas durante la transcripción, daría más tiempo al sitio 3' débil para ser reconocido por el spliceosoma antes de que el sitio fuerte sea transcripto, y así generaría que el intrón río arriba se comprometa a ser procesado (Figura 1.6).

La primera demostración directa de que la elongación de la transcripción afecta el *splicing* alternativo en células humanas fue proporcionada por el uso de una forma mutante de la RNAPII con una mutación puntual que confiere a la enzima una velocidad menor. La RNAPII lenta estimuló la inclusión del exón EDI de fibronectina, confirmando la correlación inversa entre la tasa de elongación y la inclusión de este exón alternativo [45].

La conexión entre la tasa de elongación de la RNAPII, la maquinaria de *splicing*

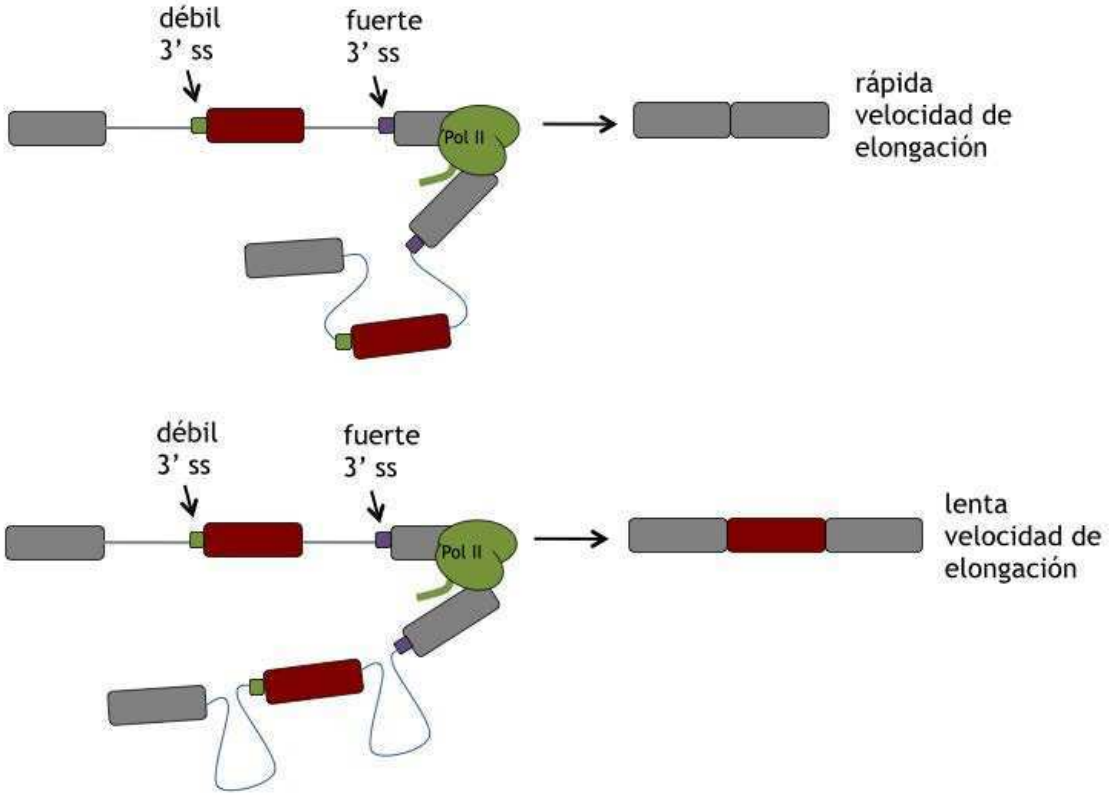

Fig. 1.6: El modelo cinético de acoplamiento funcional entre transcripción y *splicing* alternativo. El esquema muestra el modelo más simple propuesto para explicar por qué la tasa de elongación puede favorecer la inclusión de un exón alternativo con un sitio de *splicing* débil.

y el reclutamiento de factores se fue haciendo cada vez más evidente. Estudios más recientes a nivel de genoma completo mostraron que tanto la elongación lenta como la elongación rápida de la RNAPII afecta el *splicing* constitutivo al igual que el alternativo [46]. Según cómo responden a la velocidad de elongación, se diferenciaron distintos tipos de eventos de *splicing*. Los autores analizaron que los exones alternativos cuya inclusión se favorece con una elongación lenta y se desfavorece con una rápida (tipo I) tienen sitios de *splicing* más débiles e intrones flanqueantes más cortos, en relación a los exones cuya inclusión se desfavorece con una elongación rápida (tipo II). Inesperadamente, este trabajo analiza que la velocidad lenta y rápida de la RNAPII puede aumentar tanto como disminuir la inclusión de exones alternativos.

Estos resultados sugieren que se requiere una tasa óptima de elongación transcripcional para que el splicing de los pre-mRNAs ocurra cotranscripcionalmente de forma normal.

Y los dos modelos lejos de ser mutuamente excluyentes, son complementarios.

1.3. De la estructura de la cromatina al *splicing* alternativo

Como los patrones de *splicing* alternativo pueden estar regulados por la tasa de elongación de la RNAPII, la comprensión de las alteraciones de la velocidad de la RNAPII resulta fundamental. Por un lado, se sabe que la actividad intrínseca de la RNAPII puede influir en su propia tasa de elongación. Ejemplos de esta regulación se enfocan en el estado de fosforilación de la CTD y la asociación con factores de elongación. Por otra parte, la regulación de la tasa de elongación de la RNAPII podría estar determinada por el molde de la transcripción, el DNA. De este modo, la estructura de la cromatina termina regulando la velocidad de la RNAPII a la vez que afecta los patrones de *splicing* alternativo. Es esperable, entonces, que la presencia de marcas de histonas asociadas a la relajación de la cromatina generen un aumento en la tasa de elongación de la RNAPII y esto traiga aparejado una menor inclusión de exones alternativos, siguiendo el modelo cinético. Esta idea fue demostrada utilizando la despolarización de membrana de células N2a con altas concentraciones de KCl [47]. Los autores muestran que la presencia de metilación de histonas (H3K9me) en el cuerpo del gen NCAM y alrededor del exón alternativo 18 (E18), correlacionan con un aumento en la expresión de la isoforma de inclusión del E18 y con el reclutamiento de la proteína HP1. Proponen que la despolarización con KCl provoca una hiperacetilación, que genera una relajación de la estructura cromatínica con un aumento de la tasa de elongación de la RNAPII y provoca una disminución de la isoforma de inclusión del E18 (Figura 1.7).

Por otra parte, se sabe que cambios en la estructura de la cromatina debidos a la organización de los nucleosomas afectan el proceso de transcripción. Trabajos recientes se enfocaron en el posicionamiento de nucleosomas a nivel global y mos-

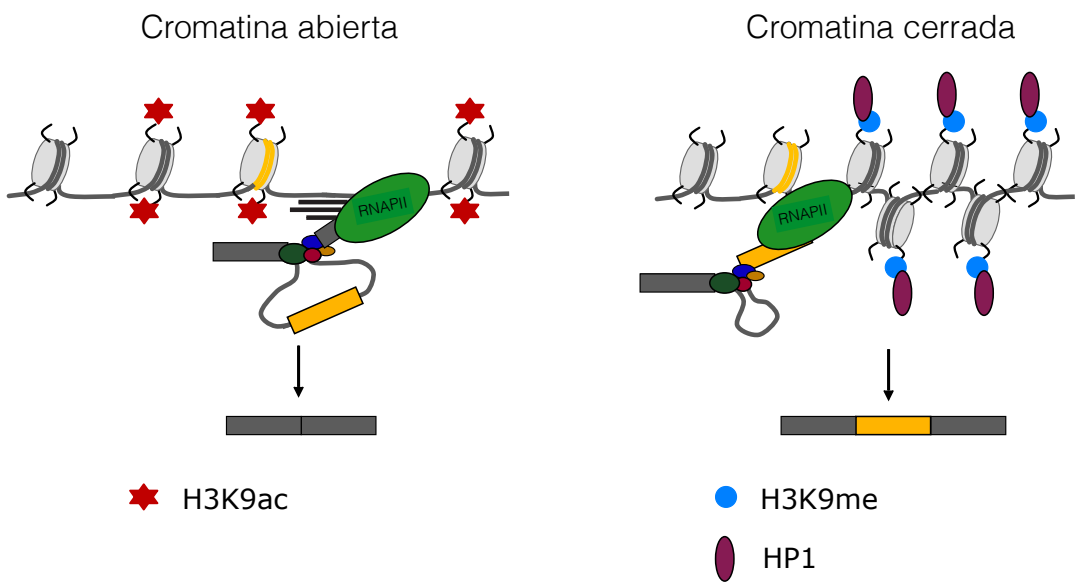

Fig. 1.7: Modelos de regulación de *splicing* alternativo a través de la estructura de la cromatina. La acetilación de histonas intragénica induce la relajación de la cromatina favoreciendo una alta tasa de elongación de la RNA polimerasa II (RNAPII) e induce la exclusión del exón alternativo. Por el contrario, la metilación intragénica induce la compactación de la cromatina por el reclutamiento de HP1, y en consecuencia, la tasa de elongación de la RNAPII disminuye favoreciendo la inclusión del exón alternativo.

traron cómo un gran número de nucleosomas no están distribuidos al azar, sino que se encuentran preferentemente en los exones [33, 48]. Por otra parte, se sabe que los nucleosomas se posicionan preferentemente en exones constitutivos en comparación con exones alternativos [49]. Estos resultados sugieren que el posicionamiento de los nucleosomas podría influir sobre la tasa de elongación de la RNAPII mediante la creación de pausas internas durante la transcripción.

En la última década se ha acumulado gran cantidad de evidencia demostrando la existencia de múltiples enlaces funcionales entre la estructura de la cromatina y el *splicing* de pre-mRNA [35, 50]. Los primeros trabajos, con virus y plásmidos [51, 52], y los más recientes, con genes endógenos muestran que distintas marcas de histonas

intragénicas se distribuyen de forma asimétrica entre los exones e intrones [53] y modulan las decisiones de *splicing* alternativo [47, 54–56]. Además de los cambios en las propiedades de elongación de la RNAPII, las marcas de la cromatina pueden regular tanto el *splicing* constitutivo como el alternativo mediante el reclutamiento de factores de *splicing* a los sitios de transcripción [50, 57, 58]. Un ejemplo lo constituye un análisis comparativo entre las marcas de la cromatina y los patrones de *splicing* alternativo de genes con secuencias de unión a PTB (proteína de unión al trecho de polipirimidinas) [50, 59]. El trabajo reveló que los genes dependientes de PTB están enriquecidos en H3K36me3 y desprovistos de H3K4me3 en las regiones de *splicing* alternativo. Se postula que la cromatina crea una plataforma para la unión de PTB al RNA a través del adaptador MRG15. Los altos niveles de H3K36me3 promueven la unión de MRG15, que, a su vez, facilita el reclutamiento de PTB, y regula el *splicing* alternativo (Figura 1.8).

1.4. El sistema nervioso como modelo de trabajo

El sistema nervioso proporciona una gran capacidad de adaptación al ambiente, e involucra una gran complejidad regulatoria. La necesidad de establecer y mantener precisas conexiones entre los distintos tipos neuronales y con las células efectoras implica eventos de migración, remodelación, crecimiento, e incluso eliminación de sinapsis y muerte celular programada. Las células neurales adultas deben no sólo mantener la homeostasis, sino que es necesaria una importante capacidad de plasticidad en los componentes del sistema, tanto para amoldarse y responder a los eventos que ocurren en la vida de un organismo, como para sostener la posibilidad del aprendizaje y la memoria.

Diversas investigaciones subrayan la importancia que tienen en el sistema nervioso tanto la estructura de la cromatina [60–62] como el *splicing* alternativo [63, 64]. Dicha importancia se hace evidente en la existencia de patologías del sistema nervioso asociadas a mutaciones o cambios en la actividad de reguladores de ambos procesos [65], como es el caso de los defectos en la memoria que se observan debido

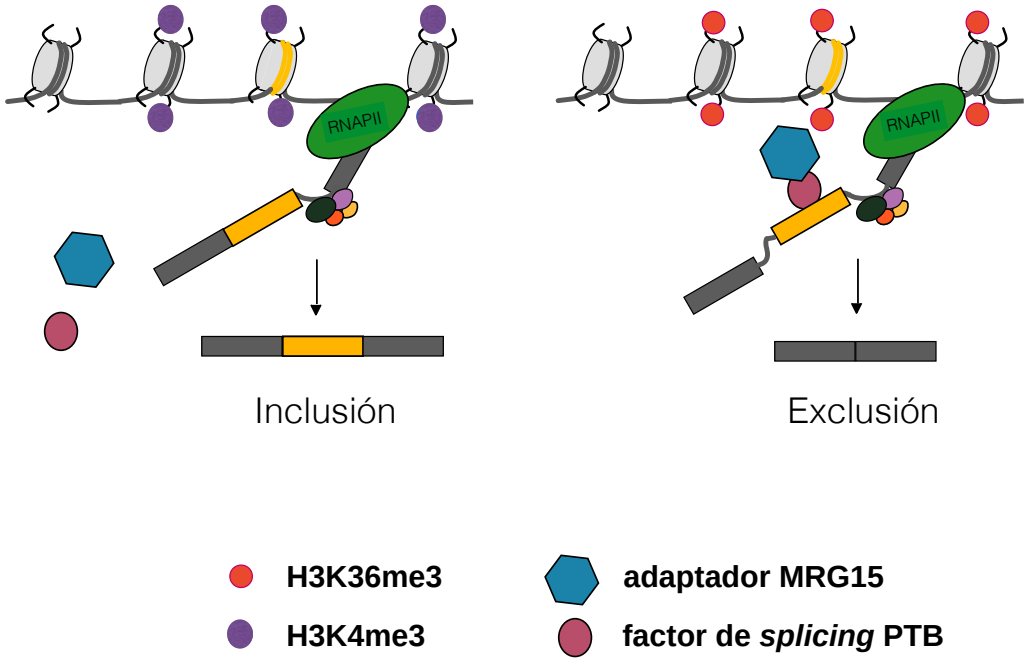

Fig. 1.8: Modelo de regulación del *splicing* alternativo por el reclutamiento del factor PTB a las marcas de histonas descriptas por [50]. La unión de PTB al pre-mRNA se ve favorecida cuando también se une un adaptador a H3K36me3. Cuando los niveles intragénicos de H3K36me3 son bajos y H3K4me3 son altos (panel izquierdo), la unión de PTB está desfavorecida y se promueve la inclusión del exón alternativo. A la inversa, cuando los niveles intragénicos de H3K36me3 son altos y H3K4me3 son bajos (panel derecho), se favorece la unión de PTB a la cromatina y disminuye la inclusión del exón alternativo.

a una hipoacetilación generalizada en ratones mutantes para la proteína de unión a CREB (CBP) [66]

1.4.1. Estructura de la cromatina en el sistema nervioso

Si bien las modificaciones de la cromatina son fundamentales para la expresión génica en cualquier tejido y especialmente durante la diferenciación celular, diversos trabajos remarcan la necesidad de su correcta regulación en el sistema nervioso. Por ejemplo, el balance entre acetilación y desacetilación de histonas es importante para la correcta progresión de linaje durante la diferenciación de los precursores

neuronales, dado que drogas que inhiben la acetilación favorecen la diferenciación a linajes no neurales [67]. Más aún, recientemente se demostró que la demetilación de histonas juega un papel crucial en el control de la expresión de programas génicos específicos en neuronas [68].

1.4.2. *Splicing* alternativo en el sistema nervioso

Si bien la regulación del *splicing* alternativo es muy variable entre las especies y su frecuencia aumenta con la complejidad de los organismos, diversos análisis de perfiles de transcripción a gran escala revelaron que el *splicing* alternativo está particularmente extendido en el sistema nervioso de vertebrados [27, 69]. Más aún, los eventos de *splicing* detectados en el cerebro de mamíferos están mayormente conservados que los detectados en otros tejidos, lo que sugiere que de forma frecuente presenten funciones más conservadas [70]. Se sabe que la regulación dinámica del *splicing* alternativo en el sistema nervioso es crítica para la modulación de las interacciones proteína-proteína, para las redes de transcripción, y múltiples aspectos del desarrollo neuronal.

La neurogénesis se caracteriza por cambios globales en el transcriptoma y proteoma de células que se diferencian. Muchos de estos cambios son críticos para la transición desde células madre neurales o células precursoras a neuronas maduras. Sin embargo, a pesar de los avances en el conocimiento del impacto de las variantes específicas de *splicing* alternativo sobre la diferenciación neuronal, morfología, maduración y actividad de las neuronas, aún queda mucho por entender. Recientemente se ha demostrado la funcionalidad de distintas variantes neuronales de *splicing* alternativo. Por ejemplo, la expresión de la isoforma neuronal del gen Disable-1, es necesaria para rescatar los defectos en la migración neuronal que se observan en la corteza cerebral de ratones *knock-out* para Nova2 (antígeno ventral neuro-oncológico 2) [71]. Por otra parte, se reportó que la expresión de una isoforma del gen Unc13 que incluye un microexón de 6-nucleótidos es la única capaz de estimular significativamente el crecimiento de neuritas y rescatar defectos fenotípicos relacionados [72].

Sin embargo, la medida en que otros eventos de *splicing* alternativo específicamente neuronales son cruciales para las funciones del sistema nervioso continúa siendo una importante cuestión pendiente.

1.4.3. Líneas celulares neuronales como modelo de estudio

Si bien es imposible establecer en cultivo un modelo de trabajo con la complejidad característica del sistema nervioso *in vivo*, diversas líneas celulares se han utilizado en el estudio de las propiedades neuronales. En particular, Neuro-2a (N2a) es una línea celular de neuroblastoma murino de rápido crecimiento y fácil manejo. Es posible diferenciar las N2a a células que tienen muchas propiedades neuronales, incluyendo la formación de neurofilamentos, en tan solo unos días de cultivo. Las N2a se han utilizado para estudiar distintos procesos desde neurotoxicidad y enfermedad de Alzheimer hasta la diferenciación neuronal y el crecimiento axonal.

Apenas establecida la línea celular, se estudió que las células N2a expresaban propiedades de células gliales y neuronales [73]. Distintos métodos se han utilizado para inducir la diferenciación en esta línea celular, pero la mayoría de los tratamientos reportados no proporcionan información sobre los tipos neuronales obtenidos. En un trabajo que estudia la diferenciación de N2a en neuronas dopaminérgicas, los autores demuestran que las células N2a indiferenciadas expresan bajos niveles del factor relacionado-Nurr 1 (Nurr1), de tirosina hidroxilasa (TH) y de dopamina. El tratamiento con dibutiril monofosfato de adenosina cíclico (dbcAMP) induce la diferenciación a neuronas dopaminérgicas evidenciado por un aumento en el nivel de dichos marcadores, al contrario de lo que ocurre con otros inductores de la diferenciación neuronal como el ácido retinoico (AR) [74]. Más aún, mientras que la diferenciación con dbcAMP estimula el crecimiento de un largo proceso bipolar o monopolar similar a un axón, la diferenciación con AR estimula la extensión de una red muy ramificada de neuritas que expresan el marcador MAP2 (proteína 2 asociada a microtúbulos) similar a lo que ocurre en dendritas [75].

Por otra parte, contribuyendo a la versatilidad de este tipo celular, se demostró

que las células N2a pueden adquirir propiedades de motoneuronas luego de la diferenciación [76] y que pueden ser utilizadas como un modelo de la enfermedad de Huntington en cultivo [77].

También se han utilizado las células N2a en ensayos de electrofisiología dado que por su forma esférica y baja densidad de los canales NaV, las N2a sin diferenciar permiten un mejor control de variables en comparación con neuronas primarias [78]. Más aún, se ha detectado el disparo de potenciales de acción de células N2a en cultivo a partir de la inyección de una corriente negativa constante y se determinó qué agentes aumentan la excitabilidad de las N2a haciendo más negativo el umbral de disparo del potencial de acción [78].

Se acepta actualmente que tanto las células N2a en cultivo como las neuronas primarias pueden diferenciar procesos neuríticos con propiedades dendríticas en términos de morfología y distribución preferencial de MAP2 [75]. En este trabajo, si bien no podemos concluir que los resultados en N2a sean extrapolables a lo que ocurre en la compleja red neuronal del cerebro, utilizaremos esta línea celular y otras como un modelo de estudio en el que simulamos los mecanismos que podrían estar sucediendo en el sistema nervioso.

1.5. El splicing alternativo del exón 18 de NCAM

1.5.1. La proteína NCAM

La molécula de adhesión celular neural (NCAM) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas implicado en el reconocimiento celular y la adhesión célula-célula a través de interacciones homofílicas. NCAM se destaca de los otros miembros de la familia, ya que se ha descripto su implicancia en la migración celular, la sinaptogénesis, la formación de la memoria entre otras funciones fundamentales. NCAM se identificó por primera vez como una glicoproteína de superficie celular [79]. Originalmente se la describió como una molécula de adhesión celular de retina de embriones de pollo debido a su papel en la formación inicial de uniones célula-

célula durante la agregación de células de la retina embrionarias [80]. Sin embargo, con el tiempo se estableció que NCAM es esencial para muchos otros procesos celulares hasta el punto de surgir como un candidato interesante para promover la plasticidad neuronal. Se ha reportado la expresión de NCAM en la superficie de la mayoría de las células del sistema nervioso central y periférico, así como también en corazón, gónadas y músculo [81]. La proteína es sintetizada en el retículo endoplásmico como una glicoproteína, y antes de llegar a membrana es modificada en el aparato de Golgi, principalmente debido a la adición de varios residuos de ácido siálico. Además, la proteína NCAM sufre otras alteraciones post-traduccionales que regulan su actividad, como extensivas fosforilaciones en serina y treonina, O- y N- glicosilación, sulfatación y palmitoilación [82]. Un gran número de evidencias muestra que las moléculas de adhesión en general y NCAM en particular participan tanto en el establecimiento de sinapsis en forma dependiente de actividad, como en la remodelación de sinapsis maduras asociadas a plasticidad neuronal y a procesos de aprendizaje [83, 84].

1.5.2. La regulación del *splicing* alternativo de NCAM

NCAM es producido por un solo gen que contiene 20 exones principales más 6 pequeños exones adicionales en ratón. Se encuentra en el cromosoma nueve y se transcribe a partir de un promotor independiente de la secuencia TATA [82]. Por *splicing* alternativo da lugar a por lo menos 20 o 30 isoformas, que a su vez pueden ser modificadas por mecanismos postraduccionales [85]. Las tres isoformas más comunes se conocen de acuerdo a su peso molecular aparente (NCAM 180, NCAM 140 y NCAM 120). NCAM 180 es una proteína de un único paso transmembrana generada a partir de la expresión de los exones 1 a 19 con la exclusión del exón 15. NCAM 140 se diferencia de NCAM 180 únicamente en la ausencia del exón 18, lo cual produce un acortamiento del dominio citoplásmico. Por otro lado, NCAM 120 resulta de la transcripción de los primeros 15 exones. La inclusión del exón 15 en NCAM 120 provoca la aparición de un sitio de poliadenilación alternativo generando la ausencia

total del dominio citoplásmico en la proteína madura (Figura 1.9). A pesar de no tener un péptido hidrofóbico, NCAM 120 puede estar ligada a la superficie celular por un glicosilfosfatidilinositol intermedio [86].

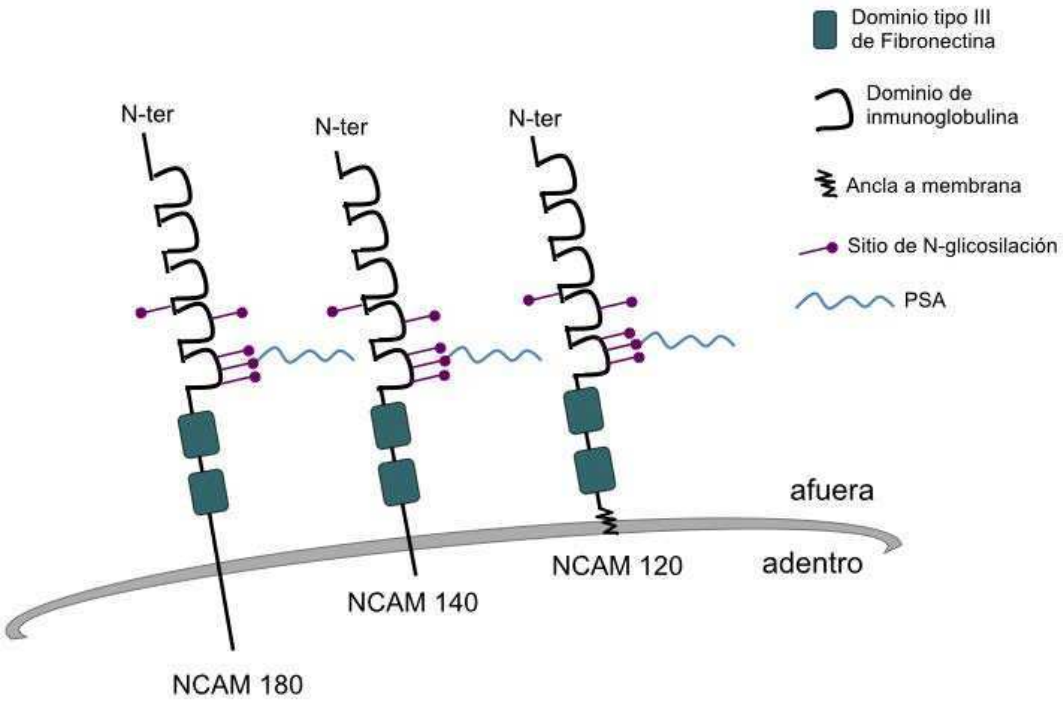

Fig. 1.9: Arquitectura de dominios y topología de las tres principales isoformas de NCAM. Se muestran los principales dominios y la ubicación en la membrana plasmática de NCAM 120, NCAM 140 y NCAM 180.

Por otra parte, más grados de variabilidad se añaden cuando un exón de 30 nucleótidos se incluye entre los exones 7 y 8. Cuando la secuencia codificada por este exón está presente en la proteína madura puede cambiar las propiedades de unión de la molécula. Por último, hay 4 pequeños exones localizados entre los exones 12 y 13 que pueden dar lugar a diferentes combinaciones que codifican una región en la porción extracelular de la molécula conocida como el dominio específico de músculo [87]. Cuando uno de estos pequeños exones que contienen un codón de terminación está incluido en la isoforma madura da lugar a una forma secretada trunca de la proteína [88].

Durante la diferenciación neuronal, el patrón de *splicing* alternativo de NCAM

cambia favoreciendo la expresión de NCAM 180 y reduciendo la expresión de NCAM 140 (Figura 1.10). En consecuencia, NCAM 140 resulta más abundante en precursores neuronales y se distribuye homogéneamente en la membrana celular donde favorece activamente el crecimiento de neuritas; mientras que NCAM 180, específica de neuronas maduras, está enriquecida en las zonas de contactos célula-célula y tiene un papel importante que contribuye a organizar sinapsis estables y maduras [89, 90]. Por lo tanto, la modulación del patrón de *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal tiene importantes consecuencias funcionales y sugiere la utilización de NCAM 180 como un marcador para las células neuronales maduras.

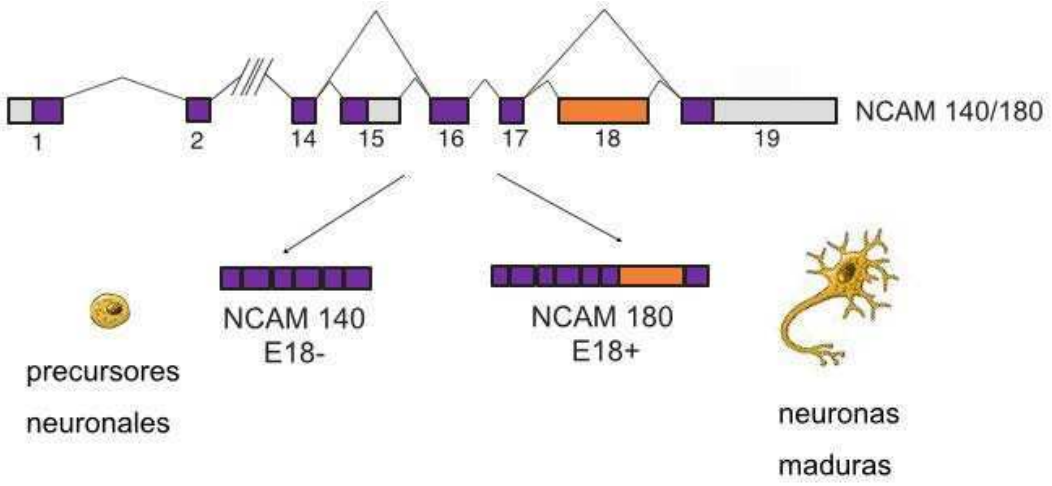

Fig. 1.10: Patrones de *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal. La isoforma NCAM 180 prevalece en neuronas maduras, mientras que los precursores neuronales expresan la isoforma NCAM 140 en mayor medida. Ambas isoformas se diferencian en la inclusión del exón alternativo 18 que codifica para una región del dominio citoplasmático de la proteína.

El ratón *knock-out* específico de la isoforma NCAM 180 provoca defectos en el desarrollo del sistema nervioso central, siendo el más evidente un subdesarrollo del bulbo olfatorio, probablemente ocasionado por un problema en la migración de las células precursoras [91]. Además, se detectan efectos más sutiles en otras áreas como cerebelo, retina e hipocampo, y problemas en la formación y función de las conexiones neuromusculares [91, 92].

