

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



**Rol de la RNA polimerasa II en la regulación del  
*splicing* alternativo de genes eucariotas.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Ciencias Biológicas

**Manuel de la Mata**

**Director de tesis: Alberto R. Kornblihtt**

Lugar de Trabajo:

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular

IFIBYNE-CONICET

Buenos Aires, 2006

## **Rol de la RNA polimerasa II en la regulación del *splicing* alternativo de genes eucariotas.**

La transcripción y el procesamiento del mRNA ocurren coordinadamente en la célula. La RNA polimerasa II (pol II) se halla en el centro de este acoplamiento y puede dirigir tanto la síntesis de mensajeros como su procesamiento simultáneo. En esta tesis se estudiaron dos modos generales de regulación del *splicing* alternativo en los cuales la pol II juega un papel central. Demostramos que una mutante lenta de pol II afecta el *splicing* alternativo tanto de genes transfectados transitoriamente como de genes endógenos. Esto constituye una prueba directa del control de la elongación sobre el *splicing* alternativo *in vivo*. Por otro lado se encontró que el dominio carboxilo terminal (CTD) de la pol II regula el *splicing* alternativo del exón EDI de la fibronectina. Se demostró que el CTD es necesario para que una proteína de la familia SR, SRp20, ejerza su acción negativa sobre la inclusión de EDI, mientras que la acción estimulante sobre la inclusión de EDI de otra proteína SR, SF2/ASF, es independiente del CTD. Esto sugiere que el CTD actúa reclutando a SRp20 y no a SF2/ASF a la proximidad de EDI, llevando a la exclusión del mismo. Se sabe que la fosforilación del CTD controla la elongación de la pol II. Sin embargo, el efecto inhibitorio de SRp20 persiste cuando la elongación se encuentra reducida en presencia de la pol II lenta o por la droga DRB. Estos resultados sugieren que la elongación y el reclutamiento de factores de *splicing* contribuyen independientemente al control transcripcional del *splicing* alternativo.

## **Role of RNA polymerase II in the regulation of alternative splicing in eukaryotes**

Transcription and mRNA processing occur in a highly coordinated manner within the cell. RNA polymerase II (pol II) lies in the center of this coupling and is capable of carrying both the synthesis of mRNAs and their simultaneous processing. In this Thesis we studied two general modes of alternative splicing regulation where pol II plays a central role. We demonstrate that a slow pol II mutant affects alternative splicing of both transiently transfected minigenes and endogenous genes. These results provide a direct proof for the elongation control of alternative splicing *in vivo*. Additionally, we found that the carboxy-terminal domain (CTD) of pol II regulates the alternative splicing of fibronectin EDI exon. We found that the CTD is required for the inhibitory action of the SR protein SRp20 on the inclusion of EDI into the mature mRNA, whereas SR protein SF2/ASF stimulates EDI inclusion in a CTD-independent manner. This suggests that the CTD acts by recruiting SRp20 but not SF2/ASF to the vicinity of EDI leading to exon skipping. CTD phosphorylation controls transcription elongation which is a major contributor to alternative splicing regulation. However, the SRp20 effect is still observed when transcription elongation is reduced by the slow pol II or DRB. These results suggest that elongation and splicing factor recruitment contribute independently to the transcriptional control of alternative splicing.

## **Agradecimientos**

Si existiera una forma ideal de justificar una tesis, para mí sería expresando quiénes fueron los verdaderos autores. No solo quienes pensaron en qué estudiar, por qué estudiarlo, cómo estudiarlo, dónde, con qué recursos, sino quienes involucraron partes de sí, y que son para mí las más valiosas contribuciones. Ellos son quienes verdaderamente me impulsaron a empezar, a seguir adelante aun en condiciones adversas y a terminar esta etapa particular de mi vida. Esta es la parte que más me va a costar de toda la tesis, porque con las palabras no me va a alcanzar e inevitablemente me voy a quedar corto. Quizás debería usar gestos, sonidos, besos, abrazos, expresiones y otras cosas para las cuales ni siquiera tengo palabras. Pero dado que la palabra es lo único que tengo a mano en este pequeño espacio, voy a hacer con ellas mi mejor esfuerzo. Lamentablemente nuestra escritura me obliga a establecer un orden, que de lo contrario felizmente violaría escribiendo prácticamente todo solapado, porque todos a su manera merecerían estar en primer lugar.

Dicho esto, mis agradecimientos son así:

- A Alberto, para quién seguramente podría dedicar todo un capítulo de agradecimientos, mezclando mi admiración, respeto y cariño inagotables, que sin obligación ni vergüenza puedo feliz y abiertamente expresar en el mismísimo primer lugar de esta lista. Porque desde el primer día que llegué perdido al laboratorio me depositaste tu confianza plena, me enseñaste sin apabullarme, fuiste generoso con tu tiempo, me permitiste viajar a congresos y cursos, me escuchaste y me diste espacio para sentirme a mis anchas en el laboratorio. Sin dudas, si en algún momento dejo el lab, voy a extrañar tener un jefe así.

A dos personas del laboratorio que, de no ser por el dicho, podrían tranquilamente ser mis madres:

- A Vale, porque si tuviera la opción de elegir el orden entre los autores de mi tesis, te pondría en primer lugar, o al menos con un asterisco (pero igual en el primer lugar). Sobre todo porque probablemente ni siquiera seas del todo consciente de lo que vale tu ayuda, y el cariño, y la paz, y la paciencia que derramás por el lab. Vales mucho Vale.
- A AnaBella, una madre full time, que practica tanto sus cariños como sus retos en el lab, por la cuota gigante de orden que nos das aunque no te hagamos caso. Como buena madre, si insistís seguro nos vas a sacar buenos.

Lo que sigue es para los chicos (cada vez menos chicos) del lab en general:

- A todos por la paciencia, particularmente en horas puntuales de la vida cotidiana como el almuerzo, o momentos en los que se requiere de cierta cohesión principalmente temporal. En otras palabras, por aguantarme las innumerables

veces que les decía cosas como el típico “vayan yendo”, o “ya voy” que en la práctica nunca o muy pobremente se concretaban. Por aguantar mi permanente piloto automático del que eventualmente salgo, completamente perdido, para decir o hacer algo que ya fue dicho o hecho y de lo que, peor aún, ya había supuestamente dado cuenta. Eso en si mismo ya dice mucho de ustedes.

En particular a mis compañeros que actualmente están en el lab, y más o menos en orden de llegada al LFBM:

- A Juan, porque debés ser probablemente la persona con quien más compartí desde que llegué al lab, y paradójicamente quizás con el menor número de palabras totales. Es decir una de mis formas de compartir favoritas. Por ser una fuente permanente de ideas que me ayudaron tantísimo durante la tesis. Por el tremendo caos organizado que sos capaz de imponer en tan poco espacio, fiel discípulo de quien más adelante hablaré.
- Al Querubín, alias Mati, por ser unas de esas personas capaces de generarme tres millones de sensaciones distintas por segundo, querer matarte y abrazarte en el transcurso de una misma oración, es para mi cosa de todos los días. Pero hay dos cosas que en mi no podés lograr, una es dejar de ser querible, y la otra es dejar de ser Queru, aunque asintóticamente vayas acercándote a ser tan viejo como yo. Gracias por llenarme de teorías, doctrinas, mails (que mucho leí), reuniones (a las que muy poco fui), y amistad de la buena que aunque te cueste creer, estará ahí independientemente de lo que hagamos para mantenerla.
- A Fede, el que sigue en orden de péndex, porque detrás de sus exabruptos se esconde el más tierno de los seres de esta tierra, y que tan bien disimula. Gracias por las charlas, por las discusiones desinteresadas, por la barbita, por tu ayuda valiosísima, y por hacer del lab un lugar más divertido para trabajar, aun dentro esas cuatro paredes insólitas.
- A Manolet, tocayo, increíble energía del lab, por aceptarme así nomás como vengo. Por tu sentido del humor y por darme alegría con tu música sin finde, cada finde. Por todas esas charlas empezadas y muy pocas veces terminadas, casi siempre debido a mi notable dificultad de hablar, y a tu notable capacidad de esperar hasta la próxima. Gracias por tu notable amistad y por tu notable afinidad por la palabra notable.
- A Petry, aunque yo prefiero Perti, o simplemente gordo, aunque ya seas flaco. Hasta este punto el más péndex de todos. Y quizás también el más mimoso, pero como sos tan chiquito así está bien. Por tantas charlas en las que juntos, no llegamos a hacer ni  $\frac{1}{4}$ . Por entenderme tanto, pero tanto, y en esas condiciones escucharme incansablemente. En fin, más que agradecerle, a vos debería abrazarte.
- A Marian, Mary Anne o más conocido como Pingüino. Por aguantar mi forma particular de expresarte el cariño; lamentablemente no siento una mejor que a través de múltiples gastadas todas juntas y sostenidas en el tiempo. Pero sabé que es la forma que me sale natural, cualquier otra no sería genuina. Gracias por

tus ideas, que son muchas y buenas, por tu buena predisposición permanente y por los mensajes de tus tatuajes (no lo puedo evitar, perdón).

- A Nacho, por tus comentarios y aportes siempre llenos de cordura aunque a veces vengan cargados de bravura. Pero como ya te conozco un poco más, no concibo a un Nacho distinto y así lo prefiero. Gracias por compartir las sesiones de fotos de tus viajes y hacer caso omiso a mi refractaria capacidad de retener cualquier comentario acerca de ellas.
- A Paula, por hablarme, hablarme, hablarme, que al fin de cuentas me dejó cosas buenas. Pero eso vino después. En realidad mucho antes, cuando te estabas yendo de posdoc y aun no te conocía, las cosas ordenaditas que dejaste en tus cajones y carpetas fueron la fuente de gran parte de los resultados de esta tesis. Además tu propia tesis fue lo primero que leí del grupo antes de venir al lab, y tuvo mucho que ver con que me motivara el tema. Por todo eso, muchas gracias.
- A los más chiquitos y recientemente llegados, Rosco, Lean, Sole, Flor, por inyectar frescura al lab y estimular los ánimos que a veces suelen bajar con tanto pipeteo.

A mis compañeros del lab que ya se han ido de cuerpo pero que siguen presentes de alma:

- A Dami (Refo), mezcla de amigo y psicólogo, por tirarme una incontable cantidad de sogas en momentos críticos desde que llegué a Bs As. Parece mentira que alguien que parezca tan loco sea a la vez tan cuerdo. Con vos tranquilamente podríamos reeditar un elogio a la locura sin necesidad de citar otros ejemplos. Gracias Dami por tanta alegría surgida de vaya a saber dónde, en momentos y situaciones en las cuales ése parecía ser el último sentimiento concebible.
- A Sebas, alias la Morsa, por salvar mi tesis y al mismo tiempo asfixiarla reiteradas veces durante mi doctorado. Como una bestia que pretende cuidar a su cría y por poco logra ahogarla, tu aporte fue no menos que esencial en varios puntos de mi doctorado. Por suerte no lograste asfixiarla lo suficiente, de modo que lo que quedó fueron sólo tus buenas intenciones.
- A Hoch, niño mimado y malcriado de la vida que supo de todos modos conquistarme con sus cargadas, sus chistes y sus puntos de vista tan particulares de la vida. Gracias gordo por darme tantas ganas de matarte y tantas más razones para quererte al mismo tiempo.
- A Guada, por mantener esa niña dentro tuyo que además de caprichos tiene muchos buenos sentimientos. Gracias por enseñarme todo lo que inicialmente aprendí cuando entré al lab, desde las buenas prácticas hasta algún que otro vicio no menos imprescindible para sobrevivir en un laboratorio nuevo.

A más compañeros del LFBM:

- A los Cosos: Tami, Sol, Sergio, y otros que ya no están, por hacer del Sur el lugar más pacífico del LFBM.
- A Anita (Lieberman), por ser alguien que inevitablemente uno quiere más allá de todo. Y sí Anita, como ya te dije, para mí más que importante sos valiosa.
- A Chiche, Damiana, Damián Bello, Juan, y los que ya no están como Damián Kovalovsky y Carolina Pérez Castro del grupo de Eduardo Arzt con quienes compartí todo este tiempo en el LFBM.
- A los chicos Iusem, Nico, Gus, Mariano y Laura.
- A los Uchiteles, increíble fuente de becarios e investigadores a quienes uno no termina de conocer bien antes de que el próximo sea incorporado. Gracias Sil y de Petris, con quienes quizás más compartí en estos años.
- Y al grupo Szczupak, Mario, María Ana, Sergio. Gracias Berni por no faltar a ningún asado.

A todos los jefes del LFBM que de una u otra manera me ayudaron a lo largo de mi tesis:

- A Archie, por el orden increíble que es capaz de generar en el LFBM y por sus autógrafos en momentos claves de la burocracia que implica un doctorado. Gracias también por dejarnos escuchar música, aunque no tan fuerte!, y hacer así más llevadera nuestra vida en el lab.
- A Omar, por su ayuda en el día a día del trabajo en el lab, por sus charlas pausadas y por esa remerita color salmón que tantas alegrías me dio.
- A Lidia, por recordar perfectamente mi nombre que, aunque le llevó su tiempo, guardo como un lindo recuerdo entre los que me quedan del lab.
- A los jefes del LFBM en general por hacer de éste un lugar muy particular para trabajar. Por incentivar la investigación tan bastardeada en Argentina y lograr construir un lugar donde la buena investigación es posible a pesar de las inclemencias de nuestro país. Prometo de ahora en más hacer un esfuerzo para asistir con mayor frecuencia a los seminarios.

A otra gente de la FCEyN:

- A los chicos del grupo Pechi-Kordon. En particular gracias a Anita por tu simpatía sin límites, a Popi no se muy bien por qué pero debe ser porque me caés tan bien, a Albi por las tantas veces que nos has pedido algún que otro reactivo y por ese drive ángulo corto que vi y del cual debería aprender mucho.

- A Andrada por cuidar tanto al laboratorio como a nosotros mismos y por darnos tantos momentos felices con sus asados casi profesionales.
- A Ana Bondía, a esta altura algo así como la codirectora de mi tesis. Gracias por tu ayuda con todos los pasos burocráticos que al mismo tiempo que aprendo voy simultáneamente olvidando y no cumpliría sin tu ayuda.
- A Lionel Müller, con quién compartimos la tan recordada parri.

A nuestros colaboradores y asesores:

- A David Bentley, por su inigualable aporte tanto de materiales como de ideas, brillantes y a veces osadas, pero que en definitiva dieron cuerpo a muchos de los resultados de esta tesis.
- A Claudio Alonso, por su aporte en esta tesis a la hora de conseguir y manejar las mutantes de *Drosophila*, que de otro modo no hubiésemos sabido qué hacer más que aplastarlas con un matamoscas.
- A Andrés Muro, por iniciar los primeros experimentos sistemáticos con la mutante C4, por proveernos de materiales y de paz a la distancia.
- A Rob Chapman, chamán de la ciencia, que vino hacia nosotros y no paró de desmitificar leyendas hasta convencernos de que ciertas cosas que veíamos no eran tales. Su aporte fue clave para interpretar y orientar muchos de nuestras posteriores investigaciones.
- A Edouard Bertrand por contribuir con sus experimentos de FRAP que definitivamente ahuyentaron nuestros fantasmas acerca de la validez de algunos de nuestros resultados.

A todos mis docentes y compañeros de la Facultad de Ciencias Químicas de Córdoba:

- A Pablo Iribarren y Clelia Riera, mis primeros jefes durante la tesis de licenciatura que en definitiva fueron quienes me introdujeron en el mundo de la investigación. Pablo gracias por tu paciencia, dedicación y amistad.
- A Alberto Rosa, por haberme orientado en el campo de la biología molecular y que en definitiva fue central para que terminara haciendo mi doctorado en este tema.
- A Diego Folco, gran exponente cordobés con quién compartí muchos momentos de alegría en el Instituto Ferreyra.
- A Vale K., gracias por tanta paciencia y ayuda en momentos críticos como pudo haber sido largar una library y un clonado y varias PCRs, pero no sin antes hacer un Southern y una maxi prep todo junto sin nunca haber hecho nada de eso antes.



- A Ceci Conde, quién mejor embajadora cordobesa para darme alegrías con tu cantito. Primero docente y después mi compañera de laboratorio, gracias por ayudarme en mis primeros pasos con la pipeta.
- A todos mis compañeros de laboratorio (en Bioquímica Clínica y el Ferreira) cuando recién empezaba a pipetear, Silvia Correa, Ceci Rodríguez, Claudia Sotomayor, Gabriel Rabinovich, Georgina, Ile y tantos otros que inevitablemente me estaré olvidando pero que siempre tengo presentes.
- A Juan Cruz, por aguantarme durante mis primeros meses en Bs As.
- A Mariano Tissone, por los momentos compartidos en la primera parte de mi doctorado.

Al CONICET por otorgarme la beca que, aunque a veces magra, me alcanzó para llegar hasta este punto de la carrera.

A mi familia:

- A mi padres, porque cada vez soy más consciente de que no soy sino lo que ustedes me enseñaron y dieron. Incluyendo tus ideales Oli, y tus vuelos por R2landia papá, con los que tantas veces me identifico. Pero sobre todo porque me lo dieron envuelto con ese amor incondicional que hace que las cosas lleguen para quedarse ahí. Gracias por ser mi ejemplo, por nunca dejar de motivarme, apoyarme, alentarme, no importa la circunstancia ni el momento de la vida. Si tuviera que dar un buen ejemplo de padres no se me ocurre otro mejor que el de ustedes. Pero casi tanto como los quiero, también los admiro. Por lo que han logrado desde una ciudad chica como Santa Rosa, con sus recursos limitados y tiempos alargados. Ustedes, prácticamente solos, lograron cosas para mí increíbles y son mi mayor fuente de inspiración.
- A mis hermanos, para mí, hermanitos Dolo y Javi. Por ser mucho más que hermanos. Se siente muy bien poder tener de hermanos a amigos, es decir mucho más que cualquiera de las dos cosas por separado. La única diferencia es que siendo mis hermanos menores, a veces me cuesta verlos como grandes aunque en la práctica sean inclusive más grandes que yo. Doli, que encima de todo figurás entre mis ídolos a base de inteligencia y esfuerzo notables. Ja, que aunque quisieras darme más alegría de la que me das, ya llegaste a un límite.
- A mis tías y abuelo, Marta, Mari y abuelo (no puedo cambiar abuelo por tu nombre real). Por ser mis segundos padres, por darme todo sin pedir nada a cambio, por estar siempre presentes y por preocuparse (y ocuparse) a niveles pocas veces visto en quienes no son padres directos. Mari, mi tía menor predilecta y Marta, mi madrina predilecta. Y el Muñe, un sentimiento en forma de abuelo.

- A mi abuela María Teresa (como a ella le gusta, con nombre completo). Por ser como una extensión de mi madre. Para mí sos un ejemplo de fortaleza increíble y energía inagotable, juventud que parece no tener límites. Gracias por todo lo que me diste aun a larga distancia, muestra de tu cariño y espíritu maternal. Sos para mí una abuela con todas las letras.
- A mi tía Riti, artista exclusiva de la familia. Gracias por tus canciones, tus poemas, tus charlas. Siempre me alegran un poco más la vida.
- A mis primos y tío Willy: Nico, que a base de momentos compartidos y varias peleas supimos construir una amistad independiente de nuestra condición de primos. Caro, silenciosa y creativa en extremo. Pancho, mi máximo ídolo tenístico aunque debo reconocer después de Federer, pero más que él en conjunto.
- A mis tíos pseudo españoles, Mar y Juan, porque la distancia no impide y tal vez refuerza los sentimientos desde lo lejos.

A toda la gente que me ha acompañado a lo largo de estos años compartiendo cosas por el camino sólo por el placer de compartir y sin pedir nada a cambio. A amigos con los cuales pasé quizás los más felices momentos de mi vida durante mi carrera en Córdoba: Guille, Marian y Pachi Turner; Agus Rodríguez; Ariel Reta; Reinaldo; Nico; y muchos otros. A Mauri Santos, mi referente en Santa Rosa a quién no dudo en contar cualquier cosa y pedir cualquier consejo. A Ted Noakes, fiel canadiense y argentino empedernido por adopción que, siendo uno de los que más lejos está, más cerca se siente. A mis compañeros de toda la vida que aunque el tiempo y espacio separe nunca se alejarán lo suficiente.

A Nuria, mi niña, porque estar en el último lugar de esta lista significa quizás que es el más importante de todos los agradecimientos. O más que un agradecimiento es en realidad una dedicatoria. Porque un agradecimiento no me alcanza para decir todo lo que te quiero, que es con alma y vida, y que no importa lo que pase vas a estar ahí presente por el resto de mi vida.

*a Nuria*

*Nadie necesita ir a ninguna otra parte. Todos estamos ya allí, lo sepamos o no.*

*El viejo Rajá  
Aldous Huxley*

*Todos los caminos son lo mismo: no llevan a ninguna parte. Son caminos que van por el matorral. Puedo decir que en mi propia vida he recorrido caminos largos, largos, pero no estoy en ninguna parte. Ahora tiene sentido la pregunta de mi benefactor. ¿Tiene corazón este camino? Si tiene, el camino es bueno; si no, de nada sirve. Ningún camino lleva a ninguna parte, pero uno tiene corazón y el otro no. Uno hace gozoso el viaje; mientras lo sigas, eres uno con él. El otro te hará maldecir tu vida. Uno te hace fuerte; el otro te debilita.*

*Don Juan Matus  
Carlos Castaneda*

## Publicaciones

### Trabajos originales

de la Mata M., Kornblihtt A.R. (2006) RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(11):973-980

Comentado en: Lynch K.W. (2006) Cotranscriptional splicing regulation: it's not just about speed. *Nat Struct Mol Biol.* 13(11):952-3.

de la Mata M., Alonso C.R., Kadener S., Fededa J.P., Blaustein M., Pelisch F., Cramer P., Bentley D. y Kornblihtt A.R. (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol. Cell* 12(2): 525-532.

Comentado en: Proudfoot NJ (2003) Dawdling polymerases allow introns time to splice. *Nat Struct Biol* 10(11): 876-878.

Kadener S, Cramer P, Nogués G, Cazalla D, de la Mata M., Fededa J.P., Webajh S.E., Srebrow A., y Kornblihtt A.R. (2001) Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J.* 20(20): 5759-5768.

### Trabajos en colaboración

Portal D, Espinosa JM, Lobo GS, Kadener S, Pereira CA, de la Mata M., Tang Z, Lin RJ, Kornblihtt AR, Baralle FE, Flawia MM, Torres HN. (2003) An early ancestor in the evolution of splicing: a *Trypanosoma cruzi* serine-arginine-rich protein (TcSR) is functional in cis-splicing. *Mol Biochem Parasitol* 127(1): 37-46.

### Revisiones

Kornblihtt AR, de la Mata M., Fededa JP, Munoz MJ, Nogués G (2004) Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10(10): 1489-1498.

Nogués G, Kadener S, Cramer P, de la Mata M., Fededa J.P., Blaustein M., Srebrow A., y Kornblihtt A.R. (2003) Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life* 55(4-5): 235-241.

Cramer P., Srebrow A., Kadener S., Werbajh S., de la Mata M., Melen G., Nogués G., Kornblihtt A.R. (2001) Coordination between transcription and pre-mRNA processing. FEBS Lett. 498(2-3): 179-182.

## Abreviaturas

$\alpha$ -am:  $\alpha$ -amanitina

$\beta$ -gal:  $\beta$ -galactosidasa

BP: *branch point* o punto de ramificación

c.p.m.: cuentas por minuto

CTD: dominio carboxilo-terminal de la RNA polimerasa II

DRB: 5,6-dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosilbencimidazol, inhibidor de la elongación

ESE: *enhancer* de *splicing* exónico

ESS: *silencer* de *splicing* exónico

FN: fibronectina

hnRNP: ribonucleoproteína nuclear heterogénea

ISE: *enhancer* de *splicing* intrónico

ISS: *silencer* de *splicing* intrónico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero maduro

pb: pares de bases

PIC: complejo de preiniciación

Pol II: RNA polimerasa II

Py: trecho de polipirimidinas

pre-mRNA: ácido ribonucleico mensajero inmaduro (no procesado)

snRNA: RNA nuclear pequeño

RNP: ribonucleoproteína

RPA: ensayo de protección a la RNasa

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

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

Tet: tetraciclina

Ubx: *Ultrabitórax*

WT: *wild-type*, salvaje

## Índice

Introducción	1
1. Transcripción	2
2. Transcripción por la pol II	4
2.1 El ciclo de la transcripción	4
2.2 Acerca de la importancia de la elongación transcripcional	7
2.3 Etapas en la elongación	7
2.4 Arrestos y pausas transcripcionales	9
2.5 Factores de elongación	11
2.6 Regulación de la elongación por la cromatina	12
2.7 Elongación versus procesividad. Distintos conceptos	14
2.8 El CTD de la RNA polimerasa II	16
2.8.1 Modificaciones de CTD	17
2.8.2 El ciclo de fosforilación del CTD durante la transcripción	18
3. Procesamiento del mRNA	21
3.1 <i>Splicing</i>	22
3.2 Arquitectura exón/intrón	24
3.3 <i>Splicing</i> alternativo	27
3.4 Proteínas regulatorias del <i>splicing</i>	29
4. Acoplamiento entre transcripción y procesamiento del pre-mRNA	32
4.1 Acoplamiento transcripción- <i>splicing</i>	33
4.2 Modelo de reclutamiento de factores de <i>splicing</i> por la pol II	35
4.2.1 CTD y acoplamiento	35
4.2.2 Factores involucrados en el acoplamiento	38
4.2.3 Promotores y acoplamiento	39
4.3 Modelo cinético de regulación del <i>splicing</i> alternativo	40
5. Fibronectina como gen modelo	42
Objetivos	46
Resultados	47
Capítulo I. Una mutante lenta de la RNA polimerasa II afecta el <i>splicing</i> alternativo <i>in vivo</i>	47
Una mutante lenta de pol II como herramienta estudiar el acoplamiento	48
Determinación de la velocidad de elongación en tiempo real	52
La mutante lenta aumenta la inclusión de EDI	54
La pol II lenta favorece la utilización del sitio 5' distal en el <i>splicing</i> del adenovirus E1A	54
Efecto dosis respuesta la mutante lenta e independencia con la síntesis de proteínas	56
Efectos de la pol II lenta y del regulador de <i>splicing</i> SF2/ASF	56
El <i>resplicing</i> del pre-mRNA de <i>Ubx</i> es estimulado en embriones C4 de <i>Drosophila</i>	59
Transfecciones estables de la mutante lenta	61



Capítulo II. El dominio carboxilo terminal de la pol II es requerido para la regulación del <i>splicing</i> alternativo mediado por SRp20	63
La ausencia del CTD aumenta la inclusión del exón EDI	65
Un sistema inducible para estudiar la pol II $\Delta$ CTD	67
La pol II $\Delta$ CTD también afecta el <i>splicing</i> alternativo de EDI con el minigén inducible	69
El efecto de la pol II $\Delta$ CTD sobre el <i>splicing</i> alternativo no es consecuencia de una inhibición global del procesamiento del pre-mRNA	70
Ambas mitades del CTD son igualmente efectivas para revertir el efecto de la pol II $\Delta$ CTD sobre la inclusión de EDI	72
Un tamaño mínimo del CTD es requerido para el <i>splicing</i> normal de EDI	74
El CTD es requerido para la inhibición de SRp20 sobre el <i>splicing</i> de EDI	77
El requerimiento del CTD para el efecto inhibitorio de SRp20 sobre el <i>splicing</i> de EDI no se debe a una reducción en la elongación	79
El efecto del CTD sobre el <i>splicing</i> de EDI puede ser atribuido completamente a SRp20 y no depende del promotor que dirige la transcripción	79
El requerimiento del CTD para el efecto inhibitorio de SRp20 también se observa en condiciones de baja inclusión de EDI	81
La interacción entre SRp20 y el CTD no es directa	82
Otros casos de <i>splicing</i> alternativo. Efectos diferenciales de la pol II $\Delta$ CTD y de la mutante lenta hC4	84
<b>Discusión</b>	<b>87</b>
Modelo cinético de regulación del <i>splicing</i> alternativo	87
Una polimerasa lenta como modelo	88
Efectos de la mutante lenta sobre el <i>splicing</i> alternativo de exones cassette	90
Efectos de la mutante lenta sobre el <i>splicing</i> alternativo de E1A	93
Efectos de la mutante lenta sobre el <i>resplicing</i> de <i>Ubx</i> de <i>Drosophila</i>	96
Distintos modos de <i>splicing</i> alternativo, distintas respuestas a la mutante lenta	99
Modelo de reclutamiento en la regulación del <i>splicing</i> alternativo	100
Una mutante de pol II sin CTD	100
Un minigén inducible para el estudio del <i>splicing</i> alternativo de EDI	101
Se trata de la cantidad y no de la calidad de héptadas en el CTD	102
El CTD podría reclutar SRp20 al spliceosoma	103
No se trata sólo de la velocidad de elongación	104
Otros efectos diferenciales de la pol II $\Delta$ CTD y la mutante lenta	105
Conclusiones generales	106
Perspectivas y direcciones futuras	109
<b>Conclusiones</b>	<b>112</b>
Capítulo 1.	
Una mutante lenta de RNA polimerasa II afecta el <i>splicing</i> alternativo <i>in vivo</i>	112
Capítulo 2.	
El dominio carboxilo terminal de la pol II es requerido para la regulación del <i>splicing</i> alternativo mediado por SRp20.	112
Conclusiones generales	113

---

<b>Materiales y Métodos</b>	<b>115</b>
1. Plásmidos	115
1.1. Minigenes reporteros de <i>splicing</i> alternativo	115
1.2. Transactivadores controlados por tetraciclina	116
1.3. Vectores de expresión de pol II	116
1.4. Vectores de expresión de proteínas SR	117
2. Transformación bacteriana, minipreps, maxipreps	117
2.1. Transformación de bacterias	117
2.2. Preparación de plásmidos a pequeña escala (minipreps)	117
2.3. Preparación de plásmidos a gran escala (maxipreps)	117
2.3.1. Por columna (Qiagen)	117
2.3.2. Por gradiente de cloruro de cesio	118
2.3.3. Cuantificación de los plásmidos	118
3. Líneas celulares	118
3.1. Mantenimiento de las líneas celulares	118
3.2. Células Hep3B	119
3.3. Transfecciones	119
3.4. siRNAs	120
3.5. Tratamientos	120
3.6. Ensayo de actividad de $\beta$ -galactosidasa	121
4. Análisis de RNA	121
4.1. Preparación de RNA	121
4.2 RT-PCR	123
4.3. Observación y cuantificación de productos de PCR radiactiva	124
4.4. Ensayos de <i>splicing</i> alternativo de otros genes	125
4.5. Reacciones de RT-PCR real time	125
4.5.1. Ensayo de procesividad de la pol II	125
4.5.2. Medición del <i>splicing</i> constitutivo	126
4.6. Obtención de mRNAs con Cap y cola de PoliA	126
4.7. Ensayo de protección a la RNasa (RPA)	126
5. Anticuerpos	129
6. Stocks de <i>Drosophila</i>	129
<b>Bibliografía</b>	<b>130</b>

---

## Introducción

Entre los organismos vivos, los metazoos presentan un amplio espectro de complejidad funcional y comportamental. Esto fue probablemente el resultado de un aumento en el número de componentes que los constituyen y de las complejas relaciones entre los mismos. Entre estos componentes, las proteínas son quizás las principales responsables de alcanzar esta complejidad debido a su versatilidad funcional. El proteoma, o conjunto de proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo, pudo haber aumentado su complejidad durante la evolución a través de un aumento en el número de genes y/o a través de mecanismos que permitieron aumentar su diversidad.

La reciente secuenciación de genomas eucariotas completos ha generado importantes interrogantes acerca de la naturaleza de la complejidad genómica. Las predicciones iniciales indicaban que el genoma humano estaría compuesto por un número de genes (estimado en unos 150.000) mucho mayor que el de organismos menos complejos como *Drosophila* (14.000 genes) y *Caenorhabditis elegans* (19.000). El hallazgo de que el genoma humano consta de aproximadamente 25.000 genes (1998; Adams et al. 2000; 2004), apenas unas dos a tres veces más que en *Drosophila*, fue realmente sorprendente, e indicó que la principal fuente de diversidad responsable de la mayor complejidad en vertebrados reside en cómo esa información es procesada y no tanto en el número total de genes (Modrek y Lee 2002).

Los genes de eucariotas que codifican proteínas son muy complejos, su expresión implica varios pasos y requiere de la acción concertada de distintas maquinarias que se hallan altamente coordinadas dentro del núcleo celular. Los pasos íntimamente ligados a la expresión de genes involucran la síntesis del RNA mensajero (mRNA) por la RNA polimerasa II (pol II) en el proceso de transcripción, modificación en el extremo 5' del gen con la adición del *Cap* (*capping*), la eliminación de regiones no codificantes o intrones y el empalme de los exones (*splicing*), modificación de bases A por I (edición o *editing*), y la modificación del extremo 3' con el corte en el extremo transcrito y la adición de una cola de poliadeninas (corte y poliadenilación). Aunque estos pasos requieren de un gasto considerable de energía, permiten que los organismos más complejos expresen mayor diversidad de proteínas a partir de un número limitado de genes. Esto es posible porque la información contenida en los

genes puede ser expandida a través del inicio alternativo de la transcripción desde múltiples sitios (Quelle et al. 1995), *splicing* alternativo (Black 2000; Goldstrohm et al. 2001; Graveley 2001; Cáceres y Kornblihtt 2002), poliadenilación alternativa (Gautheret et al. 1998) y edición alternativo (Ochsenreiter y Hajduk 2006). Entre estos mecanismos, el *splicing* alternativo es considerado la mayor fuente de diversidad de proteínas en vertebrados (Black 2000; Graveley 2001; Maniatis y Tasic 2002).

Junto con los mecanismos que expanden la información del genoma, una compleja red regulatoria ha también evolucionado para controlar la expresión de esta virtualmente ilimitada fuente de información. Como se discute más adelante, todos los pasos en la expresión de genes ocurren en íntimo contacto en el núcleo celular y se afectan mutuamente, posibilitando la regulación de cada uno a múltiples niveles (Maniatis y Reed 2002; Proudfoot et al. 2002; Kornblihtt et al. 2004).

## 1. Transcripción

La regulación de la expresión génica es una de las áreas más estudiadas en ciencia, ya que su correcto funcionamiento es esencial para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de los organismos vivos. La expresión génica diferencial en organismos multicelulares es una pieza fundamental en la determinación de especificidad de los distintos tipos celulares, y la desregulación de los patrones apropiados de expresión puede afectar profundamente la función celular y ser causa de diversas enfermedades. Si bien existen muchos procesos que controlan la expresión génica, la regulación más directa, o quizás la más estudiada, es la que ocurre a nivel de la transcripción.

La transcripción en la célula es realizada por maquinarias enzimáticas específicas, las RNA polimerasas, que junto con factores denominados factores generales de la transcripción, llevan a cabo la síntesis de RNA a partir de DNA que actúa como molde. Los factores generales de la transcripción están involucrados en el reconocimiento del promotor, la respuesta a factores regulatorios y a cambios conformacionales esenciales para la actividad de las RNA polimerasas (Hahn 2004).

Avances realizados durante las últimas dos décadas han revelado las estructuras de las RNA polimerasas bacteriana y eucariota, varios de los factores generales de la

transcripción y más recientemente estructuras de la RNA polimerasa II (pol II) interaccionando con factores generales de la transcripción (Woychik y Hampsey 2002; Hahn 2004). Junto con estudios genéticos y bioquímicos, estas estructuras proveen una importante información sobre el mecanismo de la maquinaria transcripcional, la naturaleza dinámica de las interacciones proteína-proteína, proteína-RNA y proteína-DNA involucradas, y el mecanismo de la regulación transcripcional.

Aunque la maquinaria transcripcional de eucariotas es mucho más compleja que la de procariotas o arqueas, los principios generales de la transcripción y su regulación están conservados. Las bacterias y arqueas poseen sólo una RNA polimerasa, mientras que las células eucariotas poseen cuatro RNA polimerasas nucleares diferentes, tres de las cuales (RNA polimerasa I a III) han sido descritas en décadas anteriores (Lewin 2004) y una de ellas, de origen mitocondrial (spRNAP-IV), fue descubierta recientemente (Kravchenko et al. 2005). Las distintas RNA polimerasas inician la transcripción desde secuencias características en el DNA y participan en la síntesis de distintas clases de RNA. La RNA pol I transcribe los genes de los precursores 28S, 18S, y 5.8S del RNA ribosomal (rRNA), y es posiblemente la RNA pol más activa. La pol II transcribe los RNA mensajeros (mRNAs) de genes que codifican proteínas y algunos RNAs nucleares pequeños (snRNAs) involucrados en procesos como el *splicing* (ver más adelante). La pol III transcribe los RNAs 5S ribosomales y los RNAs de transferencia (tRNAs). Por último, la spRNAP-IV transcribe algunos mRNAs (Kravchenko et al. 2005). Las RNA polimerasas nucleares I-III tienen cinco subunidades en común, y las restantes muestran una gran similitud entre las polimerasas de eucariotas y de arqueas (Hahn 2004). Aunque las polimerasas eucariotas I-III están compuestas por un mayor número de subunidades que la polimerasa de bacterias, las subunidades que componen la mayor parte de la pol II son homólogas de las subunidades de todas las RNA polimerasas celulares en general, lo cual sugiere que estas enzimas poseen la misma estructura y mecanismos básicos conservados (Ebright 2000). En bacterias, la subunidad  $\sigma$  es el único factor relacionado a un factor de transcripción.  $\sigma$  Reconoce secuencias en el promotor, promueve cambios conformacionales en el complejo polimerasa-DNA en la iniciación e interactúa directamente con algunos activadores transcripcionales. En eucariotas, la función del factor  $\sigma$  ha sido reemplazada por un conjunto mucho más grande de

polipéptidos, y cada clase de RNA pol está asociada a un grupo determinado de factores generales de transcripción (Lee y Young 2000; Schramm y Hernandez 2002; Grummt 2003). La maquinaria transcripcional de la pol II es la más compleja y consiste en aproximadamente 60 polipéptidos, algunos de los cuales son necesarios para la transcripción por las otras RNA pol nucleares. Esto es consistente con el hecho de que, como se verá más adelante, la pol II es la encargada de sintetizar mRNAs que son blancos de un procesamiento posterior exhaustivo del cual la misma pol II es partícipe. La biogénesis de los mRNAs presenta esta característica única que es posible debido a propiedades particulares de la pol II y que constituyen el objeto de estudio en esta tesis.

## **2. Transcripción por la pol II**

La pol II lleva a cabo la síntesis de todos los mRNAs en eucariotas. Comprende 12 subunidades con una masa total de más de 500 kDa. La mayor contribución a la resolución de la estructura de la pol II fue realizada en el laboratorio de Roger D. Kornberg (Cramer et al. 2001; Gnatt et al. 2001) lo cual le ha valido recientemente la obtención del premio Nóbel de Química 2006.

Prácticamente todas las subunidades de la pol II tienen homólogos en las RNA polimerasas I y III. Sin embargo, la pol II posee en su subunidad mayor (RPB1) un dominio carboxilo terminal (CTD) que es único de esta polimerasa y que la distingue de las demás polimerasas. Como se verá más adelante, esta distinción no es casual, dado que este dominio le confiere a la pol II propiedades únicas tanto en la transcripción como en la maduración de los precursores de mRNAs (pre-mRNAs) que no se observan en las demás polimerasas conocidas.

### **2.1 El ciclo de la transcripción**

La generación de mRNAs maduros por la pol II involucra múltiples procesos, algunos de los cuales ocurren secuencialmente y otros en paralelo. Los distintos pasos de la transcripción de mensajeros constituyen el llamado ciclo de la transcripción, e

involucran la preiniciación, iniciación, elongación y terminación (Figura 1). Durante este ciclo la maquinaria transcripcional en general, y en particular la pol II, están sujetas a una serie de modificaciones y rearrreglos que implican modificaciones postraduccionales (siendo la fosforilación la más estudiada), ensamblaje y desensamblaje de complejos (secundarios y ternarios involucrando proteína, DNA y RNA) en disposiciones altamente dinámicas e intrincadas. La especificidad está dictada tanto por factores específicos como por la interacción combinatoria entre factores de transcripción y secuencias regulatorias en el genoma (Barrera y Ren 2006).

El ciclo de la transcripción comienza con el ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) sobre la región *core* o central del promotor (la mínima secuencia de DNA necesaria para especificar transcripción basal o no regulada). El PIC incluye a los factores generales de la transcripción (GTFs) que junto con la pol II y cofactores adicionales determinan la ubicación precisa del sitio de iniciación de la transcripción. En este estado, la pol II y los GTFs se encuentran unidos en forma estable al promotor resultando en una conformación inactiva para iniciar la transcripción. A partir de un marcado cambio conformacional en el cual 11-15 pares de bases (pb) del DNA sobre el sitio de inicio de la transcripción son desnaturalizados, la hebra de DNA que actúa como molde es posicionada dentro del sitio activo de la polimerasa dando lugar al

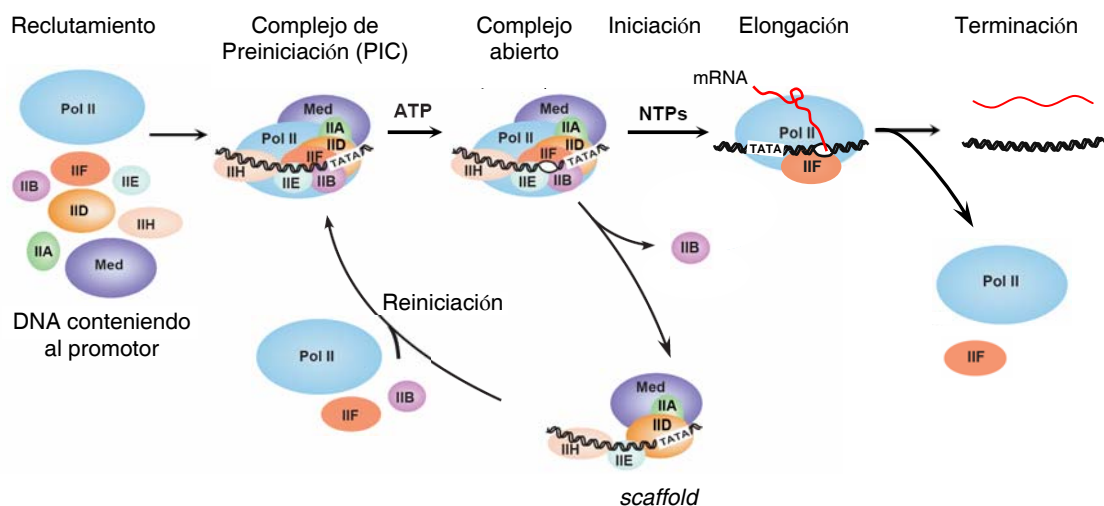


Figura 1. Ciclo de la transcripción. Extraído de Hahn 2004

complejo abierto o burbuja de transcripción (Wang et al. 1992). Este es un proceso dependiente de ATP y requiere de la acción de dos GTFs, IIE y IIH (Goodrich y Tjian 1994). La iniciación de la transcripción comienza con la formación del primer enlace fosfodiéster al adicionarse los primeros dos nucleósidos trifosfato (NTPs). La presencia de NTPs permiten a la polimerasa abandonar el promotor y sufrir la transición de iniciación a elongación en la cual el ATP es particularmente importante (Dvir et al. 1996). Esta transición está caracterizada por el estadio conocido como *clearence* del promotor, en el cual el PIC es parcialmente desmantelado y sólo algunos factores permanecen unidos al mismo. El complejo que permanece sobre el promotor es conocido como andamio o *scaffold* y es reciclado permitiendo la reiniciación de la transcripción. La reiniciación de la transcripción es un proceso mucho más rápido que la ronda inicial y es responsable de la mayor parte de la transcripción en la célula (Jiang y Gralla 1993; Orphanides y Reinberg 2000).

La regulación transcripcional a nivel de la iniciación es mediada por un complejo multienzimático conocido como Mediador. Este es un complejo de gran tamaño que interacciona con la pol II, en parte a través de su CTD, uniéndose a la forma no fosforilada de la misma (ver más abajo), y es necesario tanto para la actividad transcripcional basal como activada (Hahn 2004).

El paso final del ciclo es la terminación de la transcripción que requiere la disociación de la pol II del molde. Dos modelos alternativos, que no son necesariamente excluyentes, se han propuesto para explicar el mecanismo de terminación: el modelo alostérico de terminación implica un cambio conformacional en la pol II después de la transcripción del sitio de poliadenilación (poliA) que la hace susceptible a la terminación (Zhang y Gilmour 2006); el modelo del torpedo involucra a una exonucleasa con actividad 5'-3' que, después del corte 3', degrada al RNA y "persigue" a la pol II llevando eventualmente a su desestabilización y terminación (Connelly y Manley 1988; Proudfoot 1989; Kornbliht 2004; Luo y Bentley 2004).

Como se verá más adelante, el CTD de la pol II es blanco de modificaciones todo a lo largo del ciclo de la transcripción y actúa como sitio de unión para una gran cantidad de factores involucrados tanto en la transcripción como el posterior procesamiento de los mRNAs transcriptos.



## 2.2 Acerca de la importancia de la elongación transcripcional

Durante mucho tiempo la mayoría de las investigaciones dirigidas hacia el estudio de los mecanismos moleculares de la transcripción se enfocaron fundamentalmente en estadios tempranos de la misma, que consisten en la formación del PIC y la iniciación. Se consideraba que la elongación transcripcional consistía en la simple adición de nucleósidos monofosfato a la cadena de mRNA naciente de una manera estable y más o menos constante. Sin embargo, con el tiempo se hizo evidente que éste proceso es un estadio dinámico y que está altamente regulado durante el ciclo de la transcripción. Se ha identificado un gran número de factores que afectan específicamente a la elongación transcripcional. Existen evidencias cada vez más abundantes en la literatura que demuestran que la elongación transcripcional es también capaz de coordinar eventos del procesamiento de mRNA que ocurren río abajo de la misma, que incluyen la adición del cap en el extremo 5', el *splicing* de intrones y procesamiento 3' (ver más adelante). Por estas evidencias, la regulación de la elongación transcripcional ha cobrado una singular importancia debido a su capacidad de afectar la expresión génica a distintos niveles que influyen sobre la cantidad y calidad de los mRNAs resultantes. Distintas fallas en factores de elongación son además la causa de diversas enfermedades genéticas que han resaltado aún más la importancia del estudio de la elongación transcripcional (Conaway y Conaway 1999). Como se verá más adelante, algunos resultados de esta tesis muestran que la elongación transcripcional es capaz de afectar la regulación del *splicing* alternativo en genes eucariotas, aportando un nivel más a la regulación de la expresión génica.

## 2.3 Etapas en la elongación

La procesividad de una polimerasa se define como su capacidad de transcribir todo el largo de una unidad transcripcional. La pol II es una enzima extremadamente procesiva, capaz de transcribir genes tan largos como la distrofina que abarca más de 2 Mbases y requieren 17 hs para su síntesis (Tennyson et al. 1995), o *ultrabithorax* de *Drosophila* cuya expresión requiere de una regulación precisa durante el desarrollo (Beachy 1990). Llamativamente, la pol II es al mismo tiempo altamente propensa a

pausar y arrestarse, lo cual indica que está sujeta a múltiples niveles de control a lo largo de los cuales sufre una maduración que le permite avanzar y sintetizar los mRNAs.

La elongación transcripcional es compleja y está caracterizada por distintos estadios: Escape o *clearence* del promotor, pausado proximal al promotor y elongación productiva (Saunders et al. 2006). Cada uno de estos estadios están definidos por una marcada diferencia de estabilidad y comportamiento del complejo de la transcripción, y por los factores que se asocian con el mismo. Si bien se han establecido límites arbitrarios entre los eventos tempranos de la elongación, muchas veces es difícil distinguirlos como pasos separados (Uptain et al. 1997).

El *clearence* del promotor es el estadio más temprano en el cual la pol II rompe contacto con las secuencias del promotor y comienza la síntesis del mRNA naciente. En los pasos iniciales de la elongación la pol II es altamente inestable y tiende a liberarse del molde en lo que se conoce como iniciación abortiva. En este estadio, la pol II es también susceptible a desplazamientos laterales o *slippage* que implican su disociación y posterior reasociación en un sitio río arriba dando como resultado transcritos más largos. Tanto la iniciación abortiva como el *slippage* se reducen ampliamente después de transcribirse los primeros 8-9 nucleótidos (nt) y es prácticamente indetectable una vez alcanzados los 23 nt (Pal y Luse 2002, 2003). Hasta este punto, la pol II es además particularmente susceptible al arresto y al pausado transcripcional, los cuales disminuyen una vez superado el nt +23. El aumento inicial en la estabilidad una vez alcanzados los primeros 8-9 nt puede explicarse por evidencias cristalográficas que muestran que el híbrido RNA-DNA dentro de la burbuja de transcripción tiene 9 nt de largo (Gnatt et al. 2001). Sin embargo, la estabilización adicional alcanzada una vez transcritos 23 nt no se comprende claramente hasta el momento y sólo se han planteado hipótesis para explicarlo que deben aún ser demostradas (Sims et al. 2004; Saunders et al. 2006).

