



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Control de la elongación de la transcripción sobre el
splicing alternativo en *C. elegans*

Gonzalo Monti

Directora: Dra. Micaela Godoy Herz

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIBYNE, UBA-CONICET)

Buenos Aires, octubre 2023

Control de la elongación de la transcripción sobre el *splicing* alternativo en *C. elegans*

Resumen

La regulación del *splicing* alternativo dada por cambios en la elongación de la transcripción es un proceso que ha sido estudiado en células animales en cultivo y en plantas pero no así en organismos animales enteros. El nematodo *C. elegans* es un modelo sencillo para estudiar *splicing* alternativo, debido a su rápido desarrollo, fácil manejo y la existencia de técnicas simples para silenciar sus genes. Entre estas últimas, se encuentra la técnica de RNAi vía alimentación, que consiste en alimentar a los gusanos con bacterias transformadas con plásmidos que expresan dsRNAs.

El objetivo de este trabajo consiste en estudiar si la elongación de la transcripción juega un rol en la regulación del *splicing* alternativo en *C. elegans*. Para ello, realizamos experimentos con drogas que afectan la elongación de la transcripción, y se puso a punto la técnica de RNAi vía alimentación, con el objetivo final de utilizarla para silenciar factores de elongación de la transcripción.

Encontramos que el tratamiento con camptotecina, que reduce la elongación de la transcripción, aumenta la inclusión del exón alternativo del factor de *splicing* *hrpf-1*. Por otro lado, el tratamiento con tricostatina A, que aumenta la elongación de la transcripción, disminuye la inclusión del exón alternativo de *hrpf-1*. Además, se puso a punto correctamente la técnica de RNAi vía alimentación, y se lograron silenciar con éxito los factores de elongación *rtfo-1*, *pafo-1* y *tftis*. El silenciamiento de *tftis* aumentó la inclusión del microexón de un gen codificante para un canal de potasio, *kvs-5*.

Estos resultados son consistentes con que la elongación de la transcripción regula el *splicing* alternativo de ciertos genes en *C. elegans*, y la puesta a punto de la técnica de RNAi vía alimentación permitirá realizar experimentos silenciando factores de elongación, *splicing* o incluso isoformas específicas.

Transcriptional elongation control of alternative *splicing* in *C. elegans*

Abstract

The regulation of alternative *splicing* via transcriptional elongation is a well-known process that has been studied in animal cell cultures and in plants. However, this mode of regulation has not yet been investigated in whole animals. The nematode *C. elegans* is a useful model for studying alternative *splicing*, given its fast development and availability of easy-to-use techniques for gene silencing. One of these techniques is RNAi by feeding, which consists of feeding the worms with *E. coli* that have been transformed with a vector expressing dsRNAs.

In this work, we aim to study if transcriptional elongation plays a role in alternative *splicing* regulation in *C. elegans*. In order to explore this, worms were treated with drugs that affect transcriptional elongation. In addition, we decided to fine-tune the RNAi by feeding technique and use it to silence transcription elongation factors.

Treatment with camptothecin, which reduces transcriptional elongation, increases *splicing* factor *hrpf-1* alternative exon inclusion. On the other hand, treatment with trichostatin A, a drug that increases transcriptional elongation, reduces *hrpf-1* alternative exon inclusion. In addition, the RNAi by feeding technique was correctly fine-tuned and was used to effectively silence the elongation factors *rtfo-1*, *pafo-1* and *tfiis*. *Tfiis* silencing increased microexon inclusion of *kvs-5*, which encodes a potassium channel subunit.

These results are consistent with transcriptional elongation regulating alternative *splicing* of certain genes in *C. elegans*. The correct fine-tuning of the RNAi by feeding technique allows for future experiments regarding silencing of transcriptional elongation factors, as well as *splicing* factors and even specific isoforms of certain genes.

Agradecimientos

Quería utilizar esta sección, que parece ser más difícil de escribir que Resultados, para agradecer por toda la ayuda que recibí durante tanto la elaboración de esta tesis de licenciatura, como también durante la carrera. Gracias y gracias a todas las personas que conocí durante estos años:

A Mica, porque desde los seminarios de IBMC en 2018 hasta la recta final con la tesis, me enseñaste desde tantos lugares distintos durante la mayoría de estos años de carrera, literalmente. A pipetear, a pensar experimentos, a analizar resultados, a hacer miles de burocracias y a hacer ciencia en general, entre muchísimas otras cosas. A pesar de mis geles rotos o dudas existenciales con trámites, siempre con paciencia infinita y todo el cariño del mundo.

A Alberto y a todo el grupo en general, por aceptarme y estar siempre dispuestos a ayudar, desde consejos a nivel de diseño de experimentos de Alberto hasta los Guillitips para sacarles mejores fotos a los geles. A todos los investigadores y becarios del IFIBYNE que conocí durante este par de años, que me ayudaron y respondieron mil preguntas y me prestaron tantos pipeteadores.

A todos y cada uno de los amigos y amigas que hice durante esta etapa, no los puedo nombrar porque esta tesis quedaría de más de 100 páginas, pero hicieron que todos los momentos duros y estresantes se conviertan en anécdotas divertidas, y momentos tranquilos en el pastito detrás del pabellón 2 se conviertan en recuerdos que no se van a ir por muchos años. A mi familia, por toda la paciencia que implicó apoyarme durante una carrera así de larga y por aguantarme con tanto estrés encima siempre.

Y por último a la UBA y a la Universidad Pública en general, a pesar de todas las adversidades pasadas y que se vienen, por haberme permitido cursar una carrera tan linda y completa como es Biología.

Índice

Introducción	8
¿Qué es el <i>splicing</i> ?	8
El <i>splicing</i> alternativo	8
El <i>splicing</i> está acoplado a la transcripción	9
Modelos de acoplamiento entre transcripción y <i>splicing</i> alternativo	10
<i>C. elegans</i> como modelo animal	12
<i>C. elegans</i> como modelo para estudiar <i>splicing</i> alternativo	12
Silenciamiento en <i>C. elegans</i>	13
Objetivos e Hipótesis	16
Materiales y Métodos	18
Mantenimiento y crecimiento de <i>C. elegans</i>	18
Sincronización de embriones	18
Experimentos con Camptotecina y Tricostatina A	18
Análisis de <i>splicing</i> alternativo y de expresión	19
Pedido de bacterias RNAi	21
Verificación de plásmidos RNAi	22
RNAi vía alimentación	23
Resultados	24
Camptotecina y Tricostatina A	24
RNAi vía alimentación	28
Efecto de silenciar <i>tfiis</i> en <i>splicing</i> alternativo	35
Discusión y Conclusiones	40
Bibliografía	44

Introducción

¿Qué es el *splicing*?

Dentro de los procesos que regulan la expresión génica, el *splicing* juega un rol clave en la gran variabilidad de los transcriptos. El *splicing* es llevado a cabo por un complejo ribonucleoproteico llamado spliceosoma, que está formado por múltiples ribonucleoproteínas pequeñas (snRNPs). Los snRNPs reconocen sitios de *splicing* en los RNAs mensajeros inmaduros (sitio de *splicing* 5' y sitio de *splicing* 3') y permiten que ocurra este proceso, en el cual regiones llamadas intrones son eliminadas del RNA mensajero inmaduro y otras, llamadas exones, son unidas entre sí. Esto da como producto a un RNA mensajero, ahora maduro, compuesto únicamente por exones.

El *splicing* alternativo

Los sitios de *splicing* pueden considerarse débiles o fuertes, dependiendo de cómo son reconocidos por la maquinaria del spliceosoma: los sitios fuertes siempre son reconocidos, mientras que los sitios débiles no siempre lo son. En un transcripto que solamente posee sitios fuertes, el *splicing* ocurre de manera tal que todos los intrones van a ser removidos, y todos los exones quedarán unidos, como fue explicado antes; en lo que se conoce como *splicing* constitutivo. En el caso de que un transcripto tenga sitios fuertes y débiles, dependiendo de si se reconoce o no el sitio débil, puede generarse más de un mensajero maduro distinto. Esto es lo que se conoce como *splicing* alternativo (Ast, 2004).

Las variantes de transcriptos maduros que surgen por *splicing* alternativo se llaman isoformas, y pueden consistir en la exclusión de un exón, la inclusión de un intrón, el uso de sitios de *splicing* alternativos, tanto 3' como 5', o la presencia de exones mutuamente excluyentes (figura 1). Es posible que las isoformas puedan traducirse en

variantes de proteínas distintas, o que una pueda incluir codones *stop* prematuros y no pueda traducirse en una proteína funcional. El *splicing* alternativo, entonces, permite ampliar el proteoma sin aumentar el número de genes, lo que convierte a este proceso en uno de vital importancia para el correcto desarrollo y funcionamiento de un organismo (Kornblihtt et al., 2013).

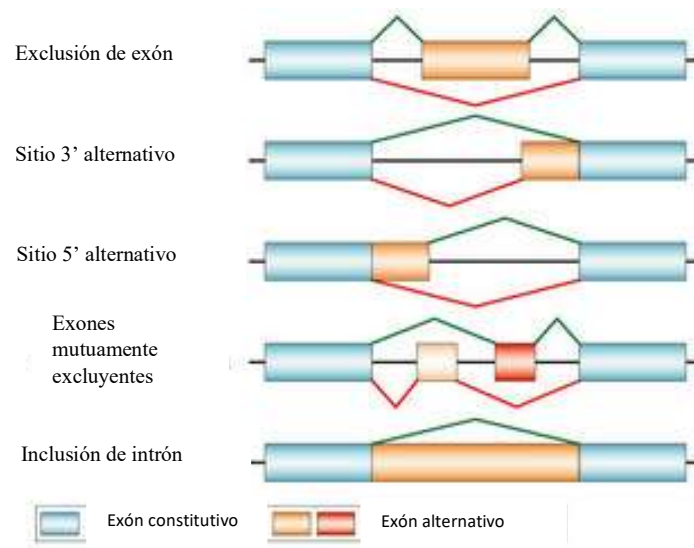


Figura 1. Tipos de eventos de *splicing* alternativo. Tomado de Edwalds-Gilbert, G. (2010).

El *splicing* está acoplado a la transcripción

El *splicing* alternativo es co-transcripcional: apenas el transcrito primario es sintetizado por la RNA Polimerasa II (RNAPII), se unen los diferentes componentes del spliceosoma y ocurre la transesterificación del mRNA (Beyer & Osheim, 1988; Schor et al., 2013). Es sabido que este acoplamiento es funcional; la elongación de la transcripción es uno de los factores que puede afectar al uso de los sitios de *splicing* al cambiar como estos son reconocidos por la maquinaria, y a su vez, el *splicing* puede afectar a la transcripción (Cramer et al., 1997).

Modelos de acoplamiento entre transcripción y *splicing* alternativo

Existen dos modelos que explican el efecto de la transcripción sobre el *splicing* alternativo: el modelo de reclutamiento, y el modelo cinético.

El primer modelo se centra en el reclutamiento de factores de *splicing* por parte de la RNAPII y la maquinaria de transcripción. Se sabe que cambios en la fosforilación del dominio CTD de la RNAPII afectan a la afinidad de esta por factores de *splicing* y procesamiento del RNA en general (McCracken et al., 1997; Muñoz et al., 2010), y que diferentes componentes del complejo Mediador reclutan factores de procesamiento (Huang et al., 2012).