1.6. El splicing alternativo de G9a

1.6.1. La enzima G9a

G9a, también conocida como EHMT2 por *euchromatic histone lysine N- methyltransferase 2*, es la enzima responsable de la mono- y di-metilación en lisina 9 de la histona H3 (H3K9me1 y H3K9me2) en mamíferos. Como metiltransferasa, no sólo cataliza el agregado de grupos metilo en H3 sino que se han encontrado numerosas proteínas que son posibles blanco de su actividad. Se sabe que mayormente reconoce secuencias ricas en lisina-arginina [93] y se descubrieron como proteínas blanco de G9a tanto a CDYL1, WIZ y ACINUS como a la misma G9a susceptible de autometilación. Su función y bioquímica han sido detalladamente estudiadas y se han desarrollado diversos inhibidores farmacológicos de su actividad [94]. Se sabe que la pérdida de su función produce una disminución global en los niveles de H3K9me y la interrupción del gen es letal en estadío embrionario [95, 96]. Primeramente descripta como un oncogén por su función en la tumorigénesis, G9a se encuentra sobre-expresada en varios tipos de cáncer [97]. La relación entre la sobreexpresión de G9a y el comportamiento metastásico ha sido vastamente estudiada. Tal es así que recientemente se ha sugerido a la sobreexpresión de G9a como un biomarcador de mal pronóstico en pacientes con melanoma [98]. Por otra parte, se ha caracterizado a G9a como la enzima responsable de la metilación en lisina 373 del gen supresor tumoral p53 posicionando a G9a como un putativo blanco terapéutico [99]. Más aun, recientes evidencias de la implicancia de G9a en la represión de la expresión de genes supresores de tumores [97, 100] han impulsado el desarrollo de tratamientos quimioterapéuticos. En un principio se describió a la enzima Suv39h1 como responsable de la metilación de lisina 9 de histona H3. Sin embargo, investigaciones posteriores con ratones deficientes de G9a y Suv39h1 demostraron que mientras la última es crucial para la trimetilación en lisina 9 de histona H3 en zonas pericentroméricas heterocromatinizadas, G9a es la principal responsable de la mono- y dimetilación de lisina 9 de histona H3 en zonas de eucromatina [14, 95, 101]. De todas formas,

se sabe que G9a también está involucrada en la trimetilación de lisina 9 de histona H3 [102] y recientemente se demostró que podría estar involucrada en la metilación de lisina 27 tanto de histona H3 como de histona H1 [103–105].

1.6.2. G9a, GLP y complejos de metiltransferasas

In vivo, G9a actúa formando un heterodímero con la que se conoce como su molécula acompañante, GLP por *G9a like protein* en inglés. Ambas son miembros del subgrupo Suv39h de moléculas con dominio SET y a pesar de que *in vitro* puedan catalizar la incorporación de grupos metilo de forma independiente, se sabe que dentro de la célula actúan en conjunto [96]. G9a no solo forma un heterodímero con GLP, sino que se ha descripto la interacción entre G9a y Wiz, una molécula que contiene numerosos motivos conocidos como dedos de zinc habitualmente relacionados con interacciones al DNA. Tanto la depleción de GLP como de Wiz produce una concomitante reducción de los niveles proteicos de G9a [96, 106]. Se ha propuesto que si bien Wiz puede reconocer tanto homodímeros de G9a y GLP, interacciona más establemente con el heterodímero formado por G9a y GLP ya unidas [94]. En un trabajo reciente se demostró que tanto ZNF644, otra proteína de unión al DNA, como Wiz son componentes principales del complejo formado por G9a y GLP y que son los principales responsables de direccionar a G9a a encontrar sus blancos específicos en el DNA [107] (Figura 1.11).

1.6.3. G9a en diferenciación celular y sistema nervioso

G9a ha sido implicada en la diferenciación de una gran variedad de tipos de células y tejidos. Se sabe que G9a es esencial para la diferenciación y el crecimiento de tenocitos, ya que en ratones *knock-out* para G9a la expresión de varios factores de transcripción tendón-específicos son suprimidos [108]. Más aún, se describió que G9a coopera con Sharp-1, un potente represor de la diferenciación del músculo esquelético, en la metilación de MyoD y las histonas en el promotor del gen de miogenina [109]. Por otra parte, se ha descripto que la deficiencia de G9a inhibe

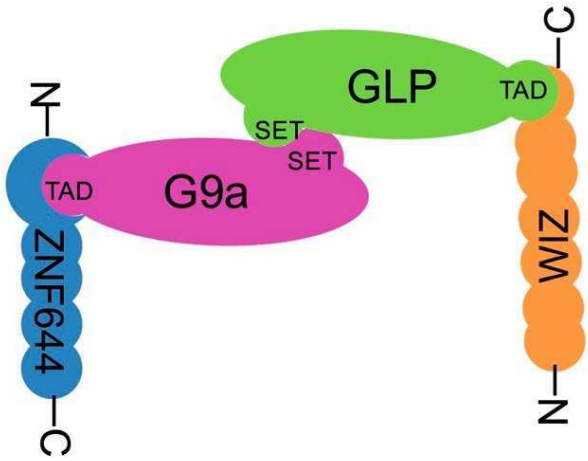

Fig. 1.11: Modelo de interacciones entre metiltransferasas. El modelo muestra que el extremo N-terminal de ZNF644 interactúa con el dominio de activación transcripcional (TAD) de G9a, mientras que el C-terminal de WIZ interactúa con el TAD de GLP

la diferenciación de monocitos [110] y células T helper [111]. G9a se requiere para la formación de tejido adiposo marrón en detrimento de la especificación del linaje muscular [112] y ratones deficientes en G9a y GLP mostraron defectos cardíacos graves tanto debido a la disminución de la expresión de genes específicos cardíacos como al aumento de la expresión de varios genes no cardíacos [113]. Además, animales *knock-out* para G9a mostraron una regulación positiva de genes relacionados con células progenitoras de la retina [114] y una pérdida drástica de gametas maduras [115]. Por último, G9a ha sido reportado como un regulador clave de genes relacionados con la pluripotencia, promoviendo el silenciamiento de genes específicos a través de la metilación del histonas durante la diferenciación de células madre embrionarias [116, 117]. La pérdida de G9a permite la reexpresión del gen de la pluripotencia Oct3/4 y la reprogramación de células diferenciadas [117, 118] y a la vez que aumenta la frecuencia de células madre pluripotentes inducidas [119].

En el sistema nervioso, se ha demostrado que G9a tiene un papel clave en el control de la cognición y las respuestas de adaptación debido a la represión de genes no neuronales [120]. Su ortólogo en *Drosophila* se ha descrito como un regulador del desarrollo de dendritas periféricas, el aprendizaje clásico y la expresión de genes re-

lacionados con la memoria [121]. Por otra parte, se ha demostrado que G9a afecta la especificación de diferentes subtipos neuronales [122] y regula la neurodegeneración inducida por etanol [123].

1.6.4. G9a como regulador transcripcional

Transcripcionalmente, G9a puede funcionar tanto de correpresor como de coactivador de la expresión génica (Figura 1.12) [94, 124–127]. La función de correpresor de la G9a depende de su actividad enzimática, así como de su interacción con otros factores implicados en la represión de genes [94, 95]. G9a inhibe la expresión de genes específicos mediante la asociación con varios represores transcripcionales y co-rrepressors tales como, E2F6, REST/NRSF, ZNF217 y varios otros [94, 95, 128, 129]. Particularmente, se estudió que G9a reprime la expresión de genes no neuronales en el sistema nervioso, mientras que en los demás tejidos inhibe la expresión de genes neuro-específicos [130].

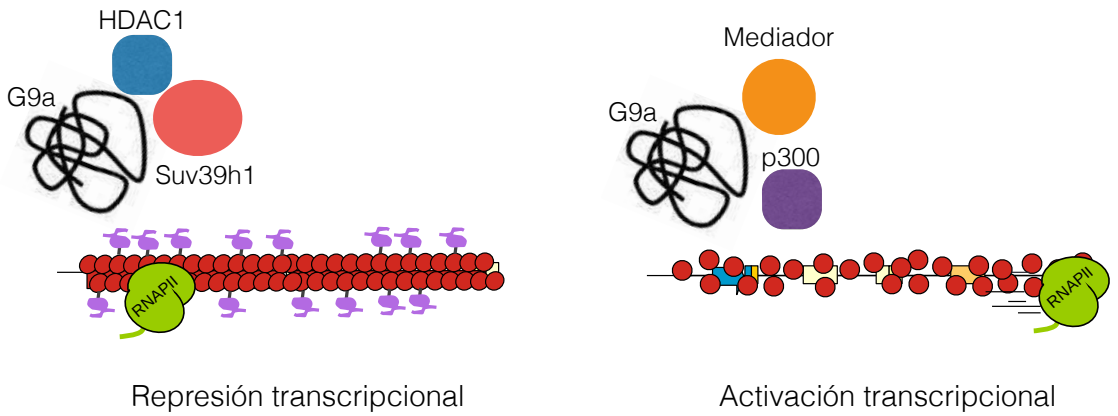

Fig. 1.12: La represión transcripcional y la activación por G9a. La unión de G9a a distintos factores de transcripción y la asociación con complejos de diferentes cofactores conduce a resultados opuestos sobre la expresión génica. La represión transcripcional de genes es dependiente de la actividad metiltransferasa de G9a (en violeta se muestra la metilación de histonas en el panel de la izquierda). Por otro lado, el reclutamiento de G9a por activadores transcripcionales conduce a la activación de genes de manera independiente de su actividad catalítica (panel de la derecha).

Sorpresivamente, la función de activador de la expresión génica de G9a no requiere de su actividad enzimática, mientras que sí requiere de la asociación con otros activadores de la transcripción o factores coactivadores incluyendo CARM1, p300, ARNP o el complejo Mediador (Figura 1.12) [125, 127].

Además de su rol como regulador de la transcripción, y como ya se ha estudiado para otros modificadores de la estructura cromatínica, un trabajo reciente demuestra el papel clave de G9a en el control del *splicing* alternativo [131]. A través de un *screening* basado en RNAs de interferencia, Salton y colaboradores, identificaron a G9a como un importante regulador del patrón de *splicing* alternativo de VEGF. El mecanismo implica la metilación intragénica en H3K9 en el locus de VEGF y el reclutamiento del factor SRSF1. De acuerdo con resultados anteriores que vinculan HP1 gamma al *splicing* alternativo (Saint-André et al., 2011), en este caso también resulta fundamental el reclutamiento de la proteína HP1. De esta manera, los autores demostraron roles separados para G9a en la transcripción y en el *splicing* alternativo.

1.6.5. Las isoformas de G9a

La existencia de distintas isoformas de G9a se hace evidente en una primera búsqueda en distintas bases de datos (USCS Genome Browser, ENSEMBL, NCBI, entre otras). En primer lugar, según la utilización de promotores alternativos, se caracterizaron dos isoformas de G9a denominadas G9a corta y G9a larga. La isoforma controlada a partir del promotor río arriba incluye un sitio dador de *splicing* que permite la escisión de un intrón generando la expresión de la isoforma corta. Sin embargo, cuando el promotor río abajo controla la expresión, ese sitio dador de splicing no está incluido en el RNA nasciente y se genera la isoforma larga [94] (Figura 1.13).

Estas isoformas difieren en algunos aminoácidos correspondientes al extremo amino-terminal de la proteína donde no se conocen dominios funcionales. El único motivo que se ha descripto en la zona amino terminal diferencial entre las dos isoformas es la inclusión de una señal de localización nuclear (NLS) en la isoforma larga.

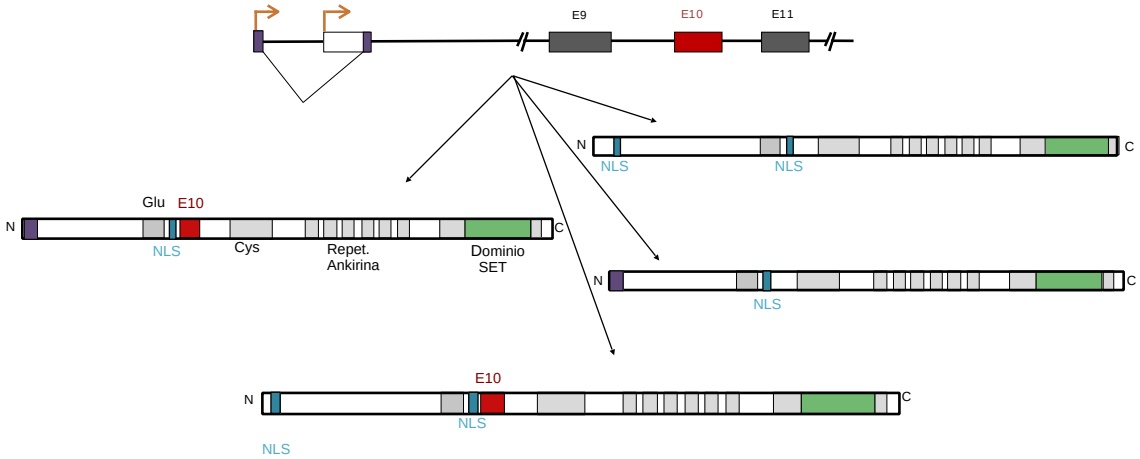

Fig. 1.13: Esquema de las cuatro isoformas de G9a generadas por transcripción alternativa y *splicing* alternativo. La utilización de promotores alternativos en G9a da lugar a la inclusión de dos posibles primeros exones diferentes. Además, la inclusión o exclusión del exón alternativo 10 genera dos nuevas variantes. Se muestran los dominios caracterizados de la proteína.

Esta seguidilla de aminoácidos básicos, que no está presente en la isoforma corta, parece tener la capacidad de direccionar a la proteína al núcleo, al menos cuando se delecionan todos los demás aminoácidos río abajo dejando únicamente el extremo amino terminal de la isoforma larga con su señal de localización nuclear [132]. Sin embargo, ambas isoformas de G9a, corta y larga, poseen otra NLS funcional, ubicada hacia el interior del polipéptido, que también es capaz de direccionar la proteína al núcleo.

Tanto en rata como ratón y humano existe en G9a un evento de splicing alternativo altamente conservado. Se trata del exón 10 (E10) en la isoforma corta, que en realidad es el exón 9 en la isoforma larga puesto que al cambiar el promotor que se utiliza, se incluye o no un pequeño primer exón en el RNAm. Información en base de datos sugiere que existen isoformas de inclusión y exclusión del exón alternativo tanto en G9a corta como en G9a larga tanto en ratón como en humano, dando lugar a cuatro isoformas posibles (Figura 1.13).

A pesar de que la existencia de las dos isoformas que se diferencian según la presencia/ausencia del exón alternativo (E10) fue descripta por primera vez en 2001

[133], desde que en uno de los *papers* fundadores de investigaciones en G9a [95] se caracterizaron únicamente las dos isoformas de G9a corta y larga, según la utilización del promotor, la mayor parte de la bibliografía hace referencia a estas dos isoformas de G9a, independientemente de que incluyan o excluyan el exón alternativo. De hecho, hasta el año pasado ningún estudio se realizó con el fin de describir la regulación del evento de *splicing* alternativo ni se había analizado la expresión diferencial de las isoformas. Fue en 2015 cuando por primera vez se publicó un trabajo analizando una posible diferencia funcional entre las dos isoformas por *splicing* alternativo [134].

Dicho trabajo estudia la función del *splicing* alternativo tanto en G9a como en la metiltransferasa de histonas SUV39H2. Los autores encontraron que la inclusión del exón alternativo 3 en SUV39H2 es clave para la localización nuclear y la actividad catalítica de esta enzima. En cuanto a la inclusión del exón alternativo en G9a, no ven cambios en la actividad de G9a medidos *in vitro*. Además, los autores analizan la localización sub-celular de las dos isoformas de G9a y no reportan diferencias debidas a la inclusión del exón alternativo. Estos resultados los llevan a concluir que, dado que los niveles de inclusión del E10 varían mucho en diferentes tipos de células, el *splicing* alternativo de G9a debe estar controlando alguna función de G9a diferente a su actividad de metiltransferasa o a su localización.

2. OBJETIVOS

Para este trabajo nos propusimos estudiar cómo las marcas epigenéticas en las histonas afectan el *splicing* alternativo durante la diferenciación neuronal. Definimos dos objetivos generales según los eventos de *splicing* alternativo que adoptamos como modelo.

1. Analizar el mecanismo de regulación del *splicing* alternativo del mRNA de NCAM durante la diferenciación neuronal centrándonos en los cambios en la estructura de la cromatina intragénicos

    - ¿Cómo se regula la inclusión del exón alternativo 18 de NCAM durante la diferenciación neuronal?
    - ¿Qué cambios a nivel de la estructura cromatínica influyen en el patrón de *splicing* alternativo de NCAM?

2. Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del *splicing* alternativo del mRNA de la metiltransferasa G9a y su rol en la diferenciación neuronal

    - ¿Cómo se regulan los eventos de *splicing* alternativo del mRNA de un modificador de la estructura cromatínica, G9a, durante la diferenciación neuronal?
    - ¿Cumple G9a algún papel fisiológico en la diferenciación de neuronas en cultivo?
    - ¿Cuál es el rol de las modificaciones epigenéticas en la regulación del *splicing* alternativo de G9a?
    - ¿Por qué el evento de *splicing* alternativo en G9a se encuentra finamente regulado durante la diferenciación neuronal? ¿La inclusión del exón 10 alternativo le otorga alguna función diferencial a G9a?

3. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL *SPLICING* ALTERNATIVO DE NCAM DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

El objetivo general de este capítulo es estudiar el rol de la estructura cromatínica en la regulación del patrón de *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal. Como vimos en 1, la modificación de la expresión relativa de las dos isoformas de NCAM, que difieren en la inclusión del exón 18, juega un papel fundamental en la diferenciación neuronal. De esta manera, surge el cuestionamiento de cómo esta modificación en los patrones de *splicing* es regulada, mientras nos preguntamos si las modificaciones epigenéticas podrían influenciar el proceso.

3.1. Sistema de trabajo: cultivo de células que se diferencian a neuronas

La primera parte de este trabajo consistió en poner a punto las condiciones de cultivo de distintas líneas celulares para establecer una correcta inducción de la diferenciación neuronal utilizando distintos protocolos. Nos centramos en dos líneas celulares murinas como modelo de trabajo. La línea celular Neuro-2a (N2a) consiste en un neuroblastoma murino a partir del cual precursores neuronales pueden ser diferenciados a neuronas maduras por el agregado de distintos agentes diferenciantes al medio de cultivo. La línea celular P19 proviene de un carcinoma embrionario murino. Las células son pluripotentes y en principio es posible inducir su diferenciación a cualquier tipo celular. Sin embargo, los protocolos de inducción de la diferenciación a células musculares cardíacas y células neuronales están muy bien establecidos en el campo y existe una amplia bibliografía descriptiva.

En un principio, estudiamos los tiempos de incubación y concentraciones de los agentes diferenciantes como ácido retinoico (AR) y dimetilsulfóxido (DMSO). En

cuanto a la línea celular N2a vimos que cuando las células llegan a tener una alta confluencia en las placas de cultivo se diferencian sin el agregado de ningún agente diferenciante. Por lo tanto, las mantuvimos a una confluencia menor al 80 % para todos los experimentos. El agregado de AR provocó importantes cambios morfológicos en las células, típicos de la diferenciación neuronal. Pasadas las 24 horas de tratamiento, la extensión de neuritas se hizo más evidente y al tercer día de incubación en el medio de diferenciación las células presentaban una morfología típica de neuronas maduras (Figura 3.1). Al cambiar el medio de diferenciación por otro sin AR al tercer día, las células comenzaban a perder la morfología neuronal y un gran porcentaje volvía a tener una forma redondeada despegándose de la placa. De esta forma, usamos como máximo tres días de diferenciación con AR para los siguientes experimentos. Por otra parte, el método de diferenciación en medio con bajo suero y DMSO no provocó cambios morfológicos tan pronunciados, como se observa en la Figura 3.1. Recién al tercer día del protocolo las células empezaban a expandir neuritas y hasta el día 8 de tratamiento continuaron diferenciándose sin despegarse de la placa. Si bien los cambios morfológicos asociados a este segundo protocolo fueron más leves, a los 7 u 8 días de diferenciación las células tienen una morfología diferente a los precursores neuronales y un porcentaje variable muestra extensión de neuritas. Incluso en algunas células se observa la extensión de una neurita predominantemente más larga que las otras, presumiblemente identificada como axón.

Cabe aclarar que en todos los casos, la inducción de la diferenciación neuronal en células N2a no es 100 % eficiente. Mientras que cierto porcentaje de las células del cultivo se encuentran parcialmente diferenciadas aún cuando no se hizo efectiva la inducción de la diferenciación, en todos los casos observamos un alto número de células no diferenciadas al final del tratamiento con el agente diferenciante. Para tener un control del grado de diferenciación de cada experimento, optamos por cuantificar el porcentaje de células diferenciadas. Para ello tomamos una de las consideraciones ampliamente extendidas en la bibliografía que consiste en contar como neurona diferenciada aquella célula que presente al menos una prolongación

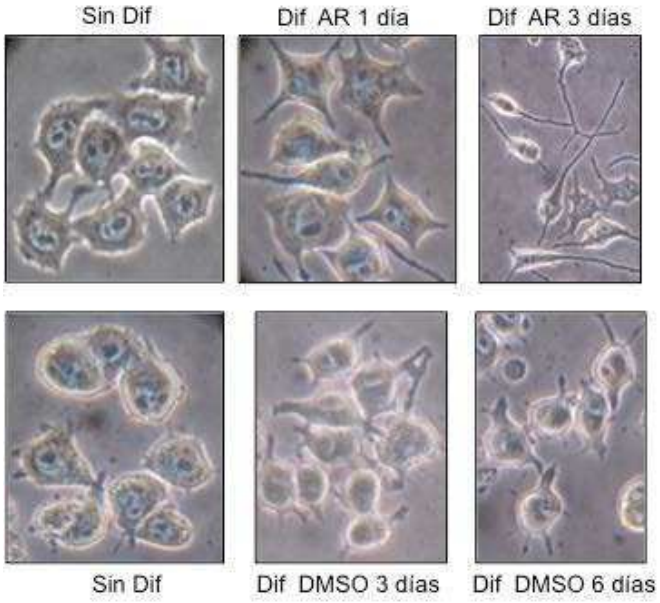

Fig. 3.1: Imágenes de la diferenciación morfológica en células N2a con dos protocolos de diferenciación. Precursores neuronales de la línea celulas N2a fueron sometidos a diferenciación neuronal con el agregado de AR o bajo tratamiento con DMSO y bajo suero. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio óptico invertido con un aumento de 100X.

neural de longitud mayor o igual a dos veces el diámetro del soma celular. Este método fue de fundamental importancia para partir de cultivos celulares con el mismo grado de diferenciación celular en distintos experimentos. Una vez concluido este análisis, utilizamos ambos protocolos de diferenciación, con AR y DMSO en los experimentos con N2a diferenciadas.

En cuanto a la inducción de la diferenciación a un linaje neuronal en células P19 se debe primero plaquear las células con AR para promover la agregación celular y la formación de cuerpos embrionarios. Luego de 4 días, los cuerpos embrionarios están listos para ser resuspendidos y plaqueados en placas poli-lisinadas previamente para su adherencia. Entre 2 y 4 días después de este plaqueo se alcanza una óptima diferenciación neuronal. El cambio morfológico de las células P19 durante todo el protocolo de diferenciación es muy evidente y en todos los experimentos en los que utilizamos esta línea celular nos aseguramos de obtener una correcta diferenciación

basándonos en parámetros morfológicos.

3.2. Modelo de estudio: *splicing* alternativo del exón 18 de NCAM

En una publicación previa [47], nuestro laboratorio había investigado la implicancia de la estructura de la cromatina en la regulación del *splicing* alternativo de NCAM utilizando como modelo de estudio la despolarización neuronal. Los resultados demostraron que la inclusión del exón 18 (E18) de NCAM en el mRNA es sensible a la estructura de la cromatina y a la tasa de elongación de la RNAPII. Por otra parte, está ampliamente documentado que las células neuronales hacen un uso particularmente intensivo de la regulación del *splicing* alternativo con el fin de aumentar y controlar su diversidad proteómica, habiéndose informado muchos eventos de *splicing* alternativo específicos de células neuronales[135]. Dado que el E18 de NCAM resulta un buen sistema para evaluar la influencia de la cromatina en la regulación del *splicing* alternativo y, aprovechando su relevancia fisiológica específica a nivel de células neuronales, decidimos adentrarnos en la investigación de la regulación epigenética del evento alternativo de *splicing* del E18 de NCAM durante la diferenciación neuronal.

3.3. El *splicing* alternativo de NCAM es regulado por la estructura cromatínica en neuronas maduras

Datos bibliográficos previos asociaban a la diferenciación neuronal con una mayor inclusión del E18 de NCAM y desde comienzos de esta tesis sabíamos que la presencia del E18 en el mRNA se correlaciona negativamente con la cromatina permisiva y una alta tasa de elongación transcripcional [47]. Se había demostrado, en particular, que el evento de *splicing* del E18 de NCAM respondía a la elongación de la RNAPII puesto que la transcripción de un minigén con la RNPII lenta favorecía la inclusión del E18 en el mRNA maduro [47]. Dichas observaciones nos permitieron hipotetizar

que marcas cromatínicas represivas podrían ser depositadas durante la diferenciación neuronal a lo largo del gen NCAM y promover el aumento en los niveles de inclusión del E18 característico de las neuronas maduras.

En una primera aproximación, analizamos el patrón de *splicing* del E18 de NCAM en la línea celular N2a. Como se observa en la Figura 3.2 A, la inclusión del E18 aumenta durante la diferenciación neuronal con el protocolo de DMSO medido por PCR radiactiva semicuantitativa y expresado como cociente entre la isoforma de inclusión y la isoforma de exclusión del E18 (ver 7).

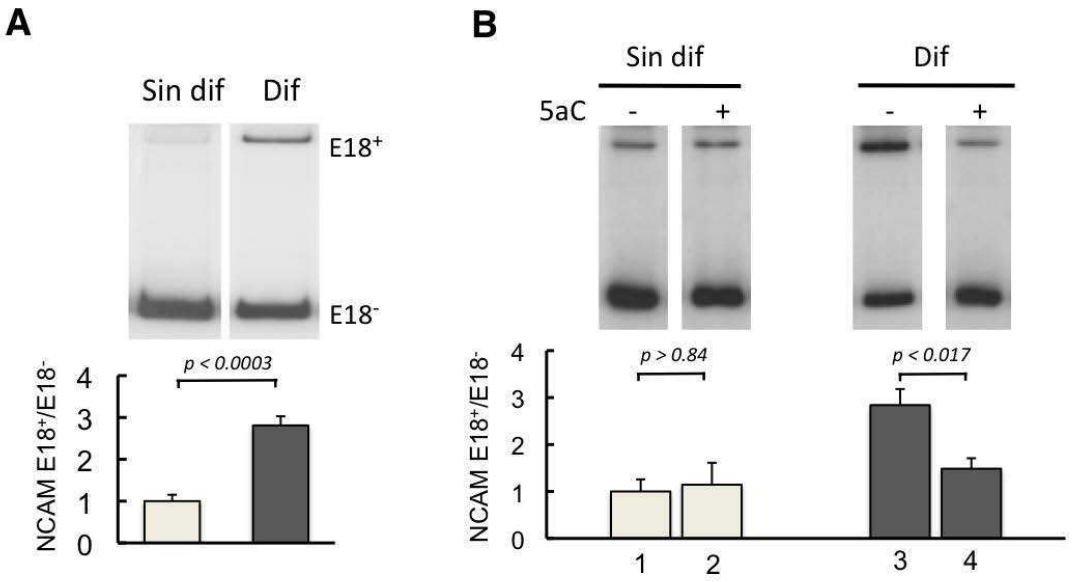

Fig. 3.2: Cambios en el patrón de *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal. (A) Aumento de la inclusión del E18 de NCAM después de la diferenciación neuronal de las células N2a evaluado por RT-PCR radiactiva semi-cuantitativa. (B) Capacidad de respuesta de las células N2a al tratamiento con 5 mM de 5 aza Citidina (5aC) durante 3 días. Los valores se expresan como media + DE, relativizados a los valores de las células control no diferenciadas. Los valores de p corresponden a la prueba t de Student a dos colas (n = 3 en todos los casos).

Este resultado es consistente con datos bibliográficos que sugieren que la predominancia de la isoforma que incluye el E18 en neuronas maduras tiene una importante función biólogica, como fue comentado en 1. Con el fin de investigar si la

estructura de la cromatina puede afectar los efectos de la diferenciación neuronal sobre el *splicing* del E18, tratamos a las células con distintas drogas modificadoras de marcas epigenéticas. En primera instancia, utilizamos la droga 5-aza-citidina (5aC) que se caracteriza por inhibir metil-transferasas de DNA (DNMTs). El tratamiento con esta droga causa una disminución de la metilación generalizada del DNA y por ende, una apertura de la cromatina[136]. Según el modelo cinético, una estructura menos compacta de la cromatina ofrece un menor obstáculo al paso de la RNAPII mientras transcribe por lo que debería disminuir los niveles de inclusión de exones alternativos[137]. Al tratar precursores neuronales de la línea N2a con 5aC la inclusión de E18 de NCAM no se ve afectada mientras que el mismo tratamiento en neuronas maduras causa una reversión del efecto de diferenciación observado en estas células (Figura 3.2 B). De igual manera, utilizamos la droga tricostatina A (TSA) cuya acción consiste en inhibir desacetilasas de histonas (HDACs). El tratamiento con esta droga causa una hiperacetilación generalizada de histonas y por lo tanto, al igual que 5aC, genera una apertura de la estructura de la cromatina. En células de la línea P19, TSA revierte parcialmente el efecto de la diferenciación sobre el patrón de *splicing* alternativo del E18 de NCAM como muestra la Figura 3.3 A, de la misma manera que el tratamiento con 5aC en N2a.