Otro paso en la regulación de la elongación incluye el pausado proximal al promotor, que es un fenómeno en el cual la pol II se pausa en la región 5' de la unidad transcripcional y sólo es capaz de progresar hacia la elongación productiva bajo la estimulación por señales específicas. Este es un paso importante en la regulación de algunos genes *in vivo*, y constituye un punto de control o *checkpoint* en el progreso hacia la elongación productiva. Este tipo de control transcripcional tiene la ventaja de ser notablemente rápido al evitar los pasos (lentos) de reclutamiento de factores al

promotor y ensamblaje del PIC (Saunders et al. 2006). Casos paradigmático de este tipo de regulación operan en los genes de respuesta al calor, o genes *heat-shock*, y en los proto-oncogenes de mamífero *MYC* y *FOS* (Lis 1998), aunque evidencias más recientes indican que este tipo de regulación es un fenómeno ampliamente distribuido en el genoma (Kim et al. 2005).

## 2.4 Arrestos y pausas transcripcionales

Para que la elongación transcripcional sea eficiente debe superar una serie de bloqueos que son intrínsecos a la actividad catalítica de la pol II. Existen tres tipos de impedimentos para la transcripción que incluyen pausa, arresto y terminación (Uptain et al. 1997). Distintos factores de elongación operan a través de mecanismos específicos para aliviar o promover los distintos tipos de bloqueos. La pausa transcripcional se define como un punto en el cual la pol II detiene la incorporación de NTPs por un tiempo determinado después del cual reinicia sin necesidad de ser asistida por factores auxiliares (Figura 2). Por consiguiente las pausas transcripcionales son auto-reversibles y se las considera un modo natural de

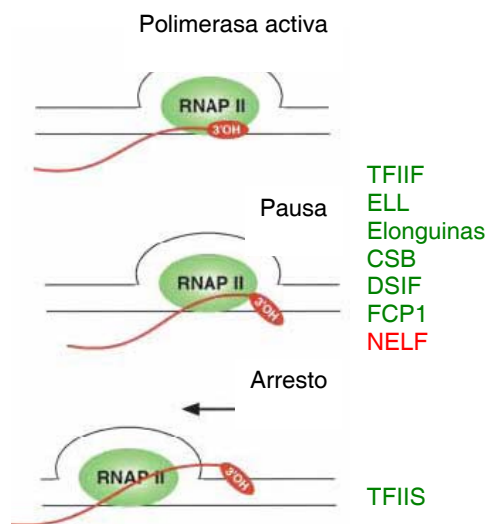


Figura 2. Pausas y arrestos transcripcionales. El pausado de la RNA pol II es un modo natural de regulación causado por una pérdida de alineamiento entre el HO-3' del RNA naciente (en rojo) y el sitio activo de la enzima. El pausado es auto-reversible y es regulado por varios factores celulares positiva (TFIIF, Elonguinas, ELL, CSB, FCP1 y DSIF) o negativamente (NELF).

El arresto transcripcional es aliviado por un proceso que requiere el corte del transcrito naciente por la RNA pol II, y es estimulado por TFIIIS.

Extraído de Sims et al. 2004.

regulación de la transcripción debido al gran número de factores capaces de modularlas (ver más abajo). A diferencia de la pausa, el arresto transcripcional se define como un bloqueo irreversible en la síntesis de RNA que sólo puede ser revertido por medio de factores accesorios (Sims et al. 2004). Aunque las pausas y arrestos están definidos funcionalmente, no son conceptos absolutos ni son mutuamente excluyentes.

En la terminación, como fue anteriormente mencionado, la pol II y el RNA son liberados del DNA efectivamente terminando el proceso de elongación (Figura 1).

*In vivo* las pausas y arrestos transcripcionales son causados por la combinación de secuencias específicas de DNA, factores proteicos y el RNA nascente. Se considera que el mecanismo de pausas y arrestos transcripcionales es similar. El mismo implica un leve deslizamiento de la pol II en dirección río arriba del punto de activa incorporación de nucleótidos, o *backtracking*, produciendo una pérdida de alineamiento entre el hidroxilo 3' (HO-3') del transcripto nascente y el sitio catalítico de la enzima (Figura 2). Este deslizamiento sería más pronunciado (e irreversible) en los arrestos que en las pausas. Evidencias más recientes demostraron que el pausado de la RNA polimerasa bacteriana puede darse en ausencia de *backtracking*, y estaría causado por un rearrreglo estructural dentro del sitio catalítico de la enzima, y de la secuencia de DNA en contacto con el mismo, que resultaría en la formación de un intermediario inactivado (Neuman et al. 2003). Dada la similitud entre los mecanismos de la pol II y la RNA polimerasa bacteriana, es probable que intermediarios similares participen en el pausado de la pol II.

Los complejos arrestados pueden volver al estado de elongación productiva a través de un mecanismo conservado evolutivamente que requiere el corte del RNA en dirección 3'-5' (Figura 2). Esta actividad endorribonucleasa, asociada intrínsecamente a la pol II, corta al transcripto nascente río arriba del HO-3' creando un nuevo HO-3' que está posicionado correctamente con respecto al sitio activo de la enzima y puede ser reextendido (Conaway et al. 2000). Existen evidencias estructurales que apoyan la idea de que el corte de los transcriptos permite el realineamiento del sitio activo de la enzima con el HO-3' del RNA promoviendo así el sobrepaso de los sitios de arresto (Kettenberger et al. 2003).

## 2.5 Factores de elongación

Numerosos factores de elongación han sido definidos en función de sus propiedades de afectar la actividad o de asociarse con el complejo de elongación transcripcional (TEC). Distintas evidencias han sido utilizadas en diferentes organismos para descubrir y caracterizar factores de elongación (Sims et al. 2004). Entre ellas pueden mencionarse evidencias bioquímicas (como la de interaccionar con la pol II o de afectar la elongación *in vitro*), moleculares (como la de asociarse con regiones codificantes y afectar la elongación *in vivo*) y genéticas (como la de dar sensibilidad a inhibidores de la elongación). En levaduras, el análogo de UTP 6-azauracilo (6-AU) produce una disminución en la concentración celular de GTP y UTP (Exinger y Lacroute 1992) y en consecuencia reduce la elongación. Por lo tanto, cepas mutantes para factores que dan sensibilidad a 6-AU son consideradas deficientes en elongación. Este enfoque genético ha ampliado el espectro conocido de factores de elongación.

Se han descrito al menos dos tipos de factores de elongación: factores de elongación activos que afectan a la actividad catalítica de la pol II, y factores pasivos que no la modifican (Sims et al. 2004). La diferencia reside en la capacidad de dichos factores de afectar la actividad catalítica de la pol II independientemente de si el factor permanece unido o no al TEC.

Entre los factores que afectan al pausado transcripcional se encuentran TFIIF, la familia ELL, Elonguinas, FCP1, CSB, DSIF y NELF (Sims et al. 2004; Saunders et al. 2006) (Figura 2). Frecuentemente, los experimentos *in vitro* sugieren funciones redundantes para distintos factores de elongación, como es el caso para TFIIF, ELL, Elonguinas y FCP1. Sin embargo no siempre se observa lo mismo *in vivo*, lo cual sugiere que posiblemente cada factor estimula la elongación en contextos diferentes y en distintos puntos dentro del ciclo de la transcripción.

Dentro de los factores que afectan el arresto transcripcional se ha descrito hasta el momento sólo a TFIIS (SII). Este factor promueve la transcripción a través de sitios de arresto transcripcional (Fish y Kane 2002; Conaway et al. 2003) a través de activar la capacidad endorribonucleasa intrínseca de la pol II (Rudd et al. 1994; Orlova et al. 1995). De acuerdo con lo discutido anteriormente, esta actividad facilita el realineamiento del sitio activo de la pol II con el HO-3' del RNA estimulando la elongación (Kettenberger et al. 2003) (Figura 2).

## 2.6 Regulación de la elongación por la cromatina

Hasta este punto se ha descrito la elongación y su regulación por factores que actúan independientemente de la cromatina. Sin embargo el DNA *in vivo* se encuentra formando en una estructura cromatínica compacta que afecta en gran medida a todos los procesos que requieren acceso al DNA como el caso de la transcripción. Aunque la cromatina cumple un rol esencial en compactar y proteger el material genético, la célula ha desarrollado mecanismos para contrarrestar y aprovechar el acceso limitado al DNA que impone la cromatina. La unidad repetitiva que forma a la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 147 pb de DNA que envuelven a un octámero de histonas formado por un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B. Los nucleosomas están a su vez conectados por DNA conector o *linker* que puede interactuar con una quinta histona, H1, la cual estabiliza la formación de cromatina más compacta de un orden superior (Khorasanizadeh 2004).

Las histonas tienen colas N-terminales que sobresalen del núcleo o *core* del nucleosoma las cuales son sustrato de enzimas modificadoras que pueden acetilarlas, metilarlas, fosforilarlas y ubiquitinarlas. Esto a su vez puede activar a reprimir la expresión génica, y la elongación en particular, dependiendo del tipo de modificación y contexto cromatínico en que se encuentra (Saunders et al. 2006). El efecto sobre la transcripción depende del tipo de histona y el residuo específico dentro de dicha histona que es modificado, de la magnitud de dicha modificación (por ejemplo las histonas pueden ser mono-, di- o tri-metiladas en un mismo residuo), y de la combinación de distintas modificaciones. Todas estas modificaciones son reversibles y altamente dinámicas, y le confieren a la cromatina características y propiedades que pueden influenciar la eficiencia y regulación de procesos como la transcripción. Esto ha llevado a la definición de un “código de histonas” que operaría junto con la información genética contenida en el DNA para regular de modo estricto los procesos como la expresión génica (Clarke et al. 1993; Mellor 2006).

La acetilación de histonas H3 y H4 ha sido en general correlacionada con la activación de genes, aunque en determinados residuos puede también estar asociada a la inactivación (Liang et al. 2004; Liu et al. 2005; Pokholok et al. 2005). Dentro de las regiones codificantes la acetilación de histonas es también importante para la

transcripción (Kristjuhan et al. 2002). Un candidato que acetilaría histonas dentro de la región codificante es el factor *elongator* (Close et al. 2006). Es interesante notar que este factor copurifica con la pol II hiperfosforilada, sugiriendo que *in vivo* podría moverse con la polimerasa y al mismo tiempo “abrir camino” al paso de la maquinaria transcripcional a través de la cromatina (Travers 1999). Sin embargo esto es sólo una interesante hipótesis que debe aún ser probada.

La metilación de histonas en sitios específicos y la magnitud de dicha modificación (mono-, di- o tri-metilación) muestra una notable correlación con activación o represión de la actividad transcripcional. En general se ha descrito un patrón de metilación a lo largo de la unidad transcripcional que es compartido entre varios genes (Saunders et al. 2006). Algunas marcas que correlacionan con la activación transcripcional son trimetilación en H3-K4 y metilación en H3-K36 (Krogan et al. 2003; Xiao et al. 2003; Schneider et al. 2004; Liu et al. 2005; Pokholok et al. 2005; Rao et al. 2005). De modo similar a la acetilación, ciertos factores con actividad metiltransferasa de histonas han sido encontrados asociados a la pol II, como el caso de Set1 (metila H3-K4) que interacciona con pol II fosforilada en Ser5 del CTD (ver fosforilación del CTD más abajo) y Set2 (metila H3-K36) que interacciona con pol II fosforilada en Ser2 y Ser5 del CTD (Krogan et al. 2003; Ng et al. 2003; Schaft et al. 2003). Esto podría ser una forma de dirigir la metilación de histonas a genes en activa transcripción.

Otras modificaciones de histonas como la monoubicuitinación también pueden afectar la transcripción (Saunders et al. 2006). La complejidad de este “código de histonas” se hace aún más evidente por el hecho de que modificaciones en ciertos residuos afectan la modificación en otros residuos (Mellor 2006).

Otro tipo de modificación en la cromatina que afecta la elongación es el reposicionamiento de nucleosomas, que incluye la remodelación de la cromatina a través de factores como SWI-SNF, desensamblaje y reensamblaje nucleosomas por medio de chaperonas de histonas como FACT y Spt6 (Sims et al. 2004).

## 2.7 Elongación versus procesividad. Distintos conceptos

Cuando se hace referencia a la elongación transcripcional, en general se engloba a dos aspectos fundamentalmente distintos del proceso de elongación por la pol II. Uno es la velocidad de elongación que corresponde a la cantidad de nucleótidos transcritos por unidad de tiempo, y otro es la procesividad, que corresponde a la cantidad de nucleótidos transcritos por evento de iniciación o la capacidad de recorrer todo el largo de un gen. La diferencia fundamental entre los dos procesos reside en que el primero es un parámetro que depende del tiempo en tanto que el segundo es independiente del mismo. A pesar de esta clara diferencia, frecuentemente se los confunde, llevando eventualmente a asunciones erróneas en la interpretación de resultados. Esto en parte responde a que es técnicamente muy dificultoso evaluar estos procesos por separado sobre todo en sistemas *in vivo*. Si bien es posible estudiarlos más fácilmente por separado *in vitro*, siendo los resultados muchas veces extrapolables a la situación *in vivo*, existen diferencias claras que requieren del uso de sistemas *in vivo* para su validación.

En un trabajo reciente (Mason y Struhl 2005) se realizó una aproximación exhaustiva que permitió estudiar la relación que existe entre velocidad de elongación y procesividad *in vivo* utilizando *S. cerevisiae* como modelo. En este trabajo se evaluaron por separado los dos procesos de la elongación ideando un método que consiste en medir por inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) los niveles de pol II en diferentes posiciones dentro de un gen cuya expresión es regulada por el promotor inducible GAL1. Para determinar la velocidad de elongación partieron de células en condiciones de activa transcripción e indujeron una rápida represión del promotor inducible. Luego, como medida de velocidad de elongación, hicieron un seguimiento de la cinética de disociación de la pol II a distintas distancias del promotor durante la “última ola” de transcripción. La procesividad se midió sencillamente evaluando la distribución de la pol II a lo largo del gen en el estado estacionario en condiciones de activa transcripción. Los defectos en la velocidad de elongación resultaron acompañados por defectos de magnitud correspondiente en la procesividad. Por ejemplo, dos condiciones que disminuyen la velocidad de elongación como una mutación en la subunidad Rpb2 de la pol II o el tratamiento con 6-azauracilo (6-AU)



producen también una disminución en la procesividad (Mason y Struhl 2005). Esto se manifiesta en que en el estado estacionario la densidad de pol II disminuye gradualmente a medida que se aleja del promotor como resultado de una disociación progresiva del molde. La explicación más simple para la conexión entre velocidad de elongación y procesividad *in vivo* es que a mayor tiempo que la pol II permanece sobre el molde, mayor es la probabilidad de que la misma se disocie del mismo llevando a la producción de transcriptos terminados prematuramente. En principio la pol II podría disociarse aleatoriamente del molde en función del tiempo que permanece en una posición determinada, pero dado que los complejos de pol II con capacidad de elongar son estables *in vitro* (Powel y Reines 1996), la disociación de la pol II *in vivo* requiere de un proceso activo (Mason y Struhl 2005). Resulta intuitivo pensar que los cambios en la velocidad de elongación están asociados a cambios en la procesividad, y de hecho esto es observado en algunos casos como los descritos anteriormente. Sin embargo, existen condiciones bajo las cuales ambos procesos pueden estar desacoplados, como en el caso de mutaciones en factores que afectan a solo uno de estos procesos. Algunos factores de elongación, como miembros de los complejos THO y Spt4 afectan la procesividad pero no la velocidad de elongación de la pol II, lo cual sugiere que dichos factores afectan la estabilidad de la maquinaria de elongación sobre el molde de cromatina pero no su capacidad intrínseca de transcribir (Mason y Struhl 2005). Otros factores de elongación no afectan a ninguno de los dos procesos de la elongación, lo que indica que podría existir una redundancia funcional entre factores de elongación o que estos podrían afectar a otros pasos de la expresión génica como el procesamiento del mRNA que, como se explicará más adelante, está íntimamente ligado a la transcripción.

Estas observaciones sugieren que la velocidad de elongación de la pol II *in vivo* está gobernada en gran medida por sus propiedades intrínsecas y que la velocidad de elongación y la procesividad son procesos funcionalmente distintos y al menos parcialmente separables.

## 2.8 El CTD de la RNA polimerasa II

El dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor (RPB1) de la pol II es una característica distintiva de esta polimerasa y está compuesto por múltiples repeticiones de un heptapéptido con la secuencia consenso YSPTSPS (Figura 3). El CTD está conservado en eucariotas, aunque el número de repeticiones aumenta con la complejidad genómica del organismo: 26 repeticiones en levaduras, 32 en *Caenorhabditis elegans*, 45 en *Drosophila* y 52 en mamíferos. El número de repeticiones es importante para la función del CTD. Un mínimo de 9 repeticiones en levaduras y 28 repeticiones en células humanas es requerido para la viabilidad celular (Kobor y Greenblatt 2002). Ratones knock-in con un CTD acortado a 39 repeticiones son de menor tamaño que los salvajes (WT) o mueren prematuramente en el útero (Litingtung et al. 1999).

La actividad catalítica de la pol II no parece depender directamente del CTD, dado que la transcripción específica de ciertos promotores puede ocurrir *in vitro* en ausencia del CTD (Thompson et al. 1989; Buermeyer et al. 1992; Kang y Dahmus 1993). Lo mismo es cierto *in vivo* para ciertos reporteros transfectados en líneas celulares en forma transitoria (Gerber et al. 1995). Sin embargo, el CTD es esencial para la transcripción *in vivo* de genes en su contexto cromatínico y su disrupción lleva a un defecto global en la transcripción (Meininghaus et al. 2000). Esto es consistente con el hecho de que el CTD interacciona con múltiples factores de elongación, con el

1	YSPTSPA	19	YSPTSPS	37	YSPTSPE
2	YEPRSPGG	20	YSPTSPS	38	YSPTSPK
3	YTQSPS	21	YSPTSPS	39	YSPTSPK
4	YSPTSPS	22	YSPTSPN	40	YSPTSPK
5	YSPTSPS	23	YSPTSPN	41	YSPTSPT
6	YSPTSPN	24	YSPTSPS	42	YSPTTPK
7	YSPTSPS	25	YSPTSPS	43	YSPTSPT
8	YSPTSPS	26	YSPTSPN	44	YSPTSPV
9	YSPTSPS	27	YSPTSPN	45	YTPTSPK
10	YSPTSPS	28	YSPTSPS	46	YSPTSPT
11	YSPTSPS	29	YSPTSPS	47	YSPTSPK
12	YSPTSPS	30	YSPTSPS	48	YSPTSPT
13	YSPTSPS	31	YSPSSPR	49	YSPTSPKSGST
14	YSPTSPS	32	YTQSPS	50	YSPTSPG
15	YSPTSPS	33	YTPSSPS	51	YSPTSPT
16	YSPTSPS	34	YSPSSPS	52	YSLTSPAI SPDDSD EEN
17	YSPTSPS	35	YSPTSPK		
18	YSPTSPS	36	YTPTSPS		

**Consensus :**  
 $Y_1 S_2 P_3 T_4 S_5 P_6 S_7$

Figura 3. Secuencia del CTD humano. Autoalineamiento de aminoácidos 1593-1979 de la subunidad mayor de la RNA pol II (Número de acceso al GeneBank: NM\_000937). Notar que la serina en la posición 7 del heptapéptido consenso no está conservado la mitad C-terminal del CTD. Los principales residuos fosforilables, Serinas 2 y 5, se muestran en rojo. Los residuos no conservados se muestran en azul. Extraído de Palancade y Bensaude 2003.

mediador, con factores relacionados con la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas (ver más arriba), y es además necesario para la correcta función de enhancers (Gerber et al. 1995).

### 2.8.1 Modificaciones de CTD

Cinco de los siete aminoácidos (aa) presentes en el heptapéptido consenso del CTD son aceptores de fosfato (YSPTSPS), y de hecho la fosforilación es una de las modificaciones más importantes que sufre el CTD *in vivo* (Palancade y Bensaude 2003). El CTD es fosforilado principalmente en los residuos de serina 2 y 5, aunque fosfotreonina y fosfotirosina han sido detectados en menor cantidad (Zhang y Corden 1991; Baskaran et al. 1993). El CTD también puede ser O-glicosilado (Kelly et al. 1993) aunque se desconoce la función de esta modificación. Las prolinas del CTD también son susceptibles a isomerización cis/trans (Meinhart et al. 2005), lo cual suma complejidad al repertorio de modificaciones posibles sobre el CTD que potencialmente se combinan para generar el denominado “código del CTD” (Buratowski 2003), denominación que está inspirada en el código de histonas mencionado anteriormente. La figura 4 (izquierda) muestra las modificaciones más importantes que sufre el CTD y algunas de las proteínas involucradas en las mismas. Considerando sólo dos de las modificaciones posibles del CTD, fosforilación de serinas e isomerización de prolinas, existen 16 combinaciones posibles dentro de una sola héptada (Figura 4, derecha). Cada combinación representa un blanco específico de interacción potencial para distintos factores. Este número aumenta considerablemente si se tienen en cuenta más héptadas. Por lo tanto, a través de regular los eventos de fosforilación durante la transcripción el CTD puede codificar una enorme cantidad de información. Si se consideran además las otras modificaciones descritas anteriormente, la complejidad se incrementa aún más.

Además de las interacciones descritas con factores involucrados en la transcripción, el CTD es capaz de unirse a otros factores involucrados en el procesamiento del mRNA, como factores de *capping*, *splicing* y poliadelinación (Bentley 2005). Como se discute más adelante, estos procesos ocurren coordinadamente en el núcleo celular afectándose mutuamente, y dan lugar al fenómeno de acoplamiento entre procesos en

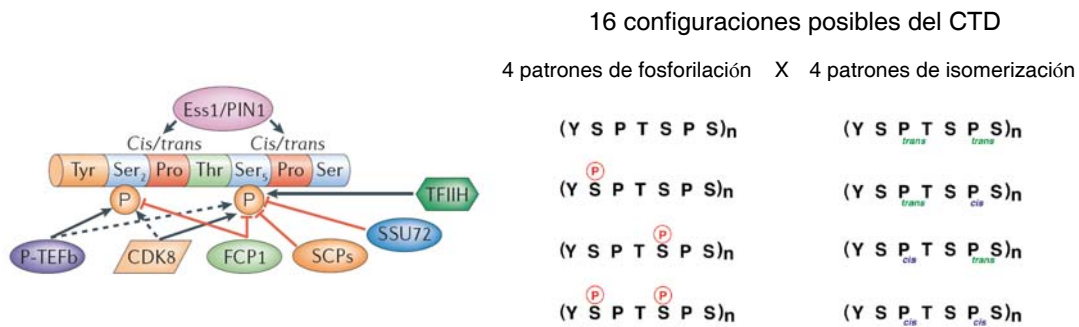


Figura 4. (Izquierda) Principales modificaciones que afectan al CTD (ver texto). Extraído de Saunders *et al.* 2006. (Derecha) “Código del CTD”. 16 posibles configuraciones que puede adoptar una sola héptada del CTD al considerar dos modificaciones posibles sobre Ser 2 y 5. Extraído de Buratowski S. 2003.

el cual el CTD tiene un papel central como plataforma de unión para los factores involucrados (Bentley 2005). Un hallazgo reciente demuestra que el CTD puede interactuar inclusive con secuencias específicas del RNA en forma directa (Kaneko y Manley 2005). En este punto surge la pregunta de cómo es posible que una secuencia tan simple como el CTD pueda ser blanco de unión de tantos factores. En lugar de transportar estos factores a lo largo de todo el ciclo de la transcripción, el CTD interactúa en forma dinámica con cada uno en el momento apropiado. La serie de modificaciones que afectan al CTD produce cambios conformacionales que afectan su estructura (Bienkiewicz et al. 2000; Buratowski 2003), y dan lugar a configuraciones específicas de unión para los distintos factores. Esto convierte al CTD en una estructura flexible, “contorsionista”, capaz de adoptar diferentes conformaciones en función de las modificaciones postraduccionales que sufre y posiblemente a través de mecanismos de ajuste inducidos por los factores con los cuales interactúa (Buratowski 2003; Bentley 2005).

### 2.8.2 El ciclo de fosforilación del CTD durante la transcripción

El código del CTD especifica la posición de la pol II dentro del ciclo de la transcripción y ayuda a reclutar factores requeridos en cada etapa del ciclo. En particular la fosforilación del CTD tiene un papel fundamental en la regulación de la

transcripción y en el procesamiento del RNA (ver más adelante). La existencia de las isoformas hipo- e hiper-fosforiladas de la pol II (II0 y IIA respectivamente) fue descrita a principios de los '80 (Christmann y Dahmus 1981). Por medio de estudios funcionales y la utilización de anticuerpos específicos para cada isoforma, se demostró que el CTD de la pol II en se encuentra desfosforilado durante el ensamblaje del PIC, mientras que durante la transcripción activa se encuentra altamente fosforilado (Christmann y Dahmus 1981; Cadena y Dahmus 1987; Laybourn y Dahmus 1989; Payne et al. 1989; Lu et al. 1991; Chesnut et al. 1992). El CTD sufre cambios dinámicos en su fosforilación a lo largo de ciclo transcripcional. Distintas quinasas y fosfatasas participan en cada etapa del ciclo permitiendo la transición entre cada una, el reciclado de la pol II y modulando la función del CTD en los procesos de procesamiento posterior del mRNA (Kobor y Greenblatt 2002; Palancade y Bensaude 2003; Sims et al. 2004).

Por medio de anticuerpos que reconocen específicamente pol II fosforilada en Ser2 o Ser5 y utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), se demostró que la pol II fosforilada en Ser5 está asociada con regiones 5' proximales al promotor y que está aparentemente ausente en la región 3' de genes. A medida que la pol II se aproxima a la región 3', aumenta la fosforilación en Ser2 (O'Brien et al. 1994; Komarnitsky et al. 2000; Cheng y Sharp 2003). Esto significa que la fosforilación del CTD en Ser5 correlaciona con la iniciación de la transcripción y elongación temprana (*clearence* del promotor), mientras que la fosforilación en Ser2 está asociada con la elongación en las regiones codificantes lejos del promotor. Aunque en general estos resultados parecen ser válidos, debe tenerse en cuenta que los anticuerpos existentes poseen especificidad limitada por el CTD fosforilado en Ser 2 o 5. Un estudio reciente demuestra que el anticuerpo específico para fosforilación en Ser2 reconoce tanto las isoformas fosforiladas en Ser2 como en Ser5 (Jones et al. 2004), sugiriendo que algunas evidencias publicadas deberían ser revisadas.

Varias quinasas participan de la fosforilación del CTD (Kobor y Greenblatt 2002; Palancade y Bensaude 2003)(Figura 5). Las principales pertenecen a la familia de quinasas dependientes de ciclinas (CDK, del inglés *cyclin-dependent-kinase*), que son a su vez componentes de distintos complejos multienzimáticos. Las CDKs principales son CDK7, CDK8 y CDK9 que para su función requieren estar asociadas a las ciclinas H, C y T1/T2/K respectivamente (Palancade y Bensaude 2003). CDK7 (Kin28 en levaduras), una subunidad de TFIIF, es responsable de la fosforilación del

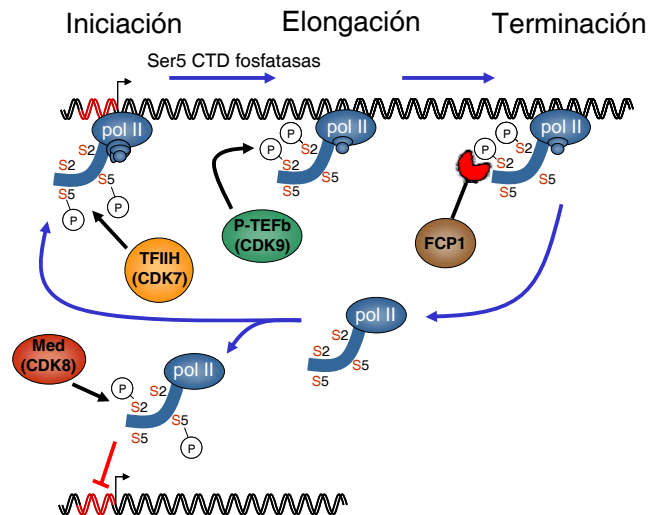


Figura 5. Ciclo de fosforilación del CTD en el ciclo de la transcripción. Después del reclutamiento al promotor el CTD es fosforilado en Ser5 por la subunidad CDK7 de TFIIH, permitiendo la iniciación de la transcripción. En un paso posterior, pTEFb a través de su subunidad CDK9, fosforila Ser2 induciendo la transición a elongación. Distintas fosfatasas asisten también la transición a elongación removiendo los fosfatos en Ser5. Después de la terminación, FCP1 junto con otras fosfatasas asisten al reciclado y reiniciación de la RNA pol II removiendo los fosfatos del CTD. El mediador, a través de su subunidad CDK8 puede inhibir la reiniciación.

CTD en Ser5 que sigue a la formación del primer enlace fosfodiéster (Akoulitchev et al. 1995). Esta fosforilación desestabiliza al PIC y lleva a la formación del complejo scaffold (Figura 1) (Liu et al. 2004). CDK8 (Srb10 en levaduras) está asociado al mediador y es capaz de fosforilar al CTD en Ser2 y 5, previniendo el reclutamiento de la pol II al promotor (Hengartner et al. 1998), aunque estudios más recientes indican que también podría promover la transcripción *in vivo* e *in vitro* (Liu et al. 2004). CDK9 (Ctk1 y Bur1 son los homólogos en levaduras) es parte del factor de elongación pTEFb (*positive elongation factor b*) que fosforila al CTD en Ser2 y estimula la elongación (Shim et al. 2002) principalmente en genes que se hallan en activa transcripción (Ni et al. 2004). pTEFb fosforila también al factor de elongación DSIF, y lo libera de la inhibición ejercida por NELF, y es el factor que confiere sensibilidad a la inhibición de la transcripción por DRB (5,6-dicloro-furanosil-benzimidazol) y flavopiridol (Sims et al. 2004). El hecho de que estas quinasas puedan tener efectos contrarios, como el caso de CDK7 y CDK8, aunque tengan el mismo blanco molecular dentro del CTD (Ser5), se explica si se tiene en cuenta que las mismas integran distintos complejos, de modo que el momento o *timing* en el que actúan dentro del ciclo de fosforilación es diferente (Hengartner et al. 1998). Otras

quinasas y factores de transcripción afectan la fosforilación del CTD, como el caso del factor Tat del virus HIV que es capaz de reclutar pTEFb al promotor LTR del genoma viral activando la transcripción de genes virales (Kobor y Greenblatt 2002; Palancade y Bensaude 2003).

A diferencia de la gran cantidad de quinasas de CTD caracterizadas, sólo unas pocas fosfatasas de CTD han sido identificadas. La mejor conocida es FCP1 (Fcp1p en levaduras), la cual ha sido involucrada en el ciclo transcripcional y en la regulación de la elongación por la pol II. FCP1 remueve los fosfatos del CTD en Ser2 y Ser5 y permite el reciclado de la pol II en el ciclo de la transcripción (Lin et al. 2002b; Lin et al. 2002a; Mandal et al. 2002)(Figura 5). Otras fosfatasas del CTD han sido identificadas y participarían tanto en las distintas etapas de la transcripción como en el reciclado de la pol II (Sims et al. 2004). Entre ellas, SSU72 y las fosfatasas de CTD pequeñas (SCPs) son fosfatasas específica de Ser5 (Meinhart et al. 2005) (Figura 4, izquierda).

Como ya se mencionó, además de las quinasas y fosfatasas que afectan directamente al CTD, las peptidil-prolil isomerasas como PIN1 (Ess1 en levaduras) pueden alterar la conformación del CTD y regular su fosforilación indirectamente (Meinhart et al. 2005).

### 3. Procesamiento del mRNA

En eucariotas la generación de mRNA maduros que van a ser finalmente traducidos en el citoplasma no resulta del simple copiado de la información genética contenida en el DNA. Antes de estar listos para ser exportados del núcleo los transcritos sufren tres tipos principales de procesamiento que dan lugar a los mensajeros maduros. Estos comprenden el agregado de la caperuza o *Cap* al extremo 5' del transcripto, proceso conocido como *capping*, la eliminación de intrones del cuerpo del pre-mRNA durante el *splicing*, y la generación del extremo 3' por medio de un corte seguido del agregado de una cola de poliA. Estos procesos aumentan la estabilidad de mensajeros y afectan el destino final de los mismos dentro del núcleo y en el citoplasma y participan en la compleja regulación de la expresión génica. A continuación se comentará acerca del mecanismo del *splicing* por ser el tema de esta tesis. Para ver revisiones acerca de los

mecanismos de capping y poliadenilación consultar (Shatkin y Manley 2000; Proudfoot et al. 2002).

### 3.1 *Splicing*

El descubrimiento de la naturaleza interrumpida de los genes y del *splicing* del mRNA tuvo lugar hace casi 30 años y fue recibida con asombro (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). Aunque los intrones deben ser removidos con precisión para evitar introducir errores en el marco de lectura, existen pocas secuencias conservadas que permiten su correcto reconocimiento. A esto se suma que la longitud de los intrones en mamíferos varía ampliamente, y que se los encuentra por docenas en un solo transcripto en la gran mayoría de los genes. Esto sugiere que la especificidad y eficiencia del *splicing* son fundamentales para la correcta expresión de genes y la función celular. La importancia del *splicing* es ilustrada por el hecho de entre 15 y 50% de las enfermedades genéticas se debe a mutaciones en sitios consenso de *splicing* o en elementos auxiliares conocidos como *enhancers* y *silencers* del *splicing* (ver más abajo).

El *splicing* en eucariotas superiores es catalizado por el *spliceosoma*, un complejo macromolecular ribonucleoproteico descubierto inicialmente en levaduras (Brody y Abelson 1985). El *spliceosoma* está compuesto por cinco RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y un número creciente factores asociados. Una estimación reciente del número de proteínas que componen al *spliceosoma* asciende a aproximadamente 145 (Zhou et al. 2002), entre las cuales se encuentran proteínas involucradas no sólo en la reacción de *splicing* sino también en otros pasos de la expresión génica.

La remoción de los intrones de un pre-mRNA y la concomitante unión de los exones son dirigidas por secuencias especiales presentes en las juntas exón/intrón denominadas sitios de *splicing* (Black 2003). El sitio de *splicing* 5' (SS-5') marca la junta exón/intrón en el extremo 5' de intrón (Figura 6A). Este incluye el dinucleótido GU en el extremo del intrón presente dentro de una secuencia consenso menos conservada (Zhang 1998). En el otro extremo del intrón, la región del sitio 3' de *splicing* (SS-3') que delimita la junta intrón/exón, posee tres secuencias conservadas consecutivas: el sitio de ramificación o *branch-point* (BP), un trecho de



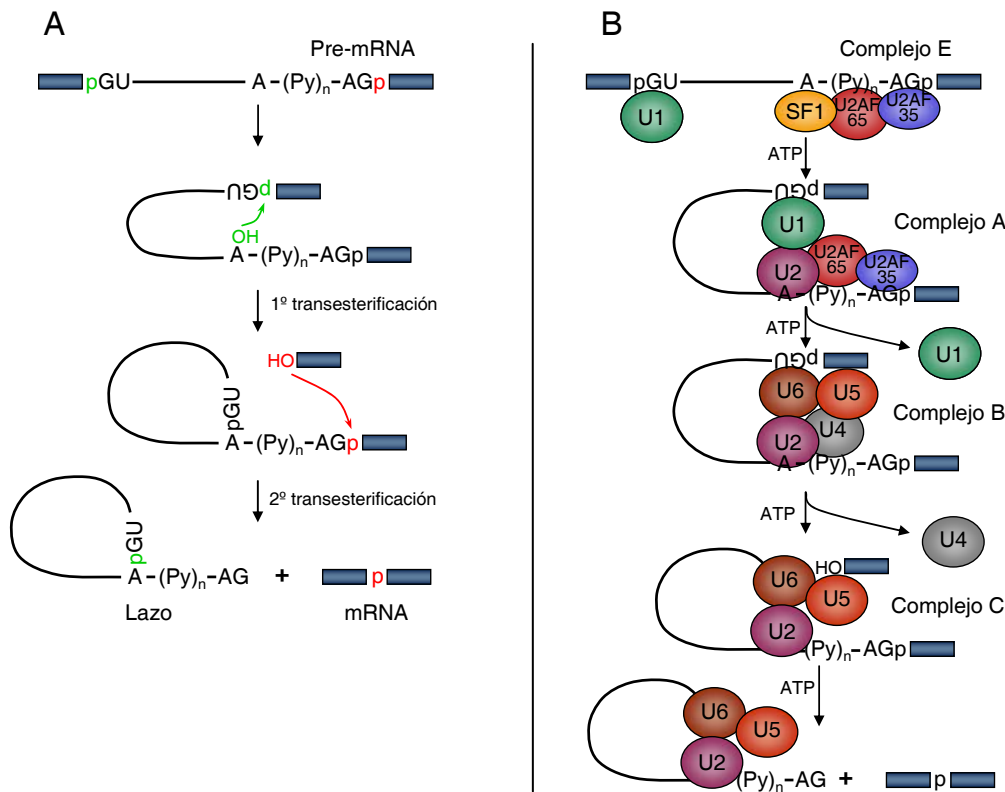


Figura 6. Mecanismo de *splicing*. (A) El *splicing* ocurre a través de dos reacciones de transesterificación. En verde, primera transesterificación. En rojo, segunda transesterificación. (B) Ensamblaje del *spliceosoma*.

polipirimidinas (Py) y el dinucleótido AG en extremo 3' del intrón (Zhang 1998). El *spliceosoma* se ensambla sobre estas secuencias y cataliza las dos reacciones de transesterificación que comprende el *splicing* (Figura 6A y B). En la primera transesterificación, el grupo hidroxilo-2' del residuo de adenina conservado en el *branch-point* ataca al fosfato del sitio de *splicing* 5'. Esto lleva al corte del exón 5' y a la unión concertada del extremo 5' del intrón con el hidroxilo-2' del *branch-point*. Este paso produce dos intermediarios de reacción: un exón 5' libre y un fragmento intrón/exón-3' en una configuración de lazo o *lariat* que contiene en una adenosina ramificada en el *branch-point*. En la segunda transesterificación el hidroxilo-3' del exón libre ataca al fosfato en el extremo 3' del intrón produciendo la unión de los dos exones y la liberación del intrón en la forma de lazo (Figura 6A).

El ensamblaje del *spliceosoma* se realiza a partir de los cinco snRNAs asociados a factores proteicos formando ribonucleoproteínas pequeñas (snRNPs) y proteínas accesorias (Staley y Guthrie 1998) (Figura 6B). El ensamblaje comienza con la

asociación del snRNP U1 al sitio 5' de *splicing* a través de apareamiento de bases entre el snRNA U1 y el sitio de *splicing*. El sitio de *splicing* 3' es reconocido por otro grupo de proteínas. Entre ellas, SF1 es una proteína de unión al *branch-point* (BBP en levaduras). La subunidad de 65 kDa del factor dimérico U2AF (factor auxiliar de U2) se une al trecho de polipirimidinas, y en algunos casos, la subunidad de 35 kDa de U2AF se une al dinucleótido AG en la juntura intrón/exón. El primer complejo definido durante el ensamblaje del *spliceosoma* es el complejo E (del inglés *early*) y contiene a U1 y U2AF unidos a ambos extremos del intrón (Das et al. 2000). Al complejo E luego se une el snRNP U2, cuyo snRNA aparea con el *branch-point* originando el complejo A. En un paso posterior, se une un complejo formado por los tres snRNPs U4/U5/U6 dando lugar al complejo B en el cual se pierde el snRNP U1. El complejo B sufre finalmente una serie de rearrreglos y da lugar al complejo C, en el cual la interacción del snRNP U1 con el sitio 5' de *splicing* es reemplazada por el snRNP U6, y el snRNP U4 se pierde del complejo. El complejo C es el que cataliza las dos reacciones de transesterificación (Figura 6B).

El *spliceosoma* es un complejo altamente dinámico (Figura 6B). Cada reacción de *splicing* requiere el ensamblaje y desensamblaje ordenado de snRNPs. El paso inicial (formación del complejo E) es el único que no requiere de gasto de energía. Sin embargo, los demás pasos requieren de la hidrólisis de ATP. Esto coincide con que en casi todos estos pasos se forman y rompen hélices de RNA y cada uno requiere de una o varias ATPasas que presentan similitud de secuencia con helicasas canónicas lo cual sugiere que los componentes del *spliceosoma* consumen energía para desenrollar RNA (Staley y Guthrie 1998).

### 3.2 Arquitectura exón/intrón

El mecanismo de *splicing* descrito en la sección anterior, considera al intrón como la unidad reconocida por el *spliceosoma*. Sin embargo, los genes en vertebrados consisten en múltiples exones pequeños (aproximadamente 150 nucleótidos en promedio) separados por intrones de mucho mayor tamaño (aproximadamente 3400 nucleótidos en promedio) (Goldstrohm et al. 2001). Por lo tanto la maquinaria de *splicing* en vertebrados tiene la tarea de reconocer secuencias exónicas pequeñas en

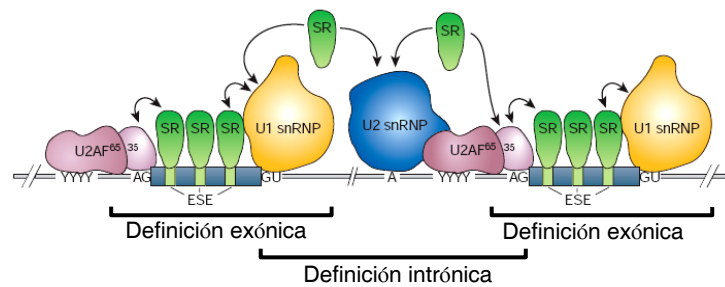


Figura 7. Arquitectura exón/intrón. Los sitios de *splicing* 5' y 3' son apareados en función de su proximidad. La interacción entre sitios puede darse inicialmente a través de los exones (definición exónica), o a través de intrones (definición intrónica). Las proteínas SR unidas a ESEs (ver más adelante) pueden reclutar factores activando la definición exónica. Las proteínas SR también pueden activar la definición intrónica funcionando como puente entre los factores de *splicing* unidos en los sitios 5' y 3' intrones. Extraído de Maniatis y Tasic 2002

medio de largas extensiones intrónicas. Sumado a esto, los sitios de *splicing* en vertebrados presentan un consenso laxo, más aún que en levaduras en las cuales sólo una minoría de los genes tiene intrones; y a su vez entre estos la mayor parte tiene un único intrón (Guthrie 1991; Ruby y Abelson 1991). Por lo tanto el *splicing* en vertebrados debe enfrentar un problema más complejo de especificidad a través del reconocimiento de secuencias consenso menos conservadas. Una solución a este problema fue propuesto originalmente por Susan Berget (Robberson et al. 1990). La clave está en la observación de que los sitios de *splicing* no son reconocidos de modo independiente. Tanto en levaduras como en vertebrados, los sitios de *splicing* 5' y 3' más próximos (dentro de una longitud óptima) son reconocidos de a pares, lo cual es además consistente con que los sitios de *splicing*, y los factores que los reconocen, presentan interacciones entre ellos (Berget 1995). La arquitectura exón/intrón, por lo tanto, determina si el *spliceosoma* reconoce a los sitios de *splicing* a través del exón o a través del intrón. En genes con intrones cortos y exones largos, como ocurre en levaduras, este apareamiento ocurre a través de los intrones y es llamado definición intrónica (*intron definition*). En vertebrados, que tienen genes con intrones largos y exones cortos, el apareamiento de sitios de *splicing* ocurre a través de los exones y es llamado definición exónica (*exon definition*, Figura 7) (Berget 1995). La observación más clara que llevó a proponer el modelo de definición exónica, fue que mutaciones en sitios de *splicing* 5' de exones internos flanqueados por intrones largos impedían este apareamiento y llevaban a la eliminación del exón junto con sus intrones

flanqueantes (*exon skipping*), en lugar de conducir a la retención del intrón en el mRNA maduro. El modelo de definición exónica propone que en pre-mRNAs con intrones largos, la maquinaria de *splicing* busca pares de sitios de *splicing* cercanos con polaridad exónica. Una vez encontrados, el exón es definido por la interacción entre U2AF y el snRNP U1 que lo flanquean junto con factores de *splicing* asociados, entre los que se encuentran las proteínas SR (Berget 1995) (ver más adelante). Una vez definidos, los exones contiguos deben ser yuxtapuestos presuntamente a través de interacciones entre factores que reconocen a los exones individuales. Este modelo implica que los exones terminales 5' y 3' requieren mecanismos especiales para ser definidos. Como se verá más adelante, las reacciones de procesamiento del RNA en el núcleo se hallan conectadas y son capaces de afectarse mutuamente. De hecho, en exones 5' el reconocimiento de sitios de *splicing* 5' es inducido por el Cap a través de interacciones entre componentes del *splicing* y el factor CBC (*Cap binding protein*) presente en el Cap (Ohno et al. 1987; Lewis et al. 1996). En el caso de los exones 3' la interacción está dada entre el sitio de *splicing* 3' y la señal de poliadenilación, e involucran al factor U2AF65 y el dominio C-terminal de la poliA polimerasa (Vagner et al. 2000).

El apareamiento de sitios de *splicing* a través de definición exónica es significativamente menos eficiente que a través de definición intrónica dado que para eliminar un solo intrón por definición exónica se requieren de dos pasos de reconocimiento (quizás tres considerando la yuxtaposición), mientras que por definición intrónica se requiere de solo un paso (Fox-Walsh et al. 2005). Esto implica que a medida que la arquitectura exón/intrón se aproxima más a la de definición exónica, es más probable que los exones sean débilmente reconocidos, ofreciendo la posibilidad de que ocurra selección diferencial de sitios de *splicing* o *splicing* alternativo (Fox-Walsh et al. 2005). Por otro lado, comparado con *Drosophila*, en humanos hay una mayor proporción de exones con una arquitectura exón/intrón del tipo de definición exónica (Fox-Walsh et al. 2005), que a su vez correlaciona con una mayor proporción de exones que sufren *splicing* alternativo. Junto con los mecanismos regulatorios que se describirán a continuación, la arquitectura exón/intrón es un factor importante en la compleja regulación del *splicing* alternativo .

### 3.3 *Splicing* alternativo

El *splicing* alternativo permite que distintas combinaciones de sitios de *splicing* sean utilizadas dentro de una misma unidad transcripcional para generar distintos mRNAs a partir de un solo gen. En los últimos años, con el inmenso aporte del análisis de genomas completos, el *splicing* alternativo ha cobrado mayor relevancia debido a los descubrimientos de que los genomas de mamíferos poseen menos genes que los estimados anteriormente (Lander et al. 2001), y que el *splicing* alternativo es más la regla que la excepción. Se sabe que aproximadamente el 60% de los genes humanos están sujetos a *splicing* alternativo, lo cual eleva la capacidad codificante del genoma a niveles mucho más altos que los que el número limitado de genes permitiría alcanzar (Modrek y Lee 2002; Johnson et al. 2003; Kampa et al. 2004). Por otro lado, parece existir un alto grado de coordinación entre eventos de *splicing* vecinos que limitaría el número de variantes de *splicing* presentes en la célula (Fededa et al. 2005; Lenasi et al. 2006).

El *splicing* alternativo permite la síntesis de isoformas de proteínas funcional y estructuralmente distintas a partir de un mismo gen. Un ejemplo extremo es el gen *Dscam* de *Drosophila*, que codifica una proteína de membrana involucrada en la conexión de neuronas. Su pre-mRNA es procesado por *splicing* alternativo y puede generar potencialmente 38016 isoformas distintas, más del doble que el número de genes de todo el genoma de *Drosophila* (Black 2000; Graveley 2001). En un extremo de menor complejidad, se encuentran los genes de *Drosophila* *Sex-lethal* (*Sxl*) y *transformer* (*tra*). En estos genes el *splicing* diferencial en los distintos sexos da lugar a proteínas funcionales sólo en hembras. En machos el *splicing* alternativo lleva a la inclusión de codones de terminación y la producción de proteínas truncas (Black 2003). El *splicing* alternativo es también usado en la célula en otros procesos como el control de la apoptosis (Boise et al. 1993). Enfoques genómicos más recientes sugieren que el *splicing* alternativo cumple su función más importante en sistemas complejos en los cuales la información debe ser procesada diferencialmente a distintos tiempos (como la tolerancia del sistema inmune y durante el desarrollo) o con una alta diversidad (como en la guía axonal de neuronas) (Modrek y Lee 2002).