El modelo cinético plantea que la velocidad de elongación de la RNAPII afecta cómo ocurre el *splicing* alternativo. Si la tasa de elongación transcripcional es elevada, los distintos sitios de *splicing* de un evento se transcribirían casi simultáneamente y se generaría una competencia entre ellos en cuanto a reclutamiento de factores. En cambio, si la tasa de elongación es lenta, los diferentes sitios no se transcribirían en simultáneo sino secuencialmente, en este caso no competirían por reclutar a los factores, y se reconocerían en el orden en que el sean transcritos. (De La Mata et al., 2003). En la figura 2 se observa un ejemplo del modelo cinético. En el ejemplo, una elongación rápida provoca que los sitios 3' fuertes y débiles se transcriban simultáneamente, y únicamente el sitio fuerte es reconocido por los componentes del spliceosoma. Al no reconocerse el sitio débil el *splicing* no ocurre de manera canónica y el exón 2, río arriba de este sitio de *splicing*, es saltado. En cambio, cuando la elongación es lenta, los sitios de *splicing* se transcriben secuencialmente, sin competir; cada uno es reconocido por los componentes del spliceosoma y los 3 exones forman parte del mensajero maduro.

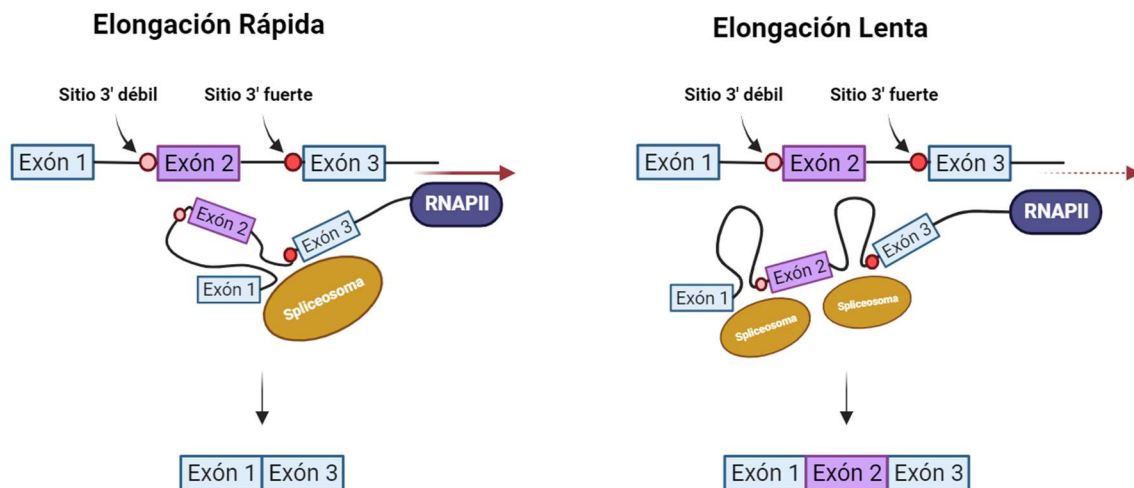


Figura 2. Ejemplo de un caso de splicing alternativo regulado según el modelo cinético.

Existen distintos elementos que afectan a la elongación de la transcripción *in vivo*. Es sabido que el grado de compactación de la cromatina causa un efecto sobre la elongación transcripcional: una cromatina más laxa, que puede estar asociada a modificaciones postraduccionales de histonas como acetilaciones, provoca un aumento en la velocidad de elongación de la RNAPII (Schor et al., 2009). Estos cambios en la elongación producidos por la estructura de la cromatina pueden tener un efecto sobre el splicing alternativo de algunos eventos (Godoy Herz & Kornblihtt, 2019). Otro factor que afecta *in vivo* a la elongación de la transcripción y en línea con este modelo, al splicing alternativo, es regulación dada por factores de elongación, como el factor TFIIS (Fish & Kane, 2002).

***C. elegans* como modelo animal**

El nematodo *C. elegans* es un modelo animal muy utilizado en biología, especialmente en el área de biología molecular y neurociencias. Los adultos miden aproximadamente 1 mm y consisten en cerca de 1.000 células. Pueden alimentarse de *E. coli* y crecerse en placas de Petri, con un mantenimiento muy sencillo (Strange, 2006). *C. elegans* presenta 4 etapas larvales (L1, L2, L3 y L4) antes de llegar a la adultez, donde alcanza la maduración sexual y la capacidad de poner huevos (figura 3).

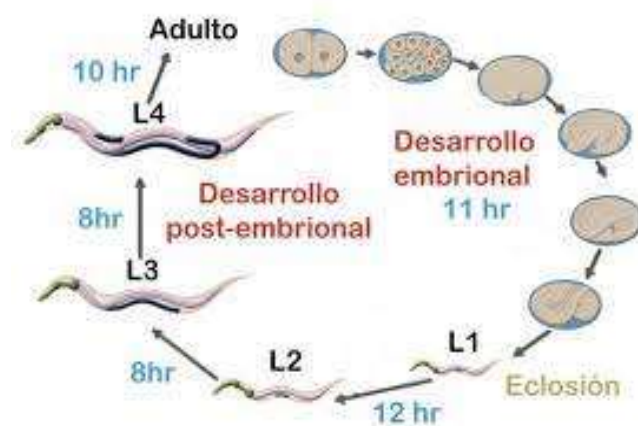


Figura 3. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*.
Figura tomada de Clavijo et al. (2016).

***C. elegans* como modelo para estudiar *splicing* alternativo**

El acoplamiento funcional entre transcripción y *splicing* alternativo se estudió ampliamente en células en cultivo (De La Mata et al., 2003), pero no así en organismos enteros. Recientemente se descubrió que en plantas, la velocidad de elongación de la RNAPII regula el *splicing* alternativo en respuesta a luz (Godoy Herz et al., 2019). Sin embargo, hay pocos trabajos que estudian el rol de la elongación de la transcripción en la regulación del *splicing* en animales enteros.

Aproximadamente un 20% de los cerca de 20.000 genes de *C. elegans* presentan diferentes isoformas de *splicing* alternativo (Ramani et al., 2011; Zahler, 2005). La mayoría de estos eventos son del tipo de exón *cassette* al igual que en seres humanos

(Keren et al., 2010)(si bien en humanos el % de genes con eventos de *splicing* alternativo aumenta a más del 90%), mientras que en plantas los eventos más comunes implican inclusión de intrones (Barta et al., 2012)

Además, múltiples genes en *C. elegans* contienen microexones. Los microexones son un tipo de evento de *splicing* alternativo, del tipo “exón *cassette*” y generalmente se definen por tener un tamaño menor a 27 nucleótidos. Se sabe que los microexones se encuentran enriquecidos en genes de expresión neuronal, tanto en *C. elegans* como en vertebrados; y su desregulación está asociada a trastornos del espectro autista y trastornos mentales como esquizofrenia (Choudhary et al., 2021).

Trabajando con organismos enteros, es posible estudiar si el *splicing* alternativo juega un rol en la respuesta a estímulos ambientales. Trabajos anteriores publicados por otros laboratorios y luego realizados por nuestro grupo demostraron que la falta de alimento provoca cambios en el *splicing* de múltiples transcritos de larvas L1 de *C. elegans* y diferencias en la expresión de más del 25% de sus genes (Baugh et al., 2009; Zorio et al., 1997). Para estudiar esto se mantuvieron gusanos en el estadio L1 en ausencia de comida o en presencia de diferentes cantidades de comida, durante 4 horas. Luego se les realizó una extracción de RNAs y una RT-PCR para ciertos eventos con exones alternativos. En la figura 4 se observa un ejemplo para uno de estos eventos, el gen *hrpf-1*, que mostró un aumento significativo en la inclusión del exón alternativo en presencia de alimento. Todavía no se conocen los mecanismos por los cuales ocurren estos cambios. Los cambios en la inclusión del exón alternativo se midieron utilizando el índice de *splicing*: a partir de la cuantificación de la intensidad de las isoformas luego de separarlas con una electroforesis, se calcula el cociente entre la isoforma más larga y el total de isoformas, para así obtener la proporción de la isoforma larga (y, por lo tanto, de la inclusión de su exón alternativo) en un tratamiento.

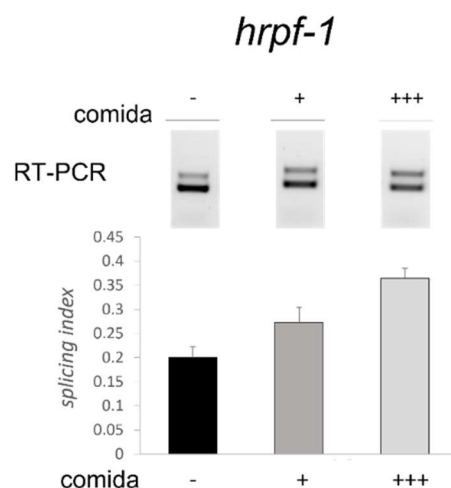


Figura 4. Resultados de RT-PCR de isoformas del gen *hrpf-1* en condiciones de hambre. Arriba: Isoformas de *hrpf-1*. Abajo: Se graficó el índice de *splicing*.

Silenciamiento en *C. elegans*

El silenciamiento de genes utilizando RNAs de interferencia fue descubierto en *C. elegans* en 1998 (Fire et al., 1998). El mecanismo general consiste en el uso de dsRNAs, que son procesados en siRNAs reconocidos por el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Este complejo está formado por múltiples proteínas incluyendo a proteínas de la familia Argonauta (AGO), y es el encargado de silenciar la expresión a partir de los siRNAs. AGO procede a asociarse a un RNA mensajero complementario con el siRNA, y clivarlo, promoviendo su degradación e impidiendo su traducción. De esta manera se controla la expresión del gen target, de manera post-transcripcional.

Desde el descubrimiento de este mecanismo, surgieron diferentes metodologías específicas para *C. elegans* con el fin de silenciar genes de esta manera. Principalmente se utilizan 3 métodos: el agregado de los dsRNAs mediante una inyección individual a cada gusano (Fire et al., 1998); el uso de una solución con dsRNAs, bañando a los gusanos en la misma (Tabara et al., 1998); o el uso de bacterias transformadas con vectores de expresión de los dsRNAs para alimentar a los gusanos (Kamath et al., 2001). Esta última técnica se conoce como RNAi vía alimentación.

Cada técnica tiene ventajas y desventajas, la técnica de RNAi vía inyección es precisa y eficiente, pero únicamente puede realizarse con una cantidad limitada de gusanos, y requiere de equipos costosos y específicos para esta técnica. La metodología de RNAi por remojo permite realizar el silenciamiento a una escala algo mayor y es menos invasiva, pero es más lenta y puede ser menos eficiente. La técnica de RNAi vía alimentación también es más lenta y requiere el paso de varios días, pero permite hacer silenciamientos a escala mayor que las otras dos técnicas. Esto la convierte en una metodología útil para estudiar *splicing* y expresión de genes, ya que se requieren cientos de gusanos para extraer una cantidad analizable de RNAs.