Continuando con esta modalidad, tratamos a las células con la droga BIX-01294 (BIX) caracterizada como un inhibidor específico de las metiltransferasas de histonas G9a y GLP. El tratamimiento con BIX genera una disminución generalizada de mono y dimetilación de lisina 9 de histona H3 (H3K9me2), una modificación represora de la transcripción y típica de estructuras cromatínicas compactas. De esta manera, al igual que las drogas 5aC y TSA, BIX causa una disminución de la compactación de la cromatina permitiendo una transcripción más rápida o con menos pausas y favoreciendo la exclusión de exones alternativos, según el modelo cinético. La Figura 3.3 B muestra cómo el tratamiento con BIX en células N2a revierte parcialmente el efecto de la diferenciación neuronal sobre el E18 de NCAM.

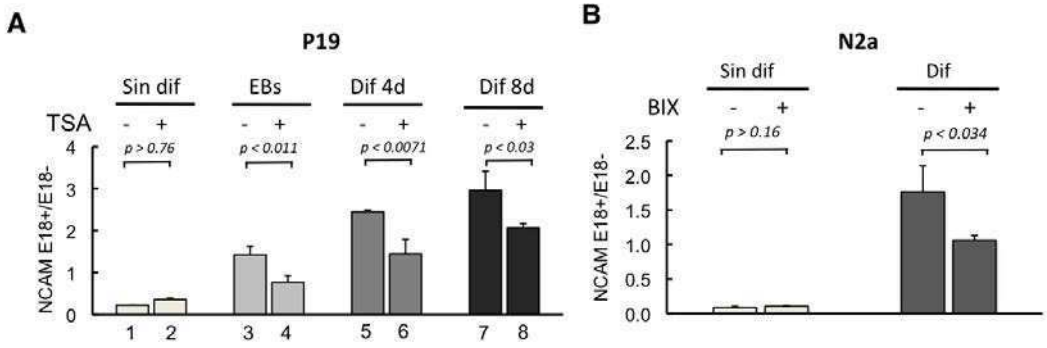

Fig. 3.3: Alteraciones en el *splicing* alternativo del E18 de NCAM en respuesta a agentes modificadores de la estructura cromatínica. (A) Efecto de la tricostatina A (TSA) en células P19 en diferentes etapas de diferenciación. Una vez formados los cuerpos embrionarios (EBs) se resuspenden las células y se siembran en medio de diferenciación neuronal durante los tiempos indicados. El tratamiento consiste en 5 ng/μl TSA durante 16 horas. (B) Respuesta de células N2a al tratamiento con BIX 01294 (BIX) antes y después de la diferenciación neuronal. Las células se trataron con 1 M BIX durante 3 días. Cada valor individual corresponde a la media + DE de 3 repeticiones y los datos fueron evaluados por RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

3.4. Durante la diferenciación neuronal aumentan las marcas cromatínicas asociadas a la represión transcripcional en el gen NCAM

Con el fin de caracterizar más finamente la participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la inclusión del E18 durante la diferenciación neuronal, analizamos el grado de metilación intragénica de DNA y de histonas en NCAM. Para determinar los niveles de metilación en el DNA utilizamos la técnica de bisulfito (ver 7) y medimos específicamente el grado de metilación río arriba y río abajo del E18. Como se observa en la Figura 3.4 A, no encontramos diferencias en cuanto a la metilación en citosinas de estas regiones comparando precursores neuronales y neuronas diferenciadas de la línea N2a. Para determinar si existían cambios en

metilación de histonas durante la diferenciación neuronal, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina nativa (nChIP, ver 7). Los amplicones que analizamos cubren densamente el área comprendida entre el exon 15 y el último exón de NCAM, también incluimos cebadores que amplifiquen la región promotora y una región intergénica río arriba de NCAM (ver Figura 3.4 B). Determinamos la distribución de H3K9me2 inmunoprecipitando nucleosomas con anticuerpos específicos para esta modificación. El perfil obtenido muestra un enriquecimiento generalizado de esta marca a lo largo del gen de NCAM en las neuronas maduras de la línea N2a con el protocolo de DMSO en comparación con los precursores neuronales de la misma línea (Figura 3.4 C).

Dado que la metilación de histonas está asociada a una cromatina más cerrrada y una transcripción menos permisiva, los resultados son compatibles con la hipótesis que sugiere que la diferenciación neuronal provoca un aumento local de la metilación de histonas en la región del gen de NCAM. Este cambio conformacional de la cromatina podría estar asociado a una elongación menos activa o a una disminución de la procesividad de la RNAPII, lo cual podría resultar en un aumento de la inclusión del exón alternativo. Con el fin de analizar si los cambios observados en el grado de metilación en histonas intragénicas eran revertidos por drogas modificadoras de la estructura cromatínica, realizamos el mismo ensayo de nChIP en células N2a diferenciadas en presencia o ausencia de TSA. Como muestra la Figura 3.4 D, las células diferenciadas tratadas con TSA presentan un menor grado de metilación comparadas con las no tratadas específicamente en regiones del gen de NCAM cercanas al E18. Este control sugiere que al provocar una hiperacetilación, el tratamiento con TSA genera una conformación de la cromatina más laxa evidenciado por la menor metilación en histonas. De esta manera, comprobamos que durante la diferenciación neuronal en la región del gen de NCAM la cromatina adopta una estructura más compacta, hecho que resulta consistente con una menor procesividad de la polimerasa y la mayor inclusión del E18 observada. Por otra parte, la reversión del aumento en H3K9me2 durante la diferenciación provocado por el tratamiento con TSA, provoca una apertura de la estructura de la cromatina y correlaciona con una menor

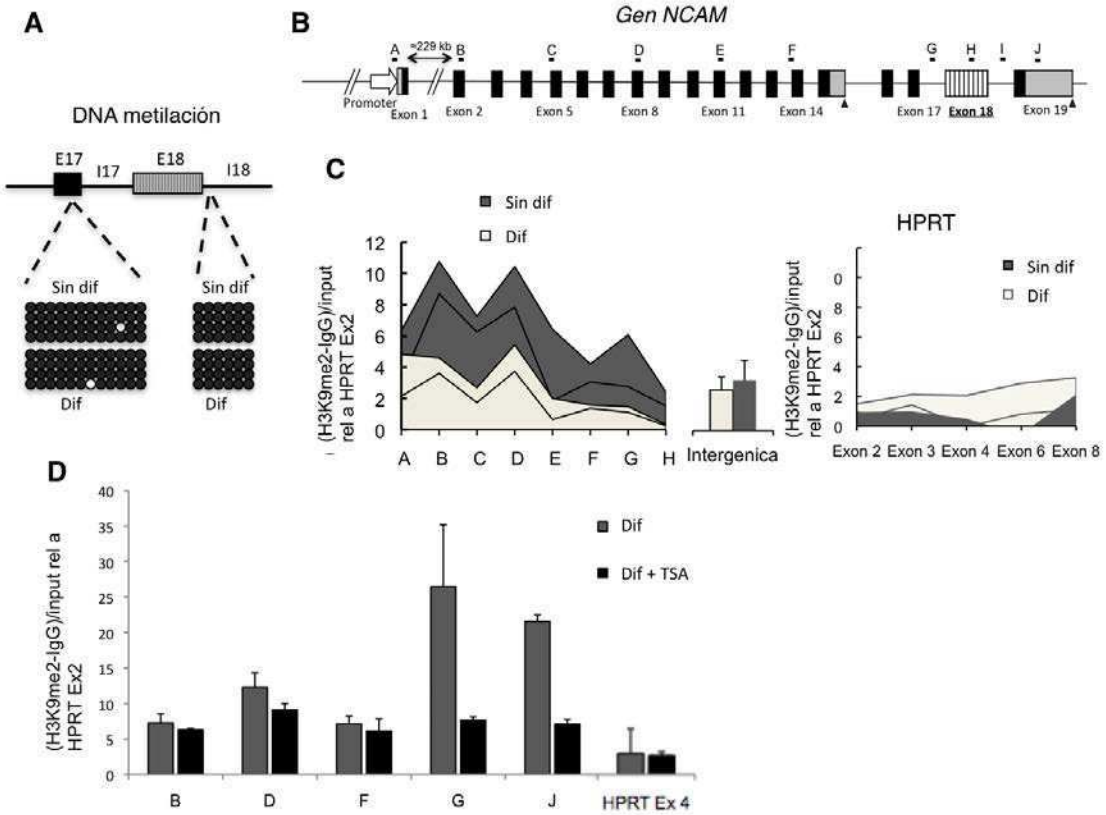

Fig. 3.4: Las células diferenciadas muestran un aumento de marcas represivas a lo largo del gen NCAM. (A) Análisis de la metilación del DNA en NCAM. Luego del tratamiento con bisulfito sódico, el DNA genómico fue amplificado por PCR y se secuenciaron 10 clones por muestra (se muestran cinco). Los círculos blancos y negros indican los sitios CpG metilados y no metilados, respectivamente. (B) Un esquema del gen NCAM indicando los amplicones usados para nChIP (líneas negras gruesas de A a J). (C) Análisis del nivel de H3K9me2 a lo largo del gen de NCAM y la zona intergénica ubicada 10,6 kpb río arriba del promotor, usando inmunoprecipitación de la cromatina nativa (nChIP). Como control, se muestran los niveles en el gen HPRT. Los valores mostrados son medias (± DE) de los duplicados de inmunoprecipitación a partir de un experimento representativo, relativizados al valor medio de HPRT exón 2. (D) Grado de H3K9me2 en células diferenciadas control y tratadas con TSA, realizado con el mismo protocolo que la Figura 3.3. Los valores son medias (+ DE) de inmunoprecipitación por duplicado y todos los valores se muestran relativizados a los del exón 4 de HPRT.

inclusión del E18 en neuronas maduras tratadas con TSA, como analizamos en el apartado anterior.

En conclusión, nuestros resultados indican que la isoforma de inclusión del exón

18 de NCAM aumenta durante la diferenciación neuronal y que este efecto correlaciona con un aumento de marcas epigenéticas típicas de una cromatina más compacta específicamente en el locus del gen en estudio. Proponemos entonces, que el aumento de marcas represoras de la transcripción tales como la dimetilación en lisina 9 de histona H3 y la trimetilación de lisina 27 de histona H3, generan un empaquetamiento mayor de la cromatina en el locus de NCAM provocando una disminución en la velocidad de la RNAPII, o un aumento en la cantidad de pausados. Esto genera, a su vez, que los sitios débiles de splicing sean expuestos a medida que son transcriptos al spliceosoma y se favorece su inclusión (Figura 3.5).

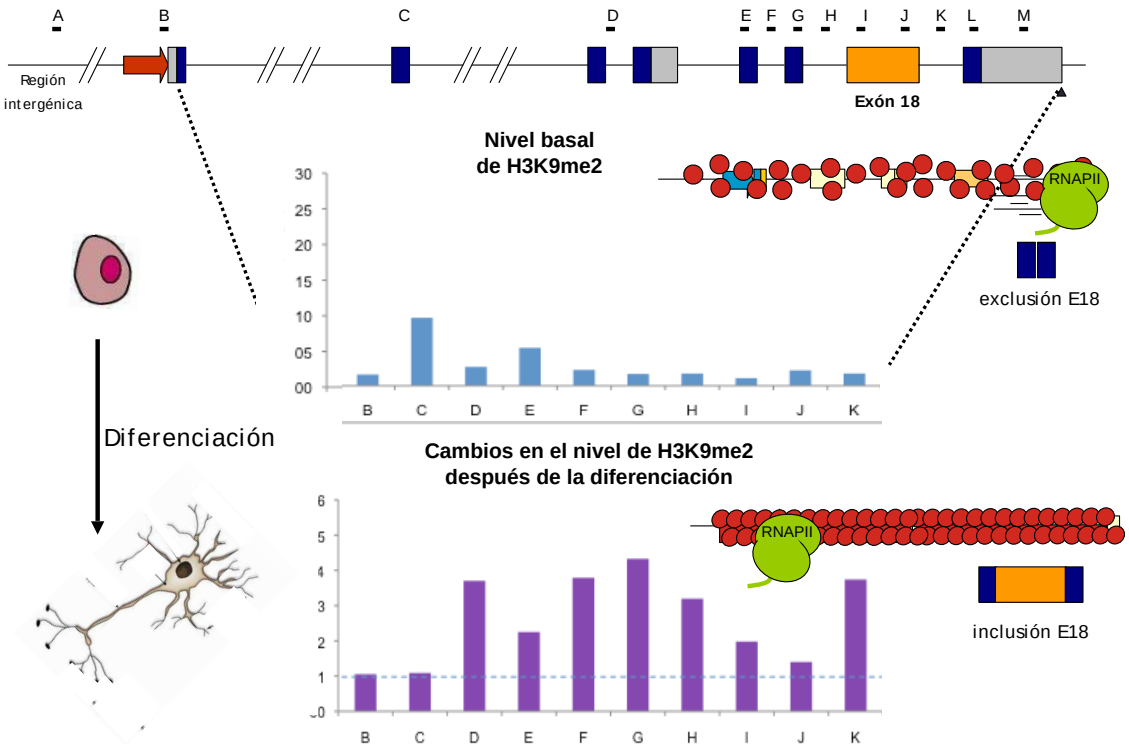

Fig. 3.5: *Splicing* alternativo - cromatina alternativa. El modelo muestra que durante la diferenciación neuronal aumentan los niveles de H3K9me2 intragénicos en el gen NCAM. Este cambio correlaciona con un aumento en la velocidad de elongación de la RNAPII provocando un incremento de los niveles de inclusión del exón alternativo 18 de NCAM en el mRNA.

En este sentido, fue posible establecer una conexión directa entre el patrón de *splicing* alternativo y la estructura de la cromatina concluyendo que las modificaciones post-traduccionales de histonas que generan una estructura compacta de la cromatina correlacionan con una mayor inclusión del E18 de NCAM. No sólo fuimos capaces de analizar cómo marcas epigenéticas pueden estar involucradas en la regulación del procesamiento de los mRNAs, sino que además, establecimos distintos modelos de diferenciación neuronal que nos permitieron encontrar correlato fisiológico a los mecanismos moleculares que estudiamos. Los resultados que obtuvimos con este modelo fueron el puntapié inicial que permitió la consolidación del segundo modelo de estudio centrado en G9a, una de las enzimas que metila histonas.

4. EL *SPLICING* ALTERNATIVO DE G9A REGULA LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

4.1. G9a es necesaria para la diferenciación neuronal

Se ha estudiado ampliamente que la metiltransferasa de histonas G9a regula el proceso de diferenciación de gran variedad de células y tejidos. En este trabajo, inspirados en los resultados recientes en NCAM, utilizamos el modelo ya establecido de diferenciación neuronal para estudiar el papel de G9a durante la diferenciación de las células precursoras a neuronas maduras. Las células N2a tratadas con AR durante 1 a 3 días entran en un programa de diferenciación como se refleja en la brotación de neuritas (Figura 4.1 A) y la expresión de la proteína Tau, un marcador neuronal (Figura 4.1 B).

Sin embargo, la disminución en los niveles de G9a en células N2a por tratamiento con un siRNA específico previo a la inducción de la diferenciación, suprime completamente tanto la formación de neuritas (Figura 4.1 C) como el efecto en la expresión de Tau (Figura 4.1 D). Más aún, células N2a tratadas con BIX desde el inicio del protocolo de differenciación comienzan a desarrollar neuritas pero fallan en establecer completamente el fenotipo diferenciado, en comparación con las células control (Figura 4.1 E). Además, el tratamiento con BIX suprime el incremento en la expresión de Tau durante la diferenciación (Figura 4.1 F). Estos resultados confirman un rol importante de G9a en la diferenciación de las células N2a a neuronas maduras.

Para reforzar esta conclusión y estudiar con más profundidad la importancia de la actividad de G9a en la diferenciación neuronal, realizamos un experimento de rescate. En este caso, la disminución en la extensión de neuritas en células N2a tratadas con el siRNA específico contra G9a, pudo ser rescatado mediante la transfección de una construcción que codifica G9a humana de tipo salvaje, pero no con una que expresa una mutante de G9a sin actividad catalítica (Figura 4.2). Al so-

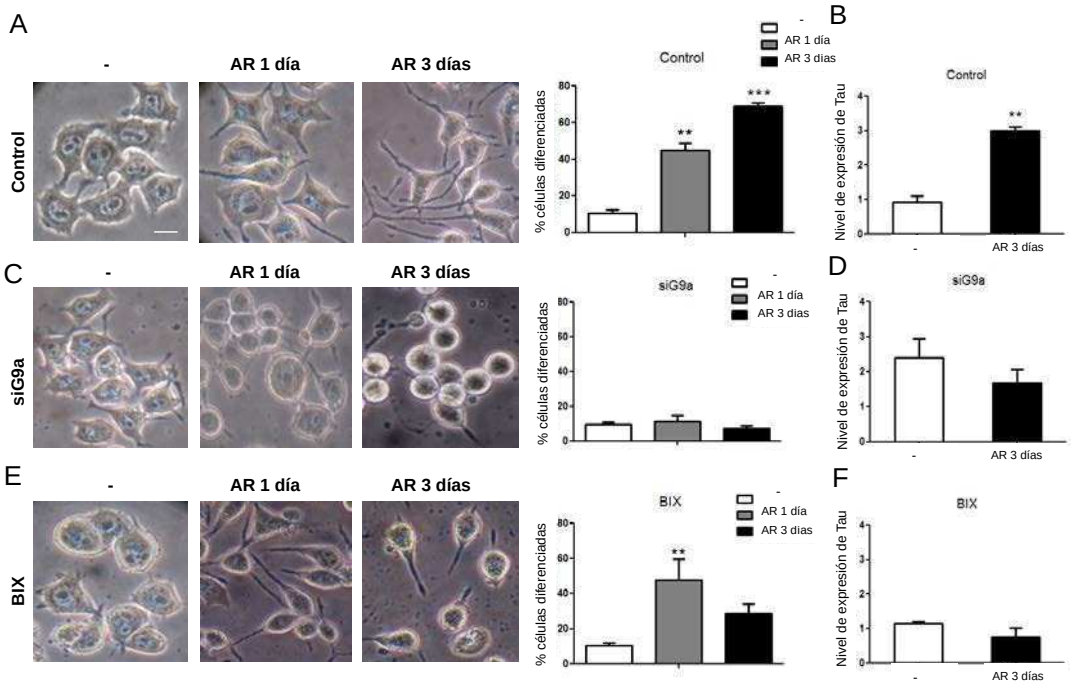

Fig. 4.1: G9a es necesaria para la diferenciación neuronal. Células N2a fueron diferenciadas con AR durante 1 a 3 días. Se determinó el porcentaje de células con crecimiento de neuritas (células diferenciadas) (A) y se evaluó mediante RT-qPCR los niveles de RNA mensajero del marcador neuronal Tau, relativizandolo a HSPCB (B). Las células fueron transfectadas con un siRNA específico contra G9a (siG9a) (C y D) o fueron tratadas con BIX (E y F) previamente a la inducción de la diferenciación y se analizaron como se describe en (A y B). El análisis estadístico corresponde al modelo lineal, de Bonferroni *test post hoc* (*) p <0,05, (**) p <0,001, (***) p <0,0001.

breexpresar G9a humana salvaje, que no es blanco del siRNA específico para G9a endógena de ratón, la diferenciación neuronal puede establecerse, al menos analizado desde el punto de vista morfológico. Estos resultados indican fuertemente que el requerimiento de G9a durante la diferenciación neuronal depende de su actividad enzimática.

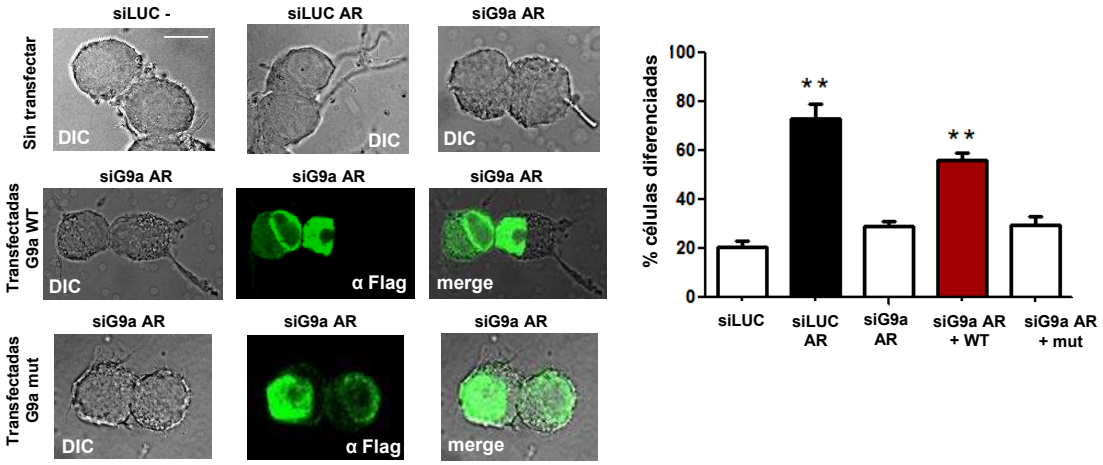

Fig. 4.2: La actividad de G9a es importante para la diferenciación neuronal. Previo a la inducción de la diferenciación con AR, las células N2a fueron transfectadas con siG9a o siRNA control contra luciferasa (siLUC), junto con plásmidos de rescate que codifican la secuencia completa de G9a salvaje humana marcada con flag (WT) o la mutante catalítica (mut). Estas construcciones humanas no son reconocidas por el siG9a utilizado puesto que es específico contra las isoformas de ratón. Luego de 3 días de diferenciación, las células se fijaron y la sobreexpresión de G9a se evaluó por inmunofluorescencia indirecta reconociendo el flag. En vista de la mayor eficiencia de transfección de siRNAs en comparación con la transfección de plásmidos, la diferenciación solamente se evaluó en las células que mostraron fluorescencia positiva. A la derecha se muestra el porcentaje de células diferenciadas.

4.2. El pre-RNA mensajero de G9a sufre *splicing* alternativo durante la diferenciación neuronal

Tanto en humanos como ratón, el RNA mensajero de G9a existe como dos isoformas que se diferencian por la inclusión o exclusión del exón alternativo 10 (E10). El exón 10 inserta un segmento interno de 33 aminoácidos hacia el extremo amino-terminal, y por lo tanto no altera el marco de lectura abierto cuando se incluye. Además, el E10 no afecta ningún dominio caracterizado de la proteína (Figura 4.3 A). Analizamos el patrón de *splicing* del E10 de G9a en células N2a y descubrimos que la inclusión del E10 aumenta durante la diferenciación neuronal tanto con el protocolo de DMSO como con el de AR (Figura 4.3 B y C). Por otra parte, con el

fin de asegurarnos de que el efecto no fuera específico para esta línea celular, realizamos el mismo análisis utilizando la línea P19, en la cual células madre embrionarias murinas son inducidas a formar cuerpos embrionarios primero y células neuronales después. Observamos el mismo patrón de *splicing* alternativo en la diferenciación neuronal de células de la línea P19 (Figura 4.3 D), concluyendo que la isoforma de inclusión del E10 de G9a se encuentra enriquecida en neuronas maduras.

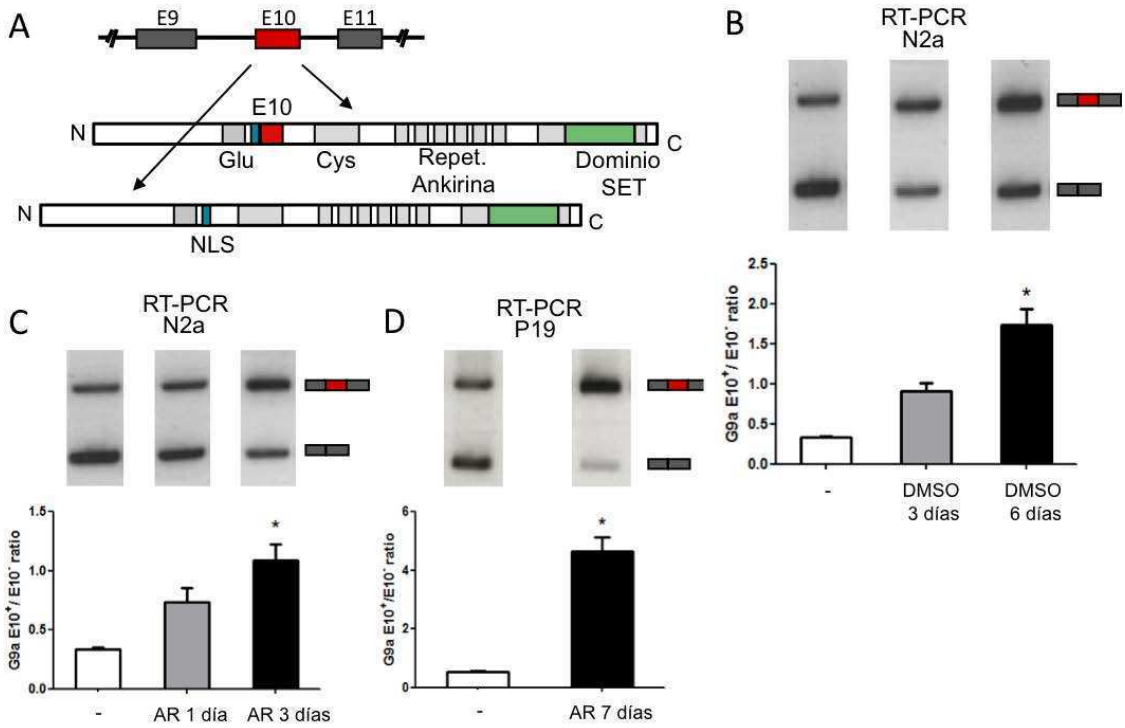

Fig. 4.3: El *splicing* alternativo de G9a es modulado durante la diferenciación neuronal. (A) Diagrama esquemático del gen G9a que muestra las isoformas de *splicing* alternativo que se diferencian por incluir o excluir el E10. Células N2a se diferenciaron con 2 % de DMSO (B) o 1 μM de AR (C) durante 1 a 6 días. En los puntos de tiempo indicados, las células fueron levantadas, el RNA extraído, y el *splicing* alternativo de G9a evaluado mediante RT-PCR radiactiva. (D) Células P19 fueron diferenciadas con AR durante 7 días y el *splicing* alternativo de G9a se evaluó como fue descripto en B y C. Los geles de RT-PCR se muestran en la parte superior y la cuantificación correspondiente en la parte inferior de cada panel. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran la media con el error estándar (DE) de experimentos representativos. El análisis estadístico corresponde a un modelo lineal, de Bonferroni *test post hoc* (*) p <0,05, (**) p <0,001.

Más importante aún fue el establecimiento de un correlato fisiológico del efecto

observado. Para ello, analizamos el patrón de *splicing* de G9a en cerebros enteros de ratones recién nacidos. Como se muestra en la Figura 4.4, la inclusión del E10 aumenta desde el día post-natal 1 al 7 y se mantiene elevada hasta por lo menos los 4 meses de edad.

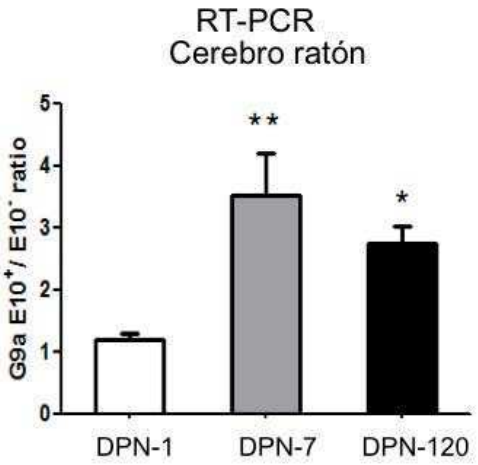

Fig. 4.4: La inclusión del E10 de G9a aumenta durante el desarrollo del cerebro en ratones. Muestras de cerebro entero de ratón fueron tomadas en los días postnatales (DPN) 1, 7, 120. El RNA fue extraído y el *splicing* alternativo de G9a fue evaluado como se describió en figuras anteriores. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se muestra la media junto con el error estándar de un experimento representativo. El análisis estadístico corresponde con un modelo lineal, de Bonferroni *test post hoc* (*) $p < 0{,}05$, (**) $p < 0{,}001$.

Por otra parte, esta regulación no se restringe a la diferenciación neuronal dado que durante la estimulación de células T del sistema inmune se observó un aumento de la inclusión del E10 en G9a [138] al igual que en la diferenciación de células de glándula mamaria en cultivo (resultados no mostrados del laboratorio de la Dr. Anabella Srebrow). Estos resultados sugieren que la presencia del E10 en G9a podría estar jugando un papel importante en la diferenciación celular.

