

## Tesis de Posgrado

# Estudio de la relación entre transcripción y Splicing alternativo de mRNAs eucarióticos

Cramer, Paula

1999

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Cramer, Paula. (1999). Estudio de la relación entre transcripción y Splicing alternativo de mRNAs eucarióticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3139\\_Cramer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3139_Cramer.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cramer, Paula. "Estudio de la relación entre transcripción y Splicing alternativo de mRNAs eucarióticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3139\\_Cramer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3139_Cramer.pdf)

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

**FCE y N BIBLIOTECA**

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE TRANSCRIPCION  
Y SPLICING ALTERNATIVO DE mRNAs  
EUCARIOTICOS**

Autora: **Paula Cramer**

Director: **Dr. Alberto R. Kornblihtt**

Lugar de trabajo:

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
INGEBI-CONICET  
(3/1994-3/1997)**

**Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA  
(3/1997-6/1999)**

-1999-

№ 3 1 3 9 7

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires**

Doctoral Thesis

**ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN  
TRANSCRIPTION AND ALTERNATIVE SPLICING OF  
EUKARYOTIC mRNAs**

Author: **Paula Cramer**

Advisor: **Dr. Alberto R. Kornblihtt**

Laboratory:

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
INGEBI-CONICET**

(3/1994-3/1997)

**Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA**

(3/1997-6/1999)

**-1999-**

Algunos de los experimentos mostrados en este manuscrito figuran en las siguientes publicaciones:

Cramer P, Cáceres JF, Cazalla DE, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, Kornblihtt AR: Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Molecular Cell*, 1999, en prensa.

Cramer P, Pesce CG, Baralle R, Kornblihtt AR: Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *PNAS*: 94, 11456-11460, 1997.

Colman Lerner AA, Fischman ML, Lanuza G, Cramer P, Kornblihtt AR, Barañao JL: Función de distintas formas de fibronectina en el desarrollo de folículos bovinos in vitro. *Medicina*: 57, 332-336, 1997.

Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh SE, Muro A: Fibronectin gene: a model for transcription and splicing studies. *FASEB Journal*: 10 (2), 248-257, 1996.

## RESUMEN

En el presente trabajo de tesis nos hemos propuesto buscar evidencias sobre la coordinación entre los procesos de transcripción y splicing alternativo. Nuestro modelo de estudio consistió en construir una batería de minigenes  $\alpha$ -globina/fibronectina que incluyen al exón EDI de la fibronectina capaz de sufrir splicing alternativo, clonados río abajo de diferentes promotores. Con estos minigenes se transfectaron líneas celulares en cultivo, analizándose luego el patrón de splicing alternativo por medio de las técnicas de Northern blot y/o RT-PCR. Encontramos así que el tipo de promotor determina el patrón de splicing alternativo. Este efecto del promotor sobre el splicing alternativo no depende de la fuerza del promotor ni de la secuencia de la región 5' no codificante de los mRNAs, sino de la calidad de factores de transcripción reclutados en el promotor. Posteriormente intentamos dilucidar el mecanismo subyacente a este fenómeno. Para ello sobreexpresamos proteínas que participan del splicing general y/o alternativo en otros modelos. Encontramos que sólo las proteínas SF2/ASF, SRp40, SRp55 y SC-35 son capaces de modificar el patrón de inclusión de EDI, mientras que las proteínas SRp20, SRp30c y Tra2 $\beta$ no tienen efecto alguno. El efecto de SF2/ASF, la proteína con mayor actividad estimuladora, es específico de promotor y opera a través de las secuencias regulatorias en cis presentes en EDI, tal como lo demuestran los experimentos con minigenes mutantes en estas regiones. Los resultados mencionados constituyen la primera evidencia de coordinación entre transcripción y splicing alternativo. A partir de los mismos proponemos un modelo de interacción entre el dominio carboxiterminal (CTD) de la RNA polimerasa II y los factores de splicing, compatible con los resultados observados en nuestro laboratorio y en otros grupos de investigación.

## **ABSTRACT**

In this work we searched for evidence of coupling between transcription and alternative splicing. Our model consisted in the construction of a series of alpha-globin/fibronectin minigenes including the fibronectin alternative EDI exon, cloned downstream of different promoters. Cell lines were transfected with the minigenes and the alternative splicing pattern was analyzed either by Northern blot and/or RT-PCR. We found that the type of promoter controls the pattern of alternative splicing. This effect is neither dependent on promoter strength nor on the 5' non-coding region of the mRNAs, but on the quality of the transcription factors recruited by the promoter. We then tried to elucidate the mechanism underlying this phenomenon. For this purpose, we overexpressed splicing factors involved in general and/or alternative splicing in other models. We found that SF2/ASF, SRp40, SRp55 y SC-35 were the only the splicing factors with ability to stimulate EDI inclusion, whereas SRp20, SRp30c y Tra2 $\beta$  had no effect. The effect yielded by SF2/ASF, the protein with the highest stimulation activity, is promoter specific and is mediated by exon regulatory sequences, as revealed by experiments performed with mutants in these regions. The mentioned results comprise the first evidence of coupling between transcription and alternative splicing. Based on our results and evidences presented by other laboratories, we propose a model in which the carboxyterminal domain (CTD) of the RNA polymerase II interacts with the splicing factors.

# INTRODUCCION

## EL NUCLEO

El núcleo celular contiene una gran diversidad de macromoléculas –DNA, RNA, proteínas- que se hallan a su vez enormemente concentradas. La compartimentalización del núcleo aporta entonces la posibilidad de regular los distintos procesos que en él ocurren, favoreciendo a las reacciones deseadas, e impidiendo que ocurran aquellas no deseadas. Algunos de los componentes de esta compartimentalización han sido evidentes desde hace muchos años, gracias a la observación microscópica del núcleo. Sin embargo, la real significación y la función de algunos de ellos recién ha comenzado a ser evidente en los últimos años, a la luz de evidencias citológicas más modernas, como la hibridación in-situ con sondas de ácidos nucleicos o el uso de anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes o con partículas de oro.

Uno de los problemas principales que involucran al núcleo es lograr el empaquetamiento del DNA genómico –de longitud macroscópica- en un volumen de unos pocos micrometros cúbicos de diámetro. Sabemos que esto se logra gracias a la existencia de la cromatina, que consiste en la interacción del DNA con las histonas, formando los nucleosomas. Conocemos además parte de la dinámica de esta interacción, pudiendo explicar la existencia de regiones con diferente grado de compactación de la cromatina, lo cual explica a su vez parte de las razones por las que en ciertas regiones existe más expresión génica que en otras. Por otro lado, el gran empaquetamiento del DNA dificulta el acceso de la maquinaria de transcripción. De este modo se logra controlar y limitar el acceso a la información genética.

### *Algunas subestructuras del núcleo representan una alta coordinación de maquinarias complejas*

La expresión génica involucra la síntesis de RNA ribosomales (rRNAs) y el ensamblado de los ribosomas, la transcripción de los genes de los RNA de transferencia (tRNAs) y la de los RNA mensajeros (mRNAs). Con excepción del rRNA 5 S en ciertas especies. Estos transcriptos son sintetizados como precursores que luego sufren procesamientos específicos. Todos estos procesos requieren de la interacción con maquinarias de maduración complejas y específicas. Además, intervienen las maquinarias de transporte, que llevan los



productos maduros al citosol. Como las maquinarias mencionadas están formadas por grandes complejos multiproteicos, algunas de ellas han sido tempranamente descritas mediante la observación microscópica. Tal es el caso de los nucleolos, cuya primera observación al microscopio óptico tuvo lugar hace más de un siglo. Estas enormes estructuras nucleares son fábricas de ribosomas y están compuestas por porciones de los diversos cromosomas que codifican para los rRNAs, los transcritos a partir de estos genes, la RNA pol I que los sintetiza, y los diferentes componentes proteicos que constituyen los ribosomas junto con los necesarios para el ensamblaje de los mismos.

La observación microscópica temprana del núcleo también demostró la existencia de otras estructuras, como los cuerpos espiralados (o *coiled bodies*) descritos por Ramón y Cajal a principios de siglo, o los cuerpos de clivaje (o *cleavage bodies*) y las gemas, descritos más recientemente. Por analogía a lo que se conoce sobre los nucleolos, se ha propuesto que estas estructuras podrían reflejar una organización similar de las maquinarias involucradas en otros procesos nucleares.

Sin embargo, aún es poco lo que sabemos sobre la arquitectura del núcleo. ¿Cómo están coordinados los distintos procesos que participan de la expresión génica, en tiempo y espacio? ¿Existe una relación entre las maquinarias involucradas en cada uno de los procesos? ¿Existe una organización espacial de esta maquinarias, tal como ocurre con los nucleolos? En caso afirmativo, ¿esta relación implica la regulación de unos procesos sobre los otros? Teniendo en cuenta que la información con que contamos sobre la transcripción de los RNAs proviene mayormente de estudios *in vitro*, en ausencia de cromatina, ¿ocurrirá *in vivo* del mismo modo en que imaginamos que ocurre *in vitro*? La maduración de los RNAs transcritos, ¿ocurre en forma posterior o simultánea a su síntesis? ¿Hay alguna coordinación entre la síntesis de los mRNAs y su transporte al citosol?

A continuación, describiremos el conocimiento que se tiene al presente de los procesos que tienen que ver con la síntesis y procesamiento de mRNAs en el núcleo.

## LA TRANSCRIPCIÓN

La transcripción constituye el primer paso del proceso mediante el cual se expresa la información genética en todos los seres vivos. Este proceso consiste en la síntesis de moléculas de RNA complementarias al DNA, que actúa como molde.

En las células eucarióticas la transcripción está a cargo de las RNA polimerasas I, II y III (RNA pol I, II y III). La RNA pol I se encarga de transcribir los genes de RNA ribosomales 28S, 18S y 5,8S. La RNA pol II es responsable de la transcripción de los genes que codifican para proteínas, dando lugar a los mRNAs, así como de la síntesis de algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y de los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs). Los RNAs de transferencia, el rRNA 5S y los demás snRNAs, son transcritos por la RNA pol III. Cada una de las polimerasas requiere de señales particulares en los genes a transcribir, denominadas promotores. La síntesis de los transcritos se lleva a cabo luego de la interacción entre las RNA pol, estas secuencias promotoras y complejos proteicos específicos para cada caso. Los promotores están constituidos por elementos basales y elementos moduladores o reguladores. Los primeros determinan la especificidad del sitio de inicio de la transcripción y permiten sólo un bajo nivel de transcripción, mientras que los segundos modifican los niveles de expresión basal.

### LA TRANSCRIPCIÓN DE mRNAs ESTA A CARGO DE LA RNA pol II

Al igual que las RNA pol I y III, la RNA pol II es una proteína multimérica con actividad de poliribonucleótido sintetasa-DNA dependiente. La actividad enzimática de la RNA pol II reside en la subunidad más grande de esta proteína, la cual presenta una característica única consistente en un dominio carboxiterminal (CTD). Este dominio contiene repeticiones en tandem del heptapéptido YSPTSPS, presente en 17-52 copias dependiendo del organismo. El consenso presente en el CTD sugiere que éste es potencialmente fosforilable. En efecto, por un lado el CTD es fosforilado *in vitro* por innumerables quinasas, y por otro, es posible recuperar de células en cultivo dos formas de la RNA pol II: una hipofosforilada o no fosforilada (denominada pol IIA) y otra hiperfosforilada (denominada pol IIO). La subunidad mayor de la RNA pol II no es capaz de

transcribir por sí misma a partir de un promotor, porque es incapaz de reconocer promotores. Para ello, necesita del resto de los componentes del complejo multiproteico.

### **LA RNA pol II ES UNA ENZIMA COMPUESTA POR UN GRAN COMPLEJO MULTIPROTEICO**

Los promotores de RNA pol II tienen como elemento basal al *núcleo promotor* (core promoter), que incluye un *iniciador* (Inr), ubicado en la región -2 a +4 (respecto del sitio de inicio de la transcripción, o +1) (Smale *et al.*, 1989), y/o una "TATA box" situada entre -25 y -30.

Las proteínas que reconocen a estos elementos basales, denominadas Factores de Transcripción Generales (FTGs), fueron purificadas como una serie de fracciones de un extracto nuclear crudo de células HeLa con capacidad para dirigir a la RNA pol II al promotor tardío de Adenovirus. Estas fracciones se denominaron TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Matsui *et al.*, 1980). La validez de estos estudios se extiende hoy a *Drosophila melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae*. La única fracción con actividad de unión al DNA es TFIID, compuesta por un complejo multiproteico de 700 kDa y al menos 9 subunidades. La TATA box es reconocida por una de ellas, la TATA binding protein (TBP). Las demás subunidades se denominan TAFIIs (TBP Associated Factors for Pol II transcription).

Se ha postulado que la transcripción en eucariotas procede en varias etapas:

- 1- **Formación del complejo de pre-iniciación (CPI)**
- 2- Iniciación
- 3- "Clearance" o liberación del promotor
- 4- Elongación
- 5- Terminación

Inicialmente se propuso que la formación del CPI ocurría tras el ensamblado gradual de FTGs. El primer paso consistía en el reconocimiento de la secuencia TATA por parte de la TATA-binding protein (TBP) o del complejo TFIID. Luego se sumaría TFIIB, que reconoce a TFIID y hace de puente entre este último y la RNA pol II, permitiendo la correcta identificación del sitio de iniciación. A este

complejo se uniría la RNA pol II asociada a TFIIF. Por último se agregarían secuencialmente TFIIE, TFIIH y TFIIJ. TFIIA activa la transcripción probablemente uniendo TAFs, aunque no es esencial *in vitro* (Maldonado *et al.*, 1995).

El modelo del ensamblado gradual del CPI proviene de ensayos *in vitro*, en los que se estudió el efecto del agregado secuencial de las fracciones mencionadas a sistemas de transcripción en el tubo de ensayo. Si bien estos estudios constituyen un gran avance en el conocimiento que hoy tenemos de la transcripción, no necesariamente reflejan lo que ocurre *in vivo*. Recientemente se han aislado complejos multiproteicos de distintas fuentes, por lo cual se ha postulado la existencia de una *holoenzima* que contendría a la RNA pol II y a algunos FTGs. El grupo de Roger Kornberg fue el primero en aislar este tipo de complejos a partir de *S. cerevisiae*. Este complejo, denominado *mediador* (Kim *et al.*, 1994), contiene a la RNA pol II y a TFIIF. El laboratorio de Young aisló –también a partir de levaduras– una holoenzima que contiene a TFIIB, TFIIF Y TFIIH y que sería reclutada al promotor luego de la unión de TBP a éste (Koleske *et al.*, 1994). Los complejos aislados de mamíferos, por otro lado, revelaron una composición distinta a estas dos. (Ossipow *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1996). Estas diferencias en la composición de la holoenzima podrían reflejar diferencias entre las técnicas de aislamiento empleadas en los distintos laboratorios, entre las especies estudiadas, o podrían deberse a que existan distintas formas de la holoenzima, con funciones especializadas (Greenblatt *et al.*, 1997).

Por esta misma razón, la validez de la existencia de las etapas de la transcripción, es relativa. La activación de la transcripción, por ejemplo, puede tener lugar en cualquiera de las etapas (excepto en la terminación).

### **LA TRANSCRIPCIÓN POR LA RNA pol II ES REGULABLE**

Los activadores son proteínas con la doble capacidad de unir secuencias de DNA en el promotor y de contactar la maquinaria de transcripción, provocando un cambio en la actividad de la RNA pol II. Estas proteínas ejercen su función gracias a su estructura modular, que consiste en un dominio de unión al DNA,

un dominio de transactivación, y en el caso de los dímeros, un dominio de dimerización.

Las secuencias de DNA reconocidas por los activadores, denominadas elementos regulatorios, pueden ejercer su efecto a gran distancia del promotor, pueden ubicarse tanto río, arriba como río abajo del mismo, e incluso funcionan si se las invierte. En algunos casos los elementos regulatorios se hallan combinados formando elementos regulatorios compuestos, los *enhancers*.

Se ha encontrado que distintos activadores requieren de la interacción con distintos TAFs (Chen *et al.*, 1994), sugiriendo que los complejos basales de transcripción pueden ser distintos de un promotor a otro, o en un mismo promotor ante diferentes situaciones. Los activadores también pueden afectar la elongación. Por ejemplo, el complejo TFIIS ayuda a la RNA pol II a proseguir la lectura del DNA molde cuando se encuentra con bloqueos debidos a estructuras secundarias (Johnson *et al.*, 1994).

Algunos activadores que carecen del dominio de transactivación ejercen su efecto promoviendo una curvatura en el DNA que favorece el contacto proteína-proteína en el enhacer (Grosschedl *et al.*, 1995).

Otros, modifican la tasa de elongación de la RNA pol II, tal como lo demostró el grupo de David Bentley *in vivo*, mediante transfecciones celulares y microinyección de ovocitos (Yankulov *et al.*, 1994).

Como dijimos, la subunidad mayor de la RNA pol II es fosforilada *in vivo*. Se sabe que existe una correlación temporal entre el "clearance" del promotor y la conversión de la enzima de la forma pol IIA a la forma pol IIO, y se ha postulado que esto provoca la liberación de la RNA pol II de contactos que podrían de otro modo impedir la elongación (Dahmus *et al.*, 1996). Específicamente, se demostró *in vivo* en varios genes en los que la transcripción se detiene luego de la síntesis de un transcrito corto, que la transición hacia la elongación coincide con la fosforilación de CTD (O'Brien *et al.*, 1994)

La fosforilación del CTD entonces, podría constituir una oportunidad para regular la transcripción.

## LOS RNA TRANSCRIPTOS POR LA RNA pol II SUFREN MODIFICACIONES

### MODIFICACION DEL EXTREMO 5': CAPPING

Apenas la RNA pol II ha transcrito los primeros 30 nucleótidos, el extremo 5' del RNA naciente es modificado por una actividad enzimática de guanilil transferasa que le agrega una guanosina metilada, estableciendo una unión 5'-5'. Esta modificación que se denomina *capping* ocurre sobre mRNAs y snRNAs, y es necesaria para la traducibilidad de los primeros y para el transporte hacia el citoplasma de los segundos. El capping es un proceso totalmente acoplado al de transcripción. La enzima que produce el capping en mamíferos aumenta su afinidad por el GTP al unirse al CTD de la RNA pol II. Se demostró muy recientemente que la unión se produce cuando el CTD se halla fosforilado en Ser-2 y Ser-5 de las repeticiones YSPTSPS, y que es la fosforilación en Ser-5 lo que estimula la actividad de guanilil transferasa. Esto implicaría un mecanismo de regulación en el que la enzima del capping sólo interactúa con moléculas de RNA pol II involucradas en la etapa de elongación (Ho *et al.*, 1999).

### MODIFICACION DEL EXTREMO 3': POLIADENILACION:

A diferencia de lo que ocurre en procariontes, los genes de eucariotas carecen de señales de terminación de la transcripción. El fin de la transcripción -que no ocurre en un sitio preciso- está relacionado con la poliadenilación, un procesamiento del extremo 3' de los transcriptos inmaduros.

Todos mRNAs eucarióticos, con la excepción de los mRNAs de histonas, sufren esta modificación. El procesamiento consiste en el clivaje endonucleolítico del transcripto primario, seguido de la adición de una cola de poliadenosina monofosfato. Este agregado estabiliza a los mRNAs (Sachs *et al.*, 1993) y aumenta su eficiencia de traducción (Tarun *et al.*, 1996).

El clivaje *in vitro* de pre-mRNAs requiere de cinco factores proteicos (Keller *et al.*, 1997). Por un lado, el Factor de Especificidad de Clivaje y Poliadenilación (CSPF) reconoce a la secuencia consenso AAUAAA, presente río arriba del sitio de clivaje. Una vez transcrita esta secuencia, la RNA pol II extiende la síntesis del mRNA por unos cuantos nucleótidos (pueden ser cientos o miles) para luego

terminar la transcripción. Por otro lado, el Factor de estimulación del clivaje (Cstf) reconoce y une elementos ricos en U o GU presentes río abajo del sitio de clivaje. La reacción de clivaje propiamente dicha ocurre a unos 10-30 nucleótidos río abajo de la señal de poliadenilación y requiere de los Factores de Clivaje I y II (CF I<sub>m</sub> y CF II<sub>m</sub>), aunque se desconoce en cuál(es) de los cuatro factores mencionados reside la actividad catalítica. La cola de poliadenosina monofosfato, finalmente, es sintetizada por la Poli(A) polimerasa (PAP). Luego de la adición de al menos diez adenosinas monofosfato, la Poly(A)-binding protein (PAB II) se une a la cola nascente, aumentando tanto la afinidad de la PAP por ésta como su procesividad. En presencia de PAB II, además, la longitud de la cola de poli(A) se limita a los 250 nucleótidos que presentan en promedio los mRNA maduros *in vivo*.

Otra proteína denominada PAB I se une a la cola de poli(A) ya formada y es capaz de reclutar en el citoplasma a las subunidades ribosomales de 40 S. Esto promueve la iniciación de la traducción y también estimula la degradación de los mRNAs a través de la remoción del 5' CAP.

Las distintas etapas del procesamiento del extremo 3' de los mRNAs se encuentran altamente coordinadas. Por ejemplo, el clivaje necesita de la PAP (que aparentemente estabiliza el complejo CPSF-RNA), y la PAP requiere de la presencia de CPSF para la síntesis de la cola de poli(A).

## **MODIFICACIONES EN REGIONES INTERNAS DE LOS pre-mRNAs: GENES PARTIDOS Y SPLICING**

Además del capping y la poliadenilación, los transcriptos de eucariotas sufren otro tipo de modificación.

El proceso de splicing fue descubierto en el año 1977 por los grupos de Philip Sharp y Richard Roberts (del Cold Spring Harbor Laboratory) simultáneamente (Berget *et al.*, 1977; Chow *et al.*, 1977). El estudio de la transcripción de genes tardíos de adenovirus 2, y su transporte del núcleo al citosol, los llevó a comparar las secuencias de los mRNAs citosólicos con aquellas del DNA viral: así se identificaron en el gen secuencias colineales con el mRNA citosólico - denominadas *exones* - y secuencias intervinientes que no estaban presentes en los mRNAs del citosol -los *intrones* -. El mRNA nuclear se llamó *transcripto primario*,

o mRNA precursor o pre-mRNA, y se lo asoció al ya identificado hnRNA (por RNA heterogeneo nuclear); y el RNA citosólico se llamó *mRNA maduro*. El proceso que sufren los mRNAs nucleares, mediante el cual se produce la pérdida de los intrones y la re-uni6n de los exones, se denomin6 *splicing*. Este descubrimiento les vali6 a ambos investigadores el Premio Nobel de Medicina, en 1993.

Hoy sabemos que los intrones se encuentran en el genoma de numerosos organismos, tales como los arqueones, las levaduras, las plantas, los insectos, y los vertebrados. El *splicing* es entonces un proceso muy conservado a lo largo de la evoluci6n, aunque presenta diferencias entre los distintos organismos mencionados.

Mientras que en las levaduras los pocos genes que poseen intrones, los tienen peque1os y en baja cantidad (1-2 por gen), un gen de vertebrado contiene en promedio unos ocho intrones, y codifica para un transcripto primario unas 4-10 veces m1s largo que el mRNA maduro.

### **Mecanismo de *splicing***

Al descubrimiento del *splicing* en adenovirus, le sucedi6 el hallazgo del mismo fen6meno en varios genes de muchas especies distintas. Al caracterizar las secuencias intr6nicas, se observ6 que la mayor parte de las mismas parec1a ser "no funcional", ya que no parec1an contener secuencias espec1ficas, ni se hallaban similitudes en la longitud y/o secuencia de distintos intrones. Sin embargo, pudo establecerse que exist1an peque1as regiones conservadas de un intr6n a otro (Breathnach *et al.*, 1981), incluso compartidas por los intrones de vertebrados, plantas y levaduras (Padgett *et al.*, 1986).

Varios laboratorios lograron dise1ar mediante estudios *in vitro*, la bioqu1mica de la reacci6n de *splicing* (Green *et al.*, 1983; Grabowski *et al.*, 1984; Krainer *et al.*, 1984).

La Figura 1 esquematiza los pasos esenciales de esta reacci6n.

En una primera etapa, el nucle6tido situado en el 5' del intr6n (o **sitio dador**) se une a un nucle6tido (que puede ser de adenina o de guanina) situado hacia el 3'



del mismo (o **sitio de ramificación**), mediante un enlace fosfodiéster 2'-5'. Simultáneamente se produce el clivaje del extremo 5' del intrón. En una segunda instancia, se cliva el RNA en el extremo 3' del intrón (o **sitio aceptor**), liberándose el mismo, concomitantemente con la unión de los dos exones.

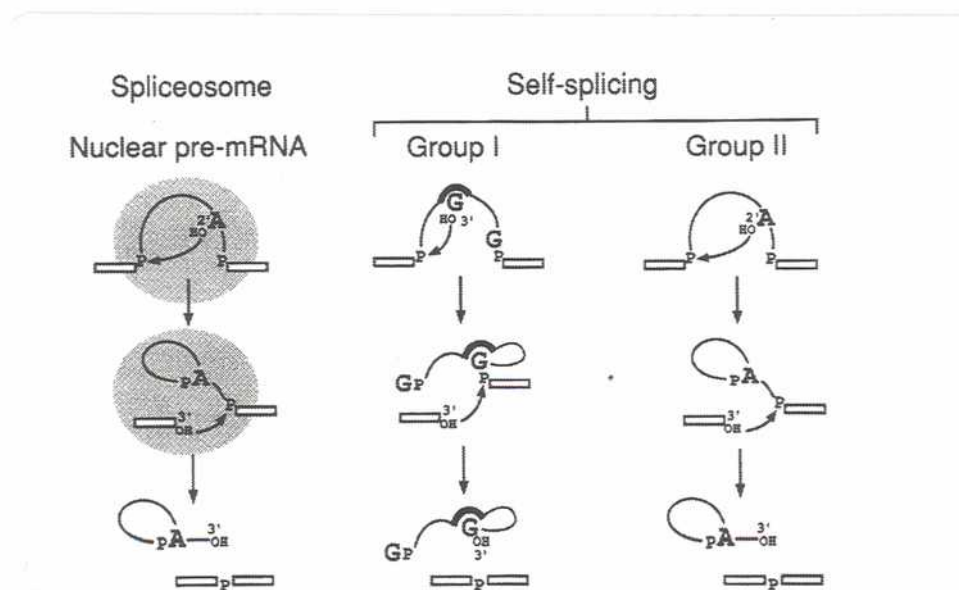


Figura 1

### Existen distintos tipos de intrones

Como se ve en la FIGURA I1 existen tres tipos de intrones. En los de tipo I y tipo II, la actividad catalítica reside en el propio intrón, por lo cual se los denomina autocatalíticos. Los intrones de tipo I requieren guanosina como cofactor y tienen una G (y no una A) en el sitio de ramificación. Es el caso de los genes de rRNA de

*Tetrahymena*, del bacteriófago T4 y de ciertos genes de mitocondrias de hongos. En los genes mitocondriales de levaduras y hongos, y en los cloroplastos de *Chlamydomonas* se encuentran los intrones de tipo II. Estos tienen una A en el sitio de ramificación, usan ATP como cofactor, y se liberan formando una estructura de lazo o *lariat*. Estas características son compartidas con los intrones del tercer grupo, en los cuales la actividad catalítica está a cargo de un gran complejo ribonucleoproteico, el *spliceosoma*. Esto ha llevado a postular que los intrones de tipo II dieron origen a los del tercer grupo.

### Los intrones de levaduras y metazoos requieren del spliceosoma

Los intrones que requieren de spliceosoma están presentes en los genes de eucariotas superiores y levaduras, y requieren de la presencia de las siguientes secuencias consenso:



Aclaración: K: A o C; Y: pirimidinas (Co U); R: purinas (A o G)

El splicing de este tipo de intrones, requiere entonces de elementos en cis (las secuencias consenso) y de elementos en trans (el spliceosoma, y otras proteínas accesorias).

### El spliceosoma es un gran complejo macromolecular

El splicing se estudió mayormente *in vitro*. Mientras los intrones de autocatalíticos requerían simplemente del agregado de cofactores (GTP o ATP), el tercer tipo de intrón se estudió mediante la incubación de algún pre-mRNA

radiactivo sintetizado *in vitro* (generalmente los mRNAs de los genes SV40 temprano,  $\beta$ -talasemia o  $\beta$ -globina humanos) con extractos totales o nucleares de células HeLa, o a veces por microinyección de ovocitos de *Xenopus sp*, en presencia de ATP.

El fraccionamiento de los extractos celulares con actividad de splicing permitió la identificación del spliceosoma (Brody *et al.*, 1985), un enorme complejo multiproteico a menudo comparado con el ribosoma por su estructura y composición enzimática. El spliceosoma está compuesto por partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas o snRNPs, que se unen secuencialmente a los intrones y/o entre sí (Moore *et al.*, 1993). El proceso de ensamblado del spliceosoma necesita además de proteínas no-snRNPs, así como de las proteínas hnRNP (llamadas así porque forman partículas al asociarse al hnRNA).

En la Figura 2 se muestra un esquema de la participación de las snRNPs en el spliceosoma.

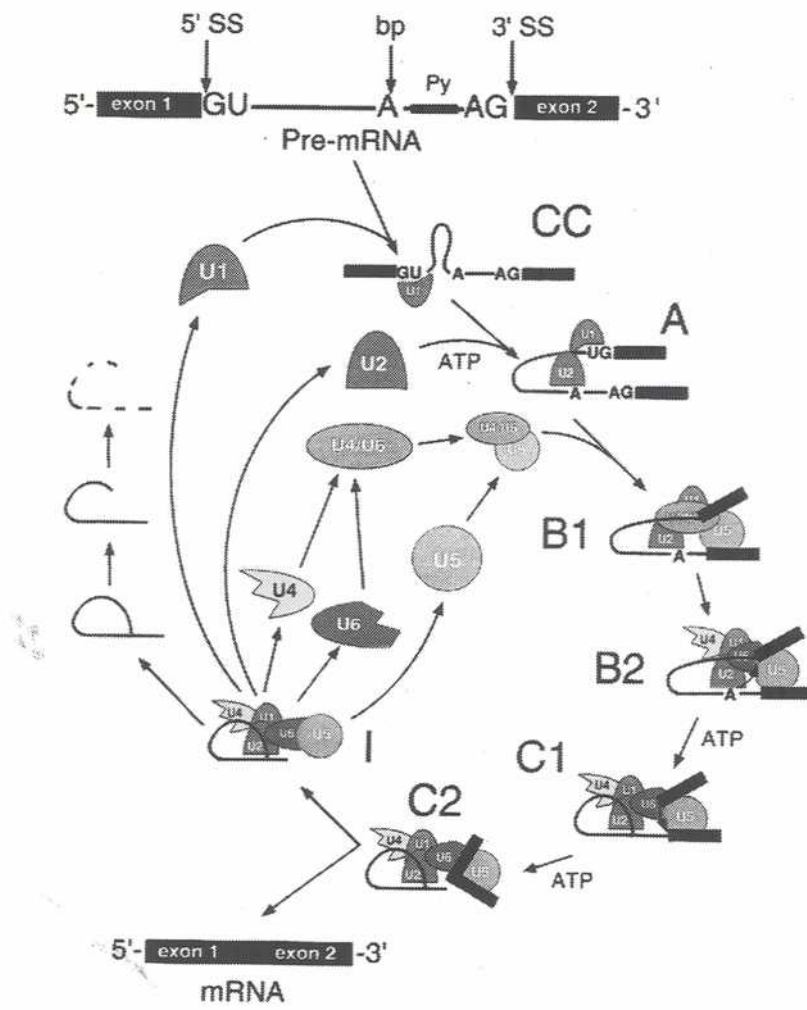


Figura 2

En una primera etapa, U1 snRNP reconoce al consenso del sitio dador del intrón, a través de su complementariedad de bases (a esta etapa se la llama E o CC, por "early" o "commitment complex", respectivamente).

Luego, U2 snRNP reconoce -también por complementariedad de bases- una secuencia adyacente al sitio de ramificación (constituyendo un complejo muy estable, llamado A). La proteína U2AF (por U2 snRNP Auxiliary Factor) asiste a la unión de U2 snRNP gracias a la presencia de un dominio de unión a RNA (U2AF<sup>65</sup>) con capacidad para reconocer al tracto de pirimidinas del intrón. Además, establece interacciones con el resto de la maquinaria de splicing a través de otro dominio, rico en serinas y argininas (U2AF<sup>35</sup>).

Por otro lado, U1 snRNP se halla unido a otra proteína rica en serinas y argininas, denominada U1-70K.

Finalmente se une el complejo formado por los snRNAs U4/U6·U5 (constituyendo el complejo B1). Una serie de rearrreglos que involucran a algunos de los snRNAs y probablemente a otros factores posibilita las reacciones que llevan a la eliminación del intrón, el cual es degradado en el núcleo. Los snRNPs, por su parte, se reciclan.

No está claro aún en qué moléculas residen las actividades catalíticas del splicing. Se postula que el complejo U4/U6·U5 es responsable del ataque nucleofílico de la adenosina sobre el sitio de ramificación. Se sabe aún menos sobre el clivaje del sitio 3' del intrón, en el cual podrían estar involucrados U2, U6 y una proteína llamada PSF (Adams *et al.*, 1996).