Objetivos e Hipótesis

Este trabajo está enmarcado en un proyecto, cuyo objetivo general es estudiar la regulación del *splicing* alternativo a nivel de organismos enteros, en este caso utilizando a *C. elegans*.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Estudiar el efecto de dos drogas que afectan la elongación de la transcripción sobre el *splicing* alternativo de los genes *hrpf-1* y *uaf-1* de *C. elegans*. Se busca estudiar el efecto de camptotecina, que inhibe a la DNA topoisomerasa I afectando negativamente la elongación de la transcripción, y tricostatina A, que inhibe deacetilasas de histonas, afectando de manera positiva la elongación.
- Poner a punto la técnica de RNAi vía alimentación en el laboratorio, usar la misma para el silenciamiento de los factores de elongación de la transcripción PAFO-1, RTFO y TFIIS, y finalmente estudiar el efecto de silenciar estos factores sobre el *splicing* alternativo de *hrpf-1*, *uaf-1* y distintos genes con microexones.

Nuestra hipótesis general es que el *splicing* alternativo en algunos genes de *C. elegans* es regulado por la elongación de la transcripción.

Materiales y Métodos

Mantenimiento y crecimiento de *C. elegans*

Se utilizaron gusanos de la cepa N2 (*wt*), crecidos en placas de Petri. Se utilizó agar NGM (*Nematode growth medium*) como medio, y la cepa de *E. coli* OP50 para alimentarlos. Se realizaron pasajes a placas nuevas semanalmente mediante el corte de un *chunk* de agar, para mantener a los gusanos. Las placas se mantuvieron en una cámara a 20 °C.

Sincronización de embriones

Para conseguir gusanos sincronizados en el mismo estadio, se usó la técnica de *Egg prep*. Se pasan gusanos de las placas de Petri a tubos falcon con agua destilada. Se centrifugan a 1250 g por 2 minutos, y al pellet con gusanos se le agrega una solución de lavandina, NaOH 10 M, y agua. Se ven los gusanos bajo una lupa hasta ver el punto en el que no haya gusanos visibles y únicamente se vean huevos. En ese punto, se realizan lavados con buffer M9 para quitar la lavandina. Se dejan los huevos en M9 en un shaker *overnight*, o se siembran en placas de Petri y se guardan a 20 °C.

Experimentos con Camptotecina y Tricostatina A

Utilizando larvas sincronizadas en el estadio L1, en buffer M9, se les agregó camptotecina (CPT) en concentraciones de 10 μ M, 30 μ M y 90 μ M y DMSO como vehículo; o tricostatina A (TSA) en una concentración de 90 μ M y DMSO como vehículo, usando triplicados para cada condición. 24 horas después, se cosecharon las larvas y se les realizó una extracción de RNAs. Se utilizaron aproximadamente 5.000 larvas por cada réplica en el experimento.

Análisis de *splicing* alternativo y de expresión

Extracción de RNAs

Para extraer el RNA de los gusanos, se usó TRIzol (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para romper el tejido de los gusanos, luego del agregado de TRIzol se utilizaron shocks de congelado y descongelado utilizando nitrógeno líquido y un bloque térmico a 37 °C. Luego se continuó con las instrucciones del producto. Para analizar la calidad y concentración de los RNAs se utilizó un Nanodrop (Thermo Fisher).

Retrotranscripción

Se realizó una retrotranscripción de los RNAs extraídos con el siguiente protocolo:

Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

RNA (aproximadamente 500 ng, volumen final 4 μ l

0,5 μ l de oligo dT (oligo de 12-18 nucleótidos) 0,5 μ g/ μ l

0,5 μ l de dNTPs 10 mM

Se procede con el siguiente protocolo:

- Desnaturalización a 65°C por 5 minutos.
- Pasaje rápido a hielo por al menos un minuto.
- Agregado de 5 μ l de la mezcla de reacción a cada tubo.

La mezcla está compuesta por:

2 μ l de buffer 5X de RT (Invitrogen)

1 μ l de DTT 100 mM

0,25 μ l de RNase OUT 40 U/ μ l (inhibidor de RNAsas de Invitrogen)

0,4 μ l de enzima (MMLV-RT 200 U/ μ l, Invitrogen)

H₂O hasta completar volumen final de 5 μ l

- Incubación a 35-37 °C por 30 minutos para que proceda la retrotranscripción.
- 70 °C por 10 min para detener la reacción por desnaturalización de la enzima.

El producto de esta reacción es el cDNA que servirá de molde para las siguientes reacciones de PCR.

PCR de punto final

Se realizaron PCRs de punto final para distintos eventos, a partir de cDNA con el siguiente protocolo:

Se agregan:

2,5 µl de de cDNA

22,5 µl de la mezcla de reacción

La mezcla se compone de:

2,5 µl de Buffer de PCR 10 X

3 µl de MgCl₂ 25 mM

0,5 µl de dNTPs 10 mM

0,5 µl de primer Forward 10 µM

0,5 µl de primer Reverse 10 µM

0,1 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Inbiohighway)

H₂O hasta llegar a 25 µl (15,4 µl)

Luego de realizar la PCR de punto final, se separaron los productos corriéndolos en geles de agarosa 1% o de poliacrilamida 6%, con el agregado de bromuro de etidio. Se utilizó luz UV para revelar al gel, y se cuantificaron los cambios de *splicing* alternativo. Para ello se cuantificó la intensidad de las bandas con el *software* ImageJ, y se calculó el índice de *splicing*, definido como la intensidad de la Isoforma Larga/Total de Isoformas.

PCR en tiempo real

Para evaluar los niveles de RNA mensajero expresados en las distintas condiciones, se realizaron PCRs de tiempo real. Paralelamente a las muestras se realizó una curva de calibración, compuesta de 10 diluciones sucesivas al medio a partir de una dilución de una mezcla de todas las muestras a medir. Cada una de las muestras se diluyó entre 1:10 y 1:50 para que entre en el rango medio de la curva de calibración.

Mezcla de reacción de PCR que se agrega a una dilución del cDNA:

- 2,5 µl de buffer de PCR 10 X
- 4 µl de MgCl₂ 50 mM
- 0,5 µl de primers (directo y reverso) 20 µM
- 0,5 µl de dNTPs 10 mM
- 0,15 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (Inbiohighway)
- 0,025 µl de SyBR Green (Roche) dilución 1/30 en DMSO del stock
- H₂O hasta completar volumen final de 25 µl

Pedido de bacterias RNAi

Las cepas de *E. coli* transformadas con vectores de expresión de dsRNAs fueron pedidas de la *RNAi by feeding library* de la Dra. Julie Ahringer. Se pidieron cepas que expresen dsRNAs contra los siguientes targets: *pafo-1*, *rtfo-1*, *tfiis*, *ama-1* y un vector vacío. La Dra. Luisa Cochella posee una colección de esta *library*, y las bacterias fueron provistas por ella. La cepa de bacterias que expresan dsRNAs de *elt-2* fue provista por la Dra. Gisela Franchini.

Verificación de plásmidos RNAi

Mini preparación de DNA plasmídico

Se corroboró el estado de los plásmidos realizando una extracción de DNA plasmídico de las bacterias transformadas, en base al siguiente protocolo:

- Se parte de un minicultivo de 2,5 ml en LB.
- Se centrifuga y el sobrenadante se resuspende en 100 µl de Solución 1.

La Solución 1 consiste en:

Glucosa 50 mM

Tris-Cl 25 mM

EDTA 10 mM

- Se agregan 200 µl de Solución 2.

La Solución 2 consiste en:

NaOH 0,2 M

SDS 1%

- Se agregan 150 µl de Solución 3 y luego se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto, guardando el sobrenadante.

La Solución 3 consiste en:

AcOK 5 M

Ácido acético glacial 3 M

- Se agrega un volumen equivalente de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico [25:24:1] al sobrenadante.
- Se centrifuga 15 minutos a máxima velocidad.
- Se agrega 0,1x del volumen, de AcONa 3M a la fase acuosa.
- Se agrega 0,7x del volumen, de isopropanol y se centrifuga a máxima velocidad por 15 minutos.
- Se agregan 150 µl de etanol 70% y se centrifuga a máxima velocidad por 10 minutos.
- Se resuspende el pellet seco en 30 µl de H₂O mq.

Secuenciación de plásmidos

Para verificar que los plásmidos obtenidos contengan la secuencia de los genes target que se esperan, se secuenciaron los distintos plásmidos luego de realizar la mini preparación (MacroGen). Con los resultados de la secuenciación se realizaron análisis de BLAST utilizando el software de NCBI para corroborar la complementariedad de las secuencias con los genes target.

RNAi vía alimentación

Los pasos realizados para poner a punto la técnica de RNAi vía alimentación se detallan a continuación:

Se parte de gusanos no sincronizados.

- Sincronización de embriones (*Egg prep*) donde al finalizarla se coloca a los huevos en placas sin césped.
- Pasaje de las larvas nacidas al día siguiente a placas con césped, para una sincronización más prolija.
- Se esperan 48 horas hasta el estadio L4.
- Pasajes individuales de L4s a placas sembradas previamente con bacterias transformadas con los vectores de interés, pasando por una placa sin césped para limpiarlos de bacterias sin transformar.

Las placas con bacterias transformadas están compuestas de:

NGM

IPTG 1 mM

Ampicilina 50 µg/ml

- 24 horas después, se cuentan los huevos por placa y se quitan los adultos.
- 48 horas después, se observan y se cuentan las larvas por placa.
- 12 horas después, se realiza una extracción de RNAs a las larvas en el caso que corresponda.

Se cuantificó la viabilidad de los gusanos silenciados calculando un cociente entre huevos presentes en las placas con bacterias transformadas, antes de quitar a los adultos, y larvas observadas 48 horas después.

Resultados

Camptotecina y Tricostatina A

Para estudiar si la elongación de la transcripción regula el *splicing* alternativo en *C. elegans*, realizamos experimentos utilizando camptotecina (CPT). La CPT inhibe a la DNA topoisomerasa I, causando una reducción en la elongación de la transcripción (Ljungman & Hanawalt, 1996).

Partimos de gusanos sincronizados en el estadio L1. Luego, se agregó camptotecina (CPT) de manera de tener triplicados con las siguientes concentraciones: 10 μ M, 30 μ M y 90 μ M además del control al que se le agregó únicamente vehículo (DMSO). Al día siguiente se extrajo el RNA de las larvas, y se realizó una RT-PCR con *primers* para los eventos *hrpf-1* y *uaf-1*. Se corrió el cDNA resultante en un gel de agarosa y se cuantificaron los índices de *splicing* (figuras 5 y 6).

