Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Regulación post-transcripcional de la expresión génica por señales extracelulares

Blaustein Kappelmacher, Matías

2007

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Blaustein Kappelmacher, Matías. (2007). Regulación post-transcripcional de la expresión génica por señales extracelulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Blaustein Kappelmacher, Matías. "Regulación post-transcripcional de la expresión génica por señales extracelulares". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2007.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR SEÑALES EXTRACELULARES

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

Matías Blaustein Kappelmacher

Directora de Tesis: Dra. Anabella Srebrow

Consejero de Estudios: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas Y Técnicas (CONICET); Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM) - Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires , 2007

"REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR SEÑALES EXTRACELULARES"

Regulación post-transcripcional de la expresión génica por señales extracelulares

El *splicing* alternativo del precursor del RNA mensajero es una fuente extraordinaria de diversidad proteica y la regulación de este proceso es crucial para diversas funciones celulares tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Sin embargo, poco se sabe acerca de las señales y vías que regulan el *splicing* alternativo. Un modelo relevante de este proceso es provisto por la fibronectina, que contiene tres regiones de *splicing* alternativo conocidas como EDI, EDII y IIICS. Encontramos que diferentes factores de crecimiento estimulan la inclusión de EDI y de IIICS pero no la de EDII en el RNA maduro de la fibronectina en diferentes líneas celulares, favoreciendo isoformas de fibronectina asociadas con la proliferación, migración y remodelado de tejidos. Caracterizamos a la vía de supervivencia Ras-fosfatidilinositol 3-quinasa-AKT/Proteína quinasa B como la principal responsable de esta regulación. Mostramos que los factores de crecimiento gatillan la fosforilación de proteínas ricas en serina/arginina tales como SF2/ASF y 9G8, las cuales son importantes reguladores del *splicing* y probamos que AKT/Proteína quinasa B funciona como una proteína quinasa de proteínas ricas en serina/arginina. Asimismo, mostramos que los factores de crecimiento no sólo modifican el patrón de *splicing* alternativo de la fibronectina sino que también alteran la traducción de RNAs reporteros conteniendo una secuencia de EDI responsable de la unión de proteínas ricas en serina/arginina, sugiriendo dos niveles co-regulados de amplificación específica de isoforma. Tanto la regulación del *splicing* como la de la traducción en respuesta a factores de crecimiento son inhibidas por RNAs pequeños de interferencia contra SF2/ASF y 9G8. Finalmente, mostramos que SF2/ASF es capaz de regular la diversidad proteómica alterando el balance entre diferentes mecanismos de iniciación de la traducción, expandiendo aún más su ya descripto potencial para aumentar el repertorio proteico.

Palabras clave: *Splicing* alternativo, traducción, fibronectina, proteínas ricas en serina/arginina, AKT/Proteína quinasa B

Post-transcripcional regulation of gene expression by extracellular signals

Alternative splicing of messenger RNA precursors is an extraordinary source of protein diversity and the regulation of this process is crucial for diverse cellular functions in both, physiological and pathological situations. However, little is known about signals and pathways regulating alternative splicing. A relevant model of this process is provided by fibronectin, which contains three alternatively spliced regions known as EDI, EDII and IIICS. We found that different growth factors stimulate EDI and IIICS but not EDII inclusion into fibronectin mature RNA in different cell lines, favoring fibronectin isoforms associated with proliferation, migration and tissue remodeling. We characterized the Ras-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT/Protein kinase B survival pathway as the main contributor to this regulation. We show that growth factors trigger phosphorylation of serine/arginine-rich proteins such as SF2/ASF and 9G8, which are important regulators of splicing and prove that AKT/Protein kinase B functions as a serine/arginine-rich protein kinase. We also show that growth factors not only modify fibronectin alternative splicing pattern but also alter translation of reporter RNAs containing an EDI sequence responsible for serine/arginine-rich binding, suggesting two co-regulated levels of isoform-specific amplification. Both, regulation of splicing and translation by growth factors are inhibited by small interfering RNAs against SF2/ASF and 9G8. Finally, we show that SF2/ASF regulates proteomic diversity by altering the balance between different translation initiation mechanisms, expanding its already described potential to increase protein repertoire even further.

Key words: Alternative splicing, translation, fibronectin, serine/arginine-rich proteins, AKT/Protein kinase B

La mayoría de los experimentos y métodos descriptos en esta tesis figuran en las siguientes publicaciones:

SF2/ASF regulates proteomic diversity by affecting the balance between translation initiation mechanisms.
Blaustein, M., Quadrana, L., Pelisch, F. *and* Srebrow, A.
Manuscrito enviado para su publicación.

Signals, pathways and splicing regulation.
Blaustein, M., Pelisch, F. *and* Srebrow, A.
International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2007) 39: 2031-2048.

Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT.
Blaustein, M.; Pelisch, F.; Tanos, T.; Muñoz, M.J.; Wengier, D.; Quadrana, L.; Sanford, J.R.; Muschietti, J.P.; Kornblihtt, A.R.; Cáceres, J.F.; Coso, O.A. *and* Srebrow, A.
Nature Structural and Molecular Biology (2005), 12:1037-1044.
Seleccionado artículo del mes en *Nature Structural and Molecular Biology*
Comentado en "News and Views", *Nature Structural and Molecular Biology* (2005) 12 (12): 1022-1023.
Seleccionado en Faculty of 1000 Biology, 19 Dic 2005,
http://www.facultyof1000.com/article/16299516/evaluation

Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: A novel role for JNK.
Pelisch, F.; **Blaustein, M.**; Kornblihtt, A.R. *and* Srebrow, A.
Journal of Biological Chemistry (2005), 280: 25461-69.
Comentado en Science STKE, Vol. 2005, *Issue* 292, pp. 251, 12 de Julio 2005.

Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase.
Blaustein, M.; Pelisch, F.; Coso, O.A.; Bissell, M.J.; Kornblihtt A.R. *and* Srebrow, A.
Journal of Biological Chemistry (2004), 279:21029-37.

A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo.
de la Mata, M.; Alonso, C.R.; Kadener, S.; Fededa, J.P.; **Blaustein, M.**; Pelisch, F.; Cramer, P.; Bentley, D.; *and* Kornblihtt, A.R.
Molecular Cell (2003), 12: 525-532.
Seleccionado en Faculty of 1000 Biology, 23 Sep 2003,
http://www.f1000biology.com/article/14536091/evaluation

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

Regulation of fibronectin alternative splicing by a basement membrane-like extracellular matrix.
Srebrow, A.; **Blaustein, M.** *and* Kornblihtt, A.R.
FEBS Letters (2002), 514: 285-289.

Abreviaturas:

Actinomicina D, ActD; AKT/Proteína quinasa B, AKT/PKB; anti-fosfo-AKT/PKB, pAKT; anti-fosfo-ERK, pERK; anti-fosfo-JNK/pkb, pJNK; anti-fosfo-p38, pp38; *immunoglobulin heavy chain binding protein*, BiP; *CDC-like kinase*, Clk; cicloheximida, CHX; cloranfenicol acetil-transferasa, CAT; dimetilsulfóxido, DMSO; DNA copia, cDNA; dominio carboxiterminal rico en serinas y argininas, dominio RS; *dual-specificity tyrosine kinase-7*, CRKRS; *enhanced chemiluminiscence*, ECL; *enhanced green fluorescent protein*, EGFP; *exonic splicing enhancer*, ESE; *exonic splicing silencer,* ESS; e*xtra domain I*, EDI; *extra domain II*, EDII; factor auxiliar de U2 snRNP, U2AF; factor de crecimiento de fibroblastos ácido, aFGF; factor de crecimiento de fibroblastos básico, bFGF; factor de crecimiento de hepatocitos/factor de *scatter*, HGF/SF; factor de crecimiento de queratinocitos, KGF; factor de crecimiento epidermal, EGF; factor de crecimiento transformante-beta1, TGF-β1; factor de crecimiento, FC; factor de iniciación de la traducción eucariota 4F, eIF4F; fibronectina, FN; fosfatidilinositol 3-quinasa, PI(3)K; glutatión-S-transferasa, GST; interferencia por RNA, RNAi; *internal ribosome entry site*, IRES; *intronic splicing enhancer,* ISE; *intronic splicing silencer,* ISS; isoelectroenfoque, IEF; isopropil-β-tiogalactopiranósido, IPTG; luciferasa, LUC; LY 294002, LY; *mammalian target of rapamycin*, mTor; MAPK quinasa, MAPKK, MKK o MEK; MAPKK quinasa, MAPKKK o MEKK; matriz extracelular, MEC; medio condicionado por células mesenquimales, MCmes; motivo de reconocimiento del RNA, RRM; *open reading frame*, ORF; Orto-nitro-fenil-galactopiranósido, ONPG; partícula ribonucleoproteica nuclear pequeña, snRNP; PD 98059, PD; polinucleótido quinasa, PNK; proteína quinasa activada por estrés, SAPK; proteína quinasa activada por mitógeno, MAPK; proteína quinasa C, PKC; proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina, CaMK IV; proteína rica en serina/arginina, proteína SR; quinasa de proteínas SR, SRPK; quinasa N-terminal de c-jun, JNK; quinasa regulada por señales extracelulares, ERK; reacción en cadena de la polimerasa, PCR; receptor tirosina quinasa, RTK; retrotranscripción, RT; ribonucleoproteína heterogénea nuclear, hnRNP; RNA mensajero, mRNA; RNA nuclear pequeño, snRNA; RNA polimerasa, Pol II; *polypyrimidine-tract-binding protein*, PTB; RNA precursor, pre-mRNA; sitio de *splicing*, ss; *small interfering* RNA, siRNA; transportador catiónico de aminoácidos, cat1; *type III connecting segment*, IIICS; virus de la hepatitis C, HCV; virus de la leucemia murina de Moloney, MMLV; α-globina humana, α-gb.

"(…) y aun siendo bellos tanto el conocimiento como la verdad, si estimamos correctamente el asunto, tendremos a la Idea del Bien por algo distinto y más bello que ellas. Y así como dijimos que era correcto tomar a la luz y a la vista por afines al sol, pero que sería erróneo creer que son el sol, análogamente ahora es correcto pensar que ambas cosas, la verdad y la ciencia, son afines al Bien, pero sería equivocado creer que una u otra fueran el Bien, ya que la condición del Bien es mucho más digna de estima."

Platón, <u>República</u> 508e – 509a

Finalmente, llego hasta acá con tanto por agradecer y, a cambio, tan sólo esta tesis.

Pensaba durante la escritura de mi tesis de licenciatura y pienso igual ahora, al finalizar mi tesis de doctorado, que no hay cosa más linda en el proceso de redacción de una tesis que la de agradecer a todos aquellos que tuvieron que ver con el desarrollo de una etapa de la vida, que la de compartirla con ellos. Sin esa compañía, sin esa ayuda, jamás podrían haber existido esos, a veces pocos y a veces muchos, momentos de alegría.

Equivocándome mucho, tropezando a cada pasito, fracasando casi con obstinación, he tratado de empezar a devolver, de comenzar a compartir al menos parte de todo lo mucho que me dieron. Habiendo sido transparente y sincero, quizás también torpe e inoportuno a la hora de explicitar lo que me ha gustado y lo que me ha disgustado en cada uno de esos otros, los no uno que han estado a mi lado, habiendo esperado lo mismo a cambio, me propongo aquí destacar esas cualidades que hacen únicas, que engrandecen a cada una de estas personas que estuvieron cerca, esas cualidades que, por lo menos a mí, me sirvieron para ser un poco más feliz.

Estoy en deuda. Acaso me alcancen todos los días por venir para devolver tanta generosidad, tanto cariño.

El acceso a las páginas 9 a 16 fue restringido a pedido del Autor.

Acces to pages 9 to 16 has been restricted on Autor´s request.

A mi vieja, con todo mi corazón y más.

No me queda claro por dónde andarás, si te llegarán estas palabras. A resolver tan hondo misterio no han llegado las pipetas ni los microscopios de laboratorio alguno.

Tuyas las palabras, allá por principios del 2004 "Si la ciencia es el *leit motiv* de tu vida, adelante, pero no te olvides de los que te rodean".

Mío es ese desafío.

El acceso a la página 18 fue restringido a pedido del Autor.

Acces to page 18 has been restricted on Autor´s request.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 22

I. Regulación post-transcripcional de la expresión génica: papel del *splicing* alternativo 23

1. Control transcripcional y post-transcripcional 23
2. *Splicing* 23
3. *Splicing* alternativo 25

II. Factores de *splicing* 27

1. Los actores principales 27
2. Estructura y función 28
3. Actividades citoplasmáticas de las proteínas SR 31

III. Señales extracelulares y vías de transducción de señales 32

1. Factores de crecimiento (FC) y transducción de señales 32
2. Vías de transducción de señales y *splicing* alternativo 34
3. Quinasas y fosfatasas de proteínas SR: papel en la transducción de señales 36

IV. El gen de la fibronectina (FN) 37

1. Estructura y función 37
2. *Splicing* alternativo 39
3. EDI 40
4. EDII 42
5. IIICS 44

V. Antecedentes del grupo 44

OBJETIVOS 50

MATERIALES Y MÉTODOS 52

I. Cultivo de células 53

1. Líneas celulares y medios 53
2. Tratamientos 54

II. Plásmidos, RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y transfecciones 55

1. Plásmidos 55
2. Preparación de plásmidos en gran escala 58

3. Construcción de pEDB-9G8 y pEDB-9G8as 59
4. siRNAs 62
5. Transfecciones 62

III. Detección de las isoformas de *splicing* alternativo 64

1. Extracción de RNA 64
2. RT-PCR 65
3. Análisis de los productos de PCR 65
4. Protocolos de PCR utilizados 66

IV. PCR en tiempo real 68

V. Separación de las fracciones nuclear y citoplasmática 68

VI. Separación de proteínas y análisis por *western blot* 69

1. Electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional 69
2. Electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional 69
3. *Western* blot 70
4. Protocolos de PCR utilizados 34

VII. Inmunofluorescencias y microscopía 71

VIII. Ensayos de fosforilación *in vitro* 71

1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes 71
2. Ensayos de fosforilación *in vitro* 72

IX. Ensayos LUC, β-galactosidasa y CAT 73

1. Obtención de extractos celulares 73
2. Detección de la actividad LUC 73
3. Detección de la actividad β-galactosidasa 73
4. Detección de la actividad CAT 74

RESULTADOS 75

I. Regulación del *splicing* alternativo de FN en respuesta a FC 76

1. Análisis de la regulación de las regiones alternativas del mRNA de FN 76
2. Papel de la estabilidad del mRNA y de la síntesis de nuevas proteínas 77
3. Exportación de los mRNAs de FN 79

II. Vías de transducción de señales 80

1. Fosforilación de los componentes de las cascadas de señalización 80
2. Bloqueo de las cascadas de señalización 80

2. Sobre-expresión de componentes de las cascadas de señalización 83

III. Papel de las proteínas SR 86

1. *Knock-down* de proteínas SR 86
2. El ESE de 9G8 como elemento de respuesta a FC 88
3. Fosforilación de las proteínas SR 88
4. Quinasas de proteínas SR 89
5. AKT/PKB es una quinasa de proteínas SR 91

IV. Regulación de la traducción 91

1. Regulación de la traducción por FC en forma dependiente de proteínas SR 91
2. SF2/ASF regula la traducción alternativa de reporteros bicistrónicos 95
3. Correlación entre la capacidad de SF2/ASF de regular el *splicing* alternativo y la de alterar la traducción alternativa 98
4. SF2/ASF regula la traducción alternativa de genes endógenos 101

DISCUSIÓN 103

BIBLIOGRAFÍA 116

INTRODUCCIÓN

I. Regulación post-transcripcional de la expresión génica: papel del *splicing* alternativo

1. Control transcripcional y post-transcripcional

Durante las últimas dos décadas, se ha vuelto ampliamente aceptado que las células interactúan con su microambiente de un modo dinámico y que esta interacción conlleva efectos profundos en su patrón de expresión génica, conduciendo a un balance apropiado entre los programas de proliferación, diferenciación y apoptosis.

Es sorprendente que, pese a compartir el 98,7% de su secuencia genómica, el ser humano y su pariente evolutivo más cercano, el chimpancé, difieran en tantos aspectos comportamentales y cognitivos. Las similitudes observadas en el transcriptoma y en el proteoma de leucocitos e hígado de ambos organismos refleja esta proximidad y, sin embargo, es al comparar los patrones de expresión en el cerebro que se encuentran diferencias profundas entre humanos y chimpancés (Enard *et al.*, 2002). Esto muestra a las claras el potencial de la regulación de la expresión génica a la hora de producir diversidad.

Por muchos años, el campo de la regulación de la expresión génica se ha enfocado en el control transcripcional y grandes esfuerzos fueron realizados con el objeto de comprender cómo las señales recibidas por las células son transducidas en cambios en la actividad de los factores de transcripción (Whitmarsh y Davis, 2000; Chang y Karin, 2001). Más recientemente, se ha comenzado a considerar como un elemento clave, dentro de este escenario, al control de otros pasos del metabolismo del RNA mensajero (mRNA), incluyendo el procesamiento del RNA precursor (pre-mRNA), así como también la exportación, estabilidad y traducción del mRNA (Graveley, 2001; Gingerich *et al.*, 2004; Shin y Manley, 2004).

2. *Splicing*

En metazoos, la mayor parte de los genes transcriptos por la RNA Polimerasa II (Pol II) sufren la eliminación de parte de sus secuencias, conocidas como intrones, y la unión de las secuencias flanqueantes, conocidas como exones. Este proceso es conocido como *splicing* y fue descubierto en 1977

por los grupos de Philip Sharp y Richard Roberts (Berget *et al.*, 1977; Chow *et al.*, 1977).

A medida que ascendemos en la escala de complejidad de los organismos, la proporción de genes conteniendo intrones aumenta. Por ejemplo, menos del 5% de los genes de *S. Cerevisiae* contienen intrones, pero alrededor del 25% de los mRNAs maduros provienen de estos genes (Ares et al., 1999). En mamíferos, la mayoría de los genes contienen intrones (Black, 2000) y el mecanismo básico de remoción de los mismos es conocido (Staley y Guthrie, 1998; Reed, 2000). El intrón es separado de los exones en los extremos 5´ y 3´, llamados sitios de *splicing* (ss) dadores y aceptores. El ss 5´ consiste en una secuencia corta que encaja vagamente en el consenso GURAGU (donde R es una purina). El ss 3´ consta de tres elementos: un sitio de ramificación (consenso YNYURAY, donde Y es una pirimidina y N es cualquier base); una seguidilla de pirimidinas conocida como tracto de polipirimidinas; y la secuencia final C/UAG. En base a los dos primeros nucleótidos del ss 5´ y a los últimos dos del ss 3´ es que a esta regla se la conoce como GU-AG. Estas secuencias deben ser reconocidas por el spliceosoma, un complejo macromolecular que consiste en cinco partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (*small nuclear ribonucleoproteins*, snRNPs) y un total de al menos 45 proteínas. Los componentes de RNA son RNAs nucleares pequeños (snRNAs), U1, U2, U4, U5 y U6, ensamblados en snRNPs. Los pasos catalíticos de este proceso se han determinado en gran detalle (Hastings y Krainer, 2001; Will y Luhrmann, 2001). Inicialmente, el ss 5´ es reconocido por U1 snRNP por apareamiento de bases. A continuación, se ensambla paso a paso el spliceosoma alrededor de los sitios de *splicing*. El tracto de polipirimidinas es reconocido por U2 snRNP y U4/U6 y U5 snRNPs son reclutados (Fig. 1). La selección correcta de los sitios de *splicing* es crucial para la expresión génica (Sharp, 1994; Black, 2003).

Un segundo tipo de spliceosoma actúa en una clase minoritaria de intrones transcriptos por la Pol II, obedeciendo la regla AU-AC (Tarn y Steitz, 1996). Estos casos no serán tratados en este trabajo.

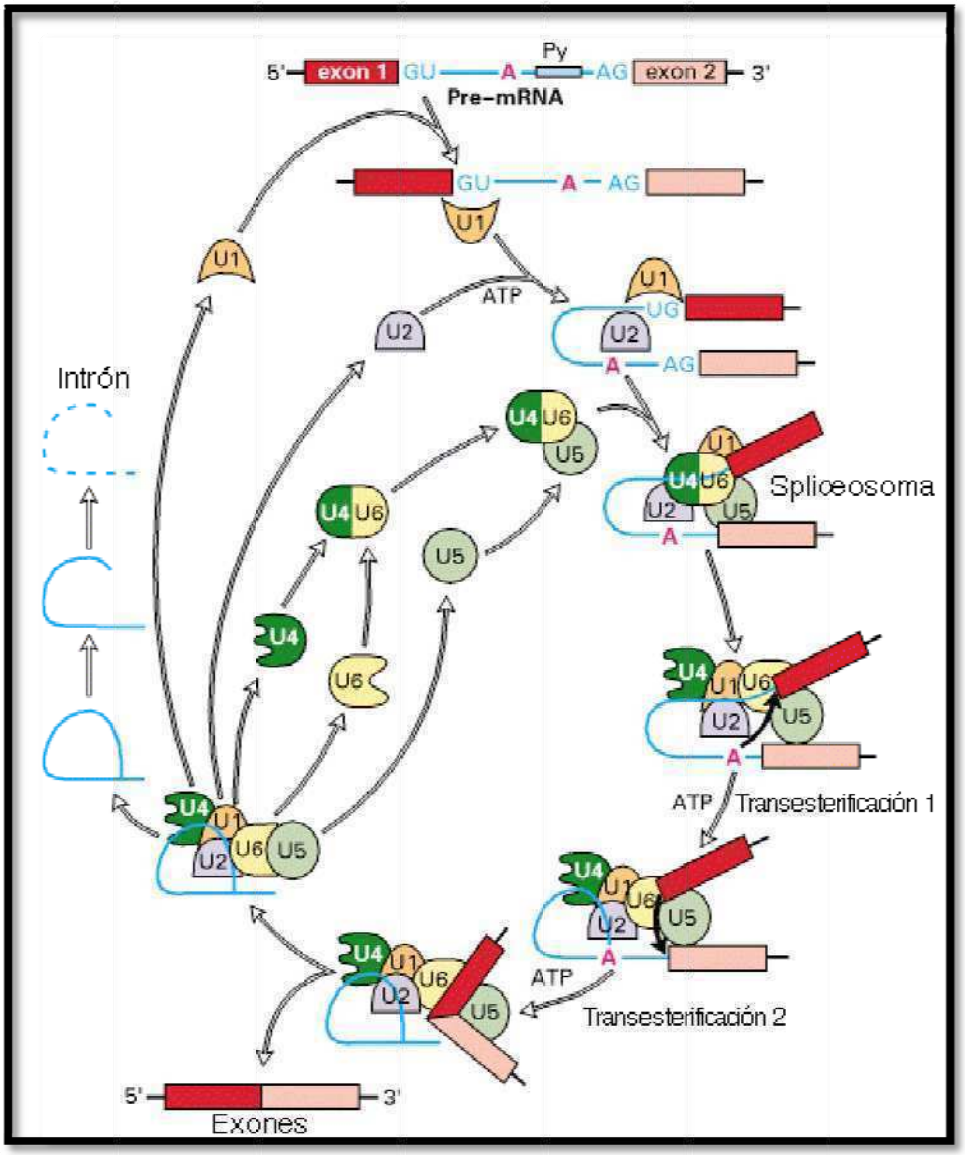

Figura 1: Ciclo de *splicing*. Los snRNP (U1, U2, U4, U5 y U6) se asocian entre sí y con el RNA inmaduro en una secuencia ordenada de pasos para formar el spliceosoma. Este complejo ribonucleoproteico cataliza las dos reacciones de transesterificación que resultan en el *splicing* de los exones (rojo claro y oscuro) y la eliminación del intrón (azul) en forma de lazo o *lariat*.

3. *Splicing* alternativo

La existencia de ss débiles que se alejan significativamente del sitio de reconocimiento consenso permite que a partir de un mismo gen se expresen mRNAs con distinta composición de exones. Este proceso, que se denomina *splicing* alternativo, puede tener también lugar cuando existen proteínas que ocultan un ss consenso al spliceosoma. En la mayor parte de los casos

conocidos de *splicing* alternativo parece haber una combinación de mecanismos de regulación, con factores actuando en *trans* y elementos trabajando en *cis*, determinando la proporción final de cada isoforma de mRNA. En particular, existen secuencias de RNA que no constituyen ss, pero que pueden igualmente jugar un papel crítico influyendo en el reconocimiento y uso de ss por el aparato de *splicing*. Estas secuencias se denominan *exonic* e *intronic splicing enhancers* (ESEs o ISEs) y *exonic* o *intronic splicing silencers* (ESSs o ISSs), y promueven (*enhancers*) o inhiben (*silencers*) el reconocimiento de exones por el spliceosoma (Matlin et al., 2005). Son, por lo general, elementos cortos (~10 nucleótidos) de secuencia conservada y están ampliamente distribuidos dentro del genoma transcripto, pudiéndoselos encontrar aislados o en grupo.

Se conocen cuatro tipos de *splicing* alternativo (Fig. 2). En el caso de los exones cassettes, el exón alternativo es totalmente incluido o totalmente excluido del mensajero maduro; en el caso de los exones mutuamente excluyentes, dos o más exones de un pre-mRNA nunca son incluidos simultáneamente en el mRNA; para el caso de los sitios aceptores 3´ alternativos o sitios dadores 5´ alternativos, se observa, además de la exclusión o inclusión total de un exón, su inclusión parcial; y finalmente, para la retención de un intrón, se ve que la secuencia correspondiente al intrón pasa a formar parte del de mRNA maduro (Lynch, 2004).

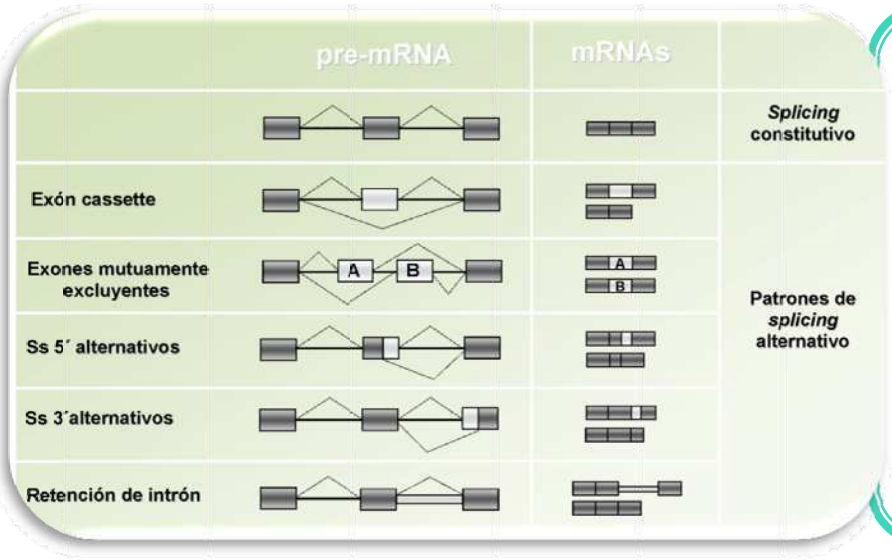

Figura 2: Diferentes patrones de *splicing* alternativo. Los exones están representados por rectángulos y los intrones por líneas sólidas negras. Las líneas entrecortadas representan diferentes posibilidades de empalme. Las regiones constitutivas son mostradas en gris oscuro, las alternativas en gris claro.

Distintas isoformas de mRNA pueden coexistir en un mismo tejido y en un mismo momento, pueden alternarse en su expresión en un tejido dado en distintos momentos del desarrollo o en distintas situaciones fisiológicas, o pueden expresarse en distintos tejidos de un mismo organismo.

La complejidad de organismos tales como el ser humano basada en un número relativamente pequeño de genes (solamente el doble que los del gusano o la mosca, aproximadamente) es explicada mayormente por mecanismos capaces de expandir la complejidad proteómica codificada por el genoma, es decir capaces de generar múltiples proteínas a partir de un único gen. El más relevante de estos mecanismos, el que desempeña un papel dominante, es el *splicing* alternativo (Sharp, 1994; Maniatis y Tasic, 2002). Hoy en día, se estima que más del 70% de los genes humanos que codifican para proteínas sufren *splicing* alternativo de su pre-mRNA (Black, 2000; Graveley, 2001).

Muchos ejemplos de alteraciones en el *splicing* asociadas al cáncer son atribuibles a mutaciones que crean o disrumpen *splicing enhancers* y *silencers*. Sin embargo, sólo en pocos casos ha sido probada una relación de causa-efecto (Srebrow y Kornblihtt, 2006).

A pesar de que la regulación de la expresión de cada isoforma particular sea, probablemente, de excepcional importancia para el destino celular, el modo preciso por el cual el *splicing* alternativo es controlado en las células y en los tejidos es, al día de la fecha, tan sólo pobremente comprendido.

II. Factores de *splicing*

1. Los actores principales

En la mayor parte de los casos, los *splicing enhancers* y *silencers* ejecutan sus efectos a través de la unión específica de proteínas regulatorias tales como las proteínas ricas en serina/arginina (proteínas SR) y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares o hnRNPs (Dreyfuss *et al.*, 1993; Manley y Tacke, 1996; Graveley, 2000). Sin embargo, algunos *silencers*, en lugar de unirse a proteínas regulatorias, forman una estructura secundaria particular en el RNA que impide el reconocimiento de un *splicing enhancer* cercano por parte de las proteínas SR (Buratti y Baralle, 2004).

SF2/ASF, la primera proteína SR descubierta, fue descripta por un lado como factor de *splicing* alternativo y denominada ASF -*Alternative Splicing Factor*- (Ge y Manley, 1990). Por otro lado, fue caracterizada como un factor esencial de *splicing* y llamada SF2 -*Splicing Factor 2*- (Krainer et al., 1990a) y como un factor de *splicing* alternativo (Krainer et al., 1990b). El clonado de los cDNAs de ASF y de SF2 permitió establecer que se trataba de la misma proteína (Ge et al.,

1991; Krainer et al., 1991). Posteriormente, se logró la purificación de SC35 y de otro grupo de proteínas de distintos PM, todas con un alto contenido de serina y arginina (Roth et al., 1991; Zahler et al., 1992). A este grupo de proteínas, que incluía a las previamente descriptas SF2/ASF y SC35, se lo denominó "familia SR". Esta familia, que resulta esencial tanto para la ejecución como para la regulación (generalmente positiva) de la reacción de *splicing*, está constituida por unos doce polipéptidos conservados evolutivamente (Manley y Tacke, 1996; Graveley, 2000).