El consumo de ATP, por otro lado, no es requerido para la catálisis propiamente dicha, que consiste en dos reacciones de transesterificación. Se ha postulado que el ATP es aprovechado para "desenrollar" los RNAs intervinientes (por ej., U4/U6). Apoya esta idea el hecho de que varias proteínas del spliceosoma tienen actividad de ATPasa (Staley *et al.*, 1998).

Recientemente se ha descrito una variante de este tipo de intrón, en la cual el consenso es AT-AC (en vez de GT-AG). También se ha descrito un spliceosoma nuevo, compuesto por un conjunto de snRNPs diferente (U11, U12 y otros) (Tarn *et al.*, 1996). Si bien estas variantes de intrones y de snRNPs han sido halladas en muchas especies distintas (*Drosophila*, vertebrados, plantas), parecen ser

minoritarias (uno de cada 5000-10000 intrones tiene el consenso AT-AC; 1/600 intrones es procesado por el spliceosoma de tipo U12; (Sharp, 1997) y no nos referiremos a ellas.

Gracias a su naturaleza química -alta estabilidad, pequeño tamaño, composición nucleotídica- los snRNPs han sido los factores de splicing más extensamente caracterizados. Como hemos mencionado antes, otras proteínas no-snRNPs (entre ellas, las ya descritas U2AF y U1-70K) participan del proceso de splicing.

### **La familia de proteínas SR es esencial para el splicing**

En metazoos, la formación del complejo E requiere de la presencia de las proteínas SR.

Estas proteínas se caracterizan por una estructura modular, análoga a la de los factores de transcripción (Graveley *et al.*, 1998; Cáceres *et al.*, 1997). Esta estructura consiste en la presencia de un dominio carboxiterminal rico en serinas y argininas -llamado dominio RS- que participa de las interacciones proteína-proteína, y de uno o dos dominios de reconocimiento del RNA -llamados dominios RRM- (por RNA Recognition Motifs) (Manley *et al.*, 1996).

Por razones incomprensibles, al menos para quien escribe, se denomina RS al dominio rico en Ser-Arg, y SR a las proteínas que incluyen este tipo de dominio.

La actividad de estas proteínas fue descrita inicialmente en ensayos de splicing *in vitro*, en los que se agregaba la proteína purificada a extractos S100 de células HeLa. Si bien estos son extractos *citoplasmáticos* libres de ribosomas, contienen factores de splicing gracias a la liberación de los mismos desde el núcleo durante el fraccionamiento subcelular. Como las proteínas SR se pierden durante la purificación, los extractos S100 son deficientes para el splicing. Mediante este tipo de ensayos se estudió el rol de cada proteína SR en el proceso de splicing.

SF2/ASF, la primera proteína SR descubierta, fue caracterizada simultáneamente por dos laboratorios. El grupo de Manley describió su actividad como factor de splicing alternativo sobre pre-mRNAs de SV40, y la denominó ASF (Alternative Splicing Factor) (Ge and Manley, 1990). Por otro lado, Krainer la caracterizó primero como un factor esencial de splicing, y la llamó SF2 (Splicing Factor 2) (Krainer *et al.*, 1990a) y luego como un factor de splicing alternativo (Krainer *et*

*al.*, 1990b). El clonado de los cDNAs de ASF y de SF2 permitió establecer que se trataba de la misma proteína (Ge *et al.*, 1991; Krainer *et al.*, 1991).

La segunda proteína SR descubierta fue SC35 (Fu *et al.*, 1990). Si bien la actividad de esta proteína fue inicialmente descrita como esencial para el splicing, se observó que su actividad *in vitro* resultaba intercambiable con la de SF2/ASF (Fu *et al.*, 1992). Esto llevó a creer que existía redundancia funcional entre estas proteínas.

Posteriormente se logró la purificación de un grupo de seis proteínas de distintos PM, con la estructura modular antes descrita, todas reconocibles por un mismo anticuerpo monoclonal, y con actividad aparentemente redundante en splicing *in vitro* (Roth *et al.*, 1991, Zahler *et al.*, 1992). A este grupo de proteínas -que incluía a las previamente descritas SF2/ASF y SC35- se lo denominó familia SR. La familia SR se encuentra conservada en numerosas especies de metazoos, desde *Drosophila* hasta humanos. La Figura 3 muestra un esquema de las proteínas SR humanas mejor descritas hasta el momento.

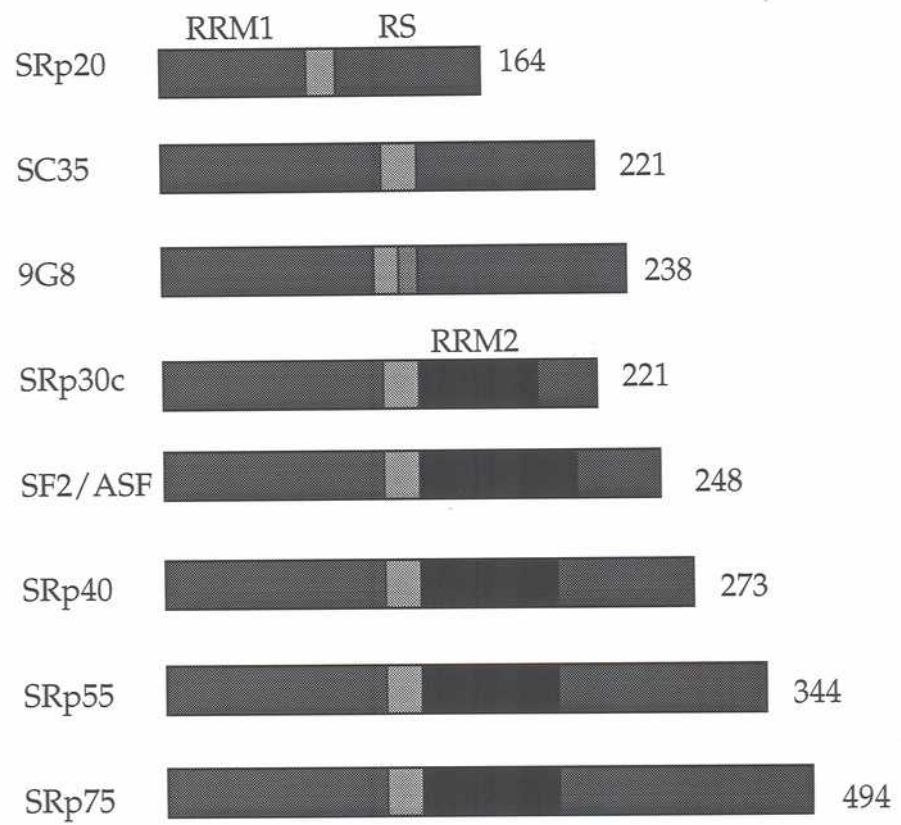


Figura 3



Se han hallado los análogos de muchas de estas proteínas en otras especies como rata, ratón, pollo y *Drosophila*. La lista presentada es incompleta, ya que recientemente han sido descritos los análogos humanos de Tra y Tra2 de *Drosophila* (ver más adelante) (Tacke *et al.*, 1998), aunque no todos los autores las consideran verdaderas proteínas SR dado que no son esenciales para el splicing *in vitro*..

El rol de las proteínas SR en el splicing general consiste en reclutar a los snRNPs hacia el pre-mRNA, y en mediar las interacciones entre los componentes del spliceosoma, que especifican los sitios de splicing y definen los exones e intrones. Como dijimos al principio de esta sección, las proteínas SR participan de la formación del complejo E. En efecto, se ha demostrado que SF2/ASF estimula la unión de U1 snRNP al sitio 5'. Esta reconoce simultáneamente al pre-mRNA y a la proteína U1-70K, gracias a la interacción entre dominios RS, presentes en ambas proteínas (Kohtz *et al.*, 1994). Es interesante destacar que el splicing *in vitro* puede prescindir de U1 snRNP, en condiciones de exceso de proteínas SR (Crispino *et al.*, 1994; Tarn *et al.*, 1994).

La elección del sitio 3' también está influida por la proteínas SR, capaces de estimular la unión de U2AF al tracto de polipirimidinas del intrón (Wu *et al.*, 1993).

De este modo, las proteínas SR promueven el acercamiento de los sitios 5' y 3' del intrón, actuando como puentes entre U1-70K -unida a U1 snRNP en el sitio 5' de splicing- y U2AF -unida a U2 snRNP en el sitio 3', tal como se muestra en la Figura 4.

Por último, se ha demostrado el rol de las proteínas SR en el reclutamiento del complejo U4/U6/U5 al spliceosoma (Rosigno *et al.*, 1995).

**Figura 4**

En levaduras no se han encontrado análogos de la familia de proteínas SR. Se cree que las funciones que cumplen éstas en los mamíferos, podrían estar presentes en proteínas del spliceosoma. U1 snRNP de levaduras, por ej., incluye seis polipéptidos cuyos análogos de mamífero aún no se han encontrado (Neubauer *et al.*, 1997).

### **El splicing es regulable**

Hasta aquí hemos descrito el mecanismo y la maquinaria involucrados en el splicing *general* o *constitutivo*.

En los metazoos la regulación del splicing constituye el control más importante de la expresión genética en el nivel post-transcripcional.

Las secuencias consenso que hemos descrito hasta el momento se encuentran en los intrones. No todos los sitios de splicing se ajustan a esos consensos, razón por la cual se los clasifica normalmente como *sitios fuertes* o *sitios débiles*. En general los sitios 5' de splicing se ajustan bastante al consenso. Los sitios 3', en cambio, presentan mayores desvíos. Paradójicamente, no siempre es posible predecir el comportamiento de un sitio de splicing -como fuerte o débil- con la simple observación de su ajuste a los consensos. Evidentemente, otros factores están en juego en la elección de un sitio de splicing.

En la Figura 5 se esquematizan las distintas situaciones posibles que se pueden presentar en el momento de definir el sitio 3' de splicing.

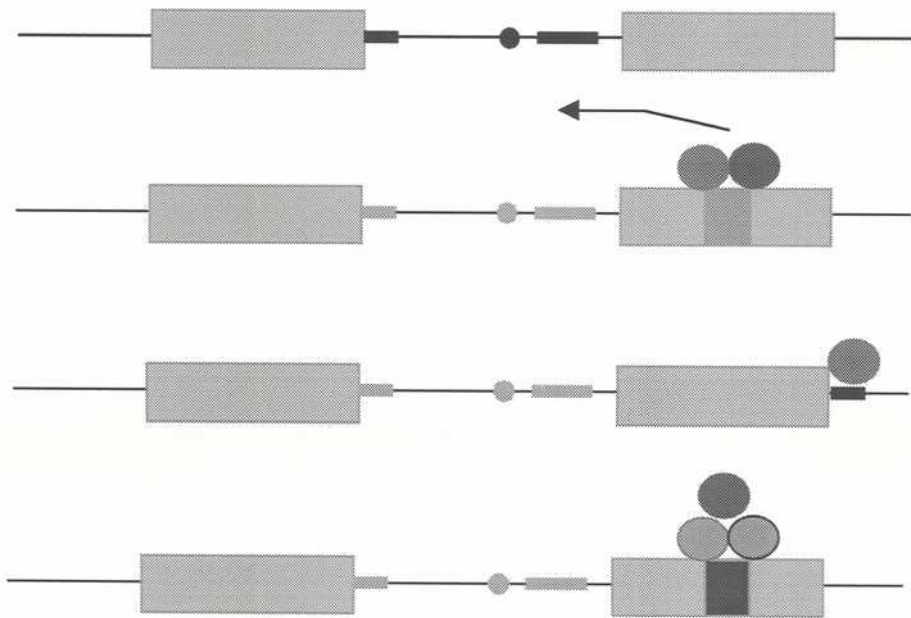


Figura 5

En A, vemos el caso de un intrón con sitios de splicing fuertes. En este caso, participa de la remoción del intrón la maquinaria "basal" de splicing ya descrita, la cual reconoce estrictamente las secuencias del consenso.

Los esquemas B, C y D, muestran en forma muy simplificada los factores en cis y en trans que pueden ayudar a definir el sitio 3' cuando éste es débil.

En B, el exón situado río abajo contiene secuencias que pueden ser reconocidas por componentes del spliceosoma (U1 en este caso) y/o por proteínas SR.

El sitio 5' del intrón río abajo, también puede participar en la definición del sitio 3', tal como se muestra en C.

De no mediar la influencia de las secuencias y/o factores esquematizados en la figura, los sitios débiles no son "vistos" por la maquinaria de splicing. En esos casos, el sitio débil es reemplazado por el sitio fuerte más próximo.

### **Splicing alternativo: un mismo gen puede dar lugar a la formación de distintos mRNAs maduros**

La existencia de sitios de splicing débiles, entre otros factores, permite que a partir de un mismo gen se expresen mRNAs con distinta composición de exones. Estos mRNAs pueden coexistir en un mismo tejido y en un mismo momento, pueden alternarse en su expresión en un tejido dado en distintos momentos del desarrollo o en distintas situaciones fisiológicas, o pueden expresarse en distintos tejidos de un mismo individuo. Este proceso, que se denomina *splicing alternativo*, permite la síntesis de varias proteínas distintas a partir de un único gen. Aproximadamente uno de cada veinte genes sufre splicing alternativo en los vertebrados (Sharp, 1994).

El splicing alternativo puede ocurrir cuando existe una ambigüedad en la elección de dos sitios de splicing débiles cercanos. En ese caso, la elección entre uno y otro sitio será casi azarosa. Sin embargo, en la mayoría de los casos el splicing alternativo está regulado por factores en trans. A continuación describiremos algunos de los ejemplos mejor descritos.

En *Drosophila*, la determinación del sexo está dada por una cascada de eventos de splicing alternativo. El primer paso consiste en el dosaje de la relación entre cromosomas X y autosomas (que es 1 en las hembras, y 0,5 en los machos). Por

mecanismos aún desconocidos, el resultado de este dosaje es transmitido a los demás componentes de la cascada. El primer paso involucra el splicing alternativo sexo-específico del gen *sex-lethal* (*sxl*). En las hembras, los mRNAs de *sxl* carecen del exón 3 y codifican para una proteína SXL funcional. Esta proteína regula el splicing alternativo de su propio mRNA y el del gen *transformer* (*tra*), en ambos casos bloqueando sitios de splicing. La proteína TRA, junto con TRA2, regula positivamente el splicing del exón 4 del gen *doublesex* (*dsx*). DSX es responsable de bloquear la expresión de genes masculinizantes. En los machos, la inclusión del exón 3 en los mRNAs de *sxl* implica la aparición de un codón stop, de modo que no se sintetiza proteína SXL. La ausencia de SXL determina un splicing diferente del pre-mRNA de TRA, lo cual implica a su vez la ausencia de proteína TRA. Ante la ausencia de TRA, los mRNAs de *dsx* en los machos carecen del exón 4 y expresan una variante de DSX capaz de bloquear la expresión de genes femineizantes.

El elemento P de *Drosophila* requiere de la expresión de una transposasa para movilizarse. En las células germinales se produce un splicing normal de los mRNAs, permitiendo la expresión de la enzima con la consiguiente dispersión del elemento P por el genoma. En forma opuesta, en las células somáticas la proteína PSI bloquea el reconocimiento del sitio 5' del último exón por parte de U1 snRNP, impidiendo la expresión de la transposasa.

En mamíferos, mediante ensayos de splicing *in vitro*, se demostró que las proteínas SR tienen influencia sobre la elección del sitio de splicing alternativo. Este efecto es dependiente de la concentración de las proteínas SR (Ge *et al.*, 1990; Krainer *et al.*, 1990; Zahler *et al.*, 1993). Además, distintas proteínas SR parecen tener distintas especificidades. En experimentos de splicing *in vitro* se demostró, por ejemplo, que el splicing del mRNA del gen *tat* del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) requiere del agregado de la proteína SF2/ASF a los extractos nucleares de splicing, mientras que el mRNA de la  $\beta$ -globina humana ( $\beta$ -gb) requiere del agregado de la proteína SC-35. En ningún caso estas proteínas son intercambiables ni reemplazables por otras (Fu X-D., 1993). Si bien estos experimentos se hicieron sobre modelos de splicing general (y no alternativo), la especificidad de interacción con ciertas proteínas reguladoras de

participación de factores en trans que reconocen al sustrato y son capaces de interactuar con la maquinaria "basal" de splicing. En algunos casos también está en juego la formación de estructuras secundarias (Muro *et al.*, 1999), como

splicing permite imaginar una situación similar en el splicing regulado o alternativo.

También se ha descrito el rol antagónico de las proteínas SF2/ASF y hnRNPA1 (a la cual nos referiremos en una sección posterior) sobre el splicing alternativo del gen de la  $\beta$ -gb humana. Así, la proteína SF2/ASF favorece la elección de sitios 5' de splicing proximales, mientras que hnRNPA1 favorece los sitios 5' distales del este pre-mRNA (Mayeda *et al.*, 1992; Cáceres *et al.*, 1994). Por otro lado, se había publicado que la abundancia de hnRNPA1 fluctúa en distintas situaciones fisiológicas (Celis *et al.*, 1986; Planck *et al.*, 1988). Esto ha llevado a proponer que el splicing alternativo en mamíferos estaría determinado por el delicado balance relativo de la abundancia de distintas proteínas de splicing, el cual podría variar en distintos tejidos, en diferentes momentos del desarrollo, o en distintas condiciones fisiológicas.

### **Splicing enhancers: secuencias en cis que afectan el splicing**

Desde un inicio se identificaron secuencias exónicas relevantes para el splicing en diversos sistemas que involucraban genes "artificiales" (Somasekhar *et al.*, 1986). La primera región exónica descrita en un sistema natural fue la correspondiente al exón EDI de la FN humana (Mardon *et al.*, 1987). A estas secuencias se las llamó *splicing enhancers*, dada su capacidad de estimular el splicing de sitios débiles, y de actuar sobre sitios de splicing heterólogos (Tian *et al.*, 1993). En algunos casos, estos enhancers actúan sobre el splicing general, estimulando la remoción de intrones constitutivos con sitios débiles. En otros, intervienen en la regulación del splicing, esto es, en el splicing alternativo. El mecanismo de acción de la mayoría de los splicing enhancers descritos hasta el momento involucra la participación de factores en trans que reconocen al enhancer y son capaces de interactuar con la maquinaria "basal" de splicing. En algunos casos también está en juego la formación de estructuras secundarias (Muro *et al.*, 1999), como veremos más adelante.

La mayoría de los enhancers se encuentra a una distancia de unas 100 bases del sitio de splicing regulado (aunque se han hallado algunos a distancias mucho

mayores). En general se ubican río abajo de sitios 3' débiles, aunque algunos son capaces de regular sitios 5' o sitios de ramificación (Hertel *et al.*, 1997).

### **Splicing enhancers y proteínas SR**

*Las secuencias en cis interactúan con proteínas en trans para regular el splicing*

El primer enhancer en el cual se pudieron identificar claramente las secuencias en cis y los factores en trans intervinientes, fue el del pre-mRNA *dsx* de *Drosophila*, que mencionamos antes. El exón 4 del gen *dsx* contiene un splicing enhancer que consiste en seis repeticiones de una secuencia particular de 13 nucleótidos. A esta secuencia se unen dos proteínas con dominios RS: Transformer2 (Tra2) y Transformer (Tra), las que a su vez interactúan con proteínas SR. Gracias a la presencia de este complejo, U2AF es capaz de reconocer al débil sitio 3' de splicing situado río arriba del exón 4. Es el caso ilustrado en la Figura 5 D.

Posteriormente se identificaron enhancers en genes de vertebrados o en genes de virus que infectan a vertebrados, como el exón M2 del gen de la cadena pesada de IgM de ratón (Watakabe *et al.*, 1993), el exón EDI (llamado también EDA) del gen de FN humana (Mardon, H. 1987), el exón 5 del gen de la hormona de crecimiento bovina (Hampson *et al.*, 1989), etc. La comparación de las secuencias de estos enhancers mostró que los todos eran ricos en purinas (Watakabe *et al.*, 1993). Hoy sabemos que, salvo algunas excepciones, la mayoría de los enhancers tiene esta característica.

El mismo laboratorio que identificó el consenso de los enhancers fue el primero en buscar el mecanismo de acción de los mismos, utilizando el enhancer del exón M2 del gen de IgM de ratón. La incubación de extractos nucleares con los mRNA conteniendo la secuencia enhancer, seguida de un análisis en geles de poliacrilamida nativos permitió establecer que el enhancer estimulaba la formación de los complejos de splicing A y B. Mediante ensayos de cross-linking seguidos de protección a la RNasa H en presencia de distintos oligonucleótidos, se pudo establecer que este enhancer era reconocido por U1 snRNP (Watakabe *et al.*, 1993).



Utilizando técnicas similares, otro laboratorio determinó que el enhancer del exón EDI del gen FN humana era capaz tanto de estimular la unión de U2 snRNP al sitio de ramificación como de unir proteínas SR (Lavigneur *et al.*, 1993). Como dijimos antes, ya había evidencias de la influencia de las proteínas SR en el splicing alternativo *in vitro*.

Esto llevó a proponer por primera vez que el mecanismo de acción de los enhancers podría consistir en el reclutamiento de proteínas SR, las que a su vez interactuarían con factores de la maquinaria basal de splicing (como U2 snRNP), estimulando la unión de éstos a sus sitios blanco.

Posteriormente se demostró *in vitro* que se podía obtener el splicing en trans de dos moléculas de RNA -una conteniendo el sitio 5', la otra el 3'- con la condición de que existiera un splicing enhancer río abajo del sitio 3', y que estuvieran presentes la proteínas SR (Chiara *et al.*, 1995). Esto confirmó que el rol de las mismas en el splicing alternativo consiste en estabilizar las interacciones entre los factores de la maquinaria basal de splicing, y que logran esto a través de su reclutamiento por los enhancers.

Esto último fue demostrado mediante ensayos de SELEX (Tuerk *et al.*, 1990). La incubación de RNAs simple cadena de secuencia al azar junto con proteínas SR inmovilizadas permite aislar a los RNA unidos a las proteínas SR, los cuales son amplificados por PCR. Los productos de PCR obtenidos son capaces de expresar *in vitro* los respectivos RNAs, los cuales se usan en una nueva ronda de reconocimiento por las proteínas SR. El procedimiento se realiza unas 7-9 veces. De este modo se pudo establecer la existencia de consensos de unión para las proteínas SF2/ASF y SC35, confirmando la capacidad de éstas de reconocer secuencias de RNA simple cadena con alta afinidad y especificidad, ya que SF2/ASF es incapaz de reconocer la secuencia de SC35 y viceversa (Tacke *et al.*, 1995). Las secuencias reconocidas por ambas resultaron ricas en purinas, pero sólo el sitio blanco de SF2/ASF se comporta como un splicing enhancer. Nuevamente, se sugirió que las distintas proteínas SR poseen actividades diferentes, descartando la idea original de la redundancia funcional de las mismas. A pesar del gran esfuerzo puesto en los últimos años en la comprensión del mecanismo del splicing alternativo, y del progreso obtenido, dsx sigue siendo el

único caso en el cual las secuencias en cis y los factores en trans han sido totalmente identificados.

## **LOS mRNAs MADUROS SON TRANSPORTADOS HACIA EL CITOPLASMA**

Una vez transcritos y procesados, los mRNAs deben dirigirse al citosol en donde se iniciará su traducción. Como ocurre con todas las macromoléculas, la exportación de mRNA al citosol implica la interacción con los complejos de los poros nucleares (NPC), y por lo tanto requiere energía y es saturable. El transporte de macromoléculas a través de la membrana nuclear se basa en la interacción de la molécula a transportar o *carga* con una molécula *adaptadora*, la que a su vez interactúa con la proteína Ran. Ran es una GTPasa miembro de la superfamilia ras, y presenta una distribución asimétrica: en el núcleo está mayormente en su forma Ran-GTP, mientras que en el citosol predomina la forma Ran-GDP. Es esta asimetría lo que le da la direccionalidad al transporte de los complejos carga-adaptador-Ran. El mecanismo de importación y exportación está bien descrito para proteínas y algunos RNAs (snRNAs, tRNAs, por ej.), pero es poco lo que se sabe respecto de los mRNAs.

El hnRNA se halla asociado a series discretas de proteínas que forman estructuras repetidas y constituyen partículas denominadas hnRNPs. En total, unas 20 proteínas hnRNP interactúan con los transcritos en el núcleo. Algunas de ellas tienen señales de exportación al citosol y acompañan al mRNA mientras otras tienen señales de retención en el núcleo. Por estas razones se cree que estas proteínas están involucradas en el transporte de los transcritos maduros desde el núcleo al citosol (Nigg *et al.*, 1997).

Por otro lado, el extremo 5' de los transcritos por la RNA pol II se halla unido a un complejo proteico denominado CBC (CAP Binding Complex) que consiste en dos proteínas (CBP80 y CBP20) que reconocen al extremo 5'-cap (Izaurralde *et al.*, 1995).

Se ha postulado que el rol del CBC podría ser el de asegurar que la translocación de los mRNAs a través de los poros ocurra de 5' a 3' (Visa *et al.*, 1996) y se ha demostrado la necesidad del CBC para el splicing de mRNAs (Izaurralde *et al.*, 1995).

## **LOS PROCESOS DE TRANSCRIPCIÓN, Y MADURACIÓN DE LOS mRNAs ESTAN ACOPLADOS TEMPORAL Y ESPACIALMENTE**

### **La ultraestructura nuclear revela la colocación de las maquinarias de procesamiento de RNAs**

Como mencionamos en la primera sección, además de los nucleolos existen otras estructuras nucleares. Aunque en ningún caso ha sido establecida completamente su función y significación real, sí se conoce parte de la composición bioquímica de las mismas.

Los coiled bodies, por ejemplo, son esferas de 0,1-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentes entre 1-5 por célula y están compuestos al menos por proteínas ribosomales, snoRNAs, snRNPs y factores de transcripción de la RNA pol II.

Se cree que de éstos brotan los cuerpos de clivaje, ya que su composición es similar, con la diferencia de que estos últimos incluyen CPSF, CstF y RNA nascentes. La naturaleza de estos cuerpos hace pensar que se trata de sitios especializados en el corte y poliadenilación de mRNAs, aunque también podrían ser meros sitios de almacenamiento de los factores involucrados.

La composición de estas y otras estructuras, y el conocimiento que se tiene de los nucleolos, han llevado a proponer que las mismas interactúan de una forma altamente coordinada con cada uno de los pasos que componen los diferentes procesos que operan en el núcleo.

### **"Tracks" y "speckles"**

Teniendo en cuenta que los mRNAs son moléculas sobre las cuales operan los procesos de transcripción, capping, splicing, poliadenilación y transporte al citosol, es pertinente plantearse si estos procesos ocurren en forma secuencial o si por el contrario suceden en forma simultánea. En los últimos años, varios laboratorios han intentado responder a este interrogante.

El grupo de Jeanne Bentley Lawrence fue uno de los pioneros en explorar este aspecto. Mediante la hibridación con sondas biotiniladas, ellos siguieron la localización nuclear de la expresión de genes del virus de Epstein-Barr (EBV) integrado en el genoma de una línea celular. Mientras que el gen da dos señales

puntiformes por célula, los mRNAs específicos se ven como huellas lineales o *tracks*, que nacen en el gen y se dirigen hacia el nucleoplasma. Estos resultados también se observaron en el mismo laboratorio en una línea celular transfectada en forma estable con el oncogen neu (erbB2) (Lawrence *et al.*, 1988), y fueron confirmados por el laboratorio de David Spector usando el gen c-fos (Huang *et al.*, 1991). De modo que los pre-mRNAs recién sintetizados no difundirían libremente al nucleoplasma sino que parecerían seguir un camino particular en su ruta al citosol.

Por otro lado, varios laboratorios que habían usado anticuerpos fluorescentes anti-snRNPs para estudiar la localización nuclear de los factores de splicing, demostraron que éstos se hallan distribuidos tanto en forma difusa en el nucleoplasma como en unas 20-50 regiones discretas, denominadas *speckles* (o pecas) (Carmo-Fonseca *et al.*, 1991). Estos anticuerpos provenían de pacientes con enfermedades autoinmunes del tejido conectivo y eran capaces de inmunoprecipitar a los snRNPs U1, U2, U4/U6 y U5. Justamente gracias a estos anticuerpos se logró el gran avance en el conocimiento que hoy tenemos sobre los snRNPs. El grupo de Tom Maniatis encontró a su vez que si se acota la especificidad de estos anticuerpos a ciertos factores de splicing específicos, como por ejemplo SC-35, el patrón difuso desaparece pero permanecen los mismos *speckles* que antes eran reconocidos por anticuerpos anti-snRNPs (por eso a los *speckles* frecuentemente se los llamó "dominios SC-35") (Fu *et al.*, 1990). Más interesante aún, estos *speckles* parecían ser estructuras dinámicas, ya que se ensamblaban y desensamblaban en forma coordinada con la división celular (Spector *et al.*, 1991). Recientemente se han detectado en los *speckles* otros múltiples factores de splicing (por ej., SC-35 y SF2/ASF), RNA poliA<sup>+</sup>, poliA polimerasa, una posible RNA helicasa y la forma hiperfosforilada de la RNA pol II (pol II0). Todas estas evidencias sugerían que los *speckles* podrían ser sitios de depósito o de ensamblado de factores de splicing, los que a su vez podrían tener alguna significación funcional. El paso siguiente consistió entonces en utilizar estas técnicas citológicas para estudiar si había alguna relación entre los procesos de transcripción y splicing.

**Los factores de splicing son reclutados hacia regiones de activa transcripción**

Usando como modelo la infección de Adenovirus (Ad2) en células HeLa, el grupo de Spector encontró que los RNAs de Ad2 colocalizan con la RNA pol II, con las proteínas de empaquetamiento de mRNAs hnRNP C1 y C2, y también con los dominios SC-35. Más aún, describieron que los speckles se mueven hacia los sitios de activa transcripción (Jiménez-García *et al.*, 1993). Si bien estos resultados fueron duramente cuestionados por otro laboratorio que llegó a la conclusión opuesta usando el mismo modelo (Zhang *et al.*, 1994), las conclusiones no se restringen a la infección viral, ya que fueron validadas en un modelo de transfección transitoria de células COS-1 con parte del gen de la  $\beta$ -tropomiosina de rata. Por su parte, Lawrence estudió la relación entre transcripción y splicing de dos genes endógenos, el gen de la fibronectina (FN) y el de la neurotensina. Usando sondas fluorescentes que reconocen sólo exones o sólo intrones del gen de FN, no sólo detectó los tracks que había descrito antes para EBV, sino que pudo también seguir el splicing de los transcritos de FN a lo largo del track (Xing *et al.*, 1993). Como muestra la Figura 6, las zonas del track más cercanas al gen contienen intrones, mientras que aquellas más alejadas, parecen haberlos perdido. Además, estos tracks de FN aparecían muy frecuentemente asociados a los speckles de la proteína SC-35.