Efecto de CPT sobre *splicing* alternativo de *hrpf-1*

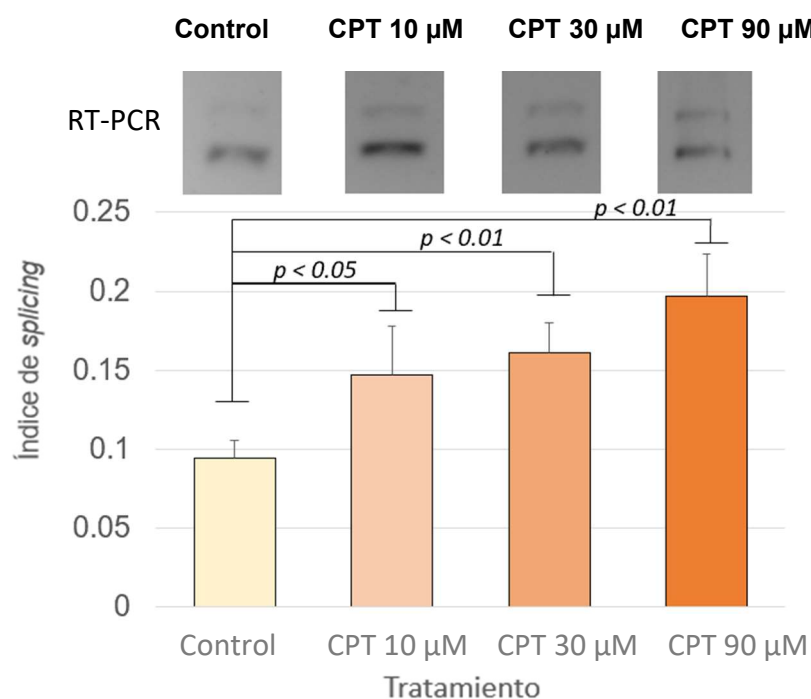


Figura 5. Efecto de camptotecina sobre el *splicing* de *hrpf-1*. En la parte superior se observa una imagen representativa de la RT-PCR corrida en un gel de agarosa. En la parte inferior se cuantifica el índice de *splicing*. Se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de T de Student con respecto al control (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Se observa un incremento en el índice de *splicing* a mayores concentraciones de CPT, es decir un aumento en la inclusión del exón alternativo de *hrpf-1* ($p < 0.05$). Esto, además, se observa a simple vista en el gel de agarosa.

Por otro lado, en el caso de *uaf-1* (figura 6) el agregado de camptotecina no pareció afectar la inclusión del exón alternativo, no se observan cambios en el índice de *splicing* ni en el patrón de isoformas en el gel de agarosa.

Efecto de CPT sobre *splicing* alternativo de *uaf-1*

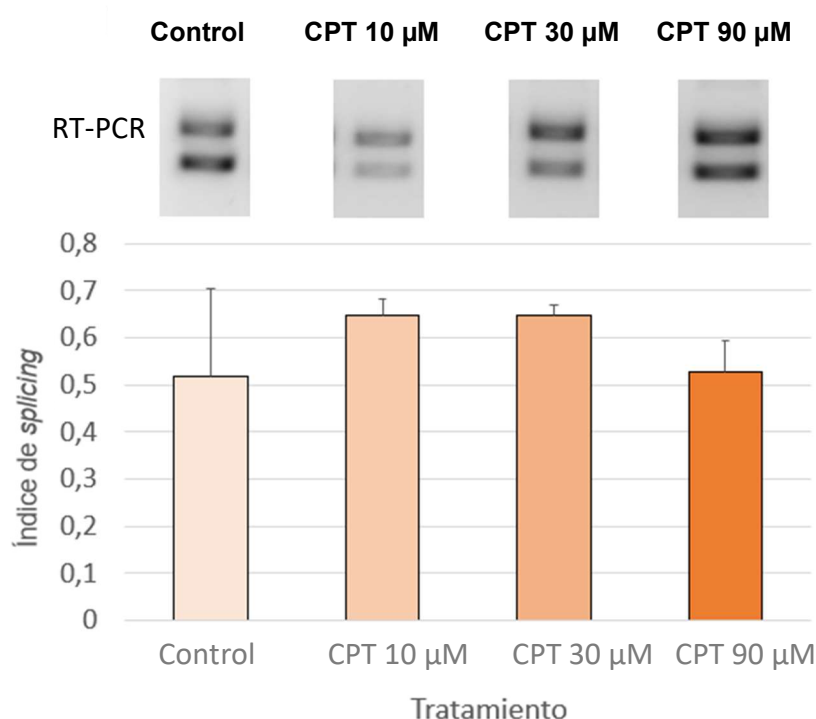


Figura 6. Efecto de camptotecina sobre el *splicing* de *uaf-1*. En la parte superior se observa una imagen representativa de la RT-PCR corrida en un gel de agarosa. En la parte inferior se cuantifica el índice de *splicing*. Se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de T de Student con respecto al control.

Para estudiar si la estructura de la cromatina regula el *splicing* alternativo en *C. elegans*, realizamos experimentos utilizando tricostatina A (TSA). La TSA inhibe deacetilasas de histonas, causando una mayor elongación de la transcripción al provocar que la cromatina esté más laxa. Es decir, provoca el efecto opuesto a CPT sobre la elongación de la transcripción (Godoy Herz et al., 2019).

Realizamos el experimento con TSA de manera de tener ahora dos condiciones: triplicados con TSA 90 μM y con vehículo (DMSO). Nuevamente, a partir de RT-PCRs con *primers* para *uaf-1* y *hrpf-1* corridas en un gel de agarosa, se calcularon los índices de *splicing* (figuras 7 y 8)

Efecto de TSA sobre *splicing* alternativo de *hrpf-1*

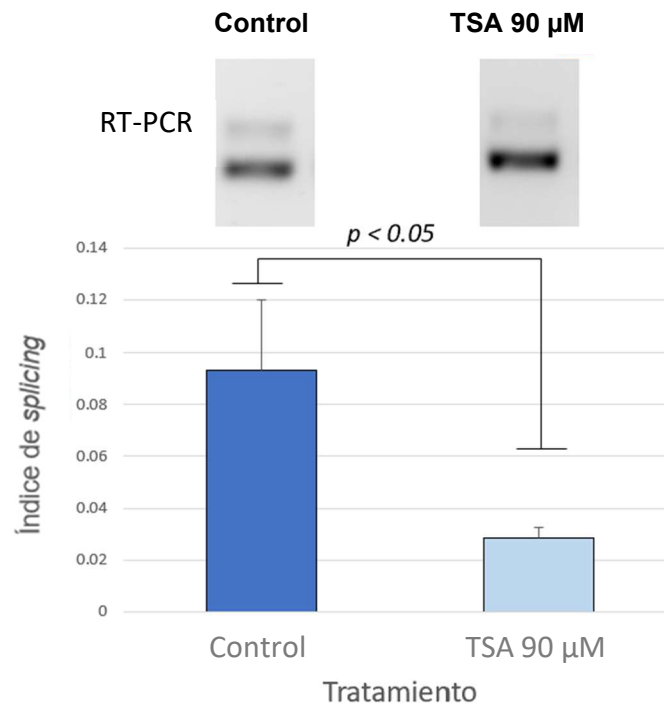


Figura 7. Efecto de TSA sobre el *splicing* de *hrpf-1*. En la parte superior se observa una imagen representativa de la RT-PCR corrida en un gel de agarosa. En la parte inferior se cuantifica el índice de *splicing*. Se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de *T* de Student ($p < 0.05$).

Al contrario que con lo observado con CPT, el agregado de TSA 90 μM reduce el índice de *splicing* calculado para *hrpf-1*, es decir que disminuye la inclusión del exón alternativo de *hrpf-1* ($p < 0.05$). Esto nuevamente se observa en el gel de agarosa, en donde la intensidad de la isoforma de mayor tamaño parece reducirse mientras que la intensidad de la isoforma de menor tamaño aumenta.

Para el caso del evento *uaf-1* (figura 8), el agregado de TSA 90 μ M tampoco parece afectar al patrón de isoformas de *splicing*, ninguna de las dos drogas utilizadas mostró un cambio en el *splicing* de *uaf-1*.

Efecto de TSA sobre *splicing* alternativo de *uaf-1*

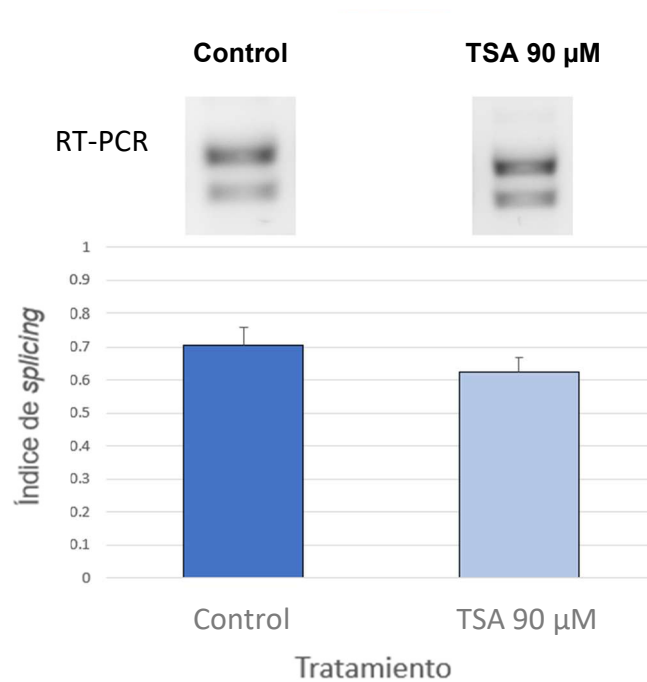


Figura 8. Efecto de TSA sobre el *splicing* de *uaf-1*. En la parte superior se observa una imagen representativa de la RT-PCR corrida en un gel de agarosa. En la parte inferior se cuantifica el índice de *splicing*. Se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de T de Student.

RNAi vía alimentación

Para aprender el paso a paso de la técnica de RNAi vía alimentación, realizamos una pasantía de una semana en el laboratorio de la Dra. Gisela Franchini, en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata. Durante la pasantía, hicimos un experimento ejemplo de RNAi vía alimentación, utilizando bacterias transformadas con vectores a modo de control. Utilizamos vectores que expresaban dsRNAs de *elt-2*, *dpy-11*, o un vector vacío (empty). Los dsRNAs *elt-2* y *dpy-11* son controles comunes para esta técnica. *elt-2* codifica para un factor de transcripción involucrado en desarrollo larval de diferentes estructuras incluyendo el intestino, mientras que *dpy-11* codifica para una proteína asociada al desarrollo de la cutícula y a la morfogénesis del cuerpo de los gusanos. Si el silenciamiento funcionó correctamente, deberían verse fenotipos típicos y fáciles de observar: los gusanos en las placas *elt-2* deberían encontrarse en un número reducido y con un tamaño más pequeño, comparados con la placa control; mientras que los de las placas *dpy-11* deberían verse más cortos y anchos que los de la placa control. El protocolo llevado a cabo y posteriormente puesto a punto en el laboratorio se muestra en la figura 9.