El *splicing* también puede ser inhibido, y varias proteínas regulatorias capaces de desempeñar este papel han sido caracterizadas. La mayoría de éstas pertenece a la familia de las hnRNPs (Dreyfuss *et al.*, 1993; Smith y Valcarcel, 2000). Éstas incluyen a la proteína hnRNP A/B, la cual bloquea los efectos de proteínas SR uniéndose a ESSs (Mayeda y Krainer, 1992). Otro represor del *splicing* extensivamente estudiado es la proteína hnRNP I, también conocida como *polypyrimidine-tract-binding protein* o PTB (Singh et al., 1995). PTB ha recibido ese nombre debido a su habilidad de unirse a secuencias ricas en polipirimidinas localizadas en la mayoría de los ss 3´, y podría funcionar bloqueando competitivamente factores positivos que reconocen estas secuencias tales como el factor auxiliar de U2 snRNP o U2AF (Ruskin et al., 1988).

2. Estructura y función

Las proteínas SR (Fig. 3) están caracterizadas por una estructura modular, análoga a la de los factores de transcripción (Cáceres *et al.*, 1997; Graveley y Maniatis, 1998). Esta estructura consiste en la presencia de un dominio carboxiterminal rico en serinas y argininas (dominio RS), que participa de las interacciones proteína-proteína (Wu y Maniatis, 1993; Kohtz *et al.*, 1994) y también en las interacciones con el sitio de ramificación y con el ss 5´ del RNA (Shen *et al.*, 2004; Shen y Green, 2006), y de uno o dos motivos de reconocimiento del RNA (RRM) que influyen sobre la especificidad de sustrato (Manley y Tacke, 1996). Se piensa que el dominio RS promueve interacciones con componentes de la maquinaria de *splicing* que contienen otros dominios RS (Fig. 4), tales como U1 70K y la subunidad pequeña de U2AF, U2AF35 (Tacke y Manley, 1999).

Como se describió para el caso de SF2/ASF, además de ser requeridas para remover los intrones constitutivamente eliminados, las proteínas SR

pueden regular el *splicing* alternativo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ge y Manley, 1990; Krainer *et al.*, 1990b; Fu *et al.*, 1992; Zahler *et al.*, 1993; Cáceres *et al.*, 1994; Wang y Manley, 1995). Este efecto es dependiente de la concentración de las proteínas SR. Esto ha llevado a proponer que el *splicing* alternativo en mamíferos estaría determinado por el delicado balance relativo de la abundancia de distintas proteínas de *splicing*, el cual podría variar en distintos tejidos, en diferentes momentos del desarrollo, o en distintas condiciones fisiológicas.

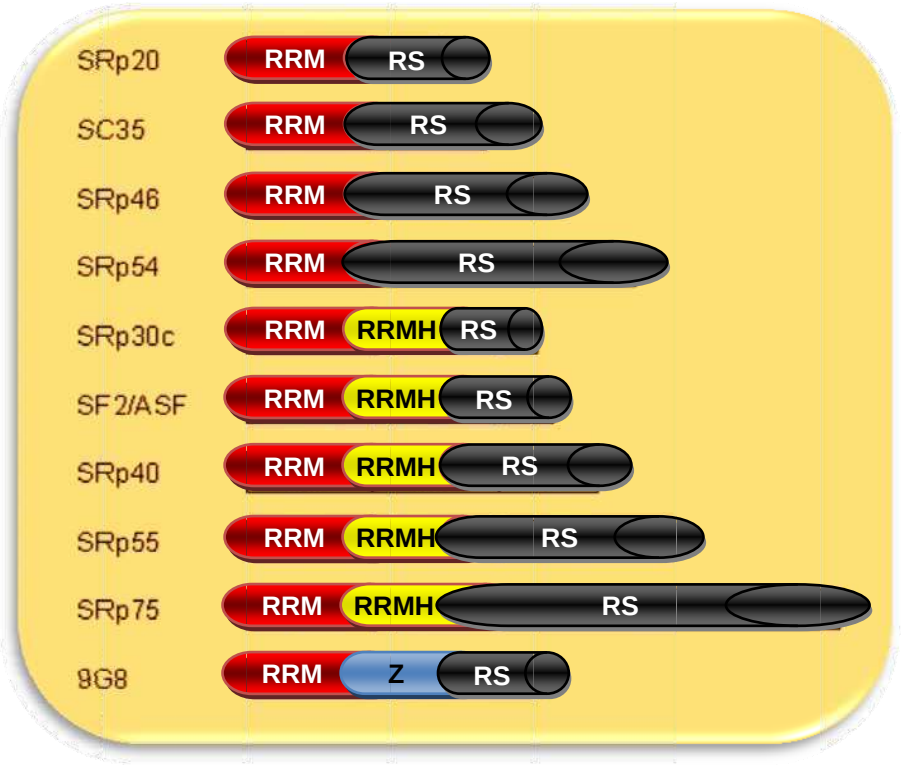

Figura 3: Proteínas SR. En la figura se muestran algunas de las proteínas SR humanas conocidas hasta la fecha, evidenciando su estructura modular. RRM: motivo de reconocimiento del RNA; RRMH: dominio con homología al RRM; Z: motivo, rico en cisteínas, capaz de unir zinc; RS: dominio carboxiterminal rico en serinas y argininas.

Por otro lado, las proteínas SR migran desde los *speckles* (dominios subnucleares que pueden funcionar como reservorio para ciertos factores de *splicing*, Fig. 5) a sitios de activa transcripción. La localización subcelular de las proteínas SR puede ser modificada por fosforilación (Misteli *et al.*, 1998; Misteli y Spector, 1998) y algunos eventos regulados de *splicing* sin duda se basan en este fenómeno (Xiao y Manley, 1997; Xiao y Manley, 1998; Graveley, 2000; Bourgeois *et al.*, 2004). El dominio RS es también un importante determinante

de la localización subcelular de las proteínas SR, actuando como una señal de localización nuclear al mediar la interacción con el receptor de importación nuclear de proteínas SR, conocido como transportina-SR (Cáceres et al., 1997; Lai et al., 2001).

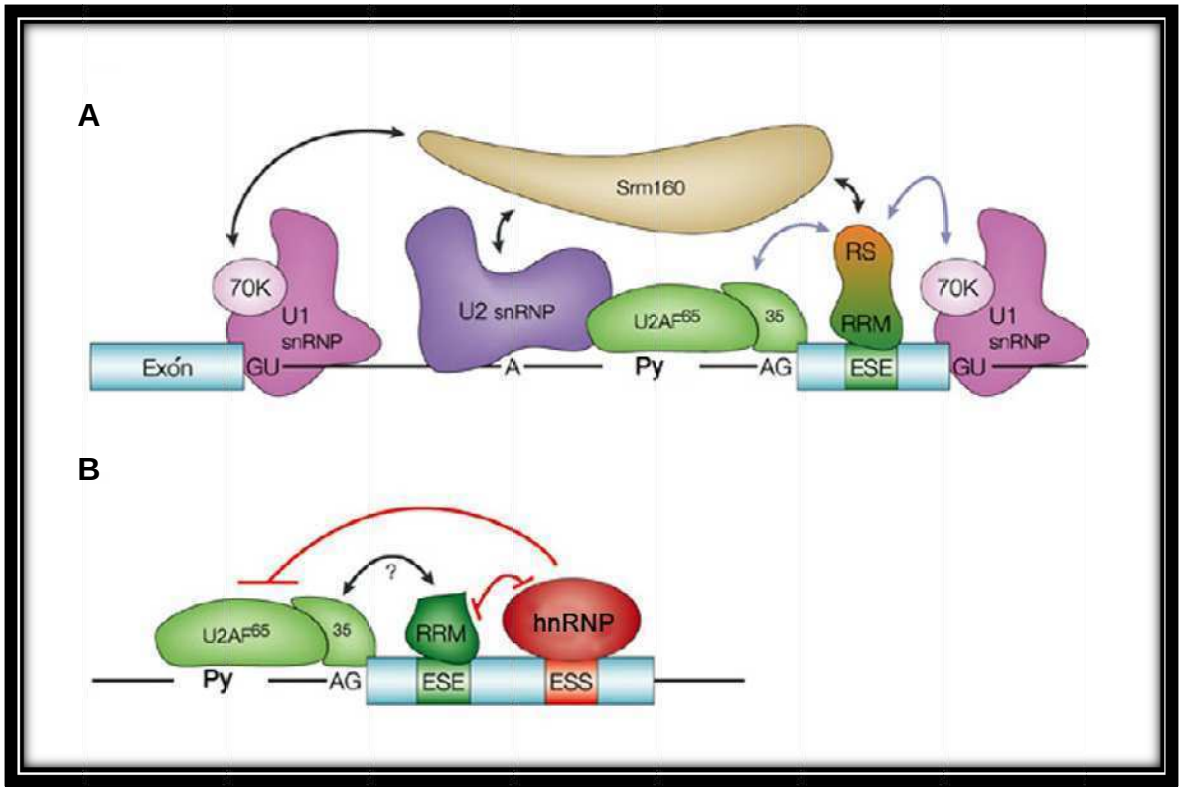

Figura 4: Modelos de acción de las proteínas SR en el *splicing* dependiente de ESE. (A) Mecanismos dependientes del dominio RS. Una proteína SR se une a un ESE a través de sus RRM y contacta a U2AF y/o a U1 snRNP a través de su dominio RS. La subunidad mayor de U2AF se une al tracto de polipirimidinas (Py) y esto promueve la unión de U2 snRNP al sitio de ramificación. Algunas interacciones indirectas son favorecidas por el co-activador Srm160, que estimula el *splicing* dependiente de ESE de algunos pre-mRNA y también interactúa con U2 snRNP. **(B)** Mecanismo independiente del dominio RS. Aquí, la principal función de la proteína SR unida a un ESE es antagonizar el efecto negativo de una proteína inhibitoria como podría ser una hnRNP pegada a un ESS. Estos modelos no son mutuamente excluyentes, y el *splicing* de algunos intrones podría involucrar una combinación de estos mecanismos (Cartegni *et al.*, 2002).

Un estudio reciente (Ngo *et al.*, 2005) apoya un modelo en el cual SF2/ASF sería primeramente fosforilado en el citoplasma por la quinasa de proteínas SR 1 (SRPK1) en unos pocos residuos de serina presentes en el dominio RS. SF2/ASF hipofosforilado sería entonces importado al núcleo y almacenado en los *speckles* nucleares. La liberación de SF2/ASF de estos reservorios y su reclutamiento a sitios de transcripción activa requeriría una

segunda ronda de fosforilación, que sería llevada a cabo por *CDC-like kinase* 1 (Clk1). La defosforilación de SF2/ASF es requerida para su actividad durante el *splicing* del mRNA, y por lo tanto es concebible que en este punto SF2/ASF sea defosforilado por fosfatasas (Huang *et al.*, 2004).

3. Actividades citoplasmáticas de las proteínas SR

El haber encontrado un subconjunto de proteínas SR con capacidad de translocar entre el núcleo y el citoplasma en forma dinámica sugirió la existencia de actividades citoplasmáticas en las proteínas SR (Cáceres et al., 1998). En coincidencia con esta idea, fue encontrado que algunas de estas proteínas SR juegan un papel importante en la exportación del mRNA (Huang y Steitz, 2001; Huang *et al.*, 2003), en la estabilidad del mRNA (Lemaire et al., 2002), en el *nonsense-mediated decay* (Zhang y Krainer, 2004), e incluso (Fig. 6) en la traducción del mRNA (Sanford et al., 2004).

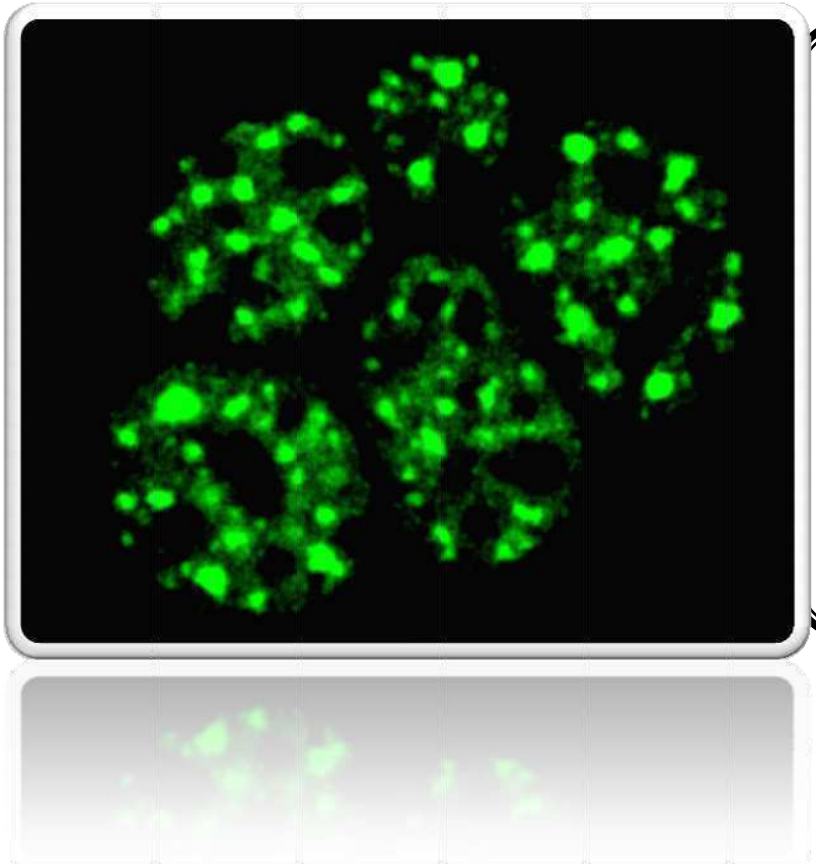

Figura 5: ***Speckles.*** Fotografía de cinco núcleos celulares, tomada con el microscopio confocal de nuestro laboratorio, mostrando la particular distribución nuclear en *speckles* de la proteína de fusión fluorescente *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-SF2/ASF.

En particular, SF2/ASF estimula la traducción de RNAs reporteros *in vivo* e *in vitro* y esta traducción es incrementada por la presencia de un ESE que funciona como sitio de unión para esta proteína SR (Sanford et al., 2004). Se ha encontrado que el estado de fosforilación de SF2/ASF influye en su capacidad de unión a los mRNAs celulares, así como también afecta su función en traducción (Sanford et al., 2005). Al inicio del presente trabajo se desconocía si las proteínas SR estarían estimulando el reclutamiento del mRNA a sitios activos de la traducción, la iniciación y/o la elongación traduccional. Hasta aquí, el mecanismo preciso por el cual las proteínas SR incrementan la actividad traduccional aguarda nuevas investigaciones.

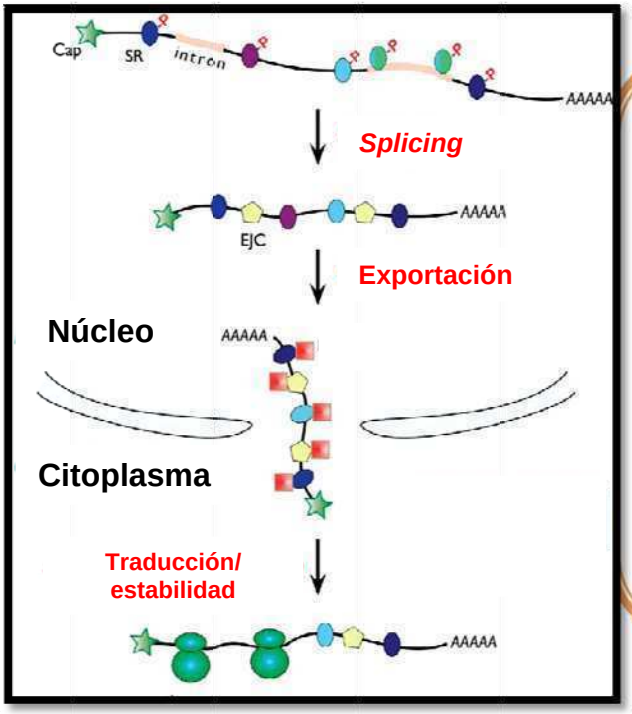

Figura 6: Múltiples funciones de las proteínas SR. Las proteínas SR son reclutadas en su versión fosforilada al pre-mRNA. Durante el proceso de *splicing* son desfosforiladas y depositadas en el *exon junction complex* (EJC) para cumplir funciones en la exportación del mRNA, en la traducción y en la estabilidad del mismo (Huang y Steitz, 2005).

III. Señales extracelulares y vías de transducción de señales

1. Factores de crecimiento (FC) y transducción de señales

Existen diferentes señales extracelulares que pueden influir en el programa que una célula lleve a cabo. El contacto entre un ligando extracelular y su receptor repercute generando una intrincada red de transducción de

señales que puede derivar en la proliferación, diferenciación, quiescencia o apoptosis celular. Los agentes mitogénicos como los FC tienen un profundo impacto durante el desarrollo del organismo y un papel fundamental en mantener la homeostasis tisular. La desregulación de su producción, de la cascada de señales que desencadenan, o de los genes que las mismas activan puede generar graves patologías, entre ellas el cáncer.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen activated protein kinases*, MAPK) son enzimas evolutivamente conservadas que conectan receptores de superficie celular, por lo general receptores tirosina quinasa (RTKs) con sus blancos regulatorios dentro de las células. Las MAPK también responden a estrés químico y físico, controlando la supervivencia celular. La actividad de las MAPK está regulada a través de cascadas compuestas por i) una MAPK; ii) una MAPK quinasa (MAPKK, MKK o MEK); iii) y una MAPKK quinasa o MEK quinasa (MAPKKK o MEKK) (Davis, 1993; English et al., 1999). En mamíferos existen, clásicamente, cuatro grupos distintos de MAPK: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)-1/2; las quinasas N-terminales de c-jun/proteínas quinasas activadas por estrés (JNK/SAPK)-1/2/3; la familia de las proteínas p38 (p38α/β/γ/δ); y ERK5. Éstas son activadas por MAPKKs específicas: MEK1/2 para ERK1/2, MKK3/6 para p38, MKK4/7 para las JNK/SAPKs y MEK5 para ERK5 (Fig. 7). Cada MAPKK puede ser activada, sin embargo, por más de una MAPKKK, aumentando la complejidad y diversidad de la señalización a través de MAPK. Presumiblemente, cada MAPKKK confiere capacidad de respuesta a distintos estímulos. Por ejemplo, la activación de ERK1/2 por FC depende de la MAPKKK c-Raf, pero otras MAPKKK pueden activar ERK1/2 en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (Chang y Karin, 2001).

Otra vía de señalización que es también activada por agentes mitogénicos, que al igual que la vía de Raf-MEK-ERK se encuentra asociada a la activación de la proteína G pequeña Ras (que se activa intercambiando GDP por GTP), y que también ha sido muy bien caracterizada es la vía de supervivencia (Potempa y Ridley, 1998). Esta vía está compuesta por la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI(3)K), por AKT/Proteína quinasa B (AKT/PKB), que resulta activada por los inositol-fosfolípidos generados por la primera, y por la proteína blanco de la rapamicina en mamíferos (*mammalian target of rapamycine*, mTor, Fig. 8).

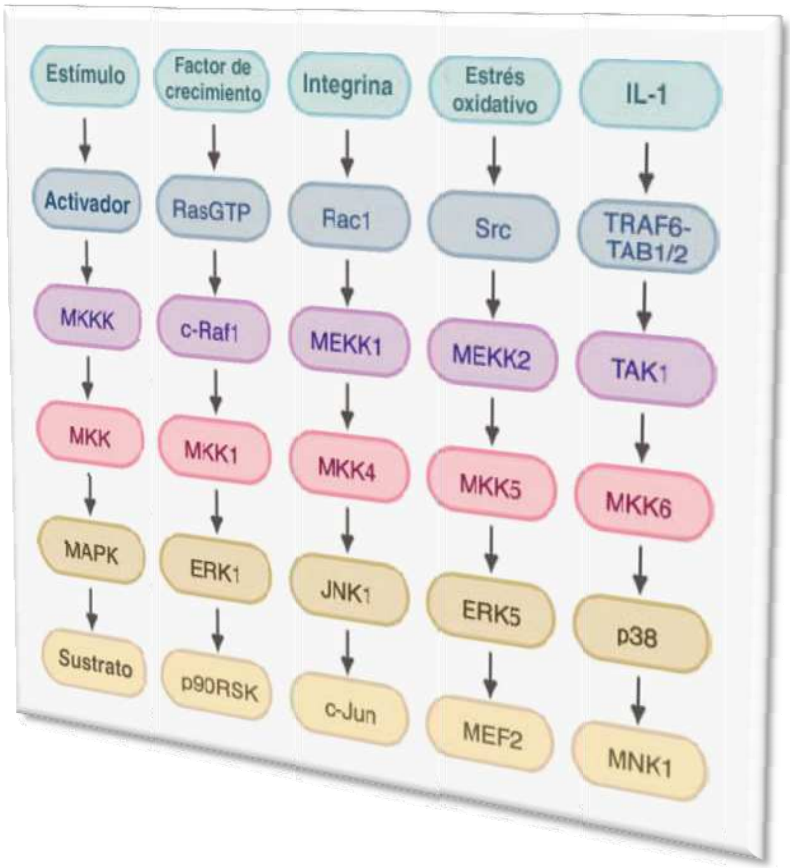

Figura 7: Vías de transducción de señales de MAPK. El esquema muestra las principales vías conocidas, así como algunos estímulos capaces de activar a cada vía (no necesariamente específicos). La linealidad de cada vía es una simplificación, existe una importante comunicación horizontal entre las vías representadas. A modo de ejemplo, se ha reportado que tanto los factores de crecimiento como el estrés oxidativo son capaces de activar a Rac1.

2. Vías de transducción de señales y *splicing* alternativo

Entre un 70% y un 90% de los eventos de *splicing* alternativo alteran el producto proteico resultante (Kan *et al.*, 2001; Modrek *et al.*, 2001). Estos hallazgos refuerzan la visión de que el control del *splicing* es un componente importante de la regulación de la expresión génica. Es por ello sorprendente que los mecanismos que regulan el *splicing*, en particular las vías de transducción de señales, no sean aún bien conocidos; lo que contrasta marcadamente con el profundo conocimiento existente acerca de los mecanismos y vías involucrados en el control transcripcional.

Hacia la fecha de inicio del trabajo que dio lugar a la presente tesis se habían publicado unos pocos artículos reportando cambios en el *splicing* alternativo de transcriptos provenientes de distintos genes en respuesta al tratamiento con estímulos extracelulares. Se supone que estas señales podrían actuar a través de vías de transducción que enviarían la información al núcleo. Efectivamente, se encontró que, en respuesta a estrés osmótico, la cascada de señalización MKK3/6-p38 altera la distribución subcelular de hnRNP A1 y es

capaz de modular el *splicing* alternativo de los transcriptos provenientes de una construcción reportera conteniendo secuencias del adenovirus E1A (van der Houven van Oordt *et al.*, 2000).

Por otro lado, si bien existe evidencia de que la proteína quinasa C (PKC), Ras y PI(3)K pueden regular el *splicing* alternativo (Fichter *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; König *et al.*, 1998; Lynch y Weiss, 2000) muy poco se sabía, para la fecha de inicio de este trabajo, acerca de los componentes de señalización que median entre la superficie celular y la maquinaria de *splicing* nuclear.

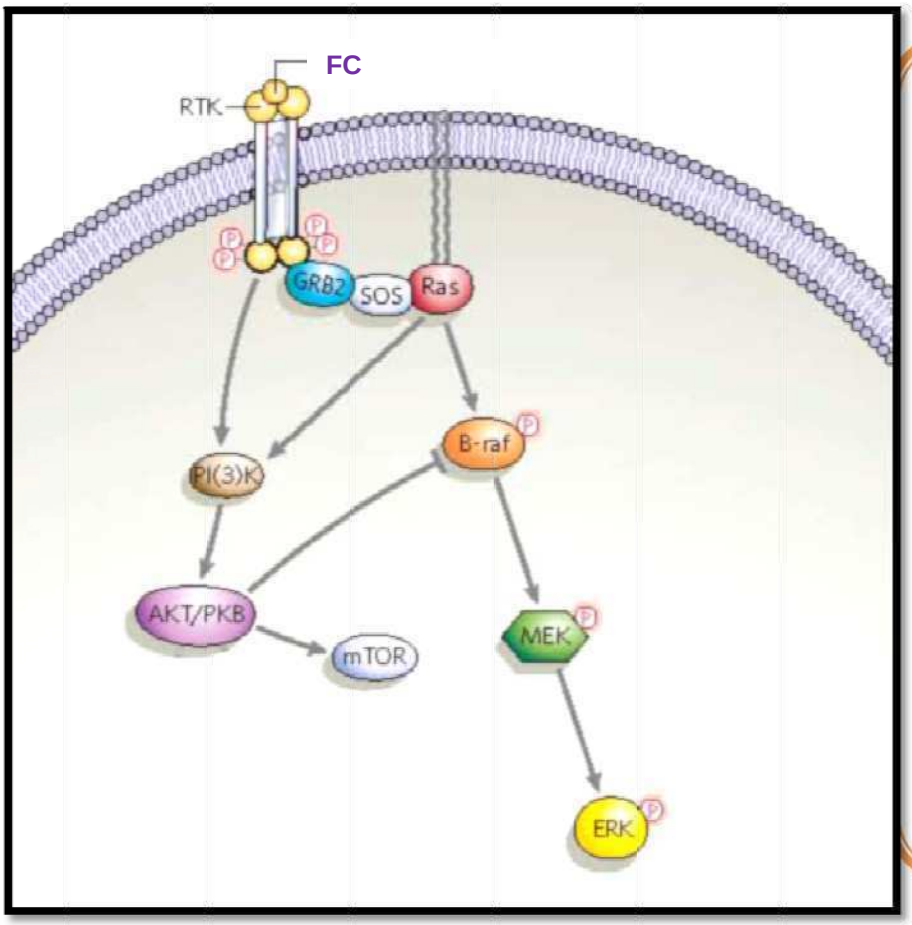

Figura 8: La vía de PI(3)K. En respuesta a la unión de un FC a un RTK, se activa la proteína pequeña G Ras, intercambiando GDP por GTP. Esto da lugar a la activación de la vía MAPK de Raf-MEK-ERK por un lado y a la de supervivencia de PI(3)K-AKT/PKB-mTor, por el otro. Estas vías se encuentran interconectadas (Sebolt-Leopold y English, 2006).

Por su parte, algunos trabajos señalan un papel predominante de la vía Ras-Raf-MEK-ERK en la transducción de señales originada por la activación de linfocitos T que deviene en la regulación del *splicing* alternativo del exón 5 de la molécula de superficie CD44 (König *et al.*, 1998; Weg-Remers *et al.*, 2001). Se encontró que la proteína Sam68 sería el eslabón final de esta vía (Fig. 9), siendo fosforilada directamente por ERK, interactuando directamente con el RNA y llevando a un aumento en la inclusión del exón alternativo (Matter *et al.*, 2002).

Finalmente, el *splicing* del pre-mRNA de la proteína fosfatasa de superficie CD45 también es regulado por señales extracelulares en linfocitos T. Contrastando con lo descripto para CD44, la transducción de señales en el caso de CD45 resulta en la exclusión de un exón alternativo. Ésta parecería ser inducida por vías de transducción de señales que involucran a Ras y a PKC (Lynch y Weiss, 2000). La exclusión está mediada por un ESS ubicado hacia el extremo 5´ del exón alternativo. La funcionalidad de este ESS es independiente de un ESE que se encuentra río abajo y que activa el sitio 5´ del exón alternativo en ausencia de estímulo extracelular (Lynch y Weiss, 2001; Rothrock *et al.*, 2003). El ESS contiene una secuencia consenso (*activation responsive sequence*) que se encuentra en otros exones alternativos del mensajero de CD45, como así también en exones alternativos regulados por señales extracelulares de otros genes (Rothrock *et al.*, 2003). El ESE contiene una secuencia rica en purinas y funcionaría mediante la actividad de proteínas SR (Lemaire *et al.*, 1999; ten Dam *et al.*, 2000) mientras que la identidad de las proteínas represoras de *splicing* que participan en esta regulación era aún desconocida al inicio del presente trabajo.

3. Quinasas y fosfatasas de proteínas SR: papel en la transducción de señales

Aunque se ha encontrado que varias quinasas, incluyendo la familia de SRPKs, Clks, *dual-specificity tyrosine-regulated kinase* (DYRKs), CRKRS (también conocida como *CDC2-related protein kinase*-7; CRK7), DNA topoisomerasa I y GSK-3 entre otras, son capaces de fosforilar a las proteínas SR (Gui *et al.*, 1994; Colwill *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2004), no se han descripto vías de transducción de señales activadas por estímulos extracelulares que funciones a través de estas quinasas. Más aún, la manera en que las actividades de las proteínas SR son reguladas de modo de asegurar la coordinación de sus diferentes funciones en el metabolismo del mRNA, requiere una investigación más exhaustiva. Por su parte, se ha encontrado que las proteínas fosfatasas de serina/treonina tales como PP1 y PP2A son capaces de defosforilar a varios miembros de las proteínas SR (incluyendo a SRp70, SRp55, SRp40 y SF2/ASF) y a otros factores de *splicing* (Mermoud *et al.*, 1994; Boudrez *et al.*, 2000; Chalfant *et al.*, 2001), alterando en consecuencia el patrón de *splicing* de varios transcriptos. Este mecanismo parece ser el responsable de la regulación del *splicing* de Bcl-x en respuesta a ceramidas vía PP1 (Chalfant *et al.*, 2002).