4.3. La secuencia del E10 de G9a está altamente conservada

Dada la fina regulación de la inclusión del E10 de G9a en el mRNA, analizamos el grado de conservación de la secuencia en diferentes especies de mamímefos, como una medida de su importancia evolutiva. Evulando en primer lugar las secuencias nucleotídicas de humano, rata y ratón encontramos que existen 3 bases diferentes en la secuencia de 102 nucleótidos codificada por el exón alternativo E10. Para extender el análisis, tomamos las secuencias nucleotídicas correspondientes al E10 de G9a de diez especies distintas de mamíferos, y observamos exactamente las mismas 3 bases distintas comparando todas entre sí. Para nuestra sorpresa, las 3 diferencias en nucleótidos corresponden a mutaciones sinónimas puesto que la secuencia primaria aminoácidica codificada por el exón 10 es exactamente idéntica para las diez especies analizadas (Figura 4.5).

Fig. 4.5: Conservación del E10 de G9a en mamíferos. El esquema es una representación gráfica de los patrones de la alineación de secuencias múltiples correspondientes al E10 de G9a de diez especies de mamíferos. La altura de cada letra en cada posición indica la conservación de esa posición medida como frecuencia relativa del correspondiente nucleótido en esa posición (medida en bits). La imagen se generó utilizando la herramienta WegLogo.

El alto grado de conservación de la secuencia codificada por el E10 de G9a sugiere que su inclusión en la proteína podría tener alguna función celular aún no caracterizada.

4.4. La inclusión del E10 de G9a es necesaria para la diferenciación neuronal

Dado que G9a es fundamental para la diferenciación neuronal y que la inclusión del E10, altamente conservado durante la evolución, se encuentra fuertemente aumentada en neuronas maduras, decidimos analizar si el E10 cumple un papel im-

portante en el establecimiento de la diferenciación celular. Con este fin, depletamos a las células N2a de la isoforma de G9a que incluye el E10 (G9a E10+) mediante un siRNA específico cuyo blanco de acción se encuentra en los primeros nucleótidos del E10 de G9a (siE10). En condiciones en las cuales la cantidad total de RNA mensajero y de proteína de G9a no se vieron afectadas (Figura 4.6), el siE10 redujo los niveles de inclusión del E10 en células N2a tratadas con AR (Figura 4.7 A).

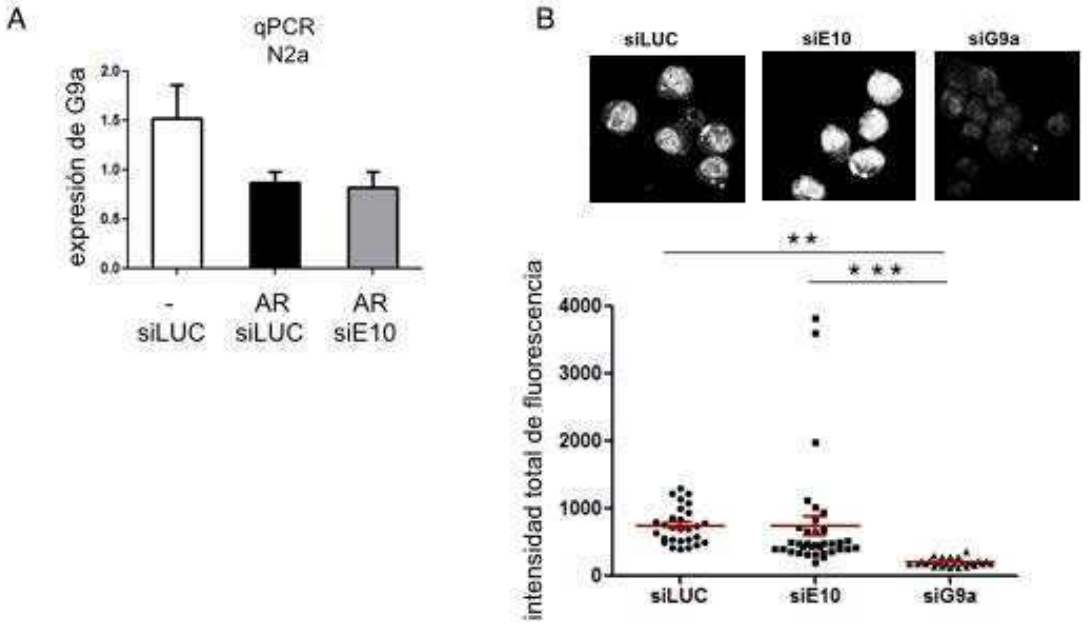

Fig. 4.6: La disminución específica de la isoforma G9a E10+ no afecta los niveles totales de G9a. Células N2a fueron diferenciadas (AR) o mantenidas sin deferenciar (-) y se transfectaron con siLUC como control, siE10 o siG9a previamente a la inducción de la diferenciación. Los niveles totales del RNA mensajero de G9a fueron evaluados por RT-qPCR y relativizados a HSPCB (A). (B) Las imágenes muestran los niveles de intensidad de fluorescencia total medida por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico anti-G9a con los tratamientos indicados y el gráfico corresponde a la cuantificación.

El tratamiento con siE10 provocó una significativa inhibición de la diferenciación neuronal visto en la generación de proyecciones neurales. La Figura 4.7 B muestra el fenotipo de las células tratadas y en la Figura 4.7 C es posible observar la cuantificación del porcentaje de células diferenciadas en cada condición. Estos resultados

revelan que la inclusión del E10 de G9a juega un papel importante en la promoción de neuritas durante la diferenciación de células N2a.

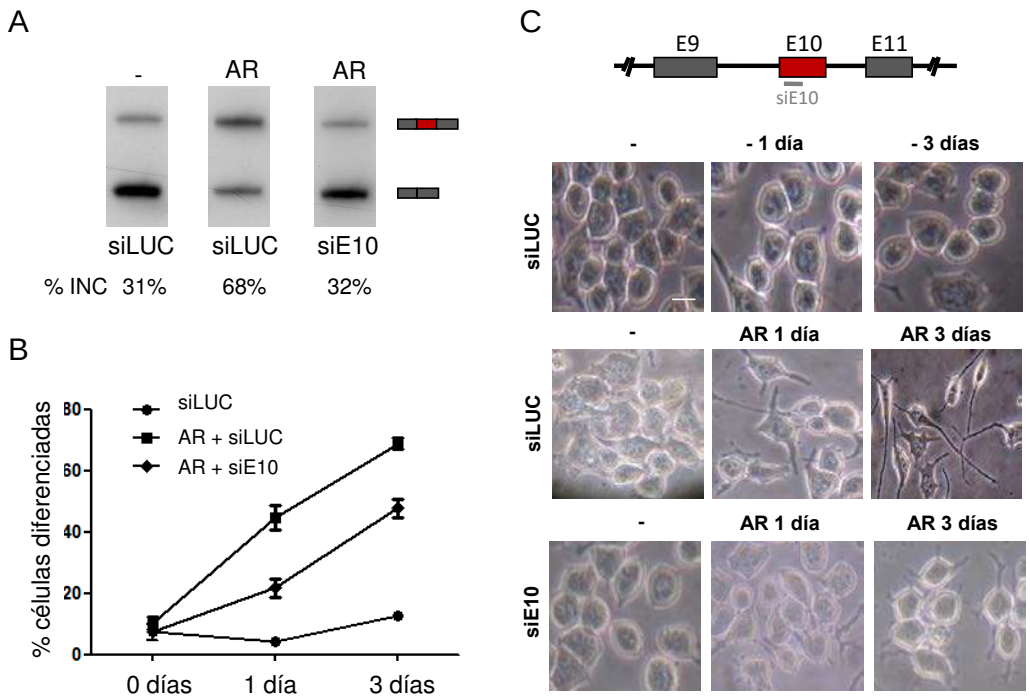

Fig. 4.7: Se requiere la inclusión del E10 de G9a para la diferenciación neuronal. Células N2a fueron diferenciadas por tratamiento con AR o mantenidas sin diferenciar (-) durante 1 a 3 días y fueron transfectadas con siLUC como control, o un siRNA específico contra el E10 de G9a (siE10) previamente a la inducción de la diferenciación. (A) El *splicing* alternativo de G9a se evaluó como fue descripto anteriormente y el porcentaje de inclusión del E10 se indica en cada panel. El porcentaje de células que mostraron gran crecimiento de neuritas fue determinado morfológicamente (B) y cuantificado (C). Se muestra un diagrama esquemático del gen de G9a donde se observa el sitio blanco del siE10 se muestra (B, arriba).

4.5. Los niveles de H3K9me2 aumentan durante la diferenciación neuronal y son estimulados por la inclusión del E10 de G9a

Dado que se requiere la actividad metiltransferasa de G9a para la diferenciación de las neuronas, decidimos evaluar los niveles globales de H3K9me2 en células precursoras y neuronas maduras. Luego de 3 días de diferenciación neuronal inducida por AR, las células N2a presentan una señal significativamente más fuerte de H3K9me2 en comparación con las células no diferenciadas (Figura 4.8 A). Como el aumento de H3K9me2 y la inclusión del E10 de G9a están correlacionados durante la diferenciación neuronal, y en busca de identificar el papel del E10 en el proceso, analizamos el efecto de la inclusión del E10 en la actividad de metiltransferasa de histonas de G9a.

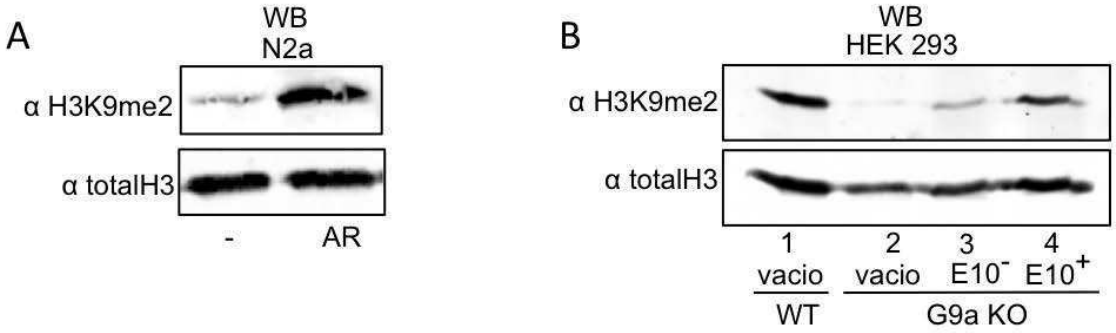

Fig. 4.8: La diferenciación neuronal y la inclusión del E10 estimulan el los niveles de H3K9me2. (A) Células N2a fueron diferenciadas con AR por 3 días o mantenidas sin diferenciar. Los niveles globales de H3K9me2 fueron evaluados por *western blot* con anticuerpos anti-H3K9me2 y anti-H3total como control. (B) Las células HEK293 *knock-out* para G9a fueron transfectadas con plásmidos que codifican las isoformas de G9a de ratón que incluyen (E10+) o excluyen (E10-) el E10, o el vector vacío correspondiente como control. 48hs horas luego de la transfección, las células fueron levantadas y analizadas como en (A).

Para ello, transfectamos vectores de expresión que codifican las dos isoformas de G9a (E10+ y E10-) en células HEK293 knock-out para G9a y analizamos los niveles globales de H3K9me2. La Figura 4.8 B muestra que mientras la dimetilación de

H3K9 es prácticamente nula en las células knock-out de G9a (comparar los carriles 1 y 2), la sobreexpresión de ambas isoformas de G9a rescatan parcialmente el fenotipo, con un efecto más fuerte provocado por la variante que incluye el E10 (comparar los carriles 3 y 4). Estos resultados sugieren que la inclusión del E10 estimula la capacidad de G9a para metilar histonas.

4.6. La inclusión del E10 no afecta la actividad catalítica intrínseca de G9a

Para examinar más a fondo el papel del E10 en la actividad de G9a, utilizamos una herramienta para medir la actividad de metiltransferasa por transmisión de energía de resonancia (FRET) *in vivo* [139]. En este sistema reportero, un sustrato peptídico correspondiente al sitio de metilación de H3K9 está unido a través de un enlace flexible a un dominio de unión a metil lisina conocido como cromodominio. Una vez metilado el residuo K9, el cromodominio forma un complejo intramolecular con la cadena lateral de la metil-lisina, alterando la relación espacial entre las unidades YFP y CFP flanqueantes y, entonces, se modifica el nivel de FRET (Figura 4.9). Con el fin de obtener resultados independientes de la localización subcelular tanto del sensor de FRET como de las isoformas de G9a, los datos de fluorescencia se recogieron sólo de los compartimentos nucleares de las células y se relativizaron a los niveles de expresión de cada isoforma.

De esta forma, cotransfectamos células HeLa con el vector de expresión del reportero de metilación y una de las isoformas de G9a, para tomar datos de fluorescencia del sensor por FRET. En este ensayo, las dos isoformas de G9a muestran capacidades de metiltransferasa similares que se evidencian en similares niveles de FRET del reportero de metilación (Figura 4.9). Estos resultados indican que la inclusión del E10 no estimula la actividad catalítica de G9a *in vivo*. Por otra parte, esta observación sugiere que el aumento en los niveles de H3K9me2 provocados por la inclusión del E10 debe ser causado por un mecanismo diferente al aumento de la actividad intrínseca de G9a.

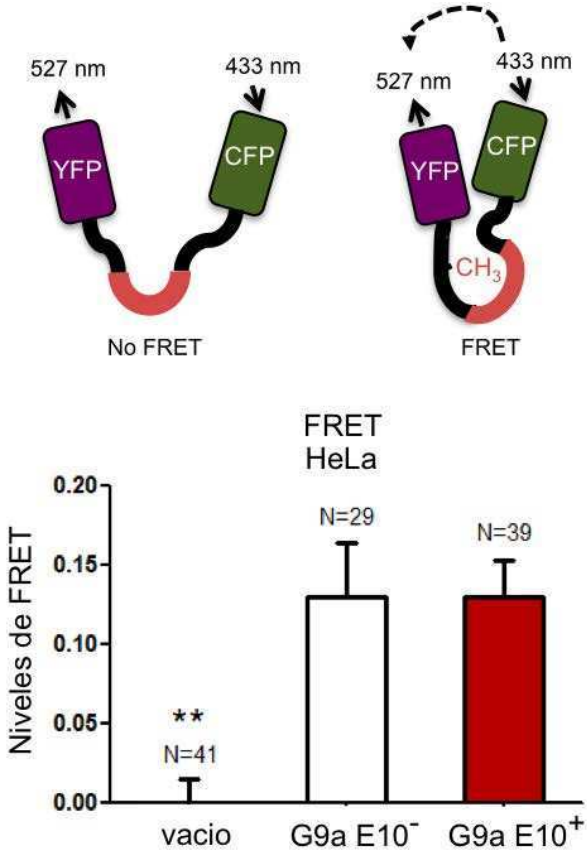

Fig. 4.9: La inclusión del E10 de G9a no altera su actividad catalítica. Arriba se muestra un diagrama esquemático del reportero de actividad de metiltransferasa. Las células HeLa fueron cotransfectadas con plásmidos de expresión de G9a de ratón incluyendo o excluyendo el E10 (G9a E10+ o G9a E10-), y el reportero de actividad de metiltransferasa. La metilación de la proteína reportera se detectó mediante datos de FRET obtenidos sólo de compartimentos nucleares. Las barras representan las medias con su error estándar. Se utilizó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon (**) p <0,001.

4.7. Funcionalidad diferencial de las isoformas de G9a y tendencia al desorden de cada aminoácido

Como se comentó en 1, si bien se conoce detalladamente la función de G9a, no se han descripto hasta el momento diferencias funcionales entre las dos isoformas.Hasta aquí hemos mostrado que si bien la inclusión del E10 promueve la dimetilación en H3K9, esto no se debe a una mayor actividad de la isoforma de inclusión en comparación con la de exclusión. De esta forma, y con el objetivo de determinar

si existe una diferencia funcional entre las dos isoformas de G9a generadas por *splicing* alternativo del exón 10 que pudiera explicar los resultados observados, lo primero que analizamos fueron los dominios funcionales que se pueden predecir a partir de su secuencia primaria. Utilizamos la plataforma UniProt de libre acceso para hacer el estudio predictivo de la ubicación de los dominios funcionales de G9a en la secuencia primaria de la proteína. Como ya adelantamos en el esquema de la Figura 4.3 A, los dominios de metiltransferasa (dominio SET) y de repeticiones de ankirinas altamente estudiados y caracterizados en G9a están ubicados hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína. Por otro lado, el exón alternativo no forma parte de ningún dominio funcional conocido, al menos en una predicción según su secuencia aminoacídica.

Sin embargo, resulta evidente la cercanía entre el exón alternativo y una señal de localización nuclear (NLS) en la secuencia primaria de la proteína. Si bien la isoforma que en la bibliografía se conoce como "G9a larga" por la utilización de un promotor alternativo posee en el extremo amino terminal otra señal de localización nuclear, la isoforma conocida como "G9a corta" tiene un único NLS situado muy cercano a E10. En un estudio previo [132] se demuestra que en "G9a larga" ambos NLS son funcionales. Sin embargo, aún sin estudios previos de la funcionalidad del NLS en G9a corta, dado que es el único y G9a siempre fue informada como una proteína nuclear, es esperable que funcione como la única secuencia capaz de localizar a G9a en el núcleo. Dicha NLS consiste en una secuencia de aminoácidos básicos bipartita localizada a exactamente 8 aminoácidos hacia el N-terminal del comienzo de la región proteica codificada por el E10.

Con el fin de evaluar un posible cambio estructural en la proteína G9a a partir de la inclusión del E10, utilizamos métodos predictivos de la tendencia al desorden de cada aminoácido que forma parte de su secuencia. Esta es una forma de interpretar si la presencia del exón modifica el entorno de la señal bipartita de localización nuclear u otro dominio estructural o funcional cercano. La Figura 4.10 muestra la gráfica del desorden de cada sección de la proteína junto con un esquema de los dominios funcionales a los que corresponde cada conjunto aminoacídico. Se observa

que en en el panel inferior, en el gráfico correspondiente a la isoforma de inclusión del E10, el exón alternativo se encuentra en una región altamente desordenada de la proteína. En comparación con la isoforma de exclusión del E10 se puede concluir que la señal de localización nuclear se adapta a un contexto de mayor grado de desorden en presencia del exón alternativo.

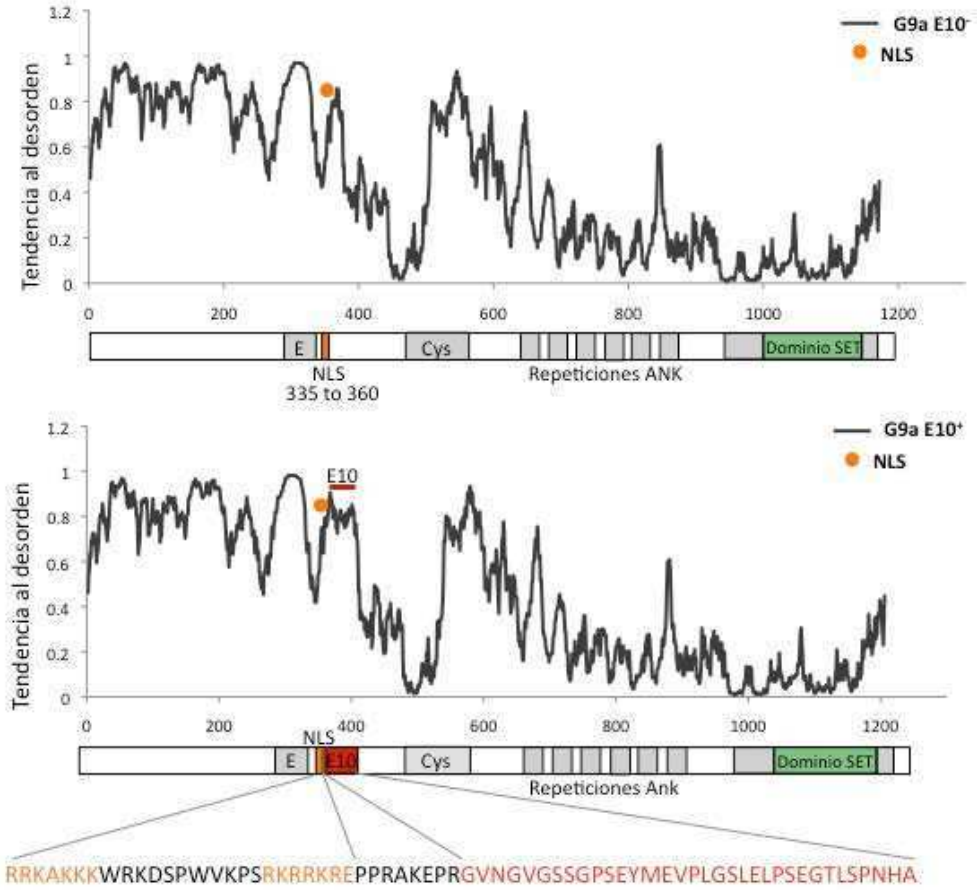

Fig. 4.10: Predicción del grado de desorden de los polipéptidos codificados por las variantes de *splicng* alternativo de G9a. La energía de cada residuo de G9a E10- (arriba) y G9A E10+ (abajo) se calcularon mediante IUPred para asignar su estado de orden/desorden. Se muestra un esquema de los dominios proteicos de las isoformas junto con una región de la secuencia aminoacídica

4.8. La localización subcelular de G9a se modifica durante la diferenciación neuronal

Dada la cercanía de la NLS al E10 decidimos evaluar la localización subcelular de G9a tanto en precursores neuronales como en neuronas maduras. Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia partiendo de células fijadas y utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la sección carboxilo-terminal de G9a. En el caso de las N2a sin diferenciar fijamos las células al día siguiente de ser plaqueadas sobre portaobjetos, mientras que en el caso de las neuronas maduras, al día siguiente del plaqueo sobre vidrio comenzamos la inducción de la diferenciación tanto para el protocolo de diferenciación con DMSO como para el que usa AR y dejamos diferenciar los días necesarios. El ensayo reveló células con patrones distintivos. En las células no diferenciadas, G9a se detecta tanto en el núcleo como en el citoplasma. Este patrón cambia radicalmente durante la diferenciación de las neuronas a una localización casi exclusivamente nuclear (Figura 4.11 A).

La cuantificación de la concentración relativa de la intensidad de fluorescencia de G9a, ya sea usando DMSO (Figura 4.11 B) o AR (Figura 4.11 C) indica que la diferenciación neuronal aumenta significativamente la relación núcleo/citoplasma. Los mismos resultados se obtienen mediante la cuantificación de la intensidad total de fluorescencia con los dos protocolos de diferenciación (Figura 4.12 A y B). Por otra parte, existe una correlación lineal entre el grado de inclusión del E10 de G9a y la localización nuclear de la proteína en cuatro líneas celulares humanas diferentes analizadas (Figura 4.12 C).

Con el fin de obtener evidencias independientes, evaluamos la localización de G9a por *western blot* en fracciones nucleares y citoplasmáticas de células N2a sin diferenciar y diferenciadas. La Figura 4.13 muestra que la diferenciación neuronal provoca una disminución de la fracción citoplásmica de las dos isoformas de G9a (comparar intensidades globales en los carriles 1 y 3) y un aumento en la fracción nuclear (comparar intensidades globales en los carriles 2 y 4). Por otra parte, las fracciones nucleares de ambos tipos celulares (carriles 2 y 4) muestran una mayor

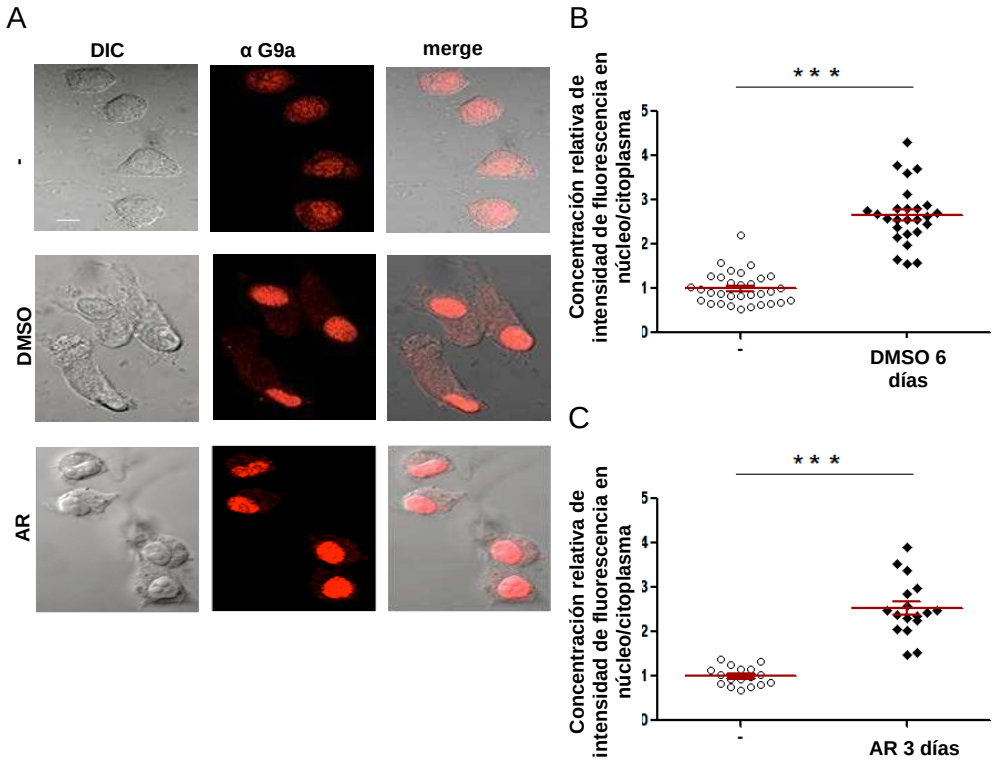

Fig. 4.11: La diferenciación neuronal promueve la localización de G9a en el núcleo. Células N2a se diferenciaron con DMSO o AR 6 o 3 días, respectivamente. Luego, se fijaron las células y se evaluó la localización de la proteína G9a por inmunofluorescencia indirecta (A). En (B y C) se muestran los paneles de la cuantificación de la concentración relativa de intensidad de fluorescencia de G9a en los compartimentos nucleares y citoplásmicos de células N2a diferenciadas con DMSO (B) o AR (C).

intensidad de la isoforma de inclusión del E10.

Estos resultados indican que la diferenciación neuronal de células N2a promueve la localización nuclear de G9a. En vista de estas observaciones y la correlación con el aumento en la inclusión del E10 durante la diferenciación, razonamos que si el E10 estimula la localización nuclear de la proteína, la traslocación al núcleo de G9a debería afectarse por el tratamiento con siE10. Con el fin de probar esta hipótesis, analizamos la localización subcelular de G9a en las células no diferenciadas transfectadas con siE10. Al comparar la concentración relativa de la intensidad

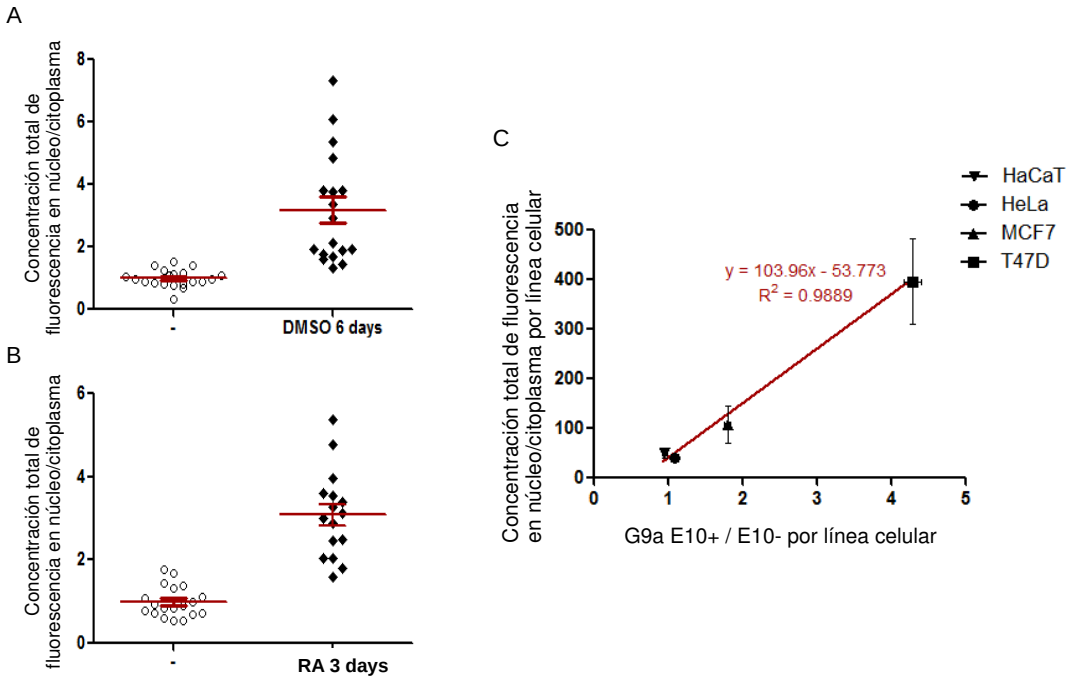

Fig. 4.12: La diferenciación neuronal desencadena una acumulación nuclear de G9a. Células N2a fueron diferenciadas con DMSO o AR durante 6 o 3 días respectivamente. Las células fueron fijadas y la localización de la proteína G9a se evaluó por inmunofluorescencia indirecta. (A y B) Los gráficos muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de G9a en los compartimientos nucleares y citoplásmicos de células N2a diferenciadas con DMSO (A) o AR (B). (C) Las células HaCaT, HeLa, MCF7 y T47D fueron fijadas y la localización de la proteína G9a se evaluó por inmunofluorescencia indirecta. El *splicing* alternativo del gen G9a se evaluó mediante RT-PCR radiactiva en cada línea celular.

de fluorescencia de G9a, las células tratadas con siE10 muestran una localización nuclear significativamente menor que las células control (Figura 4.14).