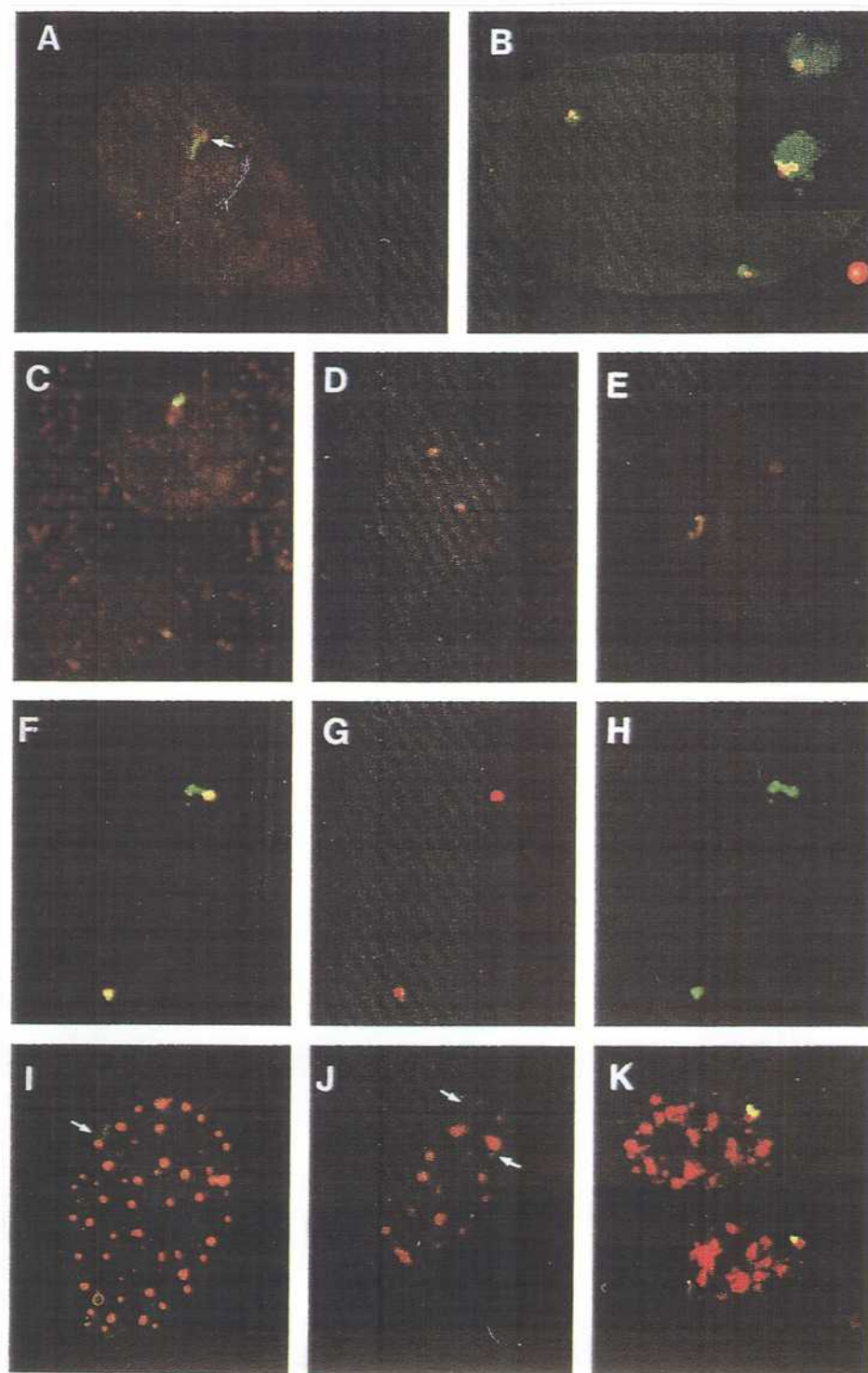


Figura 6

Este trabajo aportó la primera prueba importante sobre la coordinación funcional entre transcripción y splicing. Sin embargo, también planteó la duda sobre la validez de estas conclusiones respecto de otros genes, ya que el gen de la neurotensina no mostró tracks. En un trabajo muy reciente, estos autores llegaron a la conclusión de que el modelo de los tracks es válido para otros genes tales como el de la cadena pesada de miosina humana (MyHC) pero no para el enorme gen de la distrofina en el que la transcripción es un paso limitante para la velocidad de acumulación de los transcriptos (Smith, *et al.*, 1999). La distribución de los transcriptos de distrofina sigue la forma de un árbol de navidad, tal como se había descrito para los cromosomas politénicos de *Drosophila* (Zachar *et al.*, 1993)

En los últimos dos años, el laboratorio de Spector fue el que más progresó en el estudio de la coordinación entre transcripción y splicing. Por un lado, demostraron que los speckles tienen conexiones entre sí, y que estas dependen de la transcripción, ya que desaparecen en presencia de  $\alpha$ -amanitina. Por otro lado, observaron la estructura de los speckles al microscopio electrónico, utilizando anticuerpos anti-SC-35 y anti snRNPs acoplados a partículas de oro. Así pudieron establecer que los speckles se corresponden con los previamente descritos "conglomerados de gránulos intercromatínicos" (Interchromatin Granule Clusters, IGC) y "fibrillas pericromatínicas" (Perichromatin Fibrils, PF). La marcación simultánea con pulsos de  $^3\text{H}$ -uridina reveló además que las PFs son sitios ricos en RNA naciente, y que las conexiones entre speckles que se observan al microscopio óptico no son otra cosa que las PFs interactuando con los factores de splicing que se acercan desde los speckles hacia los sitios de activa transcripción (Spector *et al.*, 1996). La Figura 7 esquematiza la interpretación de estos resultados.

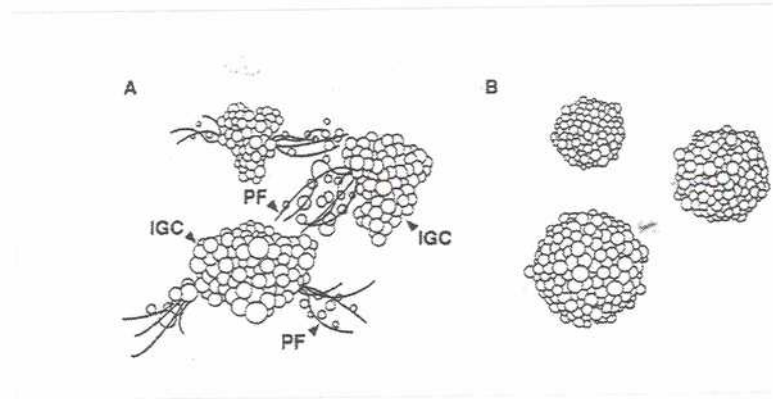


Figura 7

Además, la interacción entre sitios de activa transcripción y speckles depende de la presencia de intrones, ya que se la puede visualizar al asociada a la expresión un clon genómico de  $\beta$ -gb pero no a la de un clon de cDNA del mismo gen (Huang *et al.*, 1996). La distribución de los factores de splicing en speckles está afectada además por la actividad de SRPK y CLK/STY, dos quinasas específicas para proteínas SR (Huang *et al.*, 1996).

El aporte más significativo sobre la funcionalidad de los speckles y sobre la coordinación temporal y espacial de la transcripción y el splicing es un trabajo muy reciente. En él se siguió el comportamiento de una fusión de SF2/ASF a la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (GFP) respecto de la expresión del gen de  $\beta$ -tropomiosina transfectado, o respecto de la inducción de dos genes integrados al genoma de las células estudiadas (BKV y CMV) (Misteli *et al.*, 1997). Lo que hace a este trabajo único es que se utilizó un dispositivo que permite observar células vivas, lo cual permitió seguir en el tiempo la dinámica de los speckles -fusiones, evaginaciones y otras deformaciones- resultando evidente que la inducción de un gen en particular provoca el reclutamiento de SF2/ASF hacia el sitio de activa transcripción. También se confirmó que esta dinámica es inhibible por  $\alpha$ -amanitina y que depende de ciclos de fosforilación/desfosforilación de los factores de splicing.



### Otras evidencias apoyan el modelo de coordinación entre transcripción y splicing

Usando enfoques muy distintos, otros laboratorios demostraron la existencia de coordinación temporal de los procesos de transcripción y splicing.

La restricción del fenómeno de splicing a RNAs transcriptos por la RNA pol II exclusivamente llevó a preguntarse si esta enzima es responsable en parte del proceso de maduración de mRNAs. El reemplazo del promotor natural de un gen de por un promotor de RNA pol III, da como resultado mRNAs no procesados por la maquinaria de splicing (Sisodia *et al.*, 1993). Lo mismo ocurre si el promotor es reemplazado por uno de RNA pol I (Smale *et al.*, 1985) o de la RNA pol del bacteriofago T7 (Mc Cracken *et al.*, 1998).

En modelos experimentales tales como los anillos de Balbiani de *C. tentans* o los cromosomas politénicos de insectos, es posible aislar y analizar los pre-mRNAs. Esto permitió concluir que el orden de remoción de los intrones es constante para cada gen pero no sigue el orden secuencial de aparición de los mismos en el pre-mRNA (Bauren *et al.*, 1994). Incluso se encontró que la poliadenilación de ciertos transcriptos tiene lugar luego de la remoción de los intrones (Kessler *et al.*, 1993), lo cual demuestra que la transcripción y el splicing ocurren simultáneamente, al menos en estos casos estudiados.

El splicing también influye sobre el transporte de los mRNAs al citosol, como lo demuestra el gran número de casos descritos en los que mutaciones sin sentido en la región codificante de los mRNAs, implica la acumulación de los pre-mRNAs en el núcleo (Naeger *et al.*, 1992; Enssle *et al.*, 1993; Aoufouchi *et al.*, 1996). Aún se desconocen los mecanismos responsables de este fenómeno denominado "degradación de mRNAs mediada por mutaciones sin sentido" (non-sense mediated mRNA decay). Algunos autores especulan que debe existir algún mecanismo de lectura de los codones en el núcleo, capaz de reconocer a los codones stop (Cui *et al.*, 1995). Otros, postulan que las proteínas encargadas de interactuar con los intrones y/o las que acompañan a los mRNAs maduros al citosol serían las responsables de "señalar" a la maquinaria de transporte cuáles mRNAs deben salir del núcleo y cuáles no (Beelman *et al.*, 1995).

## EL GEN DE LA FIBRONECTINA COMO MODELO DE SPLICING ALTERNATIVO

Cuando las evidencias de coordinación espacial y temporal de la transcripción y el splicing eran aún incipientes, en nuestro laboratorio nos propusimos estudiar la posible coordinación entre transcripción y splicing alternativo. Para ello elegimos como modelo de splicing alternativo al exón EDI de la FN humana. Basamos esta decisión en la experiencia previa con que contaba el laboratorio respecto de este gen, en que los experimentos de localización de tracks lo incluían, y en el carácter paradigmático de la FN tanto a nivel genómico como proteico (Kornblihtt *et al.*, 1996).

La FN es una proteína de unos 250 kDa sintetizada por los hepatocitos que la secretan como un dímero a la sangre, o por otros tipos celulares (fibroblastos, células epiteliales, etc) que la depositan en forma de fibrillas en la matriz extracelular. Esta proteína cumple múltiples funciones en la formación de coágulos sanguíneos, la adhesión de células linfoides, la reparación de heridas cutáneas, las aterosclerosis y la regeneración hepática. La FN es esencial para la supervivencia de los mamíferos, como lo demuestran experimentos con ratones knock-out para este gen. La estructura de la FN es modular, y consiste en la repetición de unidades de 40, 60 y 90 aminoácidos, denominados dominios de tipo I, II y III respectivamente. Como este tipo de dominios está presente en otras proteínas (algunas de ellas involucradas también en procesos de adhesión), y la disposición de dominios se corresponde generalmente con la alternancia de exones en el gen, se ha tomado a la FN como un paradigma de la evolución del genoma por "barajado de exones" (exon shuffling).

En 1983, los laboratorios de Richard Hynes y Francisco Baralle descubrieron simultáneamente el splicing alternativo de los exones de FN IIICS y EDI (también llamado EDA o EIIIA) respectivamente (Schwarzbauer *et al.*, 1983; Kornblihtt *et al.*, 1984). Más tarde se descubrió el splicing alternativo de un tercer exón, llamado EDII (o EDB) (Gutman *et al.*, 1987; Zardi *et al.*, 1987; Schwarzbauer *et al.*, 1987). En total, las distintas combinaciones de splicing alternativo dan lugar a la formación de 8 variantes de FN en pollo, 12 en rata y 20 en humanos.

## El exón EDI

El exón EDI codifica para un dominio de tipo III de la FN. Este exón está presente en la FN celular pero no en la FN plasmática. Su inclusión en los mRNAs maduros varía en procesos proliferativos tales como el desarrollo embrionario y el crecimiento de ciertos tumores, y suele decaer en la senescencia. En tejidos adultos suele aumentar durante la reparación de heridas o la fibrosis.

El sitio 3' del intrón que precede al exón es subóptimo, y la inclusión de EDI depende de una región exónica de 81 pb de longitud con actividad de splicing enhancer (Mardon et al, 1987). Gracias a que esta secuencia se encuentra en el exón EDI de la FN pero no está presente en otros dominios de tipo III de la FN, el grupo de Baralle en Oxford logró asignarle la actividad estimuladora del splicing. Esta región interna está compuesta en realidad por dos elementos, denominados A y B. El elemento A es rico en purinas (GAAGAAGA) (Caputi et al., 1994; Lavigueur et al., 1993), y se parece a la secuencia consenso de unión de SF2/ASF, por lo que se ha propuesto que interactúa con esta proteína (Tacke et al., 1995). Además, este elemento es activo en el contexto de otros exones. El elemento B (CAAGG) fue originalmente descrito como un regulador negativo de la inclusión de EDI (Caputi et al., 1994) y sólo es activo en el contexto del elemento A. Se ha demostrado recientemente que es capaz de establecer una estructura secundaria en la región, lo cual determina el comportamiento alternativo de EDI (Muro et al., 1999).

Respecto del significado biológico del splicing alternativo de EDI, el laboratorio de Monty Bissell demostró en un modelo animal de fibrosis hepática que la FN EDI<sup>+</sup> se encuentra muy aumentada. Además, tanto la FN EDI<sup>+</sup> como un péptido sintético EDI<sup>+</sup> son capaces de inducir *in vitro* la conversión de un tipo celular hepático -los lipocitos o células ito- a miofibroblastos (Jarnagin et al., 1994). Dado que esta diferenciación celular se ve también en la fibrosis *in vivo*, se ha relacionado la expresión de isoformas de splicing de la FN con el proceso degenerativo hepático, aunque se desconoce si esta relación es causal o no. La proporción de FN EDI<sup>+</sup> fluctúa también durante la maduración de folículos ováricos bovinos. Se ha demostrado en cultivos de células de la granulosa bovina que el AMPc provoca una disminución de diez veces en la proporción de FN

EDI<sup>+</sup>, mientras que el TGF  $\beta$  es capaz de estimular la inclusión de EDI en unas cuatro veces (Colman-Lerner *et al.*, 1999). Es interesante destacar que existen numerosas evidencias que vinculan a los cuadros de fibrosis hepática con un alto nivel de expresión de TGF  $\beta$ . Pero quizás el efecto más llamativo de EDI sobre los cultivos de células de la granulosa mencionados es el de la estimulación de la división celular. En efecto, la incubación de estas células con un péptido EDI recombinante provoca una estimulación de la síntesis de DNA, mientras que péptidos recombinantes correspondientes a las regiones flanqueantes de tipo III, no provocan cambio alguno. A raíz de estos resultados se ha propuesto que los cambios en la expresión de FN podrían mediar algunos de los efectos hormonales involucrados en el desarrollo folicular (Colman-Lerner *et al.*, 1999).

# OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue el de poner a prueba la hipótesis de que el aparato transcripcional modula el "splicing" alternativo del RNA mensajero

Para ello nos propusimos:

- Diseñar un modelo experimental consistente en la transfección de células en cultivo con minigenes construidos río abajo de diversos promotores, cuyos transcritos sufran splicing alternativo
- Determinar si el patrón de splicing alternativo del transcripto varía según la identidad del promotor utilizado
- Determinar si los efectos observados son debidos a la "fuerza" o a la calidad de los promotores utilizados
- Determinar si los efectos observados son consecuencia de la naturaleza de la región 5' no codificante del mRNA
- Estudiar la importancia de una región regulatoria de la transcripción (e/o SV40) en la coordinación entre transcripción y splicing alternativo
- Estudiar el posible rol de proteínas de splicing como factores regulatorios en trans del splicing alternativo, en nuestro modelo experimental
- Estudiar si existe relación entre el efecto de los promotores sobre el splicing alternativo y el efecto de los factores de splicing sobre el mismo
- Analizar el papel de los tres dominios funcionales del factor de splicing SF2/ASF en el splicing alternativo del exón EDI del mRNA de fibronectina humana

- Investigar la relevancia de las regiones exónicas como secuencias regulatorias en cis del splicing alternativo
- Comparar el efecto de promotor sobre el splicing alternativo observable a partir de minigenes en episomas, respecto del efecto a partir de minigenes insertados en el genoma de células en cultivo

MATERIALES  
Y  
METODOS



## 1. Construcción de minigenes $\alpha$ -globina/fibronectina

### 1.1. Obtención del vector pSVEDAtot 0

Se partió de la construcción llamada minigen  $\alpha$ -globina/fibronectina ( $\alpha$ -gb/FN) (Vibe-Pedersen *et al.*, 1984), en la cual la región genómica conteniendo al exón EDI, sus intrones flanqueantes y los exones EDI-1 y EDI+1 ha sido ligada al tercer exón del gen de la  $\alpha$ -globina humana ( $\alpha$ -gb). Esta construcción está presente en el plásmido pSVEDAtot (Figura 8) (Caputi *et al.*, 1994) en la cual la expresión del gen quimérico  $\alpha$ -globina/fibronectina se halla bajo regulación del promotor de la  $\alpha$ -gb humana. Nótese que esta construcción lleva además la región enhancer/origen de replicación del virus simio 40 (e/o SV40).

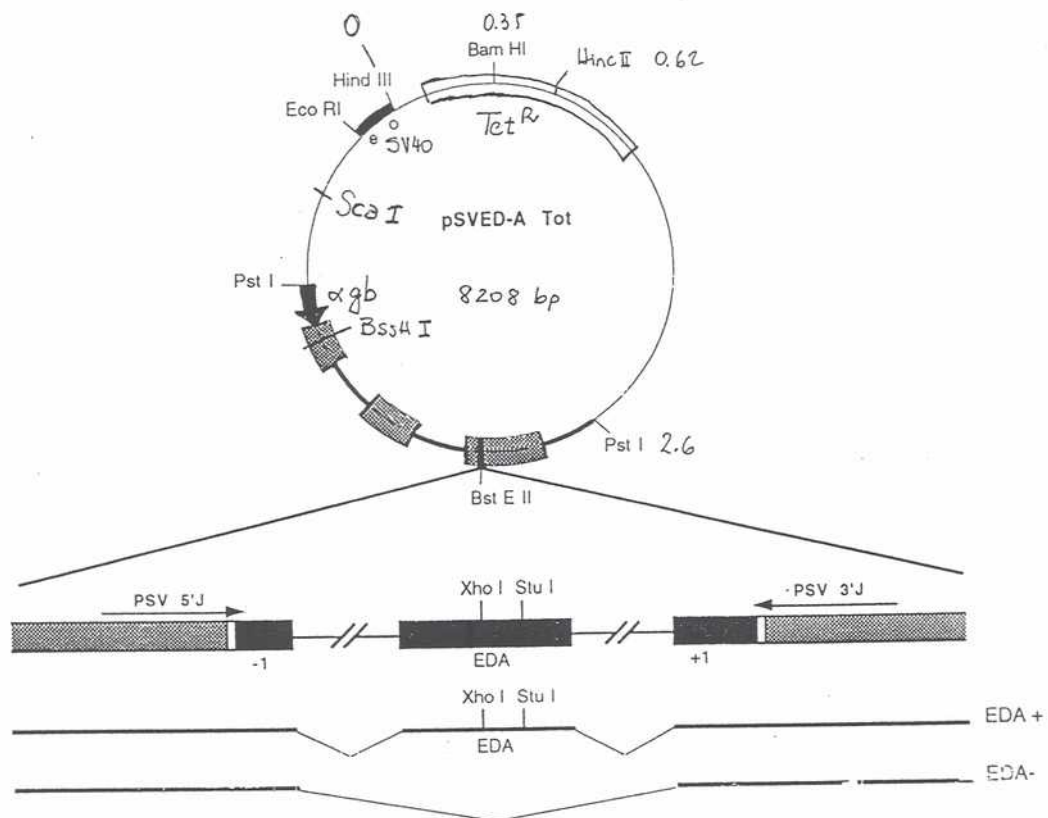


Figura 8: mapa de pSVEDAtot

Para obtener otras construcciones del gen quimérico que difieran en la región promotora, se digirió el plásmido pSVEDA<sub>tot</sub> con las enzimas de restricción Sca I y BssH II, con lo cual se eliminó un fragmento que incluye una porción del gen interrumpido de resistencia a ampicilina, el promotor de la  $\alpha$ -gb y las primeras 87 pb del exón 1 de  $\alpha$ -gb. Para poder introducir en este nuevo plásmido (pSVEDA<sub>tot</sub> 0) cada uno de los distintos promotores a ensayar, el extremo cohesivo resultante de la digestión con BssH II se rellenó utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

### 1.2. Construcción de minigenes con distintos promotores

Los promotores utilizados en esta tesis son el de la  $\alpha$ 1-antitripsina humana, el fragmento -220/+44 del gen de la FN humana, una versión de este último mutante para los sitios regulatorios CRE y CCAAT generada en nuestro laboratorio por el Dr. Gustavo Pesce, el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, la región LTR del virus de tumor mamario murino, y una fusión del promotor de HIV-2 a varios sitios de unión para la proteína GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los plásmidos generados se denominaron pSVEDA/ $\alpha$ 1-AT, pSVEDA/FN wt, pSVEDA/FN mut, pSVEDA/CMV, pSVEDA/MMTV y pSVEDA/Gal<sub>5</sub>-HIV-2 respectivamente.

#### Obtención de los promotores

El promotor de la  $\alpha$ 1-antitripsina humana ( $\alpha$ 1-AT) se obtuvo por digestión con las enzimas EcoRI y ApaI del plásmido pEMBL $\alpha$ 1-640-CAT (Ciliberto *et al.*, 1984).

Las regiones -220/+44 del promotor de la fibronectina humana salvaje y mutado en los elementos CRE y CCAAT (Alonso *et al.*, 1996) se obtuvieron por digestión EcoRI-HindIII de los plásmidos p220-wt y p220-doble (Pesce, 1997), respectivamente. En la Tabla 1 se muestran los cambios introducidos en las regiones CRE y CCAAT.

	CRE (-170)	CCAAT (-150)
FN wt	GTGACGTCAC	CCAAT
FN mut	<u>A</u> TGG <u>C</u> TTCAC	CC <u>C</u> CT

**Tabla 1:** Secuencia de las regiones CRE y CCAAT de los promotores de FN salvaje y mutante.

A partir de la digestión con HindIII y NruI del plásmido pRC/CMV (Invitrogen) se aisló el promotor inmediato temprano del citomegalovirus.

El promotor del virus del tumor mamario murino se aisló por digestión con HindIII-SmaI del plásmido pSP6MMTV (Melton *et al.*, 1984).

El promotor del virus de inmunodeficiencia humana clonado río abajo de cinco repeticiones de la secuencia de reconocimiento de la proteína GAL4 de *S. cerevisiae* (Gal<sub>5</sub>-HIV-2) se obtuvo por digestión con EcoRI y HindIII del plásmido pBL2lex<sub>4</sub>gal<sub>5</sub>CAT (Yankulov *et al.*, 1994).

En ningún caso fue necesario separar los fragmentos conteniendo los promotores de sus respectivos vectores por medio de electroforesis en geles de agarosa, ya que aquéllos confieren resistencia a ampicilina, mientras que el vector pSVEDA<sub>tot</sub> 0 al cual se ligarían dichos promotores confiere resistencia a tetraciclina.

#### *Tratamiento de extremos cohesivos de DNA doble cadena con fragmento Klenow*

Una vez digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, los extremos de los promotores aislados de LTR MMTV y CMV fueron rellenados con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Boehringer) (1 U/ $\mu$ g de DNA) durante 20' a temperatura ambiente, en el mismo buffer de digestión enzimática, en presencia de 250  $\mu$ M de cada dNTP.

#### *Tratamiento de extremos cohesivos de DNA doble cadena con DNA polimerasa del fago T4*

Una vez digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, los extremos cohesivos del promotor de la  $\alpha$ -1 antitripsina humana aislado fueron

transformados en romos con la enzima DNA polimerasa del fago T4 (BRL) (0,2 U/ $\mu$ g de DNA) durante 15' a 37°C en el mismo buffer de digestión enzimática, en presencia de 250  $\mu$ M de cada dNTP.

### **Construcción de los minigenes**

Una vez aislados los promotores, se los ligó al vector pSVEDA<sub>tot0</sub> ya descrito.

#### *Ligaciones*

Las reacciones de ligación se hicieron a 20°C durante 26 hs, en 20  $\mu$ l de buffer de ligación (BRL), en presencia de 500  $\mu$ M ATP y 1 U de DNA ligasa del fago T4.

#### *Transformación de bacterias competentes*

Cultivos de *E.coli* de las cepas DH5 $\alpha$  o MC1061 se procesaron según Hanahan, 1980, para obtener bacterias competentes.

Se usó el protocolo de transformación de Sambrook *et al.*, 1989.

### **Detección de clones positivos por hibridación de colonias**

#### *Transferencia de colonias a filtros Whatman 541*

-Se apoya un filtro de papel Whatman 541 previamente marcado sobre las colonias hasta humedecer totalmente. Se copian las marcas del papel sobre la placa para permitir su futura alineación.

-Se retira el filtro con una pinza y se lo sumerge con la cara de las colonias hacia arriba en:

- 1-NaOH 0,5 N por 5'
- 2-Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 por 5'
- 3-Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 por 5'
- 4-SSC 2X por 5'
- 5-NaOH 0,5 N por 2'
- 6-Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 por 2'
- 7-Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 por 2'
- 8-SSC 2X por 2'
- 9-Se enjuaga brevemente en etanol y luego se seca al aire.

SSC 20X:

NaCl                    3 M  
 Citrato de Na        3.33 M

Se disuelven en H<sub>2</sub>O y se lleva a pH 7 con unas gotas de NaOH 10 N.

*Marcación de sondas radiactivas*

Los fragmentos a marcar se digirieron con enzimas de restricción y se purificaron en electroforesis en geles de agarosa usando membranas de DEAE celulosa (Schleicher&Schuell).

Para las marcaciones se usó alternativamente el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E.coli (kit RadPrime, Gibco BRL), octanucleótidos de secuencia al azar y 20  $\mu$ Ci de [ $\alpha^{32}$ P] dCTP 3000 Ci/mmol (NEN) o la enzima Polinucleótido quinasa del bacteriófago T4 (Boehringer) y 70  $\mu$ Ci de [ $\gamma^{32}$ P] ATP (NEN).

*Prehibridación, hibridación y lavados*

La prehibridación se realizó en SSC 5X, 1 % SDS, Denhardt 2X y 100  $\mu$ g/ml DNA de espermatozoos de salmón a 65°C durante 2 hs.

La hibridación se realizó en un volumen reducido de la misma solución conteniendo la sonda radiactiva, a 65°C durante 16 hs.

Los sucesivos lavados se hicieron en SSC-SDS en condiciones de concentración salina decreciente y temperatura creciente.

Denhardt 50X:

(Para 1 litro de solución)

Fycoll                                    10 g  
 Polivinilpirrolidona                10 g  
 Serolabúmina bovina                10 g

*Preparación de plásmidos en pequeña escala*

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim *et al.*, 1979).

*Mapeo y secuenciación de los clones positivos*

Los clones que dieron señal positiva en el "screening" radiactivo fueron analizados usando enzimas de restricción para determinar la correcta orientación

de los promotores. Los clones de interés resultantes se secuenciaron usando el oligonucleótido LV-3 (5' GGGGAGGGAGCCTCACCTCT 3') complementario a la porción +175/+194 de la hebra no codificante, 55 bases río abajo del sitio BssHIII usado para clonar los promotores.

#### *Secuenciación a partir de DNA doble cadena*

Los plásmidos a secuenciar fueron desnaturalizados en NaOH 2 N (1/3 de volumen) durante 10 minutos a temperatura ambiente, con el objeto de desnaturalizarlos. Luego se los limpió con columnas de Sephacryl (Microspin S-200, Pharmacia), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para la secuenciación se usó el kit Sequenase, USB, siguiendo las indicaciones del proveedor. Los productos de secuenciación fueron visualizados en geles de poliacrilamida 6% con urea, gracias a su marcación interna con 5  $\mu$ Ci de [ $\alpha^{32}$ P] 3000 Ci/mmol o 5  $\mu$ Ci de [ $\alpha^{35}$ S] dCTP 3000 Ci/mmol.

#### *Preparación de plásmidos en gran escala*

Todos los plásmidos usados para transfectar líneas celulares en cultivo fueron preparados según el protocolo de purificación de DNA plasmídico en gradiente isopícnico de CsCl descrito en Sambrook *et al.*, 1989, modificado como sigue:

- 1- Inocular con una colonia en 500 ml de Terrific Broth con el antibiótico correspondiente.
- 2- Crecer por no menos de 20 horas.
- 3- Trasvasar el cultivo a mamaderas de 1/2 litro y dejar enfriando en hielo unos minutos.
- 4- Centrifugar en rotor JA 10 (GS3) a 5000 rpm por 15'.
- 5- Descartar el sobrenadante y dejar invertida la mamadera sobre papel absorbente. Resuspender en 100 ml de P1. Dejar 5' a Tamb.
- 6- Agregar 100 ml de P2 fresca. Dejar 5' a Tamb.
- 7- Agregar 100 ml de P3 helada. Dejar 15'-20' en baño de agua/hielo.
- 7- Centrifugar en rotor JA 10 (GS3) a 9000 rpm por 30'.
- 8- Filtrar el sobrenadante por embudo con lana de vidrio.
- 9- Medir el volumen y precipitar con 0,7 volúmenes de isopropanol.
- 10- Centrifugar en rotor JA 10 (GS3) a 9000 rpm por 50'.

- 11- Descartar el sobrenadante, dejar invertida la mamadera sobre papel absorbente.
- 12- Lavar el pellet con etanol 70%. Centrifugar en rotor JA 10 (GS3) a 9000 rpm por 20'.
- 13- Descartar el sobrenadante con *muchísimo* cuidado. Invertir sobre papel absorbente.
- 14- Resuspender en 10 ml de TE. Trasvasar a tubo Falcon de 15 ml (previamente tarado) y agregar 300  $\mu$ l de bromuro de etidio 10 mg/ml.
- 15- Pesar el tubo y restar el peso del Falcon. Pesar una cantidad de cloruro de cesio igual al valor de la resta. Cerrar el tubo.
- 16- Trasvasar a un tubo de ultracentrífuga y centrifugar en rotor VTi 65.1 por un ON a 55000 rpm.
- 17- Extraer la banda de plásmido ccc con una pipeta Pasteur.
- 18- Extraer el bromuro de etidio sucesivas veces con butanol saturado en agua.
- 19- Precipitar con 2 volúmenes de etanol 100% y 0,1 volúmenes de acetato de Na

**P1**

Tris-HCl                      50 mM pH 7,5

EDTA                            10 mM

Agregar 50  $\mu$ g/ml de RNasa A en el momento de usar.**P2**

NaOH                            0,2 N

SDS                              1%

**P3**

KAcO                            3 M pH 5,2

Disolver 490,7 g de KAcO en 1475 ml de H<sub>2</sub>O. Agregar 192 ml de ácido acético glacial.**1.3. Construcción de pSVEDA/5'FN y pSVEDA/5'NF**

Se construyeron versiones del minigen que llevan el promotor de la  $\alpha$ -globina humana pero que codifican para mRNAs idénticos a aquellos de los minigenes de FN. Para esto fue necesario reemplazar un fragmento de pSVEDA<sub>tot</sub> por un oligonucleótido doble cadena que abarca la región -17/-1 del promotor de  $\alpha$ -gb río arriba de la región +1/+44 del gen de la FN, generando la construcción pSVEDA/5'FN. La construcción pSVEDA/5'NF fue obtenida luego de ligar el mismo oligonucleótido en sentido invertido.

#### 1.4. Construcción de mutantes en los elementos exónicos sobre minigenes $\alpha$ -globina/fibronectina

La misma estrategia descrita para la obtención del vector pSVEDA<sub>tot</sub> 0 a partir del plásmido pSVEDA<sub>tot</sub>, se aplicó a los plásmidos pSVEDA<sub>tot</sub> $\Delta$ 2e (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>), pSVEDA<sub>tot</sub>AS<sub>tu</sub> (A<sup>+</sup>B<sup>-</sup>) y pSVEDA<sub>tot</sub>AB<sub>mut</sub> (A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>), construidos por Caputi. A estos nuevos vectores se ligaron los promotores de FN wt y FN mut. De esta manera se dispuso de minigenes con cada una de las mutaciones en los elementos regulatorios exónicos (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, A<sup>+</sup>B<sup>-</sup>, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>, A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>), con tres promotores distintos ( $\alpha$ -gb, FN wt y FN mut).

## 2. Otros plásmidos usados en esta tesis

### *Plásmidos de expresión*

Para determinar la eficiencia de transfección se usó el plásmido pCMV $\beta$ gal que expresa la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.coli* a partir del promotor del gen inmediato temprano citomegalovirus humano.

En los casos en que se indica, se reemplazó el pCMV $\beta$ gal por el plásmido pRSV $\beta$ gal (cedido por el Dr. H. Martinetto), que expresa la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.coli* a partir del promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV).

Para la expresión de la proteína Antígeno T del virus simio 40 (SV40) se utilizó el plásmido p $\beta$ 5'SVBgl II (Grosfeld *et al.*, 1982), que incluye el promotor temprano de SV40.

Para los experimentos de inducción del promUCSF, EEUU), que expresa el receptor de glucocorticoides de tipo 2.

Los plásmidos g10SF2wt, g10 SF2 $\Delta$ RS, g10 RRM1/RS ( $\Delta$ RRM2), g10 RRM2/RS ( $\Delta$ RRM1), g10 FF-DD, g10 SRp20, g10 SRp30c, g10 SRp40, g10 SRp55, g10 SC35, y pCGhnRNPA1, expresan los cDNA correspondientes a las proteínas ASF/SF2 (y las mutantes de laboratorio), SRp20, SRp30c, SRp40, SRp55, SC35, y hnRNPA1, bajo regulación del promotor de CMV. Todas estas construcciones fueron generadas en el laboratorio del Dr. A.R. Krainer (Cold Spring Harbor Lab., Long Island, NY) y cedidas por el Dr.J.F.Cáceres (MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edimburgo, Reino Unido) en el contexto de una colaboración



con nuestro grupo. Los plásmidos pflag-Tra2 $\beta$ y pEGFP-Tra2 $\beta$ , gentilmente cedidos por el Dr. Stefan Stamm (Instituto Max Planck, Martinsried, Alemania) fueron usados para expresión del análogo humano de la proteína Tra2 $\beta$  de *D. melanogaster* bajo el promotor de CMV. La segunda de estas dos construcciones expresa una proteína de fusión al extremo amino terminal de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. Por otro lado, se cotransfectó el plásmido 6RGR (cedido por el Dr. K.R. Yamamoto, Dept. Pharmacology,

### **3. Transfección de células en cultivo**

#### **3.1. Cultivo de células**

Las células Hela y Hep3B fueron cultivadas en placas de 100 mm (Nunc) conteniendo 8 ml de medio D-MEM (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL), glutamina 2 mM (Gibco BRL), penicilina 100  $\mu$ g/ml y estreptomycinina 80  $\mu$ g/ml (Gibco BRL), en una estufa a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se fueron plaqueadas a una densidad de 5x10<sup>5</sup> células por placa y repicadas con tripsina 0,25 % en PBS 1X aproximadamente cada 3 días.