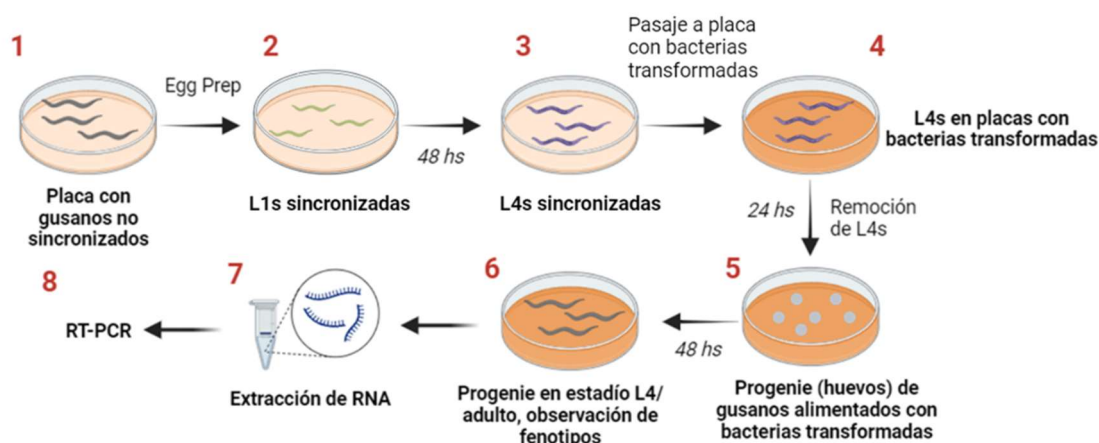


Figura 9. Metodología seguida para realizar los experimentos de RNAi vía alimentación. Las placas con coloración naranja fuertes representan a las placas con bacterias que expresan los dsRNAs.

A partir de placas con gusanos sin sincronizar, se realiza un *Egg Prep* (preparación de embriones sincronizados). Para que la sincronización sea más prolija, pueden dejarse los huevos en una placa sin comida, y al día siguiente, luego de la eclosión de las larvas

L1, pasarlas a una placa con comida para que se desarrollen a partir de ese punto. Cuando las larvas llegan al estadio L4, se las pasa individualmente a placas con bacterias transformadas con los RNAi deseados. Los gusanos van a alimentarse de las bacterias transformadas, incorporando los dsRNAs y pasándolos a la progenie. Al día siguiente se cuentan los huevos que pusieron los gusanos en cada placa, y se retira a los adultos de modo que solo queden los huevos. Finalmente, dos días después se observan los fenotipos de la progenie, se corroboran los controles, y al día siguiente se realiza una extracción de RNA.

En La Plata, logramos ver parcialmente el fenotipo esperado en las placas con dsRNAs de *elt-2*, observamos gusanos más pequeños y en menor cantidad. Sin embargo el dsRNA de *dpy-11* no pareció afectar a los gusanos, y no observamos el fenotipo esperado de gusanos más cortos y anchos.

Una vez aprendida la técnica, para realizar experimentos de silenciamiento en nuestro laboratorio se pidieron bacterias transformadas de la *RNAi by feeding library* de la Dra. Julie Ahringer, que expresen dsRNAs con los siguientes targets: *pafo-1*, *rtfo-1*, *tftis*, *ama-1*, y un vector vacío (*Empty*). Las bacterias fueron provistas por la Dra. Luisa Cochella, que posee una colección de esta library. Además, luego de aprender la técnica en La Plata, la Dra. Franchini nos dio una alícuota de bacterias que expresan el dsRNA de *elt-2*. A partir de las bacterias enviadas, se realizó una mini preparación de DNA plasmídico para purificar los vectores. Se digirió a los plásmidos con Hind-III y se los corrió en un gel de agarosa, para verificar la presencia del inserto con el dsRNA en cada caso (figura 10). En cada caso se encontró el inserto del tamaño esperado luego de la digestión con la enzima de restricción.

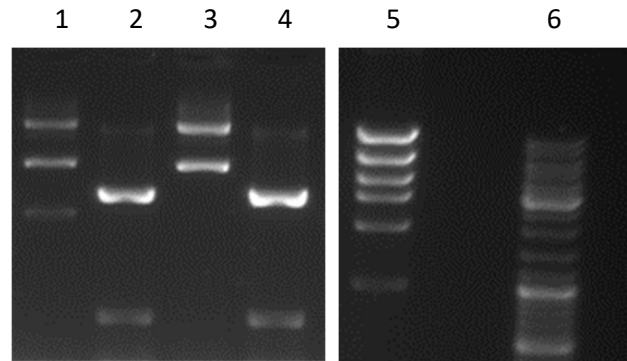


Figura 10. Plásmidos con dsRNAs corridos en un gel de agarosa. Se muestra un ejemplo para *rtfo-1*. En las calles 1 y 3 se encuentra el plásmido sin digerir, en las calles 2 y 4 se encuentra el plásmido digerido. La calle 5 es un marcador de masa, y la calle 6 es un marcador de peso molecular.

A continuación, se secuenciaron los plásmidos; y una vez obtenidas las secuencias se realizó un BLAST para corroborar que las secuencias de los dsRNAs únicamente tengan como objetivo a los genes esperados (*tfiis*, *rtfo-1*, *pafo-1*, y *ama-1*) (figura 11). Todas las secuencias mostraron complementariedad con su target esperado. Se muestran los resultados para una de ellas a modo de ejemplo.



Figura 11. A: Se secuenciaron los plásmidos de las distintas bacterias transformadas. Se muestra el cromatograma correspondiente al plásmido con la secuencia del dsRNA *tfiis*. B: Para cada secuencia obtenida, se realizó un alineamiento. Se muestra el resultado del alineamiento para la secuencia obtenida con el vector con *tfiis*.

Como primer paso, realizamos una puesta a punto del protocolo utilizando bacterias transformadas con el vector vacío, con los controles positivos *elt-2*, y *ama-1*, una de las subunidades de la RNA polimerasa II, también usado como control positivo de RNAi. Para estudiar si el silenciamiento funcionó correctamente se midió el nacimiento de la progenie (figura 12) y se observaron los fenotipos en general (figura 13).

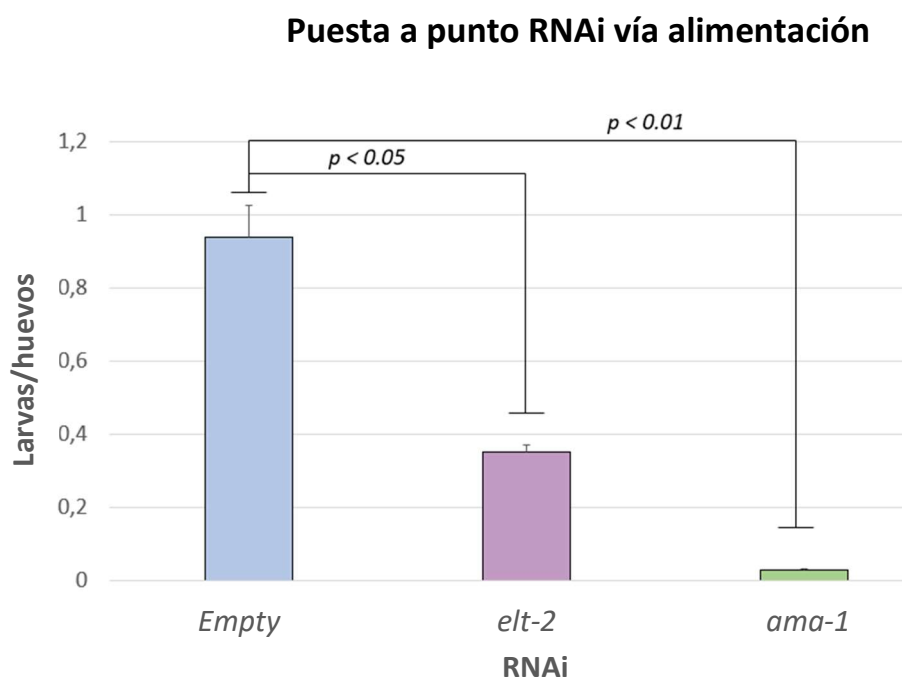


Figura 12. Se graficó el cociente entre huevos puestos y larvas observadas 48 hs luego de retirar los L4s de placas con vector vacío (*empty*), dsRNAs de *elt-2*, y dsRNAs de *ama-1*. Se muestra la media + desvío estándar ($n=2$) y se realizó un test de T de Student (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; todas las comparaciones se realizaron con el vector vacío).

El nacimiento de la progenie se midió como un cociente entre las larvas 48 horas luego de retirar a los L4s, y los huevos observados justo antes de retirarlos. En las placas con bacterias transformadas con el vector *empty*, como era de esperarse, la gran mayoría de los huevos eclosionó, se observó un cociente cercano a 1. En las placas con bacterias que expresaban dsRNAs de *elt-2*, nació una proporción significativamente menor de larvas que en las placas *empty* ($p < 0.05$), cercano a 0,4. Por último, en las placas con bacterias que expresaban dsRNAs de *ama-1* nuevamente se calculó un cociente significativamente menor que en las placas *Empty* ($p < 0.01$), prácticamente nulo. Estos resultados concuerdan con lo esperado para los controles utilizados en la puesta a punto.

Además, se tomaron imágenes de las placas con un aumento de 20x (figura 13). Las placas *Empty* contenían gusanos con el tamaño aproximado de larvas L4; mientras que las placas *elt-2* contenían menos gusanos y estos eran más pequeños, cercanos al tamaño de larvas L1. Las placas *ama-1* prácticamente no contenían gusanos, y se observaron huevos sin eclosionar.