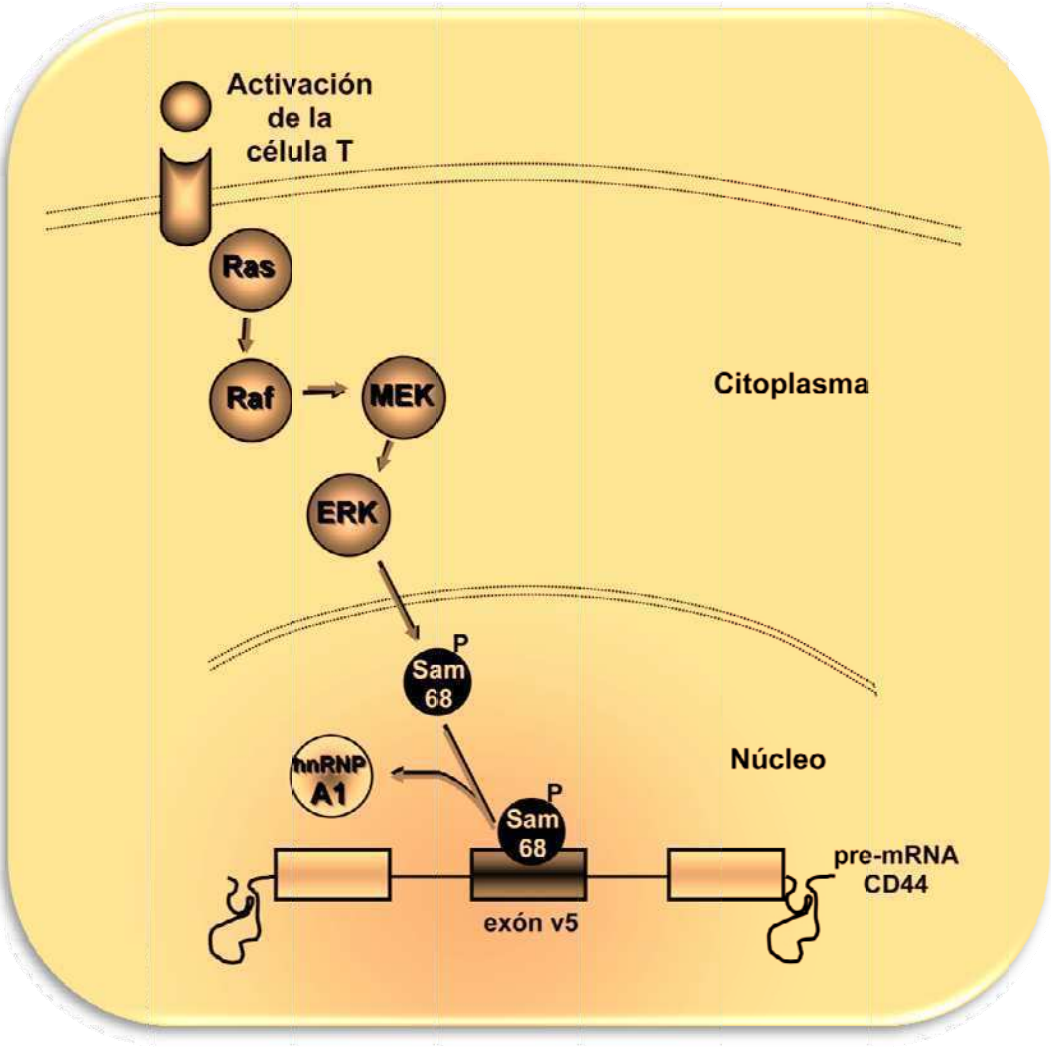

Figura 9: Activación de la célula T, señalización y regulación del *splicing* alternativo de CD44. La activación de la célula T activa a su vez la vía de Ras-Raf-MEK-ERK. El blanco final de esta vía es Sam68, que es fosforilado y desplaza o inhibe a hnRNP A1 en el exón v5 de CD44, promoviendo su inclusión en el mRNA. Otros factores como Srm160 y Brm participan también de esta regulación.

IV. El gen de la fibronectina (FN)

1. Estructura y función

La adhesión celular en organismos multicelulares involucra un grupo de proteínas con un amplio rango de actividades de unión. Estas macromoléculas son secretadas y depositadas en la vecindad de células formando una red organizada conocida como matriz extracelular (MEC). Entre las proteínas de la

MEC, la glicoproteína de alto peso molecular, FN, es la más ampliamente distribuida y la mejor caracterizada. Además de su localización en matrices de tejido conectivo y lámina basal, la FN se encuentra en altas concentraciones en el plasma. La FN juega un papel clave en el comportamiento adhesivo y migratorio de las células. Este comportamiento está relacionado a procesos fundamentales como la embriogénesis, el desarrollo tumoral, la hemostasis, la cicatrización de heridas y el mantenimiento de la integridad tisular (Akiyama *et al.*, 1995; Kornblihtt *et al.*, 1996). La importancia de la FN es conclusivamente ilustrada por el efecto letal de experimentos de *knockout* en ratón (George *et al.*, 1993).

Existen dos formas de FN: una forma dimérica soluble que es sintetizada por hepatocitos y secretada al torrente sanguíneo (FN plasmática) y una forma dimérica o multimérica, sintetizada por fibroblastos, células epiteliales y otros tipos celulares, que es depositada como fibrillas en la MEC (FN celular). Ambas están formadas a partir de polipéptidos similares, pero no idénticos, de alrededor de 250 kDa, los cuales comparten una organización modular común consistente en unidades homólogas de 40, 60 y 90 aminoácidos, denominadas repeticiones de tipo I, II y III, respectivamente (Petersen *et al.*, 1983). En particular, las repeticiones de tipo III aparecen en un gran número de proteínas adhesivas (tenascina, undulina, ciertos colágenos, contactina y N-CAM), así como en algunas proteínas intracelulares (titina y twitchina) y en los dominios extracelulares de varios tipos de receptores de membrana, como el de insulina y el de la hormona de crecimiento (Bork y Doolittle, 1992).

Existe una única copia del gen de FN por genoma haploide tanto en humanos (Kornblihtt *et al.*, 1983) como en ratas (Schwarzbauer *et al.*, 1983) y ratones (George *et al.*, 1993). El gen de FN tiene una extensión de 75 kb, contiene 50 exones y es transcripto a partir de un único promotor dando origen a un único transcripto primario. En el gen de rata, todas a excepción de una de las 12 repeticiones de tipo I y las 2 de tipo II están codificadas por un único exón cada una, mientras que 14 de las 17 unidades de tipo III están codificadas por 2 exones cada una. Las otras 3 repeticiones de tipo III (EDI, EDII y III-9) están codificadas por un único exón largo cada una (Fig. 10). La estricta correlación entre la organización intrónica/exónica y la de la proteína modular, junto a la amplia distribución de los módulos de FN en proteínas no relacionadas, refuerzan la teoría del barajado de exones (o *exon shuffling*) para el origen de proteínas de varios dominios (Gilbert, 1978).

2. *Splicing* alternativo

Cuando en el año 1983 se descubrió el *splicing* alternativo de la FN, de manera independiente por dos grupos de investigación (Schwarzbauer *et al.*, 1983; Kornblihtt *et al.*, 1984), el proceso era conocido como una rareza encontrada en una docena de genes de mamífero.

Pese a los nuevos descubrimientos, el gen de FN continúa siendo un modelo paradigmático por su fascinante complejidad (Kornblihtt *et al.*, 1996), característica que llevó a Sharp, en su discurso como ganador del Premio Nobel, a elegirlo como ejemplo para ilustrar el valor adaptativo del barajado de exones y del *splicing* alternativo (Sharp, 1994). De hecho, diferentes variantes polipeptídicas son generadas a través de un complejo patrón de *splicing* alternativo en tres sitios del transcripto primario de FN. Éstos son, de 5´ a 3´: EDII *(extra domain II)*, EDI (*extra domain I*) y IIICS (*type III connecting segment*) (Fig. 10).

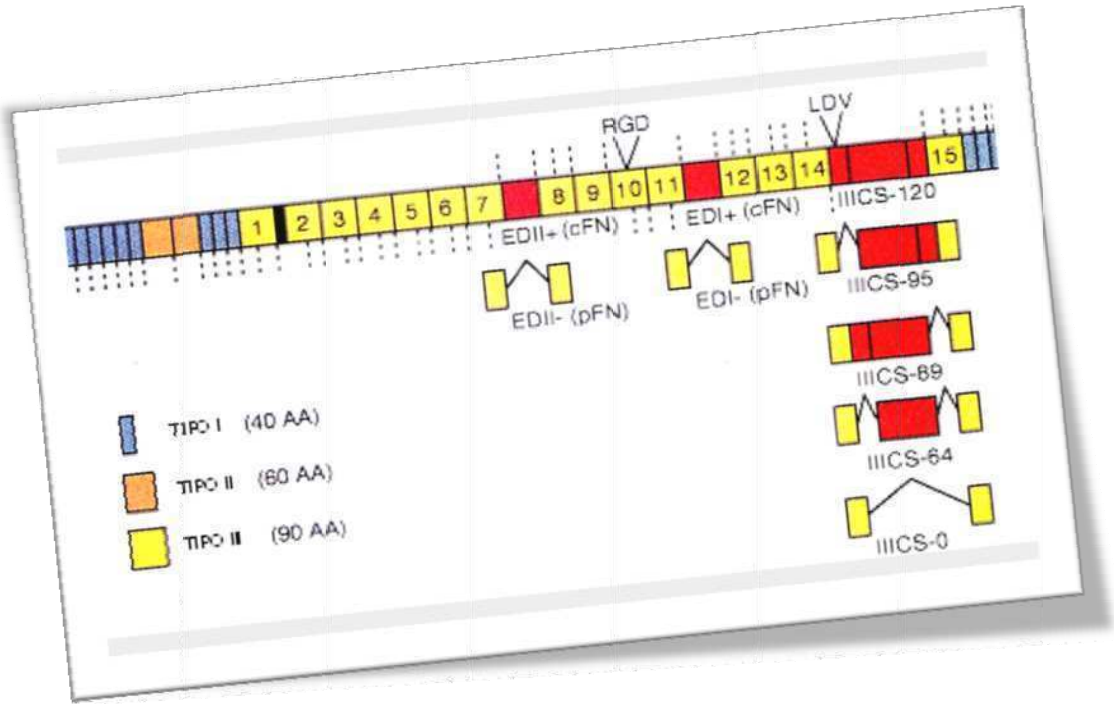

Figura 10: Variaciones en la estructura primaria de la FN humana. El esquema muestra las tres regiones que presentan *splicing* alternativo. Arriba se muestra el mayor polipéptido de FN posible. Las líneas punteadas verticales señalan los límites entre exones; los bloques de color marcan los tres tipos de homología encontrados en esta proteína. Se señalan los motivos de unión a integrinas mejor descriptos: RGD y LDV. cFN: FN celular; pFN: FN plasmática.

La subdivisión exónica de la región IIICS da lugar, en humanos, a cinco variantes por *splicing* alternativo de las secuencias codificantes (Gutman y Kornblihtt, 1987), mientras que en roedores existen tan sólo tres variantes. EDI y EDII son exones que codifican para una repetición de tipo III cada uno, siendo incluidos o excluidos durante el *splicing*. Como consecuencia de las posibles combinaciones, existen 8 variantes posibles de FN en pollo, 12 en rata y 20 en humanos (Kornblihtt *et al.*, 1996).

3. EDI

EDI (también conocido como EDA o EIIIA) codifica para una repetición de tipo III que puede ser incluida o excluida de la FN, entre las repeticiones III-11 y III-12. La inclusión de EDI resultó ser distintiva de la FN celular y se identificó en mRNAs de fibroblastos y de otros tipos celulares, pero no de hígado, lo que es consistente con la ausencia de este exón en FN plasmática (Kornblihtt *et al.*, 1984).

In vivo, la FN EDI+ está pobremente representada en la MEC de tejidos adultos normales. Sin embargo, esta variante está sobre-expresada en tejidos con alta tasa de proliferación, como durante el desarrollo embrionario (Norton y Hynes, 1987; Vartio *et al.*, 1987), en células de la granulosa ovárica (Colman-Lerner *et al.*, 1999) y en condiciones patológicas de proliferación y migración, como es el caso en tumores hepáticos malignos humanos (Oyama *et al.*, 1989), cicatrización de tejidos (ffrench-Constant *et al.*, 1989; Kuhn *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 2001), fibrosis epitelial (Barnes *et al.*, 1994) y proliferación vascular (Glukhova *et al.*, 1989). Inclusive, se ha propuesto a EDI como marcador molecular de carcinomas hepatocelulares (Tavian *et al.*, 1994).

Además de haberse encontrado una importante correlación entre la inclusión de EDI y la proliferación celular, migración y reparación de tejidos, han surgido fuertes evidencias de una participación activa de este exón alternativo en estos procesos. En esta línea de resultados, se ha sugerido que la inclusión de este exón mediaría un cambio conformacional en la FN que resultaría en una exposición incrementada del motivo RGD en el módulo III-10 (Manabe *et al.*, 1997). Dado que este módulo contiene el principal dominio de adhesión celular de la FN, y que éste a su vez es capaz de regular la proliferación celular mediante la interacción con la integrina $\alpha5\beta1$, EDI actuaría aumentando la unión a esta integrina en condiciones en que se necesita

mayor motilidad y proliferación celular. Se ha demostrado, a su vez, la importancia de EDI en la migración celular (Shimao *et al.*, 1999) y en la progresión del ciclo celular y mitogénesis (Manabe *et al.*, 1999).

Más aún, un importante número de experimentos demuestran que EDI es biológicamente activo *per se*. La conversión de lipocitos en miofibroblastos, inducida por la matriz de FN depositada por células endoteliales sinusoidales provenientes de hígado fibrótico, es bloqueada por anticuerpos contra el segmento EDI y es reproducida por FN celular y por un polipéptido EDI recombinante, mientras que la FN plasmática es incapaz de promover esta conversión (Jarnagin *et al.*, 1994). En esta última línea de evidencias, se ha demostrado también que el efecto mitogénico del medio condicionado por una línea celular de granulosa bovina, BGC-1, es inhibido por la depleción de FN EDI+ de este medio y es reproducido por un péptido EDI recombinante (Colman-Lerner *et al.*, 1999). Se ha descripto también un papel central de EDI en la activación de la expresión de metaloproteinasas de la MEC, necesarias para la migración celular y remodelación de tejidos (Huhtala *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1999) y en la diferenciación del músculo liso (Serini *et al.*, 1998). Estas observaciones fueron reforzadas por el hallazgo de que EDI es un ligando para las integrinas α9β1 y α4β1, confirmando un nuevo mecanismo para la regulación de la adhesión celular mediado por el *splicing* alternativo (Liao *et al.*, 2002). Recientemente, han sido generados ratones incapaces de regular el *splicing* de EDI y fue demostrado que esta regulación es requerida para la correcta cicatrización de heridas y para una longevidad normal (Muro *et al.*, 2003).

La primera región exónica relevante en el proceso de *splicing* descripta en un sistema natural fue la correspondiente al exón EDI de la FN humana (Mardon *et al.*, 1987). El exón alternativo EDI incluye una secuencia de 81 pares de bases con estructura bipartita (Mardon *et al.*, 1987; Muro *et al.*, 1999) que regula el uso del ss 3´ subóptimo (Fig. 11a). La disrupción de un tracto rico en purinas (GAAGAAGAC) incluido en esta región, conocido como elemento A o ESE, reduce marcadamente la inclusión de EDI *in vivo* (Caputi *et al.*, 1994) e *in vitro* (Lavigueur *et al.*, 1993). Se ha demostrado, asimismo, la interacción física entre proteínas SR y esta secuencia (Lavigueur *et al.*, 1993). Más aún, el elemento A es prácticamente idéntico a la secuencia consenso para la unión de proteínas SR como SF2/ASF, 9G8 y Tra2β (Tacke y Manley, 1995; Tacke *et al.*, 1998; Cavaloc *et al.*, 1999). Fue a raíz de estos resultados que a este tipo de secuencias se las llamó *splicing enhancers*, dada su capacidad de estimular el *splicing*

de sitios débiles, y de actuar sobre sitios de *splicing* heterólogos (Tian y Maniatis, 1992).

Se ha demostrado que la mutación del ESE de EDI bloquea la inclusión de EDI inducida por un aumento de la compactación de la cromatina, indicando que SF2/ASF y/o 9G8 son necesarias en el mecanismo que media esa respuesta (Kadener *et al.*, 2001).

Además de la secuencia ESE, el exón EDI incluye también un ESS o elemento B (CAAGG) responsable del efecto inhibitorio sobre la inclusión de EDI (Caputi *et al.*, 1994), cuya función sería regular la conformación del RNA y por ende la exposición del ESE (Muro *et al.*, 1999).

La regulación del proceso de *splicing* alternativo por señales extracelulares es crucial para modificar la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación celular (König *et al.*, 1998). Poco se sabe de las señales extracelulares que controlan el *splicing* alternativo de EDI. Entre ellas, se ha demostrado que tanto el factor de crecimiento de hepatocitos o factor de *scatter* (HGF/SF) como el factor de crecimiento transformante-beta 1(TGF-β1) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) son FC capaces de estimular la inclusión de EDI en ciertos tipos celulares (Inoue *et al.*, 1999; Shimao *et al.*, 1999; George *et al.*, 2000; Srebrow *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha encontrado que una MEC de tipo membrana basal es capaz de inhibir la inclusión de EDI en células Hep3B, observándose una paralela disminución de la proliferación celular (Srebrow *et al.*, 2002).

4. EDII

EDII (también llamado EDB o EIIIB) fue el último sitio de *splicing* alternativo en descubrirse en el mRNA de FN (Gutman y Kornblihtt, 1987; Zardi *et al.*, 1987). Como EDI, EDII codifica para una repetición de tipo III que puede o no ser incluida en la FN, entre las repeticiones III-6 y III-7, y está regulado de manera específica en el desarrollo y en cada tejido. Si bien la inclusión de este exón correlaciona con la inclusión de EDI en ciertos casos, excluyéndose de la FN plasmática y de tejidos adultos e incluyéndose en condiciones patológicas y durante el desarrollo (Kornblihtt *et al.*, 1996), existen numerosos ejemplos en que la inclusión de ambos exones no correlaciona. Los mecanismos que regulan el procesamiento de EDII parecen ser independientes de los que regulan el *splicing* de EDI (Barone *et al.*, 1989; Kornblihtt *et al.*, 1996; Lim y Sharp, 1998; Kadener *et al.*, 2001; Srebrow *et al.*, 2002). La secuencia

aminoacídica de EDII está más conservada en la evolución de lo que cualquier otra repetición de tipo III, lo cual sugiere fuertemente una función biológica para este segmento. De cualquier manera, si bien se ha sugerido un papel para EDII en la promoción de la adhesión celular (Chen y Culp, 1996; Chen y Culp, 1998) y en la diferenciación de células epiteliales alveolares (Arai *et al.*, 1997), muy poco es lo que se sabe acerca de la función y regulación de EDII. La regulación de la inclusión de EDII, por su parte, se encuentra mediada por secuencias intrónicas río abajo de EDII (Huh y Hynes, 1993). Estos elementos son una serie de 7 hexámeros (6 UGCAUG y 1 AGCAUG) localizados en una región de tan sólo 500 bases. La deleción o mutación de las 4 secuencias centrales resulta en la exclusión total de este exón en una línea de teratocarcinoma que exhibe, normalmente, altos niveles de inclusión (Huh y Hynes, 1994). Estas repeticiones aparentemente estimulan el uso del ss 5´ (Fig. 11b), no sólo del intrón río abajo de EDII, sino también de exones alternativos en genes no relacionados (Kornblihtt *et al.*, 1996).

Se ha demostrado, a su vez, que el *splicing* alternativo de este exón se encuentra controlado por SRp40 (Lim y Sharp, 1998).

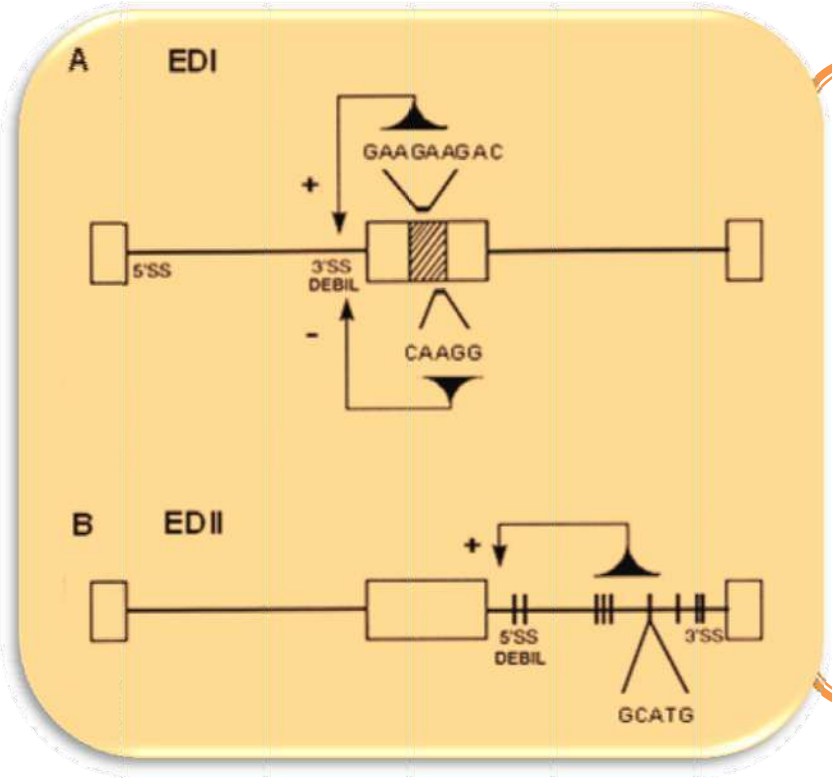

Figura 11: Secuencias génicas que controlan el *splicing* de EDI y EDII. (**A**) Se resalta la secuencia regulatoria (bloque rayado) de EDI (rectángulo central) que contiene al ESE y al ESS. (**B**) Se muestran las repeticiones GCATG (barras verticales) contenidas en el intrón 3´ de EDII (rectángulo central).

5. IIICS

En cuanto a IIICS, no se han reportado, hasta la fecha, secuencias regulatorias de *splicing*. En el único reporte donde se indaga acerca de los mecanismos que regulan el *splicing* alternativo en esta región, se demostró que SF2/ASF es capaz de aumentar la inclusión del exón, incrementando la proporción de la isoforma IIICS-120 (Sarkissian *et al.*, 1996). La inclusión de IIICS es más alta en todos los tejidos fetales en comparación con tejidos adultos, y esta región es requerida para la secreción de dímeros de FN durante la biosíntesis (Schwarzbauer *et al.*, 1989; Mardon y Sebastio, 1992).

V. Antecedentes del grupo

Mediante retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) radioactiva con *primers* que aparean en los exones constitutivos flanqueantes a EDI o a EDII (Fig. 12) fue analizada la expresión de las isoformas de FN EDI+, FN EDI-, FN EDII+ y FN EDII- en dos líneas celulares mamarias murinas, una epitelial y otra mesenquimal.

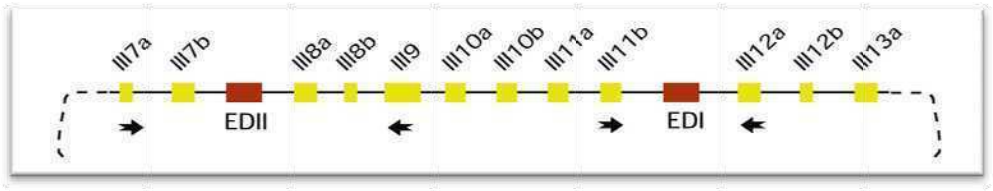

Figura 12: Análisis del *splicing* alternativo de EDI y EDII. Representación esquemática de una porción del gen de FN. Las flechas indican la ubicación de los *primers* utilizados para amplificar los mensajeros EDI+, EDI- y EDII+, EDII-.

Experimentos de la Dra. Anabella Srebrow mostraban que la línea celular mesenquimal, SCg6, expresa niveles más elevados de la isoforma EDI+ del mensajero de FN que la línea celular epitelial SCp2. La interacción entre estos dos tipos celulares induce la diferenciación de células epiteliales, evaluada por la formación de estructuras tridimensionales de tipo alveolar, capaces de producir proteínas de la leche. La células mesenquimales producen FC, tales como HGF/SF y KGF, cuyos receptores se encuentran en la membrana de las células

epiteliales (Imagawa *et al.*, 2002). Para evaluar si la interacción entre ambos tipos celulares podría también tener algún efecto sobre la expresión de las dos isoformas de FN estudiadas, fueron llevados a cabo experimentos de co-cultivo celular utilizando filtros de 0,4 μm de poro ("*cell culture inserts*") que se insertan dentro del pocillo de cultivo y permiten el cultivo de un tipo celular sobre la superficie del pocillo y otro tipo celular sobre la superficie del filtro. De esta manera, se permitió el intercambio de factores solubles producidos por los dos tipos celulares co-cultivados pero no el contacto directo entre ambos. Se observó entonces que la presencia de células mesenquimales estimula la expresión de FN EDI+ en células epiteliales, incrementando aproximadamente cuatro veces el cociente EDI+/EDI-, comparado con el cociente observado cuando a ambos lados del filtro se cultivan células epiteliales. Contrariamente, la expresión de las isoformas EDI+ y EDI- del mRNA de FN en células mesenquimales no fue modificada por la presencia de las células epiteliales (Fig. 13a).

Se estudió también si el medio condicionado por las células mesenquimales (MCmes) era suficiente para desencadenar el aumento de la expresión de la isoforma EDI+ en células epiteliales o si, por el contrario, era necesario el co-cultivo de ambos tipos celulares para generar algún tipo de retroalimentación, de intercambio dinámico entre los mismos, como lo reportado en otros sistemas (Shimao *et al.*, 1999). Este medio condicionado produjo un aumento de la inclusión del exón EDI en células epiteliales similar al obtenido durante los experimentos de co-cultivo (Fig. 13b). Por el contrario, ni los experimentos de co-cultivo, ni los experimentos de medio condicionado alteraron el cociente EDII+/EDII-.

Durante la realización de mi tesis de licenciatura, encontramos que el agregado de distintos FC recombinantes, como el FC de fibroblastos ácido (aFGF), el básico (bFGF) y el de queratinocitos (KGF/FGF-7), a un medio sin condicionar indujo también un aumento de la inclusión de EDI en células epiteliales, extendiendo los resultados publicados hasta el momento (Inoue *et al.*, 1999; Shimao *et al.*, 1999; Srebrow *et al.*, 2002) que describían para esta regulación el papel de HGF/SF, el de EGF y el de TGF-β1.

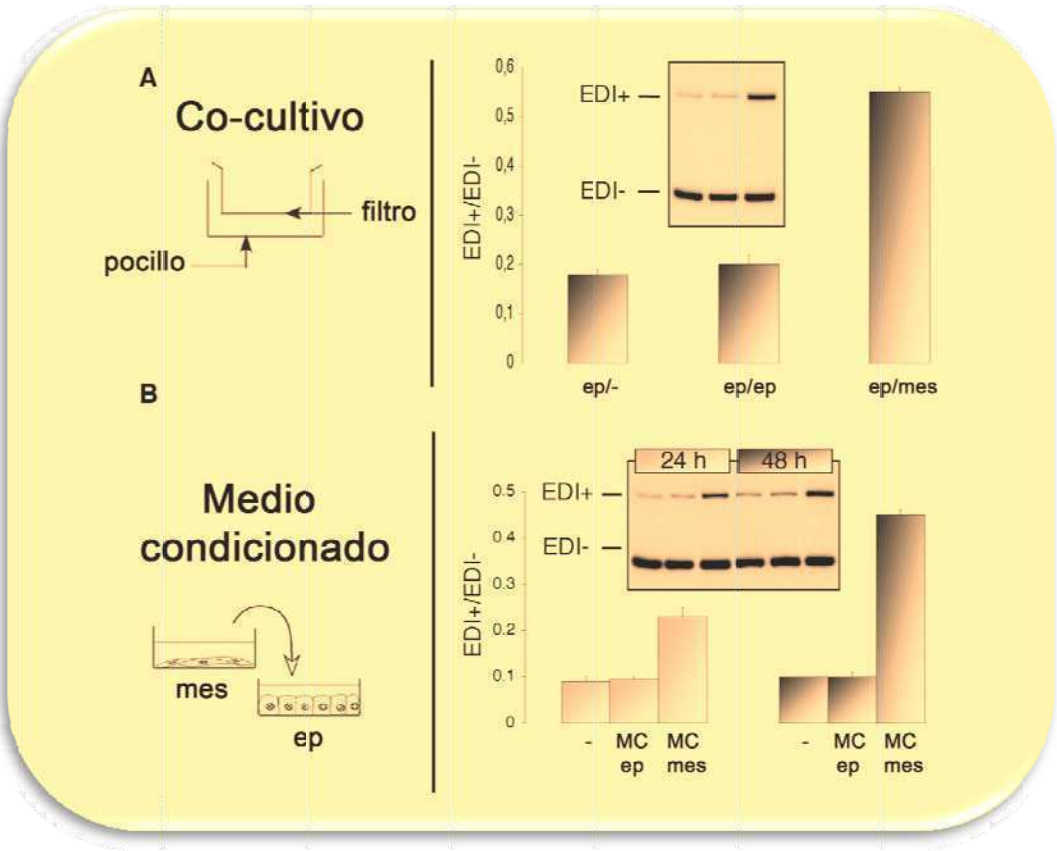

Figura 13: Experimentos de co-cultivo y de tratamiento con medio condicionado. (A) Análisis por RT-PCR de la proporción de isoformas de FN EDI+ y EDI- en experimentos de co-cultivo. Las células epiteliales SCp2 (ep) fueron cultivadas sobre un filtro poroso ubicado dentro de un pocillo de cultivo conteniendo medio libre de suero (ep/-), o bien células epiteliales (ep/ep) o células mesenquimales SCg6 (ep/mes). **(B)** Las células epiteliales fueron cultivadas en pocillos y luego de 24 h en medio sin suero permanecieron sin tratamiento (-) o fueron tratadas con medio condicionado por células epiteliales (MCep) o por células mesenquimales (MCmes) por 24 o 48 h. Se muestra el análisis por RT-PCR de cada isoforma.