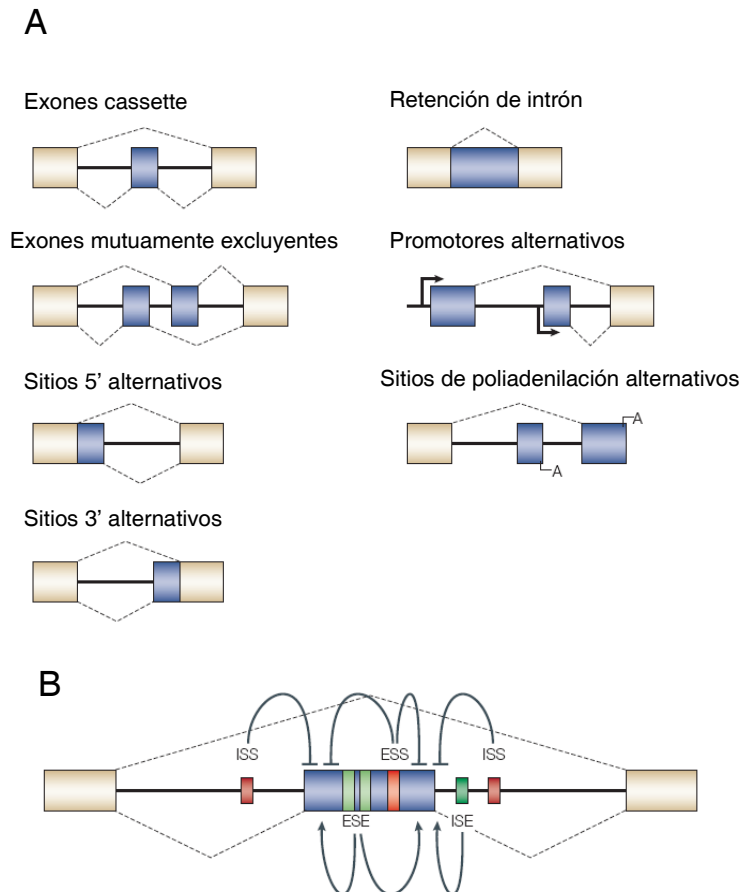


Figura 8. *Splicing* alternativo. (A) Distintos modos de *splicing* alternativo. (B) Elementos regulatorios que afectan el *splicing* alternativo. Los *enhancers* tanto exónicos como intrónicos (ESE e ISE respectivamente) estimulan el *splicing*, mientras que los *silencers* (ESS e ISS respectivamente) lo inhiben. Extraído de Sims et al. 2004

Existen distintos modos de *splicing* alternativo (Figura 8A). Ciertos exones, frecuentemente denominados exones *cassette*, pueden ser incluidos o excluidos del mRNA maduro. En otros casos, uno entre dos o más exones puede ser incluido de modo mutuamente excluyente. Algunos exones pueden variar su longitud de acuerdo a la utilización de sitios 5' o 3' alternativos. Aunque con menor frecuencia, los intrones también pueden ser retenidos alternativamente. Puede existir además una combinación entre la utilización de promotores o sitios de poliadenilación alternativos con el uso de distintos sitios de *splicing* (Matlin et al. 2005), aunque estos últimos mecanismos no necesariamente están regulados a nivel del *splicing*.

Tanto la elección de sitios de *splicing* constitutivos como la de sitios alternativos están íntimamente relacionadas dado que los componentes de la maquinaria de *splicing* que son esenciales para el *splicing* constitutivo también participan en la regulación de

*splicing* alternativo (Horowitz y Krainer 1994). La fuerza relativa de los sitios de *splicing* influye sobre la frecuencia con la cual un exón es utilizado. Los exones alternativos generalmente tienen sitios de *splicing* subóptimos y/o longitudes subóptimas en comparación con los exones constitutivos. La regulación del *splicing* de exones alternativos está modulada por factores que actúan en *trans* sobre elementos regulatorios en *cis* presentes tanto en regiones exónicas como intrónicas (Figura 8B). Los elementos que actúan positivamente sobre el *splicing* se denominan *enhancers* (ESE, exónicos; ISE, intrónicos) y los que actúan negativamente se denominan *silencers* (ESS, exónicos; ISS, intrónicos) (Cáceres y Kornblihtt 2002). El descubrimiento de secuencias regulatorias conservadas sobre los exones fue inicialmente recibido con sorpresa debido a las restricciones evolutivas impuestas sobre esas secuencias por ser secuencias codificantes de proteínas. Por otro lado dejó en claro que los criterios utilizados para evaluar el impacto de una mutación sobre una región codificante no sólo deben considerar el posible efecto sobre la secuencia de la proteína codificada, sino también los posibles efectos sobre el *splicing* alternativo. Una mutación sinónima y aparentemente silenciosa podría eventualmente crear o destruir un ESE y afectar así el *splicing* alternativo. Esto tiene particular relevancia en el caso de estudios de evolución o enfermedades en los cuales ciertas mutaciones pueden eventualmente ser ignoradas por ser inocuas traduccionalmente, mientras que en realidad podrían afectar el *splicing* alternativo y ser el blanco de selección en algunas especies o estar asociadas a fenotipos y cuadros clínicos de enfermedades genéticas (Cáceres y Kornblihtt 2002).

### **3.4 Proteínas regulatorias del *splicing***

Las proteínas SR constituyen una familia de proteínas altamente conservadas en metazoos. Las mismas participan en el *splicing* constitutivo y en la regulación del *splicing* alternativo (Fu 1995; Graveley 2000). Poseen una estructura modular que consiste de una o dos copias de un motivo de reconocimiento del RNA (RRM) y un dominio C-terminal rico en serinas y argininas intercaladas (dominio RS). El RRM determina la especificidad de unión al RNA sobre ESEs específicos, mientras que el dominio RS media interacciones proteína-proteína que se creen esenciales para el

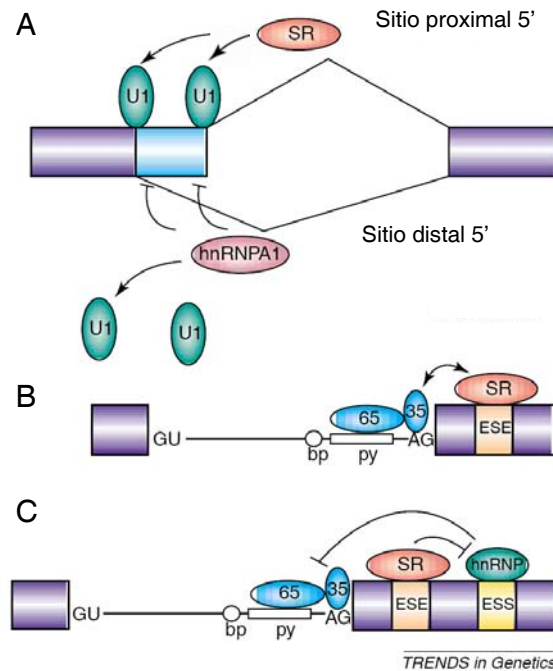


Figura 9. Factores que regulan en *splicing* alternativo. (A) La proteína SR SF2/ASF interfiere con la unión de hnRNP A1 y promueve la unión de U1snRNP a ambos sitios 5' alternativos, resultando en la selección del sitio proximal. hnRNP A1 se une cooperativamente al pre-mRNA e impide la unión de U1snRNP a ambos sitios, resultado en la selección del sitio distal. (B) Las proteínas SR unidas a ESEs promueven el reclutamiento de U2AF al trecho de polipirimidinas, activando el sitio 3' adyacente. (C) Las proteínas SR unidas a ESEs podrían antagonizar el efecto negativo de hnRNPs que reconocen ESSs. Extraído de Cáceres y Kornblihtt 2002.

reclutamiento del aparato de *splicing* y el apareamiento de sitios de *splicing* (Wu y Maniatis 1993; Tacke y Manley 1999).

Otra clase de proteínas que también posee dominios RS son las proteínas relacionadas a SRs (SRrps). Estas proteínas, que pueden tener RRMs, incluyen al factor U1-70K (componente de U1 snRNP), ambas subunidades de U2AF, SRm160/300 (proteínas de matriz nuclear relacionadas a SRs de 160 y 300 kDa) y factores Tra y Tra2 (Fu 1995). Tanto las proteínas de la familia SR como las relacionadas a SR funcionan en el reconocimiento de ESEs e ISEs llevando a la activación del *splicing* (Blencowe 2000). Algunas proteínas SR pueden unirse simultáneamente a los factores U1-70K y U2AF, funcionando como un puente que promueve la definición exónica (Wu y Maniatis 1993) (ver Figura 7).

Otra familia importante de factores regulatorios del *splicing* la integran las Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Las hnRNPs son un grupo de más de 20 proteínas, que se asocian a RNA nuclear de alto peso molecular. Contienen



dominios RRM y KH de unión al RNA y dominios auxiliares de interacción proteína-proteína y, al igual que las proteínas SR, tienen múltiples roles en el metabolismo del pre-mRNA (Krecic y Swanson 1999). Las proteínas de la familia hnRNP funcionan generalmente en el reconocimiento de ESSs e ISSs.

Las primeras evidencias indicaron que las proteínas SR y hnRNP tenían efecto antagónico sobre sitios alternativos 5' (Figura 9A). Mientras que las proteínas SR promueven la selección de sitios proximales al intrón, las hnRNP promueven los sitios distales (Mayeda y Krainer 1992; Cáceres et al. 1994; Yang et al. 1994). Las proteínas SR unidas a ESEs pueden promover el reclutamiento de U2AF al trecho de polipirimidina y activar el sitio de *splicing* 3' adyacente (Figura 9B). Al unirse a ESEs, las proteínas SR pueden también antagonizar el efecto inhibitorio de proteínas hnRNP presentes en ESSs (Figura 9C) (Graveley 2000; Hastings y Krainer 2001). Distintas proteínas SR pueden a su vez tener efectos opuestos, como por ejemplo SF2/ASF y SRp20 en la regulación del *splicing* del exón 4 de SRp20 y de EDI de fibronectina (Jumaa y Nielsen 1997; Cramer et al. 1999), o SF2/ASF y SC35 en la regulación de  $\beta$ -tropomiosina (Gallego et al. 1997). La actividad de las proteínas SR y hnRNP es a su vez afectada por la fosforilación, y las quinasas involucradas en la fosforilación de estos factores tienen un rol importante en la regulación del *splicing* alternativo por señales extracelulares (Blaustein et al. 2005).

Se han descrito otros factores regulatorios del *splicing*, entre los que pueden mencionarse PTB (proteína de unión al trecho de polipirimidina), la familia de proteínas CELF, NOVA-1 y brPTB, los dos últimos específicos de neuronas (Cáceres y Kornblihtt 2002).

Durante el desarrollo y en diferentes tejidos celulares, las diferencias en las abundancias o actividades de factores generales y regulatorios del *splicing* pueden generar diferentes patrones de *splicing* alternativo. La abundancia relativa de proteínas de *splicing* SR y hnRNP varía en algunos tejidos (de rata) y en líneas celulares en cultivo (Hanamura et al. 1998), sin embargo no parecen tener una distribución altamente específica de tejido. Aunque existen en algunos casos factores regulatorios específicos de tipos celulares como *Sxl* y *Tra*, la regulación más común implica la participación simultánea de múltiples factores positivos y negativos, que se combinan en relaciones precisas para dictar patrones determinados de *splicing* alternativo. Los patrones de *splicing* alternativo específicos de tejidos estarían

determinados por “códigos celulares” conformados por combinaciones de factores específicas para cada tipo celular (Smith y Valcarcel 2000; Matlin et al. 2005).

Los enfoques tradicionales en el estudio del *splicing* alternativo por medio del genes modelo se complementan actualmente por medio de enfoques sistemáticos que permiten la identificación de nuevos elementos y factores regulatorios, la detección simultánea de un número elevado de eventos de *splicing* alternativo y la detección secuencias de RNA blanco para factores regulatorios (Matlin et al. 2005). Estos enfoques incluyen SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) que permitió la identificación de secuencias de unión para proteínas regulatorias SR y hnRNPs (Tacke y Manley 1999), SELEX funcional *in vivo* (Coulter et al. 1997; Wang et al. 2004), SELEX genómico (Kim et al. 2003), microarreglos de *splicing* alternativo (Johnson et al. 2003; Wang et al. 2003; Pan et al. 2004; Religio et al. 2005) y las técnicas de CHIP (inmunoprecipitación de la cromatina) (Kotovic et al. 2003), ChRIP (inmunoprecipitación de cromatina asociada a RNA) (Listerman et al. 2006) y CLIP (crosslinking por UV e inmunoprecipitación) (Ule et al. 2003). Estas nuevas estrategias permitirán eventualmente identificar los mencionados códigos celulares de un modo que los genes modelo no permiten. Sin embargo, estos últimos seguirán siendo necesarios para comprender los mecanismos regulatorios y el funcionamiento de dichos códigos.

#### **4. Acoplamiento entre transcripción y procesamiento del pre-mRNA**

Si bien las reacciones involucradas en cada paso de la expresión de genes son diferentes bioquímicamente, las mismas ocurren en íntimo contacto dentro del núcleo y muchas veces simultáneamente. Aunque la visión clásica las consideró como reacciones secuenciales e independientes dado que pueden ocurrir aisladamente *in vitro*, más tarde una serie de experimentos bioquímicos, citológicos y funcionales demostró que la transcripción, el capping, el *splicing* y el procesamiento 3' no sólo ocurren al mismo tiempo sino que además pueden afectarse mutuamente (Neugebauer 2002; Proudfoot et al. 2002; Kornblihtt et al. 2004; Bentley 2005). A este fenómeno se lo denomina comúnmente acoplamiento. Las maquinarias complejas y dinámicas involucradas en cada proceso comparten componentes y están unidas formando las

llamadas “fábricas de mRNA” que maximizan la eficiencia y especificidad en cada paso de la expresión génica. La pol II está en el centro de esta compleja red y a través de su CTD coordina las distintas reacciones involucradas en el procesamiento. No sólo las reacciones encargadas de sintetizar y procesar el mRNA se hallan acopladas. La compleja red de interacciones también se extiende a otros procesos como el NMD (*nonsense-mediated decay*), un mecanismo de control de calidad que lleva a degradación a aquellos mensajeros con codones de terminación prematuros originados por errores en el *splicing* o introducidos por mutaciones (Cartegni et al. 2002; Lejeune y Maquat 2005). La posterior exportación de mensajeros al citoplasma también está acoplada al procesamiento (Maniatis y Reed 2002), y eventos tan distantes como la traducción citoplasmática de mRNAs puede ser influenciada por factores involucrados en el procesamiento nuclear (Sanford et al. 2004).

#### **4.1 Acoplamiento transcripción-*splicing***

En las secciones previas se describió al *splicing* constitutivo y alternativo como un mecanismo estático que actúa sobre un pre-mRNA presintetizado. Sin embargo, el *splicing* puede actuar de modo dinámico sobre el pre-mRNA a medida que este emerge de la pol II. Aunque el *splicing* puede ocurrir *in vitro* de un modo independiente de la transcripción, lo hace con mucho menor eficiencia que *in vivo* (Wetterberg et al. 2001; Bird et al. 2004) o que en sistemas *in vitro* de transcripción y *splicing* simultáneos cuando la transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa II (Das et al. 2006; Hicks et al. 2006). El hecho de que sólo los transcriptos sintetizados por la pol II estén sujetos a *splicing*, en si mismo sugiere la existencia de un fenómeno de acoplamiento. Si se cambia el promotor de un gen transcripto por la pol II por uno de RNA pol I, la transcripción por pol I ocurre normalmente pero los transcriptos resultantes no se poliadenilan y se vuelven altamente inestables (Smale y Tjian 1985). De modo similar los transcriptos producidos *in vivo* por genes híbridos que contienen promotores de pol III fusionados a genes específicos de pol II sufren *splicing* y poliadenilación de modo deficiente (Sisodia et al. 1987). Cuando genes específicos de pol II se encuentran bajo el control de promotores de RNA pol T7, los

transcriptos producidos *in vivo* al introducir la RNA polimerasa T7 en células de mamífero también muestran defectos en el procesamiento (McCracken et al. 1998).

Estudios recientes en levaduras demostraron que los principales factores de *splicing* (en particular los snRNPs) son reclutados cotranscripcionalmente al RNA naciente sólo en aquellos genes que poseen intrones (Kotovic et al. 2003; Gornemann et al. 2005; Lacadie y Rosbash 2005). Lo mismo fue posteriormente demostrado en células de mamíferos (Listerman et al. 2006).

La visualización directa por microscopía electrónica de transcriptos nacientes en embriones de *Drosophila* demostró claramente que el *splicing* puede ocurrir cotranscripcionalmente con una frecuencia razonable (Beyer y Osheim 1988) (Figura 10). El *splicing* cotranscripcional también ha sido observado en el mosquito *Chironomus tentans* (Bauren y Wieslander 1994; Wetterberg et al. 1996) y en humanos (Wuarin y Schibler 1994; Tennyson et al. 1995). La naturaleza cotranscripcional del *splicing* parecería ser un requisito razonable para el acoplamiento, sin embargo, la cotranscripcionalidad *per se* no necesariamente implica que la transcripción y el *splicing* están acoplados. De hecho, el *splicing* cotranscripcional no ocurre en todos los intrones. En genes largos, algunos intrones pueden ser procesados cotranscripcionalmente, mientras que otros son procesados después de que la transcripción ha finalizado. En la mayoría de los casos no se conoce el orden de eliminación de los intrones, ni si un mismo intrón sigue siempre el mismo orden. En algunos casos la posición del intrón a lo largo del gen parece ser relevante para el orden de eliminación. El intrón 3 del gen *Anillo de Balbiani 1 (BRI)*, ubicado próximo al extremo 5' del gen, es eliminado cotranscripcionalmente, mientras que el intrón 4, cercano al extremo 3', es eliminado cotranscripcionalmente solo en el 10% de las moléculas y postranscripcionalmente en el resto (Bauren y Wieslander 1994). Debe tenerse en cuenta que si el *splicing* fuera estrictamente cotranscripcional, es decir si cada intrón fuera eliminado antes de que el intrón siguiente fuera transcripto, los mecanismos como la definición exónica y el *splicing* alternativo no existirían (Kornblihtt et al. 2004).

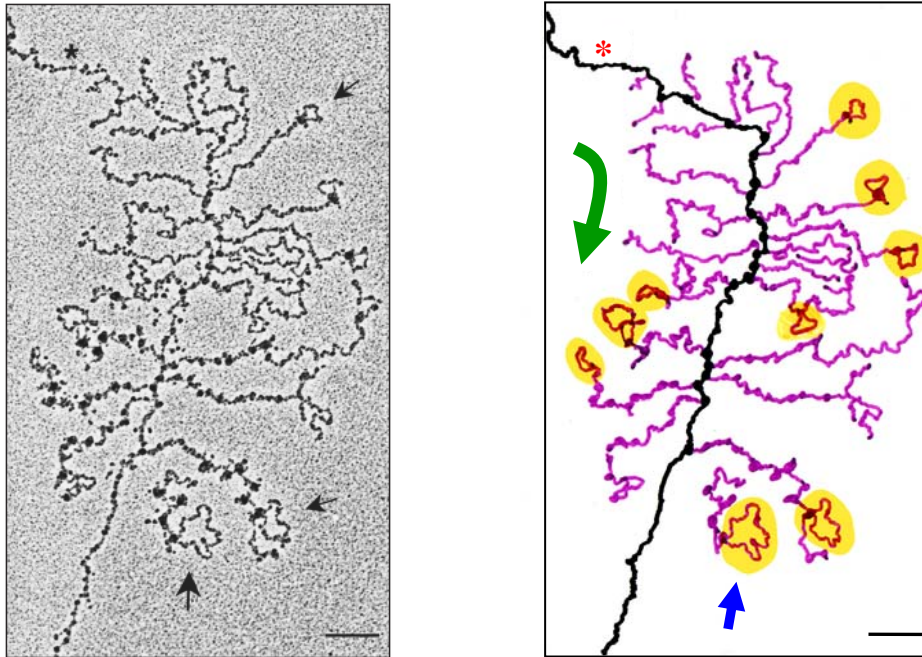


Figura 10. El *splicing* es cotranscripcional. (Izquierda) Micrografía electrónica obtenida por extendidos de cromatina de Miller que permite visualizar directamente el *splicing* cotranscripcional. La foto corresponde a un gen de *Drosophila* que abarca aproximadamente 6 kb de DNA. (Derecha) Reproducción artística por A.R.K. que resalta aspectos importantes de la fotografía. El DNA (en negro) ingresa por la parte superior izquierda en la micrografía y sale por la parte inferior izquierda. La transcripción inicia cerca del sitio señalado con un asterisco y progresa en la dirección señalada por la flecha verde. Los transcritos de RNA naciente (en violeta) lucen como fibras de longitud creciente que emanan del molde de DNA. Los transcritos sufren *splicing* cotranscripcional (sombreado en amarillo) de acuerdo con la formación y eliminación progresiva de los intrones en forma de lazos de distintos tamaños (en rojo) cerca del extremo 5' de los transcritos. La flecha azul señala a un transcripto cercano al extremo 3' del gen que está desprendido del molde de DNA y fue capturado en la foto en el momento de la terminación y liberación del mRNA. Barra: 200 nm. Extraído de (Proudfoot 2000). Reproducción de Beyer and Osheim, 1988.

## 4.2 Modelo de reclutamiento de factores de *splicing* por la pol II

### 4.2.1 CTD y acoplamiento

La eficiencia del *splicing* de un mismo gen depende del tipo de polimerasa que dirige su transcripción. Dado que la naturaleza química de cualquier RNA es la misma independientemente de la polimerasa que lo produce, ¿qué confiere a la pol II la capacidad de acoplar los procesos de transcripción y *splicing*? En la actualidad casi

todas las explicaciones tendientes a resolver el problema del acoplamiento señalan al CTD de la RNA polimerasa II como el punto central en la conexión de los distintos procesos. El CTD es de hecho lo que más diferencia a la pol II de las demás RNA polimerasas nucleares. Poco después de su descubrimiento hace unos 20 años, la estructura inusual del CTD provocó especulaciones acerca de su posible función (Allison et al. 1985; Corden et al. 1985). Resultaba natural suponer que estaría vinculado a la transcripción, lo cual fue demostrado en primer lugar (Allison y Ingles 1989). Sin embargo, fue también propuesto tempranamente como un dominio capaz de reclutar actividades relacionadas al procesamiento de transcritos sintetizados por la pol II (Howe 2002). Greenleaf sugirió inicialmente que las cargas negativas del CTD hiperfosforilado funcionarían como una estructura iónica para el reclutamiento de proteínas SR que están cargadas positivamente (Greenleaf 1993), y que la fosforilación tanto del CTD como de las proteínas SR modularía la interacción. Aunque esta interacción directa nunca fue demostrada, la hipótesis de Greenleaf estimuló la búsqueda de otros factores de procesamiento que interaccionaran con el CTD.

Las primeras evidencias de interacción física demostraron que la pol II, snRNPs e intermediarios de *splicing* coinmunoprecipitan con anticuerpos dirigidos contra el CTD fosforilado (Chabot et al. 1995; Vincent et al. 1996; Kim et al. 1997). Otros estudios demostraron que la pol II se asocia a proteínas SM (componentes de snRNPs) y que colocaliza con regiones nucleares enriquecidas en proteínas SR conocidas como *speckles* (Mortillaro et al. 1996). Estas evidencias iniciales demostraron una interacción *in vitro* entre factores de *splicing* con la pol II y no necesariamente en forma directa con el CTD. Las primeras interacciones directas con el CTD en células fueron demostradas a través de la técnica de doble híbrido en levaduras. Esto permitió descubrir un nuevo grupo de proteínas similares a proteínas SR (SCAFs) capaces de interaccionar con el CTD (Yuryev et al. 1996). Las SCAFs contienen dominios RS que, contrariamente a la hipótesis de Greenleaf, no participan en la interacción con el CTD y contienen otro dominio de interacción con el mismo (Yuryev et al. 1996). Sin embargo no se ha demostrado que las SCAFs participen en el *splicing*. Otros factores que presentan interacciones directas con el CTD incluyen a p54<sup>nrb</sup>, PSF (*PTB-associated splicing factor*) (Emili et al. 2002), CA150 (Carty et al. 2000), Ess1 (Myers et al. 2001) y Prp40 (Morris y Greenleaf 2000).

Además de las evidencias de interacciones físicas entre el CTD y factores de *splicing*, varias evidencias funcionales han demostrado la participación del CTD en el acoplamiento. El procesamiento cotranscripcional requiere que los factores de *splicing* sean reclutados activamente al sitio de transcripción o directamente al transcripto nascente. De hecho, la distribución de los factores de *splicing* está restringida espacialmente y coordinada dentro del núcleo. Esta organización subnuclear de los factores de *splicing* es distorsionada por agentes que bloquean la transcripción (Misteli 2000). Del mismo modo el CTD es requerido para el correcto reclutamiento de factores de *splicing* a los sitios de transcripción (Misteli y Spector 1999). Esto es consistente con hallazgos previos que demuestran que la sobre-expresión en células de péptidos de CTD de tamaño creciente desorganizan la distribución en *speckles* de factores de *splicing* llevando a un patrón más difuso (Du y Warren 1997). Cuando la transcripción es dirigida por una polimerasa con un CTD trunco, tanto el *splicing* como el *capping* y la poliadenilación resultan inhibidos (McCracken et al. 1997). Si bien la inhibición del *capping* se explica al tener en cuenta la interacción directa encontrada entre el CTD y factores de *capping* (Cho et al. 1997; McCracken et al. 1997; Yue et al. 1997; Cho et al. 1998; Ho et al. 1998), el efecto sobre el *splicing* no ha sido aún resuelto.

Resulta claro que el CTD participa en el *splicing* cotranscripcional, sin embargo también es capaz de afectar al *splicing* de modo directo, independientemente de la transcripción. Esto fue demostrado *in vitro* sobre transcriptos presintetizados, en los cuales la presencia de pol II0 o de péptidos de CTD híbridos en su estado fosforilado aumentan significativamente la velocidad de ensamblaje del *spliceosoma* (Hirose et al. 1999; Millhouse y Manley 2005). No obstante, al igual que en caso de la transcripción, el CTD no es esencial para la actividad catalítica del *splicing*. Tanto *in vitro* como *in vivo* el *splicing* puede ocurrir en ausencia de transcripción e independientemente del CTD (Zeng y Berget 2000; Bird et al. 2004). Mientras que el *splicing* de ciertos genes está inhibido cuando la transcripción es dirigida por una polimerasa sin CTD (McCracken et al. 1997; Rosonina et al. 2003), en otros genes la eficiencia del *splicing* general no depende del mismo (Laurencikiene et al. 2006). Estas consideraciones sugieren que el CTD juega un papel regulatorio en el *splicing*, afectando la eficiencia y/o la selección diferencial de sitios de *splicing* dependiendo de la naturaleza y contexto de la unidad transcripcional sintetizada. Una posibilidad interesante sugiere que el CTD estimula el *splicing* sólo cuando los sitios

involucrados se hallan dispuestos en una polaridad exónica y no en una polaridad intrónica (Zeng y Berget 2000). Esto indica que el CTD participaría en la definición exónica actuando no sólo como una plataforma de unión para factores de *splicing*, sino también acercando a los exones consecutivos y facilitando el ensamblaje del *spliceosoma*.

#### **4.2.2 Factores involucrados en el acoplamiento**

Un análisis reciente por proteómica del *spliceosoma* humano, reveló que al menos 30 proteínas de las 145 encontradas son factores que se sabe participan del acoplamiento o son candidatos a serlo (Zhou et al. 2002; Jurica y Moore 2003). En otro estudio similar se demostró que la pol II, junto con factores generales de la transcripción, puede copurificar con componentes del *spliceosoma* y que la mayor parte de la pol II encontrada en este complejo está en su estado hipofosforilado IIA (Robert et al. 2002). Esto implica que una parte significativa de la actividad asociada al *splicing* podría ser reclutada al PIC por el promotor durante la iniciación de la transcripción, posiblemente a través de factores que se unen al mismo. Algunos factores muestran funciones duales al actuar en la transcripción y en el *splicing*, como el activador transcripcional HPV (*human papilloma virus*) (Lai et al. 1999), la proteína EWS (*Ewing sarcoma protein*) (Yang et al. 2000), el coactivador p52 (Ge et al. 1998), las proteínas CAPER (Dowhan et al. 2005), o el coactivador termogénico PGC-1. Por ejemplo, resulta interesante que PGC-1 puede afectar el *splicing* alternativo sólo cuando es reclutado a complejos que interaccionan con el promotor (Monsalve et al. 2000). Varias revisiones que profundizan más sobre los factores duales que conectan la transcripción y reacciones de procesamiento han sido publicadas recientemente (Goldstrohm et al. 2001; Howe 2002; Maniatis y Reed 2002; Kornblihtt et al. 2004).



### 4.2.3 Promotores y acoplamiento

La regulación del *splicing* por factores reclutados al inicio de la transcripción, fue originalmente sugerida por trabajos realizados en nuestro grupo que demostraron que diferencias en la estructura del promotor conducían a diferencias en el *splicing* alternativo del transcripto (Cramer et al. 1997). El sistema analizado en nuestro laboratorio involucra la transfección transitoria de células de mamífero con minigenes que poseen el exón alternativo EDI, el cual codifica una repetición facultativa de la fibronectina humana (ver más adelante). EDI contiene un ESE capaz de estimular la utilización del sitio de *splicing* 3' subóptimo presente en el exón. Este ESE es blanco para las proteínas SR SF2/ASF y 9G8 (Lavigneur et al. 1993; Cramer et al. 1999). La sobreexpresión de SF2/ASF y 9G8 estimula significativamente la inclusión de EDI, pero este efecto parece estar modulado por la identidad del promotor (Cramer et al. 1999). El efecto del promotor no es la consecuencia trivial de los diferentes niveles de RNA producidos por cada promotor (fuerza del promotor), sino que depende de las propiedades cualitativas conferidas por los promotores a la maquinaria de transcripción/*splicing*. Este fenómeno fue más tarde corroborado en otros genes que sufren *splicing* alternativo (Auboeuf et al. 2002; Pagani et al. 2003; Robson-Dixon y García-Blanco 2004).

Los hallazgos sobre el efecto del promotor sugieren que los patrones de *splicing* alternativo específicos de tipo celular no dependerían sólo de la abundancia relativa de factores de *splicing*, sino también de la ocupación del promotor. En la naturaleza, sin embargo, los promotores no son cambiados y casi todos los genes poseen sólo un promotor. La única manera en que un promotor podría afectar el *splicing* alternativo *in vivo* sería a través de la ocupación diferencial del promotor por factores de transcripción de distinta naturaleza y con distintas propiedades. Así, cada tipo celular o estado fisiológico, podría determinar la ocupación de cada promotor afectando a su vez el *splicing* alternativo. En este sentido, en nuestro grupo se demostró que distintos activadores transcripcionales dirigidos al promotor afectan el *splicing* alternativo diferencialmente. Activadores clase I (Blau et al. 1996), como SW6, Sp1 y CTF/NF1, que estimulan sólo la iniciación de la transcripción, tienen poco efecto sobre la inclusión de EDI. Por otro lado, activadores clase II, como VP16, que estimulan tanto la iniciación como la elongación de la transcripción, disminuyen notablemente la

inclusión de EDI (Nogués et al. 2002). Algo similar fue descrito por Auboeuf y colaboradores que demostraron que las hormonas esteroides son capaces de afectar el *splicing* alternativo de genes sólo cuando la transcripción es dirigida por promotores sensibles a esteroides (Auboeuf et al. 2002). Asimismo, distintos correguladores de los receptores esteroides afectan diferencialmente al *splicing* alternativo (Auboeuf et al. 2004a; Auboeuf et al. 2004b) lo cual apoya la idea de que la ocupación diferencial del promotor afecta el patrón de *splicing* alternativo resultante.

Originalmente los hallazgos del efecto del promotor sobre el *splicing* alternativo de EDI fueron interpretados desde el punto de vista del reclutamiento de factores de *splicing* por la maquinaria transcripcional. Sin embargo, algunos hechos hicieron pensar en la posibilidad de que un mecanismo alternativo operara conjuntamente en el acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* de EDI. En primer lugar se sabía que pausas transcripcionales afectaban la competencia de sitios alternativos de poliadenilación y de *splicing* (Roberts et al. 1998; Yonaha y Proudfoot 1999). Por otro lado, sólo los factores de transcripción con capacidad de estimular selectivamente la elongación por la pol II eran capaces de afectar la inclusión de EDI (Nogués et al. 2002). En el mismo sentido la replicación del molde de DNA, que introduce una estructura cromatínica compacta sobre el molde, aumentaba significativamente la inclusión de EDI (Kadener et al. 2001). Todas estas evidencias llevaron a proponer un modelo cinético según el cual las velocidades relativas de la transcripción y del *splicing* podrían modular el *splicing* alternativo.

### **4.3 Modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo**

El *splicing* alternativo implica la existencia de sitios subóptimos de *splicing* que son débilmente reconocidos por la maquinaria del *spliceosoma*, lo cual da por resultado la competencia de sitios. Tomando como ejemplo el caso de un exón *cassette* alternativo, puede observarse que en general el sitio de *splicing* 3' sobre el exón es un sitio débil que está seguido por un sitio 3' más fuerte en el exón río abajo. Desde el punto de vista cotranscripcional del *splicing*, el sitio 3' débil está favorecido temporalmente dado que puede ser “visto” por la maquinaria de *splicing* antes de que el segundo sitio 3' río abajo sea sintetizado, ofreciendo la posibilidad de ser utilizado

en primer lugar. Sin embargo, el sitio 3' débil puede eventualmente ser seleccionado en menor proporción que el sitio más fuerte río abajo. Esto es posible porque las distintas reacciones involucradas en la síntesis del mRNA, ocurren con una cinética tal que permite la competencia de sitios (Neugebauer 2002). Considerando un exón con sus intrones flanqueantes de tamaños promedio (150 pb para exones y 3000 pb para intrones), la transcripción y el *splicing* ocurren a velocidades tales que, antes de que el primer sitio pueda ser utilizado, el segundo ha sido ya sintetizado. Por otro lado, se sabe que la estructura secundaria que adopta el RNA en torno a sitios de *splicing* afecta la disponibilidad de los mismos y por ende la eficiencia del *splicing* (Eperon et al. 1988; Muro et al. 1999). La estructura secundaria, puede formarse sólo durante una ventana temporal determinada por el tiempo que lleva transcribir las secuencias involucradas en dicha estructura, la velocidad de plegamiento de la misma y la velocidad de unión de factores a sitios contenidos dentro de la estructura (Eperon et al. 1988). Por ejemplo, un determinado sitio de *splicing* puede ser utilizado sólo si el *spliceosoma* es capaz de reconocerlo antes de que el mRNA adopte una conformación que lo ocluya. Estas consideraciones implican que la cinética de las reacciones involucradas en la síntesis de un mRNA determinado dictaría el patrón de *splicing* alternativo resultante. Si se varía la velocidad relativa de alguna de las reacciones, es de esperar que el patrón de *splicing* alternativo sea afectado.

De acuerdo con este modelo varias evidencias de nuestro laboratorio mostraron que el *splicing* alternativo de EDI es afectado por distintos cambios que afectan a la elongación. En general se encontró una correlación inversa según la cual los cambios que aumentan la velocidad de elongación disminuyen la inclusión de EDI, mientras que los cambios que disminuyen la elongación aumentan la inclusión de EDI. Si se coloca el *enhancer* del virus SV40 cercano a un promotor, la elongación aumenta significativamente y esto a su vez provoca una disminución de 3 a 10 veces en la inclusión de EDI, independientemente del promotor utilizado (Kadener et al. 2002). El tratamiento de células con DRB o flavopiridol, drogas que inhiben al factor de elongación pTEFb, reducen la elongación de la pol II (Price 2000; Ni et al. 2004) y a su vez producen un aumento en la inclusión de EDI (Nogués et al. 2002). A los fines de estudiar el efecto de la elongación sobre el *splicing* alternativo con una aproximación más directa, en esta tesis se utilizó como herramienta una pol II con una mutación puntual (C4) que le confiere una velocidad de elongación reducida, posiblemente como resultado de un cambio conformacional que afecta las

propiedades intrínsecas de la pol II (Coulter y Greenleaf 1985). Esto está desarrollado en el capítulo I de esta tesis.

## 5. Fibronectina como gen modelo

En la mayor parte de esta tesis se utilizó a la fibronectina (FN) como gen modelo de estudio, y en particular a su exón alternativo EDI. La FN es una glicoproteína de alto peso molecular que está en la matriz extracelular (MEC), y es la proteína de MEC más distribuida y mejor caracterizada (Kornblihtt et al. 1996). Además de localizar en tejido conectivo y lámina basal, la FN está presente a alta concentración en plasma. La FN tiene un rol esencial en adhesión y migración celular en procesos como la embriogénesis, malignidad tumoral, hemostasis, cicatrización de heridas, respuesta inmune y mantenimiento de la integridad de tejidos. Su importancia queda demostrada por el hecho de que ratones *knockout* para la FN son inviábiles (George et al. 1993).

Existen dos formas mayoritarias de FN: una forma dimérica soluble que es sintetizada en hepatocitos y secretada al torrente sanguíneo (FN plasmática), y una forma dimérica o multimérica sintetizada en fibroblastos, células epiteliales y otros tipos celulares, que es depositada como fibras en la MEC (FN celular). Las dos formas están compuestas por péptidos similares de aproximadamente 250 kDa, que comparten una organización modular común constituida por unidades de 40, 60 y 90 aminoácidos llamadas repeticiones de homología tipo I, II y III respectivamente (Petersen et al. 1983) (Figura 11). El gen de FN abarca 75 kb, contiene 50 exones y es transcrito a partir de un solo promotor.

El gen de FN está sujeto a *splicing* alternativo en tres regiones, EDII, EDI y IIICS (Figura 11). EDII y EDI son exones *cassette* alternativos que codifican repeticiones tipo III y pueden ser incluidos o excluidos del mRNA maduro. La región IIICS

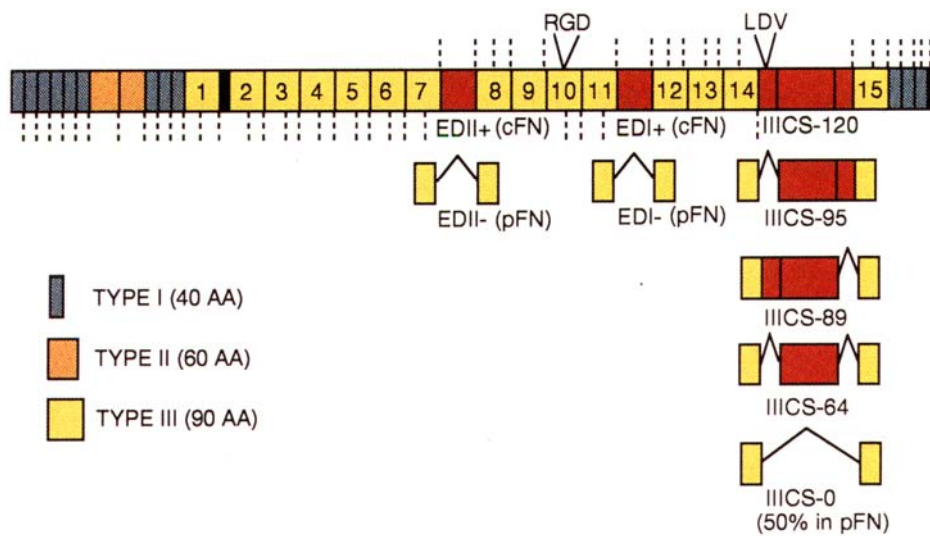


Figura 11. Variaciones de la estructura primaria de la fibronectina. El esquema superior representa el polipéptido de mayor longitud posible con sus homologías internas. Se indican los sitios de unión a integrinas: RGD, constitutivo; LDV, alternativo. Las líneas punteadas indican la posición aproximada de los intrones. Las repeticiones de tipo III están numeradas de 1 a 15. La numeración excluye a EDI y EDII. Extraído de Kornblihtt 1996.

presenta un modo particular de *splicing* con sitios 5' y 3' alternativos que, combinados con retención de intrones, producen cinco variantes de *splicing* en humanos (Gutman y Kornblihtt 1987). En total, 20 isoformas distintas de FN pueden ser generadas por *splicing* alternativo.

El exón EDI (*extra domain I*) codifica una repetición tipo III que, al igual que las demás repeticiones de su tipo, conforma un dominio estructural independiente. La inclusión de EDI es exclusiva de la FN celular, detectada en fibroblastos y ausente en el hígado, el cual produce FN plasmática (Kornblihtt et al. 1984). La FN EDI<sup>+</sup> es poco abundante en la MEC de adultos, y es sobreexpresada en tejidos en alta proliferación tales como el tejido embrionario (Norton y Hynes 1987; Vartio et al. 1987) y tumores hepáticos malignos (Oyama et al. 1989). La inclusión de EDI aumenta en condiciones patológicas específicas como la cicatrización de heridas (French-Constant et al. 1989; Kuhn et al. 1989; Brown et al. 1993) y la fibrosis epitelial (Barnes et al. 1994).

La función de EDI parece estar relacionada fundamentalmente a la cicatrización de heridas. EDI se encuentra aumentado en heridas pulmonares y de piel, con lo cual se cree que puede contribuir a generar una MEC que facilita la cicatrización a través de

promover la migración celular (French-Constant et al. 1989; Brown et al. 1993). Estudios más recientes demostraron que EDI activa a un receptor del tipo Toll-like (TLR4), y estaría involucrado en la respuesta inflamatoria (Okamura et al. 2001). La importancia de EDI fue confirmada a través de ratones *knock-out* para este exón que mostraron deficiencias en la cicatrización de heridas, tiempo de vida más corto que ratones control y deficiencias en la coordinación motora (Muro et al. 2003; Chauhan et al. 2005).

El *splicing* alternativo de EDI puede ser reproducido eficientemente en transfecciones transitorias de líneas celulares con minigenes híbridos compuestos por un fragmento de 3 kb que abarca a EDI con sus intrones flanqueantes y parte de sus exones vecinos, insertado en el exón 3 del gen de  $\alpha_1$ -globina (Vibe-Pedersen et al. 1984) (Figura 12A). Esto permitió demostrar que EDI posee un ESE rico en purinas con la secuencia GAAGAAGAC capaz de unirse a proteínas SR que estimulan al sitio 3' débil de EDI (Lavigneur et al. 1993; Caputi et al. 1994), y un elemento exónico río abajo del ESE que regula negativamente la inclusión de EDI a través de afectar la estructura secundaria del RNA y la disponibilidad del ESE (Muro et al. 2003; Buratti et al. 2004) (Figura 12B).

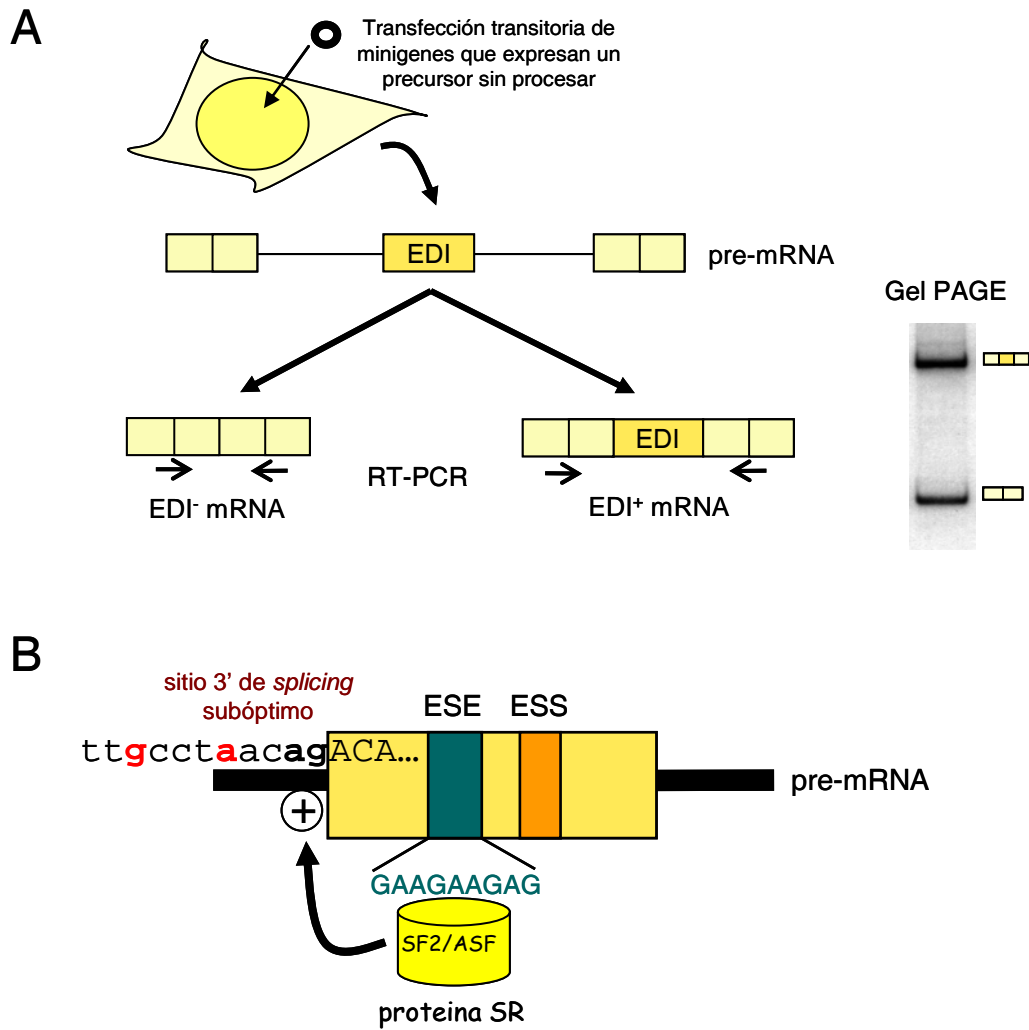


Figura 12. Reproducción del *splicing* normal de EDI en transfecciones transitorias. (A) Los minigenes son transfectados en líneas celulares. El patrón de *splicing* es posteriormente analizado por RT-PCR visualizando los productos en un gel de poliacrilamida (PAGE). (B) Elementos regulatorios en cis sobre el exón EDI (ESE y ESS) y factores en *trans* que lo regulan (proteínas SR).

## Objetivos

El objetivo general de esta tesis es investigar el rol de la pol II en la regulación *splicing* alternativo. Intentaremos demostrar la validez de los modelos de reclutamiento y elongación en distintos genes modelo que poseen *splicing* alternativo, por medio de mutantes de pol II capaces de reemplazar la función de la polimerasa endógena.

### Objetivos específicos

- Validar el modelo cinético de regulación de *splicing* alternativo por medio de una mutante lenta de pol II (mutación C4) y distintos minigenes regulados por *splicing* alternativo.
- Estudiar el *splicing* alternativo de genes endógenos en moscas mutantes C4.
- Validar el modelo de reclutamiento de factores de *splicing* por el CTD por medio de mutantes de pol II que presentan una eliminación completa o parcial de este dominio.



## Capítulo I

### **Una mutante lenta de la RNA polimerasa II afecta el *splicing* alternativo *in vivo***

Estudios anteriores de nuestro grupo sugirieron a través de evidencias indirectas la existencia de una correlación inversa entre la velocidad de elongación y la inclusión del exón alternativo EDI. El nivel de exclusión de EDI correlacionaría con la velocidad de elongación, pero no con el simple aumento del nivel total de transcriptos acumulados (Kadener et al. 2001; Kadener et al. 2002; Nogués et al. 2002).

De acuerdo a lo discutido en la introducción, se propuso un modelo cinético de acoplamiento según el cual la velocidad de elongación de la pol II determina el producto final resultante de la competencia entre dos reacciones de *splicing* que ocurren cotranscripcionalmente (Caceres y Kornblihtt 2002).

En este capítulo demostraremos, con el uso de una herramienta directa, el modelo cinético de acoplamiento transcripción y *splicing*. También demostraremos que la regulación del *splicing* alternativo por la elongación transcripcional puede ocurrir *in vivo* en el gen endógeno *Ultrabitórax (Ubx)* de *Drosophila*, lo cual podría estar relacionado al fenotipo de moscas que poseen una polimerasa mutante con una reducida capacidad de elongación.

## Resultados

### Una mutante lenta de pol II como herramienta estudiar el acoplamiento

Para probar el modelo cinético con una estrategia más directa, utilizamos una pol II que contiene una mutación puntual (R749H) en su subunidad mayor, equivalente a la mutación C4 de *Drosophila* (R741H). La mutante C4 de pol II muestra una velocidad de elongación reducida *in vitro* (Coulter y Greenleaf 1985) y es menos eficiente en transcribir a través de arrestos transcripcionales en comparación con una pol II salvaje (WT, del inglés *wild type*) (Chen et al. 1996). Transfectamos células de la línea Hep3B (derivadas de hepatoma humano) con minigenes reporteros para *splicing* alternativo del exón EDI, junto con vectores de expresión para la subunidad mayor de la pol II humana (Rpb1) WT o con la mutación C4 (hC4). Ambas variantes de pol II utilizadas en estos estudios contienen una mutación puntual adicional (distinta la mutación C4) que les confiere resistencia a  $\alpha$ -amanitina. Esta toxina es capaz de unirse con muy alta afinidad a la subunidad mayor de la pol II WT e inhibirla completamente. Como control se transfectó una pol II que sólo lleva la mutación de resistencia a  $\alpha$ -amanitina (pol II WT<sup>res</sup>). La transcripción de los minigenes por las RNA polimerasas ectópicas es favorecida a través de la inhibición de la enzima endógena con  $\alpha$ -amanitina (Gerber et al. 1995) (Figura 13). Este ensayo permite obtener una alta expresión de las distintas polimerasas, tanto a nivel del RNA mensajero (mRNA) (Figura 14A) como a nivel de las proteínas (Figura 14B, calles 2 y 3). El peso molecular de la subunidad mayor transfectada en cada caso es idéntico al de la pol II endógena (aproximadamente 240 kDa). Por este motivo incluimos como control positivo un plásmido que expresa una versión de Rpb1 trunca en su CTD ( $\Delta$ CTD, 200 kDa) en una transfección sin los plásmidos de expresión para las subunidades Rpb1 WT<sup>res</sup> y hC4 (calle 1). Tanto la versión trunca como las de la longitud correcta son expresadas a mayores niveles que la Rpb1 endógena. En estas condiciones la Rpb1 C4 sólo provoca un 40% de inhibición de la transcripción (Figura 14C).