#### **Tratamientos con AMPc y dexametasona**

En los casos en que se indica, se agregó dibutilil AMPc 1 mM (stock 10 mM en etanol) disuelto en D-MEM conteniendo 1% SFB, o 400 ng/ml dexametasona disuelta en D-MEM conteniendo 1% SFB, durante 48 hs, a partir de las 6hs post transfección.

Dado que el gen  $\beta$ -gal que usamos normalmente para medir la eficiencia de la transfección se halla bajo regulación del promotor de CMV, y por ende, el AMPc también induce su expresión, se lo reemplazó en este caso por un plásmido reporter en que la actividad  $\beta$ -galactosidasa es dirigida por el promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV).

#### **3.2. Transfección transitoria de células en cultivo con liposomas catiónicos**

El día previo a la transfección se plaquea 1,8x10<sup>5</sup> células Hep3B o 2x10<sup>5</sup> células HeLa en D-MEM conteniendo 10% SFB, en placas de 6 pocillos, de 35 mm de diámetro. Al día siguiente, se agregan el DNA y los liposomas siguiendo este

protocolo:

- 1) Se mezclan 100  $\mu$ l de D-MEM con el DNA en un tubo eppendorf
- 2) Se mezclan 100  $\mu$ l de D-MEM con la LipofectAMINE Reagent (Life Technologies) en un tubo de vidrio o en tubo de polipropileno.
- 3) Se agrega la mezcla de DNA a la de lipofectamina en el tubo de vidrio. Se deja 30'-45'.
- 4) Se agregan 800  $\mu$ l de D-MEM (por cada mezcla de 100+100), obteniendo un volumen total de 1000  $\mu$ l.
- 5) Se aspira el medio a las células repicadas el día previo, se enjuaga 2 veces en PBS 1X y se agregan 950  $\mu$ l de la mezcla a cada pocillo
- 6) Se deja por 6 o más horas en la estufa.
- 7) Se aspira el sobrenadante y se agregan 2 ml de D-MEM por pocillo.
- 8) A las 48 hs se cosecha.

Nota: donde dice D-MEM se refiere a medio solo, sin antibióticos ni suero.

Las condiciones óptimas para la transfección de estas dos líneas celulares se obtuvieron agregando 2  $\mu$ g de DNA total y 8  $\mu$ l de lipofectamina a cada pocillo. Para cada tratamiento se hicieron triplicados o cuadruplicados. En el momento de la cosecha se usó un pocillo por cada tratamiento para determinar las eficiencias de transfección mediante ensayos de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. Los pocillos restantes se usaron para la preparación de RNA.

### **3.3. Obtención de líneas celulares clonadas de expresión estable**

Para obtener clones de expresión estable se transfectaron células Hep3B con 1,7  $\mu$ g de pSVEDA<sub>tot</sub>, pSVEDA/FN mut o pSVEDA/CMV, 0,2  $\mu$ g de pCMV $\beta$ gal y 0,2  $\mu$ g de pRC/CMV. Este último plásmido, que codifica para el gen de resistencia a neomicina (o G418), se incluyó para poder seleccionar a aquellas células transfectadas en forma estable. Para garantizar la presencia de ambos tipos de plásmidos en cada célula resistente al antibiótico, se transfectó con una masa unas 10 veces menor de pRC/CMV que de los respectivos minigenes.

A las 48 hs post-transfección se agregó D-MEM 1% SFB conteniendo G418 (500  $\mu$ g/ml). La concentración selectiva de antibiótico se estableció previamente plaqueando células Hep3B no transfectadas en cantidades crecientes de G418

(que oscilaron entre 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 1,6  $\text{mg}/\text{ml}$ ). El medio de cultivo con antibiótico se cambió cada dos días a lo largo de todo el proceso de selección de clones resistentes. Transcurridas un par de semanas los clones resistentes, que se hicieron visibles primero el microscopio y luego a simple vista, fueron aislados por tripsinización dentro de pequeños discos o por simple remoción mecánica y subcultivados en placas de 24 pocillos. De esta manera, y al cabo de un par de meses, se logró la amplificación de unos 10 clones para cada minigen.

#### 4. Análisis de las transfecciones

##### 4.1. Ensayo de actividad de la $\beta$ -galactosidasa

###### *Obtención de extractos celulares*

- 1- A las 48 hs post-transfección, se enjuagan las monocapas dos veces con PBS 1X
- 2- Se agregan 150  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (5X Lysis Buffer, Promega) a cada pocillo, y se incuba por 15' a temperatura ambiente.
- 3- Con la ayuda de un "rubber policeman" se trasvasan los lisados a tubos eppendorf, y se centrifugan a 10000g, 10'.
- 4- Se recuperan los sobrenadantes, sobre los que se ensaya la actividad enzimática.

###### *Detección de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa*

- 1- En tubos eppendorf, se mezclan: un volumen de buffer  $\beta$ -gal 2X, y un volumen conteniendo el extracto diluído en  $\text{H}_2\text{O}$  (las reacciones se hicieron generalmente en 100  $\mu\text{l}$  totales, ensayando la actividad de un 10% del extracto celular).
- 2- Se incuba a 37° C hasta desarrollo de color amarillo.
- 3- Se detiene la reacción con 1 volumen (respecto del volumen de reacción) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M.
- 4- Se mide la absorbancia a 415 nm.

###### PBS 1X

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,44 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,24 g

Agregar 800 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , ajustar el pH a 7,4 con HCl, y llevar el volumen a 1 l.

###### Buffer $\beta$ -gal 2X:

Fosfato de Na pH 7,4	0,2 M
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
β-mercaptoetanol	0,1 M
Orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG)	1,33 mg/ml

#### 4. Detección de las isoformas de splicing alternativo

##### 4.1. Extracción de RNA de cultivo de células (tomado de Sambrook et al, 1989, derivado de Chomczynski *et al.*, 1987)

- 1- Aspirar bien el medio de cultivo (no enjuagar con PBS).
- 2- Agregar 500 µl de solución desnaturante por pocillo.
- 3- Trasvasar a un tubo eppendorf. Agregar 50 µl de acetato de Na 3 M pH 4. Mezclar por inversión.
- 4- Agregar 500 µl de fenol:H<sub>2</sub>O. Mezclar.
- 5- Agregar 100 µl de Cl<sub>3</sub>CH:isoamílico (49:1). Vortexear bien. Incubar 15' a 0°C.
- 6- Centrifugar 20' a 9000 rpm en SS34(10000g) a 4°C.
- 7- Pasar la fase acuosa a otro tubo.
- 8- Precipitar con un volumen (500 µl) de isopropanol 100% durante 30'-60' a -20°C
- 9- Centrifugar 10' a 9000 rpm en SS34 (10000g) a 4°C.
- 10- Volcar el sobrenadante y agregar etanol 75%. Vortexear y dejar 15' a T ambiente.
- 11- Centrifugar 10' a 9000 rpm en SS34 (10000g). Volcar el sobrenadante, escurrir y secar al aire. *No secar con speed-vac.*
- 12- Resuspender en H<sub>2</sub>O libre de RNasas.
- 13- Guardar a -80°C.

##### Solución desnaturante:

Isotiocianato de guanidinio	4 M
Citrato de Na	25 mM
2-mercaptoetanol	0,1 M
N-laurilsarcosina	0,5 %

#### 4.2. Northern blot

##### *Geles de agarosa desnaturizantes*

Se preparan geles de agarosa 1% en buffer MOPS 1X y formaldehído 6% final. Las muestras se mezclan en buffer de siembra (formamida 50%, formaldehido 6%, MOPS 1X y 1 µl de bromuro de etidio 0.5 mg/ml), se calientan a 65°C

durante 10' y se conservan en hielo hasta la siembra.

Los geles se corren en MOPS 1X con formaldehído 6% a 5 V/cm.

MOPS 10X:

MOPS pH 7	400 mM
Acetato de Na	100 mM
EDTA pH 8	10 mM

*Transferencia a filtros de nylon*

Los geles se transfieren a filtros de Nylon cargado (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) usando el método "downward", en 8 mM NaOH, 3 M NaCl, Sarkosyl 2 mM (opcional) durante una noche.

*Síntesis de ribosondas radiactivas*

Como molde de la transcripción se usó el plásmido pBS SK<sup>+</sup>/EDI<sup>+</sup> linealizado con la enzima BamHI y resuspendido en 10 mM Tris-HCl pH 7 (100 ng/ $\mu$ l). La transcripción se realizó en buffer de transcripción 1X (40 mM TrisHCl pH 7.9, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 2 mM espermidina, 0,05% Tween 20), 8 mM DTT, 150  $\mu$ M ATP, 150  $\mu$ M CTP, 150  $\mu$ M GTP, 20 U RNAsin, 70  $\mu$ Ci de [ $\alpha^{32}$ P] UTP 3000 Ci/mmol y 10 U de RNA polimerasa del fago T7, usando 400 ng de DNA molde. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego el DNA molde se degradó con 1  $\mu$ l de DNasa RQ1 (libre de RNasas) y 20 U de RNAsin, durante 15 minutos a 37°C.

El producto de transcripción se separó en geles de poliacrilamida 6% desnaturalizantes (sembrando la muestra en 97% formamida, 10 mM TrisHCl pH 7, 0,1% SDS, 0,005% BPB), de los que se eluyó el producto de transcripción durante una noche a 37°C en 2 M acetato de NH<sub>4</sub>, 1% SDS, 25 mg/ml tRNA. Alternativamente, se reemplazó la separación en geles por una doble precipitación en 2 M acetato de NH<sub>4</sub>, 1% SDS, 25 mg/ml tRNA e isopropanol (0,7 volúmenes).

### *Hibridación*

La pre-hibridación se realizó en solución de hibridación (50% formamida, 10% PEG 8000, 250 mM NaCl, 120 mM buffer fosfato de Na pH 7, 7% SDS) a 68°C en un horno de hibridación con agitación orbital durante 15 minutos.

La hibridación se realizó agregando la ribosonda hervida, e incubando en las mismas condiciones de sal y temperatura, durante 16 hs.

### *Lavados*

- 1) SSC 2X, 0,1 % SDS a temperatura ambiente (dos lavados)
- 2) SSC 2X, 0,1 % SDS a 65°C
- 3) SSC 1X, 0,1 % SDS a 65°C
- 4) SSC 0,1X, SDS 0,1 % a 65°C
- 5) SSC 0,1X, SDS 0,1 % a 68°C

Además se emplearon en esta tesis las siguientes sondas:

-oligo HIB1 (5' GATTCTGAGCATAGACACTAACCAC 3'): oligonucleótido complementario a una región del exón -1 del mRNA, marcado radiactivamente con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP y PNK.

-M13EDI: exón EDI clonado en el fago M13 simple cadena. Para su marcación se sintetizó la hebra complementaria con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y primer universal, en presencia de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP.

-pFH23 y 154: clones de cDNA de la FN humana, marcados radiactivamente con un kit comercial (Random Prime, GIBCO, BRL) en presencia de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP. El clon pFH23 abarca la región y reconoce a las isoformas de splicing EDI+ y EDI-. El clon pFH154 abarca la región y reconoce a la isoforma EDI- solamente.

La cuantificación de los resultados se realizó alternativamente mediante un densitómetro o mediante "scaneado" de las autorradiografías y posterior análisis con el programa NIH Image 1.56.

### **4.3. RT-PCR**

#### *Síntesis de DNA complementario a partir de RNA de células en cultivo*

Para sintetizar cDNA a partir del RNA extraído de células transfectadas y "mock" transfectadas, el RNA contenido en un volumen de 5  $\mu\text{l}$  se desnaturalizó

a 65°C por 5', se lo transfirió a 0°C, y luego se le agregaron mezclas de reacción de 15 µl conteniendo 50 mM TrisHCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 20 U de RNAsin (Promega), 400 µM dNTPs, 2,5 µM pdT<sub>12,18</sub>, (Pharmacia) y 300 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). Las reacciones se incubaron a 35°C durante 1 hora, y a 95°C por 5'. Se incluyeron siempre controles sin transcriptasa reversa.

#### *Amplificación de cDNA por PCR*

Las reacciones de amplificación se hicieron según las indicaciones del proveedor utilizándose 1,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 200 µM dNTPs, 3% dimetilsulfóxido y 1,5 unidades de Taq polimerasa. Como molde se usó un 10 % de la reacción de síntesis de cDNA y como "primers" a los oligonucleótidos pSV5'j y pSV3'j (Caputi *et al.*, 1994) en una concentración de 1 µM final cada uno. Siempre se incluyeron controles sin cDNA molde.

La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin Elmer) durante 30 ciclos del siguiente modo:

Desnaturalización: 93°C por 45''.

Apareamiento: 63°C por 1'.

Elongación: 72°C por 30''.

Los productos de amplificación se analizaron de las siguientes maneras:

-en geles de agarosa al 1,2 % corridos a 5 V/cm en TBE 1X teñidos con bromuro de etidio

-en ensayos de Southern blot de los geles de agarosa mencionados, usando las sondas arriba descritas. La cuantificación se realizó del mismo modo descrito para los Northern blots.

-en geles de poliacrilamida 6% corridos a 15 W en TBE 1X. En este último caso se visualizaron gracias a la inclusión de [<sup>32</sup>P] dCTP en la PCR (aprox. 1 µCi por reacción). Esto permitió, además, cuantificar la abundancia de cada producto de RT-PCR en un contador de centelleo.

oligonucleótido pSV3'j: 5'-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3'

oligonucleótido pSV5'j: 5'-CACTGCCTGCTGGTGACTCGA-3'

TBE 10X:

Acido bórico	89 mM
Tris	89 mM
EDTA	20 mM



# RESULTADOS

## 1. DESCRIPCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL USADO EN ESTE TRABAJO

En 1984, el grupo del Dr. Baralle, en Oxford, demostró que era posible reproducir el patrón de splicing alternativo del exón EDI de la fibronectina (FN) humana en células HeLa, si se transfectaban las mismas con una construcción llamada minigen alfa-globina/FN en la cual la región genómica conteniendo al exón EDI, sus intrones flanqueantes y los exones EDI-1 y EDI+1 había sido ligada al tercer exón del gen de la alfa-globina humana ( $\alpha$ -gb) (Vibe-Pedersen *et al.*, 1984). Posteriormente se obtuvo a partir de esta construcción original, el plásmido pSVEDAtot (Caputi *et al.*, 1994, ver **Figura 8** en Materiales y Métodos) del cual se habían eliminado ciertos sitios críticos de splicing.

El presente trabajo pretende profundizar el conocimiento que se tiene sobre la regulación del splicing alternativo. En particular, nos propusimos estudiar si existe una relación entre la transcripción y el splicing alternativo. Para ello, tomamos la construcción obtenida por el grupo del Dr. Baralle (pSVEDAtot) y generamos una batería de plásmidos capaces de expresar minigenes alfa-globina/FN, bajo la regulación de diferentes promotores.

### 1.1 Obtención de minigenes alfa-globina/fibronectina con distintos promotores

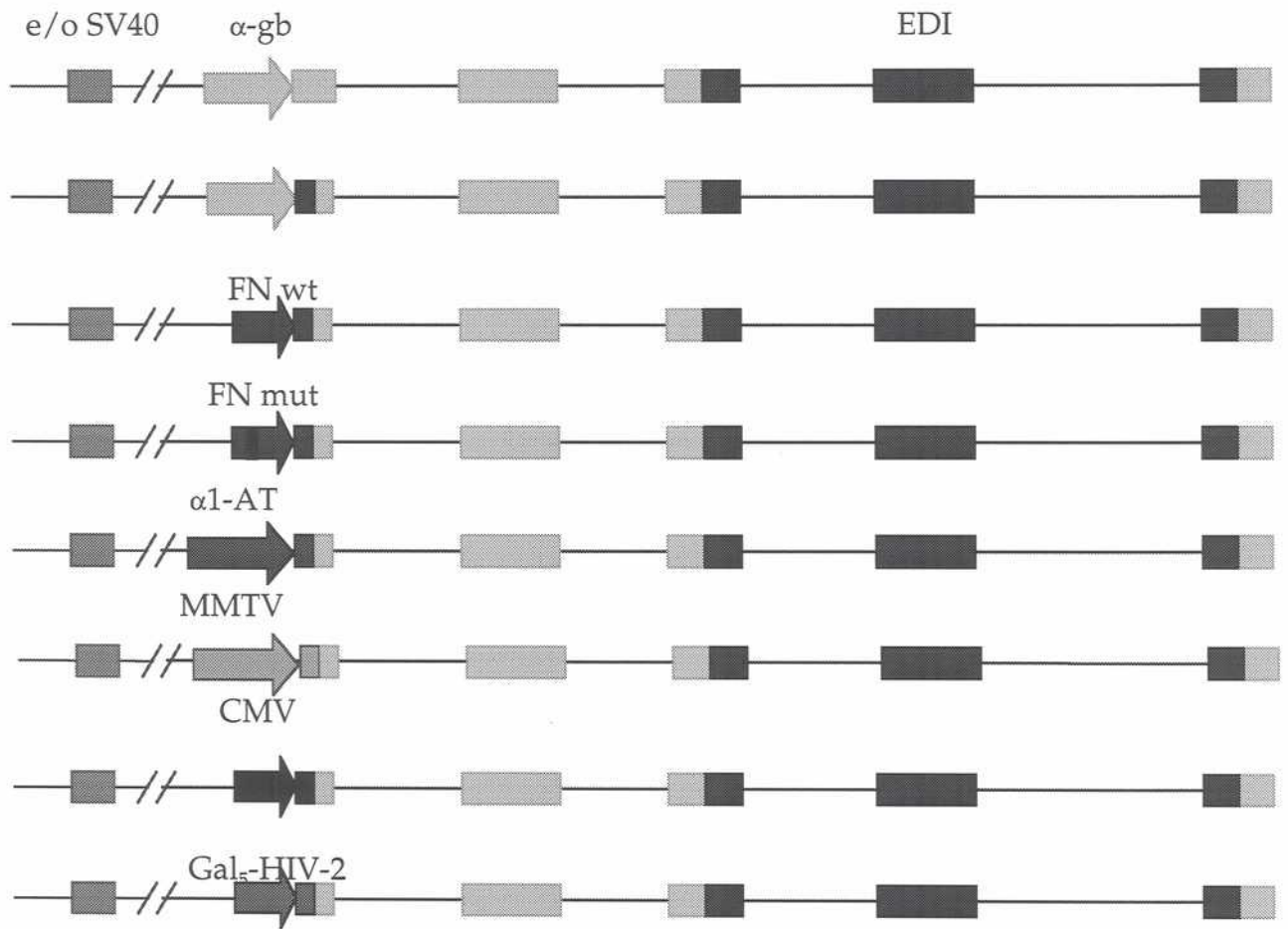
Al comienzo de esta tesis partimos entonces de la construcción modificada por Caputi, para obtener minigenes  $\alpha$ -gb/FN que difirieran en el promotor.

Así, se digerimos el plásmido pSVEDAtot de modo tal de eliminar el promotor de  $\alpha$ -gb, y se lo ligamos a fragmentos romos correspondientes a los promotores de diversos genes (ver Materiales y Métodos). Los promotores elegidos fueron los siguientes:

- alfa1-antitripsina humana ( $\alpha$ 1-AT), de expresión exclusiva en hígado
- un fragmento del promotor de la FN humana salvaje (FN wt) y otro conteniendo los sitios CRE y CCAAT mutados (FN mut) (Alonso *et al.*, 1996)
- promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), de expresión inducible por AMPc
- LTR de virus tumor mamario murino (MMTV), de expresión inducible por glucocorticoides

-promotor del virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 río abajo de cinco sitios de unión para la proteína Gal4 de *S.cerevisiae* (Gal<sub>5</sub>-HIV-2)

Todas las construcciones obtenidas se secuenciaron para confirmar la identidad de los promotores y para verificar que las uniones entre cada promotor y el minigen fueran las predichas. En la **Figura 9** se muestra un esquema de las construcciones obtenidas (el mapa del plásmido pSVEDAtot del cual se partió se muestra en la **Figura 1**, Materiales y Métodos).



**Figura 9:** Esquema de los minigenes contstruidos en esta tesis. En naranja se muestra la región e/o SV40; en amarillo, las secuencias correspondientes al gen de la alfa-globina humana; en violeta, las secuencias del gen de fibronectina humana; en verde y azul, las secuencias promotoras y 5' no codificantes de  $\alpha$ 1-AT, MMTV, CMV, Gal<sub>5</sub>-HIV-2.

## 2. ENSAYO DE LA EXPRESION IN VIVO DE LOS MINIGENES CONSTRUIDOS

### Desarrollo de un sistema eficiente de expresión *in vivo* y de un método rápido y sensible para la detección de los transcritos procesados

Una vez obtenidas las construcciones arriba mencionadas, y habiendo establecido las condiciones óptimas de transfección de líneas celulares en cultivo, procedimos a transfectar células hepáticas (Hep3B) y no hepáticas (HeLa) usando liposomas catiónicos. Para determinar la eficiencia de transfección de cada tratamiento cotransfectamos con un plásmido "reporter" que expresa el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (pCMV $\beta$ gal). A las 48 horas post-transfección determinamos la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de cada muestra, y extrajimos el RNA. Posteriormente analizamos cantidades de RNA correspondientes a lecturas equivalentes (a DO<sub>415 nm</sub>) de actividad  $\beta$ -galactosidasa entre las distintas muestras. Para analizar el patrón de splicing alternativo obtenido a partir de cada construcción, empleamos distintos métodos. En primera instancia realizamos ensayos de Northern blot, que hibridamos con distintos tipos de sondas radiactivas con el objeto de encontrar aquella que brindara las condiciones de máxima sensibilidad y que a la vez detectara con igual sensibilidad a ambas isoformas de splicing alternativo, es decir, a los mRNAs quiméricos que incluyen al exón EDI (EDI<sup>+</sup>) y a los que no lo incluyen (EDI). Así, ensayamos hibridaciones con un oligonucleótido antisentido que se apareara con el exón -1 de la FN humana (oligonucleótido HIB1), presente en ambas isoformas de splicing en igual proporción; con un fragmento de DNA que codifica para el exón EDI exclusivamente (M13EDI), y que por consiguiente reconoce solamente a la forma EDI<sup>+</sup>; y con fragmentos de clones de cDNA obtenidos a partir de la forma EDI (pFH23 y pFH154), capaces de reconocer a ambas isoformas (para información pertinente a estas sondas ver Materiales y Métodos). Todas estas sondas resultaron igualmente confiables en cuanto a su especificidad, pero ninguna demostró una alta sensibilidad. Fue así que finalmente decidimos construir un plásmido conteniendo el producto de RT-PCR de la forma EDI<sup>+</sup>, clonado río abajo del promotor del bacteriófago T7 (Materiales y Métodos), de modo de poder obtener una ribosonda radiactiva a partir de la transcripción *in vitro* de

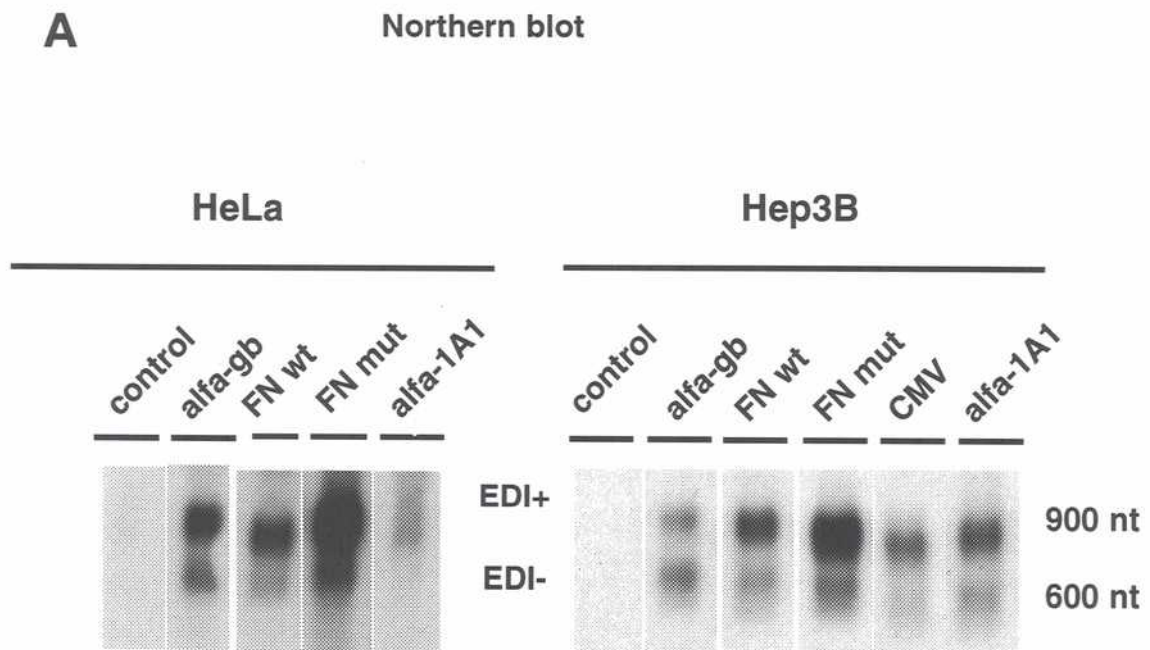
esta nueva construcción. Esta ribosonda, denominada de ahora en más ribosonda EDI<sup>+</sup>, alcanzó los niveles de sensibilidad que buscábamos, permitiéndonos observar los resultados de Northern blot en pocas horas.

Por razones prácticas, cada experimento se analizó en forma paralela mediante reacciones de RT-PCR que se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o en Southern blots de los productos de RT-PCR (hibridados con las sondas mencionadas). Comparando los resultados obtenidos en Northern blots y Southern blots de las RT-PCRs, pudimos establecer la validez del método de RT-PCR para la cuantificación de las isoformas de splicing. A la luz de estos resultados y nuevamente por razones prácticas, se puso a punto en el laboratorio la detección de los mRNAs transfectados mediante PCRs radiactivas. Por lo expuesto, algunas de las figuras de esta tesis muestran resultados de Northern blot, y en otros casos muestran resultados de RT-PCR.

### **3. EFECTOS DEL PROMOTOR SOBRE EL SPLICING ALTERNATIVO**

*Los minigenes que difieren en su promotor son funcionales y muestran un patrón de expresión específico de tejido*

En el panel A de la **Figura 10** se muestra el resultado de la transfección de las líneas celulares HeLa, y Hep3B, analizadas mediante ensayos de Northern blot hibridados con la ribosonda EDI<sup>+</sup>. Las células HeLa provienen de un carcinoma de útero humano, mientras que las células Hep3B derivan de un hepatoma humano. Se observa que las construcciones ensayadas son capaces de expresar mRNAs quiméricos a partir de los minigenes correspondientes. Se ve también que el promotor del gen de la alfa1-antitripsina humana ( $\alpha$ 1-AT), que se sabe se expresa únicamente en hígado (Ciliberto *et al.*, 1985), sólo es activo en la línea Hep3B.



**Figura 10:** Análisis de la expresión de los minigenes construidos, en transfección transitoria de las líneas celulares Hep3B y HeLa.

A) Ensayos de Northern Hep3B y Hela, hibridados con la ribosonda 2, que reconoce a ambas isoformas de splicing

B) Ensayos de Southern sobre RT-PCR, hibridados con la ribosonda 2

C) Cuantificación comparativa de los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> obtenidos por las técnicas de Northern blot y Southern blot de productos de RT-PCR.

*El tipo de promotor determina el patrón de splicing alternativo*

A partir del panel A de la Figura 10 se puede concluir que el patrón de splicing alternativo alcanzado en cada caso depende del tipo de promotor que dirige la síntesis del mRNA. De ahora en más, expresaremos el patrón de splicing alternativo como el cociente entre las formas EDI<sup>+</sup> y EDI<sup>-</sup>. En el panel C de esta figura se muestra la cuantificación de estos cocientes para la línea celular Hep3B. Así, se observa que el minigen que lleva el promotor de la  $\alpha$ -gb expresa un cociente EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> de 0,5, mientras que aquel del minigen que lleva el promotor de la FN mutante es de 3,9, en células Hep3B. Esto indica que el patrón de splicing alternativo está determinado –al menos en parte– por el tipo de promotor. También puede observarse en el panel A que un mismo minigen da origen a cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> diferentes en distintos tipos celulares. Tal es el caso del minigen con el promotor de  $\alpha$ -gb, con el que se obtienen comportamientos opuestos en las líneas HeLa y Hep3B. Esta última observación apoya a la anterior ya que es posible explicarla si se tiene en cuenta que en cada tejido la ocupación de un mismo promotor puede ser diferente debido a la expresión diferencial de factores de transcripción. Dado que en la línea celular Hep3B las diferencias de comportamiento entre los minigenes son más marcadas, decidimos seguir trabajando con estas células exclusivamente.

Como mencionamos antes, los patrones de splicing alternativo se analizaron alternativamente mediante ensayos de Northern blot o de RT-PCR. Para validar la técnica de RT-PCR como método de estimación de los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup>, analizamos el patrón de splicing alternativo de algunos de los minigenes mediante esta técnica, y lo comparamos con el obtenido mediante Northern blot. En el panel B de la figura 10 se muestra el resultado de un Southern blot de los productos de RT-PCR hibridizados con la misma ribosonda empleada en el Northern blot. Como puede verse, los resultados observados son los mismos con ambas técnicas. El panel C muestra la comparación de los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> obtenidos en cada caso para la línea Hep3B.



Como una confirmación adicional de la validez del uso de la RT-PCR, estudiamos el  $EDI^+/EDI^-$  obtenido para los dos minigenes de comportamiento opuesto en la línea Hep3B ( $\alpha$ -gb y FN mut), y lo comparamos con aquel obtenido mediante Northern blot. La **Figura 11** muestra que las diferencias entre los minigenes que llevan los promotores de  $\alpha$ -gb y FN mut se pueden apreciar mediante esta técnica, y que se mantienen en un rango de 23 a 30 ciclos de reacción de PCR.

**Figura 11:** La técnica de PCR es válida para evaluar el cociente  $EDI^+/EDI^-$ , en un amplio rango de número de ciclos.

*La región 5' no codificante de los mRNAs no influye sobre el patrón de splicing alternativo*

Los mRNAs quiméricos expresados por los minigenes estudiados en este trabajo difieren en su región 5', como consecuencia de la estrategia de clonado que usamos en su construcción (ver Materiales y Métodos). Las diferencias en la secuencia y posiblemente en la estructura secundaria de estas regiones, podrían ser las causantes de las diferencias de procesamiento de los transcritos arriba descritas. Por esta razón hemos incluido entre los promotores ensayados, dos versiones del promotor del gen de la FN humana: una de ellas, que llamamos FN wt, consta de la región -220 a +44, mientras que la otra, que llamamos FN mut, consta de la misma región en la que los sitios CRE y CCAAT han sido mutagenizados (ver Materiales y Métodos). En nuestro laboratorio, el Dr. Gustavo Pesce introdujo mutaciones puntuales en estos elementos regulatorios, que demostraron ser disruptivos para la unión de las proteínas regulatorias específicas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Pesce, 1998, Alonso, 1998, Alonso, 1996, Pesce, 1999). El sitio +1 de la transcripción es el mismo para ambas versiones del promotor, con lo cual la secuencia y la estructura secundaria de los mRNAs transcritos en ambos casos, son idénticas. En el panel A de la Figura 10, se ve que el cociente EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> es de 1,7 para el promotor salvaje y de 3,9 para el promotor mutante. Con este dato, podemos descartar que las diferencias de procesamiento entre las construcciones se deban –al menos enteramente- a las diferencias en la región 5' de los transcritos.