Dado que las células mesenquimales expresaban un elevado nivel de inclusión de EDI, dado que el MCmes y los FC aumentaban el nivel de inclusión de EDI en células epiteliales, y teniendo en cuenta que tanto el MCmes como el HGF/SF gatillaban un cambio fenotípico en las células epiteliales generando dispersión celular (*cell scattering*) y una pérdida de la morfología epitelial, caracterizada por la ruptura de uniones celulares y por la pérdida de E-cadherina en membrana plasmática (Fig. 14a-f), especulamos que la causa de este cambio en el patrón de *splicing* alternativo de las células epiteliales podía deberse a una transición epitelio-mesenquimal.

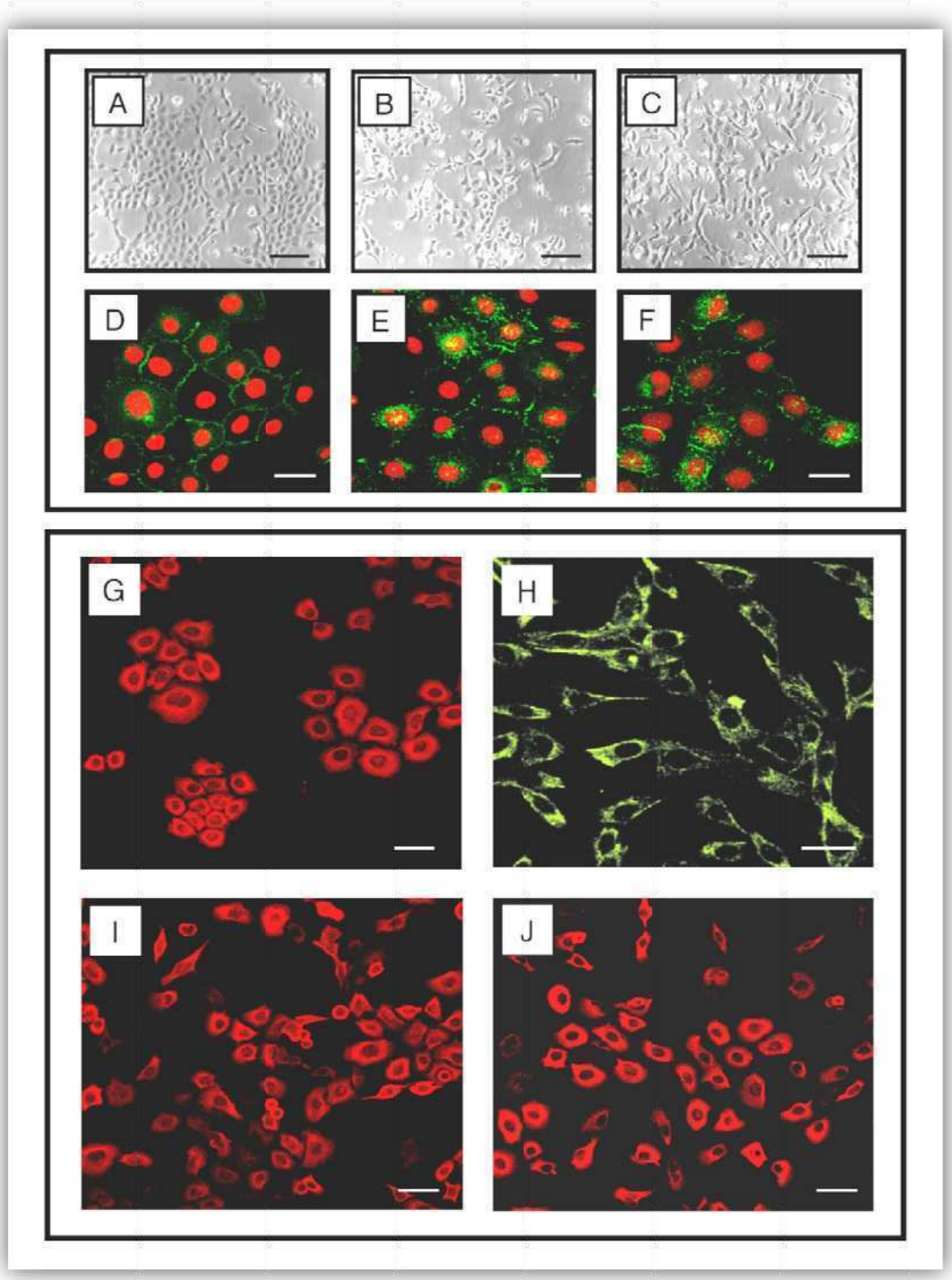

Figura 14: La inclusión de EDI en células epiteliales mamarias no está asociada con una transición epitelio-mesenquimal. (A) Las células epiteliales SCp2 muestran una típica morfología eplitelial cuando son plaqueadas en plástico pero resultan dispersadas (*cell scattering*) luego del tratamiento con HGF/SF **(B)** o MCmes **(C)**. **(D-F)** Inmunofluorescencia de células epiteliales en cultivo. La proteína de membrana E-Cadherina es mostrada en verde (FITC) y los núcleos celulares en rojo (ioduro de propidio). Los grupos de células SCp2 muestran una localización de E-Cadherina en los contactos célula-célula. Esta distribución es perturbada por tratamiento con HGF/SF **(E)** o MCmes **(F)**. **(G-J)** Doble inmunofluorescencia contra citoqueratinas (rojo, Cy5) y vimentina (verde, FITC) en células epiteliales **(G)**, mesenquimales **(H)** y epiteliales tratadas con HGF/SF **(I)** o MCmes **(J)** por 24 h. Barras: **(A-C)** 250 μm; **(D-F)** 30 μm: **(G-J)** 75 μm.

Sin embargo, el análisis de marcadores fenotípicos como la expresión de citoqueratinas (marcador epitelial), vimentina (marcador mesenquimal), y de diferentes isoformas de *splicing* alternativo del receptor 2 de FGF evidenciaron que, por lo menos a los pocos días del tratamiento, no existe tal transición (Fig. 14g-j y datos no mostrados) indicando que el cambio en el *splicing* de EDI no es el resultado trivial de esta transición o bien, alternativamente, que este cambio es un marcador temprano de una potencial transición epitelio mesenquimal.

Experimentos posteriores de mi tesis de licenciatura mostraron que la regulación del *splicing* de EDI por MCmes y por FC recombinantes era reproducible en las células epiteliales mamarias EpH4 y en las células Hep3B.

Este efecto se observó también en un minigen de EDI transfectado transitoriamente (Fig. 15), demostrando que para el aumento de la inclusión inducido por FC o bien por el MCmes es suficiente con la presencia del exón alternativo (y de sus intrones y parte de sus exones flanqueantes) y la región promotora de FN -220/+44. Por otro lado, dado que el estado de la cromatina en este plásmido es diferente al del gen endógeno, estos efectos parecen ser independientes del grado de organización basal de la cromatina.

El MCmes, por su parte, no fue capaz de producir ningún efecto sobre la inclusión de EDI en transcriptos provenientes de construcciones con mutaciones en el ESE o en el ESS señalando que la integridad de estas secuencias y, probablemente, la unión de proteínas SR a la región exónica regulatoria son indispensables para que el MCmes pueda ejercer el citado efecto.

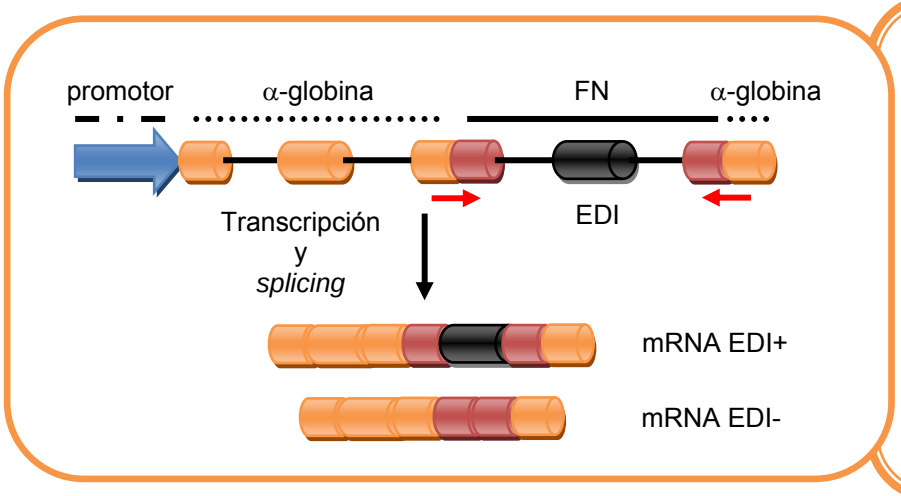

Figura 15: Minigen de EDI. Diseño del minigen reportero del *splicing* de EDI. El uso de *primers* (en rojo) que anillan contra las junturas de las secuencias de los genes α-globina y FN permite obtener un producto de PCR que corresponde a los transcriptos derivados del minigen pero no del gen endógeno de FN.

Finalmente, y de modo de empezar a conocer las vías de transducción activadas por FC que participan en la regulación del *splicing* alternativo de FN EDI, mi tesis de licenciatura concluyó con la realización de ensayos de luciferasa (LUC) con sistemas reporteros que responden a las cascadas de transducción de señales de ERK1,2, JNK y p38. Para ello, las células fueron co-transfectadas con un vector que codifica para la enzima LUC bajo las órdenes de un promotor mínimo conteniendo secuencias de unión de GAL4 (pG5-Luc) y construcciones que expresan proteínas de fusión GAL4-ELK1 o bien GAL4-ATF2, capaces de activar la transcripción cuando ELK-1 o ATF-2 se encuentran fosforilados. La fosforilación del factor de transcripción ELK-1 está asociada a la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK1,2. Sin embargo, también JNK y p38 son capaces de activar este factor de transcripción (Yordy y Muise-Helmericks, 2000). Por su parte, ATF-2 es activado por JNK y p38, pero no directamente por ERK1,2. Los FC fueron capaces de activar el sistema GAL4-ELK1 fuertemente y el sistema GAL4-ATF2 débilmente. Estos resultados señalaron, en conjunto, una importante activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK1,2 en respuesta a estos tratamientos ya que es la única vía, de las tres estudiadas, que es capaz de estimular únicamente a ELK-1.

OBJETIVOS

Nuestro grupo de trabajo está interesado en estudiar y caracterizar la influencia del microentorno celular sobre el *splicing* alternativo en particular y sobre los procesos de regulación de la expresión génica que generan variabilidad proteómica en general. El objetivo del proyecto en el cual está inmersa esta tesis de doctorado es el de intentar definir los componentes clave de la cascada de transducción de señales que, desencadenada por la unión de un FC, determina la regulación del *splicing* alternativo del pre-mRNA de FN.

Se intentará responder los siguientes interrogantes:

I. ¿Cómo afectan los FC el patrón completo de isoformas de FN (regiones alternativas EDI, EDII y IIICS)? ¿Obedecen estos cambios en el patrón de isoformas a una regulación del *splicing* alternativo, a la estabilidad diferencial de cada una de las isoformas y/o a una exportación diferencial de las mismas al citosol?

II. ¿Qué vías de transducción de señales son activadas por FC? ¿Cuáles vías de transducción de señales están involucradas en la regulación del *splicing* alternativo de FN y cuáles no? ¿Cuáles son las moléculas clave involucradas? ¿Cuáles son necesarias y cuáles son suficientes?

III. ¿Cuáles son los factores de *splicing* involucrados en dicha regulación? ¿Cómo se modifica su actividad?

IV. ¿Afecta/n esta/s vía/s de transducción de señales otros pasos en el metabolismo del mRNA de FN?

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivo de Células

1. Líneas celulares y medios

Fueron utilizadas distintas líneas celulares mamarias murinas cedidas por la Dra. Mina Bissell (LBNL, *University of California,* Berkeley, Estados Unidos): SCg6 (línea mesenquimal, queratina-negativa y vimentina-positiva), SCp2 y EpH4 (líneas epiteliales, queratina-positivas y vimentina-negativas). SCp2 y SCg6 son líneas derivadas de la cepa heterogénea CID9 (Schmidhauser *et al.*, 1990; Desprez, 1993), mientras que EpH4 es una línea derivada de la cepa heterogénea IM-2 (Reichmann *et al.*, 1989; Hirai *et al.*, 1998). Estas líneas fueron mantenidas en medio Dulbecco´s modified Eagle´s medium-F12 (DMEM-F12, Invitrogen) (1:1) conteniendo 2% (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor, insulina (5 μg/ml, Sigma) y antibiótico gentamicina (50 μg/ml, Invitrogen), y fueron repicadas cuando alcanzaron una subconfluencia aproximada del 80%, mediante la tripsinización con 0,05% tripsina pancreática (Invitrogen). Además, fueron utilizadas las líneas Hep3B (línea de tipo epitelial derivada de hepatoma humano), HeLa (línea de tipo epitelial derivada de un carcinoma cervical humano), COS-7 (línea fibroblástica transformada derivada de riñón de mono verde africano) y HEK293T (línea fibroblástica transformada derivada de riñón embrionario humano), las cuales fueron mantenidas en medio DMEM (conteniendo alta glucosa en el caso de las últimas tres líneas celulares y conteniendo piruvato de sodio sólo en el caso de la línea HEK293T) conteniendo 10% (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor, y penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml y 100 μg/ml respectivamente, Invitrogen) y fueron tripsinizadas con 0,25% tripsina pancreática cada 3 días aproximadamente.

Para la mayor parte de los experimentos se trabajó con las líneas SCp2 y Hep3B con resultados similares. Muchos de los experimentos fueron reproducidos en células EpH4 y HeLa. Los experimentos de interferencia por RNA (RNAi) fueron mayormente llevados a cabo en células Hep3B o también en HeLa para el análisis de la expresión de FGF-2. Las líneas COS-7 y HEK293T fueron utilizadas para sobre-expresar grandes cantidades de AKT/PKB y mutantes. Para el análisis de la traducción del mRNA de FGF-2 se utilizaron células HeLa dado que expresan abundante cantidad de esta proteína.

Todas las células fueron mantenidas en estufa a 37ºC con 5% de CO_2.

2. Tratamientos

- **Medio condicionado y FC**

Para la obtención de medio condicionado, 1,3 x10^6 células "donantes" (SCg6, SCp2 o EpH4) fueron plaqueadas en placas de 100 mm de diámetro. Luego de 24 h, las células fueron lavadas dos veces con medio sin suero y condicionaron 10 ml de medio libre de suero por 24 h. El medio condicionado de esas primeras 24 h fue colectado y centrifugado para eliminar restos celulares (máxima velocidad, en centrífuga Rolco 2036). Las células donantes condicionaron otros 10 ml de medio por las subsiguientes 24 h. El sobrenadante de cada centrifugación fue utilizado para tratar a las células "receptoras". Los efectos inducidos por este sobrenadante se deben a los factores en él disueltos y no a la presencia de células en el mismo ya que los mismos resultados fueron obtenidos al filtrar el sobrenadante a través de un filtro estéril de 0,45 μm (datos no mostrados). El mismo procedimiento fue repetido 24 h más tarde, por lo que finalmente las células receptoras fueron tratadas durante 48 h con medio condicionado. La misma duración tuvieron los tratamientos realizados con FC.

En paralelo, 2 x10^5 células receptoras (SCp2, EpH4 o Hep3B) fueron plaqueadas por pocillo en placas de 6 pocillos, en medio DMEM-F12 2% (v/v) suero (SCp2 y EpH4) o DMEM 10% (v/v) suero (Hep3B). A las 24 h las células fueron lavadas dos veces con medio sin suero y permanecieron en el mismo por 24 h, luego de lo cual fueron tratadas por 48 h con medio condicionado (con un cambio de medio luego de las primeras 24 h) o con FC (en medio DMEM-F12 sin suero) o bien dejadas sin tratar en medio DMEM-F12, sin suero.

Los FC utilizados fueron EGF, aFGF, bFGF, KGF/FGF-7, HGF/SF, todos de Sigma y TGF-β1, de R&D Systems. Estos factores fueron utilizados en concentraciones de 20 ng/ml.

- **Tratamiento con inhibidores farmacológicos de vías de señalización**

Las células fueron pre-tratadas con los inhibidores de MEK1, PD 98059 (PD) o U0126; con el inhibidor de PI(3)K, LY 294002 (LY); con el inhibidor de p38, SB 202190; con el inhibidor de JNK, SP 600125; o bien con

vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO) por 3 h antes de ser incubadas con el estímulo correspondiente en presencia de cada uno de los inhibidores (o DMSO como control). Todos los inhibidores utilizados son de Calbiochem.

- **Tratamiento con inhibidores de la transcripción y de la traducción**

Luego de un pre-tratamiento de 2 h con el inhibidor transcripcional, actinomicina D (Act D, Invitrogen); con el inhibidor traduccional, cicloheximida (CHX, Sigma) o con sus respectivos vehículos (DMSO y etanol), las células fueron incubadas con el estímulo correspondiente en presencia de cada inhibidor o vehículo.

- **Hambreado de aminoácidos**

Para los ensayos de inducción de estrés por ausencia de aminoácidos, 2 $x10^5$ células Hep3B fueron plaqueadas por pocillo en placas de 6 pocillos, en medio DMEM-F12 10% (v/v) suero. A las 24 h, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, luego de lo cual fueron tratadas por 48 h en Krebs-ringer *buffer* (D-glucosa 1,8 g/L, cloruro de magnesio [anhidro] 0,0468 g/L, cloruro de potasio 0,34 g/L, cloruro de sodio 7.0 g/L, fosfato de sodio dibásico [anhidro] 0,1 g/L, fosfato de sodio monobásico [anhidro] 0,18 g/L] suplementado con 10% (v/v) suero dializado o bien con DMEM-F12 suplementado con 10% (v/v) suero dializado, como control.

II. Plásmidos, RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y transfecciones

1. Plásmidos

- **Reporteros de *splicing* alternativo**

pSVEDA Tot (Caputi *et al.*, 1994), que cuenta con la región genómica conteniendo al exón EDI, sus intrones flanqueantes y los exones flanqueantes EDI-1 y EDI+1 del gen de FN humana ligados al tercer exón del gen de la α-

globina humana (α-gb). La expresión del gen quimérico α-gb/FN se halla bajo regulación del promotor de la α-gb humana.

pSVEDA/FN mut (Cramer *et al.*, 1997), idéntico al anterior pero con una región del promotor de FN conteniendo dos mutaciones puntuales que no afectan su regulación en el contexto estudiado. Este minigen y el anterior fueron utilizados con resultados similares en el estudio de la regulación por FC.

pSVEDA/FN mut Δ2e (A-B+) (Cramer *et al.*, 1999), idéntico a pSVEDA/FN mut pero con una deleción en el ESE.

pEDB-FN wt (disponible en nuestro laboratorio), similar a pSVEDA/FN *wt* pero conteniendo al exón alternativo EDII y sus secuencias flanqueantes.

pEDB-9G8, idéntico al anterior pero conteniendo la secuencia de unión de 9G8, creada por inserción de un oligo doble cadena (5´-GACAACGACGACGACTAGAA-3´) en el sitio *Xho*I presente en el exón EDB. Esta inserción no altera el marco de lectura.

pEDB-9G8as, idéntico al anterior pero portando la inserción en orientación antisentido y que fue utilizado como control. Esta inserción no altera el marco de lectura.

- **Reporteros de traducción**

pLCS-EDA (Sanford *et al.*, 2004), cedido generosamente por el laboratorio del Dr. J.F. Cáceres (*Medical Research Council Human Genetics Unit, Western General Hospital*, Edimburgo, Escocia, Reino Unido) y que cuenta con la secuencia codificante del gen de LUC a la cual se le agregó el ESE del exón EDI de FN al cual se une SF2/ASF (5´-GAAGAAGAC-3´). Esta inserción no altera el marco de lectura.

pLCS-EDA^{mt} (Sanford *et al.*, 2004), cedido generosamente por el laboratorio del Dr. J.F. Cáceres (*Medical Research Council Human Genetics Unit, Western General Hospital*, Edimburgo, Escocia, Reino Unido) y que cuenta con la secuencia codificante del gen de LUC a la cual se le agregó una versión mutante del ESE del exón EDI de FN que carece, cuando es transcripta a RNA mensajero, de sitios de pegado para SF2/ASF (5´-GTTGTTGTAC-3´). Esta inserción no altera el marco de lectura.

pSVCAT/cat1/LUC (Yaman *et al.*, 2003), cedido generosamente por el laboratorio de la Dra. Maria Hatzoglou (*Departments of Nutrition and Biochemistry, Case Western Reserve University School of Medicine,* Cleveland, Ohio, Estados Unidos), que es un reportero bicistrónico que expresa la proteína cloranfenicol

acetil-transferasa (CAT), traducida por el mecanismo canónico cap-dependiente y la proteína LUC, cuya traducción depende del *internal ribosome entry site* (IRES) del gen eucariota que codifica para un transportador catiónico de aminoácidos (cat1), ubicado entre medio de ambas unidades codificantes.

pSVCAT/BiP/LUC (Yaman *et al.*, 2003), cedido generosamente por el laboratorio de la Dra. Maria Hatzoglou (*Departments of Nutrition and Biochemistry, Case Western Reserve University School of Medicine*, Cleveland, Ohio, Estados Unidos), idéntico al anterior pero conteniendo el IRES del gen eucariota que codifica para la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina (*immunoglobulin heavy chain binding protein*, BiP) en lugar del de cat1.

pHPI1484 (Kalliampakou *et al.*, 2005), cedido generosamente por el laboratorio de la Dra. Penelope Mavromara (*Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute*, Atenas, Grecia), similar al anterior pero conteniendo un IRES del virus de la hepatitis C (HCV) en lugar del de cat1.

- **Plásmidos de expresión de proteínas SR**

Para sobre-expresar proteínas SR con la etiqueta T7 en células eucariotas fueron utilizados los plásmidos pCGT7-SF2/ASF, pCGT7-9G8, pCGT7-SC35, pCGT7-SF2/ASF ΔRS, pCGT7-SF2/ASF ΔRRM1 y pCGT7-SF2/ASF ΔRRM2 (Cáceres *et al.*, 1997; Sanford *et al.*, 2005), cedidos generosamente por el laboratorio del Dr. J.F. Cáceres (*Medical Research Council Human Genetics Unit, Western General Hospital*, Edimburgo, Escocia, Reino Unido). Para sobre-expresar proteínas SR fusionadas a EGFP fueron utilizados los plásmidos pEGFP-SF2/ASF y pEGFP-9G8 (Denegri *et al.*, 2001), cedidos generosamente por el laboratorio del Dr. G. Biamonti (*Istituto di Genetica Molecolare*, Pavia, Italia). Los plásmidos utilizados para la expresión en bacterias de proteínas SR fueron pGEX-SF2/ASF, pGEX-SF2/ASF ΔRS y pGEX-9G8 (Cavaloc *et al.*, 1999), cedidos generosamente por los laboratorios de los Dres. J. Stevenin (*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire*, CNRS/INSERM/ULP, Estrasburgo, Francia) y J. Tazi (CNRS, Montpellier, Francia).

- **Plásmidos de expresión y reporteros de quinasas y proteínas de señalización celular**

Los siguientes plásmidos fueron cedidos generosamente por el laboratorio del Dr. Omar Coso (LFBM-IFIBYNE-CONICET-FCEyN-UBA,

Buenos Aires, Argentina): para la sobre-expresión de proteínas de señalización celular fueron utilizados pCEV-Ras(V12); pCDNA3-Rac(QL) (Hochbaum *et al.*, 2003); pCMV6-HA-AKT, pCMV6-HA-AKT KM y pCMV6-HA-AKT Myr (Ahmed *et al.*, 1997); mientras que para medir la actividad de la vía de Ras-Raf-MEK-ERK1/2 y de Rac los plásmidos utilizados fueron pG5-Luc (Promega), pGal4-Elk1 y pGBDXGal4-Atf2

El plásmido pCEFL-KZ-AU5-Ras(V12C40) (Oliva *et al.*, 2004) fue cedido generosamente por el laboratorio del Dr. J.M. Rojas (Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España).

Los plásmidos pECE-Myc-Clk1/2/3 (Duncan *et al.*, 1998) fueron cedidos generosamente por el laboratorio del Dr. J.C. Bell (*Regional Cancer Centre Research Laboratories*, Ottawa, Ontario, Canadá).

Los plásmidos pME-HA-mSRPK1/2 (Kuroyanagi *et al.*, 1998) fueron cedidos generosamente por el laboratorio del Dr. M. Hagiwara (*Medical Research Institute, Tokyo Medical & Dental University*, Japón)

- **Otros plásmidos**

Para la medición de la eficiencia de transfección, las construcciones anteriores fueron co-transfectadas con el plásmido pCMV-βgal (Promega) que expresa la enzima β-galactosidasa de *E.coli* a partir del promotor del gen inmediato temprano de citomegalovirus humano. El plásmido Bluescript (pBS SK^+, Stratagene) fue utilizado para completar la masa de DNA a transfectar.

2. Preparación de plásmidos en gran escala

En los casos en que fue necesario generar masa suficiente de plásmido para las transfecciones, fueron realizadas Maxipreps mediante el uso de columnas QIAGEN.

Brevemente, 250 ml de medio LB fueron inoculados con una alícuota de bacterias conteniendo el plásmido de interés con el antibiótico correspondiente y fueron mantenidos por no menos de 20 h en agitador (Orbital Shaker, Forma Scientific). El cultivo fue trasvasado a mamaderas de 1/2 litro y fue dejado enfriar en hielo unos min. Fue centrifugado en rotor JA 14 (Centrífuga Avanti J-25, Beckman) a 6.000 x g por 15 min a 4ºC. El sobrenadante fue descartado y la mamadera fue invertida sobre papel absorbente. El pellet fue resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM) conteniendo RNasa

A (Sigma) 50 µg/ml. Luego, 10 ml de P2 (hidróxido de sodio 0,2 N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y esta mezcla fue mantenida por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, 10 ml de P3 (acetato de potasio 3 M pH 5,2) a 0ºC fueron agregados, mezclados por inversión e incubados por 15 a 20 min en hielo. Este volumen fue centrifugado a 20.000 x g (rotor JA14) por 30 min a 4ºC y el sobrenadante fue filtrado por embudo con gasa. Éste fue volcado en una columna QIAGEN-tip 500 previamente equilibrada, la cual fue vaciada por gravedad. La columna fue lavada dos veces con 30 ml de *buffer* QC y el DNA fue eluido con 15 ml de *buffer* QF. El DNA fue precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol y centrifugado a 15.000 x g (rotor JA20). Luego, el DNA fue lavado con 5 ml de etanol 70% y centrifugado (rotor JA20) a 15.000 x g por 10 min. El sobrenadante fue descartado por volcado y el pellet fue secado al aire por 10 min. Finalmente, éste fue resuspendido en 250 µl de H_20. La calidad, cantidad e identidad de los plásmidos se verificó por digestión y electroforesis en gel de agarosa.

3. Construcción de pEDB-9G8 y pEDB-9G8as

El plásmido pEDB-9G8 fue creado por inserción de un fragmento correspondiente a la secuencia de pegado de 9G8, descripta en Cavaloc *et al.*, 1999, en el sitio *Xho*I del exón EDB de pEDB-FN *wt*.

La estrategia de clonado consistió en:

1) Diseñar y encargar los oligos (Invitrogen):

Con estos oligos:

a) Se crea el ESE para 9G8, respetando las 20 bases obtenidas por SELEX (metodología basada en la selección, amplificación, clonado e identificación de las secuencias que se unen a la proteína de interés) en Cavaloc *et al.*, 1999.

b) No se altera el marco de lectura (se inserta un total de 24 bases)
c) Se disrumpe el sitio *Xho*I (CTGGAG).
d) Se crea un sitio *Pvu*I (CGATCG) con el objeto de mapear la orientación de la inserción.
e) Se deja un extremo 5´-TCGA-3´ a ambos lados del oligo doble cadena capaz de aparearse con los extremos cohesivos de un plásmido linealizado con *Xho*I.

2) Resuspender los oligos en agua, fosforilar sus extremos 5´ y anillarlos.

- **Tratamiento de los oligos con polinucleótido quinasa (PNK) y anillado de los oligos**

Ambos oligos fueron mezclados de tal manera que 50 pmoles de cada oligo (800 ng totales) fueron incubados con 2 U de la enzima PNK (Invitrogen), 30 min a 37°C, en presencia de ATP 1 mM y el *buffer* apropiado. Luego, la enzima fue inactivada a 75ºC por 10 min y la mezcla fue dejada enfriar lentamente en baño de agua para favorecer el anillado de los oligos.

3) Digerir 10 μg de pEDB-FN *wt* con la enzima *Xho*I por 2 h a 37 h, purificar la banda correspondiente al plásmido linealizado, cuantificar la concentración de plásmido purificado en gel de agarosa por comparación con un marcador de masa y defosforilar sus extremos.

- **Purificación de bandas de DNA de geles de agarosa**

La purificación de bandas de DNA a partir de geles de agarosa fue realizada con QIAEX II *Agarose Gel Extraction Protocol* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la banda de DNA fue cortada del gel de agarosa, colocada en un tubo de 1,5 ml, al cual se le agregó 3 volúmenes de *buffer* QX1. Posteriormente, fue agregada la resina QIAEX II (luego de haberla resuspendido en vórtex por 30 s). Se incubó por 10 min a 50°C para solubilizar la agarosa, mezclando cada 2 min para mantener la resina

en suspensión. La muestra fue centrifugada por 30 seg y el sobrenadante fue descartado. Luego de lavar el *pellet* con 500 µl de QX1, el mismo fue lavado dos veces con *buffer* PE. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue dejado secar al aire por 15 min. A continuación, fueron agregados 20 µl de agua y el pellet fue resuspendido. Luego de centrifugar por 30 seg, el sobrenadante conteniendo el DNA fue trasvasado a un tubo nuevo. En todos los casos en los que se utilizó este protocolo, una alícuota del DNA purificado fue corrida en un gel de agarosa para verificar la correcta purificación y posterior cuantificación.

- **Tratamiento del vector linealizado con fosfatasa alcalina**

Los extremos fosfato del vector linealizado fueron removidos mediante la acción de la fosfatasa alcalina de camarón (*Shrimp Alkaline Fosfatase*). Fue realizada una incubación de 45 min a 37°C y luego la enzima fue inactivada por calor (15 min a 65°C).