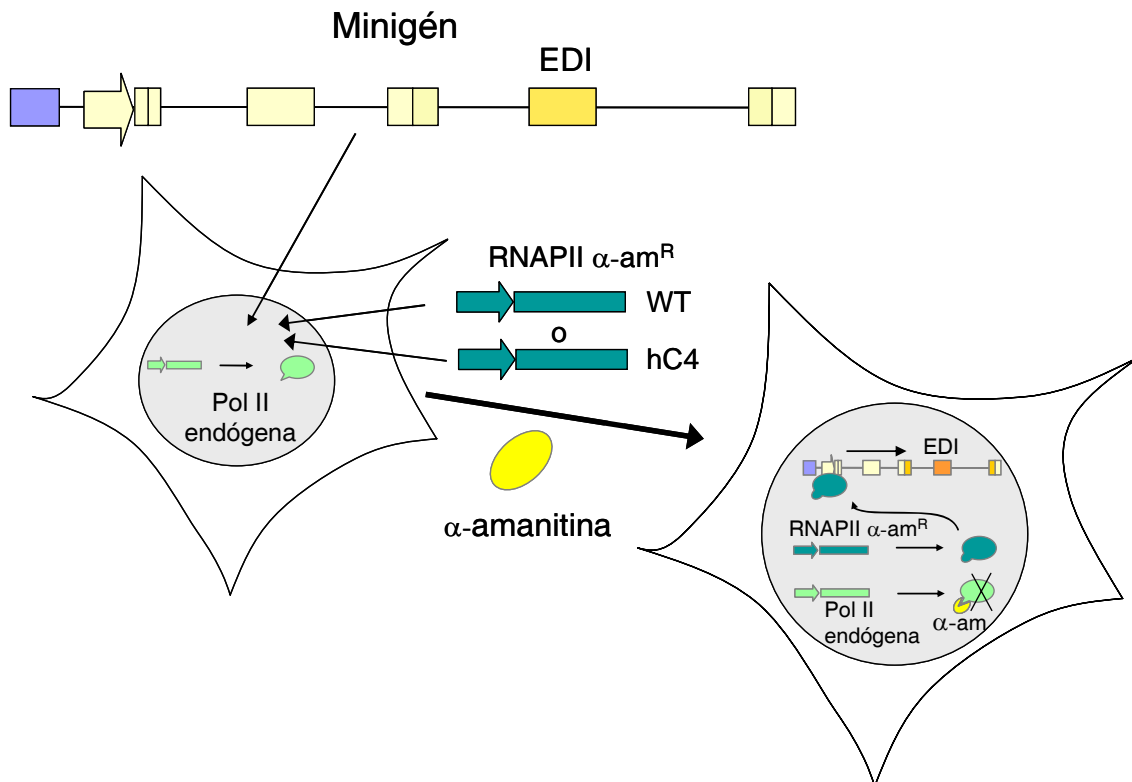


Figura 13. Esquema experimental.

Si bien la mutante C4 originalmente descrita en *Drosophila* promueve una menor elongación *in vitro* (Coulter y Greenleaf 1985), no estaba demostrado que tuviera el mismo efecto *in vivo*. Tampoco estaba demostrado que la misma mutación introducida en la pol II humana causaría un efecto similar sobre la elongación. Esto requería estimar la velocidad de elongación de la mutante hC4 en nuestro sistema. En una primera aproximación asumimos que si la velocidad de elongación *in vivo* estaba reducida en esta mutante, esto se vería reflejado en una menor procesividad por parte de esta polimerasa. Para probar que la mutante de pol II humana era menos procesiva *in vivo*, aislamos RNA total de núcleos de células transfectadas, y determinamos las cantidades relativas de mRNA inmaduro (pre-mRNA) transcrito del minigén, acumulado en regiones proximales vs. distales con respecto al sitio de inicio de la transcripción. En este experimento, se asume que la mayoría de transcritos inmaduros están en íntimo contacto con la pol II en activa transcripción, y por lo tanto reflejan la distribución de la enzima a distintas distancias del promotor. Los niveles de pre-RNA fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real. Para ello se sintetizó cDNA con diferentes

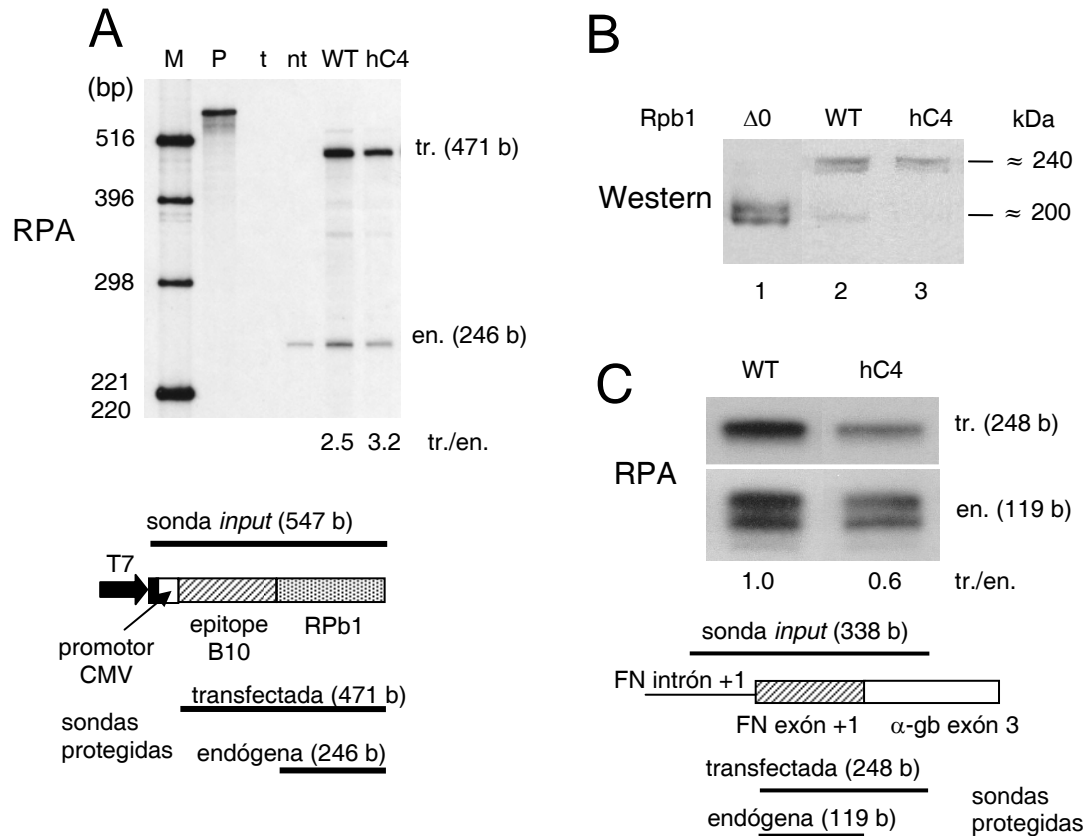


Figura 14. La mutante de pol II humana hC4 (R749H) se expresa correctamente *in vivo*. (A) Ensayo de protección a la RNasa (RPA) para cuantificar los mRNA correspondientes a las subunidades Rpb1 humanas endógenas y recombinantes, expresadas en células Hep3B transfectadas con los plásmidos pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup> (WT) o pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4) y tratadas con  $\alpha$ -amanitina según se indica en materiales y métodos. Se muestran diagramas para la sonda total (P, sonda *input*) y para la sonda protegida. M, estándar de peso molecular; t, control con tRNA de levaduras; nt, células no transfectadas; tr./en., relación de radiactividad entre bandas de Rpb1 transfectada sobre endógena. (B) Western blots de extractos de proteínas totales de células Hep3B transfectadas con pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup> (WT, calle 2), pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4, calle 3), o un plásmido que expresa una versión trunca de Rpb1 humana que carece el dominio carboxilo terminal ( $\Delta$ 0, calle 1). El Western blot se reveló con anticuerpo sc-899 (N20, Santa Cruz Biotechnologies) contra la región N terminal de Rpb1. (C) Ensayo de protección a la RNasa (RPA) para cuantificar mRNA de fibronectina (FN) endógena y mRNA recombinante (FN/ $\alpha$ globina) expresado en células Hep3B transfectadas con pSVEDA/FN y pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup> (WT) o pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4), y tratadas con  $\alpha$ -amanitina según se indica en Materiales y Métodos. Abajo se muestran los diagramas de las sondas protegidas.

*primers* para cada región seguido de la amplificación por PCR de los productos que abarcan las juntas entre un intrón y un exón para cada región, y que por lo tanto corresponden a pre-mRNAs que aun no han sufrido *splicing* (Figura 15). La cantidad de DNA proveniente de la contaminación por el minigén transfectado en las preparaciones de RNA fue estimada en reacciones de PCR en tiempo real en las cuales se omitió la transcriptasa reversa en la reacción de RT. La Figura 15 muestra que la

mutante hC4 de pol II humana provoca un aumento de 2.7 veces en la acumulación de pre-mRNAs proximales (P) sobre distales (D) en comparación con la pol II WT<sup>res</sup>, lo cual revela que la mutación hC4 provoca una disminución de la procesividad en células humanas. Nuestra conclusión fue que la disminución en la procesividad posiblemente reflejaba una disminución en la velocidad de elongación de esta polimerasa.

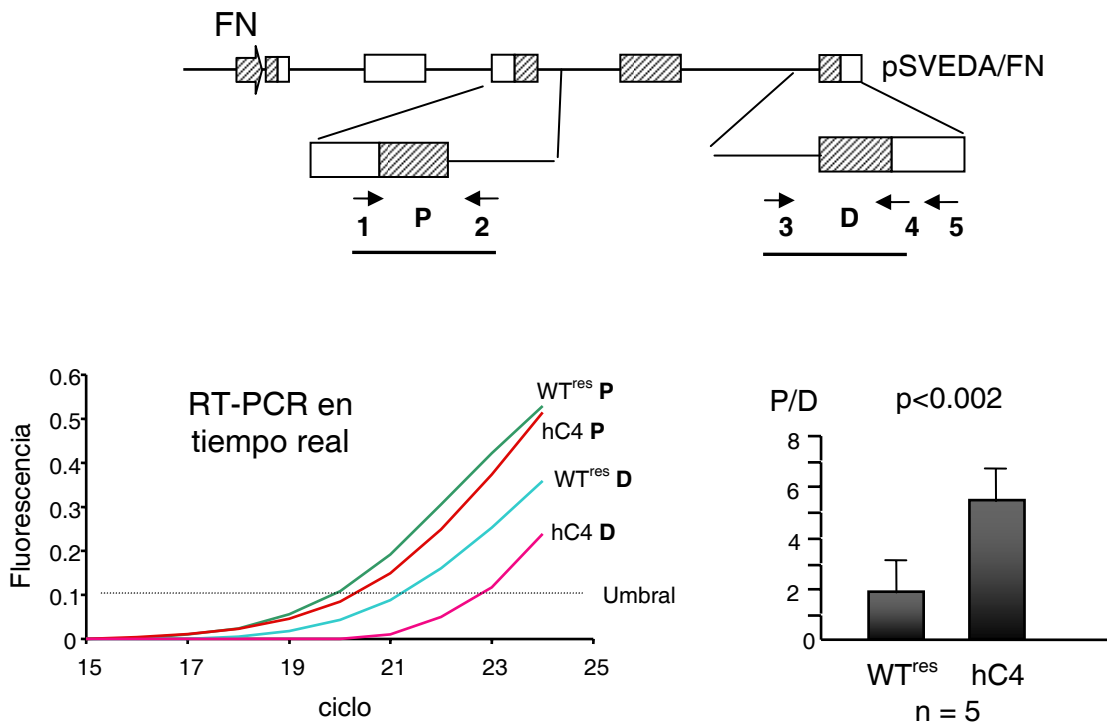


Figura 15. La mutante de pol II humana hC4 (R749H) es menos procesiva *in vivo*. RT-PCR en tiempo real para cuantificar la acumulación de pre-mRNA en regiones proximales y distales con respecto al inicio de la transcripción. Se transfectaron células Hep3B con pSVEDA/FN (diagrama superior) y pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup> (WT<sup>res</sup>) o pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4). Las células fueron tratadas con  $\alpha$ -amanitina según se indica en Materiales y Métodos. Se extrajeron núcleos 48 hs después de la transfección y se sintetizó cDNA utilizando *primers* "2" o "5". Se realizaron reacciones de PCR en presencia de SYBR green utilizando el equipo DNA Engine Opticon System (MJ Research), con los *primers* "1" y "2" para la región proximal (P) y con los *primers* "3" y "4" para la región distal (D). La vista obtenida con el Opticon (abajo, izquierda) ilustra las diferencias en número de ciclo umbral obtenidas en las dos regiones con las pol II WT<sup>res</sup> y hC4. Se muestran los promedios P/D $\pm$ SD de las mediciones en 5 transfecciones independientes (abajo, derecha).

## Determinación de la velocidad de elongación en tiempo real

Por medio de un método desarrollado por Edouard Bertrand (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Francia), pudimos visualizar y medir directamente la velocidad de síntesis de RNA por la pol II a través de la técnica de FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*). Este método permite seguir en tiempo real la síntesis de RNAs nacientes marcados con GFP (proteína fluorescente verde) en una única célula. El reportero utilizado en estos experimentos consiste en un vector de HIV-1 con 24 repeticiones del elemento de unión para la proteína de cubierta del fago MS2, insertadas en la región 3' no codificante (3'UTR) del gen de HIV-1 (Figura 16A). La coexpresión de este reportero con la proteína de fusión MS2-GFP permite la visualización directa de los RNAs en líneas celulares con alta sensibilidad (Fusco et al. 2003).

Para realizar estos experimentos el reportero fue transfectado en forma estable en células humanas U2OS, de modo que al coexpresar MS2-GFP, ésta se une a los elementos MS2 del mensajero naciente, y los sitios de transcripción dentro de cada núcleo son observados como un punto brillante en el nucleoplasma. Esto es consecuencia de la alta concentración de RNA en el punto de síntesis, que resulta del estado estacionario alcanzado entre de la velocidad de síntesis y difusión de los mensajeros. Al irradiar los sitios de transcripción con un láser, la fluorescencia de la MS2-GFP asociada al RNA naciente es extinguida por el fenómeno de *quenching*. Las polimerasas en activa transcripción continúan sintetizando nuevos sitios MS2 lo cual finalmente lleva a una recuperación de la fluorescencia posterior a la extinción (estrategia de FRAP) (Figura 16B). Afortunadamente para los fines de estos experimentos, la unión entre MS2-GFP y los elementos MS2 del RNA naciente es lo suficientemente estable como para permitir evaluar diferencias en la dinámica de movilidad y/o síntesis de los RNAs, y no el simple intercambio de MS2-GFP entre la fracción libre y la unida al mensajero. La velocidad de elongación de la pol II puede por lo tanto ser medida, al determinar el tiempo de recuperación de la fluorescencia después de la extinción (Basyuk et al. 2006, enviado a consideración editorial). Un punto importante a considerar es que la velocidad de iniciación de la transcripción se mantenga constante durante el tiempo de recuperación, de esta manera sólo la elongación determina el tiempo de recuperación de la fluorescencia.

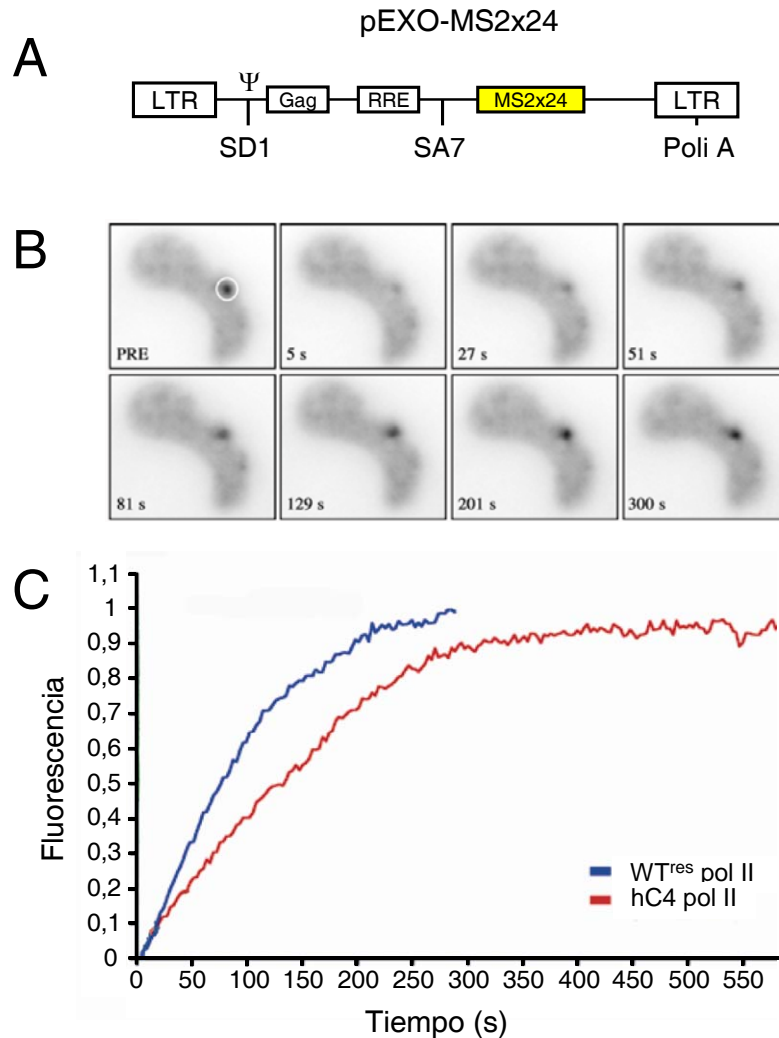


Figura 16. La polimerasa hC4 tiene una velocidad de elongación reducida. (A) Reportero de HIV-1 (pEXO-MS2x24) utilizado para el ensayo de FRAP. El reportero contiene 24 repeticiones de MS2 insertadas en la región 3'UTR, y los elementos más importantes de HIV-1: el LTR 5' (*Long terminal repeat*), el sitio donador principal de *splicing* (SD1), la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ), el gen de la proteína Gag, el elemento regulador RRE, el sitio aceptor de *splicing* A7 (SA7), y el LTR 3' que lleva a cabo el procesamiento 3'. (B) Ensayo de FRAP para sitios de transcripción. El área redondeada indica el sitio de transcripción que es irradiado. La recuperación de la fluorescencia se evalúa a distintos tiempos indicados en segundos (s). (C) Curvas de recuperación de la fluorescencia para las polimerasas WT<sup>res</sup> y hC4. La fluorescencia está normalizada a 1 respecto de la intensidad inicial del sitio de transcripción.

La Figura 16C muestra las curvas de FRAP obtenidas para la pol II WT<sup>res</sup> y hC4 en células U2OS en presencia de  $\alpha$ -amanitina. Puede verse que la recuperación de la fluorescencia para la mutante hC4 es marcadamente más lenta que para la RNA pol WT<sup>res</sup>, con tiempos de recuperación medios de 129s y 75s respectivamente. Estos resultados demuestran definitivamente que la mutante hC4 posee una menor velocidad

de elongación que la polimerasa WT. En consecuencia la mutante de pol II hC4 será denominada de aquí en más mutante “lenta”.

### **La mutante lenta aumenta la inclusión de EDI**

Para estudiar el efecto de la mutante lenta sobre el *splicing* alternativo de EDI, transfectamos células Hep3B con minigenes sujetos a *splicing* alternativo del exón EDI, junto con vectores de expresión para la pol II WT<sup>res</sup> o con la mutante lenta. La transcripción mediada por la pol II lenta estimula la inclusión de EDI aproximadamente 4 veces (Figura 17A), lo cual confirma la hipótesis de la correlación inversa entre la velocidad de elongación y la inclusión de EDI. Sin embargo, la inclusión de otros dos exones alternativos (FN-EDII y exón 7B del gen de la ribonucleoproteína heterogénea A1 [hnRNP A1-E7B]) no es afectada por la pol II lenta (Figura 17B y C). Mientras que el *splicing* de EDI es principalmente controlado por un *enhancer* exónico de *splicing* (ESE) (Caputi et al. 1994), el *splicing* FN-EDII y hnRNP A1-E7B es controlado por elementos intrónicos (Lim y Sharp 1998; Simard y Chabot 2000). Esta diferencia podría explicar la falta de respuesta a la pol II lenta. Además, la falta de respuesta de EDII es consistente con el hecho de que el *splicing* de este exón no es afectado (o lo es marginalmente) por la identidad del promotor (Pagani et al. 2003) o por reguladores transcripcionales de la elongación de pol II (Kadener et al. 2001). De hecho, la falta de respuesta del EDII a la pol II lenta es independiente del promotor que dirige la transcripción (comparar calles 1 y 2 con 3 y 4 de la Figura 17B).

### **La pol II lenta favorece la utilización del sitio 5' distal en el *splicing* del adenovirus E1A**

En nuestra búsqueda de otros sistemas de *splicing* que fueran afectados por la velocidad de elongación de la pol II, consideramos que el adenovirus E1A era un buen candidato dado que el *splicing* de este gen cambia después de la replicación del molde (Adami y Babiss 1991), de la misma manera que EDI (Kadener et al. 2001). El *splicing* de E1A presenta un único sitio de *splicing* 3' y tres sitios de *splicing* 5' alternativos, y da lugar a



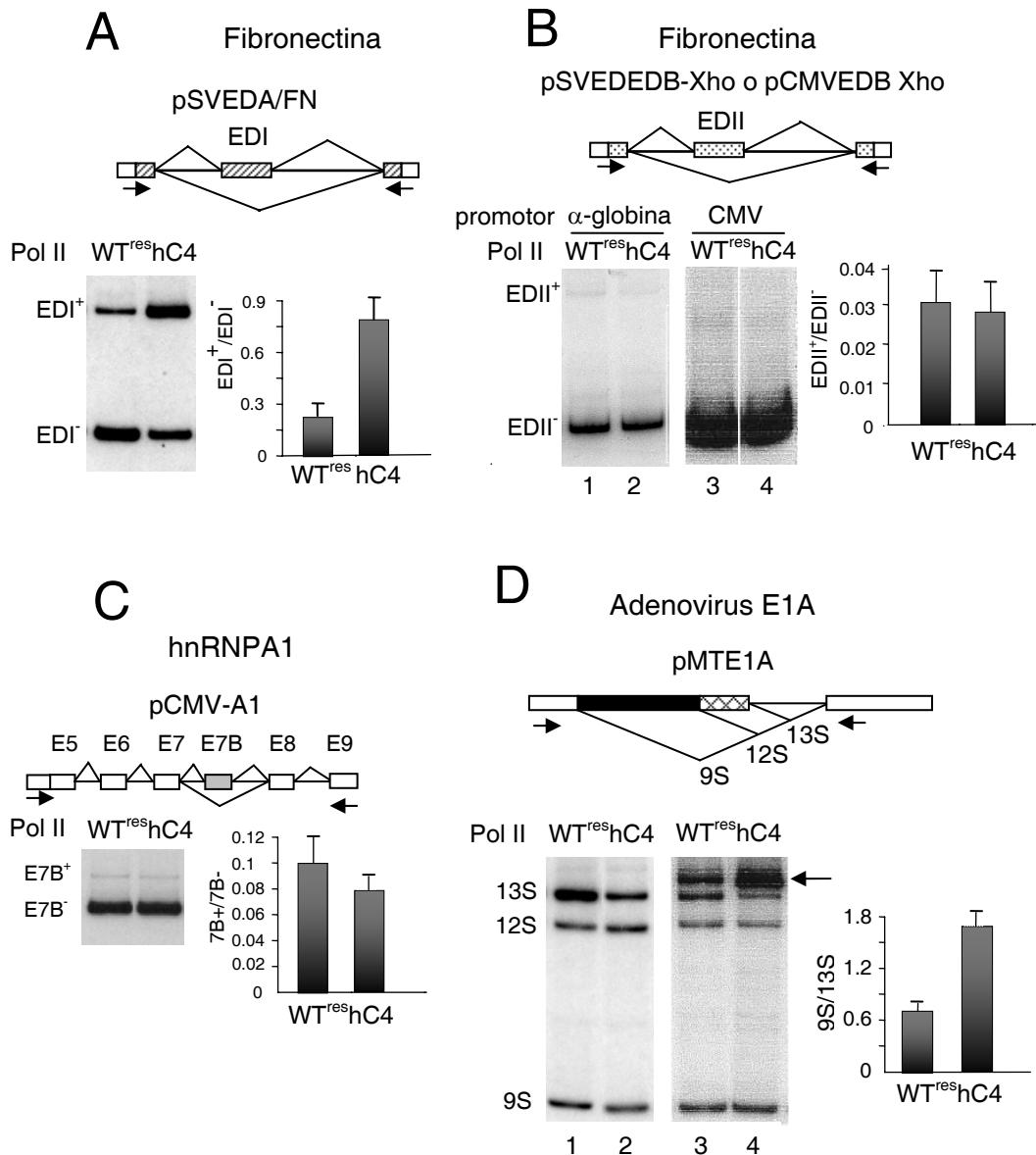


Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de las subunidades Rpb1 WT<sup>res</sup> y lenta (hC4) sobre distintos sistemas de *splicing* alternativo. Se transfectaron células Hep3B con los plásmidos pSVEDA/FN (A), pSVEDEDB-XhoI ([B], calles 1 y 2), pCMVEDB ([B], calles 3 y 4), pCMV-A1(C), o pMTE1A (D). En cada caso las células fueron co-transfectadas con pAT7Rpb1 αAm<sup>r</sup> (WT) o pAT7Rpb1 αAm<sup>r</sup>R749H (hC4), y tratadas con α-amanitina según se indica en Materiales y Métodos. Las posiciones de los primers se indican con flechas debajo de cada diagrama. Los histogramas expresan los promedios ± SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes.

3 isoformas de mensajeros, denominadas 13S, 12S y 9S. La replicación viral provoca un uso preferencial del sitio de *splicing* 5' río arriba (sitio distal con respecto al sitio de *splicing* 3') y origina una mayor proporción de la isoforma corta. Esto ha sido atribuido

a cambios en el estado del DNA molde que podrían reducir la velocidad de elongación de la pol II (Adami y Babiss 1991). Una reducción en la velocidad de elongación podría dar más tiempo a que el complejo de *splicing* se ensamble en el primer sitio de *splicing* 5', favoreciendo su utilización en comparación con el que se encuentra río abajo (sitio proximal con respecto al sitio de *splicing* 3'). Consistente con este hecho se observó un incremento de 3 veces en la proporción de las isoformas más cortas (relación 9S/13S) cuando el minigén reportero E1A (Cáceres et al. 1994) es transcrito por la pol II lenta (Figura 17D calles 1 y 2). Una banda extra señalada con una flecha en la Figura 17D aparece aleatoriamente en las RT-PCRs de E1A. La presencia de esta banda, probablemente causada por el tratamiento con  $\alpha$ -amanitina, no afecta el cambio en la relación 9S/13S observada con la pol II lenta (calles 3 y 4).

### **Efecto dosis respuesta la mutante lenta e independencia con la síntesis de proteínas**

Los efectos de la pol II lenta sobre el *splicing* alternativo de EDI y E1A aumentan con la dosis de  $\alpha$ -amanitina (Figura 18A), lo cual refleja que a mayor inhibición de la pol II endógena en la célula huésped, mayor cantidad de minigenes son transcritos por la pol II lenta recombinante. Por otro lado, la adición de cicloheximida y  $\alpha$ -amanitina a las células transfectadas, no elimina el efecto de la pol II lenta sobre el *splicing* (Figura 18B calles 2 vs. 4), lo cual indica que este efecto no está mediado indirectamente por un producto de la síntesis proteica *de novo*.

### **Efectos de la pol II lenta y del regulador de *splicing* SF2/ASF**

La inclusión de EDI es estimulada por la unión del factor de *splicing* SF2/ASF a la secuencia GAAGAAGAC que está presente en el ESE de EDI, lo cual estimula la utilización del sitio 3' débil de EDI. Además, EDI tiene un elemento silenciador de *splicing* (ESS) río abajo del ESE (Caputi et al. 1994). La mutación del ESE reduce la inclusión de EDI y previene la estimulación de la misma por la pol II lenta (Figura 19A, calles 1-4). Contrariamente, la mutación del ESS provoca un aumento de la inclusión de

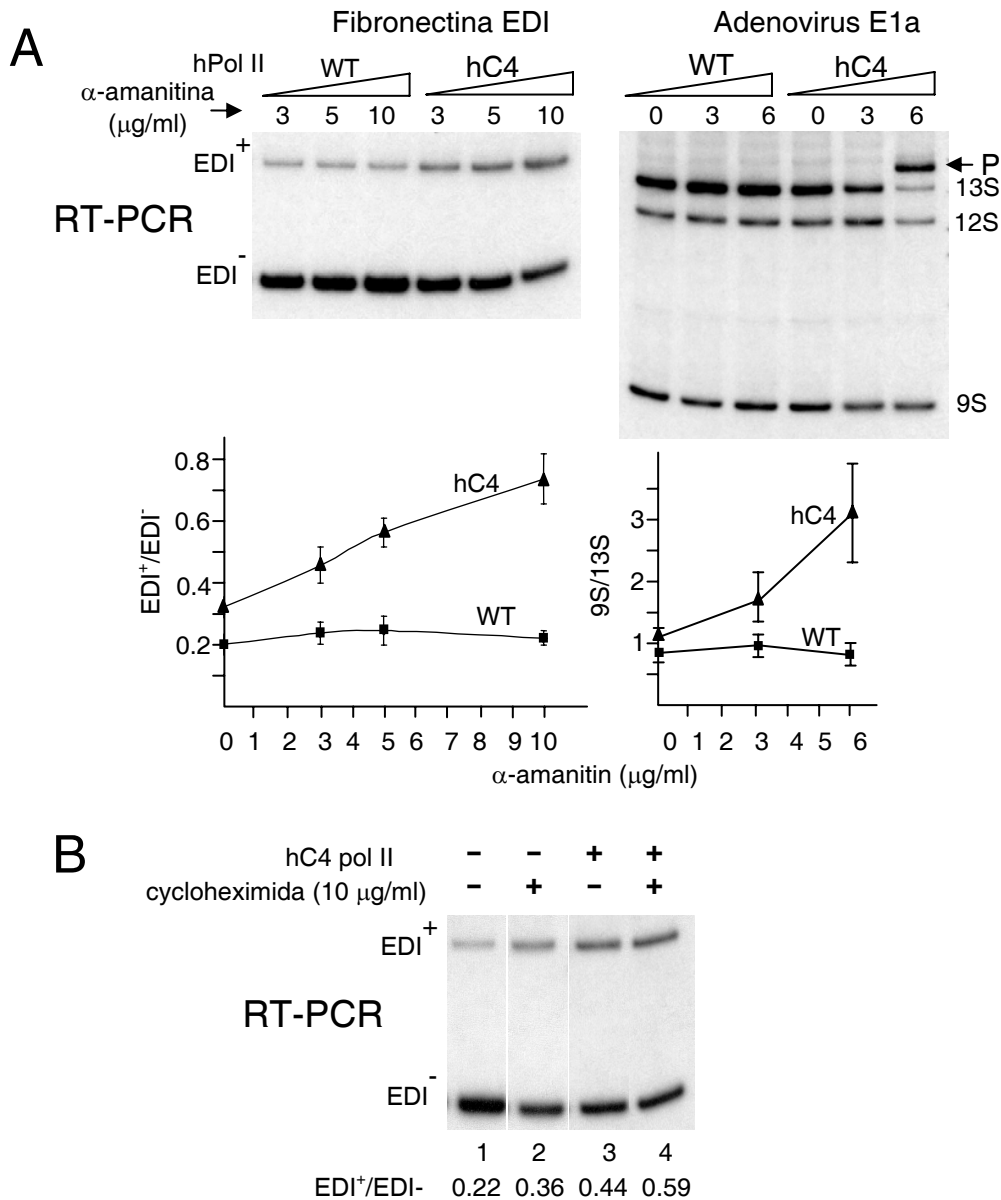


Figura 18. El efecto de la mutante lenta es dependiente de la dosis de  $\alpha$ -amanitina y no depende de la síntesis de proteínas. (A) Efecto dosis-respuesta de la  $\alpha$ -amanitina sobre el *splicing* alternativo de EDI y E1a en células que expresan la mutante lenta de pol II. Se co-transfectaron células Hep3B con pSVEDA/FN (izquierda) y con pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup> (WT) o pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4). 24 hs después de la transfección se agregó a las células la cantidad de  $\alpha$ -amanitina indicada y se incubó por 24 hs adicionales antes de la extracción de RNA. Las curvas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes. (B) El efecto de la mutante lenta sobre EDI no es inhibido por cicloheximida. Se co-transfectaron células Hep3B con pSVEDA/FN (en todas las calles) y pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4) (calles 3 y 4). 24 hs después, las células fueron tratadas sólo con  $\alpha$ -amanitina (calles 1 y 2) o conjuntamente con cicloheximida (calles 3 y 4), a las concentraciones indicadas. En el tiempo entre la transfección y el tratamiento con cicloheximida, la polimerasa recombinante es acumulada según fue demostrado previamente (MacCracken et al., 1997). Las células fueron incubadas por 24 hs adicionales y posteriormente cosechadas. La preparación de RNA y ensayo de RT-PCR se realizó según se describe en materiales y métodos.

EDI de 10 veces (calles 1 y 5) y no interfiere con el efecto de la pol II lenta, la cual induce una estimulación adicional de 3 veces. Esto indica que la pol II lenta no puede sustituir el requerimiento de SF2/ASF para la inclusión de EDI.

Dado que la sobreexpresión de la pol II lenta inhibe parcialmente la transcripción (Figura 14C), también causa una disminución parcial de SF2/ASF. El Western blot de la Figura 19B muestra que un tratamiento con un RNA de interferencia (siRNA) específico para SF2 elimina completamente la sobreexpresión de SF2/ASF (calles 3-6). Por medio de epitope T7, la proteína SF2/ASF recombinante de 36 kDa es diferenciable de la proteína endógena de 33 kDa. A pesar de que la eficiencia de transfección de los plásmidos es sólo del 10-20%, también se observa una disminución de los niveles endógenos de SF2/ASF debida al tratamiento con siRNA (calles 1-3). Esto se debe a que la eficiencia de transfección de los siRNAs es mayor que la observada para los

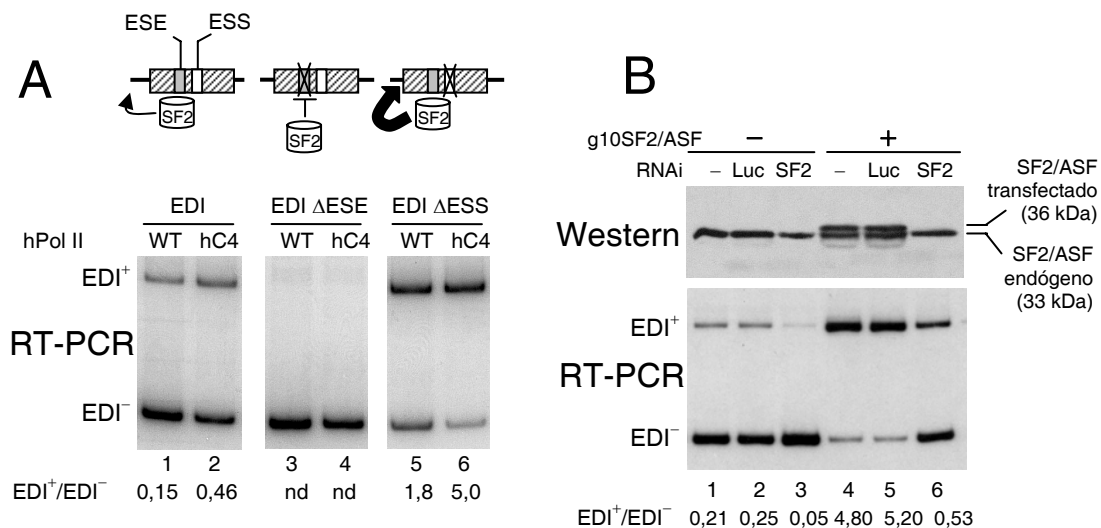


Figura 19. Efectos de la pol II lenta y del regulador de *splicing* SF2/ASF. (A) Efectos causados por la mutación del ESE o del ESS sobre el efecto de la pol II lenta. Los minigenes EDI que tienen ESE y ESS intactos (pSVEDA/FN, calle 1 y 2), ESE mutado (pSVEDA/FN ΔESE, calle 3 y 4), y ESS mutado (pSVEDA/FN ΔESS, calle 5 y 6) se transfirieron en células Hep3B con plásmidos pAT7Rpb1 αAm<sup>r</sup> (WT) o pAT7Rpb1 αAm<sup>r</sup>R749H (hC4) seguido por el tratamiento con α-amanitina y por la determinación del *splicing* alternativo por RT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. (B) Efectos del siRNA contra SF2/ASF en *splicing* alternativo de EDI. Se transfirieron células Hep3B con pSVEDA/FN (todas las calles), un plásmido que expresa SF2/ASF humana con un tag de T7 (G10SF2/ASF, calles 4-6), y siRNA contra luciferasa (control negativo, calles 2 y 5) o SF2/ASF humano (calles 3 y 6). Se extrajo RNA total 48 hs después de la transfección y se determinó el *splicing* de EDI por RT-PCR como se describe en la figura 3A (abajo). En el panel superior se muestra un Western blot de extracto de proteína total proveniente de células transfectadas con un anticuerpo específico para SF2/ASF (mAb 103, Hanamura et al. 1998).

plásmidos. El análisis por RT-PCR en la misma figura indica que la disminución específica de SF2/ASF mediada por siRNA, inhibe los niveles de inclusión de EDI basales (calle 1-3) y estimulados por SF2/ASF (calle 4-6). Esto elimina la posibilidad de que el efecto de la pol II lenta sobre el *splicing* de EDI sea una consecuencia indirecta la disminución de SF2/ASF.

### **El *resplicing* del pre-mRNA de Ubx es estimulado en embriones C4 de *Drosophila***

La mutación C4 en *Drosophila* provoca un aumento sinérgico del fenotipo originado por mutaciones en el gen *Hox Ultrabitorax (Ubx)* (Mortin et al. 1988). Además, las moscas que tienen la mutación C4 en heterocigosis y los dos alelos salvajes de *Ubx*, presentan un fenotipo mutante denominado “efecto Ubx” que es muy similar al fenotipo observado en moscas haploinsuficientes (que expresan cantidad insuficiente) para la proteína Ubx (Greenleaf et al. 1980). Estas observaciones nos llevaron a investigar si el *splicing* alternativo de *Ubx* se encontraba afectado en moscas C4 homocigotas. Estos experimentos fueron hechos en colaboración con el Dr. Claudio Alonso del Departamento de Zoología de la Universidad de Cambridge.

*Ubx* es una unidad transcripcional compleja que tiene tres intrones largos de 7,4; 14,6 y 51,5 kb. Por medio de *splicing* alternativo puede generar hasta seis variantes de mRNA que comparten los exones 5' y 3' (E5' y E3' respectivamente) y poseen inclusión alternativa de tres unidades internas: el elemento B y dos microexones mI y mII (Figura 20A). Las isoformas más abundantes de *Ubx* (Ia, IIa, IVa y Ib) están sujetas a patrones de expresión específicos espacio-temporales (Hatton et al. 1998). El *splicing* de mI o mII con el exón E5' que elimina el primer intrón, regenera un sitio de *splicing* 5' consenso en la nueva juntura exón-exón resultante. Por lo tanto, mI y mII son unidos constitutivamente al E5' en el transcripto naciente y removidos, en un paso siguiente, junto con el intrón río abajo por un mecanismo conocido como *resplicing* o *splicing recurrente*. Variando la longitud de los intrones de *Ubx*, Hatton et al. (1998) demostraron que el *resplicing* es más eficiente cuando el intrón río abajo es lo suficientemente largo como para permitir la regeneración de un sitio de *splicing* 5' antes de que el siguiente exón sea transcripto. A partir de este resultado se puede predecir que

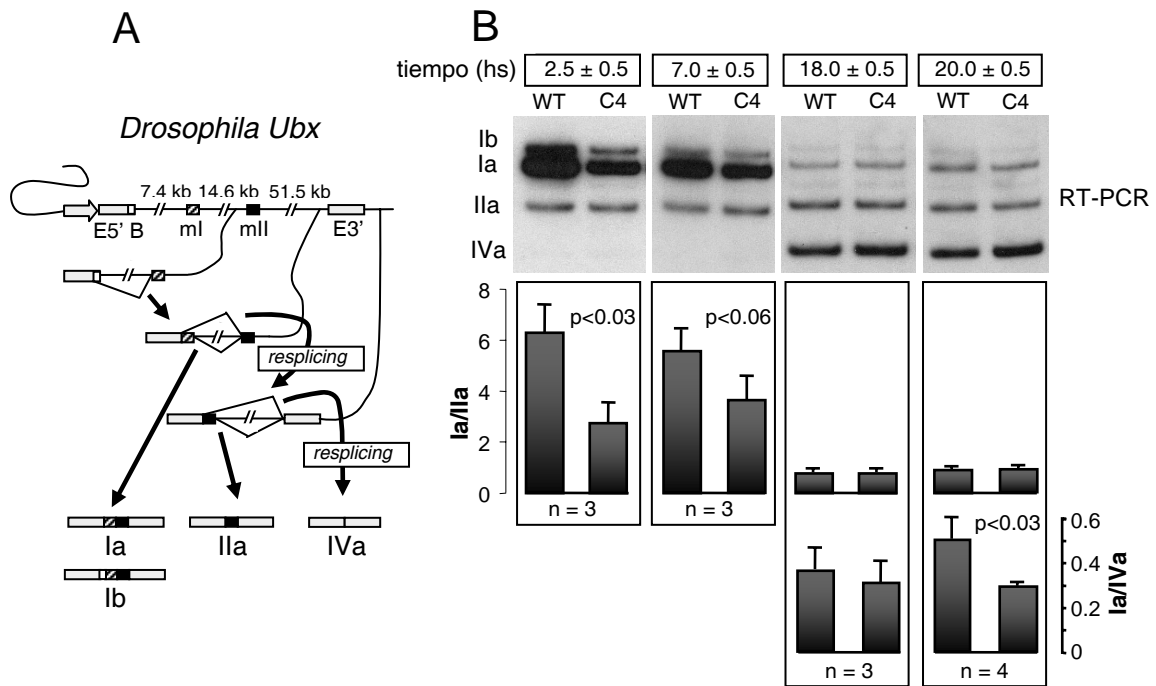


Figura 20. El *reslicing* de *Ubx* es afectado en embriones C4 de *Drosophila*. (A) Diagrama del gen *Ubx* de *Drosophila* y de las diferentes isoformas de *splicing* alternativo Ia, IIa, IVa y Ib. E5', exón 5'; ml y mII, microexones I y II; E3', exón 3'; B, elemento B. (B) RT-PCR radiactiva para evaluar la abundancia relativa de las isoformas de mRNA de *Ubx* en embriones de *Drosophila* colectados a diferentes tiempos durante el desarrollo. Los histogramas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres recolecciones independientes (n) para cada ventana de tiempo.

una disminución en la velocidad de transcripción favorecería el *reslicing* y por ende aumentaría la abundancia relativa de las isoformas más cortas. Al medir los niveles relativos de las isoformas de mRNA de *Ubx* en embriones de *Drosophila* C4 durante el desarrollo, encontramos que el *reslicing* de *Ubx* estaba aumentado en las moscas C4 (Figura 20B). Para esto se colectaron huevos en intervalos de 1 hora. A las  $2,5 \pm 0,5$  hs después de la puesta de huevos (AEL, del inglés *after egg laying*), los embriones C4 mostraron relaciones de isoformas Ia/IIa 3 veces menores que los embriones WT. Esta diferencia se reduce en embriones colectados a las  $6 \pm 0,5$  hs AEL y desaparece en las dos ventanas de tiempo tardías que fueron ensayadas ( $18,0 \pm 0,5$  y  $20,0 \pm 0,5$  hs AEL). La isoforma IVa es virtualmente indetectable en las dos ventanas de tiempo tempranas, pero es la más abundante en las dos ventanas tardías. Es interesante recalcar que la isoforma IVa es específica del sistema nervioso central, el cual no está desarrollado en los embriones de las dos ventanas temporales tempranas. La relación de isoformas

Ia/IVa no muestra diferencias significativas entre moscas WT y C4 a las  $18 \pm 0,5$  hs AEL, pero es significativamente menor a las  $20 \pm 0,5$  hs AEL en moscas C4. Por lo tanto, como resultado de estimular el *resplicing*, las moscas C4 muestran una clara disminución de la abundancia relativa de la isoforma Ia larga en favor de la isoforma corta IIa en estadios tempranos, y de la IVa en estadios posteriores.

## Transfecciones estables de la mutante lenta

El hecho de que las moscas C4 sean viables indica que la polimerasa lenta es capaz de transcribir genes endógenos, lo cual fue a su vez confirmado experimentalmente en el experimento de FRAP en células humanas. Esto nos condujo a realizar transfecciones estables en líneas celulares humanas con el fin de estudiar la regulación del *splicing* alternativo por la elongación sobre genes endógenos. La baja eficiencia de transfección de plásmidos en transfecciones transitorias impide este tipo de experimentos. Por otro lado el nivel de expresión de los vectores transfectados de manera estable se aproxima a los niveles de expresión endógena, mientras que en transfecciones transitorias el nivel de expresión es muy superior. Para ello cotransfectamos células Hep3B con los vectores de expresión para las polimerasas (WT o lenta), junto con un vector que expresa resistencia a G418 (pcDNA 3.1) en una relación 10:1 (vector de polimerasa:vector de resistencia) para favorecer la integración al genoma de los vectores de expresión para las polimerasas. 48 hs postransfección agregamos G418 al medio para seleccionar las células resistentes al antibiótico (que hubieran integrado el plásmido al genoma) y luego de sucesivas amplificaciones obtuvimos cultivos aislados a partir de colonias únicas. La expresión de las polimerasas fue monitoreada por RPA con una sonda específica para las polimerasas ectópicas. La inclusión de EDI endógeno mostró ser muy variable entre los clones analizados debido a que la misma es afectada significativamente por la tasa de proliferación celular (Kornblihtt et al. 1996) y a que los diferentes clones aislados poseían distintas tasas de proliferación. Esto impidió evaluar el efecto de la mutante lenta sobre la inclusión de EDI endógeno. Por este motivo, como una forma de validar que la expresión estable de la polimerasa lenta era capaz de afectar el *splicing* alternativo de genes, transfectamos a los distintos clones con minigenes EDI seguido del tratamiento con  $\alpha$ -amanitina y posterior análisis por RT-PCR del *splicing* de este exón.

Al hacer este experimento asumimos que los minigenes, al no estar integrados al genoma celular, serían menos sensibles a la variación en la tasa de proliferación de los distintos clones. En la Figura 21 se muestra el efecto sobre la inclusión de EDI de un clon representativo de cada polimerasa, y la cuantificación promediada de los distintos clones (Figuras 21A y B respectivamente). Puede verse que la expresión estable de la mutante lenta muestra una tendencia a aumentar la inclusión de EDI de modo consistente con los resultados obtenidos anteriormente. Esta herramienta permitirá, en un futuro próximo, estudiar el efecto de la velocidad de elongación sobre el *splicing* alternativo de un gran número de genes mediante estudios sistemáticos como la utilización de microarreglos de *splicing* alternativo.