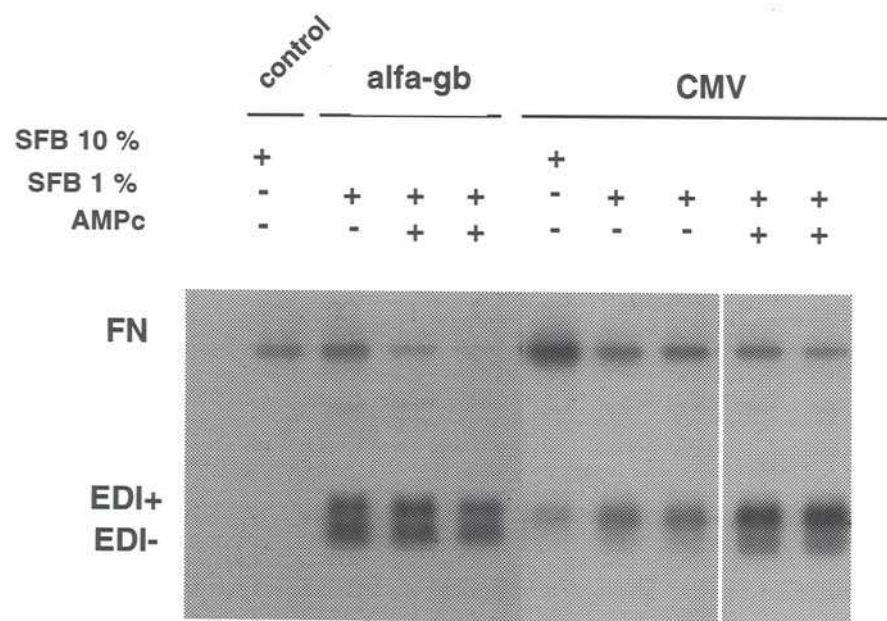
*La "fuerza" del promotor no influye sobre el patrón de splicing alternativo*

Un factor que podría ser importante en el procesamiento de exones alternativos es la velocidad de transcripción, es decir, la cantidad de transcritos sintetizados por unidad de tiempo. Por ejemplo, una alta velocidad de transcripción podría implicar la acumulación de una cantidad de mRNAs tal que no llegaran a ser procesados por la maquinaria de splicing. La tasa de transcripción también podría afectar la capacidad de los transcritos de adoptar estructuras secundarias, y esto, a su vez, podría modificar su interacción con las proteínas involucradas en el splicing. Decidimos entonces estudiar el comportamiento de

minigenes que incluyeran promotores activables, de modo de poder comparar el patrón de splicing alternativo en condiciones basales versus inducidas. Para esto, construimos un minigen que lleva el promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano (CMV), activable por AMPc, y otro que lleva la repetición terminal larga (LTR) del virus del tumor mamario murino (MMTV), activable por glucocorticoides.

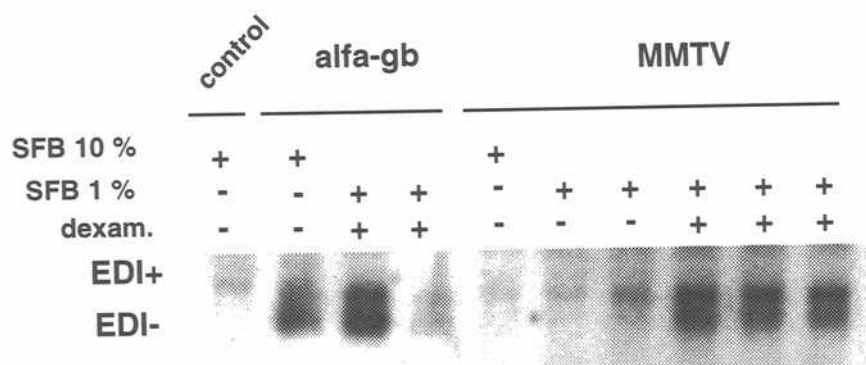
En las **Figuras 12 y 13**, se muestran ensayos de Northern blot luego de la transfección de la línea celular Hep3B con cada uno de los minigenes, en ausencia y presencia de los inductores específicos. La **Figura 12** muestra los resultados obtenidos luego de la activación del promotor CMV, y la **Figura 13** muestra los resultados obtenidos con el promotor MMTV. Para la inducción del promotor CMV se agregó 1 mM dibutilil AMPc al medio de cultivo. En el caso del promotor MMTV fue necesario cotransfectar un plásmido que expresa el receptor de tipo 2 para glucocorticoides, además del agregado de dexametasona (400 ng/ml) al medio de cultivo. En ambos casos se redujo la cantidad de suero fetal bovino (SFB) a un 1%. Se aprecia que los niveles de transcripto son muy bajos en condiciones basales en ambos casos, y que la inducción es exitosa (el aumento en la cantidad de RNA es del triple en el caso de CMV y de diez veces en el caso de MMTV). La reducción en la proporción de SFB en el medio de cultivo provoca una disminución del mRNA de FN endógeno, pero no afecta la expresión de los minigenes estudiados. Para poder estimar el cociente EDI<sup>+</sup>/EDI en cada caso, recurrimos a una reacción de RT-PCR, que se muestra en la parte inferior de las Figuras 12 y 13. Allí se observa que la activación de cada promotor no altera el patrón de splicing alternativo característico de los mismos.

Los histogramas muestran la cuantificación de los resultados en condiciones basales e inducidas.



**Figura 12:** La activación del promotor CMV no modifica el patrón de splicing alternativo de EDI.

Se muestran el resultado de ensayos de Northern blot (arriba) y de RT-PCR (abajo) a partir de RNA de células Hep3B transfectadas transitoriamente con el minigen pSVEDA/CMV. Se cultivó las células en presencia de 10% o 1% de SFB según se indica. La inducción se logró con el agregado de dibutilil AMPc al medio de cultivo.



**Figura 13:** La activación del promotor MMTV no modifica el patrón de splicing alternativo de EDI.

Se muestran el resultado de ensayos de Northern blot (arriba) y de RT-PCR (abajo) a partir de RNA de células Hep3B transfectadas transitoriamente con el minigen pSVEDA/MMTV. Se cultivó las células en presencia de 10% o 1% de SFB según se indica. Para lograr la inducción se cotransfectó con un plásmido que expresa el receptor de tipo 2 de glucocorticoides, y agregó dexametasona al medio de cultivo. Para la normalización de eficiencia de transfección se usó en este caso el plásmido RSV- $\beta$ gal.

También abordamos esta cuestión desde otro ángulo, que consistió en obtener diferentes niveles de mRNA al transfectar células Hep3B con distintas cantidades de plásmido "reporter". La Figura 14 muestra que el cociente entre las dos isoformas de splicing que se obtiene con cada minigen no se debe a la cantidad de mRNA transcrita a partir de cada uno de ellos.

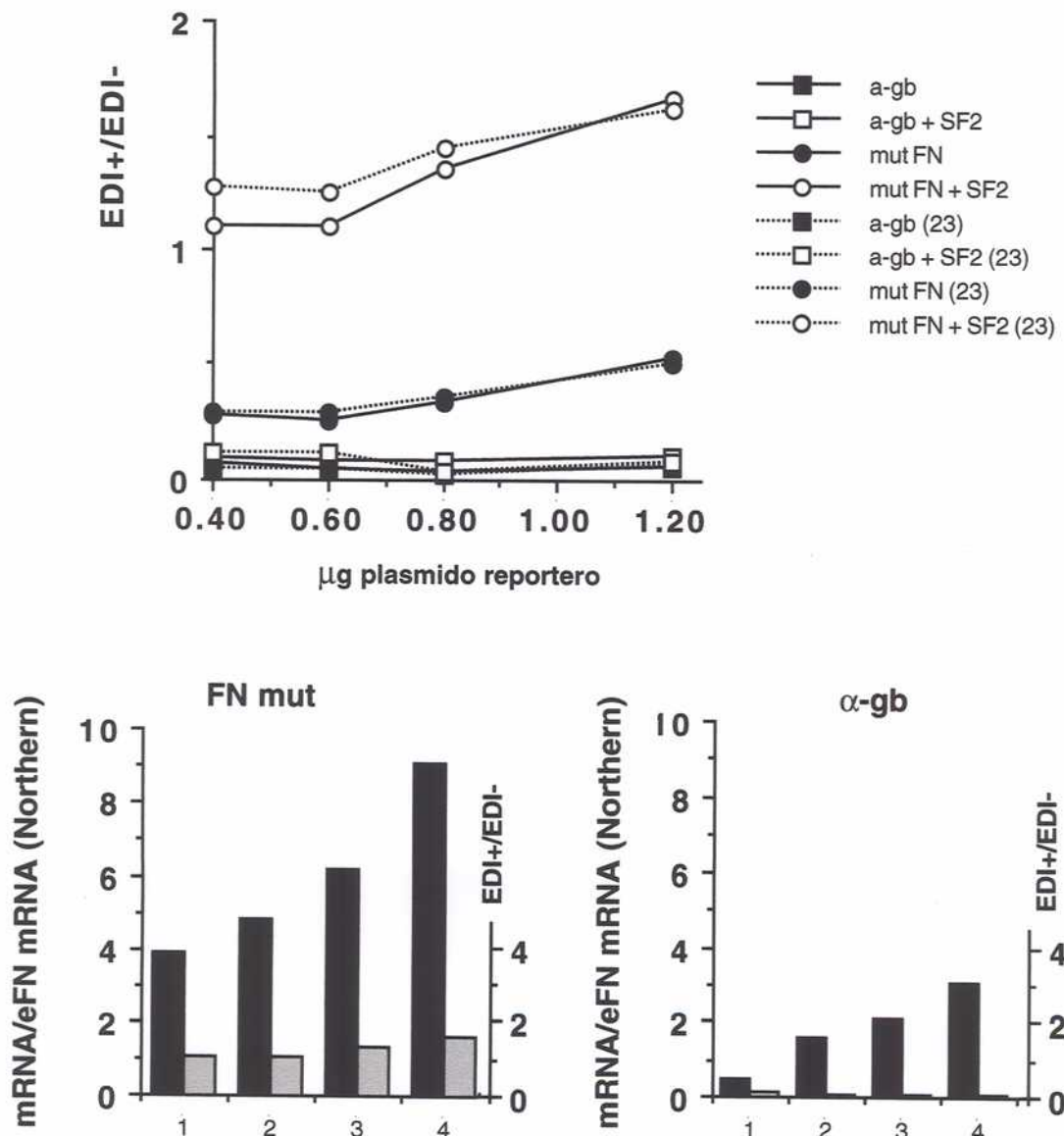
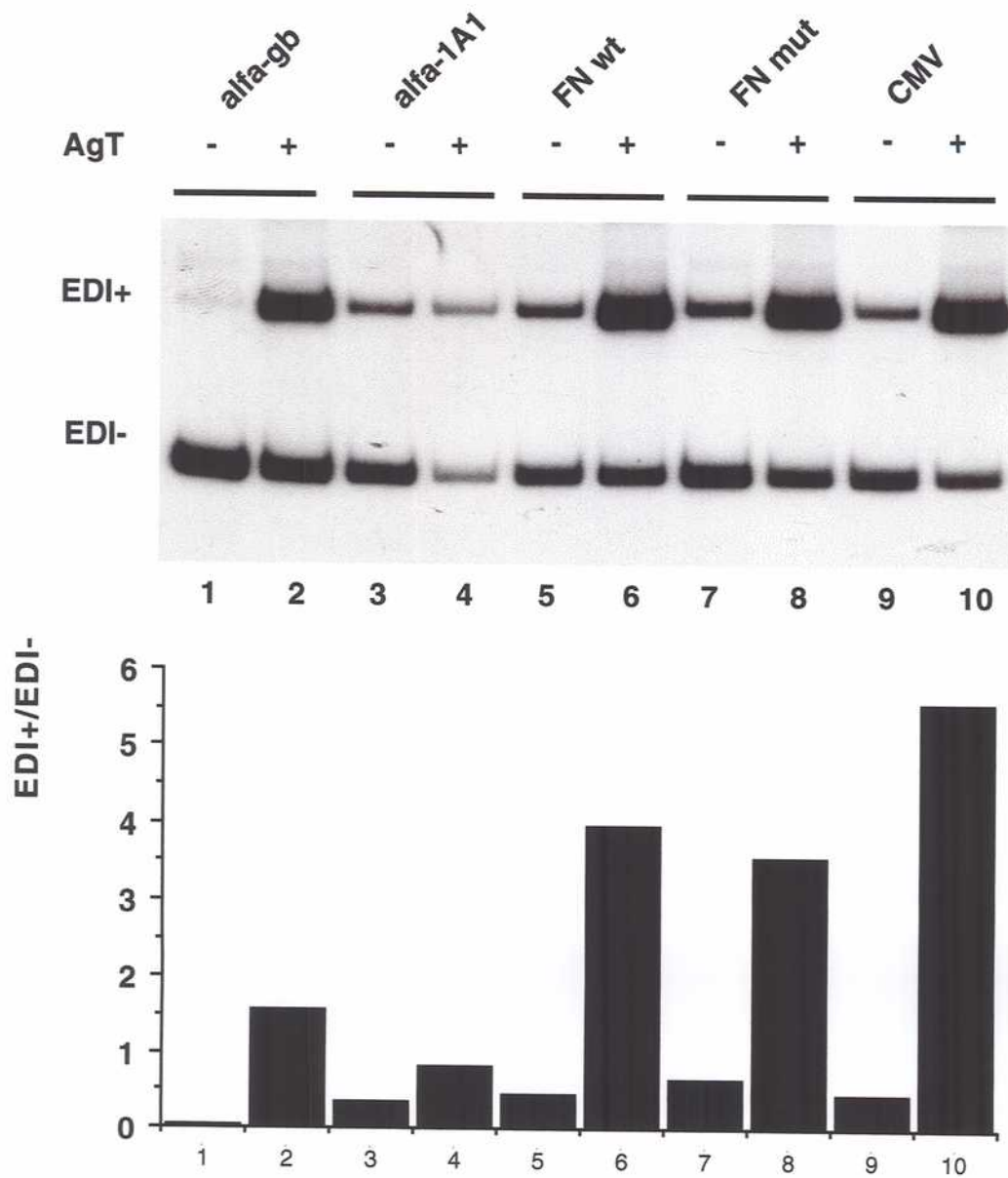


Figura 14: El patrón de splicing alternativo de EDI no se altera por la cantidad total de RNA o las masa de plásmido transfectada.

#### 4. EFECTO DEL ANTIGENO T DE SV40

*El antígeno T provoca modifica el patrón de splicing alternativo*

Como se mencionó en Materiales y Métodos, las construcciones utilizadas en este trabajo incluyen la región enhancer/origen del virus simio 40 (e/o SV40), clonada río arriba de los respectivos minigenes. La presencia de esta secuencia permite obtener altos niveles de expresión de los plásmidos cuando se expresa en la misma célula la proteína antígeno T (AgT) de SV40, ya que ésta activa la transcripción además de permitir la replicación del plásmido. Los experimentos descritos hasta aquí no incluyeron expresión del AgT dado que nuestras condiciones de transfección y de detección de mRNAs son lo suficientemente sensibles. Sin embargo, luego de observar diferencias en el patrón de splicing alternativo con distintos promotores, nos pareció interesante analizar el efecto de la cotransfección con antígeno T, teniendo en cuenta que esta proteína actúa como un activador transcripcional. La **Figura 15** muestra que la presencia del antígeno T provoca un marcado aumento en la inclusión del exón EDI, independientemente del promotor que lleve cada minigen. Así, los transcriptos generados por el promotor de  $\alpha$ -gb se comportan de modo inverso. Notablemente, el minigen que lleva el promotor de FN mut parece más débil que el de FN wt, inversamente a lo que ocurre en ausencia de antígeno T.



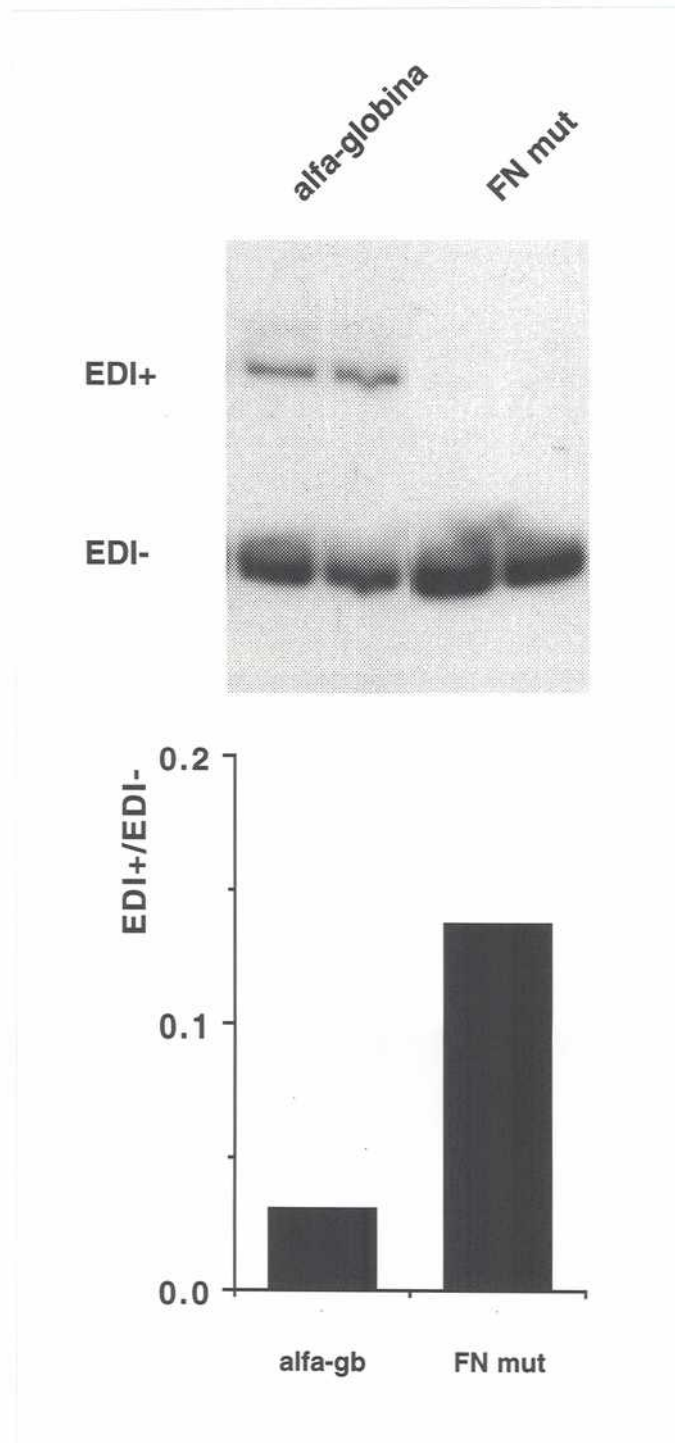
**Figura 15:** La expresión del antígeno T de SV40 favorece la inclusión de EDI en los transcritos maduros.

Se cotransfectaron células Hep3B con los minigenes indicados y un plásmido que permite la expresión del AgT. Los resultados se analizaron mediante RT-PCR radiactiva. Los histogramas muestran la cuantificación de la radiactividad de las bandas, obtenida en un contador de centelleo.



## **5. EL ESTADO DE CROMATINIZACION NO ALTERA EL PATRON DE SPLICING ALTERNATIVO PROPIO DE CADA PROMOTOR**

Luego de observar el efecto de los promotores sobre el splicing de EDI, nos interesó saber si el mismo se halla influido por el estado de cromatinización del DNA. Para ello, generamos líneas celulares clonadas de expresión estable de los minigenes que llevan los promotores de  $\alpha$ -gb, FN mut y CMV. Hasta el momento sólo hemos estudiado al expresión de los minigenes en estas líneas a través de ensayos de Northern blot o de RT-PCR. En la **Figura 16** se ve el resultado obtenido en un clon correspondiente al promotor de  $\alpha$ -gb y en otro correspondiente al promotor de FN mut.



**Figura 16:** El patrón de splicing alternativo asociado a cada promotor se mantiene en estado de cromatinización.

Se generaron líneas celulares clonadas de expresión estable de los minigenes pSVEDA<sub>tot</sub> y pSVEDA/FN mut. Se muestra un análisis por RT-PCR radiactiva por duplicado de un clon de cada promotor. La cuantificación de la radiactividad de las bandas se realizó en contador de centelleo.

Podemos decir a partir de estos resultados que es posible obtener un mismo patrón de splicing alternativo asociado a la presencia de un dado promotor, independientemente de que el DNA correspondiente se halle asociado a nucleosomas, o libre de los mismos. Si bien no determinamos aún el número de copias integradas en el genoma de cada línea celular clonada, suponemos que es un número bajo (probablemente haya habido sólo una integración por clon), y comparable para cada minigen. Esto significaría entonces que los resultados observados hasta este momento en transfecciones transitorias no se deben a un elevado –o incluso variable- número de copias del plásmido. En este momento estamos completando el análisis de estos clones a través de Southern blots de DNA genómico.

## 6. EFECTO DE LOS ELEMENTOS EXONICOS

### *Los elementos regulatorios exónicos dominan sobre la modulación del promotor*

Como se describe en la Introducción, el exón EDI incluye una región de 81 pb con actividad de "splicing enhancer". Si el promotor que dirige la síntesis de un transcripto dado puede influir sobre la maduración del mismo, ¿cuál será el rol de los elementos exónicos que regulan el splicing alternativo respecto del rol del promotor? Para responder a esta pregunta construimos una nueva serie de minigenes conteniendo los promotores de  $\alpha$ -gb, FN wt o FN mut (ver Materiales y Métodos) clonados río arriba de minigenes  $\alpha$ -gb/FN que incluyeran mutaciones disruptivas para los elementos regulatorios A y/o B del exón EDI. Estas mutaciones habían sido generadas y estudiadas por el grupo del Dr. Baralle, en Trieste, en el contexto del promotor de  $\alpha$ -gb (Caputi *et al.*, 1994; Muro *et al.*, 1999).

Las distintas versiones del exón EDI incluidas en este trabajo se detallan a continuación:

- minigenes A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> : carecen del elemento A o splicing enhancer exónico (ESE)
- minigenes A<sup>+</sup>B<sup>-</sup> : tienen mutaciones puntuales que anulan al elemento B o splicing silencer exónico (ESS)
- minigenes A<sup>-</sup>B<sup>-</sup> : llevan ambos tipos de mutaciones

La **Figura 17** muestra la secuencia de la región del exón EDI que contiene a los elementos A y B, detallando los cambios introducidos en las diferentes mutaciones.

ESE (elem. A)	ESS (elem.B)	
GCACCCUGAUGGUGAAGAAGACACUCUGCAGAGCUGCAAGGCCUCAGACCCGG	GCACCCUGAUGGUGAAGAAGACACUCUGCAGAGCUGCAAGGCCUCAGACCCGG	A+B+ (pSVEDA <sup>tot</sup> )
GCACCCUGAUGGU_____CACUGCAGAGCUGCAAGGCCUCAGACCCGG	GCACCCUGAUGGUGAAGAAGACACUCUGCAGAGCUGCAAGGCCUCAGACCCGG	A-B+ (pSVEDA/ $\Delta$ 2e)
GCACCCUGAUGGUGAAGAAGACACUCUGCAGAGCUGCAAGTCCUCAGACCCGG	GCACCCUGAUGGUGAAGAAGACACUCUGCAGAGCUGCAAGTCCUCAGACCCGG	A <sup>+</sup> B <sup>-</sup> (pSVEDA/A <sub>st</sub> u)
GCACCCUGAUGGU_____CACUGCAGAGCUGCAAGTCCUCAGACCCGG	GCACCCUGAUGGUGAAGAAGACACUCUGCAGAGCUGCAAGTCCUCAGACCCGG	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (pSVEDA/Amut)

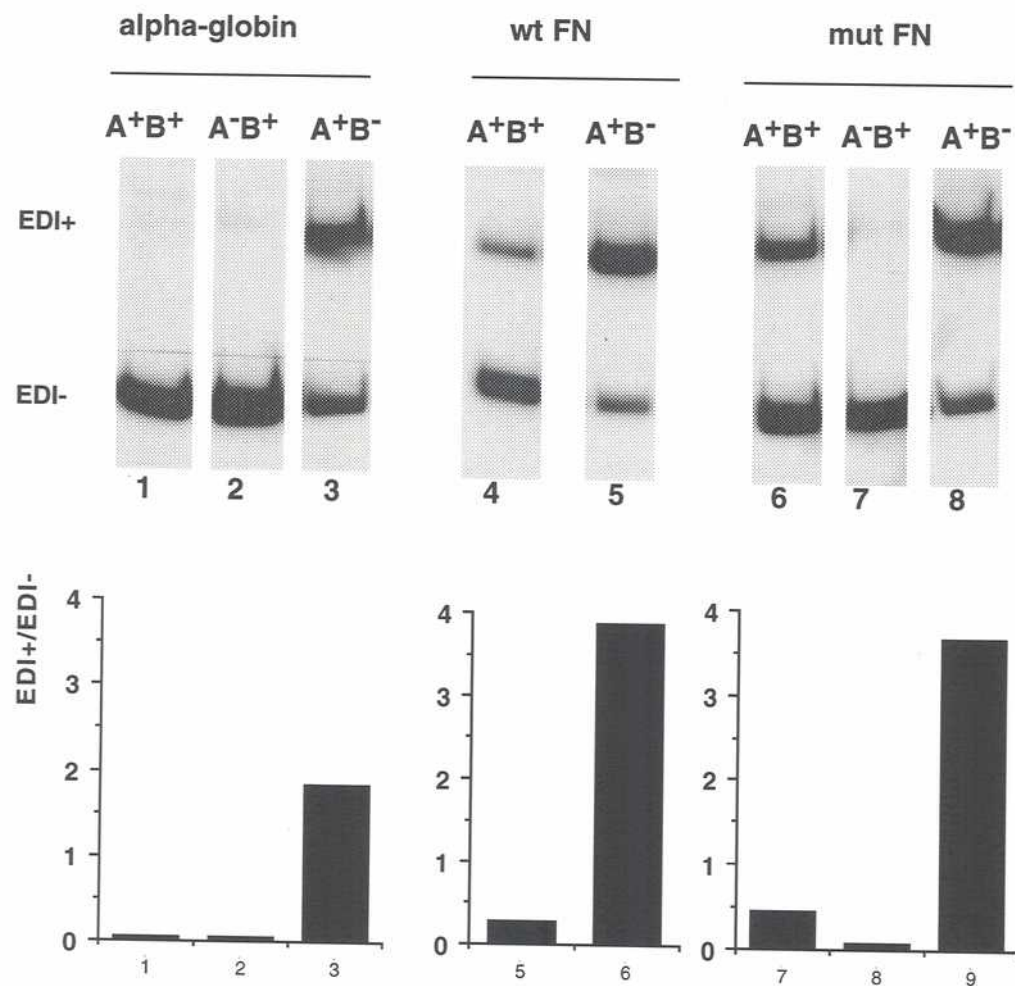
**Figura 17:** Secuencia de las regiones exónicas que regulan del splicing alternativo de EDI.

En la **Figura 18** se muestra el resultado de la transfección de células Hep3B con minigenes correspondientes a los promotores de  $\alpha$ -gb, FN wt y FN mut.

Se ve claramente que la delección del ESE resulta en una virtual anulación de la inclusión del exón alternativo en el mRNA maduro. Este efecto, además, es independiente del tipo de promotor que lleva el minigen (comparar calles 2 y 7), demostrando que la modulación del splicing alternativo debida a los promotores requiere de secuencias ESE/ESS intactas, e indicando que el efecto de las regiones regulatorias exónicas domina por sobre el del promotor.

La mutación disruptiva del ESS, por otro lado, provoca la aparición de una mayor proporción de mRNAs EDI<sup>+</sup>, como se esperaba. Cabe destacar que este último efecto es más dramático en los minigenes que normalmente provocan la aparición de menores proporciones de mRNAs EDI<sup>+</sup> (comparar  $\alpha$ -gb, con FNwt y FN mut).

El hecho de que el promotor requiera de secuencias exónicas para tener efecto, sugiere que ejerce su efecto a través de algún tipo de interacción con las mismas.



**Figura 18:** Los elementos regulatorios exónicos regulan el splicing de EDI

## 7. EFECTO DE LOS FACTORES DE SPLICING

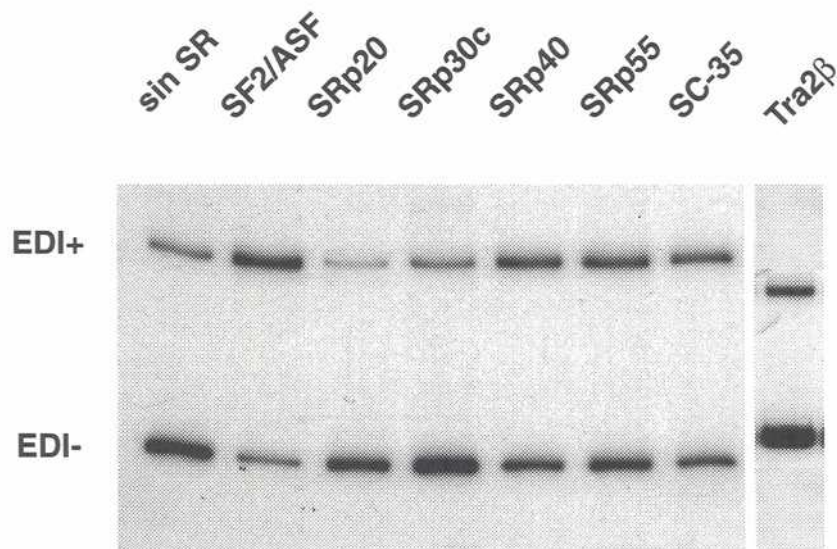
### 7.1. Efecto de las proteínas SR

Una vez constatada la importancia de los elementos regulatorios presentes en el exón EDI, nos preguntamos cuál sería el mecanismo de su efecto. Sabiendo que las proteínas SR participan en el splicing general y en la regulación del splicing alternativo de muchos pre-mRNAs, tanto *in vivo* como *in vitro* (ver Introducción), decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de proteínas de esta familia sobre los distintos minigenes.

#### *Ciertas proteínas SR afectan el patrón de splicing alternativo de EDI*

Para estudiar el efecto de las proteínas SR sobre el exón EDI co-transfectamos células Hep3B con el minigen que lleva el promotor de FN mut, y con una batería de plásmidos de expresión que codifican para algunas de las proteínas SR mejor descritas hasta el momento: SRp20, SRp30c, SRp40, SRp55, SC35 y Tra2 $\beta$ . Los respectivos cDNAs han sido clonados en un mismo vector, que incluye el promotor de CMV (ver Materiales y Métodos). En la **Figura 19** se muestra el resultado del patrón de splicing alternativo del exón EDI determinado mediante RT-PCR radiactiva. La **Tabla 2** muestra la cuantificación de la misma. Del análisis de estos resultados se desprende que existen diferencias en los efectos provocados entre las proteínas ensayadas. Mientras que SRp30c y Tra2 $\beta$  no modifican el patrón de splicing alternativo de EDI, SRp20 es levemente inhibitoria de la inclusión del exón. Las restantes proteínas estudiadas –ASF/SF2, SRp40, SRp55 y SC35– estimulan el splicing de EDI en distinto grado, siendo ASF/SF2 la que provoca la mayor inclusión de EDI. Cabe destacar que si bien la Figura 19 y la Tabla 2 muestran el resultado de la sobreexpresión de una cantidad fija de cada proteína SR, en todos los casos se ensayaron curvas de concentración creciente de las mismas (transfectando distintas cantidades de los correspondientes plásmidos de expresión).





**Figura 19:** Efecto de factores de splicing sobre EDI.

Se cotransfectaron células Hep3B con el minigen que lleva el promotor de FN mut y plásmidos que permiten la expresión de las proteínas SR indicadas. Se muestra el resultado de una RT-PCR radiactiva correspondiente a un punto (200 ng) de la curva de masa de plásmido ensayada. La cuantificación de los resultados se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Efecto de la sobre-expresión de distintas proteínas SR sobre el splicing alternativo del exón EDI.

Proteína SR	EDI+/EDI- (SD)
-	0,38 (0,05)
ASF/SF2	2,34 (0,64)
SRp20	0,18 (0,04)
SRp30c	0,23 (0,11)
SRp40	0,90 (0,22)
SRp55	0,75 (0,19)
SC35	0,90 (0,18)
Tra2 $\beta$	0,27 (0,03)

Los resultados provienen de tres experimentos de transfección independientes. En todos los casos se cotransfectó con una cantidad fija de cada plásmido (200 ng).

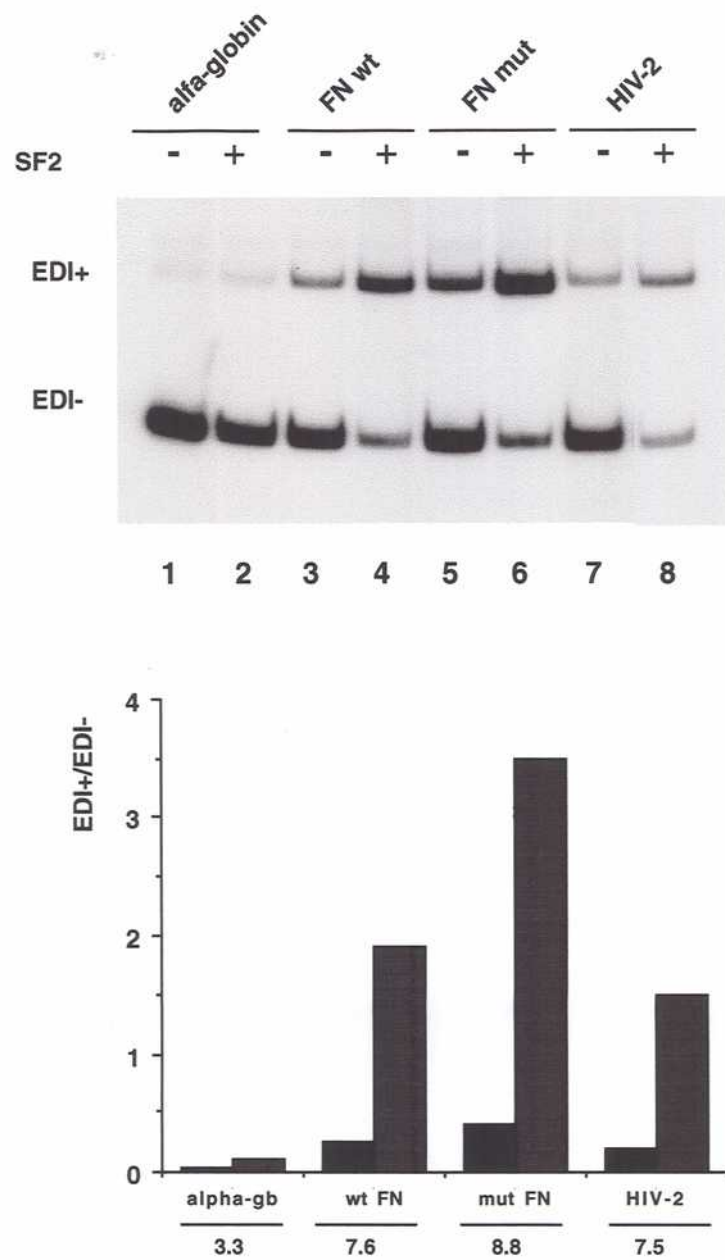
Hemos visto que la proteína ASF/SF2 presenta la mayor actividad estimuladora del splicing de EDI. Este resultado es coherente con resultados previos de otros laboratorios que demostraron que esta proteína SR se une específicamente a una secuencia blanco cuyo consenso (RGAAGAAC) incluye al elemento A o ESE del exón EDI (GAAGAAGA).