4) Realizar la ligación, transformar la misma y chequear los clones transformantes

- **Ligación, transformación y chequeo**

Para la reacción de ligación se realizó el correspondiente control sin la enzima Ligasa (Invitrogen), el control con la enzima, pero sin inserto y dos tubos (I y II) con diferentes relaciones molares inserto-vector, 3:1 y 50:1, todo en presencia de rATP 1 mM y *buffer* de ligasa. Los diferentes tubos fueron dejados toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente su contenido fue utilizado para transformar bacterias competentes (Sambrook y Russell, 2001), utilizando para ello bacterias *E.coli* de las cepas DH5α previamente procesadas según el método de Hanahan (Hanahan, 1983). Posteriormente, fueron chequeados los clones transformantes mediante preparación de plásmidos en pequeña escala (miniprep) y por medio de dos PCRs para cada clon, con un primer 5´ que anilla con en el exón EDB río arriba de la inserción (EDB For, 5´-

GGTACCGCATCACAGTAGTTGCGGCA-3´) y utilizando como 3´ cada uno de los dos oligos con que se realizó la inserción. Los productos fueron corridos en geles de agarosa 2% y los clones positivos pEDB-9G8 y pEDB-9G8as fueron identificados por originar producto del tamaño correspondiente en una PCR y no en la otra (y viceversa).

4. siRNAs

Fueron utilizados siRNAs de Invitrogen y Dharmacon con similares resultados. Los siRNAs (secuencia sentido) fueron los siguientes:

si9G8, 5´-AGGAGAGUUAGAAAGGGCU(T)(T)-3´;

siSF2/ASF, 5´-CCAAGGACAUUGAGGACGU(T)(T)-3´;

siSC35, 5´-UCGCCUUCGUUCGCUUUCACGACAA-3´.

Como control fueron utilizados siRNAs no relacionados o plásmidos vacíos. En todos los cosas fueron agregados 40 pmol de siRNA por pocillo de 35 mm en las transfecciones con Lipofectamina y 100 pmoles de siRNA por pocillo de 35 mm en las transfecciones con Lipofectamina 2000.

5. Transfecciones

Las transfecciones celulares fueron realizadas con los reactivos FuGENE 6 (Roche) en el caso de las líneas celulares mamarias y Lipofectamina o Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en el caso de las demás líneas celulares (el último reactivo se utilizó solamente para realizar la depleción de SF2/ASF por RNAi previa a los análisis de FGF-2).

- **FuGENE 6**

Por pocillo (35 mm) de placa de 6 pocillos a transfectar, fueron mezclados (en tubos eppendorf) 97 µl de medio sin suero y sin otros agregados y 3 µl de FuGENE 6. Fueron agregados 2 µg de DNA total. El contenido fue mezclado suavemente y fue incubado por 15 min a temperatura ambiente. Finalizado dicho período de tiempo, la mezcla fue agregada de a gotas al pocillo conteniendo 2 ml de medio 1% (v/v) suero con insulina o medio sin suero con insulina y a las 24 h, el pocillo fue lavado dos veces con medio sin suero y el tratamiento correspondiente fue aplicado. En el caso de placas de 24 pocillos,

todos los valores (masas y volúmenes) fueron los correspondientes a la quinta parte de los utilizados en placas de 6 pocillos.

- **Lipofectamina**

Por pocillo (35 mm) de placa de 6 pocillos a transfectar, fueron mezclados (en eppendorf o tubos de poliestireno) 100 μl de medio sin suero y sin otros agregados, y 2 μg de DNA total. En otro tubo de poliestireno fueron mezclados, por pocillo, 100 μl de medio sin suero y sin otros agregados y 6 μl de Lipofectamina. Luego, el contenido de ambos tubos fue mezclado suavemente e incubado por 40 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X y el medio fue reemplazado por 0,8 ml de medio fresco sin suero y sin antibióticos. Luego de mezclar, la solución de DNA y Lipofectamina fue introducida, de a gotas, en cada pocillo. Las células permanecieron durante 5 h a 37ºC en este medio, luego de lo cual este último fue reemplazado por el medio correspondiente. En el caso de placas de 24 pocillos, todos los valores (masas y volúmenes) fueron los correspondientes a la quinta parte de los utilizados en placas de 6 pocillos.

- **Lipofectamina 2000**

Por pocillo (35 mm) de placa de 6 pocillos a transfectar, fueron mezclados (en eppendorf o tubos de poliestireno) 250 μl de medio de cultivo Optimem (Invitrogen) y 100 pmoles de siRNA. En otro eppendorf o tubo de poliestireno fueron mezclados, por pocillo, 250 μl de medio Optimem y 5 μl de Lipofectamina 2000. Cada tubo se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Luego, el contenido de ambos tubos fue mezclado suavemente e incubado por otros 15 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X y el medio fue reemplazado por 2 ml de Optimem. La solución fue introducida, de a gotas, en cada pocillo. Las células HeLa permanecieron durante 24 h a 37ºC en este medio antes de cambiarlo por el medio correspondiente a cada línea celular.

III. Detección de las isoformas de *splicing* alternativo

1. Extracción de RNA

El medio de cultivo fue aspirado y 500 µl de solución desnaturalizante (Isotiocianato de guanidinio 4 M, Citrato de sodio 25 mM, β-mercaptoetanol 0,1 M y N-laurilsarcosina 0,5%) fueron agregados por pocillo, en placas de 6 pocillos. En los casos en que los tratamientos generaron muerte celular, los pocillos fueron lavados con medio de cultivo sin suero previo al agregado de solución desnaturalizante de modo de eliminar restos celulares en suspensión. La solución fue trasvasada a tubos eppendorf y 50 µl de acetato de sodio 3 M pH 4 fueron agregados por tubo. El contenido fue mezclado por inversión y 500 µl de fenol:H_2O fueron agregados y mezclados. Posteriormente, 120 µl de cloroformo:isoamílico (49:1) fueron agregados. El contenido fue mezclado con ayuda de un vórtex durante 10 seg e incubado 30 min en hielo. Posteriormente, fue centrifugado 30 min a 10.000 RPM (9.300 x g, centrífuga refrigerada 5415 R, Eppendorf) a 4°C. La fase acuosa fue trasvasada a otro tubo eppendorf y precipitada con un volumen de isopropanol 100% durante al menos 60 min a -20°C. Luego, fue centrifugada 30 min a 10.000 RPM a 4°C. El sobrenadante fue volcado y fueron agregados 300 µl de etanol 75%. Para desprender el *pellet* de la pared del tubo, fue utilizado un vórtex y, posteriormente, fue realizada una centrifugación de 10 min a 10.000 RPM (9.000 x g). El sobrenadante fue descartado y el *pellet* secado al aire. Finalmente, este último fue resuspendido en H_2O libre de RNasas y guardado a -80°C (Chomczynski y Sacchi, 1987; Sambrook y Russell, 2001).

Previamente a la síntesis del DNA complementario, la calidad y cantidad de RNA fue chequeada en geles de agarosa al 1% corridos a 5 V/cm en TBE 1X (ácido bórico 89 mM, Tris 89 mM y EDTA 20 mM, en TBE 10X) teñidos con bromuro de etidio.

2. RT-PCR

- **Síntesis de DNA copia (cDNA) a partir de RNA de células en cultivo**

Para sintetizar cDNA a partir del RNA extraído, el RNA contenido en un volumen de 5 µl fue desnaturalizado a 65°C por 5 min, transferido a 0°C, y luego fue mezclado con 15 µl de Tris-HCl pH 8,3 50 mM, cloruro de potasio 75 mM, cloruro de magnesio 3 mM, DTT 10 mM, RNAsin 20 U (Promega), dNTPs 400 µM, $pdT_{12.18}$ 2,5 µM (Pharmacia) y transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT, Invitrogen) 300 U. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 10 min, luego a 35°C durante 1 h y a 95°C por 5 min. Fueron incluidos siempre controles sin RNA.

- **Amplificación de cDNA por PCR**

Las reacciones de amplificación fueron realizadas según las indicaciones del proveedor utilizándose 1,5 mM de cloruro de magnesio, 200 µM dNTPs y 1,5 unidades de Taq Polimerasa (Invitrogen) en todos los casos. Como molde fue utilizado un 10% (2 µl) de la reacción de síntesis de cDNA. Los *primers* fueron utilizados en una concentración de 1 µM final cada uno. En los protocolos en que se especifica, fue agregado DMSO 3% (v/v) para eliminar bandas espurias y fueron agregados 0,1 µCi de [^{32}P-α] dCTP por tubo en las PCRs radioactivas. Siempre fueron incluidos controles sin cDNA molde.

La amplificación fue realizada en un termociclador modelo PTC-100 (MJ research, Inc.).

3. Análisis de los productos de PCR

Los productos de amplificación fueron analizados de las siguientes maneras:

-en geles de agarosa al 1-1,5% en TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio. La electroforesis fue realizada a un voltaje constante de 5V/cm.

-en geles de poliacrilamida 6% nativos en TBE 1X. La electroforesis fue realizada a una potencia constante de 15W. En este último caso, los productos fueron visualizados gracias a la inclusión de [α^{32}P] dCTP en la PCR. Esto

permitió, además, cuantificar la proporción de cada isoforma de *splicing*. Para ello, el gel fue deshidratado en una secadora modelo 583 (Bio-Rad), fue realizada una autoradiografía, el gel y la autorradiografía fueron superpuestos y las bandas correspondientes a cada isoforma estudiada fueron recortadas. Finalmente, la radioactividad de cada banda fue cuantificada en un contador de centelleo LS 6500 (Beckman) por el método de Cerenkov.

4. Protocolos de PCR utilizados

- **FN EDI endógeno de ratón**

Fueron utilizados los oligonucleótidos mFNdir y mFNrev (Werbajh *et al.*, 1998). La amplificación fue realizada del siguiente modo:

Un primer paso de desnaturalización a 94ºC por 5 min, seguido de 30 ciclos de:

Desnaturalización: 94°C por 1 min.

Apareamiento: 63°C por 1 min.

Elongación: 72°C por 1 min.

Un paso de elongación final de 5 min a 72ºC.

- **FN EDI endógeno humano**

Fueron utilizados los oligonucleótidos hFN-dir4860 y hFN-rev5758 (Srebrow *et al.*, 2002). Fue utilizado DMSO. La amplificación fue realizada del siguiente modo:

Un primer paso de desnaturalización a 94ºC por 3 min, seguido de 26 ciclos de:

Desnaturalización: 94°C por 1 min.

Apareamiento: 62°C por 1 min.

Elongación: 72°C por 2 min.

Un paso de elongación final de 10 min a 72ºC.

- **Minigen EDI**

Fueron utilizados los oligonucleótidos pSV5'j y pSV3'j (Caputi *et al.*, 1994). Fue utilizado DMSO. La amplificación fue realizada durante 30 ciclos del siguiente modo (Cramer *et al.*, 1997):

Desnaturalización: 94°C por 45 seg.

Apareamiento: 63°C por 1 min.

Elongación: 72°C por 30 seg.

- **FN EDII endógeno de ratón**

Fueron utilizados los oligonucleótidos hEDB-dir (la secuencia humana guarda 100% de identidad con la murina) y mEDB-rev (5´CAGTGGA CAGTGAATGAGTTGG 3´) (Srebrow *et al.*, 2002). La amplificación fue realizada del siguiente modo:

Un primer paso de desnaturalización a 94ºC por 3 min, seguido de 30 ciclos de:

Desnaturalización: 94°C por 1 min.

Apareamiento: 63°C por 1 min.

Elongación: 72°C por 1 min y 40 seg.

Un paso de elongación final de 5 min a 72ºC.

- **FN EDII endógeno humano**

Fueron utilizados los oligonucleótidos hEDB-dir y hEDB-rev (Srebrow *et al.*, 2002). La amplificación fue realizada del siguiente modo:

Un primer paso de desnaturalización a 94ºC por 3 min, seguido de 30 ciclos de:

Desnaturalización: 94°C por 1 min.

Apareamiento: 63°C por 1 min.

Elongación: 72°C por 1 min y 40 seg.

Un paso de elongación final de 5 min a 72ºC.

- **Minigen de EDB**

Fueron utilizados los oligonucleótidos α23-glob (5´ CTTCAAGCTCC TAAGCCACTG 3´) y bra 2 (5´ TAGGATCCGGTCACCAGGAAGTTGGT TAAATCA 3´). Fue utilizado DMSO. La amplificación fue realizada durante 30 ciclos del siguiente modo:

Desnaturalización: 94°C por 45 seg.

Apareamiento: 63°C por 1 min.

Elongación: 72°C por 30 seg.

- **FN IIICS endógeno de ratón**

Fueron utilizados los oligonucleótidos mIIICSdir y mIIICSrev (Chauhan *et al.*, 2004). La amplificación fue realizada del siguiente modo:

Desnaturalización: 94°C por 30 seg.
Apareamiento: 62°C por 30 seg.
Elongación: 72°C por 60 seg.

IV. PCR en tiempo real

La cuantificación de los transcriptos derivados de los plásmidos pLCS-EDA y pLCS-EDA^{mt} fue llevada a cabo por RT-PCR en tiempo real, utilizando un DNA *Engine Opticon system* (Bio-Rad). Las amplificaciones fueron realizadas en cloruro de magnesio 3,5 mM y SYBR Green 1:30.000 (Molecular Probes) con una incubación inicial a 94ºC por 3 min seguida de 35 ciclos de:

Desnaturalización: 94°C por 30 seg.
Apareamiento: 62°C por 30 seg.
Elongación: 72°C por 1 min.

Los oligonucleótidos fueron descriptos previamente (Sanford et al., G&D/2004).

V. Separación de las fracciones nuclear y citoplasmática

Las células fueron lavadas y cosechadas en 200 µl PBS frío y luego centrifugadas a 4°C por 2 min a 2.000 RPM. El pellet fue resuspendido en 150 µl de RSB (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, cloruro de potasio 10 mM, espermidina 0,5 mM, espermina 0,15 mM, NP40 0,1% (v/v), DTT 1 mM, y *Complete protease inhibitor cocktail* 1X [Roche]). Luego de 5 min de incubación en hielo, las células fueron lisadas en vórtex. Los núcleos fueron colectados por centrifugación a

4°C por 10 min at 2.000 RPM, correspondiendo el sobrenadante a la fracción citosólica.

VI. Separación de proteínas y análisis por *western blot*

1. Electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional

Luego de los tratamientos, las células fueron lisadas en 2X *sample buffer* (SDS 4%, glicerol 20%, Tris 120 mM, azul de bromofenol 0,002% y β-mercaptoetanol 200 mM) a los tiempos que se indican en cada caso. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE).

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional

Luego de cada tratamiento, las células fueron lavadas con PBS frío y cosechadas en *buffer* de lisis (HEPES pH 7,5 20 mM, NP-40 1% [v/v], cloruro de sodio 300 mM, EGTA 10 mM, β-glicerofosfato 40 mM, cloruro de magnesio 2,5 mM y vanadato de sodio 2 mM). Luego de remover los residuos celulares, 100 μg de proteína de la fracción soluble fueron mezclados con *buffer* de extracción SDS para llegar a una concentración final 1X (SDS 3% [p/v], glicerol 10% [v/v], Tris-HCl pH 6,8 40 mM y DTT 50 mM) y calentado a 95°C por 5 min. Para la cuantificación de proteínas, fue utilizado el ensayo de proteínas de Bio-Rad. Básicamente, 2 diluciones de cada muestra, junto con una curva de estándares de BSA (de 0,05 a 0,5 mg/ml de proteína), todas en un volumen final de 10 μl, fueron mezcladas con 200 μl de una dilución al quinto del reactivo de Bio-Rad en una placa de 96 pocillos a temperatura ambiente. Luego, fue determinada la absorbancia a 570 nm. La precipitación de las proteínas fue llevada a cabo agregando acetona fría e incubando la mezcla a -20ºC por 20 min. Luego de lavar con acetona 80% (v/v), el pellet fue secado en vacío (SAVANT SVC 100H). El pellet proteico fue resuspendido en 60 μl de *buffer* de isoelectroenfoque (*buffer* IEF: urea 8 M, tritón X-100 2% [v/v], β-mercaptoetanol 5% [v/v], anfolitos Bio-Rad Bio-Lyte 3-10 2% [v/v] y azul de bromofenol 0,01% [p/v]) por 1 h a 37ºC con agitación ocasional y centrifugado a 10.000 x g por 10 min. El sobrenadante fue sembrado en el cátodo de un gel

de IEF (gradiente de pH de 3-10) y recubierto con *buffer* IEF 0,5X. La electroforesis bidimensional en gel fue llevada a cabo en *Mini-Protean® 2-D* (BIO-RAD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La electroforesis en la primera dimensión fue desarrollada a 700 V por 6,5 h (el pre-enfoque fue omitido). Los geles de IEF corridos fueron incubados en *buffer* de equilibrado (SDS 3% [p/v], Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 10% [v/v], β-mercaptoetanol 2% [v/v] y azul de bromofenol 0,01% [p/v]) e inmediatamente congelados en hielo seco y guardados a –80ºC. Para la segunda dimensión los geles fueron cargados en un SDS-PAGE 12% (p/v) y recubiertos con *buffer* de equilibrado 0,5 X suplementado con agarosa 1% (p/v).

3. *Western blot*

Luego de electrotransferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa fue realizado el bloqueo de dichas membranas con una solución de bloqueo, leche 5% (p/v) en TBS conteniendo *Tween* (TTBS) 0,05% (v/v), por 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo (la anteriormente descripta o bien seroalbúmina bovina [BSA] 0,5% [p/v] en TTBS) por 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 5 min cada uno con TTBS se incubó la membrana con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en solución de bloqueo y luego de lavar se reveló por el sistema de detección *enhanced chemiluminiscence* (ECL).

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-fosfo-ERK (pERK), antifosfo-JNK (pJNK), anti-fosfo-p38 (pp38), anti-ERK2, anti-JNK, anti-p38, anti-PKB (Santa Cruz Biotechnology, provistos por el Dr. O.A. Coso, LFBM-IFIBYNE-CONICET-FCEyN-UBA, Buenos Aires, Argentina) y anti-fosfo-AKT/PKB (pAKT, Cell Signalling Technology); anti-SF2/ASF (mAb 103; provisto por el Dr. A.R. Krainer, *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor*, Nueva York, Estados Unidos), anti-9G8 (mAb 1C6, provisto por el Dr. J. Stevenin, *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire*, CNRS/INSERM/ULP, Estrasburgo, Francia); anti-AU5, anti-HA y anti-Myc (Covance, provistos por el Dr. O.A. Coso, LFBM-IFIBYNE-CONICET-FCEyN-UBA, Buenos Aires, Argentina); anti-T7 (Novagen); y anti-FGF-2 (sc-79 y sc-7911, Santa Cruz Biotechnology, provistos por la Dra. C. Lanari, Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina).

VII. Inmunofluorescencias y microscopía

Para los ensayos con microscopía de fluorescencia, 2 x10^5 células fueron plaqueadas en pocillos de 35 mm y transfectadas 24 h después con 250 ng de pEGFP-9G8 o pEGFP-SF2/ASF y 1.750 ng de pECE-Myc-Clk2, pCMV6-HA-AKT Myr o vector vacío. 48 h después las células fueron fijadas y sujetas a ensayos de inmunofluorescencia para detectar las proteínas Clk2 y AKT Myr. Las células fueron fijadas con 1 ml de paraformaldehído 4% (p/v) en PBS por 15 min a temperatura ambiente, lavadas dos veces con PBS, permeabilizadas por 5 min con 1 ml de tritón X-100 0,2% (v/v) en PBS, y luego de lavar con PBS, bloqueadas por 30 min con 1 ml de BSA 3% (p/v) en PBS. Luego de la incubación con 100 µl del anticuerpo primario (anti-HA o anti-Myc) y 100 µl del secundario (acoplado a Cy5) en solución de bloqueo y extenso lavado con PBS, la células fueron montadas con *Vectashield* conteniendo ioduro de propidio (Vector Laboratories). Las imágenes fueron capturadas en un microscopio confocal *Olympus Fluoview FV300* equipado con un objetivo para aceite de inmersión de 60X. Para la excitación de EGFP fue utilizado el láser de argón (488 nm); para la excitación del ioduro de propidio, el láser de helio-neón verde (543 nm); y para la excitación del Cy5, el láser de helio-neón rojo (633 nm). El programa utilizado para captura de imágenes fue el *Fluoview* versión 3.3 (Olympus).

VIII. Ensayos de fosforilación *in vitro*

1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

- **Proteínas de fusión glutatión-S-transferasa (GST)-SR**

Las proteínas de fusión GST-SR fueron sobre-expresadas en la cepa *E. coli* Rosetta pLysS BL21 (Novagen). Para ello, las bacterias fueron crecidas durante la noche a saturación en 20 ml de LB conteniendo los antibióticos ampicilina y cloranfenicol. A la mañana siguiente, las bacterias fueron transferidas a 500 ml de medio fresco conteniendo ampicilina, cloranfenicol y glucosa 0,2% (p/v) e incubadas a 37°C hasta que la densidad óptica fue de 0,5 (a 600 nm). Luego, fueron inducidas con isopropil-β-tiogalactopiranósido

(IPTG) 1 mM durante 3 h. Las bacterias fueron centrifugadas por 30 min a 3000 RPM y lisadas en solución A (PBS conteniendo tritón X-100 1% [v/v], EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, *Complete protease inhibitor cocktail* 1X [Roche]). Posteriormente, los lisados fueron congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37ºC dos veces y sonicadas tres veces al 50% de amplitud en tubos falcon de 15 ml. Posteriormente, los lisados fueron centrifugados a 9.000 RPM por 15 min y el sobrenadante fue mezclado con una resina de glutatión-sefarosa 4B-CL (Amersham-Pharmacia) y agitado por 60 min a 4ºC. Luego, la mezcla fue centrifugada por 5 min a 3.000 RPM, el sobrenadante descartado y el pellet resuspendido en 1 ml de solución A y transferido a un tubo eppendorf. Luego de tres lavados con solución A y de dos lavados con solución A sin tritón X-100, las proteínas de fusión mezcladas con la resina fueron guardadas a 4ºC.

- **Inmunoprecipitación de proteínas**

Para los ensayos de fosforilación de proteínas SR por AKT/PKB, 1-2 $x10^6$ células HEK293T o COS-7 fueron transfectadas en placas de 100 mm con pCMV6-HA-AKT o pCMV6-HA-AKT KM, o bien no fueron transfectadas. Luego de 48 h, las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas a 4ºC en *buffer* de lisis de AKT/PKB (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, cloruro de sodio 137 mM, tritón X-100 1% [v/v], glicerol 10% [v/v], fluoruro de sodio 20 mM, vanadato de sodio 2 mM, DTT 1 mM, β-glicerofosfato 25 mM y *Complete protease inhibitor cocktail* 1X [Roche]). Luego de descartar los restos celulares insolubles, los extractos fueron incubados con 1 µl de anticuerpo anti-HA (MMS-101R, Covance) por 1 h a 4ºC, luego de lo cual fueron incubados con 20 µl de *Gamma-Bind sepharose beads* (Santa Cruz Biotechnology) por 30 min a 4ºC. Finalmente, la mezcla fue centrifugada a 3.000 RPM por 30 seg a 4ºC y el sobrenadante descartado. Los lisados sin transfectar fueron sometidos al mismo procedimiento y utilizados como control negativo.

2. Ensayos de fosforilación *in vitro*

Luego de extenso lavado, los inmunoprecipitados fueron incubados con 10 mCi de [γ-^{32}P]ATP por 30 min a 25ºC en 30 ml de *buffer* de quinasa (HEPES pH 7,4 20 mM, cloruro de magnesio 10 mM, cloruro de manganeso 10 mM, DTT 1 mM, ATP 20 mM), utilizando 1–2 µg de proteínas de fusión GST-SR

(cuantificadas por comparación contra una curva de masa de BSA en gel SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*) o bien histona H2B (Santa Cruz Biotechnology) como sustrato. Las reacciones fueron terminadas por agregado de 5X *sample buffer* y luego fueron hervidas. La incorporación de fosfato fue analizada por electroforesis de las muestras en un SDS-PAGE 12% (p/v) y autoradiografía.

IX. Ensayos LUC, β-galactosidasa y CAT

1. Obtención de extractos celulares

Las monocapas fueron lavadas una vez con PBS 1X luego de lo cual, 200 µl de *buffer* de lisis (Reporter Lysis *buffer*, Promega) fueron agregados a cada pocillo. Con la ayuda de un *rubber policeman*, los lisados fueron trasvasados a tubos eppendorf. Estos permanecieron a -80ºC hasta la determinación de las distintas actividades. Previo a la misma, fueron centrifugados a 10.000 x g por 5 min y los sobrenadantes fueron utilizados para la medición de dicha actividad.

2. Detección de la actividad LUC

Para determinar la actividad LUC fue utilizado un kit de la empresa Promega. Brevemente, 30 µl de extracto fueron mezclados con 100 µl de *buffer* de ensayo (Luciferase assay *buffer* II) en tubos de luminómetro evitando la luz directa e inmediatamente la actividad LUC fue cuantificada en un luminómetro Junior (EG&G Berthold, Bad Wilbad, Alemania) como emisión de luz durante 30 seg.

3. Detección de la actividad β-galactosidasa

Un volumen de *buffer* β-gal 2X (Fosfato de sodio 0,2 M pH 7,4, cloruro de magnesio 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 M y Orto-nitro-fenil-galactopiranósido (ONPG) 1,33 mg/ml) y un volumen del sobrenadante de cada extracto centrifugado (obteniendo un volumen final de 100 µl por pocillo) fueron colocados, por pocillo, en placas de 96 pocillos e incubados a temperatura ambiente hasta desarrollo de color amarillo. La reacción fue

detenida con 100 µl de carbonato de sodio 1 M por pocillo. Finalmente, la absorbancia a 415 nm fue medida en un espectrofotómetro DU Serie 500 (Beckman).

4. Detección de la actividad CAT

Para evaluar la actividad CAT, 40 µl del sobrenadante obtenido a partir de los lisados celulares fueron calentados a 60°C por 10 min y mezclados en un volumen final de 100 µl conteniendo Tris-HCl pH 7,8 120 mM, 0,1 µCi de ^{14}C-cloranfenicol y 25 µg de n-butiril CoA (Sigma), a 37°C por 2 h. El producto, cloranfenicol n-butirilado, fue extraído por agregado de 200 µl de una mezcla 2:1 de tetrametilfenilenediamina [TMPD] – xileno, mezclado por vórtex por 30 seg, centrifugado por 2 min a máxima velocidad y, finalmente, 70 µl de la fase superior fueron cuantificados con tolueno mediante un contador de centelleo.

RESULTADOS

I. Regulación del *splicing* alternativo de FN en respuesta a FC

1. Análisis de la regulación de las regiones alternativas del mRNA de FN

Nuestros trabajos previos indican que un importante número de FC (EGF, bFGF, HGF/SF, aFGF y KGF), al igual que el MCmes, son capaces de estimular la inclusión del exón alternativo EDI, pero no de EDII en el mRNA maduro de FN. Para obtener el panorama completo de la regulación de las isoformas alternativas de FN, realizamos un análisis de la región alternativa IIICS. Luego de exponer a las células a diferentes estímulos por 48 h, éstas fueron colectadas y su RNA fue extraído para comparar las diferentes isoformas de *splicing* por RT-PCR radioactiva con *primers* que aparean en los exones flanqueantes a las zonas de interés (Fig. 16a). Notablemente, encontramos una fuerte correlación en la regulación del *splicing* alternativo de las regiones alternativas EDI y IIICS en respuesta a FC y a MCmes, a diferencia de lo observado para EDII (Fig. 16b-d y datos no mostrados). Las mismas señales que fomentaron la inclusión de EDI, estimularon la isoforma IIICS-120, que corresponde a la inclusión total de IIICS. Esta isoforma contiene un motivo LDV que es capaz de promover la adhesión celular por interacción con las integrinas α4β1 y α4β7 (Humphries *et al.*, 1986). Por lo tanto, y dado que EDI es un ligando para las integrinas α9β1 y α4β1, esta nueva FN sintetizada tendría un potencial incrementado para unirse a un grupo de integrinas asociadas con adhesión celular, proliferación, migración e inducción de metaloproteinasas de matriz (Huhtala *et al.*, 1995; Serini *et al.*, 1998; Manabe *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2002).

Esta correlación encontrada en la regulación del *splicing* alternativo de EDI y IIICS sugiere algún tipo de control en *cis* y/o en *trans* compartido por estas dos regiones de la FN. Por el contrario, el hecho de que el *splicing* alternativo de EDII no sea afectado por estos tratamientos confirma que el *splicing* alternativo de EDI y EDII es controlado por mecanismos moleculares diferentes (Lim y Sharp, 1998; Cramer *et al.*, 1999; Kadener *et al.*, 2001).

A partir de aquí, a menos que se indique lo contrario, se utilizó indistintamente HGF/SF, KGF/FGF-7 o MCmes bajo el rótulo de "FC" para estimular los cambios en las isoformas alternativas de FN.