4.9. La inclusión del E10 promueve la localización nuclear de G9a

Para determinar si la inclusión del E10 sólo se correlaciona con una mayor localización nuclear de la proteína o, si por el contrario, existe una relación de causa y efecto, expresamos de forma transitoria vectores de expresión de las dos isoformas

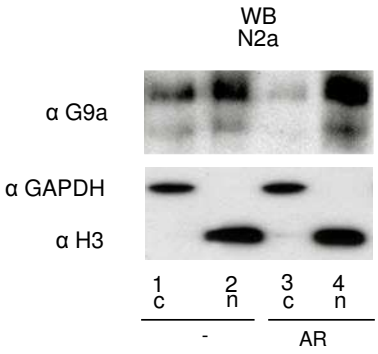

Fig. 4.13: La diferenciación neuronal promueve la localización nuclear de G9a. Células N2a fueron diferenciadas por 3 días con AR o fueron mantenidas sin diferenciar, luego fueron levantadas las células y se separaron las fracciones nucleares y citoplasmáticas. Los niveles de G9a fueron analizados por *western blot* con anticuerpo anti-G9a, mientras que se evaluó la extracción de las fracciones subcelulaes con anticuerpos anti-H3 para evidenciar la francción nuclear y anti-GAPDH para evidenciar la fracción citoplasmática.

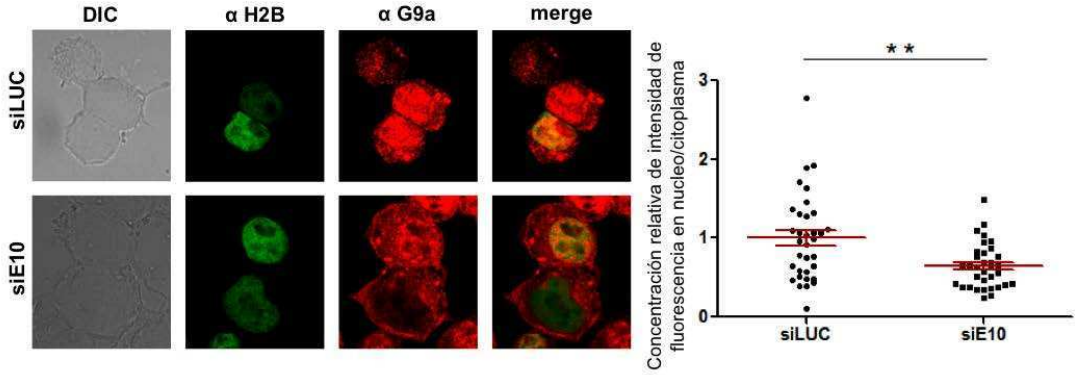

Fig. 4.14: La inclusión del E10 de G9a promueve la localización nuclear. Células N2a fueron transfectadas con siE10 o siLUC como un control. La localización subcelular de G9a fue evaluada por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-G9a y se utilizó el anticuerpo anti-H2B (histona 2B) para marcar el núcleo celular. El panel de la derecha muestra la concentración relativa de la intensidad de fluorescencia de G9a en los compartimentos nucleares y citoplasmáticos 48 horas después de la transfección. El análisis estadístico corresponde a la prueba t de Student (**) p <0,001.

de G9a, con y sin E10, en células HeLa y N2a. Las proteínas G9a recombinantes muestran dos patrones de expresión en ambos tipos celulares: solamente nuclear (n) o nuclear y citoplasmática (n + c) (Figura 4.15 A y B).

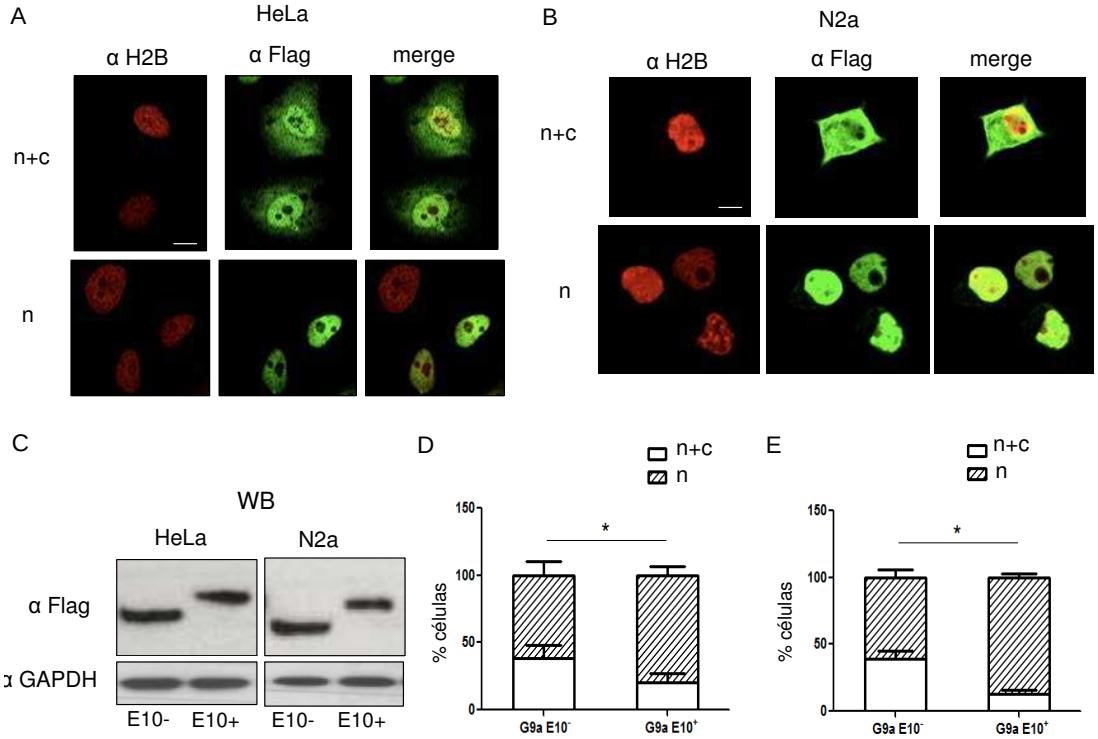

Fig. 4.15: La presencia del E10 favorece la localización nuclear de G9a. Células HeLa (A) o N2a (B) fueron transfectadas con plásmidos de expresión que codifican las isoformas de G9a. 48 hs después de la transfección, las células fueron fijadas y la localización de G9a sobre-expresada se evaluó por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Flag y se utilizó el anticuerpo anti-H2B (histona 2B) para marcar el núcleo celular. Se muestran células con localización tanto nuclear como citoplásmica (n + c) y células con localización únicamente nuclear (n). (C) Los niveles de expresión de las isoformas de G9a se determinaron mediante *western blot* en células HeLa transfectadas (izquierda) o N2a (derecha). (D y E) Las barras muestran el porcentaje de células HeLa (D) y N2a (E) con señal nuclear + citoplasmática o sólo nuclear de G9a (n = entre 31 y 208 células). El análisis estadístico corresponde a la prueba exacta de Fisher (*) p <0,05.

A igual nivel de expresión verificados por *western blot* (Figura 4.15 C), la expresión de la isoforma E10+ disminuye el porcentaje de células con el patrón n +

c al mismo tiempo que aumenta el porcentaje de células con el patrón n, tanto en HeLa (Figura 4.15 D) como N2a (Figura 4.15 E). Esto indica que la inclusión del E10 promueve la localización nuclear de los complejos de proteínas que contienen el polipéptido G9a.

4.10. La inclusión del E10 está regulada por la estructura de la cromatina

Extensas evidencias han puesto de manifiesto que las modificaciones de la cromatina pueden afectar el *splicing* alternativo [131, 140–142] y aquí demostramos que la inclusión del E10 correlaciona con el aumento de la localización nuclear de G9a y el aumento de los niveles de H3K9me2, modificación producida por G9a. Por lo tanto, decidimos averiguar si la estructura de la cromatina tenía algún rol en la regulación de la inclusión o exclusión del exón alternativo de G9a. En primer lugar, utilizamos como herramientas distintas drogas que modifican artificialmente la estructura de la cromatina. La idea surge de que si la estructura cromatínica tiene una función importante en la regulación del *splicing* alternativo de G9a, entonces los cambios estructurales del DNA deberían mostrar una variación en los patrones de expresión de las isoformas de inclusión y exclusión. El tratamiento con 5aC, como se mencionó en 3, provoca una desmetilación generalizada tanto del DNA como de las histonas, que genera una relajación de la cromatina. En el contexto de una cromatina más abierta, según el modelo cinético, la RNAPII transcribe más rápido o menos pausadamente y se presentan al mismo tiempo los sitios débiles y fuertes de *splicing*. Al competir por la unión del spliceosoma, los sitios fuertes se unen con mayor afinidad y esto lleva a la mayor exclusión de los exones alternativos, flanqueados por sitios débiles de *splicing*, tal como vimos en 1. De esta manera, es de esperar que si la estructura de la cromatina regula el patrón de *splicing* alternativo de G9a, 5aC debería modificar los niveles de inclusión en el mRNA del E10.

Como se puede observar en la Figura 4.16 A, el tratamiento con 5aC no modifica los niveles de inclusión/exclusión del E10 en precursores neuronales. Sin embargo,

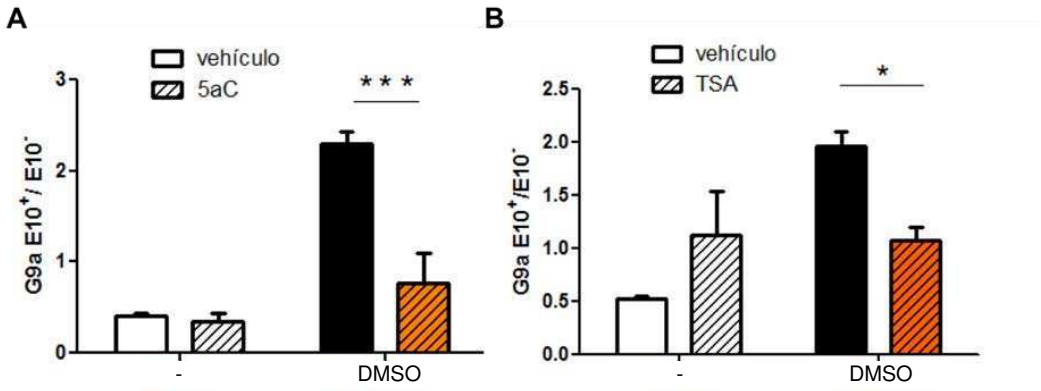

Fig. 4.16: Reversión del efecto de la diferenciación neuronal de N2a en la inclusión del E10 de G9a. Las células N2a fueron tratadas con 5aC durante 3 días (A) o TSA (B) durante 16hs y se evaluó el patrón de *splicing* alternativo de G9a. Tanto en precursores neuronales como en neuronas diferenciadas apenas terminaron los tratamientos con las drogas, las células fueron cosechadas y analizadas mediante extracción de RNA y RT-PCR radiactiva semi-cuantitativa. Se muestra la cuantificación y el análisis estadístico.

en el caso de realizar el tratamiento con la droga durante la última etapa de diferenciación con DMSO, observamos que disminuyen significativamente los niveles de inclusión del E10 de G9a en neuronas maduras. Este resultado sugiere que la estructura cromatínica podría estar implicada en la regulación que sufre el patrón de *splicing* alternativo de G9a durante la diferenciación neuronal. Del mismo modo, tratamos a las células N2a con TSA, compuesto que, como fue explicado en 3, provoca una descompactación de la cromatina. El efecto que se observa en la Figura 4.16 B, indica que el tratamiento con TSA revierte parcialmente el efecto de la diferenciación en el patrón de *splicing* alternativo de G9a, si bien hay una tendencia al aumento de la inclusión del E10 en los precursores neuronales. A partir de estos resultados concluimos que la estructura de la cromatina está implicada en la regulación del efecto que se observa en el patrón de *splicing* alternativo de G9a durante la diferenciación neuronal, dado que alteraciones estructurales provocan la reversión de dicho efecto.

Dado que las modificaciones de la cromatina están involucradas en esta regu-

lación, una pregunta que surge inmediatamente es si la regulación positiva de la inclusión del E10 podría ser el resultado de cambios en la metilación de H3K9 en el gen de G9a durante la diferenciación neuronal. Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (nChIP) muestran que la diferenciación neuronal aumenta los niveles de H3K9me2 en el cuerpo del gen de G9a pero no en el promotor ni en una región intergénica distante (Figura 4.17 A).

La metilación del DNA en citosinas se cuenta, junto con las modificaciones post-transcripcionales de las histonas, dentro de los mecanismos epigenéticos. En mamíferos, prácticamente toda la citosina metilada (5-metilcitosina) es encontrada en dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG están sub-representados en el genoma de mamíferos, y generalmente se los encuentra agrupados en regiones ricas, denominadas "islas CpG". El análisis de secuenciación de bisulfito de una isla CpG ubicada en el intrón 9 de G9a no muestra cambios en los niveles de 5-metilcitosina con la diferenciación de las células N2a, lo que indica que el efecto de 5aC en la inclusión del E10 no se debe a la inhibición de la metilación del DNA (Figura 4.17 B). En conjunto, estas observaciones sugieren que la estructura de la cromatina tiene un papel fundamental en la regulación del *splicing* alternativo G9a.

4.11. G9a regula su propio *splicing* durante la diferenciación neuronal

A partir de las observaciones anteriores, sabiendo que los niveles de H3K9me2 (marca depositada por G9a) aumentan durante la diferenciación neuronal en G9a y que la estructura de la cromatina regula el *splicing* alternativo de muchos RNAs mensajeros, incluido el de G9a, nos preguntamos si G9a podría estar involucrada en la regulación de su propio *splicing* alternativo. En primer lugar, tratamos a las células con BIX y analizamos el patrón de *splicing* alternativo de G9a. Si bien el tratamiento con BIX impide la diferenciación de precursores neuronales a neuronas maduras, en este caso las células fueron tratadas después de que el programa de diferenciación ya se había establecido con el fin de descartar una posible inhibición

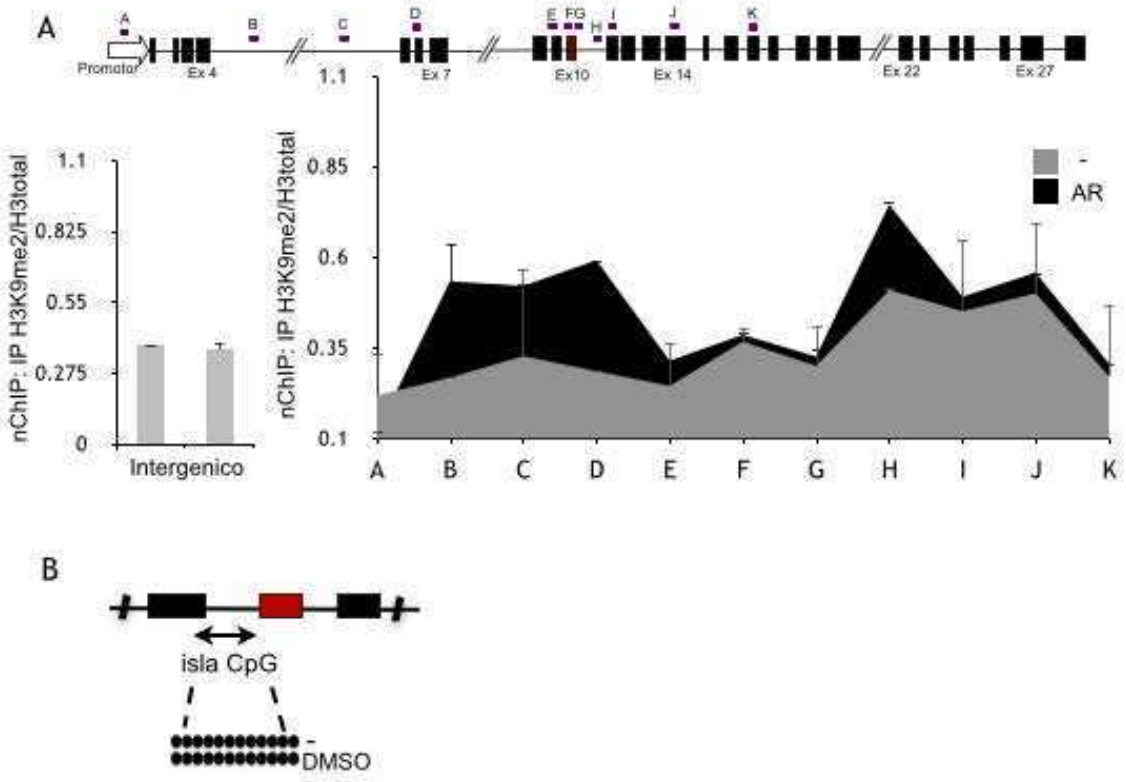

Fig. 4.17: La estructura de la cromatina regula el *splicing* alternativo de G9a. (A) Diagrama esquemático del gen de G9a que muestra la organización en exones e intrones y la distribución de los amplicones utilizados en la qPCR (parte superior). Células N2a fueron diferenciadas con AR durante 3 días y los niveles de H3K9me2 en las regiones indicadas se determinaron mediante nChIP seguido por qPCR (parte inferior). Los valores de dos inmunoprecipitaciones independientes, relativizados al valor medio para el total de H3, se muestran para cada región. Un amplicón situado en una región intergénica (izquierda) se utilizó como control. (B) Células N2a fueron diferenciadas con DMSO durante 6 días y la metilación del DNA de la isla CpG situada próxima al E10 (cuadro rojo) se determinó mediante la modificación con bisulfito de sodio seguido por secuenciación del DNA. Los círculos negros representan dinucleótidos CpG metilados.

de la diferenciación. Como se observa en la Figura 4.18, BIX no parece revertir la diferenciación cuando ya ha sido establecida, al menos a nivel de un análisis morfológico.

El tratamiento de las células N2a diferenciadas con el inhibidor de G9a revier-

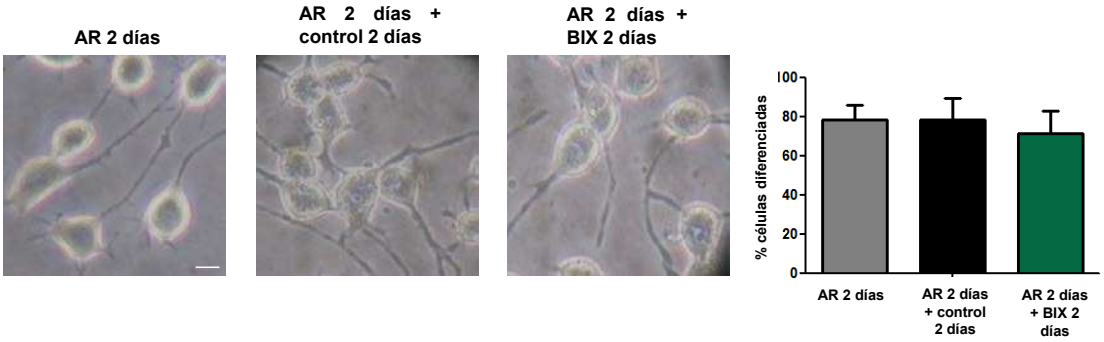

Fig. 4.18: BIX no inhibe la diferenciación neural cuando las células fueron tratadas una vez ya establecido el programa de diferenciación. Células N2a fueron diferenciadas por tratamiento con AR durante 2 días y después se añadió BIX o vehículo. Se determinó el porcentaje de células que muestran el crecimiento de neuritas (células diferenciadas) y se muestran imágenes representativas junto con la cuantificación.

te completamente el aumento en la inclusión del E10 provocada por diferenciación (Figura 4.19 A). Esta observación apoya la idea de que se requiere la actividad de metiltransferasa de G9a para la regulación de su propio *splicing* durante la diferenciación neuronal.

Para examinar más a fondo el papel de G9a en la regulación del *splicing* alternativo de su propio pre-RNA mensajero, obtuvimos un vector que expresa un minigén reportero de G9a que contiene los exones 9 a 11 y los intrones correspondientes (Figura 4.20 A).

Cuando el vector de expresión del minigén de G9a es transfectado en células N2a, muestra la misma regulación que el gen endógeno durante la diferenciación neuronal (Figura 4.20 B). Los cebadores que amplifican los transcriptos del minigén fueron diseñados para evitar la detección de las isoformas de G9a sobreexpresadas a partir de las construcciones de cDNA (Figura 4.19 B, 3 calles de la derecha). La cotransfección del minigén de G9a con las construcciones que codifican las isoformas de G9a muestra que la isoforma E10+ es más potente que la isoforma E10- para estimular la

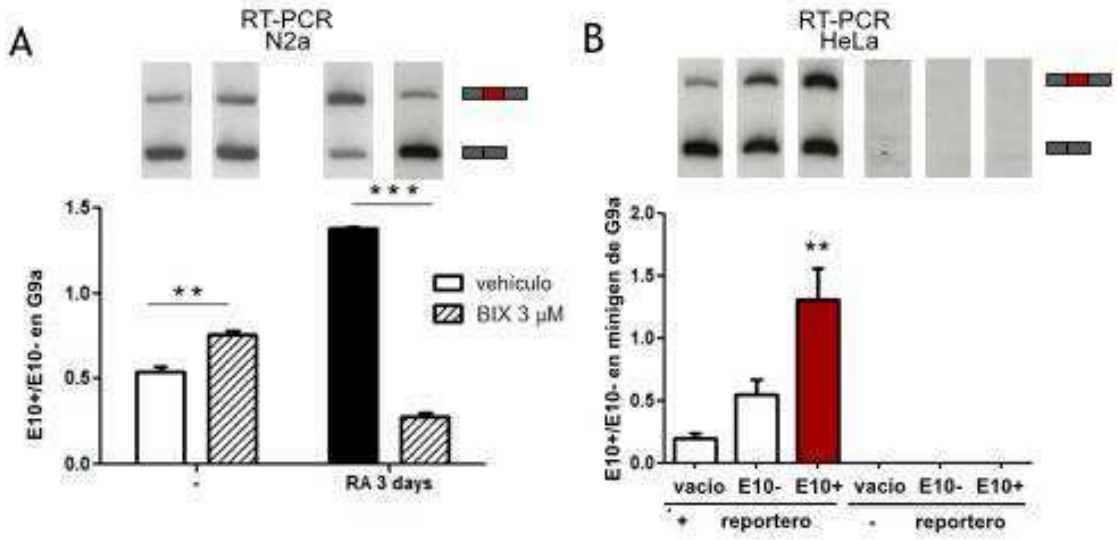

Fig. 4.19: G9a regula su propio *splicing*. (A) Células N2a fueron diferenciadas con AR durante 3 días y fueron posteriormente tratadas con BIX o su vehículo como control. El RNA fue extraído y el *splicing* alternativo evaluado como se describió anteriormente. (B) Células HeLa fueron cotransfectadas con un minigén reportero de *splicing* del E10 de G9a junto con plásmidos de expresión que codifican para el DNAc de longitud completa de las isoformas de G9a o los correspondientes vectores vacíos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran las media con el error estándar de un experimento representativo. El análisis estadístico corresponde a un ANOVA de uno o dos factores según corresponda, Bonferroni test post hoc (**) p <0,001, (***) p <0,0001.

inclusión del E10 por *splicing* en el mRNA maduro de G9a en células HeLa (Figura 4.19 B, 3 calles de la izquierda). Este efecto se reduce significativamente cuando se sobreexpresa la isoforma E10+ mutante para la actividad catalítica (Figura 4.21 A). El efecto inhibitorio es incluso más fuerte cuando se expresa otra mutante de la isoforma E10+ que además de una mutación puntual en el sitio catalítico también tiene una mutación puntual que impide la interacción con GLP [143] (Figura 4.21 B). Más aún, el efecto se revierte parcialmente con la inhibición de la actividad de G9a por tratamiento con BIX (Figura 4.21 C).

En conjunto, estos resultados demuestran que G9a regula su propio *splicing* al-

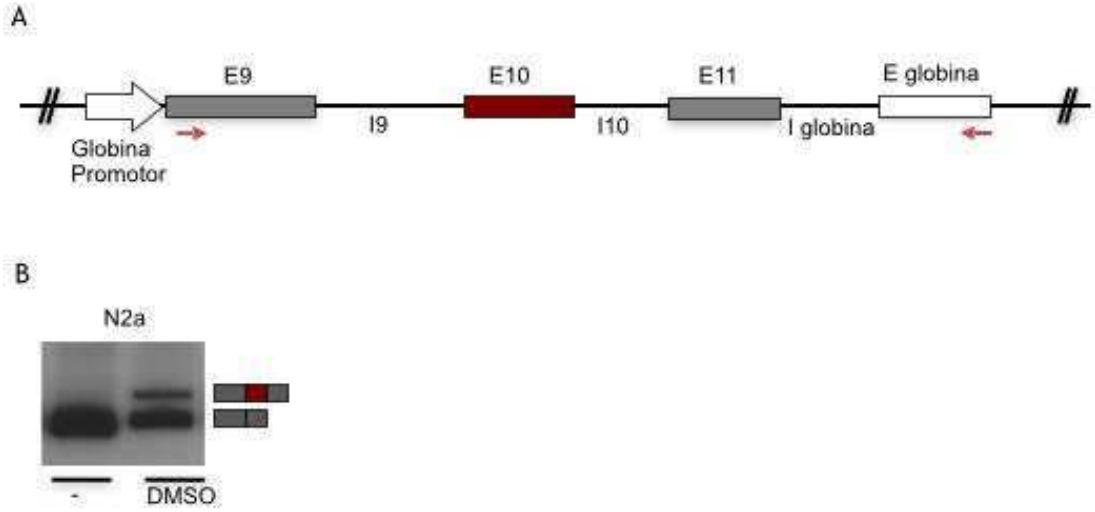

Fig. 4.20: El *splicing* alternativo del minigén de G9a es modulado durante la diferenciación neuronal. (A) Diagrama esquemático del minigén de G9a. (B) Células N2a fueron transfectadas con el vector de expresión del minigén de G9a y diferenciadas con DMSO durante 6 días. EL RNA fue extraído y el *splicing* alternativo se evaluó mediante RT-PCR radiactiva.

ternativo durante la diferenciación neuronal en un modo dependiente de su actividad catalítica como metiltransferasa y de la interacción con GLP. Como la isoforma G9a E10+ es más potente en la inducción de la inclusión del E10 y este proceso es necesario para la diferenciación eficiente de las neuronas, nuestros resultados son consistentes con un *feedback loop* positivo en el que la diferenciación neuronal favorece la síntesis de la isoforma G9a E10+ que, a su vez, promueve una mayor inclusión del E10 y estimula la localización nuclear de la proteína.

En conclusión, determinamos que tanto la estructura de la cromatina como la misma proteína G9a regulan el patrón de *splicing* alternativo en el locus en cuestión. Descubrimos que la inclusión del E10 en el mRNA maduro de G9a aumenta durante la diferenciación neuronal y que cambios en la estructura cromatínica son

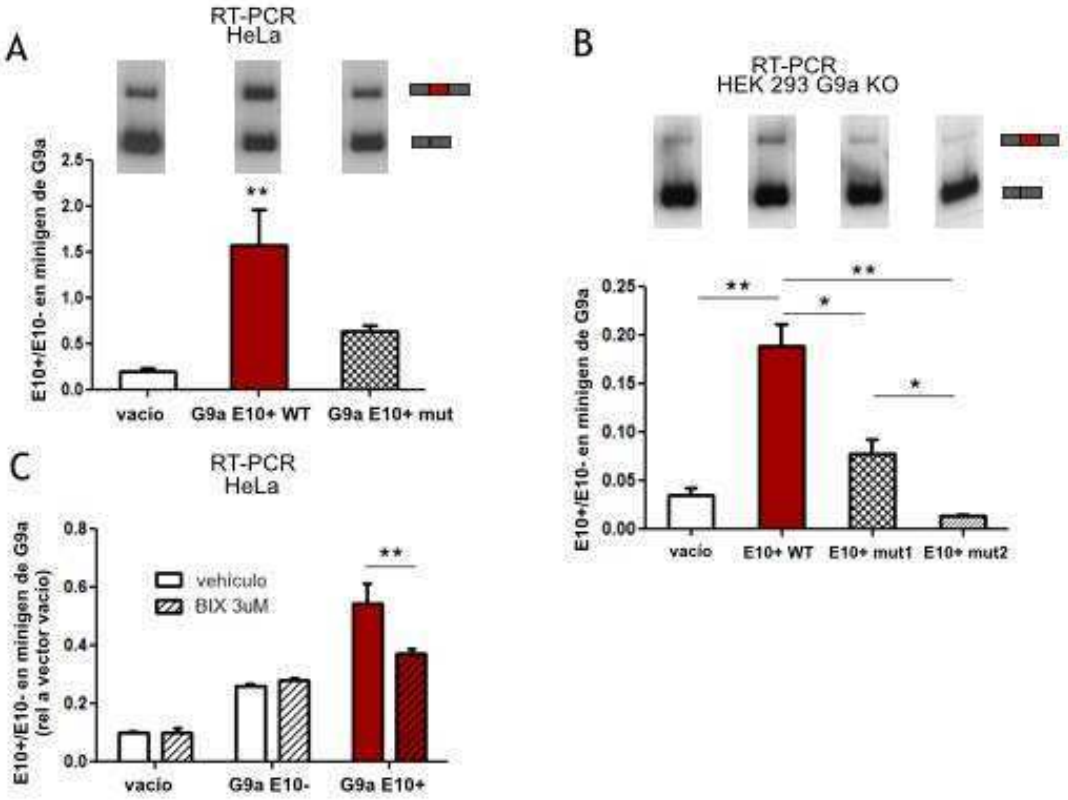

Fig. 4.21: G9a está implicada en la regulación de su propio *splicing*. (A-C) Las células fueron cotransfectadas con un minigén reportero del *splicing* del E10 de G9a junto con plásmidos de expresión que codifican para el DNAc de longitud completa de las isoformas de G9a o los correspondientes vectores vacíos. En (A), una versión mutante catalítica de la isoforma E10+ se evaluó en células HeLa, y en (B) dos versiones de mutantes catalíticos de la isoforma E10+ fueron analizados en células HEK293 *knock-out* para G9a. Los geles de RT-PCR se muestran en la parte superior y la cuantificación correspondiente en la parte inferior de cada panel. En (C) el efecto de BIX fue analizado y los resultados se muestran normalizados a los valores con el vector vacío. Las células fueron levantadas 48 hs después de la transfección y el *splicing* alternativo de G9a se evaluó mediante RT-PCR radiactiva utilizando cebadores específicos para el minigén. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran las medias con el error estándar de un experimento representativo. El análisis estadístico corresponde a un ANOVA de uno o dos factores según corresponda, Bonferroni *test post hoc* (*) p <0,05, (**) p <0,001.

responsanbles de este efecto. Sugerimos, además, que por este mecanismo, G9a regula su propio *splicing* alternativo. Por otra parte, analizamos que el aumento de

la isoforma de inclusión va acompañado de un incremento en la localización nuclear de G9a. Nuestros resultados son consistentes con un modelo en el cual la presencia del E10 genera un cambio conformacional que permite que la señal de localización nuclear situada nueve aminoácidos río arriba del E10 se encuentre en un contexto de mayor exposición. Finalmente, los datos indican que, mediante la regulación de su propio *splicing* alternativo, G9a gatilla una retroalimentación positiva que reafirma el compromiso a la diferenciación celular.