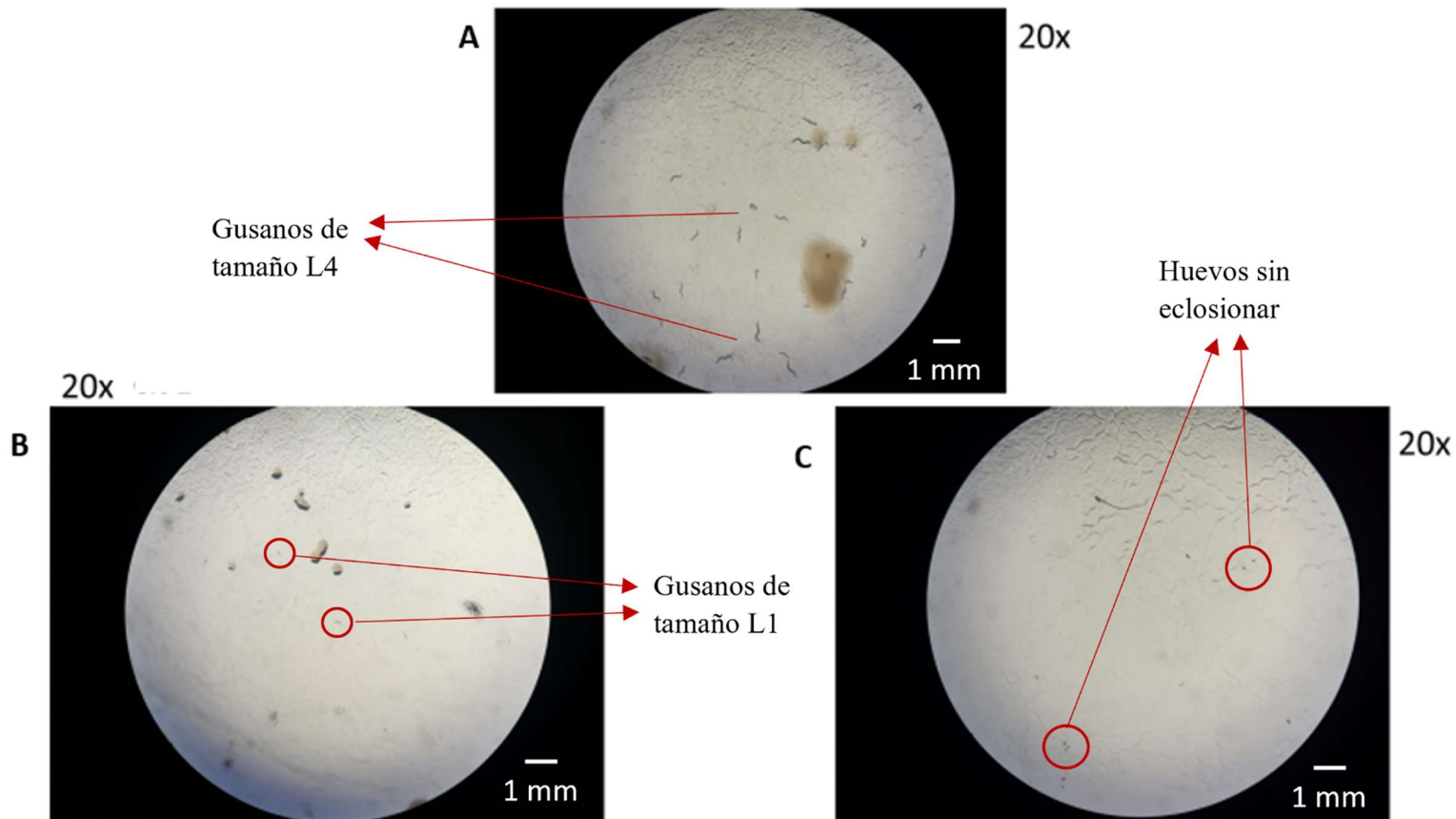


Figura 13. Imágenes representativas de las placas con la progenie 48 hs luego de retirar los L4s. A: Placa con vector vacío (*empty*). B: Placa con dsRNAs de *elt-2*. C: Placa con dsRNAs de *ama-1*. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 20x. Las imágenes A y B presentan algunas gotas de *E. coli*, que no afectaron al fenotipo de los gusanos.

Se utilizó la técnica de RNAi vía alimentación, con el procedimiento puesto a punto, para silenciar factores de elongación de la transcripción. Se eligió silenciar a los genes *pafo-1*, *rtfo-1* (ambos genes son homólogos de componentes del complejo Paf1/RNA Polimerasa II en humanos), y *tfiis* (factor de elongación TFIIS). Elegimos silenciar estos factores ya que hay antecedentes de cambios en *splicing* alternativo al silenciar TFIIS en plantas (Godoy Herz et al., 2019), y el complejo Paf1 tiene como

función principal regular la elongación de la transcripción, y se asocia con la RNAPII. En este caso, se utilizó el control *ama-1*, que en la puesta a punto resultó en un fenotipo muy fácil de observar. Nuevamente se calculó el cociente entre larvas observadas y huevos puestos (figura 14).

Efecto de silenciar factores de elongación sobre nacimiento de larvas

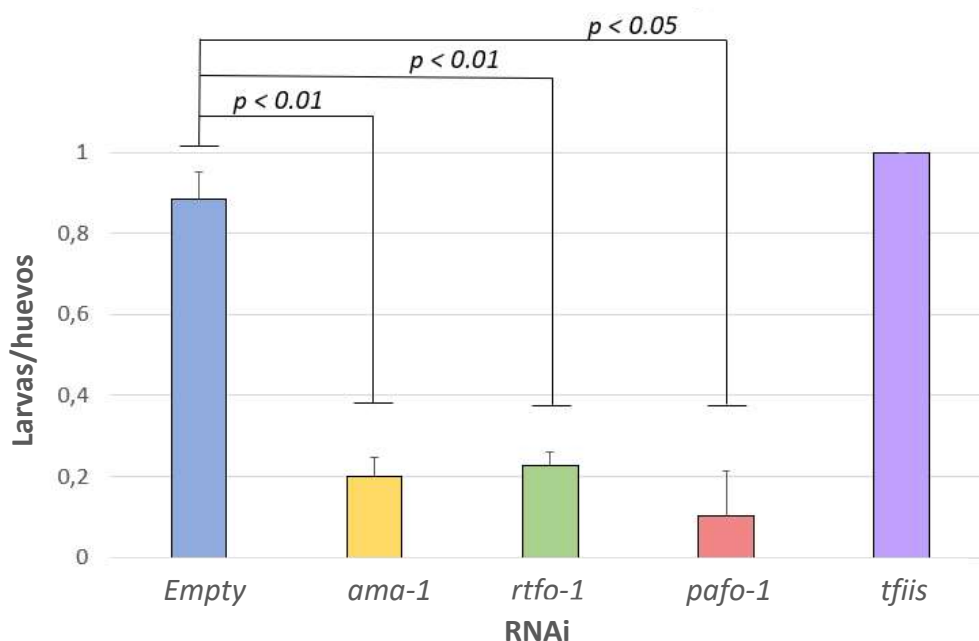


Figura 14. Se graficó el cociente entre huevos puestos y larvas observadas 48 hs luego de retirar los L4s de placas con céspedes de bacterias con dsRNAs de *ama-1*, *pafo-1*, *rtfo-1*, *tfiis*, y vector vacío. Se muestra la media + desvío estándar ($n=2$) y se realizó un test de T de Student ($p < 0.05$ en todos los casos; todas las comparaciones se realizaron con el vector vacío).

Nuevamente se observó una disminución significativa en las larvas nacidas entre las placas *Empty* y *ama-1* ($p < 0.01$). Tanto el silenciamiento de *pafo-1* como el de *rtfo-1* causaron un efecto similar al de silenciar *ama-1*, reduciendo significativamente la proporción de larvas nacidas, quedando en las placas múltiples huevos sin eclosionar ($p < 0.01$ para *rtfo-1* y $p < 0.05$ para *pafo-1*). Sin embargo, el silenciamiento de *tfiis* no pareció afectar significativamente al nacimiento o tamaño de las larvas.

Se repitió el experimento únicamente utilizando el RNAi *tfiis* y el RNAi *ama-1* como control, aumentando la cantidad de réplicas a 3. Se midió el nacimiento de larvas (figura 15).

Efecto de silenciar *tffiis* sobre nacimiento de larvas

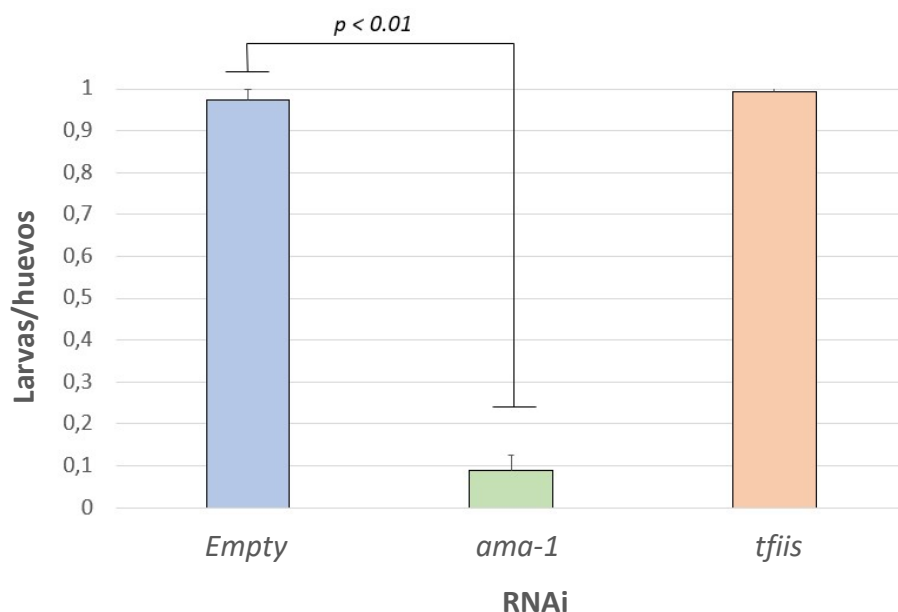
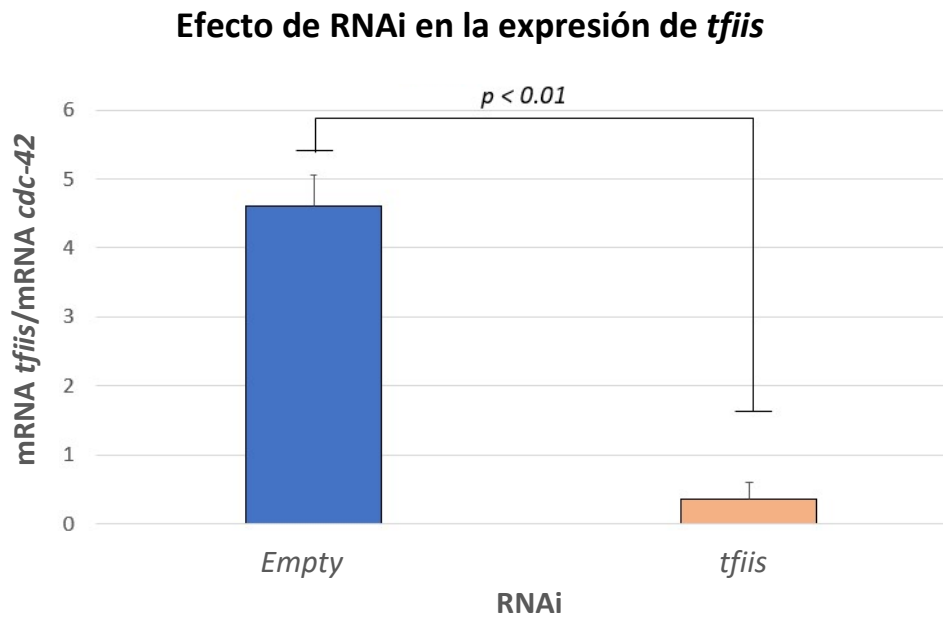


Figura 15. Se graficó el cociente entre huevos puestos y larvas observadas 48 hs luego de retirar los L4s de placas con bacterias con dsRNAs de *ama-1* y *tffiis*, y un vector vacío. Se muestra la media + desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de *T* de Student ($p < 0.01$ entre placas con dsRNAs de *ama-1* y vector vacío).

Como ocurrió anteriormente, *ama-1* correctamente redujo el nacimiento de larvas ($p < 0.01$), pero el silenciamiento de *tffiis* mostró el mismo fenotipo que los gusanos en las placas *Empty*.

A partir de los RNAs de los gusanos en las placas *Empty* y *tffiis*, se realizó una RT y una qPCR para medir la expresión de *tffiis* y corroborar que el silenciamiento haya sido exitoso (figura 16). Se comparó la expresión de *tffiis* con la del gen *housekeeping cdc-42*.



*Figura 16. Niveles de expresión del mRNA *tfiis* en gusanos silenciados con plásmidos control o con dsRNAs contra el gen. Se realizó una qPCR y se cuantificó la expresión del gen *tfiis* sobre la expresión del gen housekeeping *cdc-42*.*

La expresión de *tfiis* disminuyó significativamente en los gusanos de la placa *tfiis* ($p < 0.01$). Esto corroboró el éxito de la técnica en silenciar a este factor de elongación, sin afectar a la viabilidad de los gusanos.