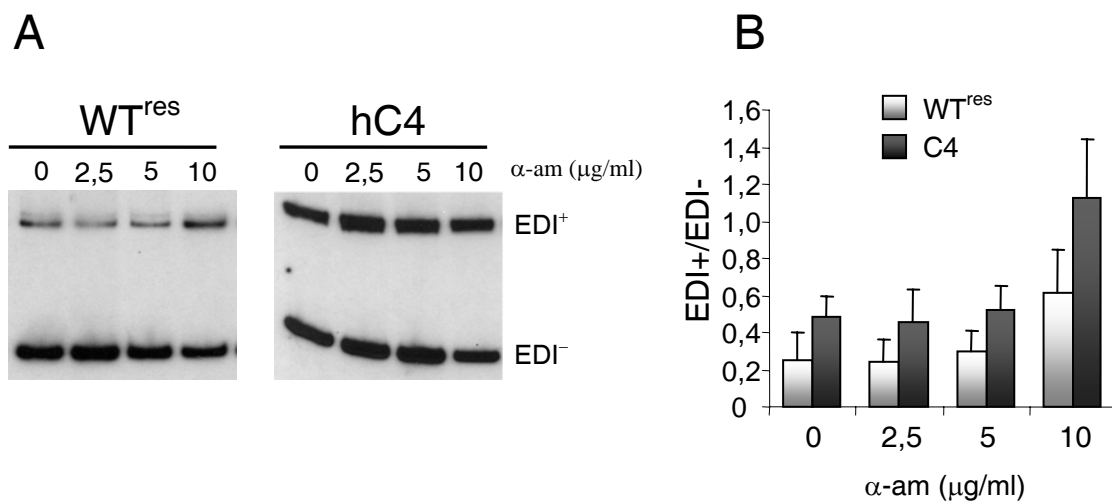


Figura 21. Clones estables para polimerasas WT<sup>res</sup> y hC4. (A) Se muestra el efecto sobre la inclusión de EDI de un clon representativo de cada polimerasa a distintas dosis de  $\alpha$ -aminitina. (B) Cuantificación de los efectos promediados de los distintos clones sobre la inclusión de EDI a distintas dosis de  $\alpha$ -aminitina. Los histogramas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas



## Capítulo II

### **El dominio carboxilo terminal de la pol II es requerido para la regulación del *splicing* alternativo mediado por SRp20**

El modelo cinético sugerido en el capítulo previo ha cobrado fuerza en el campo del acoplamiento transcripción-*splicing* porque potencialmente explica una gran cantidad de fenómenos observados en distintos sistemas. Inclusive el efecto del promotor sobre el *splicing* alternativo puede ser explicado a través del modelo de control por elongación, dado que existen correlaciones entre la procesividad y el efecto sobre el *splicing* inducido por cada promotor (Kadener et al. 2002). Sin embargo muchas observaciones indican que el control por elongación no puede explicar todos los fenómenos relacionados al acoplamiento. Por lo tanto es probable que exista un control debido al reclutamiento de factores de *splicing* por la maquinaria transcripcional. El control cinético no excluye un rol simultáneo del control por reclutamiento diferencial a la pol II de factores en *trans* en el acoplamiento de la transcripción y el *splicing* (Bentley 2002).

Según se expuso en la introducción muchas de las interacciones físicas y funcionales descritas entre factores de *splicing* y componentes de la maquinaria transcripcional involucran al dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la pol II. Varios estudios han subrayado la importancia del CTD de la pol II en el *splicing* constitutivo tanto *in vitro* como *in vivo* (McCracken et al. 1997; Misteli y Spector 1999) (Hirose et al. 1999; Zeng y Berget 2000; Rosonina et al. 2003; Millhouse y Manley 2005); sin embargo muy pocos han abordado el estudio de su posible función en la regulación del *splicing* alternativo (Rosonina y Blencowe 2004).

En este capítulo se exponen los resultados y conclusiones acerca de la participación del CTD en la regulación del *splicing* alternativo aprovechando un sistema que permite controlar estrictamente la transcripción de minigenes reporteros por polimerasas mutantes que carecen completa o parcialmente de su CTD. Se demostrará que la

presencia del CTD en la polimerasa que transcribe activamente al gen inhibe la inclusión de un exón *cassette* alternativo a través de su capacidad de permitir la acción negativa del factor de *splicing* SRp20.

## Resultados

### La ausencia del CTD aumenta la inclusión del exón EDI

Como primera aproximación para analizar si el CTD jugaba un papel en el *splicing* alternativo, utilizamos nuestro modelo de minigenes de fibronectina para el estudio del *splicing* alternativo del exón EDI, bajo el control de diferentes promotores (Figura 22A), combinándolos con construcciones que expresan la subunidad mayor de Rpb1 humana (hRpb1) con un CTD WT (WT<sup>res</sup>) o con ausencia completa del CTD (pol II  $\Delta$ CTD o  $\Delta$ 0) (McCracken et al. 1997). Estas polimerasas también tienen la mutación que les confiere resistencia a  $\alpha$ -amanitina descrita en el capítulo I (Bartolomei et al. 1988).

Se cotransfectaron en forma transitoria células Hep3B con minigenes de EDI y vectores de expresión para la subunidad mayor de la pol II. Las células se trataron con  $\alpha$ -amanitina 24 hs postransfección y se cosecharon a las 48 hs. La relación inclusión/exclusión del exón EDI se determinó por RT-PCR radiactiva como se explica en Materiales y Métodos. La RT se realizó con un *primer* que hibrida con la región 3' de los minigenes para analizar los transcritos con o sin poliadenilación que pueden originarse a partir de la transcripción de la pol II  $\Delta$ CTD. Resultó interesante que la pol II  $\Delta$ CTD aumenta significativamente la inclusión de exón EDI (Figura 22B). Este efecto también se observa en diferentes medidas (entre 4 y veces de efecto) con los cuatro promotores diferentes analizados. Como control negativo se realizó una transfección en la que se omitió la pol II resistente a  $\alpha$ -amanitina (Figura 5b, calle 3). Bajo estas condiciones no se observó efecto en los niveles de inclusión de EDI, lo cual descarta la posibilidad de un efecto indirecto de la  $\alpha$ -amanitina *per se*. El hecho de que los niveles de mRNA permanezcan altos cuando sólo está presente la pol II endógena podría deberse a una estabilización del mRNA causada por el tratamiento con  $\alpha$ -amanitina (Meininghaus et al. 2000). Una estabilidad diferencial de las dos isoformas que explicara los efectos observados también es descartada a partir de este control. En vista del efecto imprevisto sobre el *splicing* alternativo, resultó crucial demostrar que los resultados observados eran consecuencia directa de la capacidad de la pol II  $\Delta$ CTD de

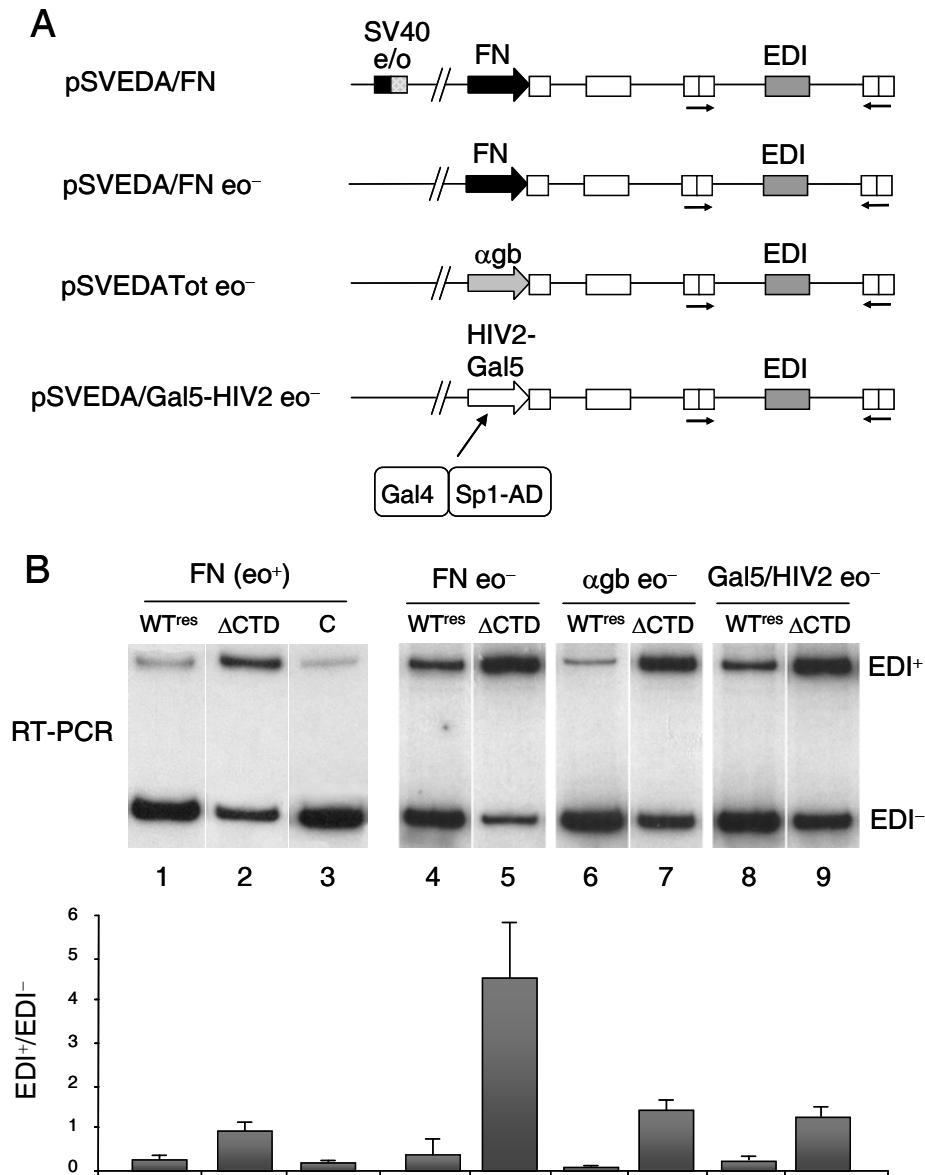


Figura 22. La pol II  $\Delta$ CTD incrementa la inclusión de EDI de manera independiente del promotor. (A) Se transfectoron células Hep3B con minigenes reporteros de *splicing* alternativo del exón EDI bajo el control de diferentes promotores y vectores de expresión de la subunidad mayor de la pol II resistentes a  $\alpha$ -amanitina (pAT7Rpb1  $\alpha$ Am<sup>r</sup>) portando un CTD wt (WT<sup>res</sup>) o carente de CTD ( $\Delta$ CTD). En el caso de pSVEDA/Gal5-HIV2 eo<sup>-</sup>, se co-transfectoron células con un vector que expresa una proteína de fusión de el dominio de unión al DNA de Gal4 y el dominio de transactivación de Sp1 (Kadener et al. 2001). Se trataron las células 24 hs postransfección con  $\alpha$ -amanitina y se cosecharon a las 48 hs. (B) Análisis por RT-PCR de las isoformas EDI. Los histogramas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes. En la calle 3 se muestra un control de transfección con un vector vacío.

transcribir el minigén y no, por ejemplo, un efecto negativo dominante de la pol II  $\Delta$ CTD sobre la actividad remanente de la pol II endógena. Los reporteros utilizado en el experimento de la Figura 22 contienen promotores constitutivos que son activos antes y

después del tratamiento con  $\alpha$ -amanitina. Esto implica que durante las primeras 24 hs en ausencia de la droga –necesarias para la expresión de la polimerasa ectópica– se acumula activamente mRNA debido a la transcripción mediada por las polimerasas endógena y transfectada. Después del tratamiento con  $\alpha$ -amanitina, cesa la transcripción mediada por la pol II endógena mientras que la pol II ectópica continúa transcribiendo a tasas diferentes dependiendo de la naturaleza de su mutación. También se ha descrito que la pol II  $\Delta$ CTD posee una capacidad limitada para transcribir plásmidos transfectados de manera transitoria (McCracken et al. 1997; Meininghaus et al. 2000). Debido a estos dos motivos decidimos desarrollar un sistema de transfección con un minigén reportero inducible que nos permitiera evaluar si el efecto de la pol II  $\Delta$ CTD sobre el *splicing* alternativo dependía de su capacidad de transcribir.

### **Un sistema inducible para estudiar la pol II $\Delta$ CTD**

Un sistema inducible resultaba ideal para restringir estrictamente la transcripción de polimerasas transfectadas de manera controlada en el tiempo. Dado que el CTD es indispensable para la activación de la transcripción por activadores fuertes como VP16 (Gerber et al. 1995) (Figura 23C) decidimos utilizar, en lugar de VP16, al dominio rico en glutaminas de Sp1 para dirigir la transcripción de un minigén reportero de *splicing* alternativo inducible. Para ello se reemplazó el dominio ácido de transactivación de VP16 presente el transactivador clásico Tet-Off por el dominio de activación rico en glutaminas de Sp1. A diferencia de VP16, la cual estimula tanto la iniciación como la elongación de la transcripción, Sp1 promueve principalmente la iniciación (Blau et al. 1996) y es capaz de mediar la transcripción en ausencia del CTD (Gerber et al. 1995). Se construyó el reportero inducible insertando el minigén híbrido de fibronectina río abajo de un promotor mínimo de CMV unido a un operador Tet, el cual permite disparar la transcripción sólo después de que la pol II transfectada ha sido expresada en el núcleo celular (Figura 23).

La estrategia experimental utilizada se muestra en la Figura 23A. Se cotransfectaron células Hep3B con el plásmido que expresa el transactivador regulado por tetraciclina (tTA) y reportero de *splicing* alternativo bajo el control del operador Tet en presencia de tetraciclina (tet). Se indujo la transcripción del reportero mediante la eliminación de tet

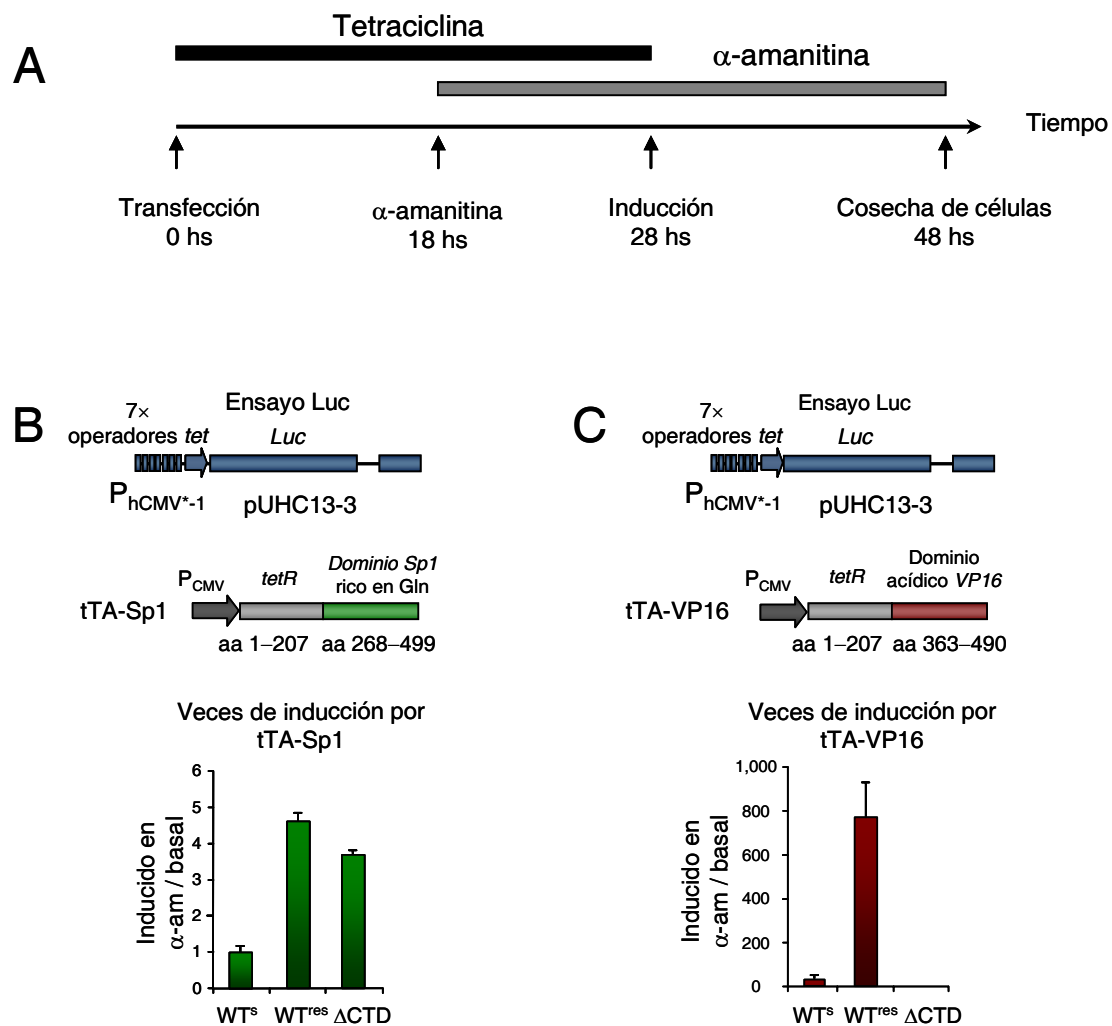


Figura 23. Un sistema inducible muestra que la transcripción de reporteros transfectados transitoriamente puede ser llevada a cabo por la pol II  $\Delta$ CTD. (A) Esquema experimental. Se transfectaron células Hep3B con un transactivador tet (tTA) y con un reportero Luc (pUHC 13-3) o un minigén EDI (pUHC-EDA) controlados por tet. (B) Ensayo de Luc utilizando el transactivador tTA-Sp1. La activación transcripcional se determinó calculando el cociente entre la actividad Luc en condiciones inducidas (con  $\alpha$ -amanitina) y el estado basal. (C) Ensayo de Luc utilizando el transactivador tTA-VP16 (pUHD 15-1). P<sub>CMV</sub>, promotor de citomegalovirus; P<sub>hCMV\*-1</sub>, promotor mínimo de CMV con 7 operadores tet; tetR, gen represor tetraciclina; aa, posiciones de amino ácidos.

del medio de cultivo sólo después de que la pol II ectópica ha sido expresada y que la transcripción por la pol II endógena se halla inhibida por la adición de  $\alpha$ -amanitina.

En primer lugar se demostró que la pol II  $\Delta$ CTD es capaz de transcribir plásmidos transfectados de manera transitoria utilizando un reportero de luciferasa (Luc) inducible por tetraciclina (pUHC 13-3, Gossen y Bujard 1992). La activación transcripcional se determinó calculando la relación de la actividad luciferasa en la condición inducida (con  $\alpha$ -amanitina) vs. la actividad de luciferasa el estado basal. Se utilizó como control

negativo del experimento un vector que expresa una pol II sensible a  $\alpha$ -amanitina (WT<sup>s</sup>). Bajo estas condiciones la pol II  $\Delta$ CTD fue capaz de inducir la transcripción del reportero Luc mientras que la pol II WT sensible a  $\alpha$ -amanitina no lo fue (Figura 23B,  $\Delta$ CTD vs. WT<sup>s</sup>). Este hecho permite concluir que la pol II  $\Delta$ CTD es realmente capaz de transcribir reporteros transfectados transitoriamente bajo la activación del transactivador Sp1. De forma coherente con publicaciones previas (Gerber et al. 1995), la pol II  $\Delta$ CTD fue incapaz de mediar la activación fuerte por VP16 (Figura 23C).

### **La pol II $\Delta$ CTD también afecta el *splicing* alternativo de EDI con el minigén inducible**

Posteriormente analizamos el efecto de la ausencia del CTD en los niveles de inclusión de EDI, utilizando el minigén inducible (pUHC-EDA). En la Figura 24A se observa que la pol II  $\Delta$ CTD incrementa varias veces la inclusión de EDI con respecto a las pol II WT<sup>res</sup> y WT<sup>s</sup> (comparar calles 2, 4 y 6). Este efecto se pierde completamente cuando no se agrega  $\alpha$ -amanitina (calles 1, 3 y 5). Es importante destacar que la presencia de  $\alpha$ -amanitina inhibe la transcripción de la pol II sensible aproximadamente 10 veces (inhibición del 90%, Figura 24B). Esta disminución en la transcripción sólo puede observarse a través de métodos cuantitativos como en los experimentos de RT-PCR en tiempo real de la Figura 24B. Por el contrario, las condiciones no lineales de la RT-PCR (Figura 24A), aunque permiten la cuantificación de la abundancias relativas de las isoformas de mRNA, no permiten cuantificar los niveles absolutos de mRNA. Por otro lado los experimentos de actividad luciferasa (Figura 23B y C) ya indicaban altos niveles de inhibición de la transcripción por  $\alpha$ -amanitina (en un rango de 78-97%). En conclusión, la pol II  $\Delta$ CTD afecta el *splicing* alternativo de EDI aumentando su inclusión y este efecto es dependiente de la transcripción por parte de la polimerasa mutante. Este resultado descarta la posibilidad de la que polimerasa mutante estuviera actuando como negativo dominante sobre la polimerasa endógena remanente sin inhibir, e indica que el efecto sobre el *splicing* es cotranscripcional. Por lo tanto se puede concluir que la presencia del CTD en la pol II regula negativamente la inclusión de EDI.

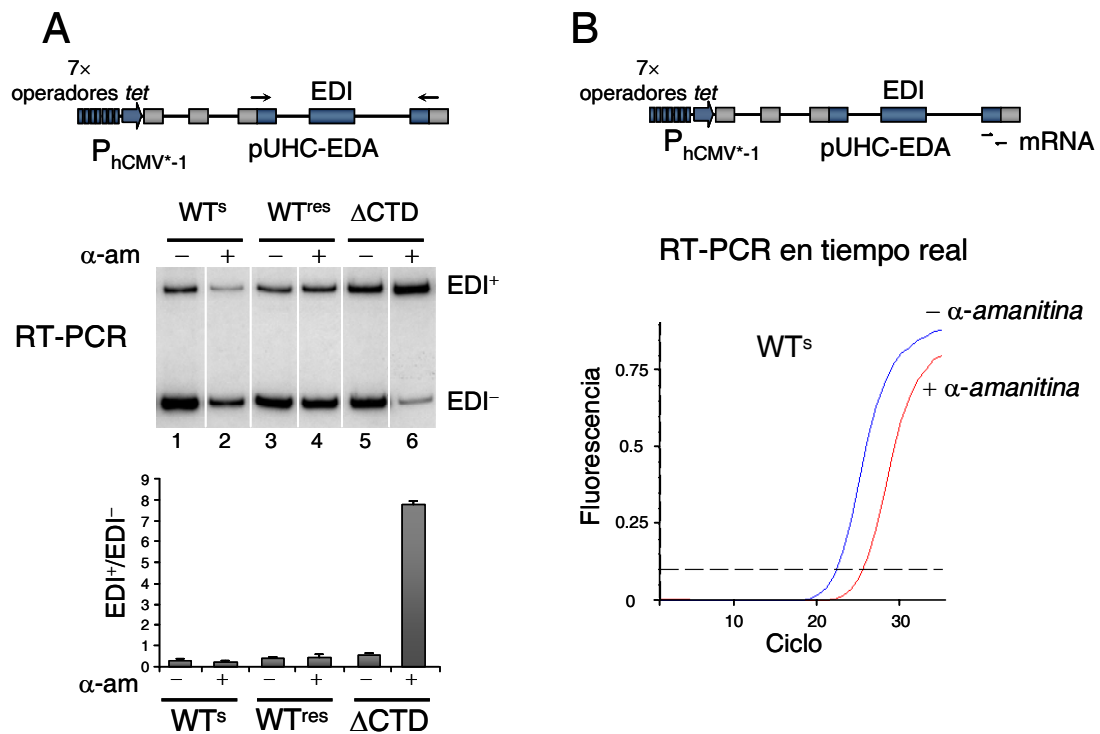


Figura 24. El sistema inducible muestra que el efecto de la ausencia del CTD en el *splicing* alternativo es dependiente de la transcripción mediada por la pol II  $\Delta$ CTD. (A) Se co-transfectaron células Hep3B con tTA-Sp1 y pUHC-EDA en combinación con vectores de expresión de las polimerasas wt<sup>res</sup> y  $\Delta$ CTD. Los cocientes de inclusión de EDI se determinaron por RT-PCR radiactiva. El histograma expresa los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas (B) La  $\alpha$ -amanitina inhibe a la pol II sensible aproximadamente un 90%. Ensayos de RT-PCR en tiempo real para medir mRNA maduro a partir de pUHC-EDA en presencia o ausencia de  $\alpha$ -amanitina.

## El efecto de la pol II $\Delta$ CTD sobre el *splicing* alternativo no es consecuencia de una inhibición global del procesamiento del pre-mRNA

Una explicación posible de la influencia del CTD en el *splicing* alternativo podría ser la inhibición global de las reacciones de procesamiento de mRNA (McCracken et al. 1997), tales como *capping*, procesamiento 3' y *splicing* constitutivo. Para analizar esta posibilidad evaluamos si la pol II  $\Delta$ CTD afectaba la eficiencia del *splicing* constitutivo y si su efecto sobre la inclusión de EDI dependía de la presencia del Cap y de una cola de poliA.



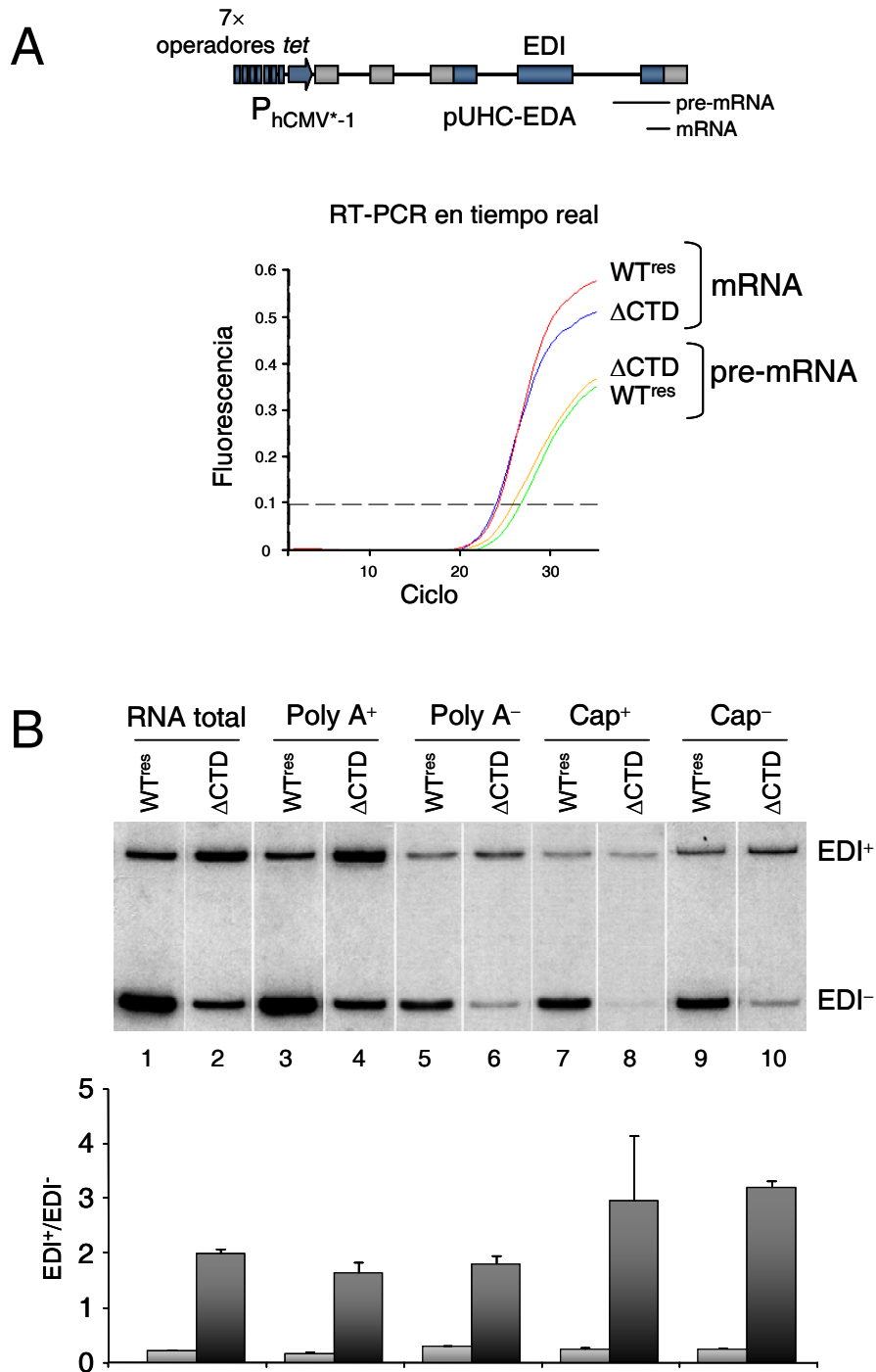


Figura 25. El efecto del CTD no depende del procesamiento global del mRNA. (A) La pol II  $\Delta$ CTD no afecta la eficiencia de *splicing* constitutivo. Análisis por RT-PCR en tiempo real para mRNA precursor y maduro a partir de pUHC-EDA transcripto por la pol II wt o  $\Delta$ CTD. (B) El efecto del CTD sobre el *splicing* alternativo es independiente de su influencia en el capping y en el procesamiento 3' del mRNA. Se analizó por RT-PCR radiactiva la inclusión de EDI a partir de las fracciones de mRNA polyA<sup>+</sup>, polyA<sup>-</sup>, Cap<sup>+</sup> y Cap<sup>-</sup>, sintetizadas por la pol II WT<sup>res</sup> y  $\Delta$ CTD. El histograma expresan los promedios  $\pm$  SEM de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas

La eficiencia del *splicing* constitutivo fue determinada por RT-PCR en tiempo real utilizando dos pares de *primers* que amplifican una región exónica, para detectar mRNA maduro, y una región de juntura intrón/exón para detectar mRNA inmaduro. Como se muestra en la Figura 25A, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia del *splicing* constitutivo entre la pol II WT<sup>res</sup> y la  $\Delta$ CTD, indicando que el efecto sobre la inclusión de EDI no responde a una inhibición global del *splicing*. Para analizar si el efecto del CTD dependía del *capping* o del procesamiento 3', se aislaron fracciones de mRNA con Cap y con cola de poliA (Cap<sup>+</sup> y polyA<sup>+</sup>) mediante inmunopurificación con un anticuerpo anti-Cap (Bochnig et al. 1987) y por medio columna de afinidad de oligo-dT respectivamente. En nuestro sistema, el efecto de la pol II  $\Delta$ CTD en la inclusión de EDI es igualmente observado en las fracciones Cap<sup>+</sup> y Cap<sup>-</sup>, como también en las fracciones polyA<sup>+</sup> y polyA<sup>-</sup> (Figura 25B). Estos resultados demuestran que el efecto del CTD sobre el *splicing* alternativo de EDI es independiente de su influencia en el procesamiento general del mRNA, y sugieren la existencia un efecto directo de este dominio sobre la regulación del *splicing* alternativo.

### **Ambas mitades del CTD son igualmente efectivas para revertir el efecto de la pol II $\Delta$ CTD sobre la inclusión de EDI**

El CTD está compuesto a grandes rasgos por dos mitades que difieren en su composición de héptadas. La mitad N-terminal (héptadas 1-25) contiene principalmente repeticiones consenso mientras que la mitad C-terminal (héptadas 27-52) contiene repeticiones degeneradas (Figura 26). Río abajo de la héptada 52 hay un motivo C-terminal de 10 aminoácidos (Cter) crítico para la estabilidad del CTD (Chapman et al. 2004), del cual se creía inicialmente que cumplía un papel en el procesamiento del mRNA (Fong et al. 2003). Con el fin de estudiar si una composición particular de héptadas tenía un efecto en *splicing* de EDI se transfectaron construcciones de pol II conteniendo la mitad N o C-terminal (1-25 y 27-52 respectivamente) en presencia o ausencia del motivo Cter. De acuerdo con Chapman et al. 2004 encontramos que la pol II es estable cuando cualquiera de las mitades del CTD contiene el motivo Cter pero se degrada a una forma límite de 180 kDa llamada IIB cuando este está ausente (Figura 26,

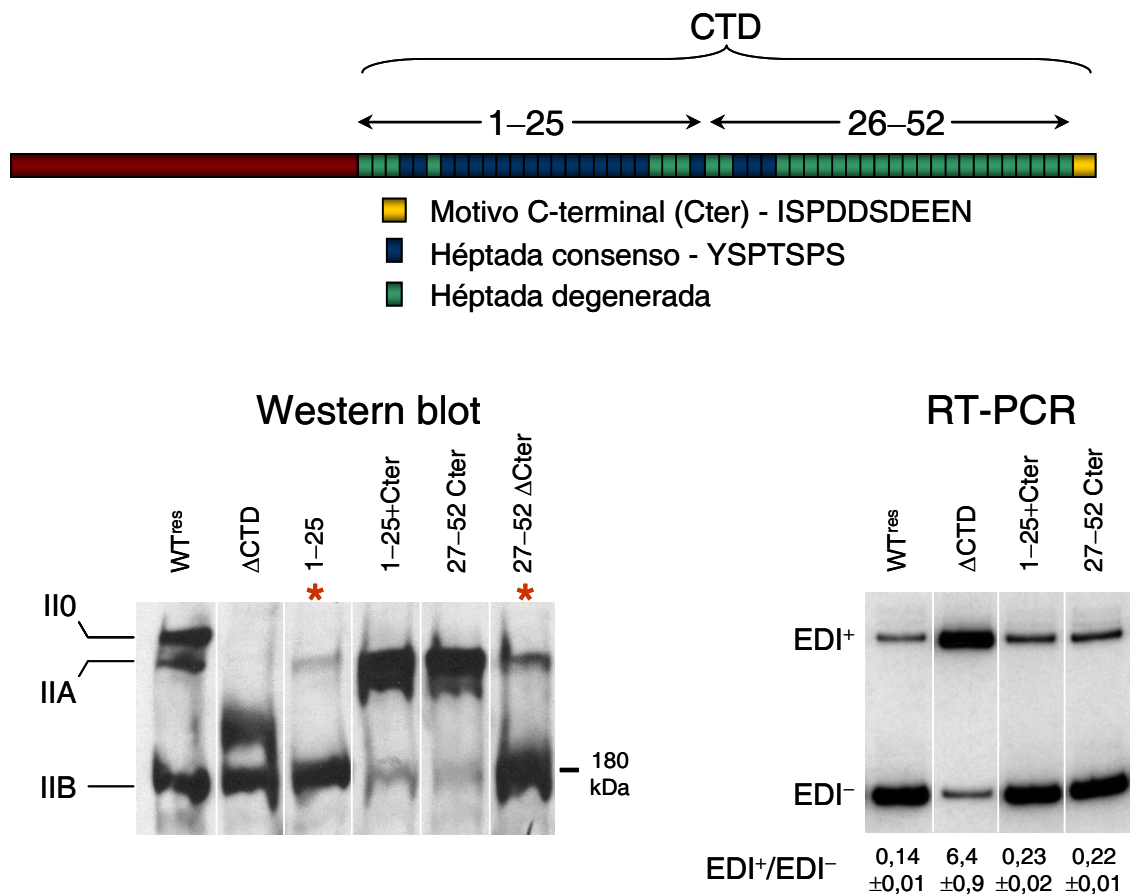


Figura 26. Ambas mitades del CTD permiten niveles normales de inclusión de EDI. Se co-transfectaron células Hep3B con el minigén inducible (pUHC-EDA) y vectores que expresan la subunidad mayor de la pol II con la mitad N o C terminal del CTD. Análisis de la estabilidad del CTD por Western Blot (izquierda) con el anticuerpo anti B10. Se utilizaron para estudios posteriores sólo las mutantes que contienen el motivo Cter de 10 aa. que previene la degradación de la pol II a la isoforma IIB de 180 kDa. Los asteriscos señalan las mutantes que no poseen el motivo Cter y que se degradan a la isoforma IIB. Análisis de los cocientes de inclusión de EDI (derecha) por RT-PCR radiactiva inducida por diferentes variantes de pol II.

Western Blot). La isoforma IIB es equivalente a la pol II  $\Delta$ CTD dado que la degradación que la origina ocurre justamente sobre el CTD. Por consiguiente decidimos analizar el efecto sobre el *splicing* sólo de aquellas mutantes que contienen el motivo Cter. El análisis por RT-PCR radiactiva reveló que ambas mitades del CTD revierten el efecto de la ausencia de CTD en el *splicing* de EDI (Figura 26, RT-PCR), lo que demuestra que la composición del CTD no es crucial para sostener los niveles de inclusión normal de EDI. Este resultado concuerda con estudios previos donde se muestra que las mitades N y C-terminales del CTD así como un CTD sintético con 27

héptadas consenso pueden sostener el *splicing* constitutivo en presencia del motivo Cter (Fong et al. 2003). De modo similar, el CTD también es requerido para la edición del mRNA y ambas mitades son suficientes para permitir una edición eficiente (Laurencikiene et al. 2006).

En ausencia del motivo Cter todas las construcciones se degradan a la isoforma IIB y se comportan como la pol II  $\Delta$ CTD en su efecto sobre el *splicing* de EDI (datos no mostrados).

### **Un tamaño mínimo del CTD es requerido para el *splicing* normal de EDI**

Hasta este punto sabíamos que no era determinante una composición particular del CTD para permitir la inclusión normal de EDI. El paso siguiente fue investigar si la longitud del CTD era un factor importante para su función en el *splicing*. Para este análisis aprovechamos un evento inesperado que ocurrió en las bacterias utilizadas para amplificar los plásmidos. Como se ha informado recientemente (Chapman et al. 2005), después de transformar bacterias con una construcción de pol II que contiene 27 héptadas consenso y de seleccionar clones diferentes encontramos que el número de repeticiones del CTD se había modificado, posiblemente debido a eventos de recombinación durante la división bacteriana. Posteriormente analizamos la expresión de tres clones que contenían 9, 12 y 19 repeticiones, para confirmar la integridad proteica de los mismos (Figura 27, Western blot). Los clones también fueron secuenciados y se descartó que tuvieran mutaciones que pudieran haber ocurrido en las bacterias (Figura 28). Por último se analizó la capacidad de estos clones de afectar el *splicing* de EDI por RT-PCR radiactiva (Figura 27, RT-PCR). El CTD más corto (9 repeticiones) provocó un fuerte aumento en la inclusión de EDI, pero inferior comparado con la pol II  $\Delta$ CTD; el CTD con 12 repeticiones tuvo un efecto intermedio en la estimulación de la inclusión de EDI y el CTD con 19 repeticiones revirtió la inclusión de EDI a niveles normales. Estos resultados demuestran que un mínimo de 19 héptadas es necesario para la función normal del CTD en el *splicing* alternativo.

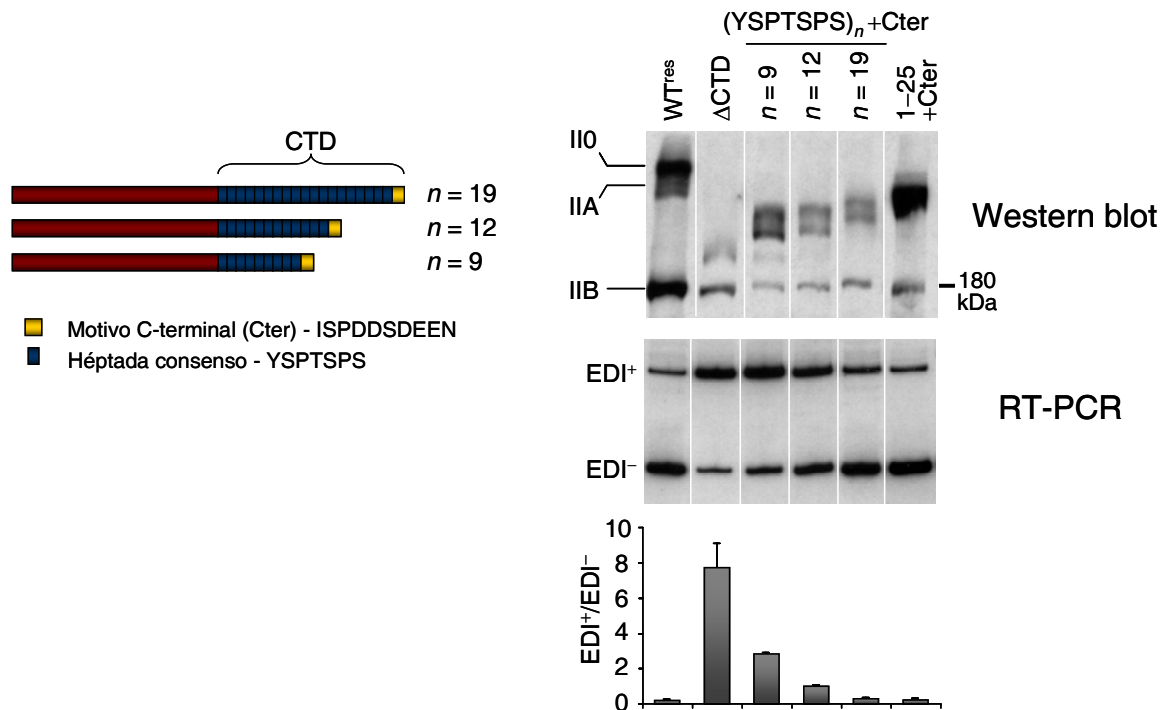


Figura 27. Una longitud mínima de 19 repeticiones en el CTD es requerida para obtener niveles normales de inclusión de EDI. Se co-transfectaron células Hep3B con pUHC-EDA y vectores para diferentes variantes de pol II que contienen CTD con un número variable de héptadas consenso además del motivo Cter. Las 3 mutantes de CTD responden a la fórmula  $(YSPTSPS)_n$ -YSPTS-(H)<sub>5</sub>-ISPDDSDEEN donde n es igual a 9, 12 o 19 (ver Figura 24). Se analizó la integridad del CTD por Western Blot contra el epítipo B10 (arriba). El análisis por RT-PCR radiactiva muestra el efecto de la longitud del CTD sobre la inclusión de EDI (abajo). Los histogramas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes.

**Clon #12\_ n=9**

```

Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   H   H
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CAC CAT
H   H   H   Q   I   S   P   D   D   S   D   E   E   N
CAC CAT CAC CAG ATC AGC CCA GAT GAC AGT GAC GAG GAG AAC
*
TGA

```

**Clon #13\_ n=12**

```

Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   H   H   H   H   H   Q   I   S   P
TAT TCT CCG ACT AGC CAC CAT CAC CAT CAC CAG ATC AGC CCA
D   D   S   D   E   E   N   *
GAT GAC AGT GAC GAG GAG AAC TGA

```

**Clon #11\_ n=19**

```

Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   P   S
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC
Y   S   P   T   S   P   S   Y   S   P   T   S   H   H
TAT TCT CCG ACT AGC CCG AGC TAT TCT CCG ACT AGC CAC CAT
H   H   H   Q   I   S   P   D   D   S   D   E   E   N
CAC CAT CAC CAG ATC AGC CCA GAT GAC AGT GAC GAG GAG AAC
*
TGA

```

Figura 28. Secuencias de CTD de los clones de Rpb1 que contienen CTDs sintéticos de distinta longitud. Las 3 mutantes de CTD responden a la fórmula  $(YSPTSPS)_n$ -YSPTS-(H)<sub>5</sub>-ISPDDSDEEN donde n es igual a 9, 12 o 19. Los residuos subrayados corresponden a la secuencia C-terminal (Cter) del CTD, esencial para la estabilidad del mismo (Chapman et al. 2004).

## **El CTD es requerido para la inhibición de SRp20 sobre el *splicing* de EDI**

Pensamos que la ausencia del CTD podría afectar el reclutamiento de factores de *splicing* al mRNA naciente de manera tal de regular positivamente la inclusión de EDI. Se consideraron dos hipótesis alternativas: la ausencia del CTD podía favorecer el reclutamiento de un activador de *splicing*, o abolir el reclutamiento de un inhibidor de *splicing*.

La mayoría de los factores de *splicing* que regulan a EDI son conocidos por estimular la inclusión del exón, dentro de los cuales SF2/ASF es el más potente entre las proteínas SR (Cramer et al. 1999). Sólo un miembro de las proteínas SR estudiadas, SRp20, inhibe la inclusión de EDI (Cramer et al. 1999). En la figura 29A se muestra que la sobreexpresión de SF2/ASF promueve un aumento en la inclusión de EDI, el cual es revertido por la sobreexpresión de SRp20 (calles 1-3). Posteriormente se analizó el efecto sobre el *splicing* de EDI disminuyendo los niveles de estas dos proteínas SR por medio de siRNAs cuando la transcripción es llevada a cabo por una pol II en presencia o ausencia del CTD. Mediante Western blots se comprobó que en efecto ambos siRNAs reducen significativamente los niveles de proteína tanto endógenos como ectópicos de SF2/ASF y de SRp20 (Figura 29B). Como se demuestra en el capítulo I (Figura 19B), los siRNAs contra SF2/ASF reducen 2 a 3 veces la inclusión de EDI (Figura 29C, calles 1 y 2). Este efecto resultó ser completamente independiente de la presencia del CTD debido a que se observó una reducción similar con la pol II  $\Delta$ CTD (Figura 29C, calles 3 y 4). De modo consistente con este resultado, evidencias *in vitro* muestran que el CTD facilita el reclutamiento temprano de U1 snRNPs al sitio de *splicing* pero no de SF2/ASF (Zeng y Berget 2000). Por otro lado, la transfección con un siRNA contra SRp20 incrementa la inclusión de EDI 3-4 veces (Figura 29C, calles 5-6). En este caso el efecto depende completamente del CTD debido a que desaparece cuando la transcripción es llevada a cabo por la pol II  $\Delta$ CTD (Figura 29C, calles 7-8).

A partir de este experimento concluimos que la inhibición de la inclusión de EDI por parte de SRp20 requiere del dominio CTD, lo cual sugiere que, además del acoplamiento con la velocidad de elongación, el *splicing* de EDI está también regulado por un mecanismo de reclutamiento de factores de *splicing* mediado por el CTD. Este

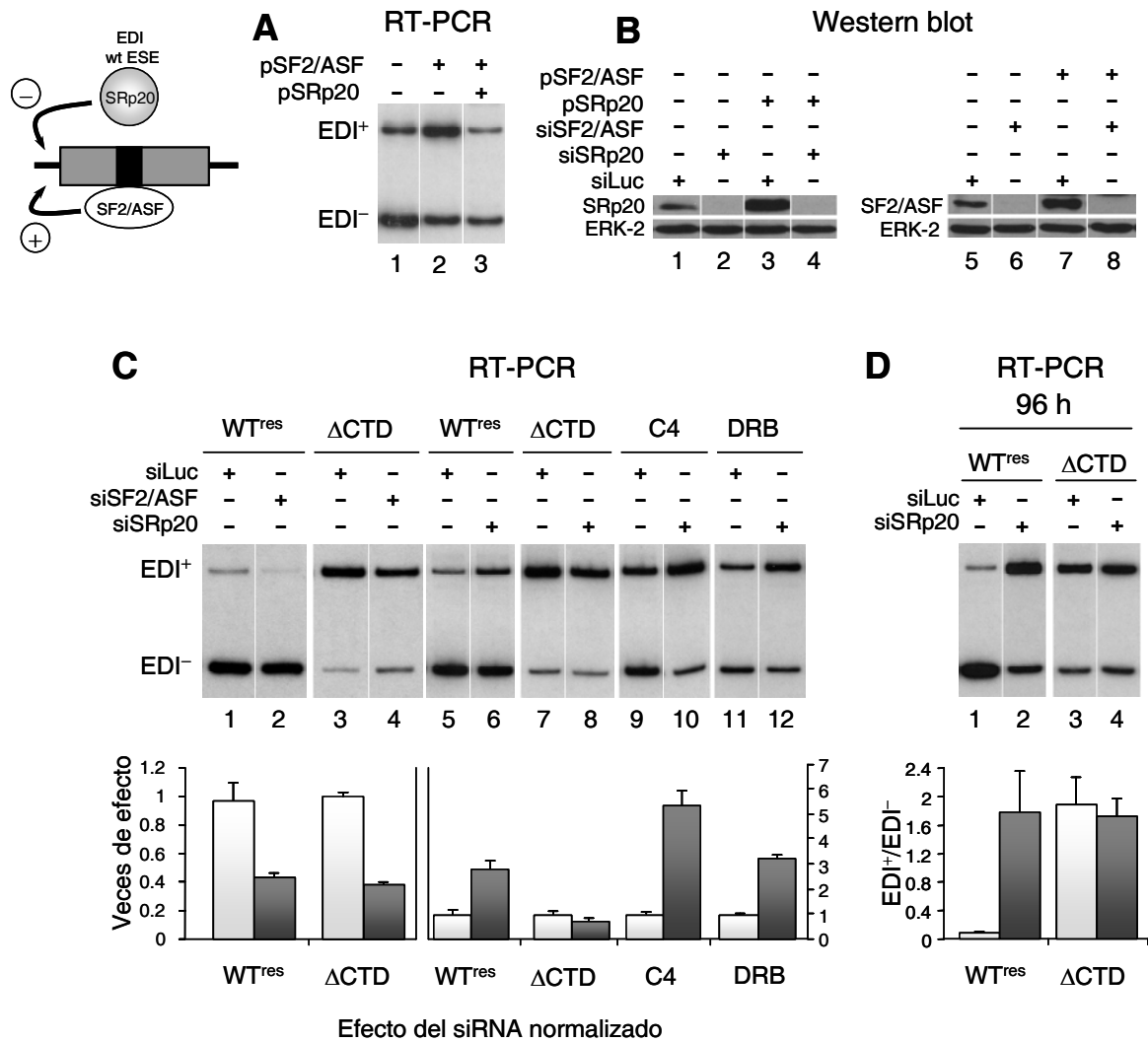


Figura 29. SRp20 promueve la exclusión de EDI a través del CTD. (A) Se co-transfectaron células Hep3B con pUHC/FN solo (calle 1) o en combinación con: un vector que expresa SF2/ASF (5 ng de plásmido) o vectores que expresan SF2/ASF (5ng de plásmido) y SRp20 (200 ng plásmido) –calle 2 y 3–.(B) Se analizó por Western Blot la eficiencia de silenciamiento de SRp20 y SF2/ASF endógenas (calle 1, 2, 5 y 6) y expresadas ectópicamente (calles 3, 4, 7 y 8) en células Hep3B transfectadas con siRNA específicos. Se utilizó como control negativo un siRNA no específico contra GL3 Luciferasa. Se detectaron las proteínas SR endógenas con sus respectivos anticuerpos específicos (ver materiales y métodos). Las proteínas SR recombinantes se detectaron con el anticuerpo contra el epítopo T7 presente en estas proteínas. Se normalizaron los niveles de proteína SR con la expresión de ERK-2 como se indica a la izquierda. (C) Se co-transfectaron células Hep3B con pUHC-EDA y diferentes vectores para la pol II en combinación con siRNAs específicos contra distintas proteínas SR o contra Luc como control negativo. El análisis de inclusión de EDI se realizó por RT-PCR radiactiva sobre el RNA de células cosechadas 48 hs posttransfección. Calles 11-12: Se agregó DRB simultáneamente con la inducción a una concentración final de 50 μM. (D) Experimento similar a (c) pero cosechando las células 96 hs posttransfección. Los histogramas expresan los promedios ± SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes.



rol específico podría estar relacionado con una publicación previa según la cual el CTD es requerido para la función correcta de *enhancers* de *splicing* (Fong y Bentley 2001).