5. DISCUSIÓN

La diferenciación celular implica la reprogramación de la expresión génica. Desde un punto de vista clásico, esto se consigue a través de la regulación diferencial de la transcripción, lo que resulta en el silenciamiento o la activación de genes específicos. Sin embargo, cada vez más evidencias ponen de manifiesto al *splicing* alternativo como una fuente importante de variación que contribuye fundamentalmente a la regulación de la diferenciación celular [144]. Aun así, se sabe muy poco acerca de las redes de regulación que resultan en patrones celulares específicos de *splicing* alternativo y, en particular, sobre cómo el acoplamiento de la transcripción y el *splicing* en diferentes contextos de la estructura de la cromatina contribuyen a la diferenciación celular.

5.1. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal

En este trabajo, utilizando células N2a en cultivo demostramos que la inclusión del E18 de NCAM aumenta entre 2 y 3 veces con la diferenciación neuronal (Figura 3.2 A) y que este efecto depende de la estructura de la cromatina ya que se revierte parcialmente por tratamientos con drogas como 5aC (Figura 3.2 B), TSA (Figura 3.3 A)y BIX (Figura 3.3 B). Estos resultados obtenidos con agentes que generan una relajación de la estructura de la cromatina sugieren que el estado compacto de la cromatina podría ser en parte responsable del cambio en los patrones de *splicing* de las células diferenciadas. Fue posible confirmar estas observaciones mediante análisis de nChIP que demostraron que marcas represivas de histonas (H3K9me2) aumentan a lo largo del gen NCAM después de la diferenciación (Figura 3.4 C). Esta conclusión es apoyada también por la demostración de que el tratamiento de las células diferenciadas con TSA inhibe el aumento de los niveles de H3K9me2 (Figura 3.4

D), lo que explica el efecto de esta droga impidiendo la regulación positiva de la inclusión del E18 durante la diferenciación.

Nuestros resultados son consistentes con un modelo en el que la diferenciación neuronal de células en cultivo promueve el silenciamiento de la cromatina intragenica en NCAM, disminuye de forma localizada la velocidad de elongación de la RNPAII y promueve una mayor inclusión del E18 de NCAM. Más aún, determinamos que este mecanismo no se limita a las células N2a, sino que también regula el *splicing* alternativo de NCAM en células P19 (Figura 3.3 A) que siguen un patrón diferente de diferenciación pasando por un estadío intermedio de cuerpos embrionarios. En un trabajo previo de nuestro laboratorio [47] se había demostrado que la despolarización neuronal provoca la acetilación de histonas del gen NCAM, permitiendo una mayor tasa de elongación de la RNPAII que deriva en bajos niveles de inclusión del E18 de NCAM en el mRNA maduro. En conjunto, los resultados anteriores [47] y el presente trabajo apoyan un modelo general de çromatina alternativa - *splicing* alternativo" en el que un solo gen, con dos configuraciones diferentes de la estructura cromatínica con efectos opuestos sobre la tasa de elongación de la RNAPII, da lugar a dos patrones de *splicing* alternativos diferentes, cada uno característico de un estado funcional y un paso de diferenciación neuronal (Figura 5.1).

La compactación de la cromatina y las marcas represivas parecen ser fundamentales para la progresión de diversos sistemas de diferenciación celular en mamíferos [145, 146], lo que puede interpretarse como una forma de silenciar genes específicos de linaje y no restringir el transcriptoma por completo. En genreal, los análisis de la modulación de marcas epigenéticas específicas se han centrado históricamente en las regiones promotoras, mientras que las regiones intragénicas no han sido mayormente estudiadas. Sin embargo, existen algunos ejemplos que analizan los cambios en la metilación del DNA intragénico durante la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a precursores neuronales [147] o los niveles de H3K27me3 y H3K9me3 durante la diferenciación de células madre embrionarias humanas a fibroblastos [148]. También se demostró que la marca H3K9me2 se encuentra formando grandes bloques llamados *LOCKs* por sus siglas en inglés (large organized chroma-

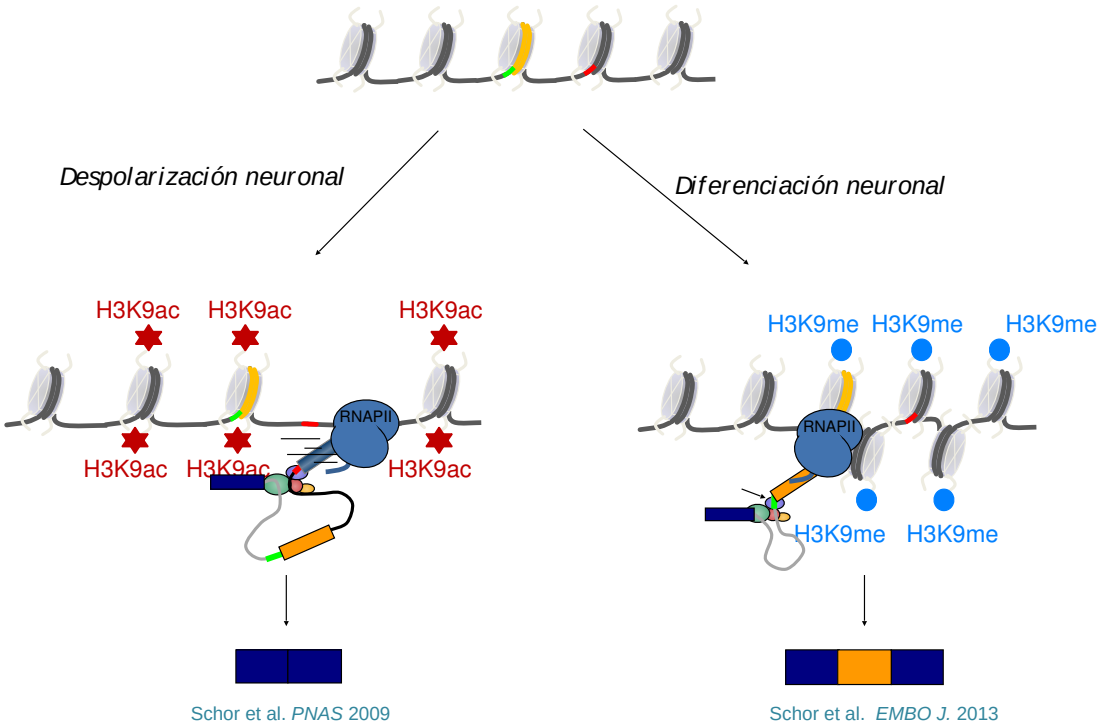

Fig. 5.1: Cromatina alternativa - *splicing* alternativo. El modelo muestra que con la despolarización neuronal aumentan los niveles de H3K9ac intragénicos en el gen NCAM mientras que durante la diferenciación neuronal aumentan los niveles de H3K9me2. Los distintos niveles de marcas en la cromatina correlacionan con distintos patrones de *splicing* alternativo. Mientras que la acetilación correlaciona con exclusión del E18, la metilación en el mismo residuo correlaciona con mayor inclusión del E18 en el mRNA.

tin K9 modifications) y que sus niveles se incrementan considerablemente durante la diferenciación *in vitro* de células madre embrionarias de ratón tanto así como en tejidos adultos como el hígado o el cerebro [149]. Dichos *LOCKs* suelen incluir muchos genes y se correlacionan negativamente con la expresión génica. Por otra parte, un trabajo más reciente evalúa los cambios en H3K9me2 durante la diferenciación de células madre embrionarias a neuronas mostrando que la cantidad total y la cobertura del genoma con esta marca represiva no aumenta dramáticamente en la diferenciación de forma global, pero sí se incrementa significativamente en ciertas

regiones específicas [150]. Lo más interesante es que estas áreas locales específicas son principalmente regiones intragénicas y no están asociados con el silenciamiento génico [150]. Este tipo de regulación sugiere un rol clave de las marcas cromatínicas represivas en pasos de la expresión génica posteriores a la iniciación de la transcripción, tal como el procesamiento de los mRNAs.

5.2. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de G9a durante la diferenciación neuronal

Las modificaciones intragénicas de histonas controlan el *splicing* alternativo, tanto a través de la modulación de la tasa de elongación de la RNAPII como del reclutamiento de adaptadores y factores de *splicing* al pre-mRNA que está siendo sintetizado. La modulación generada por estos mecanismos, complementarios entre sí, impone el estudio de la regulación de enzimas responsables de "escribir" las marcas específicas de las histonas que regulan el *splicing* alternativo. Es este estudio elegimos a G9a porque, además de su papel fundamental en la regulación de los programas de expresión génica desencadenados por la diferenciación celular, se demostró que la marca de silenciamiento H3K9me2 contribuye fundamentalmente a distintas decisiones de *splicing* alternativo [131, 140].

El grupo de Juan Valcárcel estableció recientemente una red de interacción funcional de proteínas cuya expresión afecta el *splicing* alternativo donde la mayoría de los nodos están ocupadas por reguladores de *splicing* conocidos [151]. Curiosamente, y a pesar de que la mayoría de los factores moduladores de la cromatina aparecen periféricamente en la red, G9a y SUV39H1, la enzima responsable de la marca H3K9me3, se localizan en el centro con fuertes conexiones con componentes principales del *spliceosoma* sugiriendo mecanismos cruzados entre su función de metiltransferasas y la regulación del *splicing* alternativo (Figura 5.2).

En este trabajo demostramos que G9a es necesaria para la diferenciación neuronal de las células N2a en cultivo, y que esto correlaciona con altos niveles globales de H3K9me2 en células diferenciadas. En consonancia, se había informado anterior-

mente que G9a afecta a una variedad de vías de diferenciación celular [108, 109, 111], además de sus implicaciones en el desarrollo de tejidos neuronales [120, 122, 123]. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la regulación de G9a se lleva a cabo a nivel del *splicing* alternativo por un *loop* de retroalimentación positiva. Más aún, observamos que la inclusión del E10 de G9a aumenta durante la diferenciación neuronal (Figura 4.3) y probamos que la isoforma E10+ de G9a favorece la inclusión del E10 en el mRNA maduro y es necesaria para una completa diferenciación de las neuronas en cultivo (Figuras 4.7 y 4.19 B). Los resultados sugieren que este *loop* positivo no solo es parte del programa de diferenciación neuronal, sino que podría afectar la diferenciación de distintos tipos celulares ya que el efecto sobre la inclusión E10 no se limita al desarrollo de las neuronas ([138] y resultados no mostrados del laboratorio de la Dra. Srebrow con diferenciación de células mamarias en cultivo).

Múltiples experimentos independientes demuestran que la actividad de metiltransferasa de histonas de G9a regula el *splicing* alternativo de su propio pre-mRNA: el aumento en la inclusión del E10 dependiente de la diferenciación se suprime por el tratamiento con el inhibidor de G9a BIX (Figura 4.19 A), por los fármacos que promueven la de-metilación de H3K9 como 5AC y TSA (Figura 4.16), y mediante la mutación del sitio catalítico de G9a (Figuras 4.21). Todos estos datos son consistentes con los niveles más altos de H3K9me2 observados en el gen G9a en neuronas diferenciadas (Figura 4.17). Es importante señalar que el aumento de H3K9me2 en el gen de G9a se muestra relativizado a los nivles totales de H3, lo que indica que la diferenciación no se limita a aumentar la densidad de nucleosomas en la región, sino que cambia la calidad de sus marcas en histonas.

En cuanto al mecanismo por el cual la actividad de G9a regula su propio *splicing* alternativo, una inferencia obvia sería un *loop* de retroalimentación positiva en el que la inclusión del E10 regulara positivamente la actividad enzimática de G9a. Sin embargo, demostramos aquí que la inclusión del E10 no afecta la actividad de la enzima *in vivo* (Figura 4.9). En cambio, la naturaleza intrínsecamente desestructurada del péptido codificado por el E10, característico de la mayoría de los segmentos de proteínas codificados por exones alternativos [152], puede contribuir a una exposición

mayor de la NLS vecina (Figura 4.10) lo que sugiere que la inclusión del E10 promueve la localización nuclear de G9a. Esta predicción se confirmó indirectamente en los experimentos mostrados en la Figura 4.11 y directamente mediante la evaluación de la localización de las isoformas de G9a etiquetadas con flag, que contienen o que carecen del E10, transitoriamente expresadas en células HeLa y N2a (Figura 4.15). Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que el polipéptido recombinante sobreexpresado de G9a no entra solo al núcleo, sino conformando complejos de múltiples subunidades que contienen además a GLP y otras moléculas de G9a endógenas que pueden incluir o excluir el segmento codificado por el E10. Esta idea se ve reforzada por otra evidencia que muestra que la mutante de G9a que no puede interaccionar con GLP es más defectuosa en la promoción de la inclusión del E10 (Figura 4.21). En este contexto, es previsible que la sobreexpresión de la isoforma E10+ de G9a cambie el equilibrio aumentando el porcentaje de células que muestran una localización de G9a exclusivamente nuclear.

La observación de que G9a está presente no sólo en el núcleo, sino también en el citoplasma, puede explicar que G9a metile diversas moléculas no nucleares, como se ha demostrado en distintos análisis de interacción. De hecho, se han identificado más de 500 *targets* previstos de G9a y GLP, de los cuales más del 50 % no tienen localización nuclear [153].

Durante la preparación de este trabajo, un estudio funcional de las isoformas de G9a tanto así como de las diferentes isoformas de la metiltransferasa de histonas en heterocromatina SUV39H2 fue publicado [134].

Los autores encontraron que la inclusión del exón 3 alternativo de SUV39H2 es clave para la sublocalización nuclear de la proteína y su actividad catalítica. Este hallazgo no resultó sorprendente puesto que la exclusión en el mRNA de dicho exón alternativo provoca una proteína con aproximadamente 200 aminoácidos menos ubicados en el dominio SET de la proteína, responsable de su actividad catalítica. En cuanto a G9a, los autores analizan que el patrón de *splicing* alternativo de su mRNA se encuentra finamente regulado en distintos tejidos de ratón y realizan un estudio de los factores de *splicing* involucrados en la regulación de estos cambios. En este

trabajo, por estudios de *western blot* revelan la presencia de las dos isoformas de G9a. En cuanto a la funcionalidad de la inclusión del E10, de manera similar a nuestros resultados obtenidos *in vivo* con el reportero de metilación por FRET, los autores no ven cambios en la actividad catalítica de G9a medidos *in vitro*. A diferencia de nuestros hallazgos, los autores no informan diferencias en la localización subcelular de las isoformas E10+ y E10- de G9a. Lo analizan en células HeLa por sobreexpresión de las isoformas y posterior inmunofluorescencia o fraccionamiento subcelular seguidos por *western blot*. En cuanto a la inmunofluorescencia, no es posible hacer un análisis diferente puesto que los autores muestran en la publicación una única imagen correspondiente a un único núcleo celular y determinan entonces que ambas isoformas de G9a son exclusivamente nucleares. Sorprendentemente, cuando realizan el fraccionamiento subcelular y revelan la presencia de las isoformas de G9a sobreexpresadas, en la imagen del *western blot*, se visualiza una gran banda de G9a tanto E10+ como E10- presente en la calle correspondiente al citosol celular. Los autores no hacen ninguna mención a la presencia de G9a en el citoplasma. Sus observaciones los llevan a concluir que, dado que los niveles de inclusión del E10 varían en los diferentes tipos celulares analizados, el splicing alternativo del E10 debe regular propiedades de G9a diferentes a su actividad de metiltransferasa o a su localización subcelular. Por el contrario, nosotros analizamos la localización de G9a durante la diferenciación neuronal de células N2a en cultivo y observamos una mayor concentración nuclear en las neuronas maduras. Al sobreexpresar las dos isoformas en células HeLa, si bien encontramos que en la mayoría de las células la localización de G9a era exclusivamente nuclear, se visualizaron células con un patrón de localización distinto en el cual también detectamos G9a en el citoplasma. Al cuantificar los porcentajes de células con distintos patrones de localización, pudimos concluir que la presencia de la región codificada por el E10 favorece la entrada al núcleo de la proteína. Estos resultados nos permitieron explicar las observaciones previas y concluir que si bien el E10 no altera la actividad enzimática de G9a, al promover su localización nuclear favorece un aumento en los niveles de H3K9me2 puesto que en el núcleo es dónde ocurre la metilación de histonas.

En conclusión, nuestros resultados revelan una retroalimentación positiva en la que la inclusión del E10 de G9a aumenta durante la diferenciación neuronal y favorece la localización nuclear de la proteína, posteriormente promoviendo una mayor inclusión del E10 (Figura 5.3). Proponemos que G9a desencadena un *loop* de regulación positiva que ayuda a mantener el programa de expresión génica y refuerza el compromiso celular a la diferenciación neuronal.

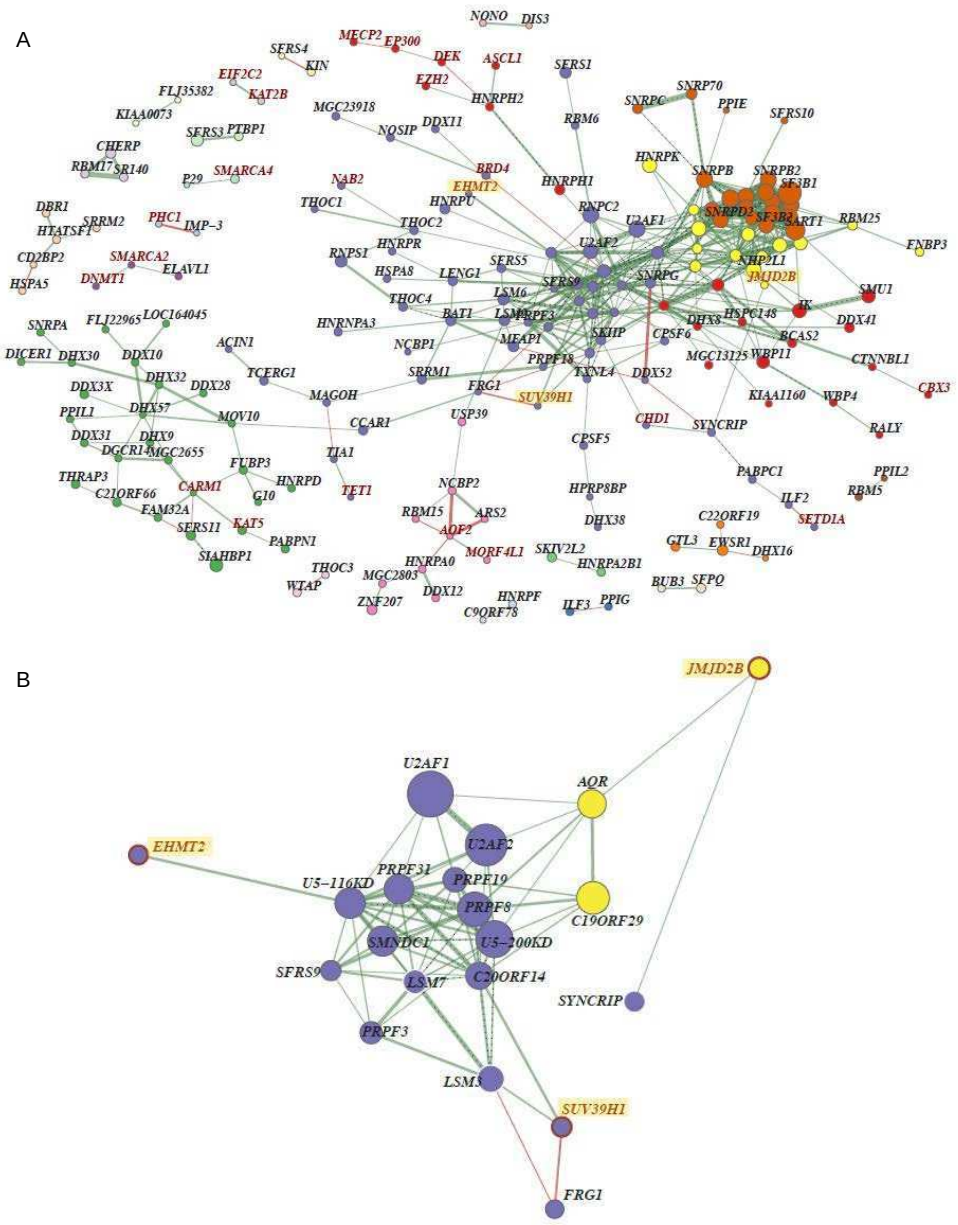

Fig. 5.2: Posición de G9a (EHMT2) y SUV39H1 en una red de interacciones funcionales del *splicing* (tomado de [151] Las conexiones entre los factores indican la regulación de un amplio conjunto de eventos de *splicing* alternativo. Las interacciones funcionales positivas y negativas están representados por bordes verdes y rojos, respectivamente. El espesor del borde indica la intensidad de la interacción funcional, mientras que el tamaño dle nodo es proporcional al impacto global del factor en la regulación del *splicing* alternativo. Los factores implicados en la modificación de la estructura de la cromatina se muestran en rojo. En (A) se muestra la red completa, mientras que en (B) se observa a mayor aumento la posición de G9a.

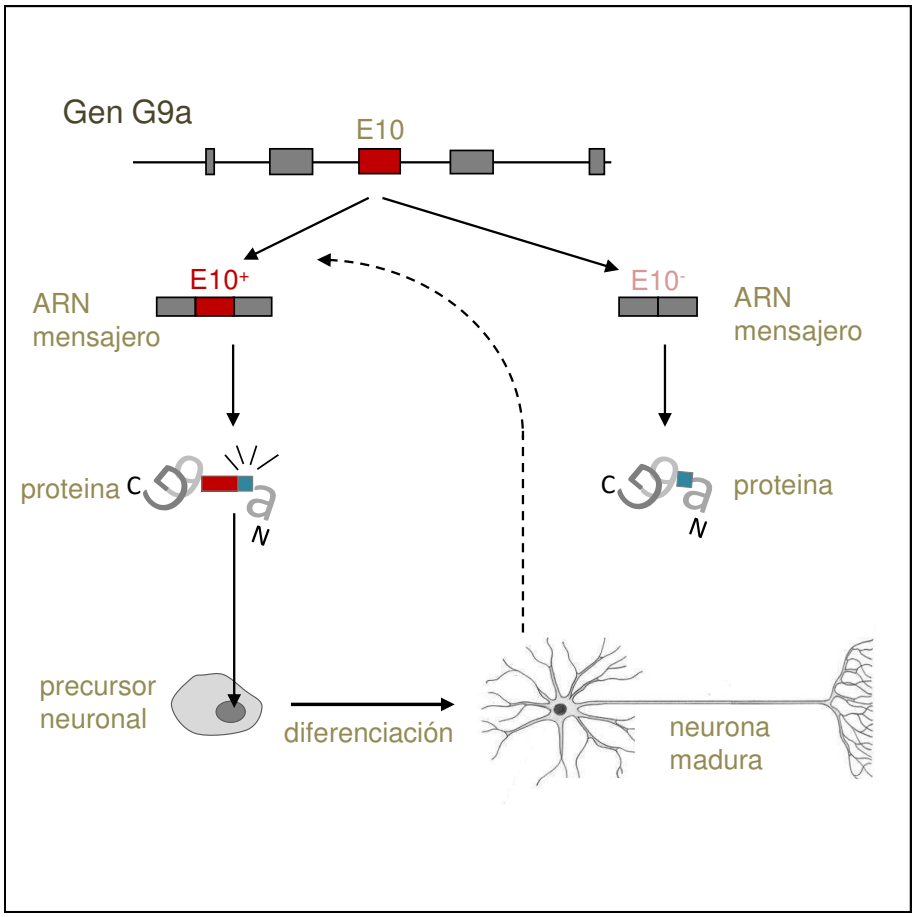

Fig. 5.3: El *splicing* alternativo de G9a regula la diferenciación neuronal. El modelo muestra que G9a es necesaria para la diferenciación neuronal y que la inclusión de su E10 aumenta en neuronas maduras. Aunque el segmento codificado por el E10 no afecta a la actividad catalítica de G9a, aumenta la localización nuclear de la proteína y se requiere de la expresión de la isoforma E10+ de G9a para una completa diferenciación de las neuronas. Mediante el control de su propio *splicing* alternativo, G9a promueve la diferenciación de las neuronas y crea un *loop* de retroalimentación positiva que refuerza el compromiso a la diferenciación celular.

6. CONCLUSIONES

6.1. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal

- La inclusión del E18 de NCAM aumenta durante la diferenciación neuronal de células N2a en cultivo
- La estructura de la cromatina regula los patrones de *splicing* alternativo de NCAM durante la diferenciación neuronal tanto de la línea celular N2a como P19
- La metilación del DNA intragénico en NCAM no se modifica con la diferenciación neuronal de células en cultivo
- Los niveles intragénicos de la marca represiva H3K9me2 aumentan en NCAM durante la diferenciación neuronal, mientras que se mantienen similares en una región intergénica
- El aumento en los niveles de H3K9me2 con la diferenciación neuronal se revierte con el tratamiento de las células con agentes de causan una hiperacetilación de histonas

6.2. Regulación epigenética del *splicing* alternativo de G9a durante la diferenciación neuronal

- G9a es necesaria para la diferenciación neuronal de células N2a en cultivo
- La inclusión del E10 de G9a está regulada positivamente durante la diferenciación de células N2a

- La inclusión del E10 de G9a con la diferenciación neuronal también aumentó en otra línea celular en cultivo (P19)
- La inclusión del E10 de G9a aumenta en el cerebro de ratones durante el desarrollo
- Se requiere la inclusión del E10 para una completa diferenciación neuronal de células en cultivo
- Los niveles globales de H3K9me2 aumentan durante la diferenciación de células N2a en cultivo
- La inclusión del E10 en G9a no modifica la actividad enzimática de la proteína, y sin embargo promueve un aumento de los niveles globales de H3K9me2
- La inclusión del E10 de G9a promueve la localización nuclear de la proteína
- La estructura desordenada del segmento codificado por el E10 de G9a podría aumentar la exposición de la NLS vecina
- El *splicing* alternativo de G9a está regulado por la estructura de la cromatina intergénica
- Los niveles intergénicos de la marca represiva H3K9me2 aumentan en el gen de G9a con la diferenciación neuronal de células N2a
- G9a regula su propio *splicing* alternativo por un *loop* de retroalimentación positiva

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivos celulares y tratamientos

7.1.1. Cultivos celulares y diferenciación neuronal

Las células N2a (ATCC #CCL-131) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 4,5 g/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomicina). Ocasionalmente, para utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agrega también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/L. Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a 37°C unos dos o tres minutos, se detiene la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaquea entre 1/5 y 1/20 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 12 ml de volumen final con medio completo. Las células se congelan en nitrógeno líquido y se descongelan siguiendo protocolos convencionales. Para inducir la diferenciación neuronal con el protocolo de baja concentración de suero y DMSO, las células N2a son lavadas con PBS y e incubadas por 4 a 8 días en medio DMEM suplementado con 0,2 % (v/v) de suero fetal bovino, 4,5 g/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomicina) y 2 % de DMSO. En el protocolo de inducción de la diferenciación neuronal con AR, las células N2a se lavan con PBS y se incuban por 1 a 3 días en medio DMEM suplementado con 0,2 % de suero fetal bovino, 4,5 g/L glucosa, antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomicina) y una concentración final de AR de 1 µM. Para la mayoría de los experimentos se plaquean entre 200.000 y 400.000 células por cada pocillo de una placa de 6 pocillos aunque estos números pueden varias según condiciones especiales.

Las células HeLa (ATCC #CCL-2) son mantenidas de la misma manera pero en

medio carente de piruvato de sodio.