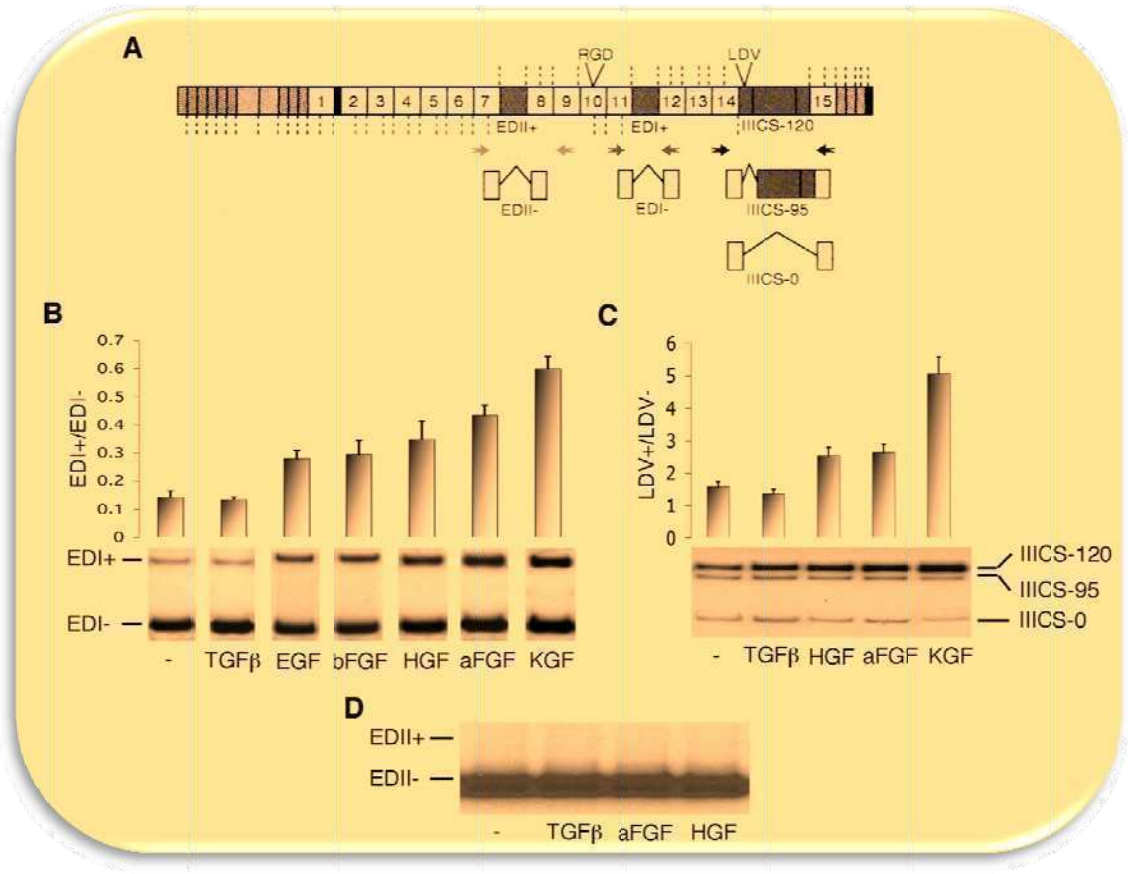

Figura 16: Regulación del patrón de isoformas murinas de FN por FC. (A) El esquema muestra las tres regiones de FN que presentan *splicing* alternativo. Arriba se muestra el mayor polipéptido de FN posible. Las flechas indican la ubicación de los *primers* utilizados para amplificar las diferentes isoformas. **(B-D)** Las células SCp2 fueron tratadas con FC (20 ng/ml finales) y 48 h después del tratamiento se extrajo el RNA y se lo sometió a RT-PCR para evaluar las isoformas de FN EDI+ y EDI- (cociente EDI+/EDI) **(B)**, las isoformas LDV+ (IIICS-120) y LDV- (IIICS-0 y IIICS-95; cociente LDV+/LDV-) **(C)**, y las isoformas EDII+ y EDII- (cociente EDII+/EDII-) **(D)**. Las variantes de *splicing* fueron analizadas como se indica en Materiales y Métodos. Los valores en los histogramas corresponden a la media ± el error estándar. Los experimentos fueron realizados en duplicado siempre y repetidos al menos dos veces. Resultados similares fueron obtenidos en células EpH4 y Hep3B.

2. Papel de la estabilidad del mRNA y de la síntesis de nuevas proteínas

Nos preguntamos entonces si los FC actúan favoreciendo, por *splicing* alternativo, la producción de una mayor proporción de mRNA conteniendo las regiones alternativas o bien, alternativamente, alterando la estabilidad relativa de las diferentes isoformas de *splicing* alternativo previamente sintetizadas. Por lo tanto, evaluamos el efecto de los FC en células pretratadas con el inhibidor de la transcripción Act D, una situación en la cual el único modo de alterar el patrón de isoformas es cambiando la estabilidad del mRNA previamente

sintetizado. El período de estimulación elegido fue suficientemente largo como para observar una regulación del *splicing* alternativo de EDI, sin comprometer la supervivencia celular por efecto de la Act D. Luego de un tratamiento de 16 h con FC, el cociente EDI+/EDI- aumentó más de un 60%, un efecto que fue completamente bloqueado por Act D (Fig. 17). Aunque este resultado es un argumento de peso en contra de la posibilidad de un cambio en la estabilidad del mRNA para explicar la regulación observada, no podemos descartar la posibilidad de que la Act D esté inhibiendo la síntesis *de novo* de una proteína necesaria para cambiar la estabilidad relativa de ambas isoformas. Sin embargo, observamos un aumento de más de cuatro veces en el cociente EDI+/EDI- cuando el tratamiento con FC se realizó en presencia del inhibidor de la traducción CHX, que si bien inhibe la síntesis de nuevas proteínas no inhibe la transcripción y el *splicing* de nuevos RNAs. Estos resultados no sólo descartan la última hipótesis sino que demuestran que la regulación del *splicing* alternativo de FN es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas y es potenciada por CHX. Más aún, la Act D bloqueó totalmente los efectos de los FC y CHX (Fig. 17). Notablemente, se obtuvieron resultados similares para los cocientes LDV+/LDV- de IIICS en estas condiciones, expandiendo la correlación entre la regulación de EDI y IIICS aún más (datos no mostrados).

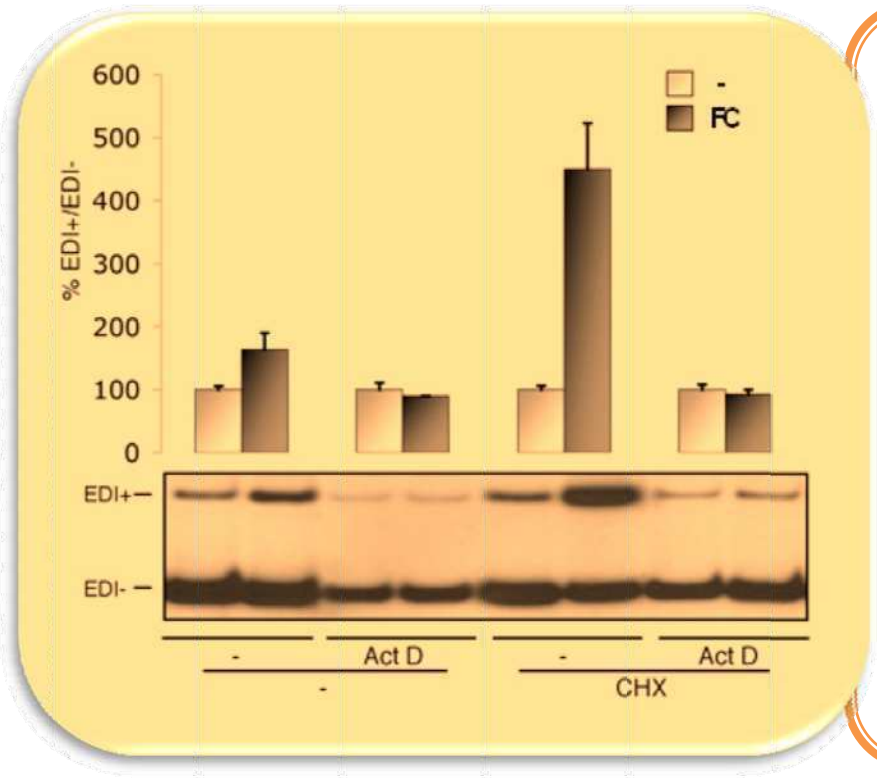

Figura 17: La regulación del patrón de isoformas alternativas de FN no depende de la estabilidad del mRNA ni requiere síntesis *de novo* de proteínas. Luego de un tratamiento de 2 h con Act D (5 μg/ml) o vehículo (etanol) más CHX (2,5 μg/ml) o vehículo (DMSO), las células SCp2 fueron dejadas sin tratamiento (barras claras) o tratadas con FC (barras oscuras). Las células fueron cosechadas 16 h después del tratamiento con FC. El RNA fue extraído y sometido a RT-PCR para evaluar las isoformas de FN EDI+ y EDI- como se describió arriba.

Estos resultados muestran que la regulación del *splicing* alternativo de FN por FC no requiere síntesis de nuevas proteínas ni involucra cambios en la estabilidad relativa de las diferentes isoformas de mRNA. Por lo tanto, esta regulación debe depender del cambio en la actividad de la maquinaria de *splicing* pre-existente y/o en la eficiencia relativa de la exportación del mRNA desde el núcleo hacia el citoplasma.

3. Exportación de los mRNAs de FN

Para evaluar si los FC pueden alterar la tasa de exportación de cada isoforma de mRNA, medimos los cocientes EDI+/EDI- en fracciones de RNA nucleares, citosólicas y totales. Para determinar la calidad del procedimiento de fraccionamiento, analizamos en cada fracción la abundancia de la proteína SR SF2/ASF, predominantemente nuclear, y de ERK2, una proteína predominantemente citoplasmática (Fig. 18). Los cocientes EDI+/EDI- (con o sin estimulación) fueron similares independientemente del compartimento analizado (Fig. 18). Resultados similares fueron obtenidos cuando se analizaron los cocientes correspondientes a minigenes transfectados. Estos datos argumentan contra la posibilidad de que los FC estén favoreciendo la exportación de una isoforma de mRNA determinada y por ende apoyan la hipótesis de una regulación relacionada directamente con el proceso de *splicing* alternativo.

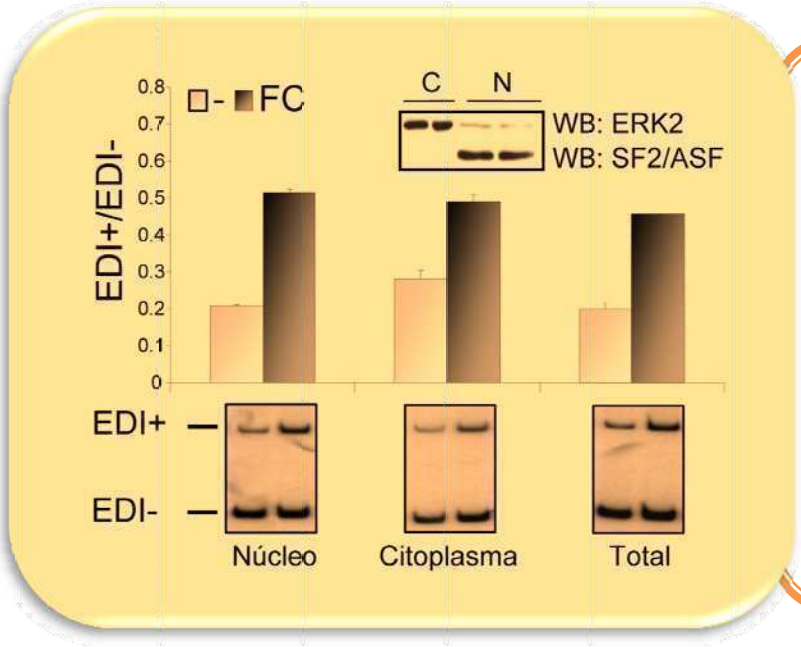

Figura 18: Los FC no alteran la exportación diferencial de las isoformas de FN. La figura muestra los cocientes EDI+/EDI– medidos en las fracciones nuclear, citoplasmática y total de células SCp2 luego de cada tratamiento. Como control se muestra un *western blot* de SF2/ASF (proteína predominantemente nuclear) y de ERK2 (proteína predominantemente citoplasmática) en cada compartimento.

II. Vía de transducción de señales

1. Fosforilación de los componentes de las cascadas de señalización

Algunos estudios han asociado la estimulación extracelular con la regulación del *splicing* alternativo. Sin embargo, las cascadas de señalización que llevan a estos efectos han sido poco exploradas (Stamm, 2002; Lynch, 2004; Shin y Manley, 2004).

Las vías que conectan los estímulos extracelulares con sus efectos celulares están agrupadas clásicamente en cascadas de quinasas activadas por agentes mitogénicos (vías de MAPK) o de estrés (vías de SAPK) (Davis, 1993). Nuestros experimentos preliminares utilizando ensayos reporteros de las distintas vías de señalización, basados en la actividad de LUC, mostraron una fuerte activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK1/2 y sólo una débil activación de las vías de p38 y JNK en nuestro sistema de estudio en respuesta a FC. Para confirmar y disectar estos resultados, realizamos ensayos de *western blot* para detectar las isoformas fosforiladas de ERK y JNK (pERK y pJNK). Observamos un incremento robusto en la señal de pERK y un aumento claro en pJNK luego de 30 min de tratamiento (Fig. 19). Estas fosforilaciones fueron sostenidas en el tiempo, con altos niveles de pJNK y pERK aún visibles luego de 2 y 5 h, respectivamente (datos no mostrados). En contraste, detectamos poca o ninguna fosforilación de p38 luego de 30 min de tratamiento con FC (datos no mostrados). Dado que PI(3)K también es una vía típicamente activada por FC (Potempa y Ridley, 1998), medimos los niveles de fosforilación de AKT/PKB (pAKT), una quinasa que se encuentra río abajo de PI(3)K. Los FC activaron esta cascada, como se concluye al observar los niveles incrementados de pAKT (Fig. 19).

En conclusión, encontramos que los FC activan las vías clásicas que llevan a la fosforilación de ERK y AKT, concomitantemente con la activación de la vía de estrés que involucra la fosforilación de JNK.

2. Bloqueo de las cascadas de señalización

Para determinar si alguna de estas vías en particular puede ser responsable de los efectos ejercidos por los FC en el *splicing* alternativo de la

FN, estudiamos primeramente la influencia de varios inhibidores farmacológicos de quinasas en la regulación del *splicing* alternativo de EDI.

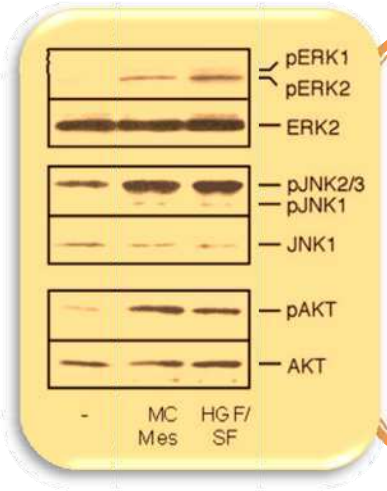

Figura 19: HGF/SF y el MCmes activan una variedad de vías de transducción de señales. Las células fueron lisadas 30 min después de la estimulación por MCmes y HGF/SF y la fosforilación de ERK1/2 (pERK), JNK (pJNK) y AKT/PKB (pAKT) fue examinada por *western blot* con anticuerpos específicos. Las membranas fueron luego reexaminadas con anticuerpos contra ERK2, JNK1 y AKT/PKB (AKT).

El bloqueo de la actividad de MEK con PD causó una disminución del 25% en el cociente EDI+/EDI- en células sin tratar. Sin embargo, los FC aumentaron este cociente en proporciones similares a aquellas observadas en ausencia del inhibidor (Fig. 20a,b). Resultados similares se obtuvieron con otro inhibidor de MEK, U0126 (resultados no mostrados). Para confirmar la funcionalidad del inhibidor PD, las células fueron co-transfectadas con un vector que codifica para la enzima LUC y que lleva un promotor mínimo conteniendo secuencias de unión de GAL4 (pG5-Luc) y otro vector que expresa una proteína de fusión GAL4-ELK1, capaz de activar la transcripción cuando ELK-1 se encuentra fosforilado. La fosforilación del factor de transcripción ELK-1 está asociada a la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK1/2. En estos ensayos se observa que PD es funcional dado que es capaz de inhibir la activación por FC del reportero GAL-ELK1 (Fig. 20c). Por ende concluimos que la actividad de MEK no es necesaria, en este contexto celular, para los efectos de los FC en la regulación del *splicing* de EDI. Por otro lado, el bloqueo de la actividad de PI(3)K con el inhibidor LY anuló por completo los efectos inducidos por HGF/SF (Fig. 20a) y parcialmente los efectos del MCmes (Fig. 20b) en la regulación del *splicing* de EDI. En este último caso, esta inhibición fue potenciada por PD (Fig. 20b), sugiriendo un papel menor pero significativo para MEK en un contexto deficiente en actividad de PI(3)K. Esto podría estar asociado a la liberación, en presencia de LY, del control negativo que ejerce AKT/PKB sobre Raf (ver Fig. 8). Como era de esperar, LY bloqueó la fosforilación de AKT/PKB inducida por FC (Fig. 20d) mientras que la

activación del reportero GAL-ELK1 permaneció invariable (Fig. 20c). El bloqueo de la actividad de p38 o de JNK con los inhibidores SB 202190 o SP 600125, respectivamente, no inhibió la regulación estudiada (datos no mostrados). En concordancia con la correlación encontrada entre la regulación del *splicing* de EDI y la de IIICS, hallamos que LY es capaz de inhibir hasta un 50% de la regulación ejercida por HGF/SF, mientras que ni PD –pese a disminuir los cocientes basales de inclusión de la isoforma que contiene el motivo LDV- ni los inhibidores de JNK o de p38 son capaces de bloquear este efecto (Fig. 20e y datos no mostrados).

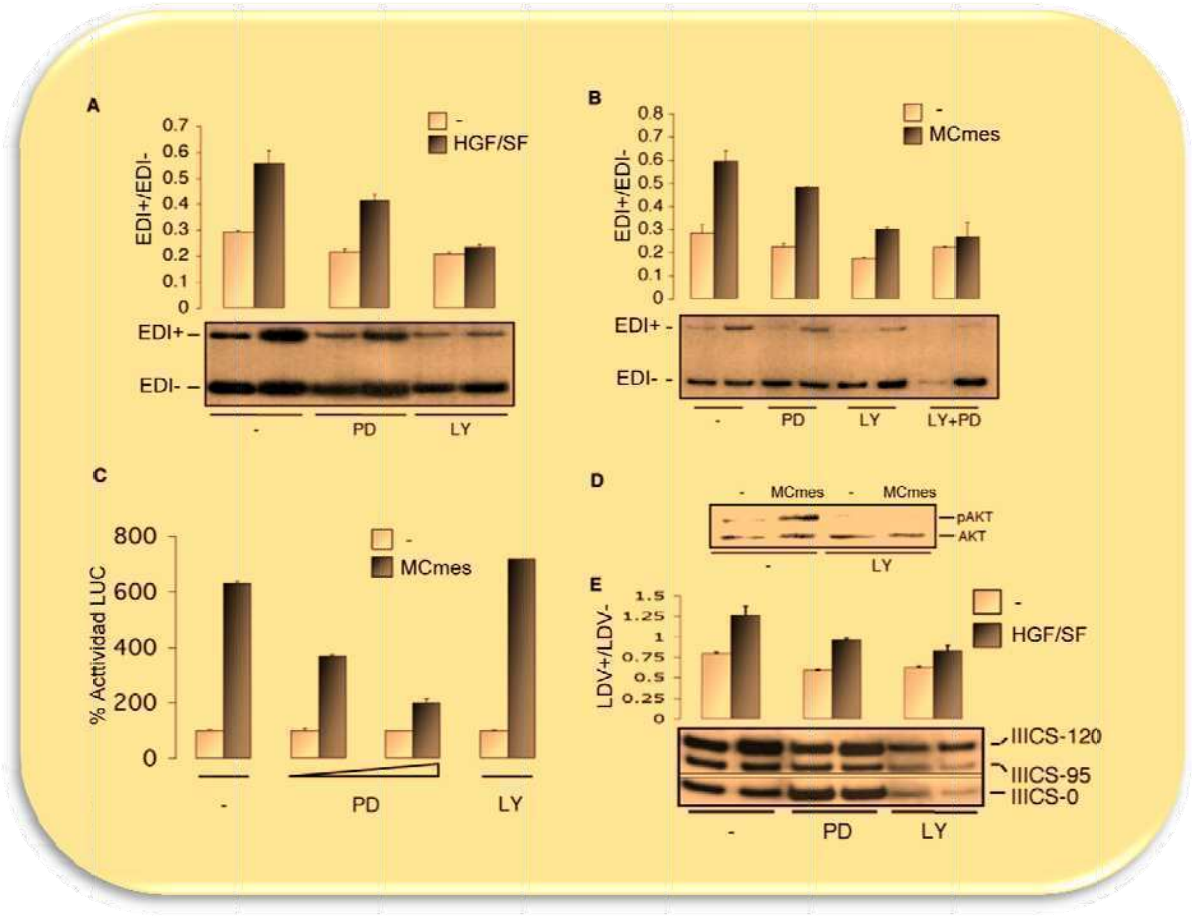

Figura 20: La estimulación de la inclusión de los exones EDI y IIICS-120 es regulada por PI(3)K. (A) Inhibición de los efectos de HGF/SF sobre el *splicing* alternativo de EDI. Las células SCp2 fueron pre-tratadas con el inhibidor de MEK1, PD (50 μM); con el inhibidor de PI(3)K, LY (25 μM) o con vehículo, DMSO (-) por 3 h y luego tratadas con el estímulo indicado en presencia de los inhibidores por 24 h. **(B)** Idem A pero utilizando MCmes. **(C)** Para evaluar la funcionalidad de PD y la especificidad de LY, la activación de la vía de ERK-MAPK en células SCp2 estimuladas con MCmes fue examinada con el ensayo basado en la actividad de LUC de GAL-ELK1 luego de 4 h de tratamiento (PD 5 y 20 μM respectivamente; LY 25 μM). **(D)** *Western blot* utilizando anticuerpos contra pAKT (y AKT total como control de carga) para revelar extractos de células estímuladas con MCmes o sin tratar, en presencia o ausencia de LY, para evaluar su funcionalidad. **(E)** Idem A para el análisis de la región IIICS de FN.

Estos resultados arguyen en favor de una participación dominante de la vía de supervivencia de PI(3)K en convertir estímulos extracelulares en cambios en los patrones de *splicing* de FN.

3. Sobre-expresión de moléculas de las cascadas de señalización

El haber encontrado en el transcurso de mi tesis de licenciatura que los transcriptos primarios derivados de un minigen reportero de *splicing* alternativo del exón EDI de FN son regulables por FC de modo análogo a sus correlatos endógenos, nos permitió realizar estudios de co-transfección de estos minigenes con plásmidos capaces de permitir la sobre-expresión de distintos componentes de las vías de señalización de interés. Dado que la probabilidad de que ambos plásmidos ingresen a las mismas células es muy alta, esta estrategia permite compensar la limitación que ocasiona una baja eficiencia de transfección en el análisis de los mRNAs endógenos. Así, la medición de los patrones de *splicing* de estos mRNAs derivados de los minigenes resulta un buen indicador de lo que está ocurriendo en las células donde se sobre-expresaron componentes de las cascadas de señalización de interés.

Ras es una proteína pequeña con capacidad de GTPasa estimulada por FC y constitutivamente activa en condiciones patológicas como en tumores humanos (Bos, 1989). Cuando se activa, Ras a su vez estimula las vías de Raf-MEK-ERK1/2 y de PI(3)K (Potempa y Ridley, 1998). Considerando que altos niveles de inclusión de EDI están asociados con la proliferación y con condiciones patológicas y sumando nuestros resultados mostrando que los FC producen la forsforilación de ERK1/2 y de AKT/PKB y que estas vías están involucradas en la regulación del *splicing* de EDI en nuestro sistema de estudio, razonamos que una forma activa de Ras, Ras(V12), debería estimular la inclusión de EDI en el mRNA maduro. De manera consistente, la sobre-expresión de Ras(V12) no sólo activó el reportero co-transfectado GAL-ELK1 sino que incrementó el cociente EDI+/EDI- de transcriptos derivados de los minigenes reporteros de *splicing* (Fig. 21a). El agregado de LY o de LY en combinación con PD bloquearon, como se esperaba, parte de estos efectos (Fig. 21b). Estos experimentos demuestran que la actividad de Ras es capaz de estimular la inclusión de EDI en el mRNA y confirman la preponderancia de la vía de PI(3)K en esta estimulación.

Luego extendimos estos resultados mostrando que un doble mutante de Ras, Ras(V12-C40), constitutivamente activo pero que a diferencia de Ras(V12)

estimula predominantemente la vía de PI(3)K (Oliva *et al.*, 2004) es también capaz de incrementar el cociente EDI+/EDI- en transcriptos derivados del minigen reportero de *splicing* (Fig. 22a, panel superior). La selectividad del doble mutante de Ras, respecto de las vías que activa río abajo, fue confirmada por ensayos de *western blot* para pERK y pAKT, mostrando un aumento de los niveles de pAKT pero no de los de pERK (Fig. 22a, panel inferior).

Estos resultados prueban que la vía de PI(3)K no sólo es necesaria sino también suficiente para alterar la regulación del *splicing* de EDI.

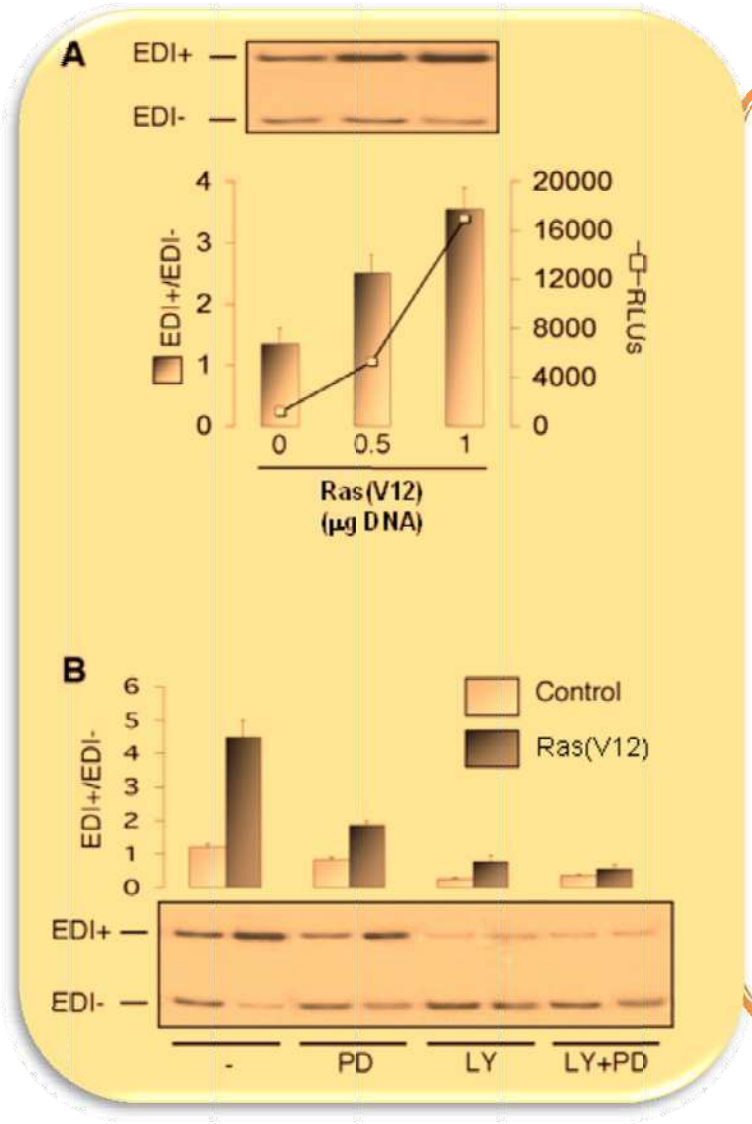

Figura 21: Una forma constitutivamente activa de Ras induce la inclusión del exón EDI. **(A)** La co-transfección de una construcción que codifica para Ras(V12) estimula la inclusión de EDI de manera dosis-dependiente (0, 0,5 y1 µg) en transcriptos generados a partir de un minigen de EDI. El RNA fue extraído 48 h pos-transfección. Las barras representan el cociente EDI+/EDI- y la línea representa las unidades de LUC relativas (RLUs) provenientes del reportero GAL-ELK1. **(B)** Inhibición de los efectos de Ras(V12). 24 h pos-transfección (1 µg de Ras(V12) o de vector vacío), las células fueron tratadas con PD (50 µM), LY (25 µM) o una combinación de ambos. Luego de 24 h, se extrajo el RNA y se realizó la RT-PCR.

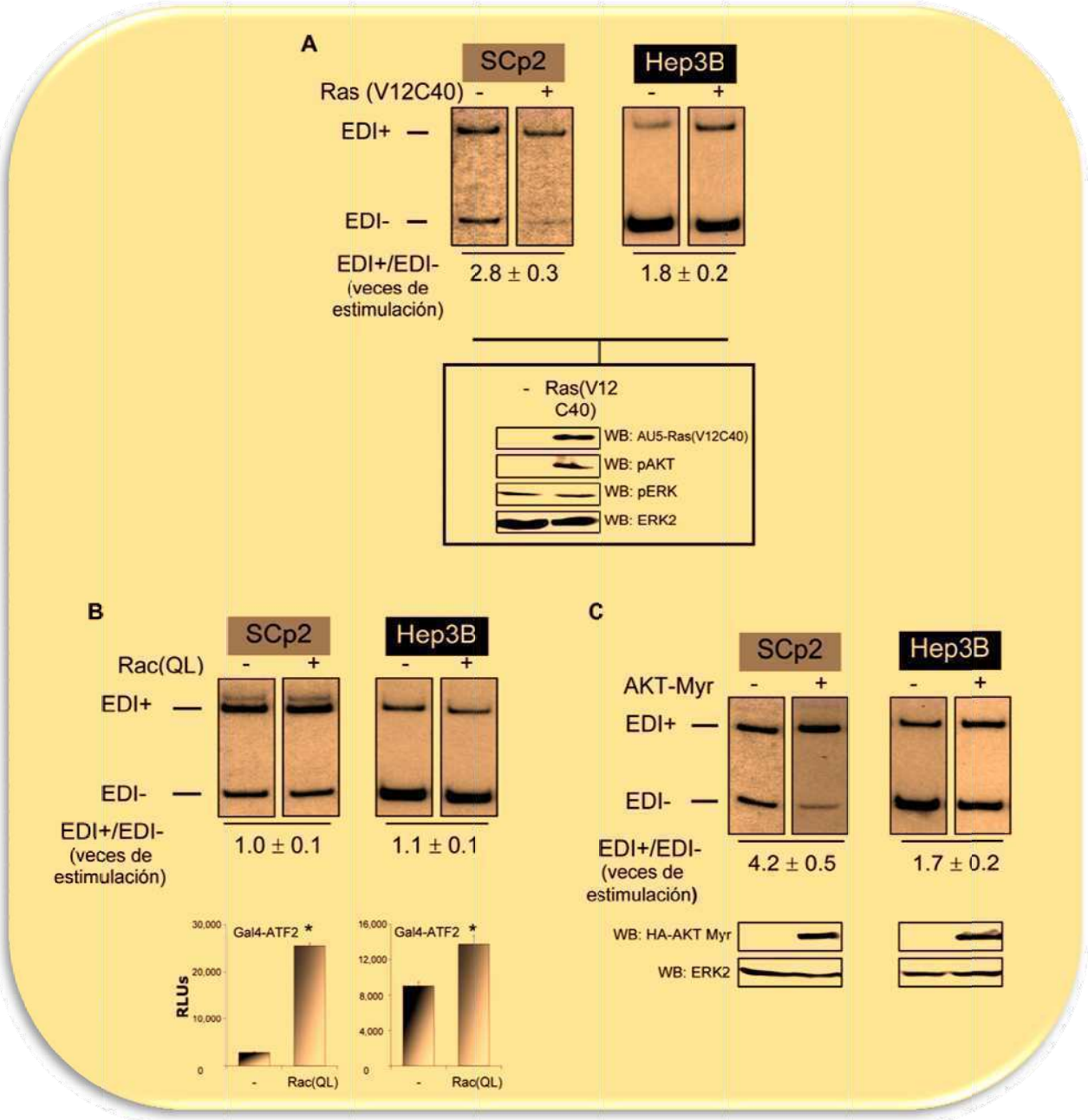

Figura 22: La activación de la vía de PI(3)K y de su blanco río abajo, AKT/PKB, es suficiente para alterar el *splicing* alternativo de EDI. (A) Las células SCp2 y Hep3B fueron co-transfectadas con el minigen de EDI y 1 μg de pCEFL-KZ-AU5-Ras(V12C40) o su vector vacío (-). Se muestra el análisis de RT-PCR de las isoformas EDI+ y EDI- derivadas del minigen. La expresión de Ras(V12C40) y la activación de la vía de PI3(K) fueron corroboradas por *western blot* (WB) contra AU5, pAKT y pERK. Un *western blot* contra ERK2 es mostrado como control de carga. **(B)** Las células SCp2 y Hep3B fueron co-transfectadas con el minigen de EDI y 1 μg de pCDNA3-Rac(QL) o vector vacío (-). Los cocientes EDI+/EDI- fueron calculados como en A. La sobre-expresión funcional de Rac fue confirmada midiendo la actividad LUC en lisados de células co-transfectadas con pG5-Luc, pGBDXGal4-Atf2 y pCDNA3-Rac(QL) o bien vector vacío (-). (*) indica $p<0.05$ (Test de Student). **(C)** Las células SCp2 y Hep3B fueron co-transfectadas con el minigen de EDI y 500 ng de pCMV6-HA-AKT Myr o vector vacío (-).Los cocientes EDI+/EDI- fueron calculados como en A. La sobre-expresión de AKT Myr fue confirmada por análisis de *western blot* con un anticuerpo contra HA.