### **El requerimiento del CTD para el efecto inhibitorio de SRp20 sobre el *splicing* de EDI no se debe a una reducción en la elongación**

Se ha establecido que el CTD es un blanco de fosforilación durante el ciclo de la transcripción (Komarnitsky et al. 2000; Palancade y Bensaude 2003). Tanto factores de elongación positivos como negativos interaccionan con el CTD afectando la elongación de la pol II (Kobor y Greenblatt 2002; Palancade y Bensaude 2003). El CTD también es necesario para la transición de la iniciación a la elongación (Lux et al. 2005). Estas evidencias llevan a preguntarse si el efecto observado con la pol II  $\Delta$ CTD es causado probablemente por una elongación reducida de esta polimerasa. Ninguna de las condiciones ensayadas en esta tesis que reducen la elongación de la transcripción, ya sea la utilización de la mutante lenta (hC4) o un inhibidor de CDK9 (5,6-dicloro-furanosil-benzimidazol, DRB), eliminan el efecto del siRNA contra SRp20 (Figura 29C, calles 9-12). Por lo tanto concluimos que el efecto de la pol II  $\Delta$ CTD no es consecuencia de una menor velocidad de elongación por parte de esta polimerasa.

### **El efecto del CTD sobre el *splicing* de EDI puede ser atribuido completamente a SRp20 y no depende del promotor que dirige la transcripción**

Los resultados de la Figura 29C se obtuvieron con células cosechadas 48 hs postransfección. En estas condiciones la pol II  $\Delta$ CTD estimula la inclusión de EDI a mayores niveles (comparar calles 5 y 7) que los inducidos por el siSRp20 (comparar calles 5 y 6). El experimento también se realizó a las 96 hs asumiendo que un tratamiento más prolongado con el siRNA produciría una mayor reducción en los niveles de SRp20. En la Figura 29D se observa que el incremento en la inclusión de EDI o por la pol II  $\Delta$ CTD o por el tratamiento con siRNA contra SRp20 son de la

misma magnitud (aproximadamente 20 veces de aumento). Esto sugiere que el efecto del CTD sobre el *splicing* de EDI puede atribuirse mayoritaria o completamente a su capacidad de mediar el efecto de SRp20.

Los experimentos de la Figura 22 muestran que el efecto de la pol II  $\Delta$ CTD sobre el *splicing* de EDI es independiente del promotor. De modo consistente con este resultado, la Figura 30 muestra que cuando la transcripción es llevada a cabo por la pol II  $\Delta$ CTD, la disminución de SRp20 no afecta los niveles de inclusión de EDI independientemente del promotor utilizado. Esto significa que el posible reclutamiento de SRp20 por la maquinaria transcripcional a través del CTD, no responde a señales específicas dentro del promotor.

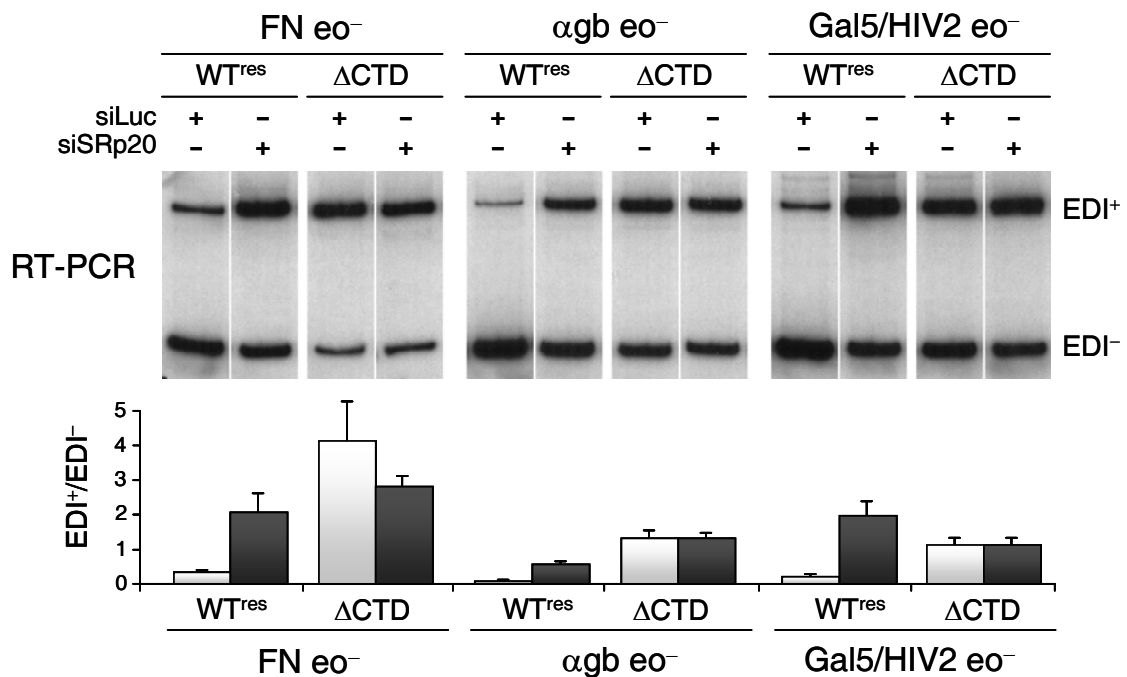


Figura 30. La falta de respuesta a siRNA contra SRp20 es independiente del promotor.

Se co-transfectaron células Hep3B con minigenes EDI controlados por diferentes promotores y diferentes vectores que expresan variantes de pol II, en combinación con siRNAs específicos contra diferentes proteínas SR o contra Luc GL3 como control negativo. Los histogramas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes.

## **El requerimiento del CTD para el efecto inhibitorio de SRp20 también se observa en condiciones de baja inclusión de EDI**

Se realizaron controles adicionales para confirmar la ausencia de efecto del siRNA contra SRp20 cuando la transcripción es llevada a cabo por la pol II  $\Delta$ CTD. Existía la posibilidad de que los altos niveles de inclusión de EDI inducidos por la pol II  $\Delta$ CTD marcaran un límite por encima del cual no pudiera detectarse un aumento aún mayor. Para descartar esta posibilidad repetimos los experimentos de la Figura 29C utilizando una variante de minigén que carece del núcleo de 9 nucleótidos (GAAGAAGAC) del ESE (mutante  $\Delta$ ESE, Figura 31, diagrama superior). Al eliminar este ESE, SF2/ASF se une con menor afinidad al exón EDI disminuyendo así la inclusión de EDI (Cramer et al. 1999). Al igual que con el minigén WT, el siRNA contra SRp20 aumenta la inclusión de EDI entre 3-4 veces (Figura 31, calles 1-2) pero este efecto no ocurre cuando la transcripción es llevada a cabo por la pol II  $\Delta$ CTD (Figura 31, calles 3-4). El efecto persiste cuando la mutante lenta (hC4) dirige la transcripción del minigén (Figura 31, calles 5-6). Cuando se cotransfecta con una pequeña cantidad de un vector que expresa SF2/ASF, los niveles basales de inclusión de EDI aumentan levemente sin eliminar el efecto del siRNA contra SRp20 (Figura 31, calles 7-8). Esta condición nos permitió comparar directamente las polimerasas WT y  $\Delta$ CTD bajo niveles basales de inclusión de EDI similares (Figura 31, calles 3 y 7). A pesar de que los niveles basales de inclusión de EDI son similares en estas condiciones para ambas polimerasas, el siRNA contra SRp20 incrementa dramáticamente la inclusión de EDI en presencia de la pol II WT<sup>res</sup> (Figura 31, comparar calles 7 y 8) pero no tiene efecto en presencia de la pol II  $\Delta$ CTD (Figura 31, comparar calles 3 y 4). Cuando se expresa SF2/ASF en presencia de la pol II  $\Delta$ CTD los niveles basales de EDI se incrementan pero permanecen iguales cuando se cotransfecta siRNA contra SRp20 (Figura 31, calle 9-10). Estos resultados confirman que, en presencia de la pol II  $\Delta$ CTD, la falta de efecto del siSRp20 sobre la inclusión de EDI no es una consecuencia trivial del incremento de los niveles basales provocados por la pol II mutante.

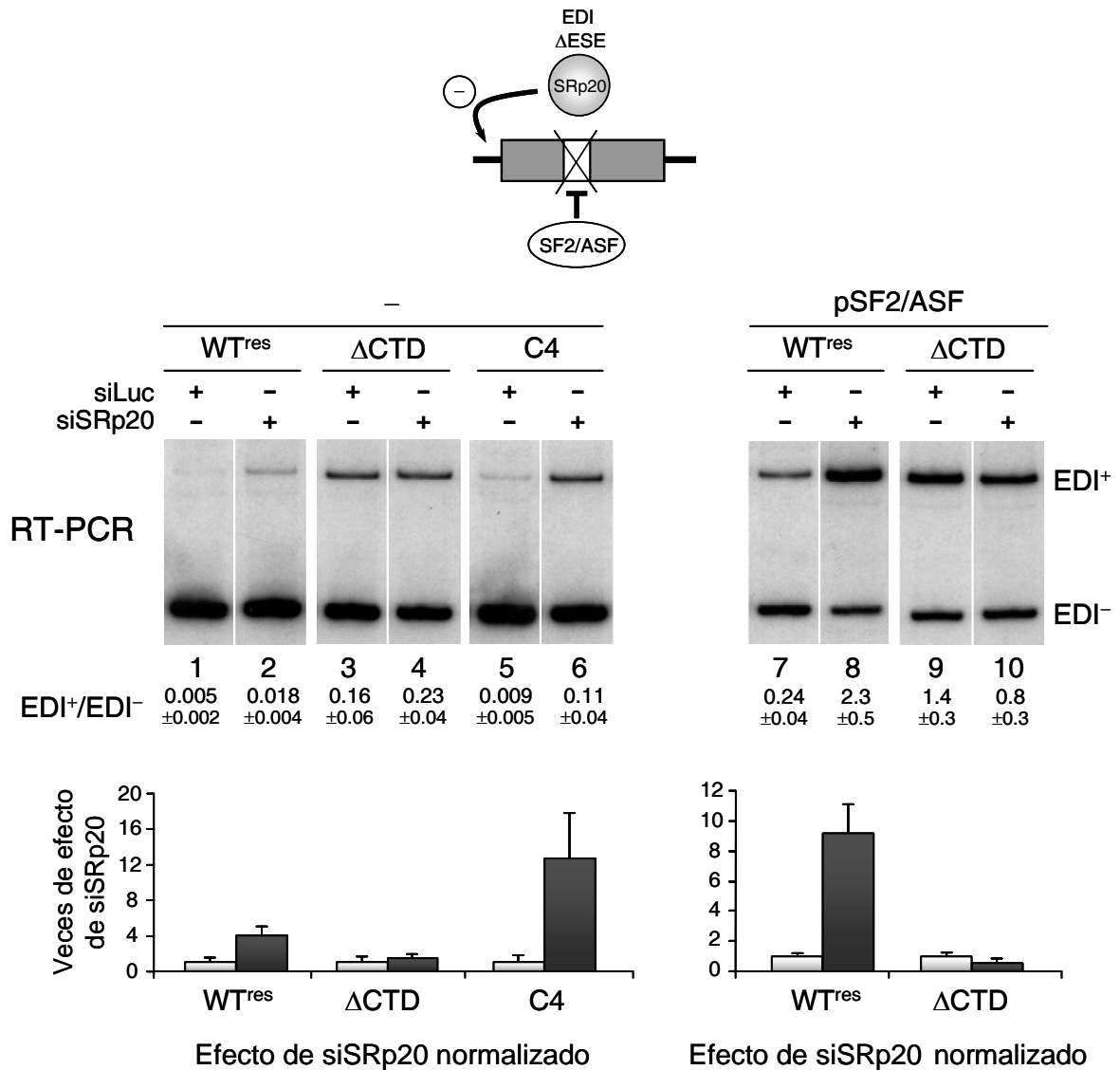


Figura 31. La falta de respuesta a siRNA contra SRp20 no es consecuencia de una elevada inclusión basal de EDI. Se co-transfectaron células Hep3B con pUHC-EDA ΔESE y diferentes vectores que expresan variantes de pol II en combinación con siRNAs específicos contra diferentes proteínas SR o contra Luc GL3 como control negativo. Se analizaron los niveles de inclusión de EDI por RT-PCR radiactiva. Calles 7-10: Se co-transfectaron 20 ng de un vector que expresa SF2/ASF para elevar los niveles basales de inclusión de EDI. Los histogramas expresan los promedios ± SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas de un mínimo de tres transfecciones independientes.

### La interacción entre SRp20 y el CTD no es directa

A pesar de que no se ha encontrado una interacción física entre proteínas SR y el CTD, y dada la interacción funcional demostrada en esta tesis, nos preguntamos si en nuestras

condiciones experimentales existía una interacción física directa entre el CTD y SRp20. Para ello utilizamos el sistema de doble híbrido para células humanas (*CheckMate<sup>TM</sup>*). El mismo se basa en la naturaleza modular de algunos factores de transcripción, con dominios de unión al DNA y dominios de transactivación capaces de estimular la transcripción. En el sistema *CheckMate<sup>TM</sup>*, se utilizan los dominios de unión al DNA del factor Gal4 y el dominio de transactivación de VP16, fusionados cada uno a una proteína o dominio proteico cuya interacción se quiere probar (cada uno en plásmidos separados). Una vez cotransfectados en células, los dominios Gal4 y VP16 se asocian sólo si las proteínas fusionadas a los mismos son capaces de interactuar. En estas condiciones, la transcripción de un reportero de luciferasa con sitios de unión para Gal4 (*pG5luc*) resulta activada. El vector pBIND contiene el dominio de unión al DNA de Gal4, y el vector pACT contiene el dominio de transactivación de VP16. Para probar si SRp20 interactuaba con el CTD, fusionamos SRp20 al dominio de unión al DNA de Gal4 (*pBIND-SRp20*) y el CTD completo con el dominio de

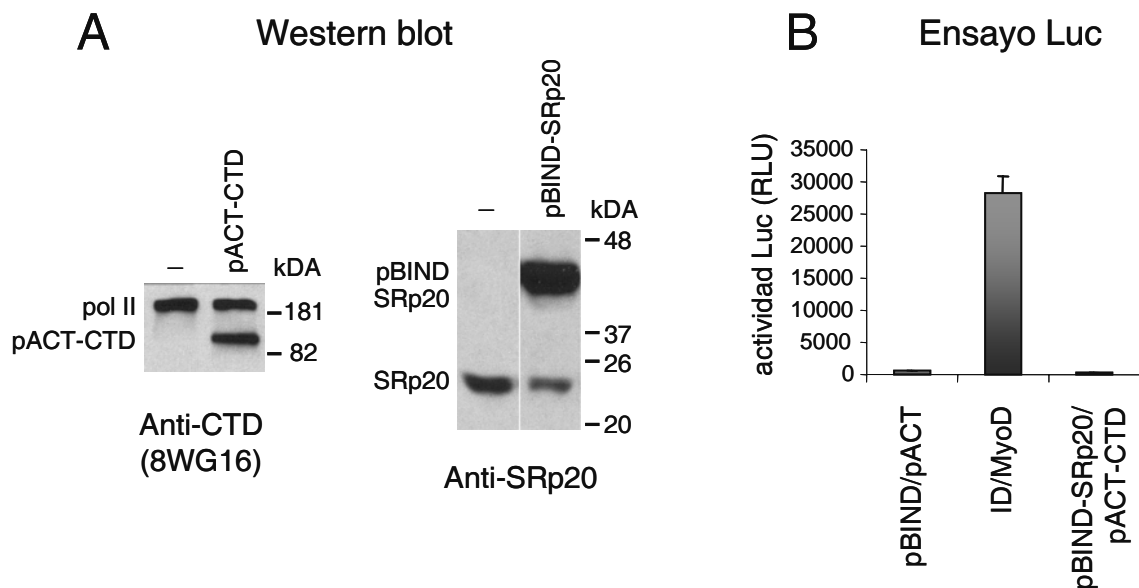


Figura 32. SRp20 y el CTD no interactúan directamente. Ensayo de doble híbrido en mamíferos (*CheckMate<sup>TM</sup>*). Se co-transfectaron células Hep3B con los vectores pBIND-SRp20, pACT-CTD y pG5luc. (A) Se analizó por Western Blot la expresión de las proteínas de fusión pBIND-SRp20 y pACT-CTD revelando con un anticuerpo anti-SRp20 y anti-CTD (8WG16) respectivamente. Puede verse que las proteínas endógenas también son detectadas (pol II y SRp20 respectivamente). (B) Ensayo de luciferasa. Como control negativo se transfectaron los vectores vacíos pBIND y pACT. Como control positivo se transfectaron los vectores pACT-MyoD (MyoD) y pBIND-Id (ID).

transactivación de VP16 (pACT-CTD). Antes de realizar el ensayo comprobamos por Western blot que las dos proteínas de fusión se expresaran correctamente. La Figura 32A muestra que las dos proteínas de fusión son expresadas en células Hep3B. pBIND-SRp20 presenta el peso molecular esperado de 39 kDa, mientras que pACT-CTD muestra un peso molecular aparente mayor al esperado (90-100 kDa contra 50 kDa esperados), posiblemente debido a que es altamente fosforilado *in vivo*. Esto coincide con lo observado por otros autores que expresaban péptidos sintéticos de CTD de distintos largos. Para todos los largos reportados, el peso molecular aparente de los péptidos sintéticos prácticamente duplicaba el esperado de acuerdo al número de aminoácidos (Du y Warren 1997), y los mismos eran reconocidos por anticuerpos específicos contra CTD fosforilado. El anticuerpo 8WG16 utilizado en nuestros experimentos es capaz de reconocer al CTD tanto hipo como hiperfosforilado, de modo que no permite determinar el estado de fosforilación directamente.

Como control positivo del ensayo de doble híbrido utilizamos dos vectores que expresan dos proteínas cuya interacción *in vivo* es conocida. Los plásmidos pACT-MyoD (MyoD) y pBIND-Id (ID) expresan segmentos de los reguladores miogénicos MyoD e Id capaces de interactuar *in vivo*. En estas condiciones, mientras que los plásmidos MyoD e ID activaron significativamente al reportero de luciferasa, la coexpresión de pBIND-SRp20 y pACT-CTD no indujo activación (Figura 32B). En este punto lo correcto hubiese sido probar la combinación recíproca de fusiones (pBIND-CTD y pACT-SRp20). Sin embargo, aunque pudimos obtener el subclonado pBIND-CTD, este no se expresó correctamente al ser transfectado en células. La conclusión es que en las condiciones probadas, SRp20 no interacciona directamente con el CTD de la pol II.

### **Otros casos de *splicing* alternativo. Efectos diferenciales de la pol II $\Delta$ CTD y de la mutante lenta hC4**

El efecto diferencial encontrado de la pol II  $\Delta$ CTD sobre distintas proteínas SR sugiere que el CTD podría regular diferencialmente a distintos exones alternativos según el tipo de mecanismo que regule a cada uno. De acuerdo a lo expuesto en la introducción distintas disposiciones de elementos en *cis* exónicos e intrónicos, junto con factores en

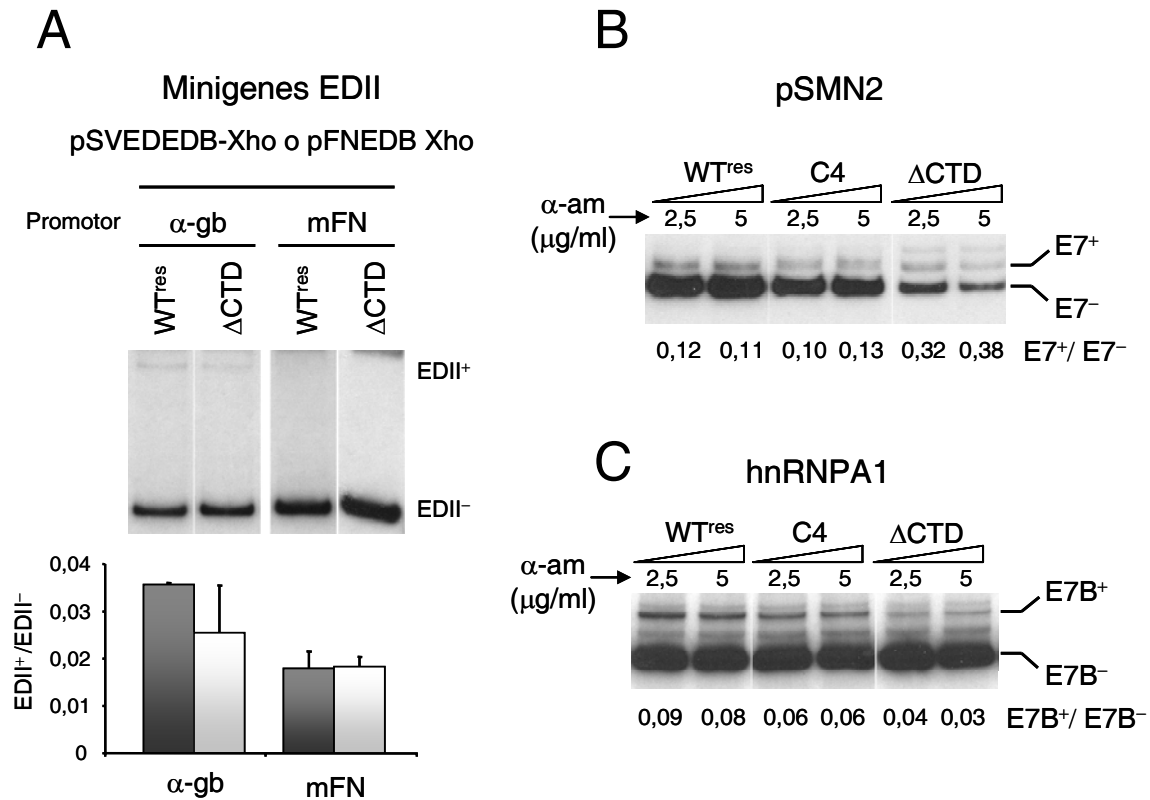


Figura 33. Efecto del CTD sobre otros exones alternativos. Se co-transfectaron células Hep3B con los minigenes indicados junto con vectores de expresión para variantes de pol II. Se trataron las células 24 hs postransfección con  $\alpha$ -amanitina y se cosecharon a las 48 hs. Posteriormente se analizaron las isoformas señaladas por RT-PCR radiactiva. (A) Minigenes EDII pSVEDEDB-Xho o pFNEDB Xho. EDII. Los histogramas expresan los promedios  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR indicadas. (B) Análisis para el minigen SMN2. (C) Análisis para el minigen hnRNPA1 (ver también Figura 14C).

*trans* específicos para cada caso, regulan diferencialmente las decisiones de *splicing* en distintos exones alternativos.

Entre los casos de exones alternativos probados, la inclusión del exón cassette EDII de fibronectina mostró no ser afectada por la pol II  $\Delta$ CTD con ninguno de los promotores ensayados (Figura 33A). Un caso interesante resultó ser el exón 7 del gen *SMN2* (Figura 33B). En presencia de la pol II  $\Delta$ CTD, el exón 7 de *SMN2* aumenta levemente su inclusión con cantidades crecientes de  $\alpha$ -amanitina. La inclusión del exón 7 no cambia en presencia de la mutante lenta hC4, sugiriendo un mecanismo no relacionado a cambios en la velocidad de elongación. Debe notarse que la cantidad total de transcripto disminuye considerablemente en presencia de la pol II  $\Delta$ CTD. Esto ocurre porque el

promotor de CMV que posee este minigén tiene elementos *enhancer* de la transcripción, y el CTD es necesario para mediar eficientemente el efecto de los mismos (Gerber et al. 1995). Aun en estas condiciones subóptimas de transcripción por la pol II  $\Delta$ CTD puede detectarse un efecto. Si bien en los dos casos anteriores la pol II  $\Delta$ CTD induce aumento en la inclusión de los exones alternativos, encontramos un caso en el cual el efecto parece ser opuesto. La inclusión del exón 7B del gen *hnRNPA1* resulta parcialmente inhibida por la pol II  $\Delta$ CTD (Figura 33C). Del mismo modo que para el exón 7 de *SMN2*, la polimerasa lenta hC4 no afecta significativamente la inclusión de este exón (ver también Figura 17C), lo cual es consistente con el hecho de que un mecanismo adicional al control por elongación opera en el acoplamiento entre el *splicing* alternativo y la transcripción.



## Discusión

### Modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo

Distintas evidencias de nuestro y de otros laboratorios eran indicativas de que un mecanismo cinético operaba sobre la regulación del *splicing* alternativo. Varios estudios sugerían que la velocidad de síntesis de mensajeros impactaba sobre el *splicing* (ver introducción) y sobre otras reacciones de procesamiento, en particular el procesamiento 3' (Yonaha y Proudfoot 1999). Sin embargo todos los enfoques experimentales utilizados en estos estudios se valían de estrategias indirectas para modificar la tasa de elongación de la pol II. En particular la utilización de factores de transcripción capaces de estimular selectivamente la elongación transcripcional (Kadener et al. 2001; Nogués et al. 2002), la utilización de drogas como el DRB que inhiben la elongación (Nogués et al. 2002), la introducción de pausas transcripcionales en regiones intrónicas (Roberts et al. 1998), la inserción de enhancers transcripcionales capaces de estimular la elongación (Kadener et al. 2002) y la inducción de cromatinización del molde que obstaculiza el avance de la pol II (Kadener et al. 2001). En conjunto estas estrategias conformaron un cuerpo sólido de evidencias a favor del modelo cinético, pero poseían al mismo tiempo limitaciones que impedían probar el modelo rápida y específicamente en otros genes con *splicing* alternativo. La mayoría de estos experimentos requieren de la construcción de vectores con promotores específicos y/o inserciones determinadas para producir los efectos buscados. Esto impide probar el modelo sobre genes endógenos en su estado transcripcional y contexto cromatínico fisiológicos, mientras que se limita a utilizar reporteros transfectados en forma transitoria en cultivos de líneas celulares. Aunque la utilización de drogas como el DRB o flavopiridol ofrece una solución parcial a este inconveniente, la especificidad de las mismas presenta cierta limitación y puede conducir a efectos pleiotrópicos indeseados.

Para obtener una respuesta más directa al problema, aprovechamos de la existencia de mutantes de pol II con una reducida velocidad de elongación y así probar en modelo cinético tanto en transfecciones transitorias como en genes endógenos.

## Una polimerasa lenta como modelo

Gracias a la colaboración establecida con el Dr. David Bentley de la Universidad de Colorado obtuvimos un vector de expresión para una mutante de pol II humana con una mutación puntual (R749H) en su subunidad mayor. Esta mutación es equivalente a la mutación C4 de *Drosophila* (R741H), descrita hace más de 30 años por A. Greenleaf y col. (Greenleaf et al. 1979), quienes entonces se hallaban estudiando aspectos básicos de la estructura, función y regulación de la pol II. Una estrategia muy utilizada para analizar a la pol II ha sido la purificación de formas alteradas de la enzima. Para ello, la toxina  $\alpha$ -amanitina del hongo *Amanita phalloides*, un potente y específico inhibidor de la pol II, ha sido de gran utilidad en estos estudios. La mutante C4 se obtuvo originalmente por mutagénesis inducida con EMS (Sulfonato de etilmetano), y seleccionada por su capacidad de inducir resistencia a  $\alpha$ -amanitina en moscas *Drosophila melanogaster* (Greenleaf et al. 1979). Este fue de hecho el primer organismo eucariota resistente a  $\alpha$ -amanitina que se describió. Mapeos posteriores determinaron que la mutación estaba situada en el cromosoma X y afectaba a la subunidad mayor de la pol II (Greenleaf et al. 1980; Chen et al. 1993).

Los primeros estudios demostraron que la pol II C4 tiene *in vitro* una velocidad de elongación reducida a la mitad en comparación con la pol II WT (Coulter y Greenleaf 1985). Más tarde se demostró que la mutante C4 es menos eficiente que la WT en transcribir a través de arrestos transcripcionales, que responde más lentamente a factores que desarrestan a la pol II (TFIIS) y que su movimiento hacia atrás en la reacción reversa a la transcripción (pirofosforólisis) ocurre también más lentamente (Chen et al. 1996). El hecho de que la mutación C4 *per se* confiera resistencia a  $\alpha$ -amanitina se explica porque reduce la afinidad de la enzima por la toxina (Coulter y Greenleaf 1982). De hecho el sitio de unión de la  $\alpha$ -amanitina a la subunidad mayor de la polimerasa coincide con la región en la que se sitúan la mayoría de las mutaciones que dan resistencia a la toxina. En este sentido se ha propuesto que la mutación C4 podría inducir cambios funcionales similares a los que causa la unión de  $\alpha$ -amanitina a la enzima (Chen et al. 1996). Esto es consistente con el hecho de que, aunque en distinta medida, tanto la mutación C4 como la  $\alpha$ -amanitina reducen la translocación del DNA y RNA próximos al sitio activo de la polimerasa, la cual es necesaria para la elongación de la cadena nascente de RNA (Chen et al. 1996; Bushnell et al. 2002).

En esta tesis demostramos que la expresión de la mutante lenta hC4 en líneas celulares provoca una disminución de la transcripción de aproximadamente 40% (Figura 14C), lo cual es coherente con la disminución del 50% en la elongación *in vitro* causada por la mutación C4 en *Drosophila* (Coulter y Greenleaf 1985). Debido al alto grado de conservación en la estructura de la pol II entre distintas especies, era altamente probable que la mutación C4 de *Drosophila* afectara a la pol II humana de igual manera. Sin embargo, dado que no se conocían los efectos de esta mutación *in vivo*, y menos aún si la mutación produciría los mismos efectos en la pol II humana, fue necesario medir la velocidad de elongación de esta polimerasa al ser transfectada en líneas celulares humanas.

Debido a la dificultad técnica de medir la velocidad de elongación *in vivo*, inicialmente nos limitamos a evaluar la procesividad de la pol II mutante como una estimación indirecta de la velocidad de elongación. En función de lo expuesto en la introducción, asumimos que al estar relacionadas, una disminución en la procesividad indicaría una menor velocidad de elongación. Mediante RT-PCR en tiempo real determinamos que la polimerasa hC4 produce un aumento en la acumulación de pre-mRNAs proximales sobre distales en comparación con la pol II WT<sup>res</sup>, mostrando que la mutación hC4 provoca una disminución de la procesividad en células humanas (Figura 15). Si bien esto sugería que la mutante tenía una menor velocidad de elongación *in vivo*, varios puntos débiles en la interpretación podían potencialmente invalidar dicha conclusión. En primer lugar, si bien asumimos que al cuantificar mensajeros inmaduros estaríamos evaluando indirectamente la procesividad, el resultado en realidad podría reflejar la velocidad relativa de eliminación de los intrones, y no la procesividad real de la polimerasa. Por otro lado, de acuerdo a lo expuesto en la introducción, una disminución en la procesividad de la pol II no necesariamente está acompañada de una reducción en la velocidad de elongación (Mason y Struhl 2005). De modo que era requerida una técnica que evaluara directamente la velocidad de elongación para demostrar el efecto de la mutación hC4 sobre la misma.

En colaboración con Edouard Bertrand del Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Francia, pudimos utilizar un método para visualizar y medir directamente la velocidad de síntesis de RNA por la pol II. Los resultados obtenidos demostraron que la mutante hC4 es efectivamente más lenta en elongar genes *in vivo* en células humanas (Figura 16). Debe tenerse en cuenta que la velocidad medida en este ensayo no es una

medida de la velocidad instantánea de cualquier polimerasa transcribiendo en un momento dado. En cambio, refleja la velocidad promedio de múltiples moléculas de polimerasa transcribiendo en un tiempo dado al gen reportero. La velocidad medida está a su vez determinada por la frecuencia y tiempo de pausado de las polimerasas y no sólo por la velocidad intrínseca (entre pausas) de las polimerasas a lo largo del reportero. El patrón de pausado de las polimerasas en distintas posiciones a lo largo del gen no puede determinarse con este ensayo. Esto significa que la mutante lenta podría en realidad tener una velocidad catalítica normal *in vivo*, pero ser más propensa al pausado, lo cual se reflejaría en una menor velocidad promedio. Sin embargo, en función de los resultados *in vitro* para la mutante C4, lo más probable es que además de ser más susceptible al pausado posea también una menor velocidad de elongación. Afortunadamente ninguna de las dos posibilidades invalidaría las conclusiones de este trabajo.

Otro dato importante de estos resultados es que la polimerasa lenta es capaz de transcribir genes integrados en el genoma celular y que por lo tanto tienen una estructura cromatínica. Esto es coherente con el hecho de que moscas C4 son viables, y permitirá en un futuro utilizar a esta mutante para estudiar la regulación del *splicing* alternativo en genes endógenos humanos.

### **Efectos de la mutante lenta sobre el *splicing* alternativo de exones cassette**

Los resultados del capítulo 1 demuestran que la transcripción mediada por la pol II lenta estimula la inclusión del exón alternativo EDI (Figura 17A). Este efecto es dependiente de la dosis de  $\alpha$ -amanitina; las mismas dosis aplicadas a células en las cuales no se ha transfectedo la mutante lenta no afectan la inclusión de EDI (datos no mostrados). Esto indica que la mutante lenta, resistente a  $\alpha$ -amanitina, es responsable de transcribir los mensajeros sensibilizados a incluir EDI, los cuales no resultan de un efecto de la  $\alpha$ -amanitina *per se* ni de un efecto negativo dominante de la mutante sobre la polimerasa endógena. Por otro lado, la utilización de minigenes mutantes que carecen del ESE dentro de EDI, indican que la mutante lenta no puede reemplazar la necesidad de SF2/ASF para la inclusión de EDI.

Como la transcripción por la mutante lenta es menor que por la WT, la concentración de muchos factores, entre ellos SF2/ASF, estará potencialmente disminuida en la célula. Aunque parezca contradictorio, esta menor concentración de SF2/ASF podría actuar sobre otros factores e indirectamente aumentar la inclusión de EDI. Sin embargo, la disminución específica de SF2/ASF mediada por siRNA, inhibe los niveles de inclusión de EDI descartando esta posibilidad (Figura 19B). La posibilidad de efectos indirectos causados por la mutante lenta debido a cambios en la síntesis proteica, fue también descartada porque el tratamiento de células con cicloheximida no inhibe su efecto sobre la inclusión de EDI (Figura 18B).

Estos resultados refuerzan la hipótesis del mecanismo cinético según el cual la correlación inversa entre la velocidad de elongación y la inclusión de EDI se debe a que las decisiones de *splicing* alternativo son dictadas por la velocidad de elongación de la pol II. Esto valida las conclusiones de trabajos previos de nuestro laboratorio mediante una prueba más directa, ya que la polimerasa hC4 tiene efectivamente una menor velocidad de elongación que pudo ser medida experimentalmente (Figura 16). Por otro lado, la mutante lenta produce niveles de mensajero comparables a los de la WT, situación que difiere significativamente de las demostraciones previas en las cuales se comparaban condiciones donde los niveles de transcripción eran muy distintos (por ejemplo en presencia o ausencia del transactivador VP16 (Kadener et al. 2001; Nogués et al. 2002), o en presencia o ausencia del enhancer de SV40 (Kadener et al. 2002)).

De modo consistente con lo encontrado para EDI en esta tesis, en un trabajo simultáneo (Howe et al. 2003) se encontró que la exclusión de un exón de un gen de levaduras es inhibido cuando la velocidad de elongación es reducida en mutantes de pol II o cuando las células son tratadas con inhibidores de la elongación. A partir de genes que tienen dos intrones y un exón interno constitutivo, los autores construyeron minigenes mutantes para debilitar el reconocimiento del punto de ramificación (*branchpoint*) del intrón 1 y así crear un exón *cassette* alternativo. La inclusión de este exón *cassette* artificial está aumentada en levaduras mutantes que contienen una pol II lenta y es inhibida por la sobreexpresión del factor de elongación TFIIS.

Una evidencia de que la velocidad de elongación puede afectar a la cinética de reclutamiento de factores y a la eficiencia del *splicing* en levaduras fue provista recientemente por el grupo de Michael Rosbash (Lacadie et al. 2006). Por medio de una estrategia muy ingeniosa los autores demostraron que el *splicing* protege a los

mensajeros que contienen intrones de los efectos inducidos por el corte de una ribozima intrónica (ribozima cabeza de martillo, del inglés *hammerhead ribozyme*), en una clara muestra de que en este sistema el *splicing* ocurre cotranscripcionalmente. El corte por la ribozima (situada en el medio de un intrón) y el *splicing* compiten temporalmente, de modo que la ribozima es capaz de cortar al intrón sólo si la eficiencia del *splicing* está disminuida. En este trabajo se utilizó un reportero diseñado de tal modo que expresara  $\beta$ -galactosidasa únicamente cuando el *splicing* fuera eficiente, es decir en ausencia del corte por la ribozima. Esto les permitió realizar un rastreo para detectar mutantes que afectaran la expresión de  $\beta$ -galactosidasa e indirectamente la eficiencia del *splicing* cotranscripcional. En esta búsqueda los autores encontraron dos genes que resultaron codificar sendos factores de elongación (TFIIS y Paf1p) que al estar mutados reprimen la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa probablemente a través de afectar la eficiencia de *splicing*. Sin embargo aunque TFIIS causa una reducción en la eficiencia del *splicing* cotranscripcional (medida a través de ChIP), Paf1p no lo afecta, e implica que los cambios en la elongación por parte de estos factores no son los únicos determinantes de los fenotipos observados en cada mutación. Estos factores podrían cumplir funciones adicionales como en el procesamiento 3' y modificación de la cromatina en el caso de Paf1p (Lacadie et al. 2006).

De manera similar un trabajo reciente demostró que la catálisis del *splicing* en células de mamífero ocurre en íntimo contacto con la cromatina (y por ende con la maquinaria transcripcional). Una reducción en la velocidad de elongación de la pol II inducida por la droga camptotecina, que bloquea a la topoisomerasa I, estimula el ensamblaje del *spliceosoma* en genes con intrones y acelera significativamente la catálisis del *splicing* (Listerman et al. 2006).

Aunque el modelo cinético podría afectar a otros genes con exones *cassette* alternativos, es importante señalar que no todas las regiones que tienen *splicing* alternativo están sujetas al control por la elongación (Figuras 17B y C). Distintos factores como la arquitectura de pausado en cada unidad transcripcional, la arquitectura exón-intrón de cada gen, y la fuerza relativa de los sitios de *splicing* que son presentados al *spliceosoma* deben ser cruciales para el grado de respuesta a la velocidad de elongación. Por otro lado, la disposición de elementos en cis que regulan positiva y negativamente a cada exón determinan su sensibilidad a la velocidad de elongación. En este sentido el exón EDII, cuya inclusión es insensible a la transcripción por la polimerasa lenta, se

torna sensible a la misma si se inserta un fragmento con la región regulatoria de EDI (ESE y ESS) en el centro del exón (Tesis de Licenciatura de Mariano Alló, 2004). Al igual que EDI, la inclusión de este exón quimérico es estimulada significativamente en presencia de la polimerasa lenta. La eliminación adicional de un enhancer intrónico (ISE) río abajo de este EDII, aumenta aún más la respuesta de este exón a la transcripción lenta. Existe la posibilidad de que este incremento en la respuesta sea consecuencia de una alteración en la arquitectura de pausado río abajo de EDII. Si una pausa se generara como resultado de la eliminación del ISE, esta podría a su vez afectar en mayor medida a la polimerasa lenta debido a su reducida capacidad de elongar a través de arrestos transcripcionales. Sin embargo experimentos no mostrados en esta tesis, en los cuales se insertaron pausas transcripcionales río abajo de EDII, muestran que las mismas no son suficientes para sensibilizar al exón EDII a la velocidad de elongación. Evidentemente muchos factores dictan el modo de regulación de cada exón y la velocidad de elongación participa como un factor más en la compleja regulación del *splicing* alternativo.

### **Efectos de la mutante lenta sobre el *splicing* alternativo de E1A**

A pesar del claro efecto de la elongación sobre la selección de sitios *splicing* no se conocen en la naturaleza casos en los cuales la regulación del *splicing* alternativo esté dada por la modulación de la elongación. En este sentido el gen E1A de adenovirus es un caso particular en el cual este tipo de regulación podría estar operando. El hecho que nos condujo a estudiarlo fue la estricta correlación existente entre la regulación normal del *splicing* de E1A durante el ciclo de infección del adenovirus y algunos resultados previos de nuestro grupo.

La expresión de genes del adenovirus está regulada temporalmente en el curso de la infección no sólo a nivel de la transcripción, sino también a nivel del procesamiento del mRNA. La acumulación de distintas variantes de *splicing* alternativo es un proceso regulado en este sistema y fue la primera evidencia en eucariotas de que la expresión génica puede estar regulada al nivel del procesamiento alternativo del mRNA (Imperiale et al. 1995). El *splicing* mismo fue descubierto por primera vez en adenovirus (Berget et al. 1977) y existe la interesante posibilidad de que la regulación del *splicing* alternativo

por cambios en la elongación sea demostrada por primera vez en este sistema. Mucho para un solo virus.

Existen varias diferencias entre los genes de adenovirus y los genes celulares. Además de contener menos intrones que los genes celulares, la arquitectura exón-intrón en adenovirus difiere significativamente de los genes celulares (Imperiale et al. 1995). Los modos más estudiados de *splicing* alternativo en adenovirus incluyen: sitios de *splicing* 5' alternativos con un único sitio 3' en los genes E1A y E1B; y sitios 3' alternativos con un único sitio 5' en el gen L1 (Figura 34).

El ciclo normal en la infección por adenovirus comprende dos estadios bien diferenciados, temprano y tardío. La tendencia general es que durante la fase temprana de infección se producen isoformas de *splicing* largas (eliminación de intrones cortos) y durante la fase tardía se acumulan isoformas cortas (eliminación de intrones largos) (Figura 34). Por ejemplo, las isoformas E1A 13S y E1B 22S son las más abundantes durante la fase temprana de la infección, mientras que las isoformas E1A 9S y E1B 13S predominan en la fase tardía. Las dos fases en la infección viral están delimitadas por una serie de eventos que incluyen la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas tardías del virus. Aunque algunas evidencias sugerían que el cambio en el patrón de *splicing* requería de la síntesis de proteínas virales, resultados posteriores indicaron que la replicación del DNA viral *per se* es capaz de inducir el cambio de isoformas de *splicing* tempranas a tardías (Adami y Babiss 1991; Larsson et al. 1991). En un experimento muy elegante se demostró que dos moldes idénticos de DNA virales introducidos en la misma célula sufren *splicing* diferencialmente según la fase del ciclo en la que se encuentran. Esto indicaba que la replicación le confiere al genoma viral propiedades *in cis* que afectan su *splicing* alternativo independientemente de los factores *in trans* presentes en el núcleo celular. Una interpretación interesante para esos hallazgos propuso que como consecuencia de la replicación, el molde adquiere una estructura cromatínica más compacta que reduce la velocidad de elongación o pausado de la polimerasa, la cual a su vez afectaría el *splicing* alternativo. Resultados similares de nuestro grupo demostraron que este tipo de regulación puede ocurrir sobre el exón EDI de fibronectina cuando los minigenes son forzados a replicar su DNA. Los nucleosomas depositados sobre el molde llevarían a una menor velocidad de elongación por parte de la pol II, aumentando inclusión de EDI (Kadener et al. 2001). De modo coherente con estas evidencias, en esta tesis se demostró que la mutante lenta induce un



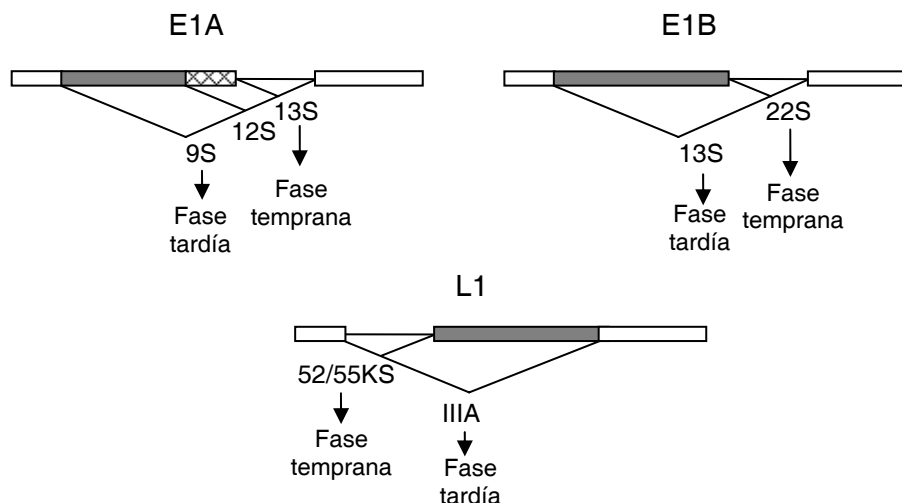


Figura 34. Genes de adenovirus con distintos modos de *splicing* alternativo.

aumento en la proporción de isoformas cortas de E1A (relación 9S/13S), en el mismo sentido que la replicación del molde viral, lo cual apoya el modelo arriba descrito (Figuras 17D y 18A).

Un punto interesante a resaltar es que la mutante lenta y la proteína SF2/ASF se comportan de una manera distinta sobre el *splicing* de EDI y E1A. Mientras que la mutante lenta tanto como SF2/ASF aumentan la inclusión de EDI (Figura 17A y 19B), se comportan de modo opuesto en E1A, ya que la mutante lenta aumenta la proporción de isoformas cortas de E1A y SF2/ASF la proporción de isoformas largas (Figura 17D y datos no mostrados). Esto implica que los pasos limitantes en la selección de sitios de *splicing* que favorece la transcripción lenta no son los mismos en cada gen, e indica que no es posible predecir (al menos no todavía) el efecto que tendrá una menor velocidad de elongación sobre el *splicing* alternativo de distintos genes. Además de los casos que no responden a la elongación (Figura 17B y C), resultados preliminares sugieren que algunos exones pueden inclusive disminuir su inclusión en presencia de la mutante lenta (datos no mostrados). En estos casos, el retraso en la síntesis de secuencias regulatorias intrónicas (como un ISE) podrían conducir a la exclusión de exones.

Para agregar aún más complejidad a estas consideraciones, existe la hipótesis de que tanto una elongación más lenta como más rápida tengan el mismo efecto sobre el *splicing* de ciertos genes (Bentley, comunicación personal). Según esta hipótesis, la cinética de ensamblaje de las maquinarias ribonucleoproteicas involucradas en las

reacciones de procesamiento del mRNA está finamente sintonizada. De modo que un aumento o reducción en la velocidad de elongación de la pol II (o cambios en el patrón de pausado) llevarían a la formación de complejos no funcionales, con estructuras secundarias de RNA o factores de unión al RNA incorrectos. Aunque todavía falta una demostración formal para esta hipótesis, es probable que en ciertos genes, sólo una velocidad óptima de elongación permita un procesamiento cotranscripcional eficiente.

Todas estas observaciones ponen de manifiesto la extraordinaria complejidad del procesamiento cotranscripcional, que seguramente dista aun de ser resuelta por nuestras muchas veces rudimentarias aproximaciones. Afortunadamente esto no afecta la validez de los resultados obtenidos, que muy probablemente deberán ser reinterpretados a la luz de nuevos hallazgos.

### **Efectos de la mutante lenta sobre el *resplicing* de *Ubx* de *Drosophila***

La utilización de minigenes transfectados resultó ser una herramienta extremadamente útil para encontrar el mecanismo por el cual la transcripción controla el *splicing* alternativo. Sin embargo la relevancia fisiológica de los experimentos de transfección podría ser cuestionable debido a que los minigenes son construcciones quiméricas donde las regiones alternativas de *splicing* están posicionadas a distancia incorrecta con respecto a los promotores. Una aproximación más fisiológica al acoplamiento entre transcripción y *splicing* debe necesariamente considerar un gen endógeno en su entorno natural.