Las células P19 (ATCC #CRL-1825) son mantenidas en medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 110 mg/L piruvato de sodio y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomicina). Para inducir la diferenciación neuronal, las células son estimuladas para formar cuerpos embrionarios en placas de bacterias por el agregado de AR 1 µM en una densidad de 5 x 105 células por ml. Luego de 2 días, los cuerpos embrionarios son removidos y desagregados cuidadosamente con micropipeta. Se vuelven a plaquear en placas adherentes previamente poli-lisinadas en medio DMEM suplementado con 10 % suero fetal bovino sin AR. Después de otros 2 días, el medio es reemplazado por un medio de cultivo adecuado para permitir la maduración neuronal. En este paso, utilizamos OPTIMEM suplementado con N2 y B27. Lás células continúan el proceso de diferenciación y son viables hasta aproximadamente 2 semanas luego de ser plaqueadas.

7.1.2. Tratamientos celulares con inhibidores farmacológicos

La droga TSA (Sigma) fue disuelta en etanol absoluto para preparar una solución madre de 5mg/ml. Esta solución fue agregada directamente al medio de cultivo hasta alcanzar las concentraciones indicadas. Para el control se utilizó etanol absoluto como vehículo y se agregó al medio de cultivo en la misma concentración que la droga. El tratamiento duró 16 horas en todos los casos. La 5aC (Sigma) fue disuelta en 50 % (v/v) de ácido acético en agua hasta una concentración de 20 mM. Esta preparación fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar las concentraciones indicadas. Como vehículo se utilizó la misma solución de 50 % (v/v) de ácido acético en agua sin presencia de la droga. El tratamiento duró 3 días en todos los casos. Se disolvió BIX en agua y se utilizó en las concentraciones indicadas agregándose al medio de cultivo directamente. Como vehículo utilizamos agua. El tratamiento duró 3 días en todos los casos.

7.1.3. Transfección transitoria de células

Las células N2a y HeLa fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con 6 ml de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2 mg de DNA total o 20 µg de siRNA. Resumidamente, el protocolo de transfección con lipofectamina que utilizamos es el siguiente (se ejemplifica utilizando las cantidades de los reactivos adecuadas para pocillos de 35mm y transfecciones de DNA):

- Se colocan 2 µg totales de DNA plasmídico en un tubo eppendorf que contiene 250 µl de Opti-MEM (Invitrogen)
- Se colocan 6 µl de lipofectamina 2000 en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 250 µl de Opti-MEM y se incuba por 5 min
- Se transfiere el contenido del tubo eppendorf al tubo con lipofectamina 2000 y se mezcla vigorosamente. Se incuba 20 minutos para que se formen los complejos entre el policatión y el DNA
- Se lavan las células con PBS para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiban la transfección, y se dejan en 2 ml de Opti-MEM
- Se agregan por goteo 500 µl de los complejos en cada pocillo. Se dejan las células en la estufa por el tiempo indicado en cada experimento. En los casos en que se realiza un cambio de medio luego de la transfección, para inducir la diferenciación por ejemplo, se deja el Opti-MEM al menos 5 hs post-transfección antes del cambio de medio

7.2. Animales

Ratones de la cepa C57BL/6J obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires) fueron utilizados para todos los experimentos. Los animales fueron mantenidos en un ciclo horario de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con las luces encendidas a las 6 a.m. El alimento y el agua para bebida fueron administrados *ad libitum*. Los experimentos

fueron realizados de acuerdo a las regulaciones locales y a la *Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* del *National Institutes of Health* (NIH, publicación 80-23/96) y fueron previamente aprobados por el Comité de Ética (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal y para reducir el número de animales utilizados. Los ratones fueron previamente anestesiados con Avertin® 2 % mediante inyección intraperitoneal y luego sacrificados por dislocación cervical en los días posnatales (DPN) indicados: DPN-7, DPN-25 and DPN-180. El cerebro entero fue extraído, rápidamente congelado en nitrógeno líquido y luego almacenado a -80°C hasta su uso.

7.3. Vectores utilizados y preparación de plásmidos

7.3.1. Vectores utilizados

El plásmido de expresión pcDNA3.1 que expresa la secuencia codificante de G9a corta de ratón fue cedido por el Dr. Shinkai de la Universidad de Kyoto, Japón. Verificamos que correspondía a la isoforma de exclusión del E10. Utilizando dicho vector como molde logramos clonar la isoforma de inclusión del E10 mediante digestiones parciales y ligaciones.

Por otra parte, el plásmido pCAGpure que expresa la secuencia codificante de G9a larga de ratón fue cedido por el Dr. Seo del College of Nature Science de Korea del Sur. A su vez, el mismo autor nos envió el vector correspondiente a la secuencia codificante de G9a larga de ratón con una mutación en el nucleótido 1115 codificante para un aminoácido del sitio activo. Este vector también en el esqueleto pCAGpure expresa una isoforma de G9a catalíticamente inactiva. Cuando nombramos a los vectores G9a E10+ y G9a E10- hacemos referencia a los plásmidos en esqueleto pcDNA3.1 clonados, mientras que cuando nombramos a G9a E10+ salvaje y mutante nos referimos a los plásmidos pCAGpure.

Además, para este trabajo contamos con plásmidos de expresión de G9a humanos

cedidos por el equipo de trabajo del Dr. Mario Rossi y Juliana H. Enriqué Steinberg de CONICET. En este caso, en que el esqueleto de los vectores corresponde a pcDNA3.1, utilizaron la isoforma de inclusión del E10 humana y realizaron distintas mutaciones para obtener la mutante análoga a la catalíticamente inactiva isoforma ya mencionada de ratón y otra mutante con una mutación puntual adicional en la región de interacción con GLP.

Por último, utilizamos un plásmido reportero de metilación en los ensayos de FRET desarrollado por el grupo de investigación de la Dra. Alice Ting y distribuido por addgene (*pcDNA3-K9 histone methylation reporter,* #22866). El esqueleto es pcDNA3 y expresa un biosensor que, dependiendo del grado de metilación, cambia los niveles de FRET entre las proteínas fluorescentes codificadas en el mismo vector.

7.3.2. Preparación de plásmidos en pequeña escala y gran escala

Se utiliza una miniprep para producir una pequeña cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de unos pocos mililitros, con el objetivo de chequear mediante mapeo de restricción y secuenciación si los clonados realizados generaron el plásmido de interés y cuál es la isoforma clonada en caso de existencia de distintas isoformas por *splicing* alternativo. Cuando la aplicación subsiguiente demandaba una mayor calidad del plásmido, como por ejemplo, la transfección de células en cultivo, se utilizó un kit de Invitrogen (*PureLink HiPure Plasmid Miniprep*). En algunos casos utilizamos las columnas de intercambio aniónico de *Qiagen* que permiten obtener entre 100 y 500 µg de DNA plasmídico. 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.

7.3.3. Cuantificación de plásmidos

Para conocer la concentración de DNA o RNA 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 fragmentos de DNA 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*).

7.3.4. Transformación de bacterias competentes

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 (10^7-10^9 UFC/mg DNA).

7.4. Extracción de RNA, RT y PCR

7.4.1. Extracción de RNA

Para obtener RNA de células en cultivo, se utiliza el reactivo TRIzol (Invitrogen) o TRI Reagent (MRC), y se siguen los protocolos provistos por cada fabricante. Con este protocolo se pueden obtener aproximadamente entre 1 y 5 µg de RNA a partir de células cultivadas en un pocillo de 35 mm de diámetro. En el momento de levantar las células, para dar por finalizado cualquier experimento, se descarta el medio y se agregan 500 µl de TRIzol o Tri Reagent por cada pocillo y luego se continúan los pasos según el protocolo.

7.4.2. Retrotranscripción

Para obtener DNA copia a partir de RNA se realizan los pasos detallados a continuación tomados del protocolo provisto por el fabricante de la enzima transcriptasa reversa (MMLV-RT, Invitrogen) con leves modificaciones. Se desnaturalizan 5 µl de RNA colocándolo 5 min a 65°C. Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la re-naturalización. Se agregan 15 µl de mezcla de reacción a cada tubo. La mezcla de reacción está compuesta de la siguiente manera:

- 4 µl de buffer de RT 5X
- 2 µl de DTT 100 mM
- 0,25 µl de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl
- 0,5 µl de oligo dT 100 µM (oligo de 12-18 nucleótidos)
- 1,5 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl
- H2O c.s.p. 15 µl

Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo-dT pueda aparearse a las colas de poli-A de RNA mensajeros poli-adenilados. Se incuba 1 h a 35°C para que ocurra la reacción. Se detiene la reacción incubando 5 min a 95°C.

7.4.3. PCR semi-cuantitativa

Para las PCRs convencionales se utilizan 2 µl de reacción de RT que contiene el cDNA que servirá de molde para la reacción de PCR. A cada tubo de cDNA se le agregan 48 µl de mix que estará compuesta de la siguiente manera:

- 5 µl de buffer de PCR sin $MgCl_2$
- entre 1,5 y 3 µl de $MgCl_2$ 25 mM

- 2 µl de cebador *forward* 20 µM
- 2 µl de cebador *reverse* 20 µM
- 1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 0,3 µl de Taq DNA polimerasa
- 0,05 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol)
- H2O c.s.p. 48 µl

Al finalizar la reacción de PCR radiactiva, se procede a separar los productos mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida 6 % (v/v) nativo. Luego de la corrida, se seca el gel sobre un papel *Whatmann* 3 MM y se lo expone a una película con orientadores para generar una auto-radiografía. De esta manera, se puede observar la o las bandas correspondientes al producto de PCR. Para cuantificar estos productos, se orienta la película sobre el gel utilizando los orientadores, se recortan las bandas correspondientes a los productos de interés y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador de centelleo líquido. Debido a que utilizamos el isótopo ^{32}P, que es un emisor beta de alta energía, podemos evitar el uso de líquido de centelleo para amplificar la señal, y contamos la radiactividad en seco, por el método de Cherenkov.

7.4.4. Evaluación de los patrones de *splicing* alternativo por RT-PCR

Con el objetivo de evaluar el *splicing* del RNA mensajero se realiza una reacción de transcipción reversa para producir DNA copia a partir del RNA, que servirá luego como molde de una reacción en cadena de la polimerasa en la cual se amplificará el fragmento de interés utilizando cebadores específicos. Como producto se obtienen bandas correspondientes a la presencia de la isoforma que incluye y a la que excluye un determinado evento de *splicing* alternativo (Figura 7.1). Los resultados se informan como relación inclusión/exclusión, y en los casos indicados además se relativiza

la relación del experimento a la del tratamiento control que toma, entonces, el valor 1.

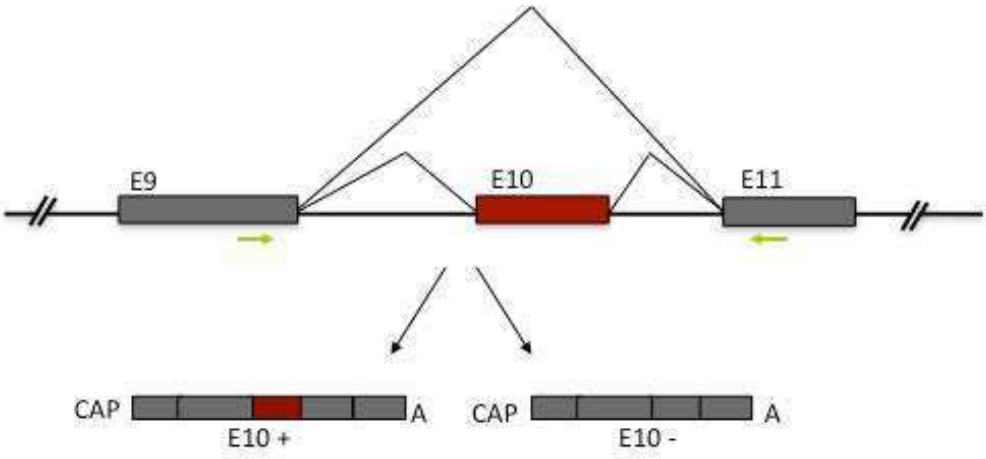

Fig. 7.1: Evaluación de los patrones de *splicing* alternativo de G9a. Esquema de las estrategias de RT-PCR radiactiva semi-cuantitativa utilizadas para determinar las relaciones de inclusión/exclusión de eventos de *splicing* alternativo

7.4.5. PCR en tiempo real

Para evaluar los niveles de RNA mensajero expresados en las distintas condiciones, se realiza, luego de la retrotranscripción, una reacción de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. Paralelamente a las muestras se prepara una curva de calibración, obtenida por ocho diluciones sucesivas al medio a partir de una dilución de una mezcla de todas las muestras a medir. Cada una de las muestras se diluye entre 1:10 y 1:50 para que entre en el rango medio de la curva de calibración. De estas diluciones se utilizan 5 µl para la reacción, a los cuales se agregan 20 µl de la mezcla de reacción. La mezcla se compone de la siguiente forma (para cada pocillo):

- 2,5 µl de buffer de PCR sin $MgCl_2$
- entre 2 y 4 µl de $MgCl_2$ 50 mM

- 1 µl de cebador *forward* 20 µM
- 1 µl de cabador *reverse* 20 µM
- 0,5 µl de dNTPs 10 mM
- 0,15 µl de Taq polimerasa 5 U/µl
- 0,025 µl de SYBR green (Roche) en dilución 1:30 en DMSO
- H2O c.s.p. 20 µl

7.5. Técnicas de inmunofluorescencia y anticuerpos utilizados

Se realizaron inmunofluorescencias indirectas sobre células fijadas utilizando distintos anticuerpos. Como anticuerpos primarios se utilizaron anti-G9a de ratón (Sigma), anti-G9a de humano (Genetex), anti-G9a de humano y ratón (Cell Signaling) y anti-Flag (Millipore). Como anticuerpos secundarios se utilizaron el anticuerpo Alexa 488 contra IgG de ratón o de conejo para el canal verde, y el anticuerpo Alexa 647 contra IgG de conejo o ratón para el canal rojo. El protocolo se describe brevemente a continuación:

- Se remueve el medio y se lava una vez con PBS 1X
- Se fija con paraformaldehído 4 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se lava dos veces con PBS 1X
- Se permeabiliza con 0,2 % (v/v) tritón X-100 durante 5 minutos, y se lava dos veces con PBS 1X
- Se bloquea 30 minutos con suero 1 % (v/v) hecho en el animal en el cuál fue generado el anticuerpo secundario (cabra en nuestro caso)
- Se incuba con el anticuerpo primario en solución de bloqueo por 1 hora, y se lava 4 veces con PBS 1X

- Se incuba con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 1 hora, y se lava cuatro veces con PBS 1X
- Se monta el preparado para visualizar en el microscopio

7.6. Western Blot y anticuerpos utilizados

Las muestras proteicas fueron corridas en geles de poliacrilamida 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 % (p/v) leche descremada en TBS más 0,1 % (v/v) tween-20 (TTBS). Posteriormente se agregó la dilución apropiada del anticuerpo primario, en la misma solución de bloqueo y se incubó toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes, acoplados 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). Los anticuerpos utilizados para esta técnica en este trabajo fueron: anti-G9a de humano (Cell Signaling), anti-flag (Millipore), anti-GAPDH (Millipore), anti-H3total (Millipore).

7.7. Ensayos de determinación de modificaciones post-traduccionales de histonas

7.7.1. Inmunoprecipitación nativa de la cromatina (nChIP)

La técnica se conoce como nChIP, por inmunoprecipitación nativa de la cromatina. A diferencia del ChIP tradicional, se omite el paso de generación de enrecruzamientos por medio de la incubación con formaldehído y el sonicado del DNA para generar fragmentos pequeños. Todos esto es reemplazado por una incubación con nucleasa micrococal (MNasa), que origina mono-nucleosomas que contiene fragmen-

tos de DNA de 147 pares de bases. En la preparación de núcleos se utilizan 2 placas de 14 centrímetros semi-confluentes por cada tratamiento, y luego de lavar con PBS se agregan 1,5 ml de tripsina 0,25 % (p/v) a cada placa para levantar las células. A continuación se agrega medio completo para inactivar la tripsina y se centrifugan las células para descartar el sobrenadante y poder congelar el pellet celular a -80ºC. A continuación se detallan los pasos siguientes:

- Se resuspenden las células de cada tubo en 2 ml de buffer I (0,3 M sacarosa, 60 mM Kcl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl2, 0,1 mM EGTA, 15 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM DTT, inhibidor de proteasas de Roche)

- Se agregan 2 ml de buffer II (buffer I + 0,4 % (v/v) NP40) a cada tubo y se incuba 10 minutos en hielo, mezclando durante la incubación

- Se van preparando por cada placa 2 tubos cónicos de 15 ml conteniendo 8 ml de buffer III (buffer I con 1,2 M sacarosa)

- Llegando a los 10 minutos, se depositan cuidadosamente 2 ml de cada suspensión de células sobre el colchón de buffer III, se tapa el tubo y se centriguga inmediatamente por 30 minutos a máxima velocidad (4ºC)

- Se descarta el sobrenadante y se resuspenden los núcleos en 1 ml de buffer de MNasa (0,32 M sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, inhibidor de proteasas) por cada 2 ml de buffer I iniciales. La integridad de los núcleos puede ser evaluada por observación al microscopio

- Se agregan 50 unidades de nucleasa micrococal (MNasa - Amersham, solución de trabajo 10 U/µl en 50 % (v/v) glicerol) a cada tubo y se incuba a 37°C por 10 minutos. La reacción se detiene por el agregado de 20 µl de 20 mM EDTA pH 8, mezclado suave e incubación en hielo

- Se centrifugan los tubos por 10' a 10000 g (4°C), pasando el sobrenadante a un eppendorf nuevo

- Se cuantifica la cantidad de DNA en cada muestra por fluorometría utilizando Quant-iT dsDNA BR (Invitrogen)

- Para las inmunoprecipitaciones se utiliza una cantidad de cromatina que contenga entre 10 y 15 µg de DNA. El volumen se lleva a 1 ml final con buffer de incubación (50 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; inhibidor de proteasas), se agrega el anticuerpo y se dejan incubando toda la noche en rotación en heladera

- Se agrega 50 µl de proteína A/G acoplada a agarosa, se deja rotando a 4°C por otras 4 horas y se centrifuga 3 minutos a 1500 g transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo, constituyendo la fracción no unida

- Se resuspenden las bolitas de agarosa en 1 ml de buffer de lavado A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 75 mM NaCl) frío y se incuba en continua rotación por 3 minutos a temperatura ambiente

- Se centrifuga 3 minutos a 1500 g para decantar la agarosa y se descarta el sobrenadante

- Se repite el procedimiento con buffer de lavado B (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 125 mM NaCl) y buffer de lavado C (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 175 mM NaCl)

- Se eluye la cromatina resuspendiendo las bolitas en 250 ml de buffer de elusion e incubando 30 minutos con rotación a temperatura ambiente. Se centrifuga 3 minutos a 250 g y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo constituyendo la fracción unida

- Se purifica el AND de las fracciones unidas y no unidas con el kit QIAquick PCR purification Kit de QIAgen y las muestras están listas para ser analizadas por PCR en tiempo real

Como anticuerpos primarios se utilizaron para esta técnica: 10 µg de anti-H3K9me2 (Upstate 07-441), 10 µg de anti-H3K27me3 (Upstate 07-449) e IgG de conejo control (Santa Cruz Biotechnology sc-10801).

7.7.2. Western blot contra H3K9me2

Para evaluar el nivel de modificaciones post-traduccionales de histonas a nivel global, utilizamos la técnica de western blot en las condiciones mencionadas en la sección anterior utilizando el anticuerpo anti-H3K9me2 (Upstate 07-441). Previamente a la corrida del gel realizamos un extracción de núcleos y citoplasmas para analizar las distintas fracciones celulares por separado. Los pasos para el fraccionamiento subcelular se detallan a continuación:

- Crecer células en placa de 15 cm, aspirar medio y lavar las células con PBS frío
- Agregar 7-10ml de PBS frío, levantar con *scraper* y pasar a un tubo falcon de 15 ml
- Centrifugar 5 minutos a 1000 g a 4°C y resuspender en 1ml de PBS
- Centrifugar 3 minutos a 1000 g a 4°C y aspirar el PBS
- Resuspender en 200 ul de Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.34 M, sacarosa, 10 % (p/v) glicerol, 1 mM DTT, Inhibidores de proteasas)
- Agregar Tritón X-100 hasta una concentración final de 0.1 % (v/v) e incubar en hielo 8 minutos
- Centrifugar 5 minutos a 1300 g. Separar el sobrenadante (S1 - Citoplasma) del pellet (P1 - Núcleos)

7.8. FRET

Las células HeLa se cotransfectaron con plásmidos de expresión de las isoformas de G9a, y un reportero de actividad de metiltransferasa (Lin et al., 2004). Las células co-transfectadas con el reportero de FRET y un vector vacío se utilizaron como control para la estimación del FRET basal. La expresión de las isoformas se evaluó por inmunofluorescencia. Las imágenes se recogieron en un microscopio confocal Olympus FV1000 invertido, utilizando un aumento 100X. En cada estado, se analizaron entre 29 y 41 células, y la relación media de FRET fue calculada para las células que expresan una isoforma de G9a. Se indica el cambio relativo de FRET con respecto a la célula control (FRET cambio Ratio = (R Isoforma FRET - R CONTROL DE FRET) / R CONTROL DE FRET). Se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar si las diferentes poblaciones fueron estadísticamente diferentes.

7.9. Oligonucleótidos y siRNAs utilizados

7.9.1. PCR semicuantitativa

***Splicing* del E18 de NCAM**

F: ATGGCAGCCCCACCGCAG R: TTTTGTTTGTGTGGCATCGTTG

***Splicing* del E10 de G9a**

F:GAAGAAATGGCGGAAAGACAGC R: CTCTCCATCCACACTCTCTGTG

***Splicing* del minigen de G9a**

F: GGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCG R: GCGAGCTTAGTGATACTTGTGGGCC

7.9.2. PCR en tiempo real

G9a total

F : CAAGATTGACCGCATCAGCG R: AAGCGGTGAGCTACACGAAA

HSPCB

F: CCAAAAAGCACCTGGAGATCA R: TGTCGGCCTCAGCCTTCT

para nChIP en NCAM

Región intergénica

F: GCAGCAGAGCATAGCAGAGG R: CAGAATGTAGTCCCAGGCAGTG

Promotor

F: CTCGGCAGTGGCTGGCAAG R: GACGGCGGCGGAGCAATG

Intrón 14

F: AATGTGAGTGCCAGCGAGAG R: GGGTGGTTTGTGGGAATGTTC

Exón 16

F: AACCACAGACCACTTCTTTCCC R: GACAATGAGGATGCCCACAATG

Intrón 16

F: TTCTTCCCACCAGCAGCATC R: TCTCACTCCATCCTTTCTCAGC

Exón 17

F: GAAGCACACAGAGCCCAACG R: GCGACAATCCCTCCTACTCCAC

Intrón 17

F: CGTCTCACAGGAACACCAATC R: AGCCAGAATGAAGAGGACCAG

Exón 18

F: TGCCTTCTGTCACCACCGTCAC R: GGTCTCACTGGTAGGGCTGTT-CTG

para nChIP en G9a

Promotor

F:GGTGTCTTCCGTGAGTCTCTGTC R: TGTGCCTTTCCCGTTCTGAGC

Exón 3

F:TGAGGAGACCCTTCCCAAG R: GACGGTGACAGTGACAGAG

Exón 7

F:CCTGGAGGAGTGGGAGAC R:CACCTTGCTGTCAGAGTCC

Intrón 7

F:GTGCCTCCTTCCTATTGCCTGTC R: ATCCTACGCCTCTGCCTCTGG

Intrón 9

F:GCATGTTCACTGTGTAGAC R: CCACACCATTCACTCCTG

Exón 10

F:CAGTGAGTACATGGAGGTTC R: CCTGGTGGCTCCCTGTCC

Intrón 10

F:GGGTGGCTGGGCGGAAAG R:TTAGACAGGAAGAGACAGAGATGATGG

Exón 11

F:CTCTGTCTCTTCCTGTCTAAG R:TGATGCGGTCAATCTTGG

Exón 14

F:CACTGACTCTGCCTAATGG R:AACTCACCTCTCAGACTCC

Exón 22

F:GTGTCAATGGTGTGGATGG R:CAGATGGGTGATGTTGCG

Exón 27

F:CAACATCAGCCGATTCATTAACC R:CAATGCGTGGGAACCGTAG

7.9.3. siRNAs

siG9a

Pool de 4 siRNAs contra G9a: siGENOME Mouse Ehmt2 (110147) siRNA - SMARTpool, 5nmol M-053728-00-0005

siE10 de G9a

Sentido: CCCAGUGAGUGGAGCUGCCCAGCGA3

Antisentido: UCGCUGGGCAGCUCCACUCACUGGG3

Bibliografía

[1] M. Azim Surani, Katsuhiko Hayashi, and Petra Hajkova. Genetic and Epigenetic Regulators of Pluripotency. *Cell*, 128(4):747–762, 2007.

[2] Gerald Thiel, Michael Lietz, and Mathias Hohl. How mammalian transcriptional repressors work. *European Journal of Biochemistry*, 271(14):2855–2862, 2004.

[3] Kazuhiro Maeshima, Saera Hihara, and Mikhail Eltsov. Chromatin structure: Does the 30-nm fibre exist in vivo? *Current Opinion in Cell Biology*, 22(3):291–297, 2010.

[4] K Luger, A W Mäder, R K Richmond, D F Sargent, and T J Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature*, 389(6648):251–260, 1997.

[5] G Arents and E N Moudrianakis. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24):11170–11174, 1995.

[6] Alan P. Wolffe and Jeffrey J. Hayes. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Research*, 27(3):711–720, 1999.

[7] Michael S Cosgrove, Jef D Boeke, and Cynthia Wolberger. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature structural & molecular biology*, 11(11):1037–1043, 2004.

[8] M. Garcia-Ramirez, C. Rocchini, and J. Ausio. Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30):17923–17928, 1995.

[9] B M Turner, A J Birley, and J Lavender. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in Drosophila polytene nuclei. *Cell*, 69(2):375–384, 1992.

[10] B D Strahl and C D Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765):41–45, 2000.

[11] Bryan M. Turner. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays*, 22(9):836–845, 2000.

[12] Andrew J Bannister and Tony Kouzarides. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3):381–395, 2011.

[13] T Jenuwein and C D Allis. Translating the histone code. *Science*, 293(5532):1074–1080, 2001.

[14] Judd C. Rice, Scott D. Briggs, Beatrix Ueberheide, Cynthia M. Barber, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, Yoichi Shinkai, and C. David Allis. Histone Methyltransferases Direct Different Degrees of Methylation to Define Distinct Chromatin Domains. *Molecular Cell*, 12(6):1591–1598, 2003.

[15] Ru Cao and Yi Zhang. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics and Development*, 14(2):155–164, 2004.

[16] Cyrus Martin and Yi Zhang. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(11):838–849, 2005.

[17] Jung Shin Lee, Abhijit Shukla, Jessica Schneider, Selene K. Swanson, Michael P. Washburn, Laurence Florens, Sukesh R. Bhaumik, and Ali Shilatifard. Histone Crosstalk between H2B Monoubiquitination and H3 Methylation Mediated by COMPASS. *Cell*, 131(6):1084–1096, 2007.

[18] Wolfgang Fischle, Boo Shan Tseng, Holger L Dormann, Beatrix M Ueberheide, Benjamin a Garcia, Jeffrey Shabanowitz, Donald F Hunt, Hironori Funa-

biki, and C David Allis. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438(7071):1116–1122, 2005.

[19] Michiel Vermeulen, H. Christian Eberl, Filomena Matarese, Hendrik Marks, Sergei Denissov, Falk Butter, Kenneth K. Lee, Jesper V. Olsen, Anthony A. Hyman, Henk G. Stunnenberg, and Matthias Mann. Quantitative Interaction Proteomics and Genome-wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers. *Cell*, 142(6):967–980, 2010.

[20] Tony Kouzarides. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4):693–705, 2007.

[21] Ronen Marmorstein and Raymond C. Trievel. Histone modifying enzymes: Structures, mechanisms, and specificities. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(1):58–68, 2009.

[22] Luciana I. Gómez Acuña, Ana Fiszbein, Mariano Alló, Ignacio E. Schor, and Alberto R. Kornblihtt. Connections between chromatin signatures and splicing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1):77–91, 2013.

[23] Hadas Keren, Galit Lev-Maor, and Gil Ast. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature reviews. Genetics*, 11(5):345–355, 2010.

[24] Timothy W Nilsen and Brenton R Graveley. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463(7280):457–463, 2010.

[25] D L Black. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*, 103(3):367–370, 2000.

[26] Eric T Wang, Rickard Sandberg, Shujun Luo, Irina Khrebtukova, Lu Zhang, Christine Mayr, Stephen F Kingsmore, Gary P Schroth, and Christopher B Burge. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456(7221):470–476, 2008.

[27] Nuno L Barbosa-Morais, Manuel Irimia, Qun Pan, Hui Y Xiong, Serge Gueroussov, Leo J Lee, Valentina Slobodeniuc, Claudia Kutter, Stephen Watt, Recep Colak, TaeHyung Kim, Christine M Misquitta-Ali, Michael D Wilson, Philip M Kim, Duncan T Odom, Brendan J Frey, and Benjamin J Blencowe. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science (New York, NY)*, 338(6114):1587–1593, 2012.