Efecto de silenciar *tfiis* en *splicing* alternativo

A partir de los RNAs extraídos de gusanos de placas *tfiis* y *Empty*, se midió el cambio en los patrones de isoformas de los genes *hrpf-1* y *uaf-1*. Se realizó una RT-PCR, corrida en geles de agarosa, y se cuantificaron los índices de *splicing* en los gusanos control y con *tfiis* silenciado (figura 17)

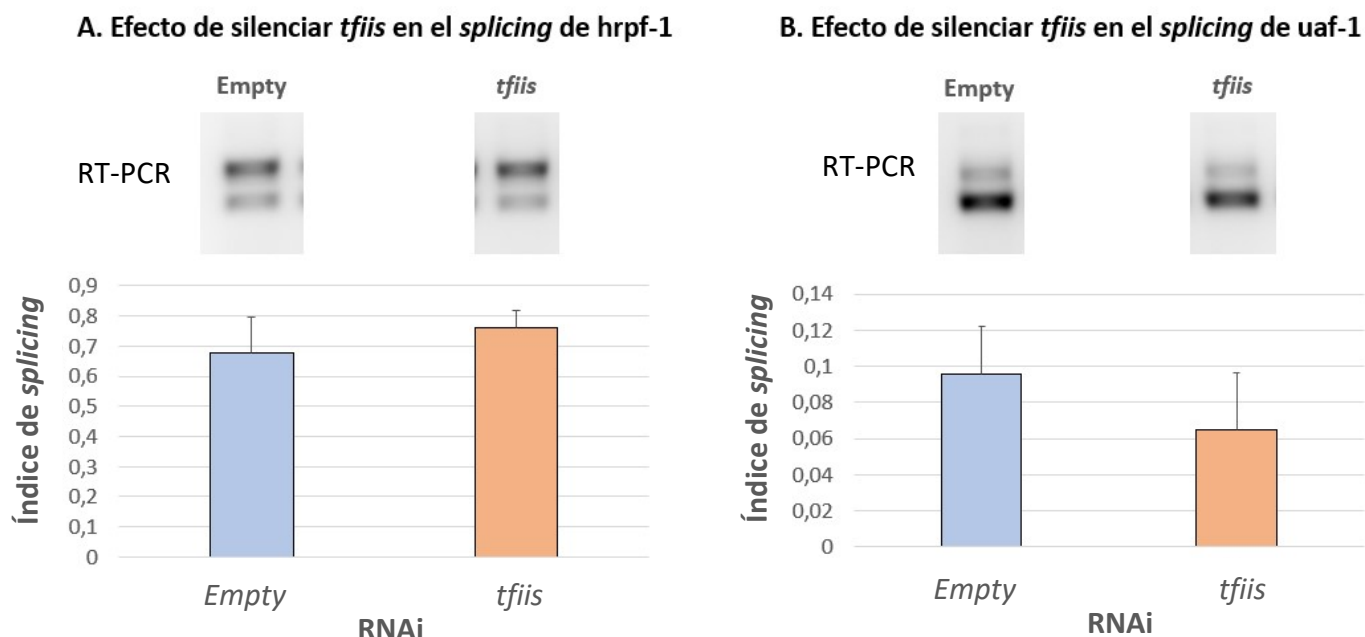


Figura 17. Efectos de silenciamiento de *tfiis*. En la parte superior se observan imágenes representativa de las RT-PCRs corridas en un gel de agarosa. A: Cuantificación del índice de *splicing* del evento *hrpf-1* en gusanos control o con *tfiis* silenciado. B: Cuantificación del índice de *splicing* del evento *uaf-1* en gusanos control o con *tfiis* silenciado. Para cada uno, se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de T de Student.

Contrariamente a lo que ocurrió con CPT o TSA en larvas L1, silenciar *tfiis* no tuvo un efecto significativo en la proporción de isoformas de *hrpf-1*, y tampoco se observa ningún cambio con las isoformas de *uaf-1*.

Además, se realizaron RT-PCRs para un panel de 7 eventos de microexones y exones pequeños alternativos, se corrieron en geles de poliacrilamida y se calculó su índice de *splicing* en gusanos de placas *Empty* y *tfiis* (figuras 18 y 19). Como se mencionó en la introducción, estos son eventos de *splicing* de tipo exón cassette, de tamaño menor a 27 pb, y suelen estar enriquecidos en genes de expresión neuronal.

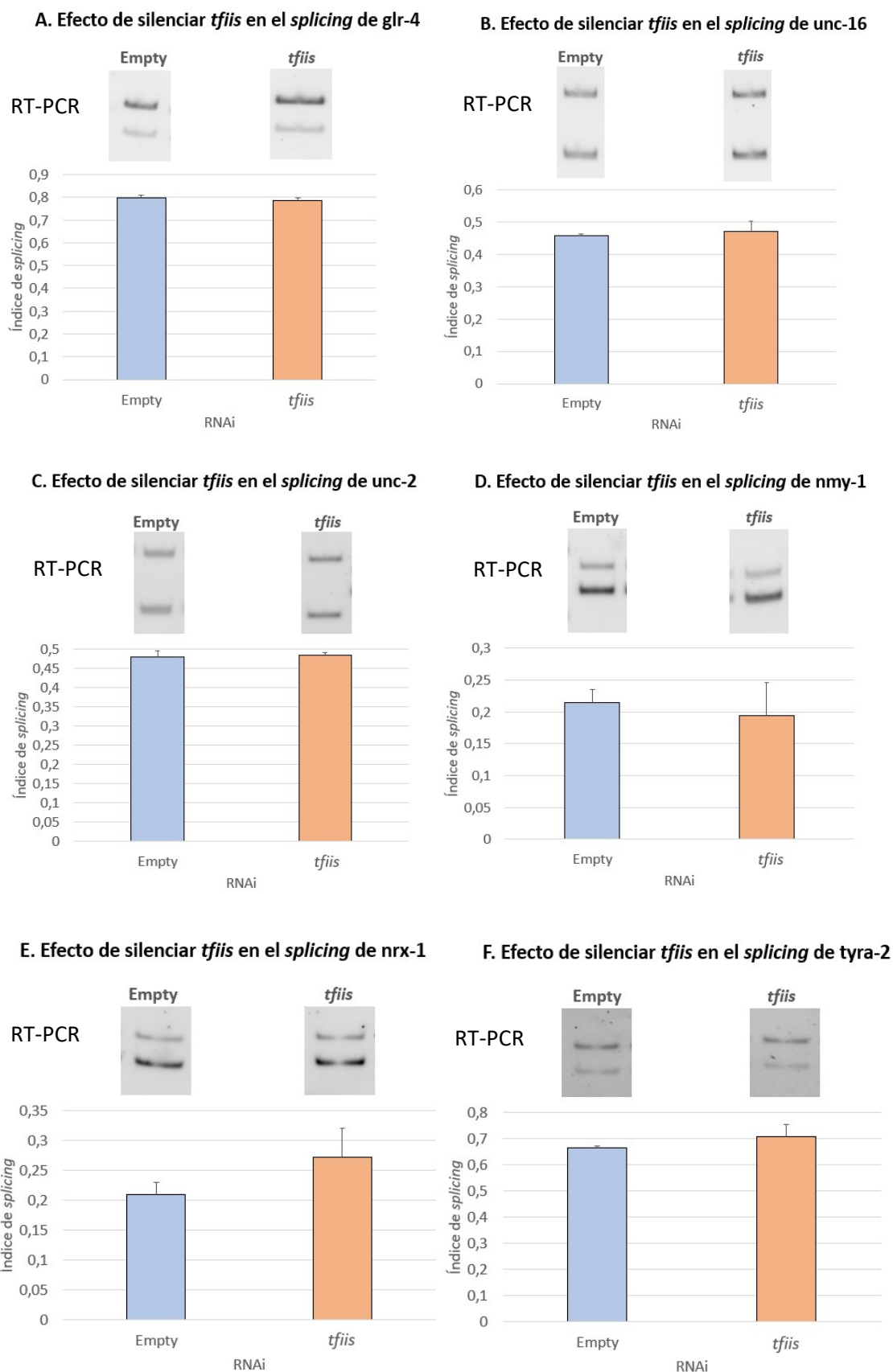


Figura 18. Efectos de silenciamiento de *tfiis* en eventos de microexones. En todos los casos, en la parte superior se observan imágenes representativa de las RT-PCRs corridas en un gel de agarosa. En la parte inferior, se cuantificó el índice de *splicing* en gusanos de placas Empty o *tfiis*. Se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de T de Student. A: microexón de *glr-4*. B: microexón de *unc-16*. C: microexón de *unc-2*. D: microexón de *nmy-1*. E: microexón de *nrx-1*. F: microexón de *tyra-2*.

Efecto de silenciar *tfiis* en el *splicing* de *kvs-5*

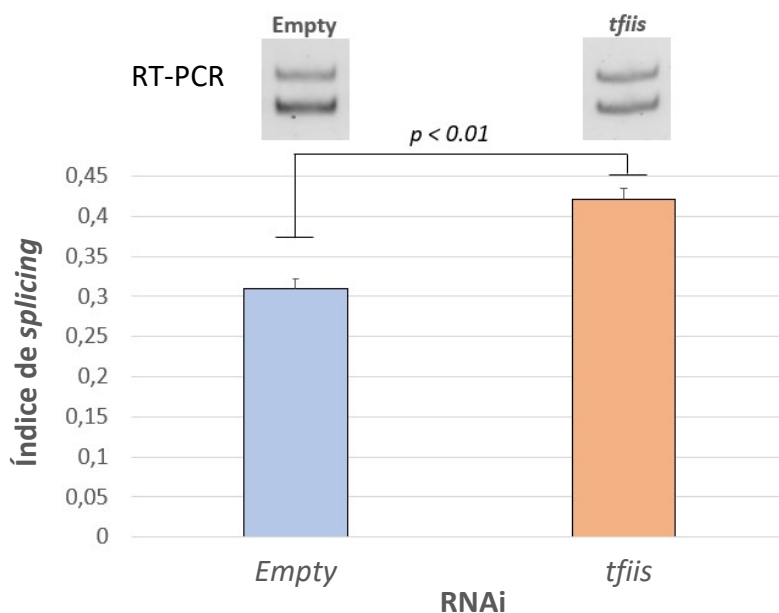


Figura 19. Efectos de silenciamiento de *tfiis* en el evento *kvs-5*. en la parte superior se observan imágenes representativa de las RT-PCRs corridas en un gel de agarosa con una condición control y otra silenciando *tfiis*. En la parte inferior, se cuantificó el índice de *splicing*. Se graficó la media + el desvío estándar ($n=3$) y se realizó un test de T de Student ($p < 0.01$).

Los eventos *glr-4*, *unc-2*, *unc-16*, *nmy-1*, *tyra-2* y *nrx-1* no presentaron cambios en su *splicing* alternativo en gusanos control o con *tfiis* silenciado, similar a lo observado con *hrpf-1* y *uaf-1*. El evento *kvs-5*, sin embargo, que también posee un microexón alternativo, sí mostró diferencias significativas (figura 19). Al silenciar *tfiis*, la inclusión del microexón alternativo aumentó alrededor de un 30% ($p < 0.01$). Se observa en la parte superior que en la condición control la isoforma de menor tamaño se encuentra en una proporción mayor que la isoforma con tamaño más grande, mientras que en los gusanos con *tfiis* silenciado ambas isoformas parecen encontrarse en una proporción similar.