La existencia de la mutante lenta en *Drosophila* ofrece la posibilidad de estudiar el efecto de la elongación sobre el *splicing* alternativo de genes endógenos en un organismo multicelular eucariota. Aunque las moscas C4 son viables y fértiles, presentan un defecto en su desarrollo que también es observado en mutantes para otros alelos de pol II. Esto se manifiesta en un fenotipo homeótico dominante en el cual las estructuras de alas rudimentarias (halterios) del tercer segmento torácico (T3) se transforman parcialmente en estructuras análogas del segundo segmento torácico (T2), es decir en alas (Greenleaf et al. 1980) (Figura 35A). Este fenómeno es denominado “efecto *Ubx*”, debido a que un fenotipo similar se observa en moscas heterocigotas para la mutación de gen *Hox Ubx* (Ultrabitorax), que expresan una cantidad insuficiente de la

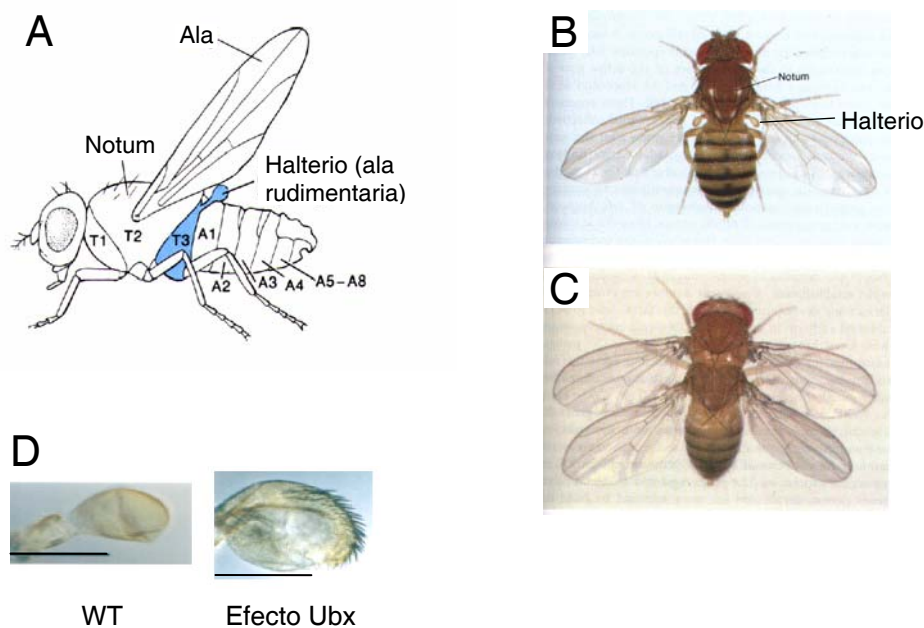


Figura 35. Transformación homeótica en *Drosophila* del tercer segmento torácico (T3) en uno idéntico al segundo segmento (T2). (A) Diagrama que muestra los segmento abdominales y torácicos normales de *Drosophila*. Notar la estructura de ala rudimentaria (halterio) derivada del segmento T3. (B) Mosca WT con una copia de T2 y una T3. (C) Mutante triple homocigota en el complejo bitorax que presenta una transformación completa del segmento T3 en T2. Extraído de (Griffiths *et al.* 1996). (D) Halterios de moscas WT y mutantes  $Ubx^{6,28}/bx^{34E}$  con haploisuficiencia para *Ubx* (Kerridge y Morata 1982). Notar que la escala es la misma en los dos casos. Extraído de Scott D. Weatherbee S.D. *et al.* 1998.

proteína *Ubx* (haploinsuficiencia) (Figura 35D). Cuando el gen *Ubx* está mutado en homocigosis, la transformación de tercer segmento torácico es completa y resulta en moscas con dos pares de alas (Lewis 1978) (Figura 35B-C). La mutación C4 en *Drosophila* provoca además un aumento sinérgico del fenotipo originado por mutaciones en el gen *Ubx* (Mortin et al. 1988). Estas observaciones, junto al hecho de que *Ubx* expresa distintas isoformas de *splicing*, nos llevaron a investigar el *splicing* alternativo de *Ubx* en moscas C4.

El gen homeótico *Ubx* presenta un modo de *splicing* alternativo particular denominado *resplicing* (Figura 20A). En este mecanismo de *splicing*, las juntas exón-exón formadas en un paso inicial de *splicing*, regeneran sitios 5' que puede ser reutilizados en pasos de *splicing* subsiguientes. Este mecanismo permite que el inmenso tamaño de los intrones de *Ubx* no impida su eficiente eliminación. Para la generación de las isoformas

cortas de *Ubx* (IIa y IVa, que excluyen a los microexones mI y mII), el *resplicing* permite la eliminación de los intrones en etapas lo que reduce su tamaño efectivo. De lo contrario, la formación de la isoforma IVa por ejemplo, requeriría la eliminación de un intrón de 74 kb (abarcando los 3 intrones internos y los 2 microexones) cuya transcripción lleva aproximadamente 60 min. De este modo el *resplicing* minimiza el tamaño de los intrones y permite que sean eliminados ni bien son transcriptos.

En colaboración con el Dr. Claudio Alonso del Departamento de Zoología de la Universidad de Cambridge, demostramos que la mutación C4 aumenta la eficiencia del *resplicing* de *Ubx* en algunos estadios del desarrollo de *Drosophila*, y favorece la generación de isoformas cortas de *splicing* (Figura 20B). Esto indica que el mecanismo de control cinético podría operar sobre el *splicing* de *Ubx*, alterando el patrón normal de isoformas y posiblemente contribuyendo al fenotipo observado en esta mutante. Actualmente no se sabe en qué medida la alteración en el *resplicing* de *Ubx* es causante del “efecto *Ubx*”. Un trabajo en particular muestra que mutaciones en ciertos genes, como el gen *hrp48* (de la familia hnRNPA/B), aumentan la eficiencia del *resplicing* en el mismo sentido que la mutación C4, y provocan también un aumento sinérgico del efecto *Ubx* (Burnette et al. 1999). En el mismo sentido, otras mutaciones y *deficiencias* que aumentan el efecto *Ubx* son también capaces de aumentar la eficiencia del *resplicing*. El hecho de que las isoformas de *splicing* de *Ubx* sean distintas funcionalmente, y que estén altamente reguladas durante el desarrollo de modo específico de tejido y estadio, sugiere que la regulación del *splicing* (y no sólo de la transcripción de *Ubx*) tiene un papel importante en el desarrollo. Esto está apoyado por el hecho de que tanto la secuencia de isoformas como la regulación tejido específica del *splicing* de *Ubx* están altamente conservadas en distintas especies de *Drosophila* separadas por 60 millones de años de evolución (Bomze y López 1994). Además el patrón de *splicing* de *Ubx* es muy estable, y son relativamente pocas las mutaciones que lo afectan (Burnette et al. 1999).

Los resultados obtenidos con la mutante lenta implican que el mecanismo de control cinético del *splicing* podría operar sobre genes endógenos y cumplir funciones en el desarrollo u homeostasis de los organismos. Juntos, el *splicing* del gen E1A de adenovirus y el *resplicing* de *Ubx* constituyen dos ejemplos posibles de este tipo de control.

## Distintos modos de *splicing* alternativo, distintas respuestas a la mutante lenta

Nuestros resultados indican que el control cinético ocurre de modo diferente en genes con exones *cassette* opcionales como EDI, con respecto a genes que presentan sitios de *splicing* 5' alternativos o *resplicing*, como E1a y Ubx respectivamente. A diferencia del *splicing* de exones *cassette*, el *resplicing per se* permite la eliminación de cada intrón inmediatamente después de ser transcritos, lo cual evita la competencia entre sitios de *splicing* alejados en el tiempo y espacio (Hatton et al. 1998). Esto explica por qué una velocidad de elongación lenta aumenta la inclusión del exón EDI pero favorece el *resplicing* en Ubx. Según nuestro modelo, la exclusión de EDI ocurre porque el SS 3' del intrón río arriba es un sitio débil en comparación con el SS 3' del intrón río abajo. Si la pol II reduce su velocidad de elongación o si se pausa en algún punto entre estos dos sitios, solo la eliminación del intrón río arriba puede ocurrir. Una vez superada la pausa o si la polimerasa continúa a su velocidad normal, no queda otra opción para la maquinaria de *splicing* que eliminar el intrón río abajo. Una alta velocidad de elongación, o la ausencia de pausas internas, favorecería la presentación simultánea de los dos intrones a la maquinaria de *splicing*, situación en la cual el sitio de *splicing* 3' fuerte del intrón río abajo sería más utilizado que el sitio de *splicing* 3' débil del intrón río arriba, resultando en la eliminación de EDI (ver modelo Figura 36). En el caso de E1A, una velocidad de elongación lenta o el pausado daría más tiempo para el reclutamiento de componentes de *splicing* al sitio de 5' más distal con respecto al sitio 3', favoreciendo así la generación de isoformas cortas.

De acuerdo a lo expuesto en la sección anterior, esta sencilla interpretación no es necesariamente generalizable a otros genes y la respuesta del *splicing* alternativo a la elongación dependerá en cada caso de múltiples factores involucrados.

## Modelo de reclutamiento en la regulación del *splicing* alternativo

El modelo de acoplamiento cinético ha surgido como un modo natural de regulación del *splicing*. Aun en ausencia de interacciones físicas directas entre las maquinarias responsables de la síntesis de mensajeros, el modelo cinético es concebible desde el punto de vista cotranscripcional del *splicing*, debido a la conexión temporal existente entre los dos procesos. Muchos fenómenos de acoplamiento inicialmente interpretados como el resultado de la interacción física entre maquinarias, pueden ser reinterpretados por medio de consideraciones cinéticas referidas a las velocidades relativas de las reacciones involucradas. Un ejemplo es el caso del efecto del promotor sobre el *splicing* alternativo (Kadener et al. 2002). Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de la pol II que copurifica con la maquinaria de *splicing* esté en su estado defosforilado (Robert et al. 2002), hace pensar que existen interacciones desde el inicio de la transcripción entre la maquinaria transcripcional y factores de *splicing*, que pueden eventualmente ser transportados por la pol II y afectar el procesamiento posterior de los mRNAs. Por otro lado, algunos efectos parecen contradictorios si son interpretados sólo desde el punto de vista de la elongación. Por ejemplo, los promotores de  $\alpha$ -gb y FN tienen un efecto diferencial sobre la inclusión de EDI (Cramer et al. 1997) (Figura 22B, calles 4 vs. 6; notar que el promotor  $\alpha$ -gb incluye significativamente menos que FN), pero en EDII no se detecta diferencia (Pagani et al. 2003) o la diferencia es ligera y en el sentido opuesto a EDI (Figura 33A, notar que a diferencia de EDI, el promotor de  $\alpha$ -gb incluye levemente más a EDII que el de FN. Tener en cuenta además que EDII no responde a la transcripción lenta, Figura 17B). Esta evidencia, junto con otras expuestas en el capítulo 2, sugiere que un mecanismo de reclutamiento está operando en paralelo al de elongación sobre el control del *splicing* alternativo.

## Una mutante de pol II sin CTD

En el capítulo 2 de esta tesis se demostró que la transcripción por una pol II mutante que carece del CTD ( $\Delta$ CTD) provoca un aumento marcado en la inclusión de EDI

independientemente del promotor que dirige la transcripción del minigén (Figura 22). Si este efecto se debiera a un fenómeno de reclutamiento significaría que la maquinaria de transcripción, quizás vía su CTD, está interaccionando con algún regulador/res en un paso de iniciación común en todos los promotores, o posterior al inicio de la transcripción. Resulta natural pensar que el carácter dinámico tanto de las maquinarias de transcripción como de *splicing* hace que las interacciones entre las mismas también lo sean y ocurran en distintos pasos durante el ciclo de la transcripción.

### **Un minigén inducible para el estudio del *splicing* alternativo de EDI**

Como el CTD es esencial para el control de la transcripción *in vivo*, existía la posibilidad de que al eliminarlo toda transcripción estuviera inhibida. De hecho la eliminación del CTD impide la transcripción de genes endógenos y es necesario para la transición de iniciación a elongación en la transcripción (Meininghaus et al. 2000; Lux et al. 2005). También está demostrado que el CTD es requerido para permitir la transactivación de activadores fuertes y de *enhancers* transcripcionales (Gerber et al. 1995).

En este tesis se desarrolló un sistema inducible con el fin de demostrar que la pol II  $\Delta$ CTD es capaz de transcribir minigenes transfectados transitoriamente. Esto se logró en base al sistema inducible clásico de tetraciclina (Tet-Off) (Gossen y Bujard 1992), pero cambiando el dominio de transactivación fuerte de VP16 por el de Sp1 que se sabía podía transactivar aun a través de una polimerasa sin CTD (Gerber et al. 1995). Mediante este sistema se demostró que la pol II  $\Delta$ CTD puede transcribir reporteros en transfecciones transitorias (Figura 23). La utilización de un minigén reportero de *splicing* alternativo inducible, permitió confirmar que los efectos observados sobre la inclusión de EDI son causados por la transcripción de de la pol II  $\Delta$ CTD y no debidos a efectos negativos dominantes sobre la pol II endógena (Figura 24A).

En reportes previos se indicaba que la falta de CTD provoca una inhibición global de las reacciones de procesamiento (*capping*, *splicing* y poliadenilación) (McCracken et al. 1997). Una reducción en la eficiencia global del *splicing* en nuestro sistema podría llevar a un desbalance en la competencia de sitios de *splicing* e indirectamente a un aumento en la inclusión de EDI en el mRNA maduro. De modo similar, dada la

interacción conocida entre el *capping* y la eliminación de intrones en la región 5' de genes (Proudfoot et al. 2002), existía la posibilidad de que la falta de CTD produjera una inhibición del *capping* que a su vez llevara a un efecto indirecto sobre el *splicing* alternativo de EDI. Por razones similares, un defecto en la poliadenilación podría afectar indirectamente el *splicing* alternativo (Proudfoot et al. 2002).

Por medio de RT-PCR en tiempo real, en esta tesis demostramos que la pol II  $\Delta$ CTD aumenta los niveles de inclusión de EDI sin afectar la eficiencia del *splicing* constitutivo (Figura 25A). Aunque la falta de inhibición del *splicing* constitutivo difiere de reportes previos llevados a cabo utilizando minigenes reporteros de  $\beta$ -globina (McCracken et al. 1997; Rosonina et al. 2003), es consistente con un estudio más reciente en el cual la falta del CTD no afecta el *splicing* normal del intrón 4 en los transcritos de ADAR2 (adenosina deaminasa que actúa sobre el RNA) (Laurencikiene et al. 2006). Por otro lado demostramos que el CTD afecta el *splicing* alternativo de una manera independiente del *capping* y del procesamiento 3' (Figura 25B). Esto significa que el mecanismo por el cual el CTD inhibe la inclusión de EDI debe ser directamente sobre *splicing* y no indirecto a través de afectar el *capping* o la poliadenilación.

### **Se trata de la cantidad y no de la calidad de héptadas en el CTD**

De las 52 héptadas que componen al CTD, las primeras 25 muestran un alto grado de conservación de la secuencia consenso YSPTSPS. Las 27 restantes, en cambio, se alejan en mayor medida de este consenso. Algunos trabajos previos sugerían funciones diferentes para cada mitad del CTD. A pesar de su mayor grado conservación, la mitad N-terminal (1-25) parecía ser menos importante funcionalmente que la C-terminal (1-27) (Fong y Bentley 2001; Fong et al. 2003). Más tarde se demostró que esta diferencia obedecía a que la mitad C-terminal, y en particular un motivo de 10 aa (Cter) al final de la última héptada, contribuían a la estabilidad del CTD (Chapman et al. 2004). De modo que un CTD con sólo la mitad N-terminal, al carecer de este motivo, se degradaba resultando en una polimerasa sin CTD. En esta tesis se demostró que las dos mitades del CTD son capaces de revertir el efecto de la pol II  $\Delta$ CTD sobre el *splicing* alternativo con la misma eficiencia si poseen el motivo Cter (Figura 26). Por otro lado, la utilización de variantes de CTD con diferente número de repeticiones consenso reveló



que la longitud del CTD correlaciona inversamente con los niveles de inclusión de EDI, requiriéndose 19 repeticiones de héptadas como mínimo para sostener el *splicing* normal de EDI (Figura 27). Esto está de acuerdo con reportes previos que demuestran que el condicionante más importante para la función del CTD es su longitud y no su composición (Ryan et al. 2002; Rosonina y Blencowe 2004; Chapman et al. 2005), lo que sugiere que las héptadas degeneradas podrían o bien ser dispensables, o bien funcionales para mecanismos aún desconocidos. Rosonina y Blencowe demostraron que 22 repeticiones en tándem son suficientes para permitir niveles normales de *splicing* en pre-mRNAs que contienen intrones constitutivos o intrones que dependen de un ESE para su correcto procesamiento. En cambio, 22 repeticiones, ya sean consenso o degeneradas, son insuficientes para permitir la inclusión de un exón alternativo regulado por un ESS, lo cual indica que la longitud mínima de CTD requerida podría variar en diferentes mecanismos regulatorios de *splicing* (Rosonina y Blencowe 2004).

### **El CTD podría reclutar SRp20 al spliceosoma**

Para entender las bases moleculares del efecto del CTD observado en esta tesis, buscamos proteínas cuyos roles conocidos en la inclusión de EDI pudieran estar afectados por la ausencia del CTD. Utilizando la estrategia de RNA de interferencia (RNAi) se encontró que mientras que la activación de la inclusión de EDI por la proteína SR SF2/ASF no es afectada por la ausencia del CTD, la inhibición de la inclusión de EDI por otra proteína SR, SRp20, es completamente abolida en ausencia del CTD (Figura 29C y 31)). Esto sugiere que SRp20 necesita el dominio CTD para ser reclutada a la maquinaria de transcripción y *splicing*. Además, se demostró que el efecto del CTD sobre el *splicing* de EDI, puede atribuirse mayoritaria o completamente a su capacidad de mediar el efecto inhibitorio de SRp20 (Figura 29D). No se conoce el mecanismo a través del cual SRp20 inhibe la inclusión del exón EDI. SRp20 podría actuar interaccionando con EDI e interfiriendo en su reconocimiento como exón, o activando la definición exónica de los exones vecinos e induciendo indirectamente la exclusión de EDI. En cualquier caso, el CTD podría ser responsable del reclutamiento de SRp20 a la maquinaria de *splicing*. Una posibilidad adicional fue sugerida recientemente, según la cual SRp20 unida a EDI secuestraría al exón en un complejo

formado por la pol II y el mediador, impidiendo su contacto con el spliceosoma (Lynch 2006). Este modelo sería consistente con los hallazgos de un trabajo reciente que demuestran que un exón puede ser secuestrado en un complejo no productivo o impedido estéricamente, llevando a la exclusión del exón (House y Lynch 2006).

### **No se trata sólo de la velocidad de elongación**

El hecho de que el CTD cumpla un rol central en la transcripción hace posible que su eliminación cause defectos en la elongación y que actúe mediante un mecanismo cinético en el acoplamiento con el *splicing*.

Los resultados de esta tesis demuestran que la disminución de los niveles de SRp20 mediante RNAi aumenta la inclusión de EDI aun cuando la transcripción es llevada a cabo por una mutante de pol II lenta (hC4) o en presencia de DRB que reduce la elongación (Figura 29C y 31). Esto no ocurre cuando la pol II  $\Delta$ CTD dirige la transcripción. Consistente con este hecho, el requerimiento del CTD para la inhibición por SRp20 es independiente del promotor utilizado (Figura 30). Dado que los diferentes promotores utilizados en esta tesis han sido asociados a diferentes velocidades de elongación (Kadener et al. 2002), nuestros resultados confirman que el efecto del CTD en el *splicing* alternativo es debido principalmente al reclutamiento de factores y no a cambios en la elongación. Estos resultados argumentan en contra de que la pol II  $\Delta$ CTD afecte el *splicing* de EDI debido a una reducción de la velocidad de elongación. Por el contrario existen evidencias que indican que la ausencia del CTD podría incrementar la elongación transcripcional en lugar de disminuirla (McCracken et al. 1998; Park et al. 2004) (Bentley, comunicación personal), lo cual sería consistente con una inhibición de la inclusión de EDI. En este escenario se puede concluir que SRp20 requiere la presencia del CTD para actuar en el *splicing* alternativo de EDI a través de un mecanismo que es independiente de la modulación de la velocidad de elongación de la pol II.

El mensaje principal de estos resultados es que la elongación y el reclutamiento de factores contribuyen independientemente al control transcripcional del *splicing* alternativo. Se ha propuesto al CTD como una plataforma para los factores de procesamiento del mRNA. De hecho se han reportado algunas interacciones entre

factores de *splicing* y el dominio CTD (Yuryev et al. 1996; Carty et al. 2000; Morris y Greenleaf 2000). En particular un grupo de proteínas conocido como SCAFs (*SR like CTD Associated Factors*) son factores que interactúan con el CTD y, de modo similar a las proteínas SR, contienen un dominio RS y un dominio de unión al RNA (Yuryev et al. 1996). El hecho de que las SCAFs interactúen con el CTD podría no estar relacionado con el *splicing*. No obstante, en la búsqueda de posibles interacciones entre el CTD y SRp20 que pudieran explicar el rol funcional del CTD descrito en esta tesis, se probaron diferentes enfoques experimentales que incluyeron ensayos de doble híbrido en mamíferos (Figura 32) y coimmunoprecipitaciones (datos no mostrados). Ninguno de estos ensayos reveló una interacción física directa entre SRp20 y el CTD o la subunidad mayor de la pol II, lo cual sugiere que, de existir, la interacción sería débil, altamente dinámica o indirecta. Sin embargo, cabe mencionar que se ha encontrado a SRp20 en el complejo mediador junto con la subunidad mayor de la pol II (Sato et al. 2004). De hecho la interacción entre la pol II y el mediador ocurre al menos en parte a través del CTD hipofosforilado (Hahn 2004). Esto es a su vez coherente con el hecho de que el DRB, que inhibe la fosforilación en del CTD, no interfiere con el efecto de SRp20 sobre la inclusión de EDI (Figura 29C). Creemos que la interacción entre SRp20 y el CTD probablemente involucra a un complejo ternario dinámico formado por DNA-proteína-RNA en el cual el CTD serviría para coordinar el ensamblaje específico del mismo sobre el pre-mRNA. Además, de modo consistente con nuestros resultados, se demostró por inmunofluorescencia que SRp20 está preferencialmente asociado a sitios de transcripción (Neugebauer y Roth 1997) y es reclutada eficientemente hacia los sitios de transcripción del gen tau cuando se incluye uno de sus exones alternativos, pero no cuando es excluido (Mabon y Misteli 2005).

### **Otros efectos diferenciales de la pol II $\Delta$ CTD y la mutante lenta**

Otra evidencia a favor de un modelo de reclutamiento es el hecho de que no todos los exones alternativos son afectados por la falta de CTD y por la elongación lenta de la misma manera. Además del efecto diferencial sobre el proceso inhibitorio de SRp20, la pol II  $\Delta$ CTD y la mutante lenta tuvieron distinto comportamiento frente a por lo menos otros dos exones alternativos adicionales. En particular *SMN2* mostró ser un caso en el

cual la inclusión del exón 7 es aumentada por la mutante  $\Delta$ CTD y no es afectada por la mutante lenta (Figura 33B). De modo similar, la inclusión del exón 7B de hnRNPA1 es disminuida por la RNA pol  $\Delta$ CTD, pero no cambia con la mutante lenta (Figura 33C). El caso de EDII de fibronectina es un caso particular porque no responde a ninguna de las dos mutantes de polimerasa (Figura 33A y 17B), y sin embargo muestra una leve regulación por el promotor (Figura 33A, comparar calles  $\alpha$ -gb vs. FN en presencia de la pol II WT<sup>res</sup>). En conjunto, estas evidencias señalan que el mecanismo de reclutamiento por la maquinaria transcripcional podría en algunos casos inclusive exceder a la función del CTD e implicar otro tipo de interacciones. Por ejemplo la participación de factores duales con funciones tanto en la transcripción como en el *splicing*, es candidata natural a este tipo de acoplamiento. Resultados recientes sugieren que el reclutamiento de ciertos factores de *splicing* ocurre de modo cotranscripcional al RNA naciente, sin necesariamente asociarse de modo directo a la pol II (Listerman et al. 2006). Una posibilidad es que la maquinaria basal de *splicing* se asocie de manera cotranscripcional directamente al RNA naciente independientemente de la pol II, y que la eficiencia y/o fidelidad de las reacciones de eliminación de intrones estén moduladas por factores asociados a la pol II. En este escenario sólo serían modulados por la pol II preferencialmente aquellos exones alternativos sensibles a factores de *splicing* asociados de algún modo a la polimerasa.

## Conclusiones generales

En esta tesis se estudiaron dos modos generales de regulación del *splicing* alternativo que involucran un acoplamiento íntimo con la maquinaria transcripcional. Este acoplamiento implica que el *splicing* está regulado a varios niveles, no sólo a nivel del ensamblaje directo del *spliceosoma* como resultado de la unión de factores a secuencias de RNA y a proteínas de la maquinaria de *splicing*, sino también por la maquinaria transcripcional, que es capaz de balancear la cinética de las reacciones y contribuir al reclutamiento de factores al sitio de procesamiento. Esto aporta mayor grado de complejidad a los mecanismos de expresión génica lo cual implica no sólo a la transcripción por la pol II de manera temporal y espacialmente específica, sino también al procesamiento posterior íntimamente ligado a la misma. Los tipos de regulación del

*splicing* aquí descritos permiten pensar en nuevas funciones fisiológicas asociadas a la regulación del *splicing* en metazoos, y a nuevas explicaciones para las causas de enfermedad genéticas (Cáceres y Kornblihtt 2002). Los defectos en los componentes de la maquinaria transcripcional podrían afectar directamente la tasa de expresión de muchos genes y también la “calidad” de expresión de los mismos a través de afectar el *splicing* y/o poliadenilación alternativos acoplados a la transcripción. Un acoplamiento recíproco también puede ocurrir, ya que componentes de la maquinaria de *splicing* pueden a su vez estimular la elongación por la pol II (Fong y Zhou 2001); la mera presencia de un intrón, o simplemente un sitio de *splicing* 5' inmediatamente río abajo del promotor, pueden estimular la transcripción en gran medida (Furger 2002).

Los modelos de la Figura 36 resumen las conclusiones de esta tesis. El modelo de regulación cinético del *splicing* alternativo (Figura 36A) sugiere que la transcripción puede regular el *splicing* a través de afectar la velocidad de elongación de la pol II. Baja velocidad de elongación o pausas internas favorecerían la inclusión de exones alternativos gobernados por un mecanismo de definición de exón (Robberson et al. 1990), mientras que una alta velocidad de elongación o la ausencia de pausas internas favorecerían la inclusión de este tipo de exones. El mecanismo por el cual la velocidad de elongación afecta el *splicing* de EDI es una consecuencia de la secuencia del pre-mRNA del mismo, y es válido cuando existen dos SS 3' consecutivos, el primero de los cuales es débil con respecto al segundo (Kornblihtt et al. 2004). Sin embargo, cuando existen dos SS 3' fuertes consecutivos, como en el caso de los exones constitutivos, la velocidad de elongación se vuelve irrelevante (Nogués et al. 2003).

El modelo de regulación de *splicing* alternativo de EDI por reclutamiento a través del CTD (Figura 36B) propone que mediante interacciones físicas y/o funcionales el CTD aproxima a la proteína SRp20 al mRNA naciente e inhibe la inclusión del exón EDI.

Un modelo general para la regulación del *splicing* alternativo propone un mecanismo combinatorial de regulación de las decisiones de *splicing* por asociación diferencial de factores de *splicing* generales (Smith y Valcárcel 2000; Mabon y Misteli 2005; Matlin et al. 2005). Diferentes combinaciones de factores de *splicing* podrían dar lugar a las diferencias observadas en la selección de sitios de *splicing* entre diferentes tipos celulares y tejidos. Los resultados de esta tesis muestran que tanto la velocidad de

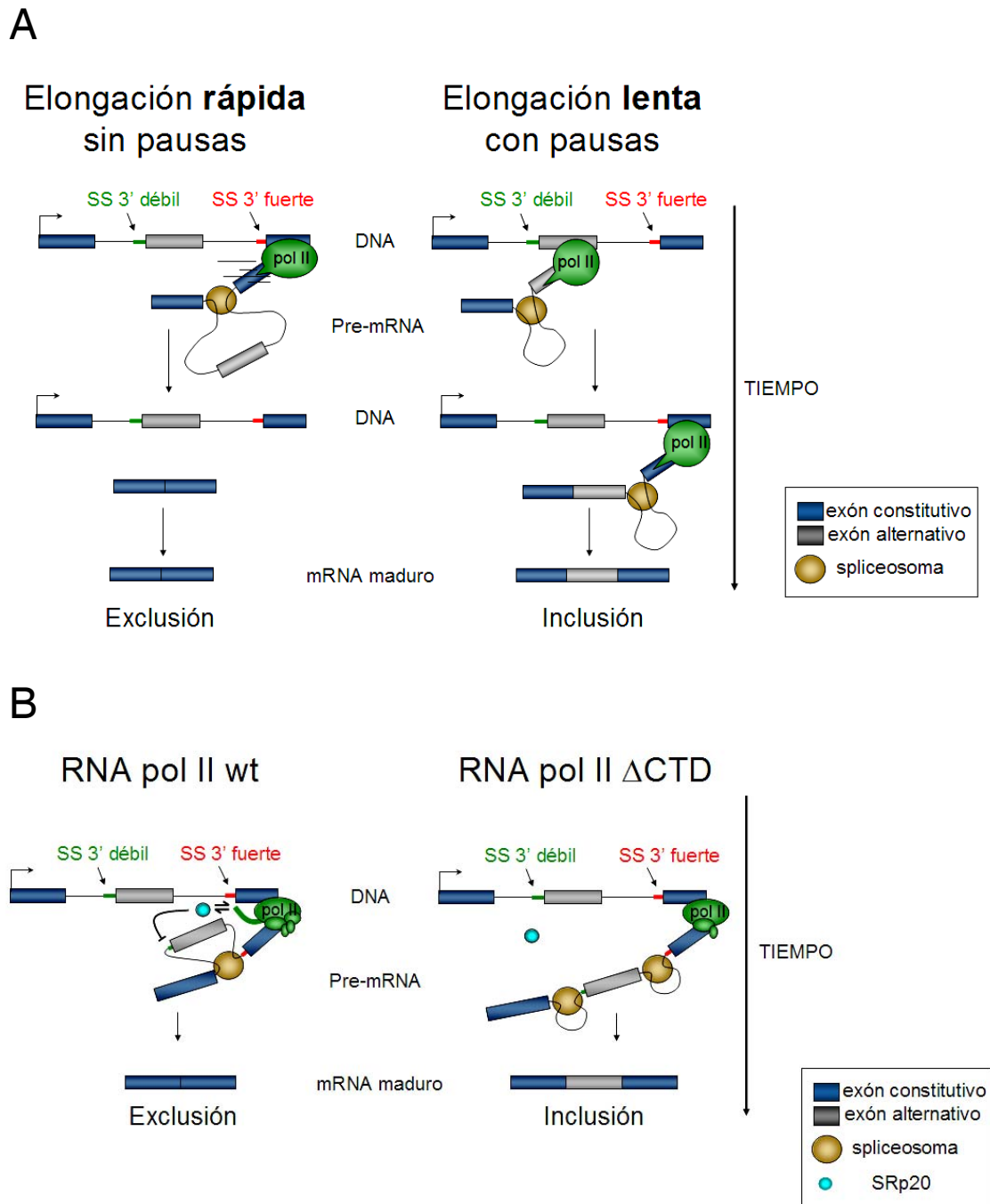


Figura 36. (A) Modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo. (B) Modelo de regulación de *splicing* alternativo por reclutamiento.

elongación de la pol II como el reclutamiento de factores a través del CTD son actores críticos que afectan potencialmente el acceso de factores a la vecindad del sitio de ensamblaje del *spliceosoma*. Cualquier modificación fisiológica postraduccional sobre la pol II en general o sobre el CTD en particular que afectara sus propiedades de unión

podría modular la regulación combinatorial de la selección del sitio de *splicing*. El hecho de que el CTD está sujeto a un grado tan alto de modificaciones postraduccionales lo convierte en un blanco ideal para la regulación del *splicing* alternativo del pre-mRNA.

## **Perspectivas y direcciones futuras**

Estudios sistemáticos podrían contribuir a establecer cuáles son los factores que determinan cada patrón de respuesta a cambios en la elongación o a la falta de CTD en distintos genes con *splicing* alternativos. Esto permitirá predecir los patrones de respuesta del *splicing* en distintos genes, lo cual sería interesante sobre todo en aquellos involucrados en procesos fisiológicos y/o patológicos. En este sentido, la utilización de microarreglos de *splicing* alternativo permitirá detectar genes que respondan a la elongación o a defectos en el CTD. Un estudio posterior más detallado, y en forma individual, de aquellos genes detectados será luego necesario para buscar patrones en la arquitectura exón-intrón, en las secuencias regulatorias en *cis* de la transcripción y del *splicing* (o de ambas), en la respuesta a factores regulatorios en *trans*, y en la estructura cromatínica que rodea a dichos genes en distintos contextos celulares. Gran parte de estos estudios posteriores requerirán necesariamente la experimentación con genes modelo en transfecciones transitorias y/o estables, debido a su gran versatilidad, con una posterior validación en genes endógenos. En nuestro laboratorio varias líneas de investigación ya apuntan en estas direcciones. Juan Pablo Fededa investiga mecanismos de coordinación, según los cuales distintos eventos de *splicing* alternativo sobre un mismo gen pueden “comunicarse” y afectarse mutuamente restringiendo el número o proporción de variantes producidas. El carácter “polar” de esta coordinación, es decir la asimetría observada que implica una comunicación preferencial en la dirección de la transcripción (5' a 3'), sugiere un acoplamiento con la maquinaria transcripcional y en particular con la elongación (Fededa et al. 2005). Este mecanismo podría explicar en parte por qué muchos genes expresan un menor número de variantes que las potencialmente codificadas, o por qué ciertas variantes están menos representadas que otras. Manuel Muñoz investiga el efecto de la radiación UV sobre el *splicing* alternativo, enfocándose principalmente en los cambios que el UV induce sobre la

maquinaria transcripcional. La radiación UV afecta tanto la estabilidad de la pol II como su actividad transcripcional lo cual sugiere que un mecanismo de acoplamiento participa en los efectos observados del UV sobre el *splicing*. Por otro lado estos resultados pueden tener importancia clínica. Mariano Alló estudia cómo el contexto cromatínico de un gen influye sobre su *splicing* alternativo, en particular analizando modificaciones de metilación específicas sobre las histonas a lo largo de la unidad transcripcional. Esto tiene una posible conexión con la transcripción y en particular con el CTD de la pol II debido a las interacciones conocidas entre este dominio y enzimas con actividad metiltransferas (Set1 y Set2, ver introducción). Ignacio Schor investiga efectos sobre el *splicing* alternativo de genes en neuronas (N-CAM particularmente) en distintos estadios de diferenciación o causados por distintos estímulos como la despolarización. Estos estímulos parecen estar vinculados a cambios en la acetilación de histonas que a su vez podrían afectar la transcripción y *splicing* de dichos genes. El estudio del *splicing* alternativo en el sistema nervioso tiene particular relevancia debido a la mayor complejidad del transcriptoma en este tejido, en especial en organismos superiores (Gustincich et al. 2006). En una extensión a otros organismos, Ezequiel Petrillo estudia la regulación del *splicing* alternativo en genes de plantas en distintas condiciones de luz-oscuridad. Tanto la intensidad como la calidad de la luz parecen afectar la regulación del *splicing* alternativo del gen de *rubisco activasa*, cuyas isoformas podrían tener diferentes funciones en el metabolismo fotosintético del carbono. Por otro lado las distintas isoformas de *splicing* alternativo de ciertos genes como *FT* de *Arabidopsis thaliana* son capaces de afectar profundamente el tiempo del desarrollo floral, indicando un papel importante del *splicing* en estos procesos. Será interesante determinar si la transcripción participa en la regulación del *splicing* alternativo de estos genes.

Las principales conclusiones de esta tesis se basan en interacciones funcionales entre fenómenos estudiados. En un futuro será interesante poder profundizar el estudio con el fin de entender las bases moleculares del mecanismo de reclutamiento descrito para el gen de la fibronectina (exón EDI), y extender el estudio a otras unidades transcripcionales. En particular, el gen de SRp20 es un caso interesante dado que la proteína SRp20 es capaz de regular su propio *splicing* alternativo (Jumaa y Nielsen 1997). Al igual que para EDI, SF2/ASF antagoniza a SRp20 en el *splicing* del exón 4 de SRp20 (Jumaa y Nielsen 1997), y representa un buen sistema para comparar los



resultados encontrados para EDI. De esta manera se podrá comprobar si el mecanismo propuesto para la regulación de EDI por el CTD puede operar en otro caso de *splicing* alternativo.

El estudio del reclutamiento también implicará buscar nuevas interacciones funcionales entre la maquinaria transcripcional y factores involucrados en el *splicing* alternativo. En este sentido existe la posibilidad de utilizar métodos no sesgados tales como bancos de siRNAs contra genes humanos, con el fin de ampliar el espectro de posibles interacciones funcionales y/o físicas entre el CTD y la maquinaria de *splicing*.

Además de la regulación directa del *splicing* alternativo por la transcripción, otros modos de acoplamiento han sido descritos. La poliadenilación es capaz de afectar el *splicing* de intrones terminales (Proudfoot et al. 2002), y en particular la proteína SRp20 es capaz de afectar el procesamiento 3' (Lou et al. 1998). Algunas observaciones indicarían que la inclusión de EDI, al ser el penúltimo exón en los minigenes estudiados, podría ser afectada parcialmente por la poliadenilación (Figura 25B, comparar calles 3 y 5). Esto ofrece un modelo para estudiar la influencia de la poliadenilación sobre el *splicing* alternativo de EDI. Por otro lado será interesante determinar si SRp20 participa en este posible acoplamiento y si es a su vez dependiente del CTD de la pol II.

## Conclusiones

### Capítulo 1.

#### **Una mutante lenta de RNA polimerasa II afecta el *splicing* alternativo *in vivo***

- La introducción de la mutación C4 de *Drosophila* en la pol II humana (hC4) le confiere a esta última una reducida procesividad y menor velocidad de elongación *in vivo*.
- La transcripción por la polimerasa lenta hC4 afecta el *splicing* alternativo del exón EDI de fibronectina aumentando su inclusión en el mRNA maduro.
- La polimerasa lenta hC4 estimula la selección de sitios alternativos 5' distales de *splicing* del gen E1A de adenovirus.
- El efecto de la polimerasa lenta hC4 sobre la inclusión de EDI es independiente de la síntesis proteica.
- El efecto de la polimerasa lenta hC4 no puede sustituir la necesidad de SF2/ASF para la inclusión de EDI y no es una consecuencia indirecta la disminución de SF2/ASF causada por su menor transcripción.
- El *resplicing* del gen endógeno Ubx es estimulado en embriones C4 de *Drosophila*.
- No todos los exones alternativos responden al control por elongación del *splicing*.

### Capítulo 2.

#### **El dominio carboxilo terminal de la pol II es requerido para la regulación del *splicing* alternativo mediado por SRp20.**

- A través de un sistema inducible se demostró que la transcripción de reporteros transfectados transitoriamente puede ser llevada a cabo por una pol II que carece del CTD (pol II  $\Delta$ CTD).
- El CTD de la pol II afecta el *splicing* alternativo EDI de la fibronectina, disminuyendo su inclusión.
- El efecto del CTD sobre el *splicing* alternativo de EDI es independiente del promotor que dirige la transcripción.
- El efecto de la pol II  $\Delta$ CTD sobre el *splicing* alternativo de EDI no ocurre a través de la inhibición global de las reacciones de procesamiento del pre-mRNA.
- Ambas mitades del CTD son suficientes para alcanzar niveles normales de inclusión de EDI.
- Un número mínimo de 19 heptapéptidos en el CTD es suficiente para el *splicing* normal de EDI.
- El CTD es necesario para la inhibición del *splicing* de EDI por el factor SRp20.
- La función del CTD en el efecto inhibitorio de SRp20 sobre el *splicing* de EDI no se debe a una reducción en la velocidad de elongación.
- El efecto del CTD sobre el *splicing* de EDI no depende del promotor que dirige la transcripción.
- La interacción entre SRp20 y el CTD no es directa.
- La pol II  $\Delta$ CTD y la mutante lenta hC4 actúan diferencialmente sobre el *splicing* alternativo. En tanto que la mutante lenta no afecta el *splicing* de los exones de 7 y 7B de SMN2 y hnRNPA1 respectivamente, la pol II  $\Delta$ CTD aumenta la inclusión del primero e inhibe la inclusión del segundo.

## Conclusiones generales

- El *splicing* alternativo responde al menos a dos tipos de regulación en su acoplamiento con la transcripción: una regulación cinética dada por la velocidad de elongación de la pol II y las velocidades relativas de *splicing* de cada intrón; y una regulación dada por el reclutamiento de factores de *splicing* por parte de la

maquinaria transcripcional al menos parcialmente vía el dominio CTD de la pol II.

- Algunos exones alternativos responden más a un tipo de regulación que a otro, o a ninguno, dependiendo de la arquitectura exón-intrón y de los factores regulatorios que los afectan.

## Materiales y Métodos

### 1. Plásmidos

#### 1.1. Minigenes reporteros de *splicing* alternativo

- pSVEDATot contiene el exón alternativo EDI de la Fibronectina (FN) humana (también llamado EDA) bajo el control del promotor de la  $\alpha$ -globina humana (Caputi et al. 1994).
- pSVEDA/FN contiene el exón alternativo EDI de la FN humana bajo el control del promotor de la FN humana (Cramer et al. 1997).
- pSVEDA/FN  $\Delta$ ESE y pSVEDA/FN  $\Delta$ ESS son derivados de pSVEDA/FN que contienen mutaciones en el *enhancer* exónico de *splicing* (ESE) y en el silenciador exónico de *splicing* (ESS) respectivamente (Cramer et al. 1999).
- pSVEDB-XhoI contiene el exón alternativo EDII de la Fibronectina (FN) humana (también llamado EDB) bajo el control del promotor de la  $\alpha$ -globina humana (Muro et al. 1999).
- pCMVEDB-XhoI es una variante de pSVEDB-XhoI en la cual se reemplazó el promotor de la  $\alpha$ -globina por el de citomegalovirus (CMV).
- pFNEDB-XhoI es una variante de pSVEDB-XhoI en la cual se reemplazó el promotor de la  $\alpha$ -globina por el de fibronectina (FN).
- pCMV-A1 expresa el exón alternativo 7B de hnRNP A1 de ratón bajo el control del promotor CMV (Simard y Chabot 2000).
- pMTE1A contiene la región de *splicing* alternativo del gen de adenovirus E1a bajo el control del promotor de la metalotioneína I de ratón (Cáceres et al. 1994).
- pSVEDATot  $eo^-$  y pSVEDA/FN  $eo^-$  son derivados de pSVEDATot y pSVEDA/FN respectivamente, en los cuales se eliminó la región *enhancer*-origen de SV40 (Kadener et al. 2002).
- pHIV2EDA  $eo^-$  contiene el exón alternativo EDI de la FN humana bajo el control del promotor de HIV (Nogués et al. 2002).
- pUHC-EDA se obtuvo a partir de pUHC13-3 (Gossen y Bujard 1992). Para ello se removió el gen de Luciferasa presente en este vector mediante una digestión

con la enzima de restricción XbaI, y se lo reemplazó por el fragmento BssHII/PvuII de 3899 pb de pSVEDATot que contiene el exón EDI y parte de sus exones flanqueantes río arriba y río abajo del mismo.

- pUHC-EDA  $\Delta$ ESE es un derivado de pUHC-EDA que contiene una mutación en el *enhancer* exónico de *splicing* (ESE).
- pSMN2 contiene la región genómica de SMN clonada en el vector pCI bajo el control del promotor de CMV (Lorson et al. 1999).

### **1.2. Transactivadores controlados por tetraciclina**

- pUHD 15-1 (tTA-VP16) expresa una fusión entre el represor procariota tet y el dominio de transactivación ácido C-terminal (aa 363-490) de VP16 del virus herpes humano (Gossen y Bujard 1992).
- tTA-Sp1 es un derivado de pUHD 15-1 en el cual se reemplazó el dominio de transactivación ácido de VP16 por el dominio de transactivación rico en glutaminas (aa 268-499) de Sp1 mediante PCR de ensamblaje.

### **1.3. Vectores de expresión de pol II**

Los siguientes vectores de expresión para la subunidad mayor de pol II fueron gentilmente cedidos por el Dr. David Bentley de la Universidad de Colorado:

- pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup> (Nguyen et al. 1996) expresa la subunidad mayor (hRpb1) de la pol II humana con una mutación puntual (N792D) que confiere resistencia a  $\alpha$ -amanitina.
- pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H (hC4) es un derivado de pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup> con una mutación en el codón 749 de hRpb1 (CGT a CAG), que produce el cambio de un único amino ácido (R749H) de modo equivalente a la mutación C4 de *Drosophila* (R741H) (Coulter y Greenleaf 1985).
- Los derivados de pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup> con una eliminación total o parcial del CTD (hRpb1  $\Delta$ CTD, hRpb1 1-25, hRpb1 1-25+Cter, hRpb1 27-52 $\Delta$ Cter y hRpb1 27-52Cter) han sido descritos en reportes previos (Fong et al. 2003).
- Las variantes hRpb1 con CTDs de distinta longitud (9, 12 y 19 héptadas consenso), fueron obtenidas al transformar bacterias con una construcción que contiene 27 repeticiones consenso –hRpb1 (YSPTSPS)<sub>27</sub>+WT Cter (Fong et al. 2003)– y seleccionando clones aislados con diferente número de repeticiones,

que se originaron posiblemente a partir de eventos de recombinación durante la división celular (ver secuencias de CTD en Figura 28).

#### **1.4. Vectores de expresión de proteínas SR**

Los plásmidos de expresión para SF2/ASF (g10SF2/ASF) y SRp20 fueron descritos en reportes previos (Cramer et al. 1999).

## **2. Transformación bacteriana, minipreps, maxipreps**

### **2.1. Transformación de bacterias**

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl<sub>2</sub> y otras sales. Con este protocolo, se generan bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ $\mu$ g. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan (Hanahan 1983).

### **2.2. Preparación de plásmidos a pequeña escala (minipreps)**

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

### **2.3. Preparación de plásmidos a gran escala (maxipreps)**

#### **2.3.1. Por columna (Qiagen)**

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

### 2.3.2. Por gradiente de cloruro de cesio

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

### 2.3.3. Cuantificación de los plásmidos

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

## 3. Líneas celulares

### 3.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Para las transfecciones transitorias realizadas en esta tesis se utilizaron células de la línea, Hep3B. Esta línea celular es mantenida en placas de plástico de 10 cm de diámetro con medio completo, en un incubador para células con temperatura controlada (37 °C) y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. El medio completo consiste en D-MEM baja glucosa (Invitrogen), al cual se le agrega 10% v/v de suero fetal bovino, antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomycin). Ocasionalmente, si se quiere utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agrega también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/ml. Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a temperatura ambiente unos dos o tres minutos, se detiene la reacción con unos mililitros de medio completo, se replaquea entre 1/4 y 1/8 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 8 ml de volumen final con medio completo. Las células son congeladas en N<sub>2</sub> líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales.



### 3.2. Células Hep3B

La línea celular de hepatoma humano Hep3B es utilizada desde hace muchos años en nuestro laboratorio. Proviene de un carcinoma hepatocelular y es una línea celular adherente con morfología epitelial (para más información ver <http://www.atcc.org>).

### 3.3. Transfecciones

Se transfectaron células Hep3B (derivadas de hepatoma) con Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se plaquean las células en placas de plástico de 6 pocillos (cada pocillo tiene un diámetro aproximado de 3,5 cm) el día anterior a realizar la transfección. En el caso de las células Hep3B, se sembraron 200.000 células por pocillo. La cantidad de plásmido total transfectado se ajustó a 2  $\mu$ g para una cantidad de 6  $\mu$ L de lipofectamina. Cuando se cotransfectaron minigenes junto con vectores de expresión de variantes de pol II se mantuvo una relación molar mínima de hRpb1:minigén de 4:1. Cuando se cotransfectaron minigenes inducibles con transactivadores tTA, se mantuvo una relación molar tTA:minigén de 10:1 según descrito previamente (Gossen y Bujard 1992).

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

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

- Se coloca 2  $\mu$ g totales de DNA plasmídico en un tubo eppendorf que contiene 100  $\mu$ l de D-MEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se coloca 6  $\mu$ l de Lipofectamine en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 100  $\mu$ l de D-MEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se transfiere el contenido del tubo eppendorf al tubo con Lipofectamina.