[28] Jonathan D. Ellis, Miriam Barrios-Rodiles, Recep Çolak, Manuel Irimia, TaeHyung Kim, John A. Calarco, Xinchen Wang, Qun Pan, Dave O'Hanlon, Philip M. Kim, Jeffrey L. Wrana, and Benjamin J. Blencowe. Tissue-Specific Alternative Splicing Remodels Protein-Protein Interaction Networks. *Molecular Cell*, 46(6):884–892, 2012.

[29] Alberto R Kornblihtt, Ignacio E Schor, Mariano Alló, Gwendal Dujardin, Ezequiel Petrillo, and Manuel J Muñoz. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(3):153–65, 2013.

[30] J F Caceres and A R Kornblihtt. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*, 18:186–193, 2002.

[31] Nuno André Faustino and Thomas A. Cooper. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & Development*, 17(4):419–437, 2003.

[32] Olga Kelemen, Paolo Convertini, Zhaiyi Zhang, Yuan Wen, Manli Shen, Marina Falaleeva, and Stefan Stamm. Function of alternative splicing. *Gene*, 514(1):1–30, 2013.

[33] Hagen Tilgner, David G. Knowles, Rory Johnson, Carrie A. Davis, Sudipto Chakrabortty, Sarah Djebali, João Curado, Michael Snyder, Thomas R. Gingeras, and Roderic Guigó. Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Research*, 22(9):1616–1625, 2012.

[34] Fernando Carrillo Oesterreich, Lydia Herzel, Korinna Straube, Katja Hujer, Jonathon Howard, and Karla M. Neugebauer. Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell*, 165(2):372–381, 2016.

[35] Shiran Naftelberg, Ignacio E. Schor, Gil Ast, and Alberto R. Kornblihtt. Regulation of Alternative Splicing Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1):165–198, 2015.

[36] Cindy L. Will and Reinhard Lührmann. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7):1–2, 2011.

[37] P Cramer, C G Pesce, F E Baralle, and A R Kornblihtt. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21):11456–11460, 1997.

[38] Alberto R Kornblihtt. Chromatin, transcript elongation and alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*, 13(1):5–7, 2006.

[39] Ming Chih Lai, Bee Heong Teh, and Woan Y. Tarn. A human papillomavirus E2 transcriptional activator: The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17):11832–11841, 1999.

[40] M Monsalve, Z Wu, G Adelmant, P Puigserver, M Fan, and B M Spiegelman. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Molecular cell*, 6(2):307–316, 2000.

[41] Christel Guillouf, Isabelle Gallais, and Françoise Moreau-Gachelin. Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28):19145–19155, 2006.

[42] Manuel de la Mata and Alberto R Kornblihtt. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nature structural & molecular biology*, 13(11):973–980, 2006.

[43] Guadalupe Nogués, Manuel J. Muñoz, and Alberto R. Kornblihtt. Influence of Polymerase II Processivity on Alternative Splicing Depends on Splice Site Strength. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52):52166–52171, 2003.

[44] Natalia Gromak, Gabriele Talotti, Nicholas J Proudfoot, and Franco Pagani. Modulating alternative splicing by cotranscriptional cleavage of nascent intronic RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(2):359–66, 2008.

[45] Manuel De La Mata, Claudio R. Alonso, Sebastián Kadener, Juan P. Fededa, Matías Blaustein, Federico Pelisch, Paula Cramer, David Bentley, and Alberto R. Kornblihtt. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell*, 12(2):525–532, 2003.

[46] Nova Fong, Hyunmin Kim, Yu Zhou, Xiong Ji, Jinsong Qiu, Tassa Saldi, Katrina Diener, Ken Jones, Xiang Dong Fu, and David L. Bentley. Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate. *Genes and Development*, 28(23):2663–2676, 2014.

[47] Ignacio E Schor, Nicolás Rascovan, Federico Pelisch, Mariano Alló, and Alberto R Kornblihtt. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11):4325–4330, 2009.

[48] Hadas Keren-Shaul, Galit Lev-Maor, and Gil Ast. Pre-mRNA Splicing Is a Determinant of Nucleosome Organization. *PLoS ONE*, 8(1), 2013.

[49] Schraga Schwartz, Eran Meshorer, and Gil Ast. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature structural & molecular biology*, 16(9):990–995, 2009.

[50] Reini F Luco, Qun Pan, Kaoru Tominaga, Benjamin J Blencowe, Olivia M Pereira-Smith, and Tom Misteli. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968):996–1000, 2010.

[51] G Adami and L E Babiss. DNA template effect on RNA splicing: two copies of the same gene in the same nucleus are processed differently. *The EMBO journal*, 10(11):3457–3465, 1991.

[52] Sebastián Kadener, Paula Cramer, Guadalupe Nogués, Demián Cazalla, Manuel De La Mata, Juan Pablo Fededa, Santiago E. Werbajh, Anabella Srebrow, and Alberto R. Kornblihtt. Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO Journal*, 20(20):5759–5768, 2001.

[53] Paulina Kolasinska-Zwierz, Thomas Down, Isabel Latorre, Tao Liu, X Shirley Liu, and Julie Ahringer. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature genetics*, 41(3):376–381, 2009.

[54] Mariano Alló, Eneritz Agirre, Sergey Bessonov, Paola Bertucci, Luciana Gómez, and Valeria Buggiano. Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44):15622–15629, 2014.

[55] Mariano Alló, Valeria Buggiano, Juan P Fededa, Ezequiel Petrillo, Ignacio Schor, Manuel de la Mata, Eneritz Agirre, Mireya Plass, Eduardo Eyras, Sherif Abou Elela, Roscoe Klinck, Benoit Chabot, and Alberto R Kornblihtt. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nature structural & molecular biology*, 16(7):717–724, 2009.

[56] Eric Batsché, Moshe Yaniv, and Christian Muchardt. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*, 13(1):22–29, 2006.

[57] Inma Gonzalez, Roberto Munita, Eneritz Agirre, Travis a Dittmer, Katia Gysling, Tom Misteli, and Reini F Luco. A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5(April):370–376, 2015.

[58] Robert J. Sims, Scott Millhouse, Chi Fu Chen, Brian A. Lewis, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, James L. Manley, and Danny Reinberg. Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 28(4):665–676, 2007.

[59] Reini F. Luco, Mariano Allo, Ignacio E. Schor, Alberto R. Kornblihtt, and Tom Misteli. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, 144(1):16–26, 2011.

[60] Jonathan M Levenson and J David Sweatt. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(2):108–118, 2005.

[61] Emiliana Borrelli, Eric J. Nestler, C. David Allis, and Paolo Sassone-Corsi. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. *Neuron*, 60(6):961–974, 2008.

[62] Y Jiang, B Langley, F D Lubin, W Renthal, M A Wood, D H Yasui, A Kumar, E J Nestler, S Akbarian, and A C Beckel-Mitchener. Epigenetics in the nervous system. *J Neurosci*, 28(46):11753–11759, 2008.

[63] Jernej Ule and Robert B. Darnell. RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1):102–110, 2006.

[64] Qin Li, Ji-Ann Lee, and Douglas L Black. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(11):819–831, 2007.

[65] Donny D. Licatalosi and Robert B. Darnell. Splicing Regulation in Neurologic Disease. *Neuron*, 52(1):93–101, 2006.

[66] Juan M. Alarcón, Gaël Malleret, Khalid Touzani, Svetlana Vronskaya, Shunsuke Ishii, Eric R. Kandel, and Angel Barco. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: A model for the cognitive deficit

in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, 42(6):947–959, 2004.

[67] Mireya Marin-Husstege, Michela Muggironi, Aixiao Liu, and Patricia Casaccia-Bonnefil. Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(23):10333–10345, 2002.

[68] Benoit Laurent, Lv Ruitu, Jernej Murn, Kristina Hempel, Ryan Ferrao, Yang Xiang, Shichong Liu, Benjamin A. Garcia, Hao Wu, Feizhen Wu, Hanno Steen, and Yang Shi. A Specific LSD1/KDM1A Isoform Regulates Neuronal Differentiation through H3K9 Demethylation. *Molecular Cell*, 57(6):957–970, 2015.

[69] J Merkin, C Russell, P Chen, and C B Burge. Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in Mammalian tissues. *Science*, 338(6114):1593–1599, 2012.

[70] Bushra Raj and Benjamin J. Blencowe. Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles. *Neuron*, 87(1):14–27, 2015.

[71] Masato Yano, Yoshika Hayakawa-Yano, Aldo Mele, and Robert B. Darnell. Nova2 Regulates Neuronal Migration through an RNA Switch in Disabled-1 Signaling. *Neuron*, 66(6):848–858, 2010.

[72] Mathieu Quesnel-Vallières, Manuel Irimia, Sabine P. Cordes, and Benjamin J. Blencowe. Essential roles for the splicing regulator nSR100/SRRM4 during nervous system development. *Genes and Development*, 29(7):746–759, 2015.

[73] K N Prasad. Differentiation of neuroblastoma cells in culture. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 50(2):129–165, 1975.

[74] Roger G. Tremblay, Marianna Sikorska, Jagdeep K. Sandhu, Patricia Lanthier, Maria Ribecco-Lutkiewicz, and Mahmud Bani-Yaghoub. Differentiation

of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(1):60–67, 2010.

[75] Kosik KS. Fischer I, Shea TB, Sapirstein VS. Expression and Distribution of Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) in Neuroblastoma and Primary Neuronal Cells. *Brain Res.*, 390(1):99–109, 1986.

[76] P Pasinelli, D R Borchelt, M K Houseweart, D W Cleveland, and R H Brown. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26):15763–8, 1998.

[77] Evgeny a. Zemskov, Nihar R. Jana, Masaru Kurosawa, Haruko Miyazaki, Naoaki Sakamoto, Munenori Nekooki, and Nobuyuki Nukina. Pro-apoptotic protein kinase Cdelta is associated with intranuclear inclusions in a transgenic model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 87(2):395–406, 2003.

[78] David J Combs, Hyeon-Gyu Shin, Yanping Xu, Yajamana Ramu, and Zhe Lu. Tuning voltage-gated channel activity and cellular excitability with a sphingomyelinase. *The Journal of general physiology*, 142(4):367–80, 2013.

[79] U. Rutishauser, W. E. Gall, and G. M. Edelman. Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. *Journal of Cell Biology*, 79(2 I):382–393, 1978.

[80] J P Thiery, R Brackenbury, U Rutishauser, and G M Edelman. Adhesion among neural cells of the chick embryo. *Progress in clinical and biological research*, 15(19):199–206, 1977.

[81] a M Andersson, M Olsen, D Zhernosekov, H Gaardsvoll, L Krog, D Linnemann, and E Bock. Age-related changes in expression of the neural cell adhesion

molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Biochemical Journal*, 290(Pt 3):641–648, 1993.

[82] D K Ditlevsen and K Kolkova. Signaling Pathways Involved in NCAM-Induced Neurite Outgrowth. *Neurochemical Research*, 2008.

[83] R D Fields and K Itoh. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*, 19(11):473–480, 1996.

[84] D. Muller, C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon, and J. Z. Kiss. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3):413–422, 1996.

[85] C Goridis and J F Brunet. NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Seminars in cell biology*, 3(3):189–97, 1992.

[86] G M Edelman and K L Crossin. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annual review of biochemistry*, 60:155–190, 1991.

[87] S. Hoffman MK. Byeon, Y. Sugi, RR. Markwald. NCAM polypeptides in heart development: Association with Z discs of forms that contain the muscle-specific domain. *Journal of Cell Biology*, 128(1-2):209–221, 1995.

[88] Peter S. Walmod, Kateryna Kolkova, Vladimir Berezin, and Elisabeth Bock. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochemical Research*, 29(11 SPEC. ISS.):2015–2035, 2004.

[89] P Doherty, G Rimon, D A Mann, and F S Walsh. Alternative splicing of the cytoplasmic domain of neural cell adhesion molecule alters its ability to act as a substrate for neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry*, 58(6):2338–2341, 1992.

[90] E. Persohn and M. Schachner. Immunohistological localization of the neural

adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *Journal of Neurocytology*, 19(6):807–819, 1990.

[91] Henry Tomasiewicz, Katsuhiko Ono, Della Yee, Christian Thompson, Christo Goridis, Urs Rutishauser, and Terry Magnuson. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron*, 11(6):1163–1174, 1993.

[92] Luis Polo-Parada, Christian M Bose, Florian Plattner, and Lynn T Landmesser. Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice . *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(8):1852–1864, 2004.

[93] Philipp Rathert, Arunkumar Dhayalan, Marie Murakami, Xing Zhang, Raluca Tamas, Renata Jurkowska, Yasuhiko Komatsu, Yoichi Shinkai, Xiaodong Cheng, and Albert Jeltsch. Protein lysine methyltransferase G9a acts on non-histone targets. *Nature chemical biology*, 4(6):344–346, 2008.

[94] Yoichi Shinkai and Makoto Tachibana. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes and Development*, 25(8):781–788, 2011.

[95] Makoto Tachibana, Kenji Sugimoto, Masami Nozaki, Jun Ueda, Tsutomu Ohta, Misao Ohki, Mikiko Fukuda, Naoki Takeda, Hiroyuki Niida, Hiroyuki Kato, and Yoichi Shinkai. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes and Development*, 16(14):1779–1791, 2002.

[96] Makoto Tachibana, Jun Ueda, Mikiko Fukuda, Naoki Takeda, Tsutomu Ohta, Hiroko Iwanari, Toshiko Sakihama, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, and Yoichi Shinkai. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes and Development*, 19(7):815–826, 2005.

[97] Min Wei Chen, Kuo Tai Hua, Hsin Jung Kao, Chia Chun Chi, Lin Hung Wei, Gunnar Johansson, Shine Gwo Shiah, Pai Sheng Chen, Yung Ming Jeng, Tsu Yao Cheng, Tsung Ching Lai, Jeng Shou Chang, Yi Hua Jan, Ming Hsien Chien, Chih Jen Yang, Ming Shyan Huang, Michael Hsiao, and Min Liang Kuo. H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. *Cancer Research*, 70(20):7830–7840, 2010.

[98] S Miura, C Maesawa, M Shibazaki, S Yasuhira, S Kasai, K Tsunoda, F Maeda, K Takahashi, T Akasaka, and T Masuda. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas. *Am J Dermatopathol*, 36(3):211–216, 2014.

[99] Jing Huang, Jean Dorsey, Sergei Chuikov, Xinyue Zhang, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg, and Shelley L. Berger. G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13):9636–9641, 2010.

[100] S H Lee, J Kim, W-H Kim, and Y M Lee. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells. *Oncogene*, 28(2):184–194, 2009.

[101] Antoine H F M Peters, Stefan Kubicek, Karl Mechtler, Roderick J. O'Sullivan, Alwin A H A Derijck, Laura Perez-Burgos, Alexander Kohlmaier, Susanne Opravil, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Joost H A Martens, and Thomas Jenuwein. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Molecular Cell*, 12(6):1577–1589, 2003.

[102] Tomoki Yokochi, Kristina Poduch, Tyrone Ryba, Junjie Lu, Ichiro Hiratani, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, and David M Gilbert. G9a selectively represses a class of late-replicating genes at the nuclear periphery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46):19363–19368, 2009.

[103] Patrick Trojer, Jin Zhang, Masato Yonezawa, Andreas Schmidt, Haiyan Zheng, Thomas Jenuwein, and Danny Reinberg. Dynamic histone H1 isotype 4 methylation and demethylation by histone lysine methyltransferase G9a/KMT1C and the jumonji domain-containing JMJD2/KDM4 proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13):8395–8405, 2009.

[104] Thomas Weiss, Sonja Hergeth, Ulrike Zeissler, Annalisa Izzo, Philipp Tropberger, Barry M Zee, Miroslav Dundr, Benjamin A Garcia, Sylvain Daujat, and Robert Schneider. Histone H1 variant-specific lysine methylation by G9a/KMT1C and Glp1/KMT1D. *Epigenetics & chromatin*, 3(1):7, 2010.

[105] Hui Wu, Xiuzhen Chen, Jun Xiong, Yingfeng Li, Hong Li, Xiaojun Ding, Sheng Liu, She Chen, Shaorong Gao, and Bing Zhu. Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo. *Cell research*, 21(2):365–367, 2011.

[106] Jun Ueda, Makoto Tachibana, Tsuyoshi Ikura, and Yoichi Shinkai. Zinc finger protein Wiz links G9a/GLP histone methyltransferases to the co-repressor molecule CtBP. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29):20120–20128, 2006.

[107] Chunjing Bian, Qiang Chen, and Xiaochun Yu. The zinc finger proteins ZNF644 and WIZ regulate the G9a/GLP complex for gene repression. *eLife*, 4:1–17, 2015.

[108] Satoshi Wada, Hisashi Ideno, Akemi Shimada, Taichi Kamiunten, Yoshiki Nakamura, Kazuhisa Nakashima, Hiroshi Kimura, Yoichi Shinkai, Makoto Tachibana, and Akira Nifuji. H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro. *Histochemistry and Cell Biology*, 144(1):13–20, 2015.

[109] Belinda Mei Tze Ling, Suma Gopinadhan, Wai Kay Kok, Shilpa Rani Shankar, Pooja Gopal, Narendra Bharathy, Yaju Wang, and Reshma Taneja. G9a mediates Sharp-1-dependent inhibition of skeletal muscle differentiation. *Molecular biology of the cell*, 23(24):4778–85, 2012.

[110] Rutger J. Wierda, Marieke Goedhart, Marja C.J.A. van Eggermond, Alice F. Muggen, Xanne M. Miggelbrink, Sacha B. Geutskens, Erik van Zwet, Geert W. Haasnoot, and Peter J. van den Elsen. A role for KMT1c in monocyte to dendritic cell differentiation. *Human Immunology*, 76(6):431–437, 2015.

[111] Bernhard Lehnertz, Jeffrey P Northrop, Frann Antignano, Kyle Burrows, Sima Hadidi, Sarah C Mullaly, Fabio M V Rossi, and Colby Zaph. Activating and inhibitory functions for the histone lysine methyltransferase G9a in T helper cell differentiation and function. *The Journal of experimental medicine*, 207(5):915–22, 2010.

[112] Haruya Ohno, Kosaku Shinoda, Kana Ohyama, Louis Z Sharp, and Shingo Kajimura. EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature*, 504(7478):163–7, 2013.

[113] Masayo Inagawa, Kuniko Nakajima, Tomoyuki Makino, Satoko Ogawa, Mizuyo Kojima, Satomi Ito, Aiko Ikenishi, Toshinori Hayashi, Robert J. Schwartz, Kazuomi Nakamura, Tetsuya Obayashi, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Kazuhiro Maeda, Sachiko Miyagawa-Tomita, and Takashi Takeuchi. Histone H3 lysine 9 methyltransferases, G9a and GLP are essential for cardiac morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 130(11-12):519–531, 2013.

[114] Kimiko Katoh, Ryoji Yamazaki, Akishi Onishi, Rikako Sanuki, and Takahisa Furukawa. G9a histone methyltransferase activity in retinal progenitors is essential for proper differentiation and survival of mouse retinal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(49):17658–70, 2012.

[115] Makoto Tachibana, Masami Nozaki, Naoki Takeda, and Yoichi Shinkai. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *The EMBO journal*, 26(14):3346–59, 2007.

[116] Danielle Bittencourt, Brian H Lee, Lu Gao, Daniel S Gerke, and Michael R

Stallcup. Role of distinct surfaces of the G9a ankyrin repeat domain in histone and DNA methylation during embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Epigenetics & chromatin*, 7(1):27, 2014.

[117] Silvina Epsztejn-Litman, Nirit Feldman, Monther Abu-Remaileh, Yoel Shufaro, Ariela Gerson, Jun Ueda, Rachel Deplus, François Fuks, Yoichi Shinkai, Howard Cedar, and Yehudit Bergman. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature structural & molecular biology*, 15(11):1176–83, 2008.

[118] Nirit Feldman, Ariela Gerson, Jia Fang, En Li, Yi Zhang, Yoichi Shinkai, Howard Cedar, and Yehudit Bergman. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature cell biology*, 8(2):188–194, 2006.

[119] Dengke K Ma, Cheng-Hsuan J Chiang, Karthikeyan Ponnusamy, Guo-Li Ming, and Hongjun Song. G9a and Jhdm2a regulate embryonic stem cell fusion-induced reprogramming of adult neural stem cells. *Stem cells*, 26(8):2131–2141, 2008.

[120] Anne Schaefer, Srihari C. Sampath, Adam Intrator, Alice Min, Tracy S. Gertler, D. James Surmeier, Alexander Tarakhovsky, and Paul Greengard. Control of Cognition and Adaptive Behavior by the GLP/G9a Epigenetic Suppressor Complex. *Neuron*, 64(5):678–691, 2009.

[121] Jamie M. Kramer, Korinna Kochinke, Merel A W Oortveld, Hendrik Marks, Daniela Kramer, Eiko K. de Jong, Zoltan Asztalos, J. Timothy Westwood, Hendrik G. Stunnenberg, Marla B. Sokolowski, Krystyna Keleman, Huiqing Zhou, Hans van Bokhoven, and Annette Schenck. Epigenetic regulation of learning and memory by Drosophila EHMT/G9a. *PLoS Biology*, 9(1), 2011.

[122] I Maze, D Chaudhury, D M Dietz, M Von Schimmelmann, P J Kennedy, M K Lobo, S E Sillivan, M L Miller, R C Bagot, H Sun, G Turecki, R L Neve, Y L

Hurd, L Shen, M H Han, A Schaefer, and E J Nestler. G9a influences neuronal subtype specification in striatum. *Nat Neurosci*, 17(4):533–539, 2014.

[123] Shivakumar Subbanna, Madhu Shivakumar, Nagavedi S. Umapathy, Mariko Saito, Panaiyur S. Mohan, Asok Kumar, Ralph A. Nixon, Alexander D. Verin, Delphine Psychoyos, and Balapal S. Basavarajappa. G9a-mediated histone methylation regulates ethanol-induced neurodegeneration in the neonatal mouse brain. *Neurobiology of Disease*, 54:475–485, 2013.

[124] Robert Collins and Xiaodong Cheng. A case study in cross-talk: The histone lysine methyltransferases G9a and GLP. *Nucleic Acids Research*, 38(11):3503–3511, 2010.

[125] Chandra-Prakash Chaturvedi, Alison M Hosey, Carmen Palii, Carolina Perez-Iratxeta, Yoshihiro Nakatani, Jeffrey a Ranish, F Jeffrey Dilworth, and Marjorie Brand. Dual role for the methyltransferase G9a in the maintenance of beta-globin gene transcription in adult erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43):18303–18308, 2009.

[126] Daniel J. Purcell, Kwang Won Jeong, Danielle Bittencourt, Daniel S. Gerke, and Michael R. Stallcup. A distinct mechanism for coactivator versus corepressor function by histone methyltransferase G9a in transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49):41963–41971, 2011.

[127] Danielle Bittencourt, Dai-Ying Wu, Kwang Won Jeong, Daniel S Gerke, Laurie Herviou, Irina Ianculescu, Rajas Chodankar, Kimberly D Siegmund, and Michael R Stallcup. G9a functions as a molecular scaffold for assembly of transcriptional coactivators on a subset of glucocorticoid receptor target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(48):19673–8, 2012.

[128] Ildikó Gyory, Jian Wu, György Fejér, Edward Seto, and Kenneth L Wright.

PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nature immunology*, 5(3):299–308, 2004.

[129] Takashi Nagano, Jennifer A Mitchell, Lionel A Sanz, Florian M Pauler, Anne C Ferguson-Smith, Robert Feil, and Peter Fraser. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science*, 322(December):1717–1720, 2008.

[130] Avtar Roopra, Romena Qazi, Barry Schoenike, Timothy J. Daley, and John F. Morrison. Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Molecular Cell*, 14(6):727–738, 2004.

[131] M. Salton, T. C. Voss, and T. Misteli. Identification by high-throughput imaging of the histone methyltransferase EHMT2 as an epigenetic regulator of VEGFA alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 42(22):13662–13673, 2014.

[132] Pierre Olivier Estève, Debasi Patnaik, Hang Gyeong Chin, Jack Benner, Michael A. Teitell, and Sriharsa Pradhan. Functional analysis of the N- and C-terminus of mammalian G9a histone H3 methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 33(10):3211–3223, 2005.

[133] Stephanie E. Brown, R. Duncan Campbell, and Christopher M. Sanderson. Novel NG36/G9a gene products encoded within the human and mouse MHC class III regions. *Mammalian Genome*, 12(12):916–924, 2001.

[134] O. Mauger, R. Klinck, B. Chabot, C. Muchardt, E. Allemand, and E. Batsche. Alternative splicing regulates the expression of G9A and SUV39H2 methyltransferases, and dramatically changes SUV39H2 functions. *Nucleic Acids Research*, 43(3):1869–1882, 2015.

[135] Matthew Fagnani, Yoseph Barash, Joanna Y Ip, Christine Misquitta, Qun Pan, Arneet L Saltzman, Ofer Shai, Leo Lee, Aviad Rozenhek, Naveed Mohammad, Sandrine Willaime-Morawek, Tomas Babak, Wen Zhang, Timothy R

Hughes, Derek van der Kooy, Brendan J Frey, and Benjamin J Blencowe. Functional coordination of alternative splicing in the mammalian central nervous system. *Genome biology*, 8(6):R108, 2007.

[136] Choy Pik Chiu and Helen M. Blau. 5-azacytidine permits gene activation in a previously noninducible cell type. *Cell*, 40(2):417–424, 1985.

[137] Guadalupe Nogués, Sebastián Kadener, Paula Cramer, David Bentley, and Alberto R. Kornblihtt. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):43110–43114, 2002.

[138] Nicole M Martinez, Qun Pan, Brian S Cole, Christopher A Yarosh, Grace A Babcock, Florian Heyd, William Zhu, Sandya Ajith, Benjamin J Blencowe, and Kristen W Lynch. Alternative splicing networks regulated by signaling in human T cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(5):1029–40, 2012.

[139] Chi Wang Lin, Cindy Y. Jao, and Alice Y. Ting. Genetically Encoded Fluorescent Reporters of Histone Methylation in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(19):5982–5983, 2004.

[140] Violaine Saint-André, Eric Batsché, Christophe Rachez, and Christian Muchardt. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1γ favor inclusion of alternative exons. *Nature structural & molecular biology*, 18(3):337–344, 2011.

[141] Ignacio E Schor, Ana Fiszbein, Ezequiel Petrillo, and Alberto R Kornblihtt. Intragenic epigenetic changes modulate NCAM alternative splicing in neuronal differentiation. *The EMBO journal*, 32(16):2264–2274, 2013.

[142] Sanjeev Shukla, Ersen Kavak, Melissa Gregory, Masahiko Imashimizu, Bojan Shutinoski, Mikhail Kashlev, Philipp Oberdoerffer, Rickard Sandberg, and Shalini Oberdoerffer. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*, 479(7371):74–79, 2011.

[143] Makoto Tachibana, Yasuko Matsumura, Mikiko Fukuda, Hiroshi Kimura, and Yoichi Shinkai. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *The EMBO journal*, 27(20):2681–2690, 2008.

[144] Auinash Kalsotra and Thomas A Cooper. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nature reviews. Genetics*, 12(10):715–729, 2011.

[145] Cynthia L. Fisher and Amanda G. Fisher. Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(2):140–146, 2011.

[146] Eran Meshorer and Tom Misteli. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(7):540–546, 2006.

[147] Alexander Meissner, Tarjei S Mikkelsen, Hongcang Gu, Marius Wernig, Jacob Hanna, Andrey Sivachenko, Xiaolan Zhang, Bradley E Bernstein, Chad Nusbaum, David B Jaffe, Andreas Gnirke, Rudolf Jaenisch, and Eric S Lander. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205):766–70, 2008.

[148] R. David Hawkins, Gary C. Hon, Leonard K. Lee, Queminh Ngo, Ryan Lister, Mattia Pelizzola, Lee E. Edsall, Samantha Kuan, Ying Luu, Sarit Klugman, Jessica Antosiewicz-Bourget, Zhen Ye, Celso Espinoza, Saurabh Agarwahl, Li Shen, Victor Ruotti, Wei Wang, Ron Stewart, James A. Thomson, Joseph R. Ecker, and Bing Ren. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*, 6(5):479–491, 2010.

[149] Bo Wen, Hao Wu, Yoichi Shinkai, Rafael a Irizarry, and Andrew P Feinberg. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature genetics*, 41(2):246–250, 2009.

[150] Florian Lienert, Fabio Mohn, Vijay K. Tiwari, Tuncay Baubec, Tim C. Roloff, Dimos Gaidatzis, Michael B. Stadler, and Dirk Sch??beler. Genomic prevalence of heterochromatic H3K9me2 and transcription do not discriminate pluripotent from terminally differentiated cells. *PLoS Genetics*, 7(6), 2011.

[151] Panagiotis Papasaikas, J. Ram??n Tejedor, Luisa Vigevani, and Juan Valc??rcel. Functional splicing network reveals extensive regulatory potential of the core spliceosomal machinery. *Molecular Cell*, 57(1):7–22, 2015.

[152] Marija Buljan, Guilhem Chalancon, A. Keith Dunker, Alex Bateman, S. Balaji, Monika Fuxreiter, and M. Madan Babu. Alternative splicing of intrinsically disordered regions and rewiring of protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3):443–450, 2013.

[153] Kabirul Islam, Yuling Chen, Hong Wu, Ian R Bothwell, Gil J Blum, Hong Zeng, Aiping Dong, Weihong Zheng, Jinrong Min, Haiteng Deng, and Minkui Luo. Defining efficient enzyme-cofactor pairs for bioorthogonal profiling of protein methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42):16778–83, 2013.