Discusión y Conclusiones

En la primera parte del trabajo, se estudió si la camptotecina o la tricostatina A provocaban cambios en el *splicing* alternativo, para entender si la elongación de la transcripción puede regular el *splicing* en *C. elegans*. En la segunda parte se puso a punto la técnica de RNAi vía alimentación, y se la utilizó para silenciar los factores de elongación *tfts*, *pafo-1* y *rtfo-1*. En esta sección se van a discutir los resultados presentados anteriormente en el contexto de la bibliografía conocida y la metodología utilizada; y reflexionar sobre cómo continuarán estos experimentos.

Como se observó en las figura 5, el agregado de camptotecina, que inhibe la DNA topoisomerasa I y de esta manera reduce la elongación de la transcripción, provocó un aumento en la inclusión del exón alternativo del gen *hrpf-1*. Por otro lado, el agregado de tricostatina A, que tiene un efecto opuesto sobre la elongación de la transcripción al inhibir deacetilasas de histonas, provocó una disminución de la inclusión del exón alternativo del mismo gen (figura 7). Además de los efectos individuales de cada droga sobre el *splicing*, el hecho de que cambios opuestos en la velocidad de transcripción generen efectos opuestos en la inclusión de este exón sugiere que efectivamente el *splicing* alternativo del gen *hrpf-1* puede ser regulado por la elongación transcripcional. Estos mismos cambios no fueron observados en el *splicing* alternativo del gen *uaf-1*, lo que parece mostrar que este tipo de regulación ocurriría solo en ciertas poblaciones de genes. Sería útil estudiar los efectos de estas drogas sobre el *splicing* en más eventos, de manera más global, para entender cuán común es este mecanismo.

Estos resultados resultan útiles para reflexionar sobre la existencia de mecanismos de acoplamiento entre transcripción y *splicing* en *C. elegans*, a nivel del organismo entero. Sería interesante realizar experimentos para evaluar si este mecanismo de regulación está involucrado en respuestas a estímulos ambientales, como por ejemplo los cambios en las isoformas de *hrpf-1* debidas a la presencia de comida, que se habían discutido en la Introducción.

Por otro lado, se puso a punto correctamente la técnica de RNAi vía alimentación. Los controles utilizados mostraron los fenotipos esperados y pudieron diferenciarse claramente del resto, y el control *ama-1* resultó altamente reproducible y eficiente. Como

se mencionó en la Introducción, esta técnica en particular permite realizar el silenciamiento a una escala mayor que las otras dos, y el número final de gusanos por réplica, que quedó en el orden de los cien a doscientos, fue suficiente para conseguir cantidades analizables de RNAs.

El uso de esta técnica para silenciar factores de elongación de la transcripción mostró que tanto el silenciamiento de los factores *rtfo-1* y *pafo-1* resultó en un fenotipo letal embrionario para los gusanos, como se vio en la figura 14. Esto resalta la importancia de estos factores para el organismo, y es muy probable que muchos genes tengan cambios en su regulación, incluyendo potencialmente cambios en su *splicing* alternativo. El efecto letal de estos silenciamientos, sin embargo, no permite estudiar cambios a nivel del RNA en los gusanos.

El silenciamiento de *tfiis*, contrariamente a lo que ocurrió con los otros dos factores, no resultó letal para los gusanos. Esto permitió analizar si la ausencia del factor provocó cambios en el *splicing* alternativo de distintos eventos. Como se observó en la figura 17, silenciar *tfiis* no afectó al *splicing* de *hrpf-1* ni de *uaf-1*. Si bien *hrpf-1* había mostrado cambios al afectar la elongación de la transcripción, es importante mencionar que los experimentos de camptotecina y tricostatina A se realizaron en larvas L1. Por otro lado, en los experimentos de silenciamiento, las extracciones de RNAs y posterior análisis de *splicing* alternativo se realizaron en gusanos de estadios de larvas L4. Esto se debe a los tiempos requeridos para observar los fenotipos de silenciamiento en los controles, por un lado, y a que el escalado del experimento para tener muchas larvas L1, suficientes para obtener una buena cantidad de RNA, es técnicamente muy complejo.

Entonces, es posible que para el caso de *hrpf-1* la regulación del *splicing* por elongación de la transcripción únicamente se vea en larvas L1 y no se observe en L4.

Otra posible explicación es que el factor *tfiis* no tenga una función demasiado relevante en este organismo y no afecte de manera significativa la elongación de la transcripción, lo cual también explicaría el fenotipo no letal en comparación a *rtfo-1* y *pafo-1*. Para desarrollar estas ideas, podrían realizarse experimentos con CPT y TSA para analizar si hay cambios en el *splicing* de *hrpf-1* en larvas L4. Intentar la inversa, silenciar *tfiis* y analizar cambios en larvas L1, es más dificultoso debido a la gran cantidad de L1s necesarias para una extracción de RNAs, por su menor tamaño.

El silenciamiento de *tftis* no afectó al *splicing* de la mayoría de los eventos de microexones analizados: *glr-4*, *unc-2*, *unc-16*, *nmy-1*, *tyra-2* y *nrx-1*. Nuevamente este experimento se realizó en larvas L4,. Por lo tanto, podría estudiarse si la elongación de la transcripción afecta al *splicing* de este tipo de eventos en ambos estadíos, realizando experimentos con CPT y TSA.

Un evento de microexón en donde sí observamos cambios al silenciar *tftis* fue el gen *kvs-5*: al silenciar el factor, la inclusión del microexón aumentó de manera significativa. *kvs-5* codifica para un canal de potasio y es principalmente expresado en las neuronas ventrales posteriores de los gusanos; además sus homólogos en humanos son conocidos por estar asociados a enfermedades como epilepsia. Teniendo en cuenta esto, sería interesante estudiar en el futuro si los cambios en el *splicing* de *kvs-5* traen consigo cambios en el comportamiento de los gusanos.

Algunos experimentos pensados a futuro, como fue mencionado durante esta Discusión, consisten en desarrollar ciertos resultados de este trabajo realizando experimentos en gusanos de otros estadíos, y utilizando CPT y TSA para estudiar con más detalle la regulación del *splicing* de genes con microexones. También pensamos realizar experimentos para estudiar si estos mecanismos de acoplamiento cumplen una función en cuanto a respuestas a estímulos. Para ello, sabiendo que la inclusión del exón alternativo de *hrpf-1* parece ser regulado por la elongación de la transcripción y la inclusión del mismo exón aumenta en presencia de comida, se realizarán western blots para evaluar el estado de fosforilación de la RNAPII en presencia y ausencia de comida. Además, pensamos estudiar los efectos que la regulación de microexones de los eventos ya mencionados pueden tener sobre el comportamiento y el desarrollo del sistema nervioso de los gusanos, utilizando técnicas como RNAi vía alimentación.

Como conclusión, puede decirse que se encontraron resultados que sugieren la existencia de mecanismos que regulan el *splicing* alternativo en función de la elongación de la transcripción, en *C. elegans*, a nivel del organismo entero. La puesta a punto de la técnica de RNAi vía alimentación permitirá realizar experimentos de silenciamiento de diversos factores y de isoformas específicas, facilitando el estudio de estos mecanismos y su importancia para el funcionamiento de un organismo.

Bibliografía

- Ast, G. (2004). How did alternative splicing evolve? In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 5, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrg1451>
- Barta, A., Marquez, Y., & Brown, J. W. S. (2012). Challenges in plant alternative splicing. In *Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols*. <https://doi.org/10.1002/9783527636778.ch7>
- Baugh, L. R., DeModena, J., & Sternberg, P. W. (2009). RNA Pol II accumulates at promoters of growth genes during developmental arrest. *Science*, 324(5923). <https://doi.org/10.1126/science.1169628>
- Beyer, A. L., & Osheim, Y. N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes & Development*, 2(6). <https://doi.org/10.1101/gad.2.6.754>
- Choudhary, B., Marx, O., & Norris, A. D. (2021). Spliceosomal component PRP-40 is a central regulator of microexon splicing. *Cell Reports*, 36(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109464>
- Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., & Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11456>
- De La Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., & Kornblihtt, A. R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell*, 12(2). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669). <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fish, R. N., & Kane, C. M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* (Vol. 1577, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00459-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00459-1)
- Godoy Herz, M. A., & Kornblihtt, A. R. (2019). Alternative splicing and transcription elongation in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00309>
- Godoy Herz, M. A., Kubaczka, M. G., Brzyżek, G., Servi, L., Krzyszton, M., Simpson, C., Brown, J., Swiezewski, S., Petrillo, E., & Kornblihtt, A. R. (2019). Light Regulates Plant Alternative Splicing through the Control of Transcriptional Elongation. *Molecular Cell*, 73(5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.005>
- Huang, Y., Li, W., Yao, X., Lin, Q., jiang, Yin, J. wen, Liang, Y., Heiner, M., Tian, B., Hui, J., & Wang, G. (2012). Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the MED23 Subunit. *Molecular Cell*, 45(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.022>

- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., & Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, 2(1).
- Keren, H., Lev-Maor, G., & Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: Diversification, exon definition and function. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nrg2776>
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: A pivotal step between eukaryotic transcription and translation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 14, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/nrm3525>
- Ljungman, M., & Hanawalt, P. C. (1996). The anti-cancer drug camptothecin inhibits elongation but stimulates initiation of RNA polymerase II transcription. *Carcinogenesis*, 17(1). <https://doi.org/10.1093/carcin/17.1.31>
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., & Bentley, D. L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, 385(6614). <https://doi.org/10.1038/385357a0>
- Muñoz, M. J., de la Mata, M., & Kornblihtt, A. R. (2010). The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 35, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.010>
- Ramani, A. K., Calarco, J. A., Pan, Q., Mavandadi, S., Wang, Y., Nelson, A. C., Lee, L. J., Morris, Q., Blencowe, B. J., Zhen, M., & Fraser, A. G. (2011). Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*, 21(2). <https://doi.org/10.1101/gr.114645.110>
- Schor, I. E., Gómez Acuña, L. I., & Kornblihtt, A. R. (2013). Coupling between transcription and alternative splicing. *Cancer Treatment and Research*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31659-3_1
- Schor, I. E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alió, M., & Kornblihtt, A. R. (2009). 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). <https://doi.org/10.1073/pnas.0810666106>
- Strange, K. (2006). An overview of *C. elegans* biology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 351. <https://doi.org/10.1385/1-59745-151-7:1>
- Tabara, H., Grishok, A., & Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome sequence. In *Science* (Vol. 282, Issue 5388). <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.430>
- Zahler, A. M. (2005). Alternative splicing in *C. elegans*. In *WormBook : the online review of C. elegans biology*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.31.1>
- Zorio, D. A. R., Lea, K., & Blumenthal, T. (1997). Cloning of *Caenorhabditis* U2AF 65 : an Alternatively Spliced RNA Containing a Novel Exon . *Molecular and Cellular Biology*, 17(2). <https://doi.org/10.1128/mcb.17.2.946>