Los experimentos de sobre-expresión de proteínas SR descritos hasta el momento se hicieron sobre la construcción del minigen  $\alpha$ -gb/FN que lleva el promotor de FN mutante. Nos interesó saber entonces, si el efecto observado para la proteína ASF/SF2 existía también sobre construcciones que incluyeran otros promotores.

*La sensibilidad al efecto de ASF/SF2 depende del tipo de promotor*

En la **Figura 20** se muestra el resultado del patrón de splicing alternativo del exón EDI en células Hep3B cotransfectadas con los minigenes correspondientes a los promotores de  $\alpha$ -gb, FN wt, FN mut y HIV-2, y el plásmido que expresa la proteína ASF/SF2. En el panel inferior de la figura se muestra la cuantificación de los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> (los números debajo de las líneas indican la proporción en que aumenta la inclusión del exón EDI en presencia de ASF/SF2). Se observa claramente que esta proteína es capaz de estimular la inclusión del exón EDI en todos los casos. Cabe destacar que si bien ASF/SF2 es una de las proteínas SR mejor descritas, esta es la primera vez que se demuestra que ASF/SF2 regula el splicing de EDI in vivo. También se aprecia que la magnitud de la respuesta es diferente para cada minigen (los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> en ausencia versus presencia de ASF/SF2 son:  $\alpha$ -gb=3,3; FN wt=7,6; FN mut=8,8; HIV-2=7,5).

La cotransfección con cantidades superiores a los 200 ng de plásmido g10 ASF/SF2 wt provoca una disminución en la cantidad de RNA detectada tanto en RT-PCR radiactivas como en Northern blots, tal como ha sido descrito previamente (Cáceres et al., 1994).



**Figura 20:** El efecto de SF2/ASF sobre el splicing alternativo de EDI es específico del promotor que dirige la síntesis de los transcritos.

El experimento mostrado en la Figura 20 nos permitió ver que cada promotor presenta una respuesta distinta a la sobreexpresión de ASF/SF2. Para estudiar si este resultado se debía a una sensibilidad diferencial de cada minigen a esta proteína SR, realizamos un ensayo de dosis-respuesta a ASF/SF2 para cada minigen. En la **Figura 21** se ve claramente que los transcritos expresados por los promotores  $\alpha$ -gb, FN mut y Gal5-HIV-2 muestran sensibilidades diferentes a ASF/SF2. El gráfico del panel inferior, que muestra la cuantificación de los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup>, permite apreciar que en todos los casos se alcanza un valor máximo de inclusión del exón EDI, y que este valor es diferente para cada construcción. Así, vemos que la construcción que lleva el promotor de  $\alpha$ -gb responde pobremente a la sobreexpresión de ASF/SF2, aún en presencia de altas cantidades de la misma, mientras que las construcciones que llevan los promotores de FN mut y Gal<sub>5</sub>-HIV-2 muestran sensibilidad a esta proteína. De estos últimos, se ve que el minigen con el promotor Gal<sub>5</sub>-HIV-2 alcanza rápidamente un plateau en el grado de inclusión de EDI (EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> = 1,5 a partir de 100 ng de g10 ASF/SF2 wt, ver gráfico en el panel inferior), mientras que el minigen con el promotor FN mut aumenta la inclusión de EDI conforme aumenta la cantidad de la proteína SR. Esta construcción, además, es la que muestra la mayor sensibilidad a ASF/SF2 (ver proporciones de aumento de la forma EDI<sup>+</sup> en presencia de ASF/SF2, en los números debajo de los histogramas, panel inferior de la Figura 20).

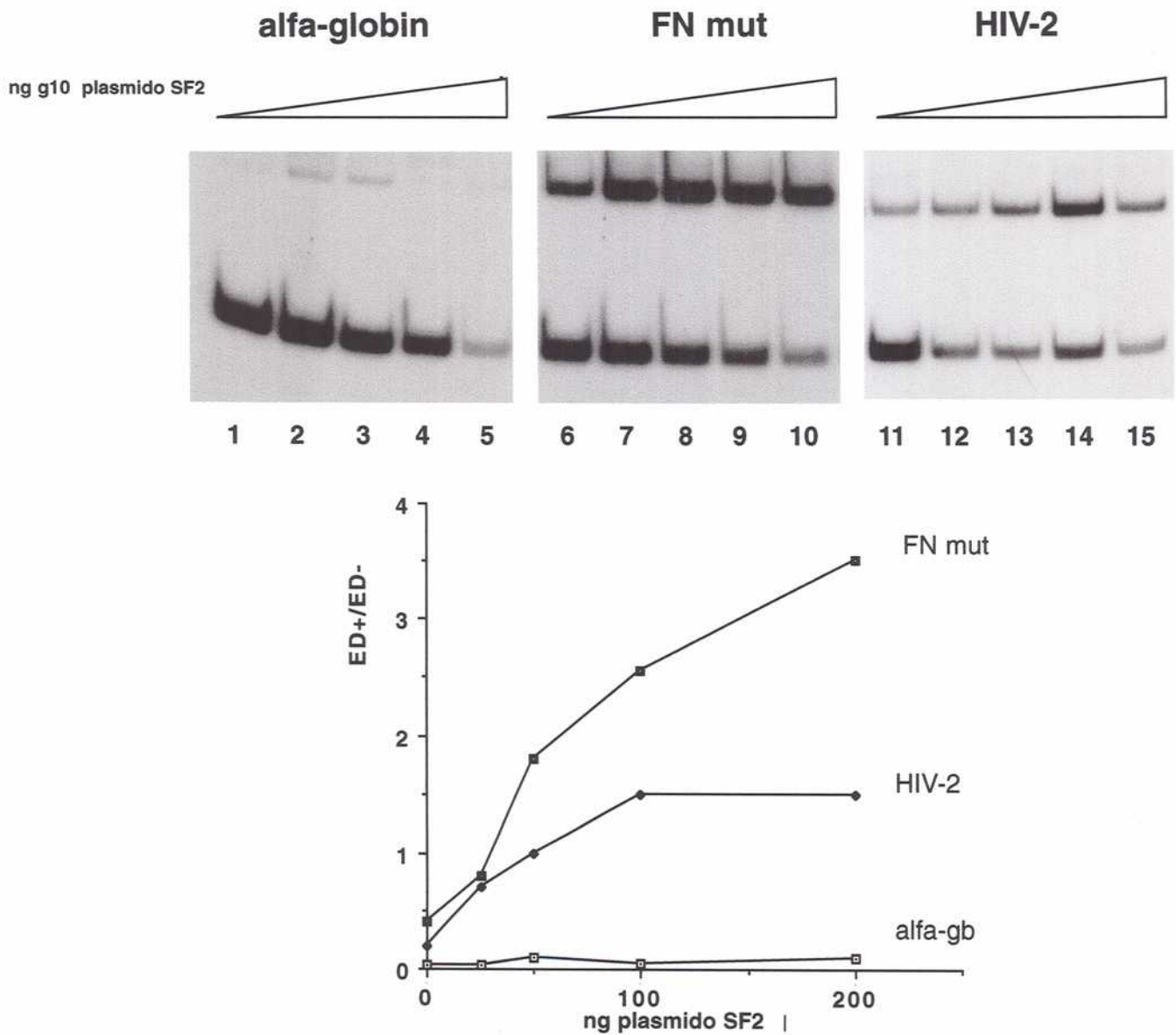
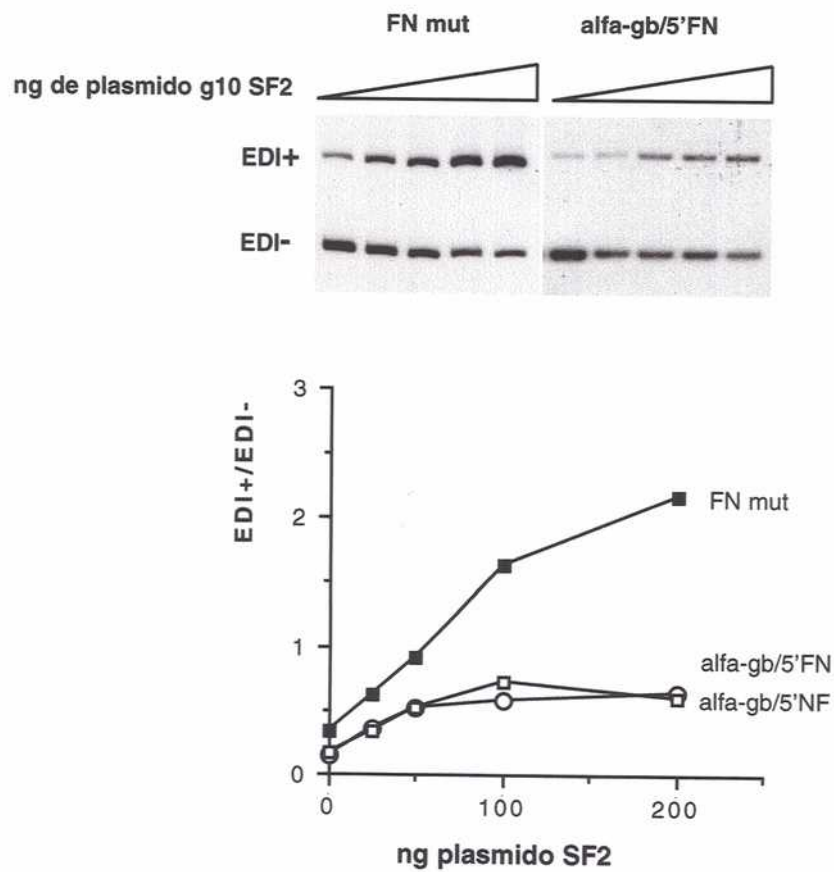


Figura 21: La sensibilidad a SF2/ASF está determinada por el tipo de promotor.

Teniendo en cuenta que las únicas diferencias entre los minigenes residen en sus promotores y en las secuencias de las regiones 5' no codificantes de los respectivos transcritos, podemos concluir que las diferencias en la sensibilidad de esta respuesta se deben a dichas regiones. Sin embargo, no podemos asignar estas diferencias inequívocamente a los promotores o a las regiones 5' no traducibles de los mRNAs. Para responder a este interrogante, clonamos la región 5' no codificante del mRNA de la FN humana río abajo del promotor de la  $\alpha$ -gb. A esta nueva construcción la llamamos  $\alpha$ -gb/5'FN (ver Materiales y Métodos). El minigen resultante codifica entonces para un mRNA idéntico al generado por las construcciones FN wt y FN mut, bajo regulación del promotor de  $\alpha$ -gb. Elegimos este promotor porque es aquel que genera las mayores diferencias en el splicing alternativo y en la sensibilidad a SF2/ASF respecto del promotor de FN mut.

También ensayamos el comportamiento de una construcción obtenida durante el proceso de clonado en la cual la región 5' codificante del gen de FN se encuentra invertida (a este minigen lo denominamos  $\alpha$ -gb/5'NF).

En el panel superior de la **Figura 22** se muestran un esquema comparativo de las construcciones  $\alpha$ -gb y  $\alpha$ -gb/5'FN,  $\alpha$ -gb/5'NF y el comportamiento de estas construcciones respecto del de FN mut.



**Figura 22:** La región 5' no codificante del mRNA no influye sobre la sensibilidad a SF2/ASF.



Análisis por RT-PCR radiactiva del patrón de splicing alternativo obtenido con las construcciones  $\alpha$ -gb/5'FN,  $\alpha$ -gb/5'NF y FN mut, que difieren exclusivamente en su promotor.

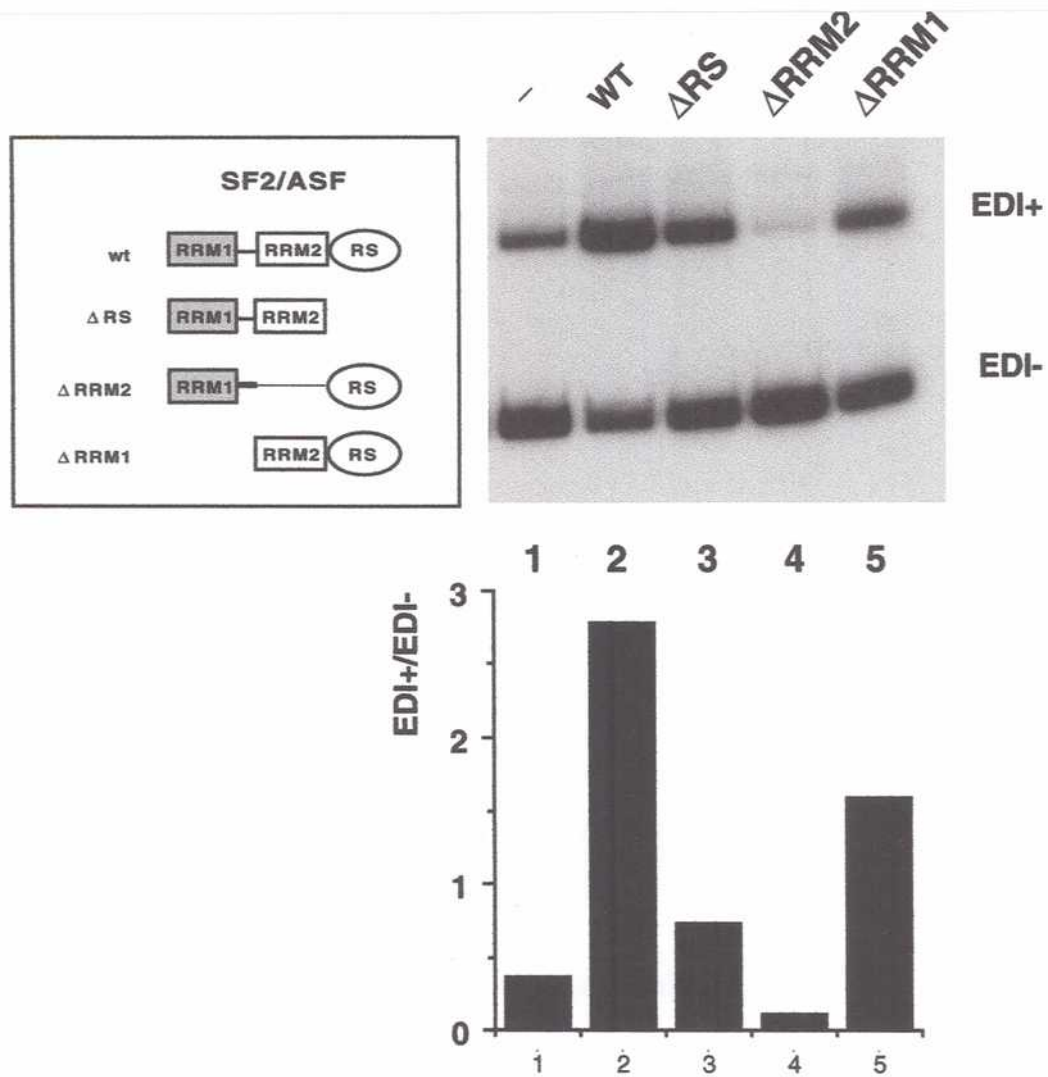
Como se ve, las nuevas construcciones de  $\alpha$ -gb difieren en su comportamiento de splicing alternativo respecto de la de FN mut. Dado que las únicas diferencias entre las construcciones  $\alpha$ -gb/5'FN y FN mut residen en sus secuencias promotoras, podemos decir que estas secuencias son las únicas responsables del patrón de splicing alternativo obtenido. Además, las construcciones  $\alpha$ -gb/5'FN y  $\alpha$ -gb/5'NF dan como resultado un cociente EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> idéntico, lo cual indica que la región 5' de los mRNAs no es relevante para el patrón de splicing alternativo en nuestro sistema.

#### *Rol de los dominios de la proteína SR ASF/SF2*

Las proteínas SR presentan estructuras modulares compuestas por dos tipos de dominios: uno carboxi-terminal, involucrado en interacciones proteína-proteína, denominado RS, y otro denominado RRM (por RNA Recognition Motif, Motivo de Reconocimiento del RNA), que contiene una secuencia consenso de unión a RNA simple cadena (ver Introducción). En particular, la proteína ASF/SF2 consta de un dominio RS y dos dominios de unión al RNA (RRM1 y RRM2).

Conociendo el marcado efecto de ASF/SF2 sobre el splicing alternativo de EDI, nos interesó estudiar qué dominios de la proteína estaban involucrados en esta función de la misma. De esta manera podríamos comenzar a dilucidar el mecanismo por el cual afecta el procesamiento de los transcriptos originados a partir de nuestros minigenes.

La **Figura 23** muestra el resultado de la sobreexpresión de ASF/SF2 wt, y de mutantes que carecen del dominio RS ( $\Delta$ RS), del dominio RRM2 ( $\Delta$ RRM2), o del dominio RRM1 ( $\Delta$ RRM1), sobre el minigen que lleva el promotor de FN wt, En el panel izquierdo se esquematizan las respectivas variantes de ASF/SF2.



**Figura 23:** El dominio RRM2 de SF2/ASF es imprescindible para su efecto como regulador positivo de la inclusión de EDI.

Vemos que los dominios RS y RRM1 no son imprescindibles para la estimulación de la inclusión de EDI (aunque en su ausencia este efecto es menor). La delección del dominio RRM2, por el contrario, no sólo provoca la anulación del efecto descrito para la proteína salvaje, sino que parece tener el efecto opuesto, comportándose como un "negativo dominante". Para confirmar esta última observación, realizamos el experimento que se muestra en la **Figura 24**.

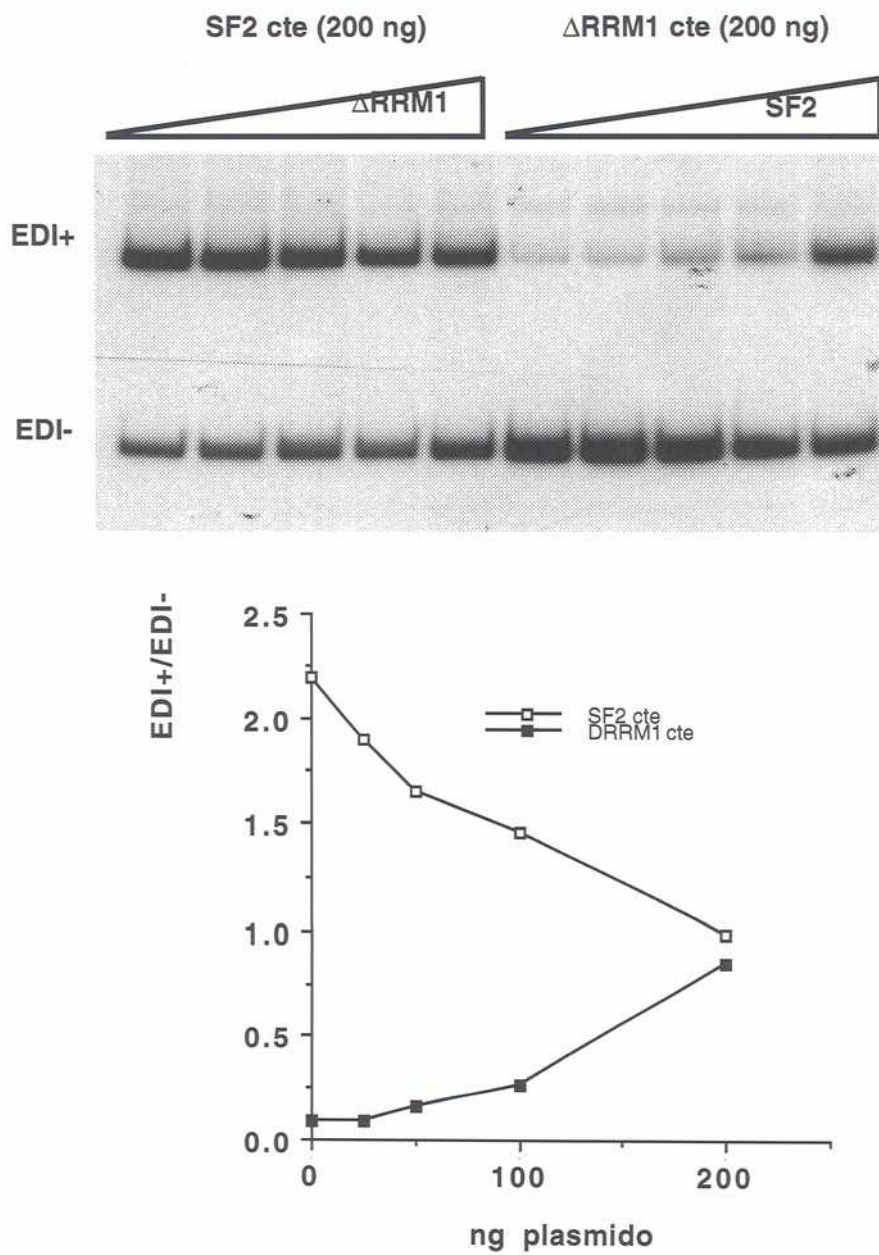


Figura 24: La mutante  $\Delta$ RRM2 de SF2/ASF actúa como "negativo dominante".

La coexpresión de cantidades crecientes de la proteína mutante  $\Delta$ RRM2 es capaz de revertir la estimulación de la inclusión de EDI determinada por una cantidad constante de ASF/SF2 wt. Inversamente, la expresión de cantidades crecientes de ASF/SF2 wt permite rescatar el efecto negativo que produce una cantidad fija de la proteína mutante  $\Delta$ RRM2. Confirmamos entonces el rol de  $\Delta$ RRM2 como negativo dominante. Este experimento, además, afianza la idea de que ASF/SF2 debe ser una proteína clave en la regulación del splicing de EDI *in vivo*.

## 7.2. Efecto de proteínas de splicing no-SR

*Otras proteínas involucradas en el splicing alternativo no afectan la inclusión de EDI*

La proteína hnRNP A1, que no pertenece a la familia de las proteínas SR sino a la de las proteínas hnRNP (por ribonucleopartículas del heterogeneo nuclear), presenta dos dominios del tipo RRM y uno carboxi-terminal rico en glicina. Se cree que se esta proteína se halla unida a todos los transcritos *in vivo*, y se sabe que es capaz de formar complejos inespecíficos con muchos pre-mRNAs estudiados *in vitro* (Cáceres y Krainer, 1996). Su rol en el splicing sería el de propiciar la elección de sitios 5' distales. Además, esta proteína ha sido descrita como una "antagonista" de ASF/SF2 (ver Introducción). Esto nos llevó a realizar el experimento de la **Figura 25**, en el que se sobreexpresó la proteína hnRNP A1. Se ensayó en este caso el efecto sobre los minigenes que llevan los promotores de  $\alpha$ -gb, FN wt y FN mut.

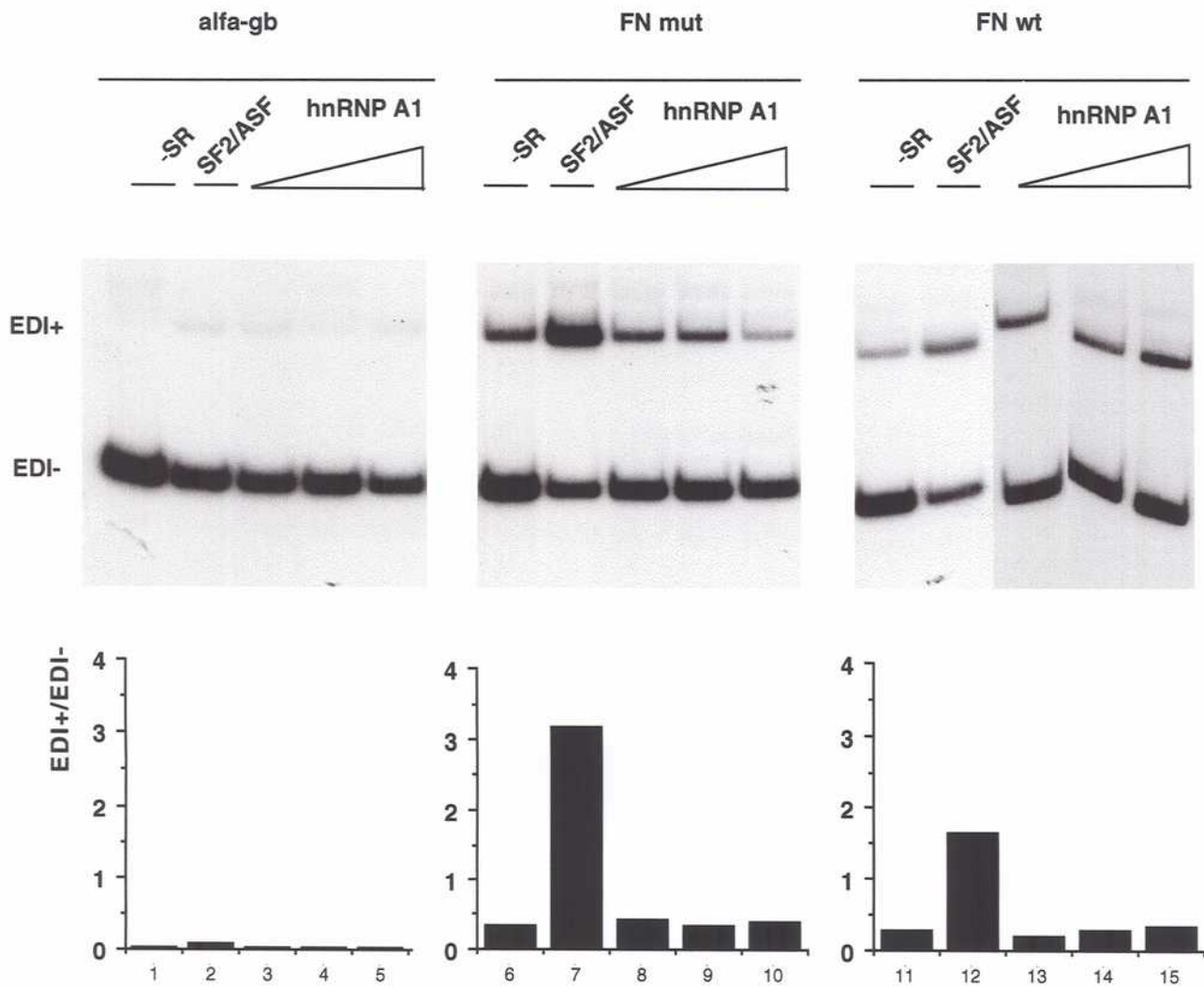


Figura 25: La proteína hnRNP A1 no tiene efecto sobre el splicing de EDI.

Sorprendentemente, nos encontramos con que –en nuestras manos- la proteína hnRNP A1 no tiene el efecto opuesto al de ASF/SF2. El efecto observado es el de una tenue estimulación de la inclusión del exón EDI sobre los minigenes que llevan los promotores de FN wt y mut, y un efecto nulo sobre aquel que lleva el promotor de  $\alpha$ -gb. Cabe destacar que fue necesario sobreexpresar grandes cantidades del plásmido correspondiente para ver este efecto (se usaron hasta 3  $\mu$ g del plásmido pCGhnRNPA1, comparar con la Figura 21, en donde se usaron hasta 200 ng de plásmido g10 ASF/SF2 wt).

## **8. EFECTO CONJUNTO DEL PROMOTOR, LOS ELEMENTOS EXONICOS Y LA PROTEINA ASF/SF2**

Los resultados expuestos hasta el momento nos permiten decir que en la regulación del splicing alternativo del exón EDI participan los elementos exónicos (ESE y ESS), algunas proteínas SR (predominantemente ASF/SF2), y la estructura del promotor que dirige la síntesis del transcripto. Sabemos ahora que el promotor modifica el patrón de splicing alternativo y que determina la sensibilidad a la proteína ASF/SF2, la cual provoca un aumento en la proporción de mRNAs EDI<sup>+</sup>. Esto indica que debe existir alguna relación entre las maquinarias de transcripción y de splicing. Nos cuestionamos entonces si la proteína ASF/SF2 ejerce su efecto reconociendo los elementos ESE y ESS. Para responder a esta pregunta, ensayamos la sobreexpresión de ASF/SF2 sobre las mutantes en los elementos regulatorios en cis, tal como se muestra en la **Figura R19**.

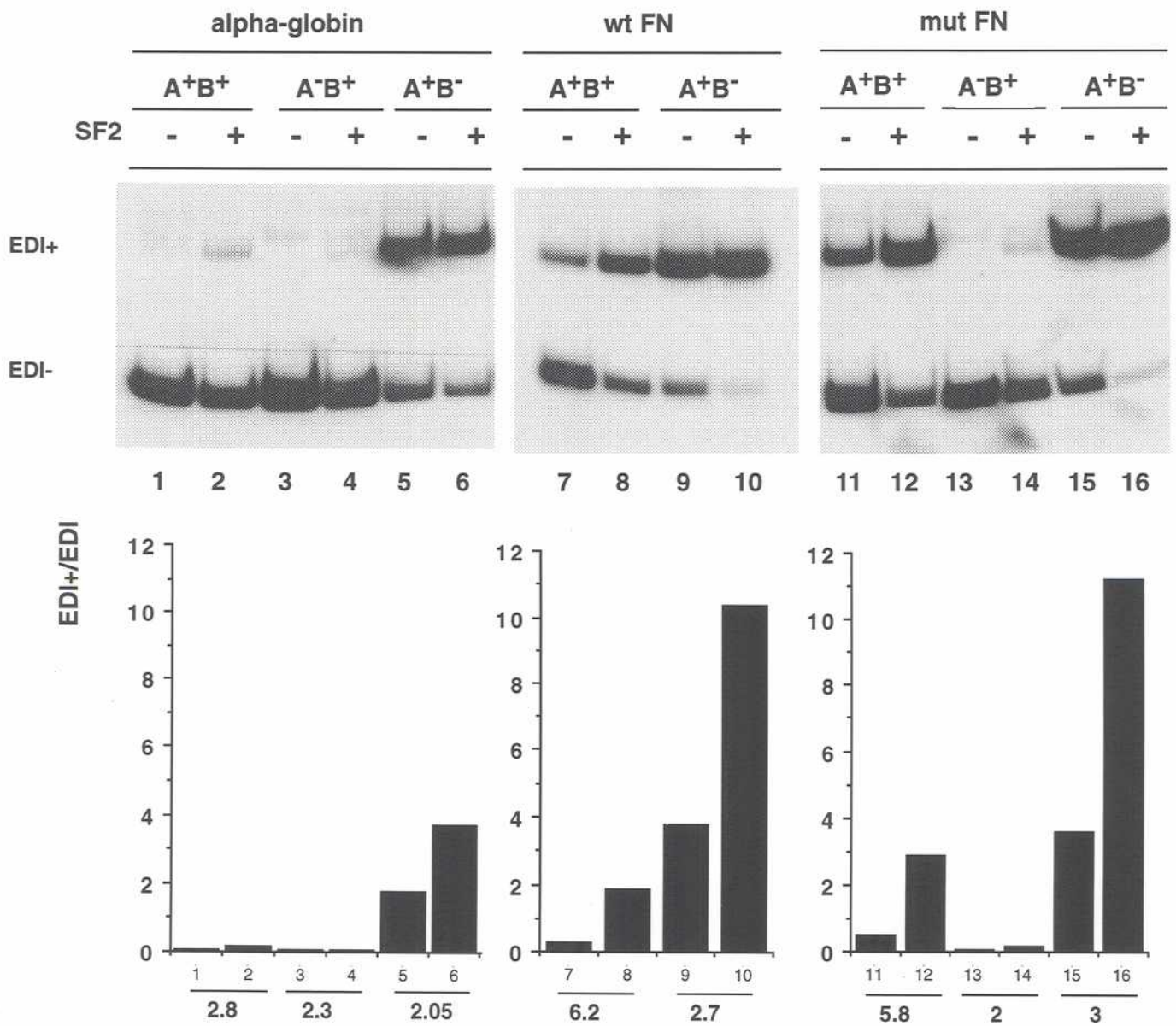


Figura R19: SF2/ASF interactúa con los elementos reguladores exónicos de EDI



Como se ve, ante la ausencia del ESE, se pierde la respuesta a la proteína ASF/SF2, sugiriendo que este factor reconoce -directa o indirectamente- a esta secuencia (este efecto se ve claramente comparando las calles 13 y 14 con las calles 11 y 12).