PI(3)K puede ejercer sus efectos mediante la activación de la proteína pequeña GTPasa Rac, de AKT/PKB o de ambas (Zhao *et al.*, 2003). Para evaluar si Rac o AKT/PKB actúan como blancos río abajo de PI(3)K en este fenómeno regulatorio, sobre-expresamos mutantes constitutivamente activos de ambas proteínas por separado.

La sobre-expresión de Rac(QL), capaz de inducir fuertemente la transcripción de LUC a partir de un reportero GAL4-ATF2 inducible por la vía de Rac, no logró inducir ningún efecto en el *splicing* alternativo de EDI (Fig. 22b). Por el contrario, la sobre-expresión de una forma activa de AKT/PKB (AKT Myr) aumentó los niveles de EDI+/EDI- en transcriptos derivados del minigen de EDI (Fig. 22c).

Estos resultados, en conjunto con aquellos que mostraban la fosforilación de AKT/PKB en respuesta a la estimulación con FC (Fig. 19), sugieren fuertemente que PI(3)K está actuando vía AKT/PKB para estimular la inclusión de EDI en el mRNA de FN.

III. Papel de las proteínas SR

1. *Knock-down* de proteínas SR

La inclusión del exón alternativo EDI en el mRNA de FN es regulada por la unión de proteínas SR al elemento ESE polipurínico (Lavigueur *et al.*, 1993; Buratti *et al.*, 2004). La sobre-expresión de un número de proteínas SR promueve la inclusión de EDI en transcriptos derivados de un minigen transfectado. Entre ellas, SF2/ASF y 9G8 muestran los efectos estimulatorios más fuertes (Cramer *et al.*, 1999). El trabajo realizado durante mi tesis de licenciatura mostraba que el aumento de la inclusión de EDI en el mRNA de FN en respuesta a FC requiere de un elemento ESE intacto en EDI. Por lo antedicho, analizamos el papel de las proteínas SR en este fenómeno regulatorio utilizando siRNAs diseñados para hibridar con los mRNAs que codifican para proteínas SR humanas específicas. Analizamos el efecto mediado por FC en el *splicing* alternativo de transcriptos derivados del minigen de EDI en células donde se realizó un *knock-down* de SF2/ASF o de 9G8 por un mecanismo de RNAi. El análisis por *western blot* con anticuerpos contra SF2/ASF y 9G8 reveló que cada siRNA específico disminuye los niveles endógenos de la proteína correspondiente en más de un 50% sin afectar el de la otra (Fig. 23a,b). Como

la transfección del siRNA no es 100% eficiente y esto puede llevar a una subestimación de la efectividad del *knock-down* en cada célula, también analizamos por *western blot* la expresión de T7-SF2/ASF o de T7-9G8 a partir de sus respectivos plásmidos, co-transfectados con los siRNAs. Esta estrategia reveló la abundancia de estas proteínas en células que efectivamente contenían el minigen de EDI transfectado en conjunto con el siRNA. Estos experimentos de co-transfección mostraron que la eficiencia de *knock-down* es de casi el 100% (datos no mostrados). Notablemente, un siRNA contra SF2/ASF inhibió la inclusión de EDI en el mRNA, tanto a nivel basal (Fig. 23a, calles 1 y 3) como a nivel de la estimulación por FC (comparar las calles 1 y 2 con las 3 y 4), mientras que un siRNA contra 9G8 inhibió específicamente la regulación por FC sin afectar los niveles basales (comparar calles 1 y 2 con 5 y 6). En contraste, un siRNA contra la proteína SC35 no tuvo efecto en la regulación del *splicing* de EDI por FC (datos no mostrados). Estos datos sugieren que 9G8 tiene como función transducir la información desde el medio extracelular, mientras que SF2/ASF participa no sólo en esta regulación sino también en mantener los niveles basales de inclusión de EDI. Más aún, el efecto de AKT Myr fue bloqueado de manera similar por siRNAs contra 9G8 y por SF2/ASF (Fig. 23b).

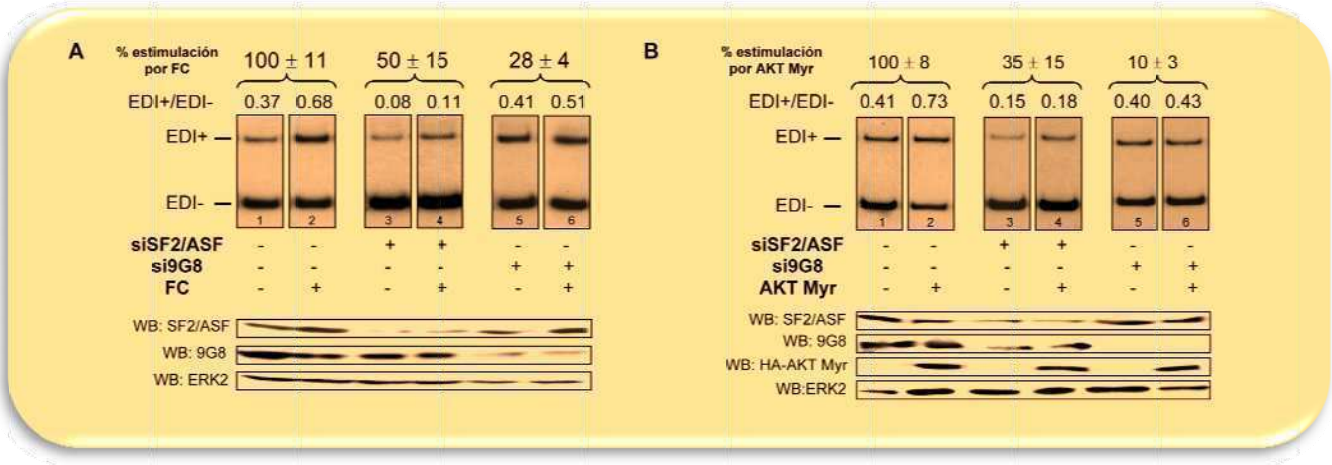

Figura 23: SF2/ASF y 9G8 están implicados en la regulación del *splicing* de EDI mediada por FC y AKT/PKB. (A) Las células Hep3B fueron co-transfectadas con el minigen de EDI y los siRNAs indicados. 24 h después de la transfección, las células fueron tratadas con FC. Se muestra el análisis de RT-PCR, los cocientes EDI+/EDI- de un experimento representativo y el porcentaje de estimulación de los mismos por FC (promedio entre diferentes experimentos, el 100% corresponde al aumento del cociente EDI+/EDI- provocado por FC en ausencia de un siRNA específico). El *knock-down* de SF2/ASF y 9G8 endógenas fue confirmado por *western blot*. **(B)** Las células Hep3B fueron co-transfectadas con el minigen de EDI, con 500 ng de pCMV6-HA-AKT Myr o vector vacío (-), y con los siRNAs indicados. Los cocientes EDI+/EDI- fueron analizados por RT-PCR. El *knock-down* de SF2/ASF y 9G8 endógenas, así como la sobre-expresión de HA-AKT Myr fue confirmada por *western blot*.

2. El ESE de 9G8 como elemento de respuesta a FC

Para continuar con la exploración del papel de las proteínas SR como mediadores de la regulación del *splicing* de EDI en respuesta a FC, creamos un minigen artificial insertando un sitio de pegado para 9G8 en el exón alternativo EDII (pEDB-9G8, Fig. 24a) que, en su versión *wild type* y como se describiera anteriormente, no es regulado por FC. Nuestra hipótesis fue que si 9G8 está realmente transduciendo información desde el medio extracelular, la inserción de un ESE para 9G8 dentro de EDII debería ser suficiente para volver al *splicing* de este exón, regulable por FC. Efectivamente, encontramos que el reclutamiento de 9G8 le confiere a EDII la capacidad de ser regulado por FC (Fig. 24b). Como control, evaluamos la sensibilidad de los diferentes minigenes de EDII utilizados a la sobre-expresión de 9G8. Como era previsto, el minigen pEDB-9G8 mostró la mayor respuesta (Fig. 24c). Obtuvimos resultados similares al reemplazar el ESE de EDI, que lleva un motivo que prácticamente coincide con la secuencia consenso para SF2/ASF, 9G8 y Tra2β (Cramer *et al.*, 1999), por un ESE específico para 9G8 (datos no mostrados). Estos resultados apoyan fuertemente la participación de proteínas SR, y en particular de 9G8, en la vía regulatoria estudiada.

3. Fosforilación de las proteínas SR

Las proteínas SR son extensamente fosforiladas en su dominio RS y su estado de fosforilación puede influir en su especificidad de unión al RNA, en su actividad en el proceso de *splicing* y en su localización subcelular (Graveley, 2000). Nuestros resultados previos muestran que los efectos de los FC pueden observarse a las pocas horas de estimulación y que son independientes de la síntesis de nuevas proteínas (Fig. 17 y datos no mostrados). Esto es consistente con un posible cambio en los niveles de fosforilación de las proteínas SR. En efecto, el análisis por *western blot* de geles bidimensionales mostró que la distribución de isoformas proteicas de SF2/ASF, que se observa como una mancha dispersa en zonas de alto punto isoeléctrico en células control, se vuelve una mancha compacta con un punto isoeléctrico más bajo en respuesta a FC, mientras que la distribución del patrón de isoformas de ERK2, utilizado como control dado que su fosforilación sólo es regulada a tiempos cortos por FC (datos no mostrados), no cambia (Fig. 25a). Debido a la presencia de varias serinas, las proteínas SR son proteínas básicas y por ende poseen un alto punto

isoeléctrico. Como la fosforilación puede reducir drásticamente el punto isoeléctrico de las proteínas SR, estos resultados sugieren fuertemente que la vía de transducción de señales gatillada por la unión de los FC a su receptor de membrana conlleva un cambio en el patrón de fosforilación de SF2/ASF.

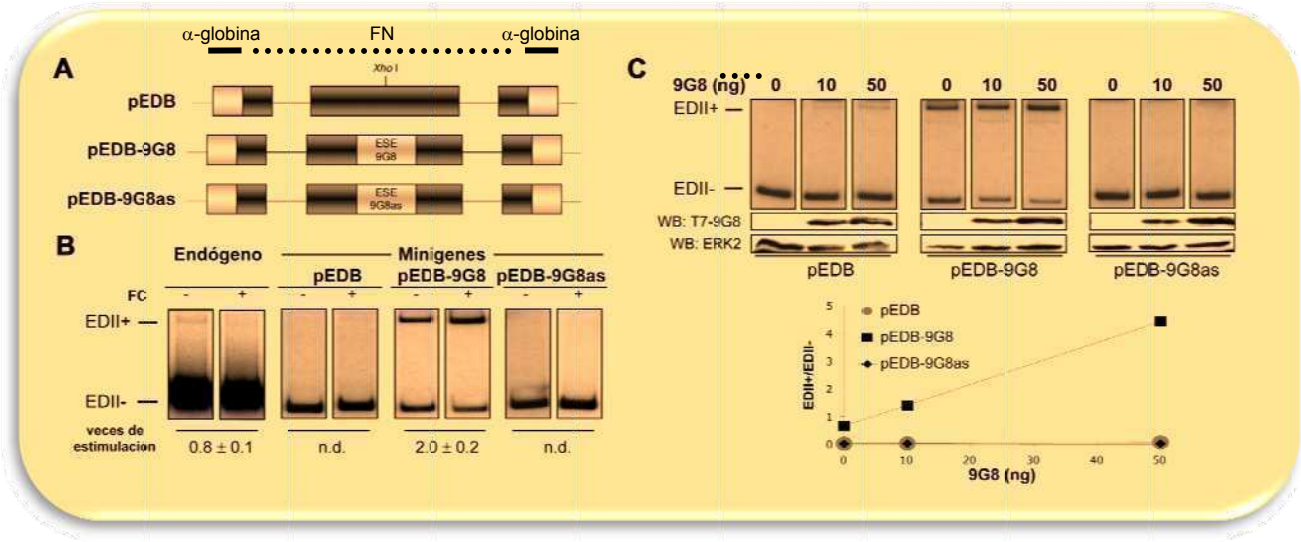

Figura 24: El *splicing* alternativo de los transcriptos provenientes de una construcción de EDII conteniendo un ESE para 9G8 es regulable por FC. (A) Esquema de los minigenes de FN EDII creados. Un ESE para 9G8 fue insertado en la orientación correcta (pEDB-9G8) o antisentido (pEDB-9G8as) dentro del exón de EDII (rectángulo central oscuro). **(B)** Las células SCp2 fueron transfectadas con diferentes minigenes de EDII y tratadas con FC. Los cocientes EDII+/EDII-, tanto correspondientes a los mRNA derivados de los minigenes como del gen endógeno, fueron analizados por RT-PCR. **(C)** Comparación de la sensibilidad (evaluada como cambio en el cociente EDII+/EDII-) de los distintos minigenes a la sobre-expresión de 9G8 en células SCp2. La sobre-expresión de T7-9G8 fue confirmada por *western blot* contra T7.

4. Quinasas de proteínas SR

Dado que las familias de proteínas quinasas SRPK y Clk han sido caracterizadas como modificadoras de los niveles de fosforilación de las proteínas SR, especulamos que el tratamiento con FC podría estar aumentando su actividad. Sin embargo, la sobre-expresión de Clk1, Clk2 y Clk3 inhibió la inclusión de EDI en el mRNA de FN (Fig. 25b), en contraste con los efectos gatillados por los FC o por la sobre-expresión de AKT Myr. De modo similar, aumentar los niveles de SRPK1 o SRPK2 disminuyó el cociente EDI+/EDI- (Fig. 25c).

Se ha reportado que la sobreexpresión de Clk o de SRPK es suficiente para cambiar la localización de las proteínas SR desde los *speckles* nucleares hacia una localización difusa (comparar Fig. 26a,b).

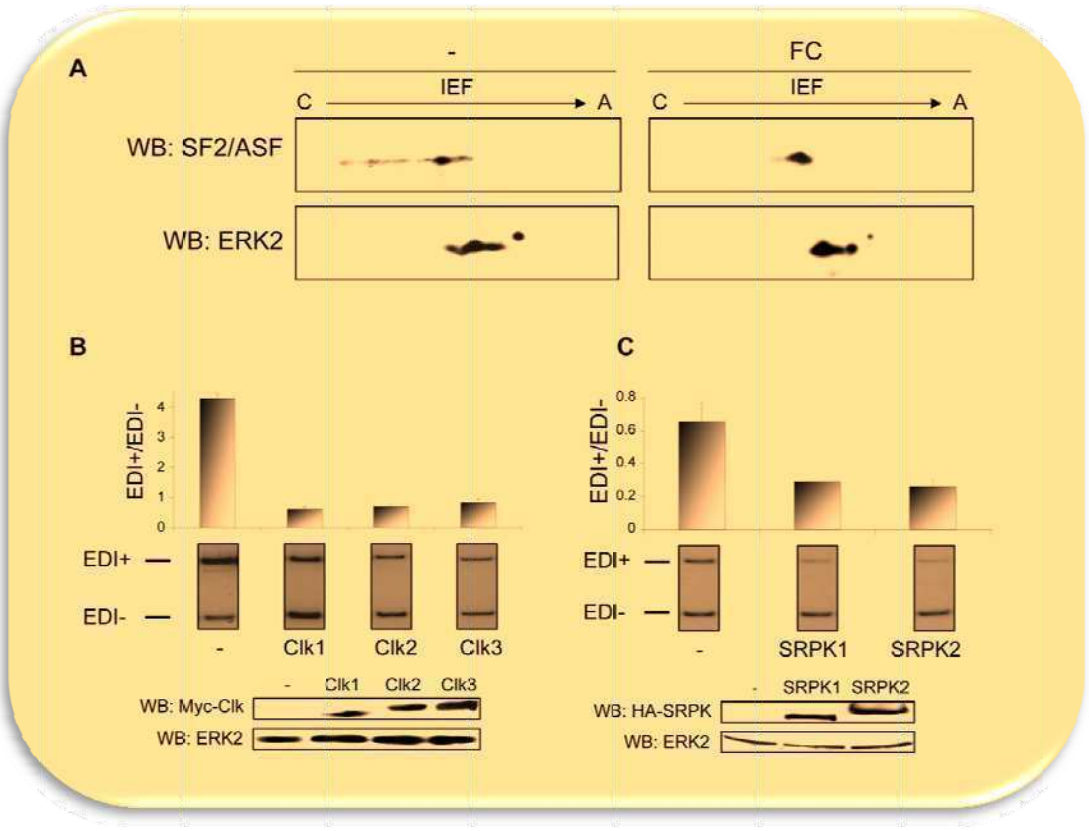

Figura 25: La sobre-expresión de quinasas de proteínas SR provoca efectos en el *splicing* que son opuestos a los producidos por los FC y por la sobre-expresión de AKT Myr. (A) Las células SCp2 fueron tratadas con FC o permanecieron sin estimular. 100 μg de proteína total fueron sembrados en el cátodo (C) y separados por migración hacia el ánodo (A). Luego del isoelectroenfoque (IEF), las proteínas fueron separadas en un SDS-PAGE en la segunda dimensión. SF2/ASF y ERK2 endógenos fueron visualizados por *western blot*. **(B)** Las células SCp2 fueron co-transfectadas con el minigen de EDI y con 1 μg de pECE-Myc-Clk1, 2 o 3. Los cocientes EDI+/EDI- fueron analizados por RT-PCR. **(C)** Idem B, pero sobre-expresando SRPK1 o 2. La sobre-expresión de Clk y de SRPK fue confirmada por *western blot* contra Myc o HA, respectivamente.

La alteración de la localización nuclear de las proteínas SR e incluso su remoción del núcleo en respuesta a la sobre-expresión de estas dos familias de quinasas (Colwill *et al.*, 1996; Cáceres *et al.*, 1998; Kuroyanagi *et al.*, 1998) podría ser la causa de la inhibición de la inclusión de EDI en el mRNA de FN observada en esas mismas condiciones. Por el contrario, ni la sobre-expresión de AKT Myr (Fig. 26c) ni el tratamiento con FC (datos no mostrados) desorganizaron los *speckles* nucleares ni indujeron una localización citoplásmica de SF2/ASF, lo cual correlaciona con un aumento del cociente EDI+/EDI-.

Estos resultados sugieren que los cambios en el *splicing* alternativo que disparan los FC y AKT/PKB no son debidos a incrementos en la actividad de Clk, SRPK o ambas.

5. AKT/PKB es una quinasa de proteínas SR

Los dominios RS de SF2/ASF y de 9G8 contienen varios motivos putativos para la fosforilación por AKT/PKB (RXRXXS/T, Fig. 27a). Por lo tanto, es concebible que la misma AKT/PKB sea responsable de fosforilar a las proteínas SR. Para evaluar esta hipótesis, analizamos si AKT/PKB es capaz de forsforilar a las proteínas SR, en particular a aquellas que están involucradas en la regulación del *splicing* alternativo descripta en este trabajo. Mediante ensayos de quinasa *in vitro*, encontramos que AKT/PKB es capaz de fosforilar a SF2/ASF y a 9G8, y que esta fosforilación es sustancialmente reducida por la sustracción del dominio RS de dichas proteínas (Fig. 27b).

En contraste, una mutante inactiva de AKT/PKB, AKT KM, es incapaz de fosforilar a SF2/ASF (Fig. 27b), confirmando que la actividad de AKT/PKB es requerida para la fosforilación de las proteínas SR *in vitro*. Estos resultados demuestran por un lado que AKT/PKB puede, de hecho, funcionar como una quinasa de proteínas SR y por el otro que su sobre-expresión ejerce, al menos sobre el *splicing* alternativo de FN, efectos opuestos a los de las familias de quinasas previamente descriptas SRPK y Clk.

IV. Regulación de la traducción

1. Regulación de la traducción por FC en forma dependiente de proteínas SR

Trabajos recientes demostraron que las proteínas SR no sólo funcionan como reguladores del *splicing*, sino que también toman parte en otros aspectos del metabolismo del mRNA, como su exportación, estabilidad y traducción como se discute en un *review* reciente (Huang y Steitz, 2005).

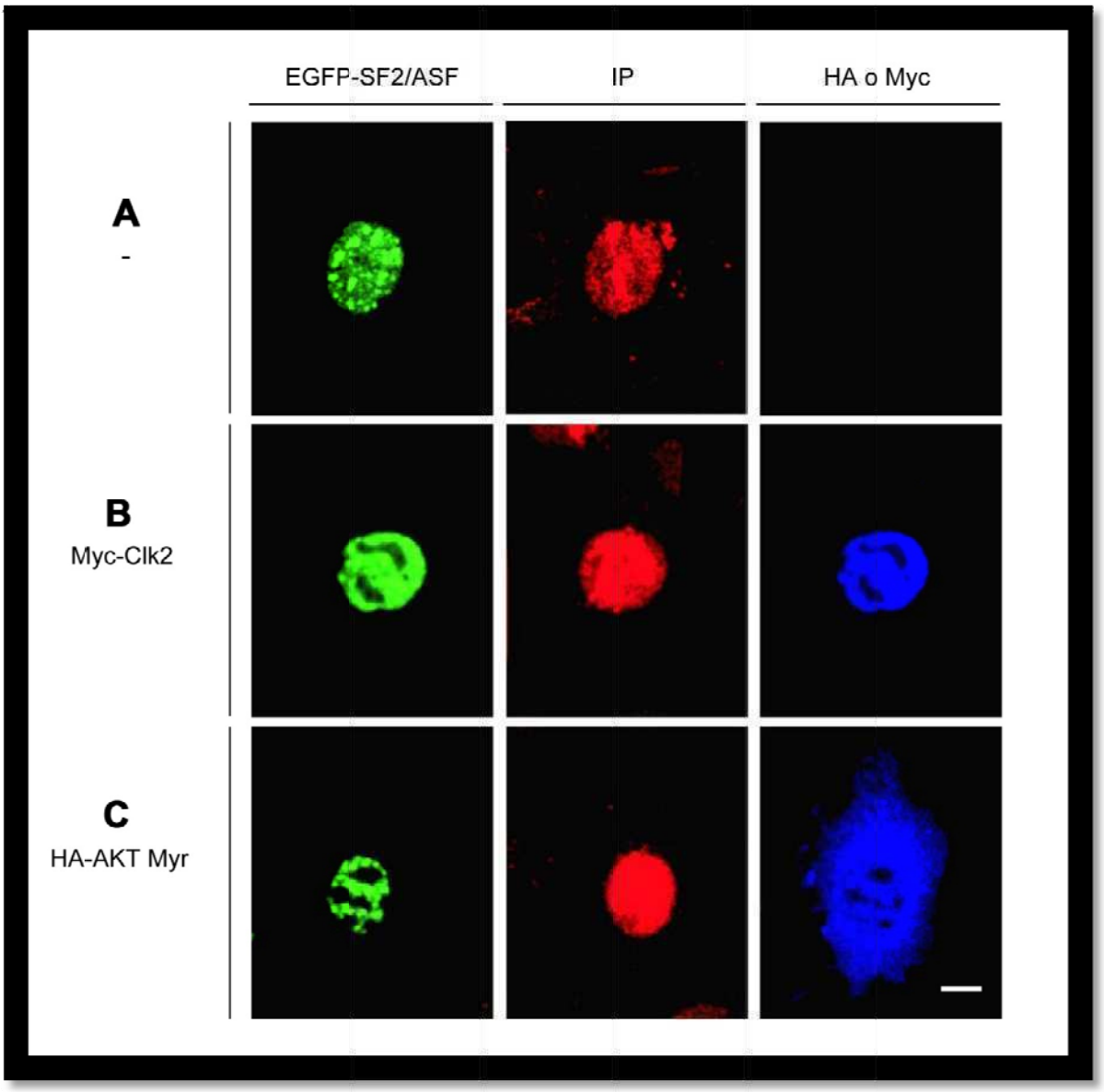

Figura 26: AKT/PKB, a diferencia de Clk2, no desorganiza los *speckles*. (A-C) Las células SCp2 fueron transfectadas con vector vacío **(A)**, pECE-Myc-Clk2 **(B)** o pCMV6-HA-AKT Myr **(C)**. En cada caso, las células fueron co-transfectadas con pEGFP-SF2/ASF. La inmunofluorescencia contra Myc o HA reveló la expresión de Clk2 o AKT Myr respectivamente. EGFP-SF2/ASF se muestra en verde, el ioduro de propidio (IP), para revelar los núcleos celulares, en rojo y HA-AKT Myr o Myc-Clk 2, en azul. Barra: 5 μm.

Dado que no encontramos influencia de los FC ni en la exportación ni en la estabilidad diferenciales de las isoformas de mRNA de FN (Figs. 17-18) decidimos explorar una posible influencia de la vía FC-Ras-PI(3)K-AKT/PKB sobre la traducción, centrando nuestra atención en el papel de las proteínas SR. Para ello, utilizamos reporteros traduccionales que contienen la secuencia

codificante para LUC y el ESE de EDI (pLCS-EDA) o bien una versión mutante del mismo (pLCS-EDA^{mt}) que no es capaz de unir SF2/ASF (Fig. 28a). Previamente, fue descripto que la sobre-expresión de SF2/ASF aumenta la actividad LUC derivada del reportero pLCS-EDA (Sanford *et al.*, 2004). Más aún, nosotros encontramos que los FC estimulan preferencialmente la actividad LUC del reportero pLCS-EDA por sobre la del pLCS-EDA^{mt} (Fig. 28b). Esta estimulación no puede ser explicada por diferencias en los niveles de estado estacionario de sus correspondientes mRNAs, como se observa en el análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 28c). El papel de las proteínas SR en la traducción fue confirmado por la observación de que los siRNAs contra SF2/ASF y 9G8 bloquearon la estimulación de la traducción desencadenada por FC (Fig. 28d). Finalmente, analizamos si AKT/PKB puede modificar la traducción de un modo dependiente de la presencia de un ESE. En efecto, la sobre-expresión de AKT Myr aumentó predominantemente la traducción del reportero pLCS-EDA en comparación con aquella determinada a partir del reportero pLCS-EDA^{mt} (Fig. 28e).

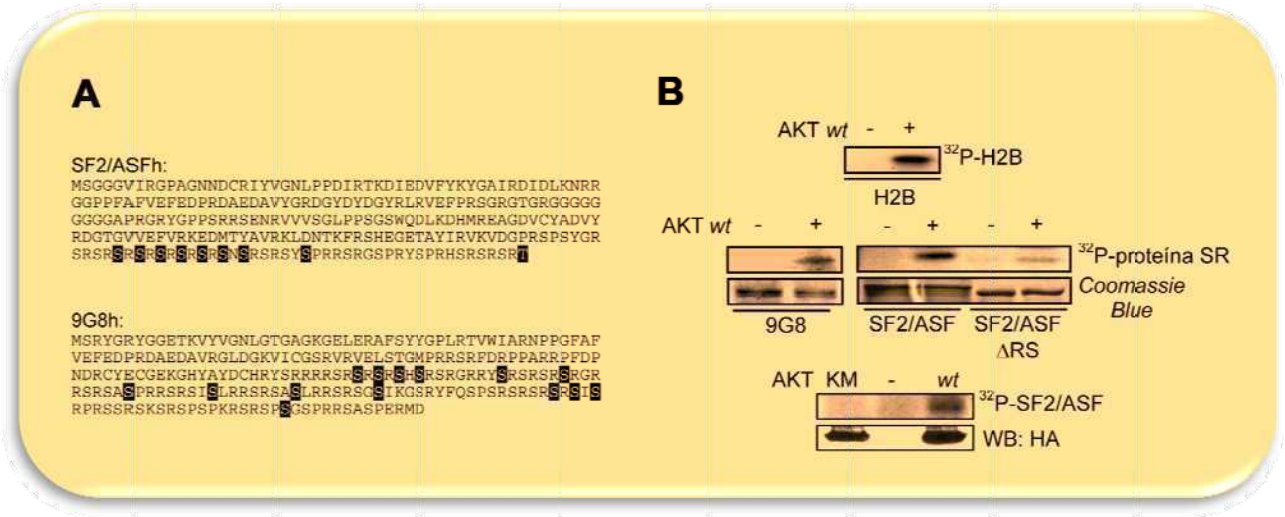

Figura 27: AKT/PKB puede funcionar como una quinasa de proteínas SR. (A) Secuencia aminoacídica de SF2/ASF y 9G8 humanas, destacando los sitios potenciales de fosforilación por AKT/PKB (en negro). **(B)** Iguales cantidades de histona H2B (control positivo) o de proteínas de fusión recombinantes GST-SR fueron utilizadas como sustrato en ensayos de quinasa de AKT/PKB. Se evaluó la actividad quinasa de AKT/PKB *wild type* (AKT *wt*) o del mutante inactivo AKT KM previamente inmunoprecipitados. Como control (-), el inmunoprecipitado de células sin transfectar fue incluido en lugar de la quinasa. Las autoradiografías muestran la señal radiactiva de H2B (^{32}P-H2B) y de las proteínas de fusión GST-SR (^{32}P-proteína SR). La tinción con *Coomassie Blue* muestra que fueron sembradas cantidades similares de cada proteína de fusión. La sobre-expresión de AKT (*wt* o KM) fue confirmada por *western blot* contra HA.