- Se incubaba 30-45 minutos para que se formen los complejos entre el polication y el DNA.
- Se lava 2 veces con PBS 1X (Invitrogen) las células a transfectar para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiben la transfección.
- Se deja las células en el incubador unas 5 hs aproximadamente para que ocurra la transfección.
- Luego se aspira el medio para eliminar la Lipofectamine, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.
- Se deja las células en el incubador 48 hs, y luego se prepara RNA o un extracto proteico a partir de las mismas.

### **3.4. siRNAs**

En los experimentos de RNAi, se transfectaron 500 ng de siRNA doble cadena por pocillo de 3,5 cm. Las secuencias de los siRNAs utilizados son las siguientes (sólo se muestra la secuencia sentido): SF2/ASF (siRNA) 5'-CCAAGGACAUG AGGACGUdTdT-3'; SRp20 (Stealth<sup>TM</sup> siRNA) 5'-GGACUGUAAGGUUUAUGU AGGCAAU-3'; Luc (siRNA contra Luciferasa GL3) 5'-CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT-3'. En las transfecciones de siRNAs las células fueron incubadas por 18 hs (Figuras 19B, 29B-C, 30, 31) o 66 hs (Figura 29D) antes del pretratamiento con  $\alpha$ -amanitina. El tratamiento más largo se hizo para permitir un silenciamiento más eficiente antes de la inducción de la transcripción.

### **3.5. Tratamientos**

En las transfecciones de minigenes con promotores constitutivos y variantes de pol II resistentes a  $\alpha$ -amanitina, las células fueron tratadas con 2,5-10  $\mu$ g/mL de  $\alpha$ -amanitina a las 24-48 hs postransfección según indicado en el texto. Las células se cosecharon 24 hs después del tratamiento.

En los experimentos de inducción (Figura 23A), las células fueron cotransfectadas con un transactivador controlado por tetraciclina (tTA-VP16 o tTA-Sp1) y un minigén reportero inducible (pUHC 13-3 o pUHC-EDA según indicado en el texto). Se agregó tetraciclina (1  $\mu$ g/mL) inmediatamente después de la transfección, y 18 hs (Figuras 19B, 29B-C, 30, 31) o 66 hs (Figura 29D) postransfección las células fueron pretratadas con  $\alpha$ -amanitina (5-10  $\mu$ g/mL) para detener la transcripción por la pol II endógena. 10 hs

más tarde las células fueron inducidas por medio del dos lavados con PBS para eliminar la tet y posterior agregado de medio sin tet conteniendo  $\alpha$ -amanitina (Figura 23A).

Los tratamientos con DRB fueron hechos simultáneamente con la inducción a una concentración final de 50  $\mu$ M.

### **3.6. Ensayo de actividad de $\beta$ -galactosidasa**

Para realizar este ensayo, primero se debe realizar un extracto proteico. Para ello, se lava las células dos veces con PBS 1X, se escurre bien, y se colocan 150  $\mu$ l de buffer de lisis. Se transfiere el lisado a un tubo eppendorf y se elimina el detrito celular centrifugando 10 min a 12 krpm. Luego se transfieren 50  $\mu$ l del sobrenadante, donde se encuentra la enzima  $\beta$ -gal, a un tubo eppendorf nuevo, y se le agrega 50  $\mu$ l de buffer  $\beta$ -gal 2X, que contiene ONPG como sustrato. La actividad de la enzima  $\beta$ -gal se evidencia como aparición de color amarillo por acumulación del producto ONP. Se detiene la reacción con 100  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Por último, se cuantifica la actividad de la enzima midiendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. Soluciones utilizadas

- PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  c.s.p. 1 litro.
- Buffer de lisis 1X: 100 mM buffer fosfato de potasio pH 7,8 + 0,2 % Triton X- 100.
- Buffer  $\beta$ -gal 2X: 0,2 M buffer fosfato de sodio, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 M  $\beta$ -mercaptoetanol, 1,33 mg/ml ONPG.

## **4. Análisis de RNA**

### **4.1. Preparación de RNA**

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

- Se descarta el medio de las células y se aspira bien para que no queden restos de líquido.

- Se agrega 500 µl de solución D, que ya contiene β-mercaptoetanol y glucógeno, a cada pocillo con células.
  - Se levanta el lisado de células con pipeta y se las transfiere a un tubo eppendorf.
  - Se agrega 1/10 de volumen (50 µl) de AcONa pH 4,2 2M y se mezcla por inversión.
  - Se agrega un volumen (500 µl) de fenol ácido saturado en agua y se agita con un .vortex..
  - Se agrega 1/5 de volumen (100 µl) de una mezcla 49:1 de cloroformo:alcohol isoamílico y se agita vigorosamente con un .vortex..
  - Se deja 30 min en hielo.
  - Se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4 °C.
  - Se toma la fase acuosa (superior) y se la pasar a un nuevo tubo eppendorf.
  - Se precipita con un volumen (500 µl) de isopropanol y se agita con un .vortex..
  - Se deja al menos 2 hs a -20°C.
  - Se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4 °C.
  - Se vuelca el sobrenadante.
  - Se agrega 500 µl de etanol 80% v/v y se agita con un .vortex. para lavar bien el precipitado.
  - Se deja unos 15 min a temperatura ambiente.
  - Se centrifuga 20 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente para disminuir la cantidad de sales precipitadas.
  - Se vuelca el sobrenadante y se aspira bien para que no queden restos de etanol.
  - Se seca el pellet al aire.
  - Se agrega 20 µl de agua y se congela a .20 °C o .80°C.
  - Para resuspender bien el RNA, se descongela en un baño de agua a 50 °C durante 5 min y se agita vigorosamente con un .vortex..
- Se puede controlar la integridad del RNA extraído corriéndolo en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje relativamente alto y por poco tiempo, para disminuir la degradación durante la corrida. En una preparación buena de RNA, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA.

Soluciones utilizadas

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

#### 4.2 RT-PCR

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

##### Transcripción reversa (RT)

Primer para RT específica de EDI

pSVcDNA: 5'-GGTATTTGGAGGTCAGCA-3'

- Se desnaturaliza 5 µl de RNA colocándolo 5 min a 65 °C.
- Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la renaturalización.
- Se agrega 15 µl de .mix. a cada tubo. La .mix. está compuesta de la siguiente manera:
  - 4 µl de buffer de RT 5X.
  - 0,2 µl de DTT 100 mM.
  - 0,24 µl de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
  - 0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl.
  - 0,5 µl de oligo dT 100 µM (oligo de 12-18 nucleótidos), o *primer* específico.
  - 1,5 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl.
- H<sub>2</sub>O c.s.p. 15 µl.
- Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo dT pueda aparearse a las colas de poliA de mRNAs poliadenilados.
- Se incuba 1h a 35 °C para que ocurra la reacción.
- Se detiene la reacción incubando 5 min a 95 °C.

##### PCR de cDNA de minigén EDI de fibronectina humana

Primers para EDI

pSV5'j: 5.-CACTGCCTGCTGGTGA CT CGA-3.

pSV3'j: 5.-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3.

#### Reacción de PCR radiactiva

– Se utilizan 2 µl de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR.

– A cada tubo de cDNA se le agregan 48 µl de .mix. que estará compuesta de la siguiente manera:

5 µl de buffer de PCR sin MgCl<sub>2</sub>

3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM

1,5µl de DMSO (dimetil sulfóxido)

2,5 µl de *primer* pSV5'j 20 µM

2,5 µl de *primer* pSV3'j 20 µM

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

0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl

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

H<sub>2</sub>O c.s.p. 48 µl

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

– Reacción de PCR:

45'' a 94 °C

1' a 63 °C      30 ciclos

30'' a 72 °C

#### 4.3. Observación y cuantificación de productos de PCR radiactiva

Al finalizar la reacción de PCR radiactivas, se procede a separar los productos corriéndolos en un gel de poliacrilamida 6% nativo. Luego de la corrida, se seca el gel sobre un papel Whatmann y se lo expone a una película con orientadores para generar una autoradiografía. De esta manera, se puede observar las bandas correspondientes al producto de PCR que incluye el exón y al que lo excluye. Para cuantificar estos productos, se orienta la película sobre el gel utilizando los orientadores, se recorta las bandas correspondientes a los productos de interés (con y sin exón alternativo), y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador beta. Debido a que utilizamos el isótopo <sup>32</sup>P, que es un emisor beta de alta energía, podemos evitar el uso de líquido

de centelleo para amplificar la señal, y contamos la radiactividad con el método Cerenkov, que es en seco. La eficiencia de este método en seco es algo menor que utilizando un líquido de centelleo pero, por otra parte, es más rápido y se evita el manipuleo de tolueno.

#### 4.4. Ensayos de *splicing* alternativo de otros genes

La amplificación de las isoformas de *splicing* por RT-PCR radiactiva se llevó a cabo utilizando *primers* específicos para EDII (Kadener et al. 2001), hnRNPA1 (Simard y Chabot 2000), y E1a (Cáceres et al. 1994). Para detectar las isoformas de *splicing* de Ubx se utilizaron los siguientes *primers*: 5'-TGGAATGCCAATTGCAC CATC-3' y 5'-GTCTGGTAGCGGGTGTATGTC-3'. Condiciones de PCR: 30 ciclos de 45s a 94°C, 60s a 56°C y 30s a 72°C.

#### 4.5. Reacciones de RT-PCR real time

##### 4.5.1. Ensayo de procesividad de la pol II

Se preparó RNA de núcleos aislados de células Hep3B transfectadas con pSVED/FN y pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup> o pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup>R749H. La cuantificación de transcritos inmaduros acumulados en regiones proximales o distales (Figura 15) se llevó a cabo por PCR en tiempo real utilizando un termociclador DNA Engine Opticon System (MJ Research). Para la síntesis de cDNA proximal (P) se utilizó el *primer* “2” (5'-GCATTCAGACACCCAAGAAC-3') y para la PCR los *primers* “1” (5'-TTCTCTGCACAGCTCCTAAG-3') y “2”. Para la síntesis de cDNA distal (D) se utilizó el *primer* “5” (5'-GGTATTTGGAGG TCAGCA-3') y para la PCR los *primers* “3” (5'-TTGGAACTACGTTTATTTTCC-3') y “4” (5'-GCGGCCAGGGGTCA CGAT-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en presencia de MgCl<sub>2</sub> 4 mM, SYBR Green 1:30000 (Molecular Probes Inc) con el siguiente programa: 3 min a 95°, seguido por 35 ciclos de 30s a 95°, 30s a 57° y 45s a 72°.

##### 4.5.2. Medición del *splicing* constitutivo

La reacción de RT se realizó con el *primer* específico para la región 3' del minigén EDI: pSVcDNA (5'-GGTATTTGGAGGTCAGCA-3'). La cuantificación de los mensajeros maduros (mRNAs) se llevó a cabo por PCR en tiempo real con los *primers* 5'-AGCTATTCCTGCACCAACTG-3' y 5'-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3', y la de los mensajeros inmaduros (pre-mRNAs) con los *primers* 5'-GGTATTTGGAGGTCAGCA-3' y 5'-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3'.

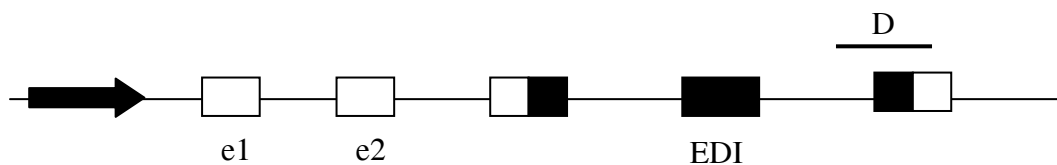
#### 4.6. Obtención de mRNAs con Cap y cola de PoliA

Las fracciones de mRNA con Cap (Cap<sup>+</sup>) fueron obtenidas por inmunoselección con el anticuerpo anti-cap H20 (Bochnig et al. 1987) de acuerdo al procedimiento seguido por otros autores (Kabrane-Lazizi et al. 1999).

Las fracciones de mRNA poliadeniladas (PolyA<sup>+</sup>) fueron obtenidas por medio de hibridación a oligo-dT biotinilado y posterior separación con partículas magnéticas unidas a streptavidina. Se utilizó el sistema PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System (de Promega Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.7. Ensayo de protección a la RNasa (RPA)

##### Sonda para minigenes EDI



Sonda distal (D):		400 nt
Fragmento protegido:	mRNA:	248 nt
	precursor:	320 nt

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

- Se linealiza el plásmido (sonda D) con HindIII.
- Se agrega proteinasa K hasta 0,1 mg/ml y se incuba 30 min a 37 °C.
- Se extrae 2 veces con un volumen de PIC (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1).



- Se extrae con cloroformo.
- Se precipita con 0,2 vol de NH<sub>4</sub>OAc 10 M y 2,5 vol de etanol.
- Se lava con etanol 75 % v/v y se deja secar.
- Se resuspende en 10 mM Tris-HCl pH 7.
- Se realiza la transcripción *in vitro* con RNA polimerasa T7.

### **Sondas: Transcripción in vitro, marcación y elución**

- Se mezcla en un tubo los siguientes reactivos para la transcripción *in vitro*:

5 µl de buffer de transcripción TSC 5X

2 µl de DTT 100 mM

1 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl

4,5 µl de rATP, rCTP, rGTP 2,5 mM cada uno

2,4 µl de rUTP 100 µM

6 µl de rUTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol )

1 µl de RNA polimerasa T7 20 U/µl

500 ng de plásmido molde previamente linealizado

H<sub>2</sub>O c.s.p. 26,1 µl

- Se incuba una hora a 37 °C para que ocurra la reacción.
- Se agrega 0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl y, para digerir el molde de DNA, se agrega DNAsa RQ1 a una concentración final de 1 U/µg de molde.
- Se incuba 15 min a 37 °C.
- Se agrega 37,5 µl de buffer de siembra (aprox. 1,5 volúmenes).
- Se calienta 5 min a 90 °C para desnaturalizar el RNA, y se pasa a hielo inmediatamente.
- Se siembra en un gel preparativo 6% de acrilamida:bisacrilamida, 42% urea (desnaturalizante) y se corre a 300 V. De esta manera se separa la sonda de interés de productos espurios y/o semidegradados de la transcripción *in vitro*.
- Luego de correr el gel, se lo expone a una película autoradiográfica para detectar la presencia de las moléculas radiactivas. Orientando bien, se procede a cortar la banda con la ribosonda de interés (corresponde al transcrito de mayor tamaño) y se la pasa a un tubo eppendorf.
- Se agrega 1 ml de buffer de elución con tRNA que funcionará de carrier.

- Se incuba toda la noche a 37 °C.
- Al día siguiente se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se cuenta en contador beta de centelleo una alícuota para estimar la actividad específica de la ribosonda.
- Utilizar aproximadamente 105 cpm de ribosonda (unos 2 µl aprox.) para cada reacción de protección a la RNasa.

#### Soluciones utilizadas

- Buffer de siembra: A 485 µl de formamida deionizada se le agregan 5 µl de Tris- HCl 1 M pH 7,5, 5 µl de SDS 10 % p/v, y 5 µl de azul de bromofenol 0,5 % p/v.
- Buffer de elución: NH<sub>4</sub>OAc 2 M, SDS 1 % p/v, tRNA 25 µg/ml.

#### **Protocolo de RPA**

- Se agrega a cada muestra de RNA (5-10 µg) el equivalente a 10<sup>5</sup> cpm de ribosonda (actividad específica 2-3 x 10<sup>8</sup> cpm/µg) en buffer de elución.
- Se precipita agregando NH<sub>4</sub>OAc hasta 0,5 M final (solución stock 5 M por ej.) y 2,5-3 vol de etanol.
- Se incuba 20 min a -20 °C y se centrifuga 15 min a velocidad máxima.
- Se retira el sobrenadante con pipeta y, sin dejar secar el pellet, se resuspende cada pellet en 25 µl de buffer de hibridación (tomar el buffer 5X y diluir una parte en 4 partes de formamida en el momento de usar).
- Se agita con un vortex, se centrifuga brevemente, se calienta 5 min a 60 °C, se vuelve a agitar con un vortex, se desnaturaliza 5 min a 90 °C, se agita con un vortex por última vez, se centrifuga brevemente y se incuba toda la noche en un baño a 45 °C.
- Al día siguiente, se agrega 300 µl de solución de RNasa a cada muestra y se incuba 30 min a 30 °C para que ocurra la digestión de las hebras de RNA simple cadena.
- Se agrega 10 µl de SDS 20 % p/v y 3 µl de proteinasa K 10 mg/ml (aprox 100 X) a cada muestra.
- Se incuba 15 min a 37 °C.
- Se extrae con un volumen de PIC (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1).
- Se agrega 1 µl de tRNA 10 mg/ml como carrier.
- Se agrega 1 ml de etanol y se incuba 30 min a -20 °C.
- Se centrifuga 15 min y se resuspende el pellet en 10 µl de buffer de siembra.
- Se calienta 5 min a 90 °C y se siembra inmediatamente en un gel desnaturalizante de acrilamida 6%.

- Se corre a 60 W aproximadamente. Soluciones utilizadas
- Buffer de hibridación: PIPES pH 6,7 200 mM, NaCl 2M, EDTA 5 mM. Se congela a -20 °C, y antes de usar se diluye 1:4 en formamida deionizada.
- Solución de RNasa: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM, NaCl 0,2 M, LiCl 0,1 M. Se mantiene a -20 °C y, antes de usar, se agrega las RNasas a partir de la siguiente solución stock 250 X: 500 µg/ml de RNasa A y 10.000 U/ml de RNasa T1.

d. Observación y cuantificación del resultado de la RPA

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

El molde para la ribosonda específica contra hRpb1 se obtuvo subclonando en pBluescript KS+ un fragmento de DNA de 506 pb que abarca la fusión del epítope B10-hRpb1 obtenido de pAT7Rpb1 $\alpha$ Am<sup>r</sup>. El plásmido resultante fue linealizado con EcoRI y transcripto *in vitro* con la RNA polimerasa T7 en presencia de [ $\alpha^{32}$ P]UTP, con lo que se obtiene una sonda marcada de 547 bases.

## 5. Anticuerpos

Anti-SRp20, cedido por Karla Neugebauer (Neugebauer y Roth 1997).

Anti SF2/ASF, Mab103 (Hanamura et al. 1998), cedido por Adrián Krainer.

Anti-B10, comprado en Chemicon.

Anti-ERK2, comprado de Santa Cruz.

Anti-T7, comprado en Novagen.

## 6. Stocks de Drosophila

Los stocks de moscas homocigotas para el alelo de pol II 215 C4 fueron obtenidos del Bloomington Stock Centre. Los embriones fueron colectados en placas conteniendo jugo de manzana por aproximadamente 1 hora, y luego se los dejó desarrollar a 25°C durante tiempos variables.

**Bibliografía**

- Adami G, Babiss LE (1991) DNA template effect on RNA splicing: two copies of the same gene in the same nucleus are processed differently. *Embo J* 10(11): 3457-3465.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287(5461): 2185-2195.
- Akoulitchev S, Makela TP, Weinberg RA, Reinberg D (1995) Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 377(6549): 557-560.
- Allison LA, Ingles CJ (1989) Mutations in RNA polymerase II enhance or suppress mutations in GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2794-2798.
- Allison LA, Moyle M, Shales M, Ingles CJ (1985) Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* 42(2): 599-610.
- Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298(5592): 416-419.
- Auboeuf D, Dowhan DH, Kang YK, Larkin K, Lee JW et al. (2004a) Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2270-2274.
- Auboeuf D, Dowhan DH, Li X, Larkin K, Ko L et al. (2004b) CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol* 24(1): 442-453.
- Barnes JL, Hastings RR, De la Garza MA (1994) Sequential expression of cellular fibronectin by platelets, macrophages, and mesangial cells in proliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol* 145(3): 585-597.
- Barrera LO, Ren B (2006) The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells--insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Curr Opin Cell Biol* 18(3): 291-298.
- Bartolomei MS, Halden NF, Cullen CR, Corden JL (1988) Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 8(1): 330-339.
- Baskaran R, Dahmus ME, Wang JY (1993) Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 11167-11171.
- Bauren G, Wieslander L (1994) Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* 76(1): 183-192.
- Beachy PA (1990) A molecular view of the Ultrabithorax homeotic gene of *Drosophila*. *Trends Genet* 6(2): 46-51.
- Bentley D (2002) The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr Opin Cell Biol* 14(3): 336-342.
- Bentley DL (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17(3): 251-256.
- Berget SM (1995) Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270(6): 2411-2414.

- Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8): 3171-3175.
- Beyer AL, Osheim YN (1988) Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev* 2(6): 754-765.
- Bienkiewicz EA, Moon Woody A, Woody RW (2000) Conformation of the RNA polymerase II C-terminal domain: circular dichroism of long and short fragments. *J Mol Biol* 297(1): 119-133.
- Bird G, Zorio DA, Bentley DL (2004) RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation. *Mol Cell Biol* 24(20): 8963-8969.
- Black DL (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 103(3): 367-370.
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Blau J, Xiao H, McCracken S, O'Hare P, Greenblatt J et al. (1996) Three functional classes of transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 16(5): 2044-2055.
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D et al. (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* 12(12): 1037-1044.
- Blencowe BJ (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25(3): 106-110.
- Bochnig P, Reuter R, Bringmann P, Luhrmann R (1987) A monoclonal antibody against 2,2,7-trimethylguanosine that reacts with intact, class U, small nuclear ribonucleoproteins as well as with 7-methylguanosine-capped RNAs. *Eur J Biochem* 168(2): 461-467.
- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T et al. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74(4): 597-608.
- Bomze HM, Lopez AJ (1994) Evolutionary conservation of the structure and expression of alternatively spliced Ultrabithorax isoforms from *Drosophila*. *Genetics* 136(3): 965-977.
- Brody E, Abelson J (1985) The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228(4702): 963-967.
- Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF et al. (1993) Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 142(3): 793-801.
- Buermeyer AB, Thompson NE, Strasheim LA, Burgess RR, Farnham PJ (1992) The HIP1 initiator element plays a role in determining the in vitro requirement of the dihydrofolate reductase gene promoter for the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 12(5): 2250-2259.
- Buratowski S (2003) The CTD code. *Nat Struct Biol* 10(9): 679-680.
- Buratti E, Muro AF, Giombi M, Gherbassi D, Iaconcig A et al. (2004) RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon. *Mol Cell Biol* 24(3): 1387-1400.
- Burnette JM, Hatton AR, Lopez AJ (1999) Trans-acting factors required for inclusion of regulated exons in the Ultrabithorax mRNAs of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151(4): 1517-1529.

- Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD (2002) Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1218-1222.
- Cáceres JF, Kornblihtt AR (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18(4): 186-193.
- Cáceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR (1994) Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 265(5179): 1706-1709.
- Cadena DL, Dahmus ME (1987) Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 262(26): 12468-12474.
- Caputi M, Casari G, Guenzi S, Tagliabue R, Sidoli A et al. (1994) A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acids Res* 22(6): 1018-1022.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3(4): 285-298.
- Carty SM, Goldstrohm AC, Sune C, Garcia-Blanco MA, Greenleaf AL (2000a) Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9015-9020.
- Carty SM, Goldstrohm AC, Sune C, Garcia-Blanco MA, Greenleaf AL (2000b) Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(16): 9015-9020.
- Clarke DJ, O'Neill LP, Turner BM (1993) Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 294 ( Pt 2): 557-561.
- Close P, Hawkes N, Cornez I, Creppe C, Lambert CA et al. (2006) Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Mol Cell* 22(4): 521-531.
- Conaway JW, Conaway RC (1999) Transcription elongation and human disease. *Annu Rev Biochem* 68: 301-319.
- Conaway JW, Shilatifard A, Dvir A, Conaway RC (2000) Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 25(8): 375-380.
- Conaway RC, Kong SE, Conaway JW (2003) TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers. *Cell* 114(3): 272-274.
- Connelly S, Manley JL (1988) A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev* 2(4): 440-452.
- Consortium IHGS (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431(7011): 931-945.
- Consortium. TCeS (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396): 2012-2018.
- Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM, Jr., Dahmus ME (1985) A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23): 7934-7938.
- Coulter DE, Greenleaf AL (1982) Properties of mutationally altered RNA polymerases II of *Drosophila*. *J Biol Chem* 257(4): 1945-1952.
- Coulter DE, Greenleaf AL (1985) A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro. *J Biol Chem* 260(24): 13190-13198.
- Coulter LR, Landree MA, Cooper TA (1997) Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol Cell Biol* 17(4): 2143-2150.

- Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292(5523): 1863-1876.
- Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblihtt AR (1997) Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21): 11456-11460.
- Cramer P, Cáceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF et al. (1999) Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 4(2): 251-258.
- Chabot B, Bisotto S, Vincent M (1995) The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* 23(16): 3206-3213.
- Chapman RD, Conrad M, Eick D (2005) Role of the mammalian RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) nonconsensus repeats in CTD stability and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 25(17): 7665-7674.
- Chapman RD, Palancade B, Lang A, Bensaude O, Eick D (2004) The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* 32(1): 35-44.
- Chauhan AK, Moretti FA, Iaconcig A, Baralle FE, Muro AF (2005) Impaired motor coordination in mice lacking the EDA exon of the fibronectin gene. *Behav Brain Res* 161(1): 31-38.
- Chen Y, Weeks J, Mortin MA, Greenleaf AL (1993) Mapping mutations in genes encoding the two large subunits of *Drosophila* RNA polymerase II defines domains essential for basic transcription functions and for proper expression of developmental genes. *Mol Cell Biol* 13(7): 4214-4222.
- Chen Y, Chafin D, Price DH, Greenleaf AL (1996) *Drosophila* RNA polymerase II mutants that affect transcription elongation. *J Biol Chem* 271(11): 5993-5999.
- Cheng C, Sharp PA (2003) RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes. *Mol Cell Biol* 23(6): 1961-1967.
- Chesnut JD, Stephens JH, Dahmus ME (1992) The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa. *J Biol Chem* 267(15): 10500-10506.
- Cho EJ, Takagi T, Moore CR, Buratowski S (1997) mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11(24): 3319-3326.
- Cho EJ, Rodriguez CR, Takagi T, Buratowski S (1998) Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 12(22): 3482-3487.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12(1): 1-8.
- Christmann JL, Dahmus ME (1981) Monoclonal antibody specific for calf thymus RNA polymerases IIO and IIA. *J Biol Chem* 256(22): 11798-11803.
- Das R, Zhou Z, Reed R (2000) Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell* 5(5): 779-787.
- Das R, Dufu K, Romney B, Feldt M, Elenko M et al. (2006) Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. *Genes Dev* 20(9): 1100-1109.
- Dowhan DH, Hong EP, Auboeuf D, Dennis AP, Wilson MM et al. (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol Cell* 17(3): 429-439.

- Du L, Warren SL (1997) A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 136(1): 5-18.
- Dvir A, Conaway RC, Conaway JW (1996) Promoter escape by RNA polymerase II. A role for an ATP cofactor in suppression of arrest by polymerase at promoter-proximal sites. *J Biol Chem* 271(38): 23352-23356.
- Ebright RH (2000) RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* 304(5): 687-698.
- Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW et al. (2002) Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna* 8(9): 1102-1111.
- Eperon LP, Graham IR, Griffiths AD, Eperon IC (1988) Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? *Cell* 54(3): 393-401.
- Exinger F, Lacroute F (1992) 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22(1): 9-11.
- Fededa JP, Petrillo E, Gelfand MS, Neverov AD, Kadener S et al. (2005) A polar mechanism coordinates different regions of alternative splicing within a single gene. *Mol Cell* 19(3): 393-404.
- Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO (1989) Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 109(2): 903-914.
- Fish RN, Kane CM (2002) Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim Biophys Acta* 1577(2): 287-307.
- Fong N, Bentley DL (2001) Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD. *Genes Dev* 15(14): 1783-1795.
- Fong N, Bird G, Vigneron M, Bentley DL (2003) A 10 residue motif at the C-terminus of the RNA pol II CTD is required for transcription, splicing and 3' end processing. *EMBO J* 22(16): 4274-4282.
- Fong YW, Zhou Q (2001) Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* 414(6866): 929-933.
- Fox-Walsh KL, Dou Y, Lam BJ, Hung SP, Baldi PF et al. (2005) The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45): 16176-16181.
- Fu XD (1995) The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna* 1(7): 663-680.
- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM et al. (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* 13(2): 161-167.
- Gallego ME, Gattoni R, Stevenin J, Marie J, Expert-Bezancon A (1997) The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A. *Embo J* 16(7): 1772-1784.
- Gautheret D, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie JM (1998) Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. *Genome Res* 8(5): 524-530.
- Ge H, Si Y, Wolffe AP (1998) A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell* 2(6): 751-759.



- George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119(4): 1079-1091.
- Gerber HP, Hagmann M, Seipel K, Georgiev O, West MA et al. (1995) RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* 374(6523): 660-662.
- Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292(5523): 1876-1882.
- Goldstrohm AC, Greenleaf AL, Garcia-Blanco MA (2001) Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene* 277(1-2): 31-47.
- Goodrich JA, Tjian R (1994) Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 77(1): 145-156.
- Gornemann J, Kotovic KM, Hujer K, Neugebauer KM (2005) Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol Cell* 19(1): 53-63.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(12): 5547-5551.
- Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* 6(9): 1197-1211.
- Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17(2): 100-107.
- Greenleaf AL (1993) Positive patches and negative noodles: linking RNA processing to transcription? *Trends Biochem Sci* 18(4): 117-119.
- Greenleaf AL, Borsett LM, Jiamachello PF, Coulter DE (1979) Alpha-amanitin-resistant *D. melanogaster* with an altered RNA polymerase II. *Cell* 18(3): 613-622.
- Greenleaf AL, Weeks JR, Voelker RA, Ohnishi S, Dickson B (1980) Genetic and biochemical characterization of mutants at an RNA polymerase II locus in *D. melanogaster*. *Cell* 21(3): 785-792.
- Griffiths AJF, Miller JH, T. SD, Lewontin RC, Gelbart WM (1996) *An Introduction to genetic analysis*. New York: W.H. Freeman. ix, 915 p. p.
- Grummt I (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17(14): 1691-1702.
- Gustincich S, Sandelin A, Plessy C, Katayama S, Simone R et al. (2006) The complexity of the mammalian transcriptome. *J Physiol* 575(Pt 2): 321-332.
- Guthrie C (1991) Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein. *Science* 253(5016): 157-163.
- Gutman A, Kornblihtt AR (1987) Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(20): 7179-7182.
- Hahn S (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11(5): 394-403.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hanamura A, Cáceres JF, Mayeda A, Franza BR, Jr., Krainer AR (1998) Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 4(4): 430-444.

- Hastings ML, Krainer AR (2001) Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol* 13(3): 302-309.
- Hatton AR, Subramaniam V, Lopez AJ (1998) Generation of alternative Ultrabithorax isoforms and stepwise removal of a large intron by resplicing at exon-exon junctions. *Mol Cell* 2(6): 787-796.
- Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS et al. (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2(1): 43-53.
- Hicks MJ, Yang CR, Kotlajich MV, Hertel KJ (2006) Linking splicing to Pol II transcription stabilizes pre-mRNAs and influences splicing patterns. *PLoS Biol* 4(6): e147.
- Hirose Y, Tacke R, Manley JL (1999) Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 13(10): 1234-1239.
- Ho CK, Sriskanda V, McCracken S, Bentley D, Schwer B et al. (1998) The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 273(16): 9577-9585.
- Horowitz DS, Krainer AR (1994) Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet* 10(3): 100-106.
- House AE, Lynch KW (2006) An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nat Struct Mol Biol* 13(10): 937-944.
- Howe KJ (2002) RNA polymerase II conducts a symphony of pre-mRNA processing activities. *Biochim Biophys Acta* 1577(2): 308-324.
- Howe KJ, Kane CM, Ares M, Jr. (2003) Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9(8): 993-1006.
- Imperiale MJ, Akusjarvi G, Leppard KN (1995) Post-transcriptional control of adenovirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 ( Pt 2): 139-171.
- Jiang Y, Gralla JD (1993) Uncoupling of initiation and reinitiation rates during HeLa RNA polymerase II transcription in vitro. *Mol Cell Biol* 13(8): 4572-4577.
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM et al. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302(5653): 2141-2144.
- Jones JC, Phatnani HP, Haystead TA, MacDonald JA, Alam SM et al. (2004) C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem* 279(24): 24957-24964.
- Jumaa H, Nielsen PJ (1997) The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *Embo J* 16(16): 5077-5085.
- Jurica MS, Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12(1): 5-14.
- Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU (1999) Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol* 73(10): 8848-8850.
- Kadener S, Fededa JP, Rosbash M, Kornblihtt AR (2002) Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12): 8185-8190.
- Kadener S, Cramer P, Nogués G, Cazalla D, de la Mata M et al. (2001) Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J* 20(20): 5759-5768.

- Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S et al. (2004) Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res* 14(3): 331-342.
- Kaneko S, Manley JL (2005) The mammalian RNA polymerase II C-terminal domain interacts with RNA to suppress transcription-coupled 3' end formation. *Mol Cell* 20(1): 91-103.
- Kang ME, Dahmus ME (1993) RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter. *J Biol Chem* 268(33): 25033-25040.
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268(14): 10416-10424.
- Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P (2003) Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114(3): 347-357.
- Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116(2): 259-272.
- Kim E, Du L, Bregman DB, Warren SL (1997) Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* 136(1): 19-28.
- Kim S, Shi H, Lee DK, Lis JT (2003) Specific SR protein-dependent splicing substrates identified through genomic SELEX. *Nucleic Acids Res* 31(7): 1955-1961.
- Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA et al. (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436(7052): 876-880.
- Kobor MS, Greenblatt J (2002) Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1577(2): 261-275.
- Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S (2000a) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14(19): 2452-2460.
- Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S (2000b) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14(19): 2452-2460.
- Kornblihtt AR (2004) Shortcuts to the end. *Nat Struct Mol Biol* 11(12): 1156-1157.
- Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE (1984) Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain. *Embo J* 3(1): 221-226.
- Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogués G (2004) Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10(10): 1489-1498.
- Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A et al. (1996) The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* 10(2): 248-257.
- Kotovic KM, Lockshon D, Boric L, Neugebauer KM (2003) Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Mol Cell Biol* 23(16): 5768-5779.
- Kravchenko JE, Rogozin IB, Koonin EV, Chumakov PM (2005) Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin. *Nature* 436(7051): 735-739.
- Krecic AM, Swanson MS (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11(3): 363-371.

- Kristjuhan A, Walker J, Suka N, Grunstein M, Roberts D et al. (2002) Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol Cell* 10(4): 925-933.
- Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G et al. (2003) Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 23(12): 4207-4218.
- Kuhn C, 3rd, Boldt J, King TE, Jr., Crouch E, Vartio T et al. (1989) An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 140(6): 1693-1703.
- Lacadie SA, Rosbash M (2005) Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast. *Mol Cell* 19(1): 65-75.
- Lacadie SA, Tardiff DF, Kadener S, Rosbash M (2006) In vivo commitment to yeast cotranscriptional splicing is sensitive to transcription elongation mutants. *Genes Dev* 20(15): 2055-2066.
- Lai MC, Teh BH, Tarn WY (1999) A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem* 274(17): 11832-11841.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921.
- Larsson S, Kreivi JP, Akusjarvi G (1991) Control of adenovirus alternative RNA splicing: effect of viral DNA replication on RNA splice site choice. *Gene* 107(2): 219-227.
- Laurencikiene J, Kallman AM, Fong N, Bentley DL, Ohman M (2006) RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination. *EMBO Rep* 7(3): 303-307.
- Lavigueur A, La Branche H, Kornblihtt AR, Chabot B (1993) A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev* 7(12A): 2405-2417.
- Laybourn PJ, Dahmus ME (1989) Transcription-dependent structural changes in the C-terminal domain of mammalian RNA polymerase subunit IIa/o. *J Biol Chem* 264(12): 6693-6698.
- Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34: 77-137.
- Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17(3): 309-315.
- Lenasi T, Peterlin BM, Dovc P (2006) Distal regulation of alternative splicing by splicing enhancer in equine beta-casein intron 1. *RNA* 12(3): 498-507.
- Lewin B (2004) *Genes VIII*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. xxi, 1027 p. p.
- Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276(5688): 565-570.
- Lewis JD, Izaurralde E, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1996) A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev* 10(13): 1683-1698.
- Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, Cheng JC et al. (2004) Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19): 7357-7362.
- Lim LP, Sharp PA (1998) Alternative splicing of the fibronectin EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats. *Mol Cell Biol* 18(7): 3900-3906.

- Lin PS, Dubois MF, Dahmus ME (2002a) TFIIIF-associating carboxyl-terminal domain phosphatase dephosphorylates phosphoserines 2 and 5 of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 277(48): 45949-45956.
- Lin PS, Marshall NF, Dahmus ME (2002b) CTD phosphatase: role in RNA polymerase II cycling and the regulation of transcript elongation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 333-365.
- Lis J (1998) Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 347-356.
- Listerman I, Sapra AK, Neugebauer KM (2006) Co-transcriptional coupling of splicing factor recruitment and pre-mRNA splicing in mammalian cells.
- Litingtung Y, Lawler AM, Sebald SM, Lee E, Gearhart JD et al. (1999) Growth retardation and neonatal lethality in mice with a homozygous deletion in the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Gen Genet* 261(1): 100-105.
- Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL et al. (2005) Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3(10): e328.
- Liu Y, Kung C, Fishburn J, Ansari AZ, Shokat KM et al. (2004) Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol Cell Biol* 24(4): 1721-1735.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6307-6311.
- Lou H, Neugebauer KM, Gagel RF, Berget SM (1998) Regulation of alternative polyadenylation by U1 snRNPs and SRp20. *Mol Cell Biol* 18(9): 4977-4985.
- Lu H, Flores O, Weinmann R, Reinberg D (1991) The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(22): 10004-10008.
- Luo W, Bentley D (2004) A ribonucleolytic rat torpedoes RNA polymerase II. *Cell* 119(7): 911-914.
- Lux C, Albiez H, Chapman RD, Heidinger M, Meininghaus M et al. (2005) Transition from initiation to promoter proximal pausing requires the CTD of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* 33(16): 5139-5144.
- Lynch KW (2006) Cotranscriptional splicing regulation: it's not just about speed. *Nat Struct Mol Biol* 13(11): 952-953.
- Mabon SA, Misteli T (2005) Differential recruitment of pre-mRNA splicing factors to alternatively spliced transcripts in vivo. *PLoS Biol* 3(11): e374.
- Mandal SS, Cho H, Kim S, Cabane K, Reinberg D (2002) FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation. *Mol Cell Biol* 22(21): 7543-7552.
- Maniatis T, Tasic B (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418(6894): 236-243.
- Maniatis T, Reed R (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416(6880): 499-506.
- Mason PB, Struhl K (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* 17(6): 831-840.
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(5): 386-398.
- Mayeda A, Krainer AR (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68(2): 365-375.

- McCracken S, Rosonina E, Fong N, Sikes M, Beyer A et al. (1998) Role of RNA polymerase II carboxy-terminal domain in coordinating transcription with RNA processing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 301-309.
- McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G et al. (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385(6614): 357-361.
- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19(12): 1401-1415.
- Meininghaus M, Chapman RD, Horndasch M, Eick D (2000) Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription. *J Biol Chem* 275(32): 24375-24382.
- Mellor J (2006) Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet* 22(6): 320-329.
- Millhouse S, Manley JL (2005) The C-terminal domain of RNA polymerase II functions as a phosphorylation-dependent splicing activator in a heterologous protein. *Mol Cell Biol* 25(2): 533-544.
- Misteli T (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113 ( Pt 11): 1841-1849.
- Misteli T, Spector DL (1999) RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3(6): 697-705.
- Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30(1): 13-19.
- Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M et al. (2000) Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 6(2): 307-316.
- Morris DP, Greenleaf AL (2000) The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275(51): 39935-39943.
- Mortillaro MJ, Blencowe BJ, Wei X, Nakayasu H, Du L et al. (1996) A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(16): 8253-8257.
- Mortin MA, Kim WJ, Huang J (1988) Antagonistic interactions between alleles of the Rpl215 locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 119(4): 863-873.
- Muro AF, Caputi M, Pariyarath R, Pagani F, Buratti E et al. (1999) Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display. *Mol Cell Biol* 19(4): 2657-2671.
- Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F et al. (2003) Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 162(1): 149-160.
- Myers JK, Morris DP, Greenleaf AL, Oas TG (2001) Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase Ess1. *Biochemistry* 40(29): 8479-8486.
- Neugebauer KM (2002) On the importance of being co-transcriptional. *J Cell Sci* 115(Pt 20): 3865-3871.
- Neugebauer KM, Roth MB (1997) Distribution of pre-mRNA splicing factors at sites of RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 11(9): 1148-1159.

- Neuman KC, Abbondanzieri EA, Landick R, Gelles J, Block SM (2003) Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell* 115(4): 437-447.
- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11(3): 709-719.
- Nguyen VT, Giannoni F, Dubois MF, Seo SJ, Vigneron M et al. (1996) In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* 24(15): 2924-2929.
- Ni Z, Schwartz BE, Werner J, Suarez JR, Lis JT (2004) Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 13(1): 55-65.
- Nogués G, Kadener S, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR (2002) Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J Biol Chem* 277(45): 43110-43114.
- Nogués G, Kadener S, Cramer P, de la Mata M, Fededa JP et al. (2003) Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life* 55(4-5): 235-241.
- Norton PA, Hynes RO (1987) Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 7(12): 4297-4307.
- O'Brien T, Hardin S, Greenleaf A, Lis JT (1994) Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* 370(6484): 75-77.
- Ochsenreiter T, Hajduk SL (2006) Alternative editing of cytochrome c oxidase III mRNA in trypanosome mitochondria generates protein diversity. *EMBO Rep*.
- Ohno M, Sakamoto H, Shimura Y (1987) Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15): 5187-5191.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST et al. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(13): 10229-10233.
- Orlova M, Newlands J, Das A, Goldfarb A, Borukhov S (1995) Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4596-4600.
- Orphanides G, Reinberg D (2000) RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407(6803): 471-475.
- Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K (1989) Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *J Biol Chem* 264(18): 10331-10334.
- Pagani F, Stuani C, Zuccato E, Kornblihtt AR, Baralle FE (2003) Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping. *J Biol Chem* 278(3): 1511-1517.
- Pal M, Luse DS (2002) Strong natural pausing by RNA polymerase II within 10 bases of transcription start may result in repeated slippage and reextension of the nascent RNA. *Mol Cell Biol* 22(1): 30-40.
- Pal M, Luse DS (2003) The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5700-5705.
- Palancade B, Bensaude O (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* 270(19): 3859-3870.

- Pan Q, Shai O, Misquitta C, Zhang W, Saltzman AL et al. (2004) Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform. *Mol Cell* 16(6): 929-941.
- Park NJ, Tsao DC, Martinson HG (2004) The two steps of poly(A)-dependent termination, pausing and release, can be uncoupled by truncation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeat domain. *Mol Cell Biol* 24(10): 4092-4103.
- Payne JM, Laybourn PJ, Dahmus ME (1989) The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of subunit IIa. *J Biol Chem* 264(33): 19621-19629.
- Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K, Sahl P et al. (1983) Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(1): 137-141.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM et al. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4): 517-527.
- Price DH (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 20(8): 2629-2634.
- Proudfoot N (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 25(6): 290-293.
- Proudfoot NJ (1989) How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 14(3): 105-110.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108(4): 501-512.
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83(6): 993-1000.
- Rao B, Shibata Y, Strahl BD, Lieb JD (2005) Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Mol Cell Biol* 25(21): 9447-9459.
- Religio A, Ben-Dov C, Baum M, Ruggiu M, Gemund C et al. (2005) Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem* 280(6): 4779-4784.
- Robberson BL, Cote GJ, Berget SM (1990) Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* 10(1): 84-94.
- Robert F, Blanchette M, Maes O, Chabot B, Coulombe B (2002) A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *J Biol Chem* 277(11): 9302-9306.
- Roberts GC, Gooding C, Mak HY, Proudfoot NJ, Smith CW (1998) Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res* 26(24): 5568-5572.
- Robson-Dixon ND, Garcia-Blanco MA (2004) MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb. *J Biol Chem* 279(28): 29075-29084.
- Rosonina E, Blencowe BJ (2004) Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3'-end cleavage. *RNA* 10(4): 581-589.
- Rosonina E, Bakowski MA, McCracken S, Blencowe BJ (2003) Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels. *J Biol Chem* 278(44): 43034-43040.
- Ruby SW, Abelson J (1991) Pre-mRNA splicing in yeast. *Trends Genet* 7(3): 79-85.



- Rudd MD, Izban MG, Luse DS (1994) The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8057-8061.
- Ryan K, Murthy KG, Kaneko S, Manley JL (2002) Requirements of the RNA polymerase II C-terminal domain for reconstituting pre-mRNA 3' cleavage. *Mol Cell Biol* 22(6): 1684-1692.
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Cáceres JF (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* 18(7): 755-768.
- Sato S, Tomomori-Sato C, Parmely TJ, Florens L, Zybailov B et al. (2004) A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14(5): 685-691.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 557-567.
- Schaft D, Roguev A, Kotovic KM, Shevchenko A, Sarov M et al. (2003) The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic Acids Res* 31(10): 2475-2482.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C et al. (2004) Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* 6(1): 73-77.
- Schramm L, Hernandez N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16(20): 2593-2620.
- Shatkin AJ, Manley JL (2000) The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* 7(10): 838-842.
- Shim EY, Walker AK, Shi Y, Blackwell TK (2002) CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev* 16(16): 2135-2146.
- Simard MJ, Chabot B (2000) Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site. *Mol Cell Biol* 20(19): 7353-7362.
- Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* 18(20): 2437-2468.
- Sisodia SS, Sollner-Webb B, Cleveland DW (1987) Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. *Mol Cell Biol* 7(10): 3602-3612.
- Smale ST, 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(2): 352-362.
- Smith CW, Valcarcel J (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 25(8): 381-388.
- Staley JP, Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92(3): 315-326.
- Tacke R, Manley JL (1999) Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol* 11(3): 358-362.
- Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG (1995) The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet* 9(2): 184-190.
- Thompson NE, Steinberg TH, Aronson DB, Burgess RR (1989) Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J Biol Chem* 264(19): 11511-11520.

- Travers A (1999) Chromatin modification by DNA tracking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13634-13637.
- Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, Mele A, Ule A et al. (2003) CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* 302(5648): 1212-1215.
- Uptain SM, Kane CM, Chamberlin MJ (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem* 66: 117-172.
- Vagner S, Vagner C, Mattaj JW (2000) The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing. *Genes Dev* 14(4): 403-413.
- Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, Cutolo M, Thornell LE et al. (1987) Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *J Cell Sci* 88 ( Pt 4): 419-430.
- Vibe-Pedersen K, Kornblihtt AR, Baralle FE (1984) Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing. *Embo J* 3(11): 2511-2516.
- Vincent M, Lauriault P, Dubois MF, Lavoie S, Bensaude O et al. (1996) The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes. *Nucleic Acids Res* 24(23): 4649-4652.
- Wang H, Hubbell E, Hu JS, Mei G, Cline M et al. (2003) Gene structure-based splice variant deconvolution using a microarray platform. *Bioinformatics* 19 Suppl 1: i315-322.
- Wang W, Carey M, Gralla JD (1992) Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 255(5043): 450-453.
- Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M et al. (2004) Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 119(6): 831-845.
- Weatherbee SD, Halder G, Kim J, Hudson A, Carroll S (1998) Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev* 12(10): 1474-1482.
- Wetterberg I, Bauren G, Wieslander L (1996) The intranuclear site of excision of each intron in Balbiani ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *Rna* 2(7): 641-651.
- Wetterberg I, Zhao J, Masich S, Wieslander L, Skoglund U (2001) In situ transcription and splicing in the Balbiani ring 3 gene. *EMBO J* 20(10): 2564-2574.
- Woychik NA, Hampsey M (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108(4): 453-463.
- Wu JY, Maniatis T (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75(6): 1061-1070.
- Wuarin J, Schibler U (1994) Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNA polymerase II: evidence for cotranscriptional splicing. *Mol Cell Biol* 14(11): 7219-7225.
- Xiao T, Hall H, Kizer KO, Shibata Y, Hall MC et al. (2003) Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev* 17(5): 654-663.
- Yang L, Chansky HA, Hickstein DD (2000) EWS.Fli-1 fusion protein interacts with hyperphosphorylated RNA polymerase II and interferes with serine-arginine protein-mediated RNA splicing. *J Biol Chem* 275(48): 37612-37618.

- Yang X, Bani MR, Lu SJ, Rowan S, Ben-David Y et al. (1994) The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15): 6924-6928.
- Yonaha M, Proudfoot NJ (1999) Specific transcriptional pausing activates polyadenylation in a coupled in vitro system. *Mol Cell* 3(5): 593-600.
- Yue Z, Maldonado E, Pillutla R, Cho H, Reinberg D et al. (1997) Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12898-12903.
- Yuryev A, Patturajan M, Litingtung Y, Joshi RV, Gentile C et al. (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(14): 6975-6980.
- Zeng C, Berget SM (2000) Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 20(21): 8290-8301.
- Zhang J, Corden JL (1991) Identification of phosphorylation sites in the repetitive carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem* 266(4): 2290-2296.
- Zhang MQ (1998) Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum Mol Genet* 7(5): 919-932.
- Zhang Z, Gilmour DS (2006) Pcf11 is a termination factor in *Drosophila* that dismantles the elongation complex by bridging the CTD of RNA polymerase II to the nascent transcript. *Mol Cell* 21(1): 65-74.
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419(6903): 182-185.