Vemos también que la mutación del ESS no anula el efecto de ASF/SF2, alcanzándose niveles muy altos de inclusión de EDI. Sin embargo, la "sensibilidad" a ASF/SF2 en estos transcritos (estimada como el incremento la inclusión de EDI en presencia de ASF/SF2) es menor a la de los mRNAs con sus elementos exónicos salvajes (comparar los números bajo los histogramas 1-2 vs 5-6; 7-8 vs 9-10; 11-12 vs 15-16).

# DISCUSSION

## 1. EL EXON EDI DE LA FIBRONECTINA COMO MODELO DE ESTUDIO DEL ACOPLAMIENTO ENTRE TRANSCRIPCIÓN Y SPLICING ALTERNATIVO

Como se explicó en la Introducción de esta tesis, la elección del exón EDI de la FN como modelo de splicing alternativo se basa en numerosos antecedentes. Por un lado, se ha asignado una relevancia biológica de la expresión de las isoformas de splicing EDI<sup>+</sup> y EDI<sup>-</sup> de la FN durante el desarrollo fetal, la regeneración hepática, y en los procesos proliferativos y de reparación de heridas. Como mencionamos en la Introducción, el exón EDI tiene un efecto mitogénico sobre las células de la granulosa bovina (Colman-Lerner *et al.*, 1999) y promueve la diferenciación de los lipocitos del hígado a miofibroblastos (Jarnagin *et al.*, 1994) *in vitro*. Consistentemente con esta observación, tanto en ovario como en hígado la proporción de FN EDI<sup>+</sup> se encuentra aumentada *in vivo* durante los procesos proliferativos.

Por otro lado, conocemos en parte la regulación de la expresión de isoformas de splicing de la FN. Así, el TGFβ parece estimular la expresión de la forma EDI<sup>+</sup> mientras el AMPc inhibe la inclusión de este exón en células foliculares bovinas (Colman-Lerner *et al.*, 1999). La primera demostración de la influencia del TGFβ sobre el splicing de FN se realizó sobre fibroblastos humanos normales (Borsi *et al.*, 1990).

También sabemos que la FN plasmática, secretada por el hígado en condiciones normales, carece del dominio de tipo III codificado por el exón EDI, mientras que la FN producida por otros tipos celulares incluye EDI<sup>+</sup> en distintas proporciones. Además, gracias a que el exón EDI ha sido usado como modelo de splicing alternativo por otros laboratorios (Caputi *et al.*, 1994; Lavigueur *et al.*, 1993; Cavaloc *et al.*, 1999), sabemos que incluye una secuencia con actividad de splicing enhancer y de otra con actividad de splicing silencer.

También contamos con información respecto de la regulación de la transcripción del gen de FN. Particularmente en nuestro laboratorio se ha estudiado el rol de los elementos CRE y CCAAT del promotor del gen de FN y se ha demostrado la interacción de estas regiones con ciertos factores regulatorios (ver más adelante).

El gen de la FN, incluso, constituye uno de los pocos casos en que se ha estudiado su expresión en hibridación *in situ* con sondas fluorescentes. Esto ha permitido determinar la existencia de "tracks" de mRNAs nacientes de FN, procesados en las cercanías del gen. Estos tracks, además, se hallaron asociados a "speckles", que contienen factores de maduración de mRNAs. Esto ha sugerido que los transcriptos de FN son procesados co-transcripcionalmente (Xing *et al.*, 1993).

También nos pareció interesante por todo aquello que restaba por explorar respecto de la regulación del splicing alternativo de EDI.

¿Cuál es el mecanismo de acción de las regiones exónicas que regulan el splicing en cis? ¿están involucrados en esta regulación los factores de splicing descriptos en otros modelos? en caso afirmativo ¿qué tipo de interacciones existen entre los factores de splicing y las secuencias en cis?

Todas estas evidencias hacen al exón EDI un modelo atractivo para el estudio del splicing alternativo y del acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo. La elección del minigen  $\alpha$ -gb/FN como modelo obedece a su vez a otros factores. El estudio del comportamiento del exón EDI en el gen completo de FN sería muy complejo, ya que los transcriptos de FN contienen 50 exones, entre los cuales se cuentan otros dos exones alternativos (EDII o EDB y IIICS), dando lugar a la formación de 20 posibles variantes de splicing en humanos. Otro obstáculo importante es el enorme tamaño de este gen (alrededor de 75 kpb) y de sus transcriptos (unas 7 kb). Por estos motivos, el grupo del Dr. Baralle en Oxford eligió el minigen  $\alpha$ -gb/FN para demostrar que era posible reproducir el splicing alternativo de EDI en células HeLa en cultivo (Vibe-Pedersen *et al.*, 1984). Así, nosotros elegimos el mismo modelo de estudio, combinado con el uso de distintos promotores, para estudiar el acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo.

## **2. LOS PROCESOS DE TRANSCRIPCIÓN Y SPLICING ALTERNATIVO SE ENCUENTRAN ACOPLADOS**

### **El tipo de promotor determina el patrón de splicing alternativo**

Como demostramos en los resultados de esta tesis, el tipo de promotor controla el patrón de splicing alternativo en nuestro modelo de estudio (Figura 10).

Encontramos que distintos promotores provocan distintos patrones de splicing alternativo en una misma línea celular, y que un mismo promotor ( $\alpha$ -gb) puede comportarse de modo diferente en dos líneas celulares. Esto constituye la primera evidencia de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo.

La construcción  $\alpha$ -gb arroja un patrón de splicing alternativo marcadamente distinto al de los demás minigenes. Esto podría deberse a las diferencias existentes en la región 5' no codificante del mRNA de  $\alpha$ -gb. En efecto, la estrategia de clonado elegida para ligar los distintos promotores al minigen  $\alpha$ -gb/FN consistió en reemplazar un fragmento que abarca el promotor de  $\alpha$ -gb entero hasta la posición +92 de la construcción original, por cada uno de los nuevos promotores. Como consecuencia, los distintos minigenes codifican para mRNAs con regiones 5' distintas, difieren en el sitio +1 de la transcripción y carecen de la región +1 a +92 del primer exón de la  $\alpha$ -gb. Esto podría indicar que dicha región juega un rol importante en el splicing alternativo en nuestro sistema. Como veremos en la próxima sección, se demostró que la estructura secundaria del exón 2 de la  $\beta$ -gb de conejo puede influir sobre el splicing alternativo del mismo (Eperon *et al.*, 1988). Si bien no podemos descartar de plano este tipo de hipótesis, creemos que es poco probable que la estructura y/o la secuencia de la región 5' de los mRNAs estudiados determine las diferencias observadas a nivel del splicing. Para afirmar esto, nos apoyamos en varias evidencias. La primera y más importante es la diferencia de comportamiento entre las construcciones de FN wt y FN mut, que sólo difieren en 5 mutaciones puntuales en los sitios CRE y CCAAT de sus promotores y comparten el sitio +1 de la transcripción. Mientras que la construcción FN wt arroja un cociente  $EDI^+/EDI^-$  de 1,7, FN mut muestra un cociente  $EDI^+/EDI^-$  de 3,9. La segunda, es la diferencia en el cociente de inclusión de EDI obtenido con la construcción  $\alpha$ -gb/5'FN respecto del de FN mut. En este caso -en que las diferencias entre ambos promotores no son puntuales, pero los mRNAs codificados son idénticos en secuencia- se mantiene el efecto del promotor sobre el splicing alternativo. Además, la construcción  $\alpha$ -gb/5'NF, que incluye una porción de la secuencia 5' no codificante en forma invertida, presenta exactamente el mismo cociente de inclusión de EDI que  $\alpha$ -gb/5'FN, con lo cual creemos poco probable un efecto de

estructura secundaria en esta región. Cabe destacar que el cambio en la región 5' no traducible del mRNA codificado por el promotor de  $\alpha$ -gb sí provoca un comportamiento diferente en el splicing alternativo (los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> de  $\alpha$ -gb y  $\alpha$ -gb/5'FN son  $y$  y  $x$  respectivamente). Creemos que la modificación de la región 5' codificante del minigen puede implicar cambios a nivel del DNA, como por ejemplo el reclutamiento de factores de transcripción por parte del promotor de  $\alpha$ -gb. De ser así, el promotor de  $\alpha$ -gb interactuaría con distintas proteínas en cada una de las dos construcciones, resultando en patrones de splicing levemente distintos. Los estudios previos sobre el promotor de  $\alpha$ -gb no nos permiten descartar ni apoyar esta hipótesis, ya que fueron hechos con un promotor de la  $\alpha$ -gb rodeado de un contexto diferente (Whitelaw *et al.*, 1989).

**La calidad de los factores de transcripción reclutados por el promotor y no la "fuerza" del mismo determinan el patrón de splicing alternativo**

Las diferencias en los patrones de splicing alternativo atribuidas a los promotores podrían deberse a la ocupación diferencial de cada promotor por parte de los factores regulatorios de la transcripción, a las diferentes tasas de transcripción de los promotores, o a ambos fenómenos a la vez. Una tasa de transcripción muy baja, por ejemplo, podría implicar una mayor oportunidad de reconocimiento del exón EDI por parte de la maquinaria de splicing, resultando en una mayor inclusión del exón en los transcriptos maduros. Asimismo, la tasa de transcripción podría influir sobre la posibilidad o no del pre-mRNA de adoptar estructuras secundarias, las cuales podrían a su vez modificar el patrón de splicing alternativo. Se ha observado, en el caso del exón 2 de la  $\beta$ -gb de conejo, que la inclusión de secuencias exógenas que provocan la formación de una estructura de "lazo" en un exón alternativo influyen sobre la inclusión de este exón en el transcripto maduro (Eperon *et al.*, 1988). El hecho de que estos resultados sólo fueron observados en experimentos *in vivo* y no se cumplen *in vitro*, sugiere que la interacción con las proteínas de hnRNPs o con los snRNPs podrían estar influyendo sobre la estructura secundaria adoptada *in vivo*.

Sin duda la mejor manera de determinar la tasa transcripcional o la "fuerza" de cada promotor habría sido la medir la expresión de algún gen reportero (CAT, por ejemplo) clonado río abajo de cada promotor en lugar del minigen  $\alpha$ -gb/FN. En nuestro caso, intentamos responder a estos interrogantes mediante el uso de promotores activables. Como demostramos en los resultados de este trabajo, la inducción de la expresión del promotor CMV en presencia de dibutilil AMPc es de unas tres veces, y la del promotor MMTV en presencia de dexametasona es de unas diez veces (Figuras 12 y 13). En ninguno de los dos casos, sin embargo, observamos diferencias en el patrón de splicing alternativo comparando las condiciones basales de expresión con las inducidas. Si bien esta demostración no constituye una prueba inequívoca de que nuestras diferencias entre promotores no se deben a la tasa de transcripción sino al reclutamiento de factores regulatorios, podemos decir que la "fuerza" del promotor no es relevante en el caso de los patrones de splicing obtenidos con los promotores CMV y MMTV.

Otras evidencias apoyan este punto. Por un lado, se observa claramente en el Northern blot de células Hep3B (Figura 10) que las construcciones que llevan los promotores de  $\alpha$ -gb y de CMV presentan niveles de mRNA comparables en estas células, mientras que los patrones de splicing resultantes son muy diferentes (los cocientes EDI<sup>+</sup>/EDI<sup>-</sup> son de 0,5 y 2,7 respectivamente). Se puede argumentar, en contra de esto último, que los niveles de mRNA que se observan en un Northern blot representan la abundancia de mRNAs en estado estacionario, reflejando no sólo la tasa de transcripción sino también la de degradación de cada transcripto. Como en nuestro sistema los transcriptos analizados son muy similares, difiriendo solamente en la región 5' no traducible, suponemos que las tasas de degradación de los mRNAs deberían ser comparables.

Por otro lado, la transfección de cantidades de crecientes de los dos minigenes de comportamiento opuesto ( $\alpha$ -gb y FN mut) nos permitió asociar la cantidad total de mRNA con el grado de inclusión del exón EDI obtenido en cada caso. Como mostramos en los resultados (Figura 14) una mayor cantidad de transcripto estimada por Northern blot, no modifica la alta inclusión de EDI en el caso de la construcción de FN mut, ni la baja inclusión observada en el caso de  $\alpha$ -gb.

Por todo lo expuesto, creemos que las diferencias que observamos obedecen al reclutamiento diferencial de factores de transcripción regulatorios de cada promotor. ¿Cuál es el mecanismo por el cual los factores de transcripción afectan al splicing alternativo? ¿Habrá diferencias entre los factores de transcripción que participan en la iniciación y aquellos que participan en la elongación?

### **Regulación de la transcripción de los promotores utilizados en esta tesis**

#### *Regulación del promotor de la $\alpha$ -gb humana*

Este promotor, que se expresa *in vivo* exclusivamente en eritrocitos, es capaz de expresarse en líneas celulares no eritroides *in vitro*. Esta observación es consistente con la expresión del promotor de  $\alpha$ -gb que nosotros observamos en células HeLa y Hep3B. El promotor  $\alpha$ -gb humano tiene una región rica en GC, que incluye seis posibles sitios de unión para el factor regulatorio Sp1. Se ha descrito que cuando se lo expresa en plásmidos que no se pueden replicar, el promotor es sensible a la presencia de la región enhancer del virus simio 40 (SV40), mientras que esta sensibilidad desaparece en condiciones replicativas. Se ha postulado que esto se debe a la interacción de factores regulatorios que reconocen a la "CCAAT box" del promotor, que se volverían limitantes en condiciones de alto número de copias de plásmido (Whitelaw *et al.*, 1989).

En nuestro sistema trabajamos con plásmidos en condiciones no-replicativas, y todos los promotores estudiados se hallan a unas 1000 pb río abajo del elemento enhancer/origen de SV40 (e/o SV40).

#### *Regulación del promotor de la fibronectina humana*

En este trabajo de tesis se emplearon dos versiones del promotor de la FN humana, denominadas FN wt y FN mut. Ambas abarcan un fragmento que va desde la posición -220 a +44, y fueron generadas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Los fragmentos utilizados en los clonados de esta tesis fueron aislados por Gustavo Pesce, quien introdujo una serie de mutaciones disruptivas de los elementos regulatorios CRE -170 y CCAAT -150 del promotor, con el fin de estudiar el rol de los mismos en transfecciones transitorias. La versión que llamamos FN wt es salvaje respecto de estos elementos, mientras que la versión FN mut contiene tres mutaciones puntuales en la región CRE y dos en la región



CCAAT (ver Materiales y Métodos). Andrés Muro había descrito previamente *in vitro* que estos elementos cooperan entre sí a través de la unión de factores regulatorios (Muro *et al.*, 1992). Pesce demostró la importancia de estos sitios regulatorios para la expresión basal del promotor y para la respuesta a AMPc *in vivo*, y propuso que ésta está mediada por la proteína ATF-2 unida a alguna proteína CCAAT. Simultáneamente, Claudio Alonso utilizó ensayos *in vitro* para determinar que los factores NF-I y CP1 presentes en extractos nucleares hepáticos reconocen al elemento CCAAT del promotor de la FN, y que éstos interactúan con el factor ATF-2 unido al elemento CRE (Alonso *et al.*, 1996).

Estas observaciones nos permiten decir que los promotores FN wt y FN mut usados en esta tesis tienen distintas capacidades de reclutamiento de factores regulatorios, es decir, son funcionalmente distintos. Cabe señalar que en nuestras manos la versión mutante del promotor de la FN parece ser más activa que la versión salvaje del mismo. Esto, en primera instancia contradictorio con lo observado por Pesce, se explica por la cercanía de la región e/o SV40 (ver más adelante), ausente en los experimentos de Pesce y Alonso.

### **Regulación de la expresión de los minigenes por la región enhancer/origen de SV40**

#### *La región enhancer de SV40 regula la transcripción*

Todas las construcciones empleadas en este trabajo de tesis incluyen a la región enhancer/origen del virus simio 40 (e/o SV40). Esta región de pb está compuesta por dos elementos, ambos reconocidos por la proteína antígeno T grande de SV40 (AgT). La unión del AgT a la región denominada origen de replicación resulta en la multiplicación del DNA, mientras que su unión a la región enhancer tiene un efecto de estimulación de la transcripción. La inclusión del e/o SV40 en vectores de expresión eucarióticos se usaba hasta hace un tiempo para aumentar los niveles de expresión de los genes introducidos en células en cultivo. El enhancer de SV40 es capaz de interactuar con factores de transcripción celulares, ya que tiene efecto aún en ausencia de AgT. Entre ellos se cuenta el factor C/EBP, que también reconoce al elemento CCAAT presente en varios promotores (Landschulz *et al.*, 1988). Se ha demostrado incluso, que su efecto sobre la transcripción de c-myc es equivalente al que tienen los factores de

transcripción que activan la elongación de este gen (Yankulov *et al.*, 1994). Todos los promotores que usamos en este trabajo están entonces bajo la influencia del enhancer de SV40. La influencia de éste sobre cada promotor pueden ser muy distinta, ya que en cada caso los factores asociados al enhancer deberán interactuar con complejos asociados a la holoenzima RNA pol II de composición diferente.

En nuestras condiciones de trabajo en las células Hep3B, por ejemplo, el promotor CMV es muy activo, tal como lo vimos al expresar el gen de la  $\beta$ -galactosidasa o las distintas proteínas SR bajo su regulación. Sin embargo, el minigen  $\alpha$ -gb/FN que lleva el promotor CMV (incluyendo el sitio de iniciación propio de este promotor) se expresa pobremente. Creemos que la diferencia de comportamiento entre el minigen y los otros plásmidos de expresión mencionados es la presencia del e/o SV40.

En nuestros experimentos la construcción que lleva el promotor de FN mutante se expresa más que aquella que lleva el promotor FN salvaje. Este hecho representa una contradicción respecto de lo observado en nuestro propio laboratorio por Pesce, quien determinó que las mutaciones de los sitios CRE y CCAAT (presentes en la versión mutante del promotor) eliminan la unión de factores de transcripción específicos *in vitro*, y reducen la actividad del promotor en distintas líneas celulares (Pesce, 1997). Proponemos que la presencia del e/o SV40 en nuestros plásmidos altera la composición de factores de transcripción reclutados por uno y otro promotor, modificando los niveles de expresión de cada uno. El hecho de que existan proteínas como C/EBP con capacidad de unir tanto al elemento CCAAT como al enhancer de SV40 nos permite imaginar una competencia por factores de transcripción entre la versión salvaje del promotor de FN y el enhancer SV40, que no existiría en la interacción del enhancer con el promotor de FN mutado.

#### *La expresión del AgT modifica el patrón de splicing de EDI*

En los Resultados mostramos el efecto de la expresión de la proteína AgT sobre los distintos minigenes. Además de observar el lógico aumento en los niveles de transcritos en todos los casos, encontramos sorprendentemente que todos los minigenes dan como resultado una marcada inclusión del exón EDI. Este

expresión transitoria permanece en estas condiciones. Para esto generaríamos líneas celulares clonadas de expresión estable de los minigenes que llevan el promotor de la  $\alpha$ -gb, de la FN mutante, y de CMV. Hasta el momento sólo hemos

resultado es de difícil interpretación, ya que además de provocar la replicación y de estimular la transcripción, el AgT transforma a las células a través de su interacción con proteínas celulares como p53 y pRb, que normalmente se comportan como reguladores negativos del crecimiento (Fields *et al.*, 1991). Con estos resultados, no nos es posible determinar si el efecto de AgT sobre el splicing alternativo es directo -a través de la replicación y/o transcripción- o indirecto -a través de la transformación celular. Para responder a esta cuestión, Sebastián Kadener generó en nuestro laboratorio deleciones de la región enhancer SV40, de la región origen SV40 o de ambas, sobre las versiones de los minigenes que llevan los promotores de  $\alpha$ -gb, FN mut y CMV. Por los resultados observados hasta el momento, podemos decir que el AgT actúa a través de los tres niveles mencionados. La deleción del origen de replicación reduce en gran medida el efecto de esta proteína, lo cual nos lleva a pensar que la mayor parte de su efecto es debido a la replicación del plásmido. La replicación del plásmido no necesariamente implica un mayor nivel de transcripción, ya que puede determinar la imposibilidad de reclutamiento de ciertos factores de transcripción limitantes. Por otro lado, la deleción del enhancer o del enhancer y el origen de SV40, no anulan totalmente el efecto de AgT sobre el splicing de EDI, con lo cual postulamos algún rol indirecto del AgT, quizás a través de su rol como proteína transformadora.

#### **4. EL ESTADO DE CROMATINIZACION NO ALTERA EL PATRON DE SPLICING ALTERNATIVO**

Hemos intentado estudiar si el estado de cromatinización del minigen y su localización cromosómica afectan el patrón de splicing alternativo, y si el efecto de la transcripción sobre el mismo -originalmente descrito en transfecciones de expresión transitoria- permanece en estas condiciones. Para esto generamos líneas celulares clonadas de expresión estable de los minigenes que llevan el promotor de la  $\alpha$ -gb, de la FN mutante, y de CMV. Hasta el momento sólo hemos analizado la expresión de los respectivos minigenes en las líneas obtenidas. Encontramos líneas de expresión estable que se comportan igual que en los experimentos de expresión transitoria, con lo cual podemos afirmar que el efecto del promotor sobre el splicing alternativo se manifiesta en diferentes estados de

cromatinización y ante distintos niveles de expresión de los mRNAs. Sin embargo, también hallamos variabilidad en el grado de inclusión de EDI entre líneas independientes para un mismo promotor. Un análisis mucho más profundo de estas líneas podría indicar si la causa de estas diferencias reside, por ejemplo, en la proximidad a distintos elementos regulatorios o a enhancers en cada caso.

### **3. LOS ELEMENTOS REGULATORIOS EXONICOS MEDIAN EL EFECTO DEL PROMOTOR SOBRE EL SPLICING ALTERNATIVO**

Como explicamos en la Introducción, el exón EDI incluye una secuencia de 81 pb con actividad de splicing enhancer. Esta región incluye una secuencia rica en purinas (GAAGAAGA) denominada elemento A o "splicing enhancer" o ESE, ya que su delección provoca una disminución de la inclusión de EDI tanto *in vitro* (Lavigneur *et al.*, 1993) como *in vivo* (Caputi *et al.*, 1994). Próximo al ESE se encuentra el elemento B o "splicing silencer" o ESS (CAAGG) cuya mutación provoca un aumento en la inclusión de EDI (Caputi *et al.*, 1994). El ESE funciona en exones heterólogos, mientras que el ESS sólo tiene efecto cuando se halla contiguo al ESE (Muro *et al.*, 1999). Esto sugirió que el ESE ejerce su efecto a través de la interacción con factores en trans, y que el ESS actúa a través de algún otro mecanismo. En efecto, el grupo del Dr. Baralle confirmó recientemente la existencia de una estructura secundaria originalmente propuesta por otros autores (Staffa *et al.*, 1997), que involucra a los primeros 118 nucleótidos de EDI. Mediante mapeos con distintas RNasas, se demostró que la región de EDI que contiene a estos dos elementos adopta una estructura secundaria en la cual el ESS forma un "stem" o tallo, mientras que el ESE se halla en un "loop" o lazo terminal (Muro *et al.*, 1999). Esta estructura 2ria determinaría la posibilidad de interactuar con ciertos factores de splicing.

En este trabajo construimos minigenes con mutaciones en ESE (A<sup>-</sup>), en ESS (B<sup>-</sup>), o en ambos elementos (A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>), bajo regulación de los promotores de  $\alpha$ -gb, FN wt o FN mut. Observamos que la delección del elemento A provoca la casi total exclusión de EDI, sea cual fuere el promotor estudiado. Análogamente, la

mutación del elemento B implica la inclusión casi total de EDI en todos los transcriptos. Esto se observa incluso en el caso de la construcción que lleva el promotor de  $\alpha$ -gb, demostrando que los transcriptos expresados a partir de la misma no están impedidos -por su estructura 1ria y/o 2ria- de generar mRNAs que incluyan al exón EDI. Todo esto significa que las regiones exónicas que regulan el splicing alternativo de EDI "dominan" sobre el efecto de promotor. A partir de esta observación, proponemos que el efecto de los promotores sobre el splicing alternativo debe implicar interacciones con los elementos exónicos.

#### **4. CIERTAS PROTEINAS DE SPLICING MODIFICAN EL PATRON DE INCLUSION DE EDI Y ESTE EFECTO ES ESPECIFICO DE PROMOTOR**

##### **Ciertas proteínas SR promueven el splicing de EDI**

Las partículas nucleares ribonucleoproteicas pequeñas o snRNPs (U1, U2, U4/U5/U6) que componen el spliceosoma, constituyen los factores de splicing mejor caracterizados hasta el momento (Moore *et al.*, 1993). Entre los factores de splicing no-snRNP se cuentan las proteínas SR (Zahler *et al.*, 1992). Estas proteínas interactúan con los snRNPs, y son esenciales para la formación de los spliceosomas. Además, se ha postulado que las proteínas SR se unen a las secuencias regulatorias en cis o splicing enhancers, reclutando de ese modo a los factores de splicing que reconocen a los consensos de splicing intrónicos (Wu *et al.*, 1993; Staknis *et al.*, 1994). En el caso particular de SF2/ASF se demostró que su unión a regiones exónicas con actividad de splicing enhancer estimula la eliminación del intrón río arriba (Sun *et al.*, 1993).

Como se mencionó en la Introducción, inicialmente se creía que las proteínas SR eran funcionalmente redundantes, pero luego se fueron acumulando evidencias de cierta especificidad de las mismas, sobre todo en el splicing alternativo. Esta especificidad parece residir precisamente en el reconocimiento de las secuencias regulatorias en cis o splicing enhancers. Varios laboratorios se han dedicado en los últimos años a establecer la especificidad de reconocimiento de las proteínas SR mediante ensayos de SELEX (Tacke *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998; Tacke *et al.*, 1998; Schaal *et al.*, 1999; Cavaloc *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos indican que cada proteína SR tiene un sitio blanco de unión específico, aunque a veces más de una proteína SR reconoce una dada secuencia de RNA, y

sorprendentemente, algunas proteínas SR son capaces de reconocer secuencias muy diversas. Sin embargo, resta comprobar la validez de estas conclusiones en experimentos *in vivo*.

Nosotros ensayamos un panel de proteínas SR sobre el splicing alternativo de EDI, encontrando que sólo algunas de ellas son capaces de estimular la inclusión de EDI. En nuestras manos, SF2/ASF estimula la inclusión de EDI en unas seis veces, SRp40, SRp55 y SC-35 en unas dos veces, Tra2 $\beta$  no tiene efecto, y SRp20 y SRp30c tienen un leve efecto inhibitorio sobre la inclusión del exón. Esta es la primera vez que se determina *in vivo* la influencia de las proteínas SR sobre el exón EDI.

En el caso particular de la proteína SF2/ASF, la secuencia de su sitio blanco de unión en el RNA determinada por SELEX es RGAAGAAC (Tacke *et al.*, 1995). La secuencia del ESE de EDI determinada por Caputi es GAAGAAGA. Esta similitud de secuencias es consistente con la gran actividad estimuladora de SF2/ASF sobre EDI que nosotros observamos en este trabajo.

Se había descrito que las proteínas SF2/ASF y hnRNPA1 tienen efectos antagónicos, favoreciendo el uso de sitios 5' de splicing proximales la primera, y de sitios 5' de splicing distales, la segunda (Cáceres *et al.*, 1994). La proteína hnRNP A1 no es un factor esencial de splicing, y no forma parte de la familia de proteínas SR sino del grupo de proteínas que forman el "core" de las hnRNPs. Estas proteínas tienen dominios de reconocimiento del RNA que les permiten asociarse a los transcriptos nacientes (hnRNAs), formando los hnRNPs. hnRNP A1 es el miembro mejor descrito de este grupo, incluye un motivo (llamado M9) que le permite atravesar continuamente los poros nucleares, desde el núcleo al citosol y viceversa, por lo que se postula que acompaña a los mRNAs maduros en su ruta al citosol.

A pesar de haber sobreexpresado grandes cantidades de hnRNP A1, nosotros no hemos detectado ninguna clase de influencia de esta proteína sobre el splicing de EDI.

**SF2/ASF ejerce su efecto a través de la interacción con el ESE presente en EDI**

La estimulación de la inclusión de EDI por parte de SF2/ASF involucra algún tipo de interacción con el elemento A o ESE de EDI. En efecto, la sobreexpresión de este factor de splicing sólo modifica el patrón de splicing de EDI en presencia de un ESE intacto, tal como mostramos en los experimentos con mutantes por delección de este elemento regulatorio. Desconocemos si las interacciones entre el factor de splicing en trans y las secuencias en cis son directas o si están mediadas por otros factores. Creemos probable la existencia de contactos directos, teniendo en cuenta la similitud entre el sitio de unión de SF2/ASF determinado *in vitro*, y la secuencia del ESE de EDI.

La mutación del elemento B o ESS disminuye un poco el efecto de SF2/ASF pero no lo anula totalmente. A raíz de estas observaciones postulamos que los transcriptos B<sup>-</sup> tienen una menor sensibilidad a SF2/ASF, probablemente debida a la diferente estructura secundaria que presentan estos mRNAs (Muro *et al.*, 1999).

**Papel de los dominios de SF2/ASF**

Como dijimos, SF2/ASF estimula la inclusión de EDI en los transcriptos maduros. Como se explicó en la Introducción, las proteínas SR presentan una estructura modular, análoga a la de los factores de transcripción. Gracias a una colaboración con el Dr. Javier Cáceres, tuvimos acceso a una colección de mutantes de dominios de la proteína SF2/ASF, lo que nos permitió estudiar la relevancia de los mismos en el splicing alternativo de EDI. Demostramos así que uno de los dos dominios de reconocimiento del RNA, RRM2, es esencial para el efecto de SF2/ASF sobre EDI. Esto confirma la idea de que los dominios podrían actuar como módulos a nivel funcional determinando la especificidad del splicing alternativo (Cáceres *et al.*, 1997; Chandler *et al.*, 1997). Además, observamos que la delección del dominio RRM2 no sólo no es capaz de estimular la inclusión de EDI sino que provoca su exclusión. Esto sugiere que la mutante  $\Delta$ RRM2 actúa como un "negativo dominante". Estos resultados se podrían explicar si la proteína SF2/ASF sirviera de puente para otros factores de splicing

que reconocen al ESE. De este modo la mutante  $\Delta$ RRM2 podría "secuestrarlos" a través del dominio RS, impidiendo la interacción de éstos con el mRNA.

Las deletantes para los dominios RS y RRM1 conservan cierto efecto sobre EDI, aunque menos que el de la proteína salvaje. Sabemos que la integridad de SF2/ASF es importante para su correcta localización subcelular, lo cual puede explicar la menor eficiencia de las mutantes  $\Delta$ RS y  $\Delta$ RRM1 (Cáceres *et al.*, 1997). Respecto del dominio RS sabemos que es indispensable para el splicing constitutivo pero no para el splicing alternativo (Cáceres *et al.*, 1993; Zuo *et al.*, 1993), y que es necesario pero no suficiente para el tránsito de esta proteína del núcleo al citosol y viceversa (Cáceres *et al.*, 1998). Respecto de los dominios de reconocimiento del RNA, ambos parecen ser necesarios para el reconocimiento específico de la secuencia blanco de unión de SF2/ASF (Tacke, *et al.*, 1995). En particular, RRM2 confiere selectividad para sitios de splicing 5' proximales (Cáceres *et al.*, 1997a), lo cual concuerda con la marcada exclusión de EDI que vemos en nuestras manos con la mutante  $\Delta$ RRM2.

Es posible que análogos de las mutantes analizadas en este trabajo tengan algún rol fisiológico *in vivo*, ya que los mRNAs de las proteínas SR presentan varias isoformas de splicing alternativo que difieren entre sí en la presencia o ausencia de las regiones codificantes para uno u otro tipo de dominio (Cáceres *et al.*, 1997b). Quizás parte de la regulación del splicing alternativo dependa de la abundancia relativa de las diversas isoformas.

#### **La sensibilidad a SF2/ASF varía con la estructura del promotor**

Los experimentos con proteínas SR comentados hasta este punto involucraron sólo al promotor de la FN. La sobreexpresión de SF2/ASF sobre distintos minigenes nos permitió concluir que el efecto de esta proteína es distinto según el promotor estudiado. Así, los transcritos bajo regulación del promotor de la  $\alpha$ -gb son prácticamente insensibles a SF2/ASF, mientras que aquellos bajo regulación del promotor FN mut incluyen al exón EDI en mayor proporción cuanto más proteína SF2/ASF halla presente. El minigen bajo regulación del promotor de HIV-2 tiene una sensibilidad intermedia a este factor de splicing, alcanzando un plateau de máxima inclusión de EDI diferente al obtenido con el



minigen FN mut. Esto sugiere que el nivel de inclusión de EDI está determinado por el tipo de promotor.

Las diferencias de comportamiento mencionadas podrían deberse a las distintas secuencias de los RNAs en cada caso. Recordemos que los transcritos a partir de cada minigen difieren no sólo en el promotor que los expresa sino también en su región 5' no traducible. Nosotros descartamos la relevancia de la región 5' no codificante el splicing alternativo de EDI, ya que las construcciones  $\alpha$ -gb/5'FN y  $\alpha$ -gb/5'NF codifican para mRNAs de secuencia idéntica al codificado por el minigen FN mut y, sin embargo, no son capaces de responder a la sobreexpresión de SF2/ASF. Por esta razón, asignamos las diferencias observadas a las secuencias promotoras.

Este efecto de SF2/ASF específico de promotor es quizás la observación más original de este trabajo.

## **5. LA TRANSCRIPCIÓN Y EL SPLICING ALTERNATIVO DE EDI SE ENCUENTRAN ACOPLADOS**

**El promotor, los elementos exónicos y ciertas proteínas de splicing conjuntamente determinan el patrón de splicing alternativo de EDI**

Primero mostramos que el tipo de promotor modula el patrón de splicing alternativo. Luego vimos que algunas proteínas SR son capaces de estimular la inclusión de EDI en los mRNAs maduros, y que en particular el efecto de SF2/ASF involucra interacciones con el ESE y depende del tipo de promotor que dirige la transcripción. Todo esto sugiere que los procesos de transcripción y maduración de mRNAs están acoplados. ¿Cuál es el mecanismo por el cual esto ocurre? ¿Qué moléculas están involucradas en este acoplamiento? ¿Qué tipo de interacciones establecen los distintos factores responsables de este fenómeno?

### **La transcripción y maduración de los RNAs son procesos acoplados**

Nuestros resultados se podrían explicar si el reclutamiento de SF2/ASF al transcrito estuviera influido por el tipo de promotor. Este reclutamiento podría estar mediado por los factores regulatorios de splicing, ya que se sabe que la composición de los mismos varía de promotor a promotor. Si esto fuera cierto, deberían existir evidencias de interacción entre proteínas SR y coactivadores de

la transcripción. Hasta el momento no contamos con tales evidencias. Sin embargo, sí existen indicios de la interacción entre la RNA pol II y los factores de splicing. En 1993, Greenleaf relacionó la gran capacidad de fosforilación del dominio carboxiterminal de la RNA pol II (CTD) con la alta proporción de residuos cargados positivamente de los dominios RS de las proteínas SR, y propuso que ambos tipos de moléculas podrían interactuar a través de estos dominios (Greenleaf, 1993). Si bien hoy sabemos que esta teoría no es exactamente cierta, en su momento consistió una observación pionera en el área que llevó a diversos grupos a buscar una relación entre ambos tipos de moléculas.

*"Fábricas de mRNA": la integración de los procesos de transcripción y procesamiento de RNAs ocurre a través del CTD*

La presencia del CTD en la RNA pol II es una característica única de esta polimerasa, no compartida con las RNA pol I y III, por lo cual frecuentemente se ha intentado relacionar su presencia con los fenómenos de maduración que sufren los transcritos de RNA pol II. Recordemos que el CTD incluye múltiples repeticiones del péptido YSPTSPS, fosforilable en las posiciones Ser, lo cual da lugar a la existencia de una forma hiposforilada de la enzima o pol IIA y de una forma hiperfosforilada o pol IIO.

En el caso del proceso de "capping", por ejemplo, que sólo ocurre sobre RNAs transcritos por esta enzima (mRNAs, snRNAs), se demostró la interacción directa entre el CTD fosforilado y la enzima del capping. El laboratorio de David Bentley observó que los genes transcritos por RNA pol II sin CTD no sufren adición de cap eficientemente *in vivo* (McCracken *et al.*, 1997a). Luego se vio que esto involucra una interacción que ocurre a través de la unión entre la enzima del capping y las serinas fosforiladas de las repeticiones YSPTSPS del CTD (Ho *et al.*, 1999). En particular, la Ser5 fosforilada aumenta al doble la afinidad de la enzima por el GTP. Esto demuestra que los procesos de transcripción y capping se hallan íntimamente acoplados.

La poliadenilación también está fuertemente acoplada a la transcripción a través de interacciones con el CTD. Nuevamente usando mutantes de la RNA pol II que carecen del CTD, Bentley demostró que los transcritos no son clivados ni

poliadenilados en ausencia de este dominio (McCracken *et al.*, 1997b). Los factores de poliadenilación CstF y CSPF son capaces de unirse a CTD de extractos crudos y co-purifican con los complejos de holoenzima pol II. Sorprendentemente, se encontró que tres de las subunidades de CSPF son en realidad factores de transcripción del aparato basal (TAFs) (Dantonel *et al.*, 1997). Luego de la iniciación CPSF co-inmunoprecipita con la RNA pol II, por lo que se cree que es transferido de TFIID a la pol II (Dantonel *et al.*, 1997).

Otra observación llamativa es la demostración de que la RNA pol II es en sí mismo un factor de poliadenilación (Hirose y Manley, 1998). Esto fue observado muy recientemente en experimentos *in vitro* realizados sobre mRNAs previamente transcriptos.

También hay numerosos indicios sobre el acoplamiento entre la transcripción y el splicing general. Por un lado, hemos comentado en la Introducción una serie de evidencias citológicas que permitieron visualizar la colocalización en tiempo y espacio de las maquinarias responsables de ambos procesos (Roth *et al.*, 1991; Jiménez-García *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 1993; Spector, 1996; Misteli *et al.*, 1997). A éstas, se suman evidencias bioquímicas que apoyan la idea original de Greenleaf. El grupo de Corden, por ejemplo, logró inmunoprecipitar proteínas SR a partir de extractos nucleares usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el CTD (Yuryev *et al.*, 1996). Este anticuerpo también inhibe el splicing *in vitro*.

En los experimentos con versiones truncadas de la RNA pol II que comentamos antes, se demostró que el CTD es imprescindible para el splicing general *in vivo* (McCracken *et al.*, 1997b). Además, la forma hiperfosforilada de la RNA pol II participa del splicing *in vitro*, estimulando el ensamblado temprano del spliceosoma (Hirose *et al.*, 1999). La forma hipofosforilada de la enzima, por el contrario, inhibe la formación de estos complejos.

Todas estas evidencias de coordinación entre transcripción y maduración han llevado a proponer la existencia de una "fábrica de mRNA", compuesta por la RNA pol II y los factores de procesamiento (enzima del capping, factores de poliadenilación, proteínas SR).

Ahora bien, si los procesos de transcripción y maduración de mRNAs están tan íntimamente asociados: ¿cómo es posible reproducir el splicing o la poliadenilación *in vitro* a partir de RNAs previamente transcriptos? Podemos

argumentar que el splicing *in vitro* es muy ineficiente y mucho más lento que el splicing *in vivo*. Un gen pequeño (de unas 1500 pb) con un solo intrón puede ser transcrito y procesado simultáneamente en tan sólo un minuto *in vivo*, mientras su splicing *in vitro* puede tomar una hora (Corden y Patturajan, 1997). Esto sugiere que el acoplamiento podría aportar la ventaja de una mayor velocidad de procesamiento (Bentley, 1999). También se ha postulado que el CTD podría cumplir la función de un andamio, sobre el cual se ensamblan del modo y en el orden correcto los factores de procesamiento (Bentley, 1998). En suma, el proceso de splicing *in vivo*, por ser mucho más complejo, puede tener de condicionantes que no tiene el proceso *in vitro*.

### **Hacia un modelo de coordinación entre transcripción y splicing alternativo**

Pero volvamos al interrogante planteado al principio de esta sección. Hasta ahora hemos explicado cómo proceden las interacciones entre las maquinarias de transcripción y splicing -que podrían operar también en el splicing alternativo- pero aún no explicamos cómo podrían influir sobre las mismas los diferentes promotores.

Nuestra hipótesis es que los diferentes factores de transcripción con que se relaciona la RNA pol II en los distintos promotores, determinan un grado diferente de fosforilación del CTD, lo cual a su vez se traduce en una distinta capacidad de reclutamiento de factores de splicing. En la **Figura 27** se esquematiza la interacción de la RNA pol II con dos promotores diferentes, X e Y.

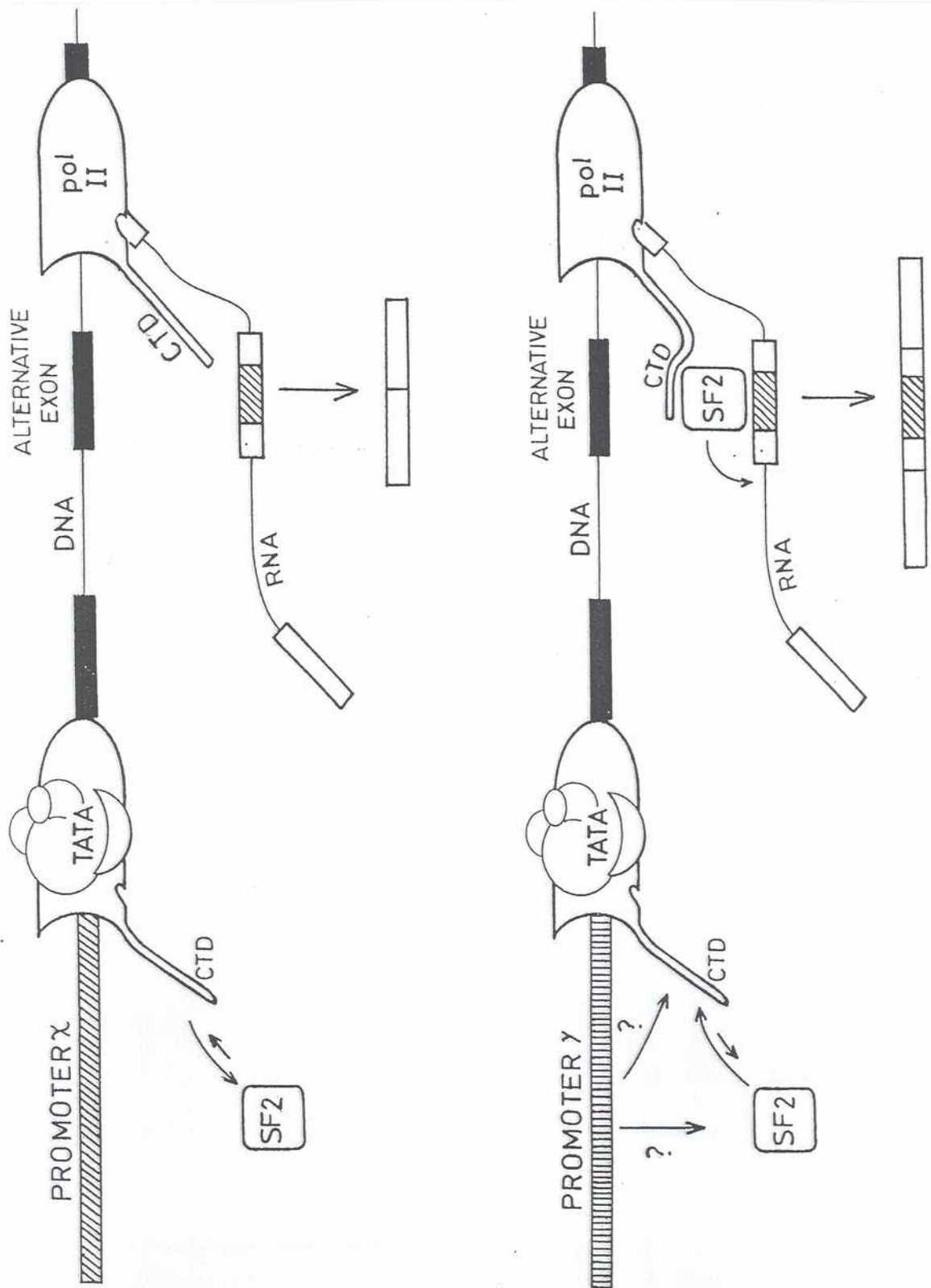


Figura 27: Modelo de interacción entre las maquinarias de transcripción y splicing alterantivo de mRNAs eucarióticos.

En el promotor X, las interacciones de la RNA pol II con los factores de transcripción regulatorios determinan un cierto grado de fosforilación del CTD, lo cual resulta en un pobre reclutamiento de los factores de splicing, lo cual a su vez resulta en una escasa inclusión de EDI en los transcriptos maduros. En forma opuesta, los factores de transcripción regulatorios reclutados por el promotor Y tienen como consecuencia otro nivel de fosforilación del CTD, lo que a su vez implica una gran capacidad de reclutamiento de proteínas SR con el consecuente aumento en la proporción de mRNAs maduros que incluyen EDI.

Apoyan este modelo los experimentos de transcripción in vivo que involucran genes en los que la polimerasa hace una pausa luego de la iniciación. Se ha visto que el paso de la polimerasa "en pausa" a la polimerasa "elongadora" coincide con la fosforilación del CTD, y que el nivel de fosforilación de éste no está relacionado con la tasa de transcripción sino con el tipo de promotor (O'Brien *et al.*, 1994). La relación entre elongación y fosforilación del CTD ha sido documentada en otros sistemas (Akoulitchev *et al.*, 1995; Parada y Roeder, 1996). La actividad de quinasa sobre el CTD está presente en TFIIF, y se debe a CAK (CDK-activating kinase), compuesta a su vez por CDK7 y ciclina H (Roy *et al.*, 1994). La proteína CDK7 participa además de la reparación de DNA y del control del ciclo celular, por lo cual se abre un nuevo panorama para la búsqueda de interacciones entre la transcripción y otros procesos (Nigg, 1996).

Sería interesante saber si en nuestro modelo de estudio, los minigenes con los promotores que presentan las mayores diferencias en el splicing de EDI difieren en la calidad y/o cantidad de factores de transcripción que intervienen en la etapa de la elongación.

También podemos pensar en mecanismos alternativos, no necesariamente excluyentes con el propuesto. Los factores de splicing, por ejemplo, podrían interactuar en forma directa con los factores de transcripción. Muy recientemente se describió que la interacción entre SF2/ASF y un coactivador transcripcional denominado p52 resulta en la activación de la transcripción dependiente de Sp1 (Ge *et al.*, 1998). Por otro lado se ha demostrado la existencia de una proteína llamada supresor del tumor de Wilms (WT1), con la capacidad dual de participar tanto en la transcripción como en el splicing. Esta proteína presenta diferentes isoformas de splicing, una de las cuales colocaliza con los factores splicing en el

núcleo mientras que la otra se encuentra asociada a la maquinaria transcripcional (Davies *et al.*, 1999).

# CONCLUSIONES



---

A partir de los resultados expuestos, podemos concluir lo siguiente:

- diseñamos un modelo de estudio consistente en la transfección de líneas celulares con minigenes  $\alpha$ -gb/FN bajo regulación de distintos promotores, que resultó adecuado para estudiar la coordinación entre transcripción y splicing alternativo
- determinamos que el patrón de splicing alternativo del exón EDI de la FN humana varía de acuerdo al promotor utilizado en la síntesis de los transcritos, en condiciones de transfección transitoria de células humanas
- generamos líneas celulares clonadas de expresión estable para algunos de los minigenes, observando los mismos resultados que en las transfecciones transitorias
- establecimos que la influencia del promotor sobre el splicing alternativo no se debe a las diferencias en las regiones 5' no codificantes de los transcritos, ni a la "fuerza" del promotor sino a la calidad de factores de transcripción reclutados por el mismo
- observamos que el splicing alternativo de EDI se modifica en presencia del antígeno T de SV40
- encontramos que las proteínas de splicing SF2/ASF, SRp40, SRp55 y SC-35 estimulan el splicing de EDI, mientras que las proteínas SRp20, SRp30c, hnRNP A1 y TRa2 $\beta$  no tienen ningún efecto
- estudiamos el papel de los dominios funcionales de SF2/ASF, observando que el dominio RRM2 es esencial para su rol de factor de splicing sobre EDI
- confirmamos el efecto de los elementos ESE y ESS sobre la regulación en cis del splicing de EDI -previamente demostrado para el promotor de la  $\alpha$ -gb- extendiéndolo a los promotores de FN wt y mut. Concluimos así que el efecto de las regiones exónicas sobre el splicing alternativo "domina" sobre el efecto del promotor

- determinamos que el efecto de SF2/ASF sobre la inclusión de EDI está mediado por la secuencia ESE del exón
- proponemos un modelo según el cual el splicing de EDI está regulado por la interacción de secuencias exónicas, factores de splicing y la naturaleza del promotor que dirige la síntesis del transcripto



Paula Cramer



DR. ALBERTO KORNBLIHTT  
PROFESOR TITULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES - U.B.A.

# BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.D., Rudner, D.Z., Rio, D.C. (1996). Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr. Op. Cell Biol.* 8, 331-339.
- Akoulitchev, S., Mäkela, T.P., Weinberg, R.A., Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 377, 557-560.
- Alonso, C.A., Pesce, C.G., Kornblihtt, A.R. (1996). The CCAAT-binding proteins CP1 and NF-I cooperate with ATF-2 in the transcription of the fibronectin gene. *Journal of Biol. Chem.* 271, 22271-22279.
- Alonso, C.R. (1998) Identificación y análisis funcional de factores que regulan la transcripción del gen de fibronectina humana. FCEyN, UBA
- Aoufouchi, S., Yélamos, J., Milstein, C. (1996). Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis. *Cell* 85, 415-422.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, S.A., Struhl, K.C.P.i.M.B. (1989). En: Ausubel F.M. (eds.). *Greene Publishing Associates-Wiley Interscience*. New York,
- Bauren, G., Wieslander, L. (1994). Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* 76, 183-192.
- Beelman, C.A., Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81, 179-183.
- Bentley, D. (1998). A tale of two tails. *Nature* 395, 21-22.
- Bentley, D.L. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr. Op. Cell Biol.* 11, 347-351.
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3171-3175.

- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7, 1513.
- Borsi, L., Castellani, A., Risso, A.M., Leprini, A., Zardi, L. (1990). Transforming growth factor- $\beta$  regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett.* 261, 175-178.
- Breathnach, R., P., C. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349-384.
- Brody, E., Abelson, J. (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228, 963-967.
- Bruzik, J., Maniatis, T. (1995). Enhancer dependent interaction between 5' and 3' sites in mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7056-7059.
- Caputi, M., Casari, G., Guenzi, S., Tagliabue, R., Sidoli, A., Melo, C.A., Baralle, F.E. (1994). A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acid Res.* 22, 1018-1022.
- Carmo-Fonseca, M., Tollervy, D., Pepperkok, R., Barabino, S.M.L., Merdes, A., Brunner, C., Zamore, P., Green, M., Hurt, E., Lamond, A.I. (1991). Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO J.* 10, 195-206.
- Cavaloc, Y., Bourgeois, C.F., Kister, L., Stévenin, J. (1999). The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. *RNA* 5, 468-483.
- Cáceres, J.F., Krainer, A.R. (1993). Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J.* 12, 4715-4726.

- Cáceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M., Krainer, A.R. (1994). Regulation of alternative splicing by antagonistic splicing factors. *Science* 265, 1706-1709.
- Cáceres, J., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L., Krainer, A.R. (1997a). Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J. Cell Biol.* 138, 225-238.
- Cáceres, J.F., Sreaton, G.R., Krainer, A.R. (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* 12, 55-66.
- Celis, J.E., Bravo, R., Arenstorf, H.P., Le Sturgeon, W.M. (1986). Identification of proliferation-sensitive human proteins amongst components of the 40 S hnRNP particles: identity of hnRNP core proteins in the HeLa protein catalogue. *FEBS Lett* 194, 101-109.
- Chandler, S.D., Mayeda, A., Yeakley, J.M., Krainer, A.R., Fu, X.-D. (1997). RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3596-3601.
- Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D., Young, R.A. (1996). A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 380, 82-85.
- Chen, J.-L., Attardi, L.D., Verrijzer, C.P., Yokomori, K., Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79, 93-105.
- Chiara, M.D., Reed, R. (1995). A two-step mechanism for 5' and 3' splice site pairing. *Nature* 375, 510-513.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal. Biochem.* 162, 156-159.

- Chow, L.T., Gelinás, R.E., Broker, T.R., Roberts, R.J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.
- Ciliberto, G., Dente, L., Cortese, R. (1985). Cell specific expression of a transfected human  $\alpha$ 1-antitrypsin gene. *Cell* 41, 531-541.
- Colman-Lerner, A., Fischman, M.L., Lanuza, G.M., Bissell, D.M., Kornblihtt, A.R., Barañao, J.L. (1999). Evidence for a role of the alternatively spliced ED-I sequence of fibronectin during ovarian follicular development. *Endocrinology* 140, 2541-2548.
- Corden, J.L., Patturajan, M. (1997). A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem Sci.* 22, 413-416.
- Crispino, J.D., Blencowe, B.J., Sharp, P.A. (1994). Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* 265, 1866-1869.
- Cui, Y., Hagan, K.W., Zhang, S., Peltz, S.W. (1995). Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 9, 423-436.
- Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271, 19009-19012.
- Dantonel, J.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., Tora, L. (1997). Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* 389, 399-402.
- Davies, R., Moore, A., Schedl, A., Bratt, E., Miyahawa, K., Ladomery, M., Miles, C., Menke, A., van Heyningen, V., Hastie, N. (1999). Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Cancer Res.* 1747-1750.
- Enssle, J., Kugler, W., Hentze, M., Kulozik, A.E. (1993). Determination of mRNA fate by different RNA polymerase II promoters. *Proc. Natl. Acad. USA* 90, 10091-10095.

- Eperon, L.P., Graham, I., Griffiths, A.D., Eperon, I.C. (1988). Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing polymerase? *Cell* 54, 393-401.
- Fields, B., Knipe, D. (1991). En: (eds.).
- Fu, X.-D., Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343, 437-441.
- Fu, X.-D., Maniatis, T. (1992). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC-35. *Science* 256, 535-538.
- Ge, H., Manley, J.L. (1990). A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62, 25-34.
- Ge, H., Zuo, P., Manley, J.L. (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* 66, 373-382.
- Ge, H., Si, Y., Wolffe, A.P. (1998). A novel transcriptional activator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol. Cell* 2,
- Gorman, C.e.a. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79, 6453,.
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R., Sharp, P.A. (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42, 345-353.
- Graveley, B.R., Maniatis, T. (1998). Arginine/Serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 1, 765-771.
- Green, M.R., Maniatis, T., D.A., M. (1983). Human beta-globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in *Xenopus* oocyte nuclei. *Cell* 32, 681-694.
- Greenblatt, J. (1997). RNA polymerase holoenzyme and transcription regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 310-319.



Greenleaf, A. (1993). Positive patches and negative noodles: linking RNA processing to transcription? *Trends. Biochem. Sci.* 18, 117-119.

Grosschedl, R. (1995). Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site-specific recombination. *Curr. Op. Cell Biol.* 7, 362-370.

Grosfeld (1982). *Nature* 295, 120.

Gutman, A., Kornblihtt, A.R. (1987). Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7179-7182, 7179-7182.

Hampson, R.K., La Follette, L., Rottman, F.M. (1989). Alternative processing of bovine growth hormone mRNA is influenced by downstream exon sequences. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1604-1610.

Hernández, N., Keller, W.I. (1983). Splicing of in vitro synthesized RNA precursors in HeLa cell extracts. *Cel* 35, 89-99.

Hertel, K.J., Lynch, K.W., Maniatis, T. (1997). Common themes in the function of transcription and splicing enhancers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 350-357.

Hirose, Y., Manley, J.L. (1998). RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395, 93-96.

Hirose, Y., Tacke, R., Manley, J.L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 13, 1234-1239.

Ho, C.K., Shuman, S. (1999). Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Mol. Cell* 3, 405-411.

- Huang, S., Spector, D.L. (1991). Nascent pre-mRNAs transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. *Genes Dev.* 5, 2288-2302.
- Huang, S., Spector, D.L. (1996). Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. *J. Cell Biol.* 133, 719-732.
- Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C., Mattaj, I.W. (1995). A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* 376, 709-712.
- Jarnagin, W.R., Rockey, D.C., Koteliensky, V.E., Wang, S., Bissell, D.M. (1994). Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J. Cell Biol.* 127, 2037-2048.
- Jiménez-García, L.F., Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
- Johnson, T., Chamberlin, M. (1994). Complexes of yeast RNA polymerase II and RNA are substrates for TFIIS-induced RNA cleavage. *Cell* 77, 217-224.
- Keller, W., Minvielle-Sebastia, L. (1997). A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing. *Curr. Op. Cell Biol.* 9, 329-336.
- Kessler, Jiang, Chasin, L. (1993). Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6211-6222.
- Kim, Y.-J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.
- Kohtz, J.D., Jamison, S.F., Will, C.L., Zuo, P., Lührman, R., García Blanco, M.A., Manley, J.L. (1994). Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368, 119-124.

Koleske, A.J., Young, R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.

Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F.E. (1984). Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain. *EMBO J.* 3, 221-226.

Kornblihtt, A.R., Pesce, C.G., Alonso, C.R., Cramer, P., Srebrow, A., Werbajh, S.E., Muro, A.F. (1996). The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J.* 10, 248-257.

Krainer, A.R., Maniatis, T., Ruskin, B., Green, M.R. (1984). Normal and mutant human beta-globin pre.mRNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. *Cell* 36, 993-1005.

Krainer, A.R., Conway, G.C., Kozak, D. (1990). The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* 62, 35-42.

Krainer, A.R. (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev.*

Landschulz, W., Johnson, P., McKnight, S. (1988). *Science* 240, 1759-1764.

Lavigueur, A., La Branche, H., Kornblihtt, A.R., Chabot, B. (1993). A splicing enhancer in the human fibronectin alternate exon EDI interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev.* 7, 2405-2417.

Lawrence, J.B., Singer, R.H., Marselle, L.M. (1988). Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. *Cell* 57, 493-502.

Liu, H.-X., Zhang, M., Krainer, A.R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* 12, 1998-2012.

- Maldonado, E., Reinberg, D. (1995). News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 352-361.
- Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S., Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins.
- Manley, J.L., Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes & Dev.* 10, 1569-1579.
- Mardon, H.J., Sebastio, G., Baralle, F.E. (1987). A role for exon sequences in alternative splicing of the human fibronectin gene. *Nucleic Acids Res.* 15, 7725-7733.
- Matsui, W., Segall, P.A., Weil, P.A., Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255, 11992-11996.
- Mayeda, A., Krainer, A.R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68, 365-375.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Amgen EST Program, Shuman, S., Bentley, D. (1997a). 5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 11, 3306-3318.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G.H., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., Bentley, D.L. (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase couples messenger RNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.
- Melton, e.a. (1984). *NAR* 12, 7035.
- Misteli, T., Cáceres, J.F., Spector, D.L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-526.

- Muro, A.F., Bernath, V.A., Kornblihtt, A.R. (1992). Interaction of the -170 cyclic AMP response element with the adjacent CCAAT box in the human fibronectin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 267, 12767-12774.
- Muro, A.F., Caputi, M., Pariyarath, R., Pagani, F., Buratti, E., Baralle, F.E. (1999). Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2657-2671.
- Naeger, L.K., Schoborg, R.V., Zhao, Q., Tullis, G.E., Pintel, D. (1992). Nonsense mutations inhibit splicing of MVM RNA in cis when they interrupt the reading frame of either exon of the final spliced product. *Genes Dev.* 6, 1107-1119.
- Neubauer, G., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Séraphin, B., Lührmann, R., Mann, M. (1997). Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 385-390.
- Nigg, E.A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the crossroads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr. Op. Cell Biol.* 8, 312-317.
- Nigg, E.A. (1997). Nucleoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
- O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A., Lis, J.T. (1994). Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* 370, 75-77.
- Ossipow, V., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Schibler, U. (1995). A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* 83, 137-146.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S., Sharp, P.A. (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1119-1150.

- Parada, C., Roeder, R. (1996). Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* 384, 375-378.
- Pesce, C.G. (1997) Múltiples interacciones determinan la participación de ATF-2 en la regulación transcripcional del promotor del gen de la fibronectina humana. FCEyN, UBA
- Pesce, C.G., Alonso, C.R., Nogués, G., Kornblihtt, A.R. (1999). ATF-2 activates the fibronectin gene promoter through an interaction with a CCAAT factor. Manuscrito en preparación.
- Planck, S.R., Listerud, M.D., Buckley, S.D. (1988). Modulation of hnRNP A1 protein gene expression by epidermal growth factor in Rat-1 cells. *Nucl. Acid Res.* 16, 11663-11673.
- Reed, R., Maniatis, T. (1986). A role for exon sequences and splice site proximity in splice site selection. *Cell* 46, 681-690.
- Roscigno, R.F., García-Blanco, M.A. (1995). SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA* 1, 692-706.
- Roth, M.B., Zahler, A.M., Stolk, J.A. (1991). A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell Biol.* 115, 587-596.
- Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.P., Scjaefffer, L., Nigg, E.A., Hojmakers, J.H.J., Egly, J.M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* 79, 1093-1101.
- Sachs, A., Wahle, E. (1993). Poly(A) tail metabolism and function in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 31, 2295-2298.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). En: Press C.S.H.L. (eds.). New York, Schaal, T.D., Maniatis, T. (1999). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1705-1719.

- Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R., Hynes, R.O. (1983). Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell* 421-431, 421-431.
- Schwarzbauer, J.E., Patel, R.S., Fonda, D., Hynes, R.O. (1987). Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J.* 6, 2573-2580.
- Sharp, P.A. (1994). Split genes and RNA splicing. Nobel Lecture. *Cell* 77, 805-815.
- Sharp, P.A. (1997). Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell* 91, 875-879.
- Sisodia, S.S., Sollner, W.B., Cleveland, D.W. (1987). Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3602-3612.
- Smale, S.T., Tjian, R. (1985). Transcription of herpes simplex virus tk sequences under the control of wild type and mutant human RNA polymerase I promoters. *Mol. Cell. Biol.* 5, 352-362.
- Smale, S.T., Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.
- Smith, K.P., Moen, P.T., Wydner, K.L., Coleman, J.R., Lawrence, J.B. (1999). Processing of endogenous pre-mRNAs in association with SC-35 domains is gene specific. *J. Cell Biology* 144, 617-629.
- Somasekhar, M.B., J.E., M. (1985). Exon mutations that affect the choice of splice sites used in processing the SV40 late transcripts. *Nucleic Acid Res.* 13, 5591-5609.
- Spector, D.L., Fu, X.-D., Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10, 3467-3481.

- Spector, D.L. (1996). Nuclear organization and gene expression. *Exp. Cell Res.* 229, 189-197.
- Staffa, A., Acheson, N.H., Cochrane, A. (1997). Novel exonic elements that modulate splicing of the human fibronectin EDA exon. *J. Biol. Chem.* 272, 33394-33401.
- Staknis, D., Reed, R. (1994). SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3540-3551.
- Staley, J.P., Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs and things. *Cell* 92, 315-326.
- Sun, Q., Mayeda, A., Hampson, R.K., Krainer, A.R., Rottman, F.M. (1992). General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. *Genes Dev.* 7, 2598-2608.
- Tacke, R., Manley, J.L. (1995). The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *EMBO J.* 14, 3540-3551,.
- Tacke, R., Tohyama, M., Ogawa, S., J.L., M. (1998). Human Tra2 proteins are sequence specific activators of pre-mRNA splicing. *Cell* 93, 139-148.
- Tarn, W.-Y., Steitz, J.A. (1994). SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro. *Genes Dev.* 8, 2704-271.
- Tarn, W.-Y., Steitz, J.A. (1996). A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell* 84, 801-811.
- Tarun, S.Z., Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* 15, 7168-7177.



- Tian, M., Maniatis, T. (1992). Positive control of pre-mRNA splicing in vitro. *Science* 256, 237-240.
- Tuerk, C., Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Vibe-Pedersen, K., Kornblihtt, A.R., Baralle, F.E. (1984). Expression of a human  $\alpha$ -globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing. *EMBO J.* 3, 2511-2516.
- Visa, N., Izaurralde, E., Ferreira, J., Daneholt, B., Mattaj, I.W. (1996). A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J. Cell Biol.* 133, 5-14.
- Watakabe, A., Tanaka, K., Shimura, Y. (1993). The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* 7, 407-418.
- Whitelaw, E., Hogben, P., Hanscombe, O., Proudfoot, N.J. (1989). Transcriptional promiscuity of the human  $\alpha$ -globin gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 241-251.
- Will, C.L., Lührmann, R. (1997). Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr. Op. Cell Biol.* 9, 320-328.
- Wu, J.Y., Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 1061-1070.
- Xing, Y., Johnson, C.V., Dobner, P.R., Lawrence, J.B. (1993). Higher organization of individual gene transcription and RNA splicing. *Science* 259, 259.
- Yankulov, K., Blau, J., Purton, T., Roberts, S., Bentley, D.L. (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell* 77, 749-759.

- Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R.V., Gentile, C., Gebara, M., Corden, J.L. (1996). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6975-6980.
- Zachar, Z., Kramer, J., Mims, I.P., Bingham, P.M. (1993). Evidence for channel diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J. Cell Biology* 121, 729-742.
- Zahler, A.M., Lane, W., Stolk, J.A., Roth, M.B. (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* 6, 837-847.
- Zahler, A.M., Neugebauer, K.M., Lane, W.S., Roth, M.B. (1993). Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* 260, 219-222.
- Zardi, L., Carnemolla, B., Siri, A., Petersen, T.E., Paoletta, G., Sebastio, G., Baralle, F.E. (1987). Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J.* 6, 2337-2342.
- Zhang, G., Taneja, K., Singer, R.H., Green, M.R. (1994). Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.
- Zuo, P., Manley, J.L. (1993). Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* 12, 4727-4737.

5

,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
(