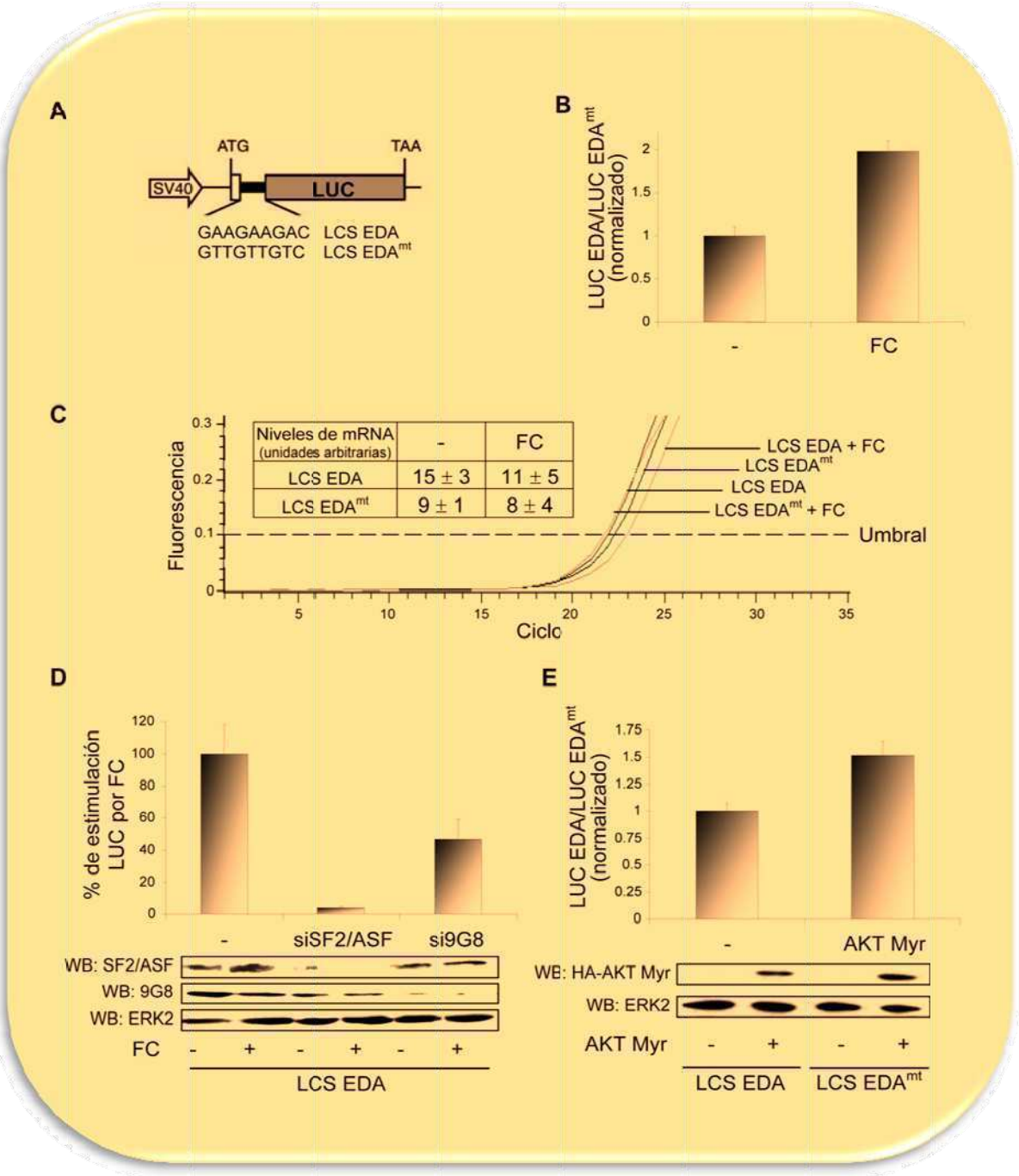

Figura 28: Los FC y AKT Myr alteran la traducción de mRNA que contienen un ESE. (A) Reporteros de LUC utilizados para los ensayos de traducción *in vivo*. **(B)** Las células SCp2 fueron transfectadas con pLCS-EDA o pLCS-EDA^{mt} y tratadas con FC. 48 h después, fue evaluada la actividad LUC en los lisados celulares. **(C)** Se muestra la amplificación de los mRNA derivados de los reporteros de LUC por RT-PCR en tiempo real. **(D)** Las células Hep3B fueron co-transfectadas con pLCS-EDA y los siRNAs indicados y tratadas con FC. Posteriormente, fue evaluada la actividad LUC en los lisados (100% corresponde a la estimulación de la actividad LUC por FC en ausencia de un siRNA específico). El *knock-down* de SF2/ASF y 9G8 endógenas fue confirmado por *western blot*. **(E)** Las células SCp2 fueron co-transfectadas con 500 ng de pCMV6-HA-AKT Myr o vector vacío (-) y con pLCS-EDA o pLCS-EDA^{mt}. Luego de 48 h, se midió la actividad LUC. La sobre-expresión de AKT Myr fue confirmada por *western blot* contra HA.

Estos resultados muestran, en conjunto, que la cascada de señalización disparada por FC no sólo regula el *splicing* del pre-mRNA sino que también afecta el modo en que el mRNA maduro es traducido, indicando que ambos procesos son regulados por un mecanismo dependiente de las mismas proteínas SR.

2. SF2/ASF regula la traducción alternativa de reporteros bicistrónicos

Hasta el momento, poco se sabe acerca de cómo es que las proteínas SR estimulan la traducción, si lo hacen fomentando la iniciación de la traducción, la elongación y/o el reclutamiento a sitios de activa traducción. La traducción de la mayoría de los mRNAs eucarióticos es iniciada por el mecanismo de escaneado, que implica el reconocimiento del extremo 5´ del mRNA y su estructura m7G-cap por el complejo que contiene al factor de iniciación de la traducción eucariota 4F (eIF4F) que es un complejo multiproteico. Por otro lado, el inicio de la traducción puede ser mediado por elementos que actúan en *cis* llamados IRESs que estimulan la unión del ribosoma a un codón de iniciación sin requerir el reconocimiento del m7G-cap por parte de eIF4F (Hellen y Sarnow, 2001). Varios RNAs virales, los primeros ejemplos en los cuales se describió la actividad de IRESs, son traducidos cuando la iniciación de la traducción dependiente de cap es inihibida por proteínas virales en la célula infectada (Pelletier y Sonenberg, 1988). Con el tiempo, se han descubierto que muchos mRNAs celulares eucariotas pueden también ser traducidos vía un mecanismo de traducción independiente de cap pero mediado por IRESs (Hellen y Sarnow, 2001).

A pesar de que la traducción mediada por IRESs ha sido considerada usualmente como un mecanismo de traducción alternativa en contraste con el mecanismo (canónico) dependiente de cap, haremos alusión aquí a "traducción alternativa" como la producción de diferentes proteínas a partir de un mismo mRNA, a través del balance entre estos dos mecanismos de iniciación de la traducción.

Nos propusimos entonces analizar la actividad de SF2/ASF en la traducción dependiente de cap y en la dependiente de IRES, hipotetizando que esta proteína podría no sólo funcionar como reguladora del *splicing* alternativo sino también de la traducción alternativa, expandiéndose más aún su ya descripto potencial para incrementar la diversidad proteica.

Con este objetivo, utilizamos reporteros bicistrónicos que contienen dos marcos de lectura abiertos u *open reading frames* (ORFs), el de CAT en el extremo 5´ y el de LUC en el extremo 3´. La traducción del primer ORF es dependiente de cap, mientras que la del segundo es independiente de cap pero depende de la presencia de un IRES del gen que codifca para cat1. Este IRES celular ha sido colocado entre ambos ORFs y se activa por hambreado de aminoácidos (Yaman *et al.*, 2003). En esta construcción, CAT y LUC son traducidos a partir de un único mRNA, eliminando diferencias debidas a la eficiencia de transfección así como a efectos en los niveles de RNA. Ambos cistrones, así como la secuencia IRES contienen varias secuencias potenciales de unión para SF2/ASF (Fig. 29a) según lo predicho por el ESEfinder©, un programa diseñado para detectar putativos sitios de unión para las distintas proteínas SR (Cartegni *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). Primeramente, validamos que este reportero alternativo pudiera efectivamente reportar la regulación de la traducción alternativa (es decir el cociente CAT/LUC como indicador de la traducción dependiente de cap en función de la dependiente de un IRES) exponiendo a las células Hep3B a una hambreado de aminoácidos o, en contraste, sobre-expresando AKT-Myr. El estrés de aminoácidos disminuyó el cociente CAT/LUC (Fig. 29b), lo cual es consistente con el hecho de que fue reportado que este tratamiento aumenta la actividad del IRES de cat1 e inhibe la traducción dependiente de cap en células de glioma de rata y en fibroblastos embrionarios (Fernandez *et al.*, 2001; Yaman *et al.*, 2003). Por el contrario, la sobre-expresión de AKT Myr aumentó el cociente CAT/LUC (Fig. 29c), lo cual es predecible dado que AKT/PKB estimula la traducción a nivel del reclutamiento de RNAs a polisomas en forma dependiente de cap, modificando la actividad de factores de iniciación de la traducción (Gingras *et al.*, 1998). Luego, sobre-expresamos SF2/ASF y encontramos un aumento consistente del cociente CAT/LUC (Fig. 29d). Más aún, el *knock-down* de SF2/ASF endógeno por una estrategia de RNAi provocó el efecto opuesto (Fig. 29e). Por lo tanto, SF2/ASF, al igual que AKT/PKB, puede funcionar como un regulador de la traducción alternativa. La sobre-expresión de SC35, una proteína SR incapaz de traslocar entre núcleo y citoplasma en forma dinámica, tiene consecuencias sobre el *splicing* alternativo del mRNA de FN y sobre el del adenovirus E1A que son similares a las provocadas por la sobre-expresión de SF2/ASF (Cáceres *et al.*, 1994; Wang y Manley, 1995; Cramer *et al.*, 1999). Sin embargo, SC35 no es capaz de alterar el cociente CAT/LUC (Fig. 30a), lo cual es consistente con su incapacidad para abandonar el núcleo celular.

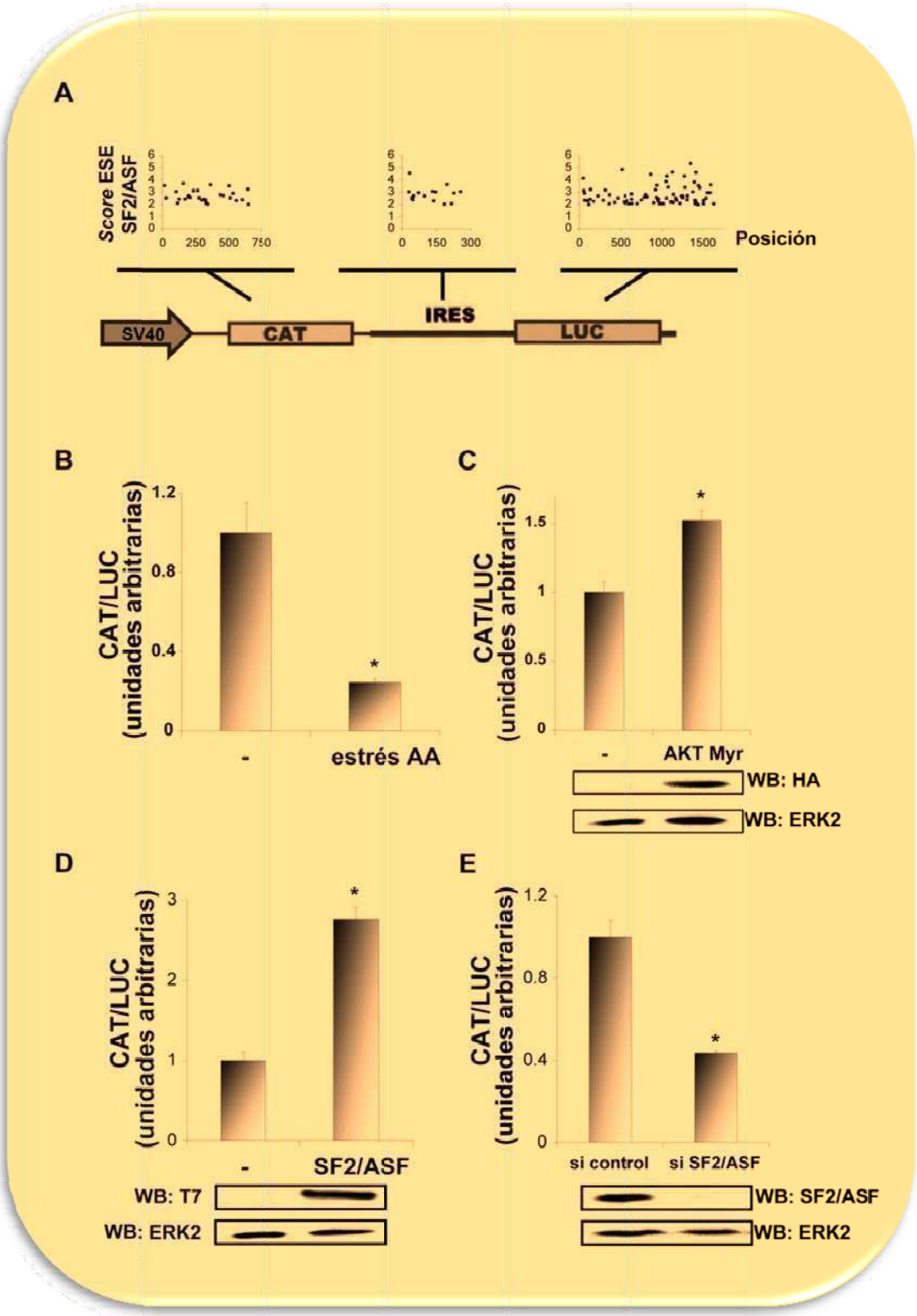

Figura 29: SF2/ASF regula la traducción alternativa de un reportero bicistrónico *in vivo*. (A) Esquema del reportero bicistrónico CAT/LUC utilizado para los ensayos de traducción alternativa *in vivo*. Los potenciales sitios de unión para SF2/ASF son mostrados para cada región del reportero de acuerdo a su posición y *score* en el *ESEfinder*. El *score* se obtiene asignando un puntaje a cada nucleótido de una secuencia corta, dependiendo de la posición en que aparece el mismo. Dicho *score* se basa en experimentos de SELEX. **(B)** Las células Hep3B fueron transfectadas con el reportero bicistrónico pSVCAT/cat1-IRES/LUC y 5 h después fueron privadas de

Figura 29 (continuación): aminoácidos (estrés AA) o dejadas sin tratar (-). Luego de 48 h, las actividades CAT y LUC fueron evaluadas para calcular los cocientes CAT/LUC. **(C)** Las células Hep3B fueron co-transfectadas con el reportero bicistrónico y 500 ng de pCMV6-HA-AKT Myr o vector vacío (-). Luego de 48 h, las actividades CAT y LUC fueron evaluadas para calcular los cocientes CAT/LUC. La sobre-expresión de AKT Myr fue confirmada por *western blot* contra HA. **(D)** Idem C, pero para la co-transfección del reportero bicistrónico y 200 ng de pCGT7-SF2/ASF o vector vacío (-) **(E)** Las células Hep3B fueron co-transfectadas con el reportero bicistrónico y 40 pmol de cada siRNA. Luego de 48 h, las actividades CAT y LUC fueron evaluadas para calcular los cocientes CAT/LUC. El *knock-down* de SF2/ASF fue confirmado por *western blot*. (*) indica $p<0.05$ (Test de Student).

El efecto de SF2/ASF en la traducción alternativa no está restringido a un IRES particular. Cuando se co-transfecta SF2/ASF con una construcción bicistrónica en la que el IRES de cat1 ha sido reemplazado por el IRES celular del gen que codifica para BiP, se encuentra de nuevo un aumento consistente del cociente CAT/LUC (Fig. 30b). Más aún, un siRNA contra SF2/ASF disminuye este cociente como en el caso anterior (Fig. 30c). De modo análogo, cuando se utiliza un reportero bicistrónico conteniendo entre ambos ORFs el IRES del HCV se obtienen resultados similares (Fig. 30d, e).

Los efectos de SF2/ASF en la traducción alternativa, por lo tanto, no pueden ser extrapolados a todas las proteínas SR y muy probablemente, dependen de su capacidad de transportarse del núcleo al citosol. Por el contrario, el efecto de la sobre-expresión de SF2/ASF sobre la regulación de la traducción alternativa sí se puede extender, al menos, a otros casos diferentes como lo son los reportados en el análisis con el IRES celular de BiP y el IRES viral de HCV.

3. Correlación entre la capacidad de SF2/ASF de regular el *splicing* alternativo y la de alterar la traducción alternativa

Con el objeto de evaluar si existe una correlación entre la capacidad de SF2/ASF para regular el *splicing* alternativo con su habilidad para controlar la traducción alternativa, analizamos el efecto en ambos procesos no sólo de sobre-expresar o inhibir la expresión de SF2/ASF sino también las consecuencias de sobre-expresar dicha proteína pero habiendo eliminado cada uno de sus dominios modulares. En cada caso, evaluamos el efecto en el *splicing* alternativo, como el cociente EDI+/EDI- obtenido por análisis de RT-PCR de transcriptos derivados del minigen reportero de *splicing* de EDI y el efecto en la

traducción alternativa como cociente CAT/LUC obtenido a partir de la transfección de los reporteros bicistrónicos.

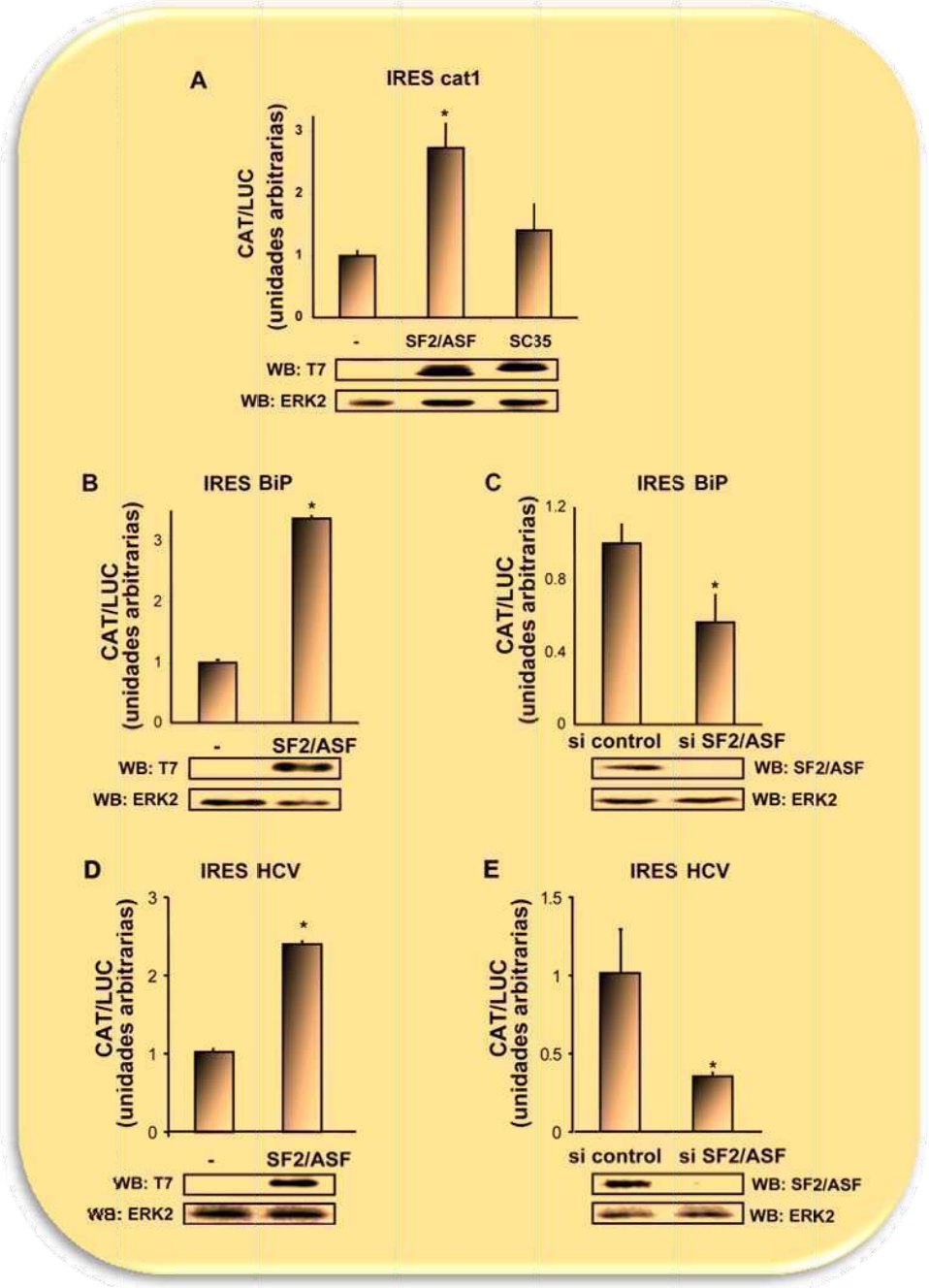

Figura 30: Los efectos de SF2/ASF pueden ser generalizados para otro IRES pero no pueden ser reproducidos por SC35. (A) Las células Hep3B fueron co-transfectadas con el reportero bicistrónico y 200 ng de pCGT7-SF2/ASF, pCGT7-SC35 o vector vacío (-). Luego de 48 h, las actividades CAT y LUC fueron evaluadas para calcular los cocientes CAT/LUC. La sobre-expresión de SF2/ASF y de SC35 fue confirmada por *western blot* contra T7. **(B, C)** Idem Fig. 29d, e, pero utilizando el vector pSVCAT/BiP IRES/LUC. **(D, E)** Idem Fig. 29d, e, pero utilizando el vector pHPI1484 que contiene el IRES de HCV. (*) indica $p<0.05$ (Test de Student).

Encontramos una importante correlación (ρ= 0,927) entre ambos procesos (Fig. 31a), sugiriendo que la abundancia y/o actividad de esta proteína pueden proveer una fuerte coordinación de ambos procesos que dan por resultado una expansión de la diversidad proteómica. En este contexto celular, cada uno de los dominios modulares de SF2/ASF resulta crucial para sus funciones en *splicing* y traducción alternativas, implicando que estos efectos son dependientes de las funciones ejercidas por estos dominios.

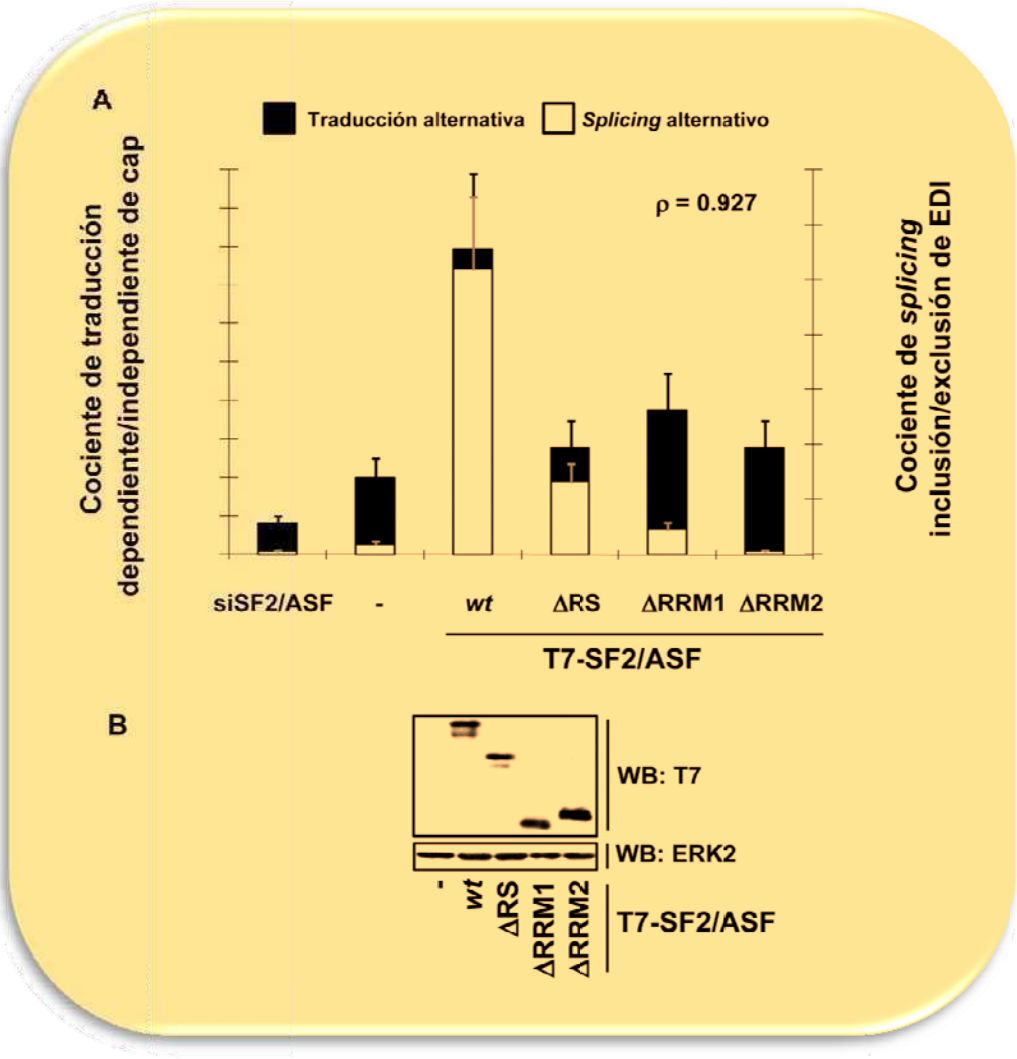

Figura 31: Análisis de correlación. (A) Análisis de correlación de la regulación de la traducción alternativa (evaluada como cociente CAT/LUC) *versus* la del *splicing* alternativo (evaluada como cociente EDI+/EDI-). Las células fueron co-transfectadas con el reportero bicistrónico o con el minigen de EDI, y con pCGT7-SF2/ASF (*wt*), sus mutantes por deleción (ΔRS, ΔRRM1 o ΔRRM2), siRNA contra SF2/ASF o vector vacío (-). 48 o 72 h más tarde, las células fueron colectadas para el análisis de las actividades CAT y LUC o para el aislamiento del RNA y posterior RT-PCR. **(B)** Para confirmar que T7-SF2/ASF y sus mutantes son sobre-expresados en modo similar, los niveles de expresión fueron evaluados por *western blot* contra T7.

4. SF2/ASF regula la traducción alternativa de genes endógenos

Finalmente, intentamos reproducir estos resultados analizando la traducción de un mensajero endógeno. Con ese objetivo, trabajamos con el mRNA de FGF-2 humano. Dicho mRNA posee cinco codones de iniciación de la traducción en marco (4CUGs y 1 AUG) que dan origen a cinco isoformas proteicas de FGF-2 que varían en sus extensiones amino-terminales. Mientras que la traducción de la isoforma de 34-kDa es iniciada por un mecanismo dependiente de cap, las isoformas más pequeñas son iniciadas por un proceso mediado por un IRES (Fig. 32a). Estas isoformas diferentes de FGF-2 tienen distinta localización y función, y la expresión de cada una de ellas es regulada traduccionalmente dependiendo del tipo celular o el estado fisiológico de la célula (Bonnal *et al.*, 2005). Analizamos los patrones de expresión de FGF-2 por *western blot* con un anticuerpo que reconoce todas las isoformas proteicas de FGF-2. Encontramos que, de modo similar a lo observado para los reporteros bicistrónicos, un siRNA contra SF2/ASF es capaz de alterar el patrón de traducción alternativa, en particular, disminuyendo la proporción de la isoforma que se traduce por un mecanismo dependiente de cap y aumentando la proporción de aquellas que dependen de un IRES para poder ser traducidas (Fig. 32b). Dependiendo del experimento, los niveles de la isoforma de 34-kDa disminuyeron o permanecieron sin cambio. Sin embargo, el cociente de traducción dependiente de cap en función del dependiente de IRES fue afectado siempre del mismo modo.

Estos resultados validan los obtenidos previamente con reporteros bicistrónicos, con la ventaja de que aquí no se están midiendo dos actividades enzimáticas diferentes. Además, agregan un cuarto ejemplo (sumado a los anteriores en que se utilizaron los IRESs de cat1, BiP y HCV) en donde la traducción alternativa puede ser regulada por SF2/ASF. Más importante, muestran que SF2/ASF puede afectar la traducción alternativa de mRNAs endógenos.

La regulación de la abundancia y/o actividad de SF2/ASF puede ser, por lo tanto, no sólo un mecanismo para cambiar los patrones de *splicing* alternativo sino también una vía por la cual las células pueden cambiar los patrones de traducción alternativa de los mRNAs que contienen IRESs.

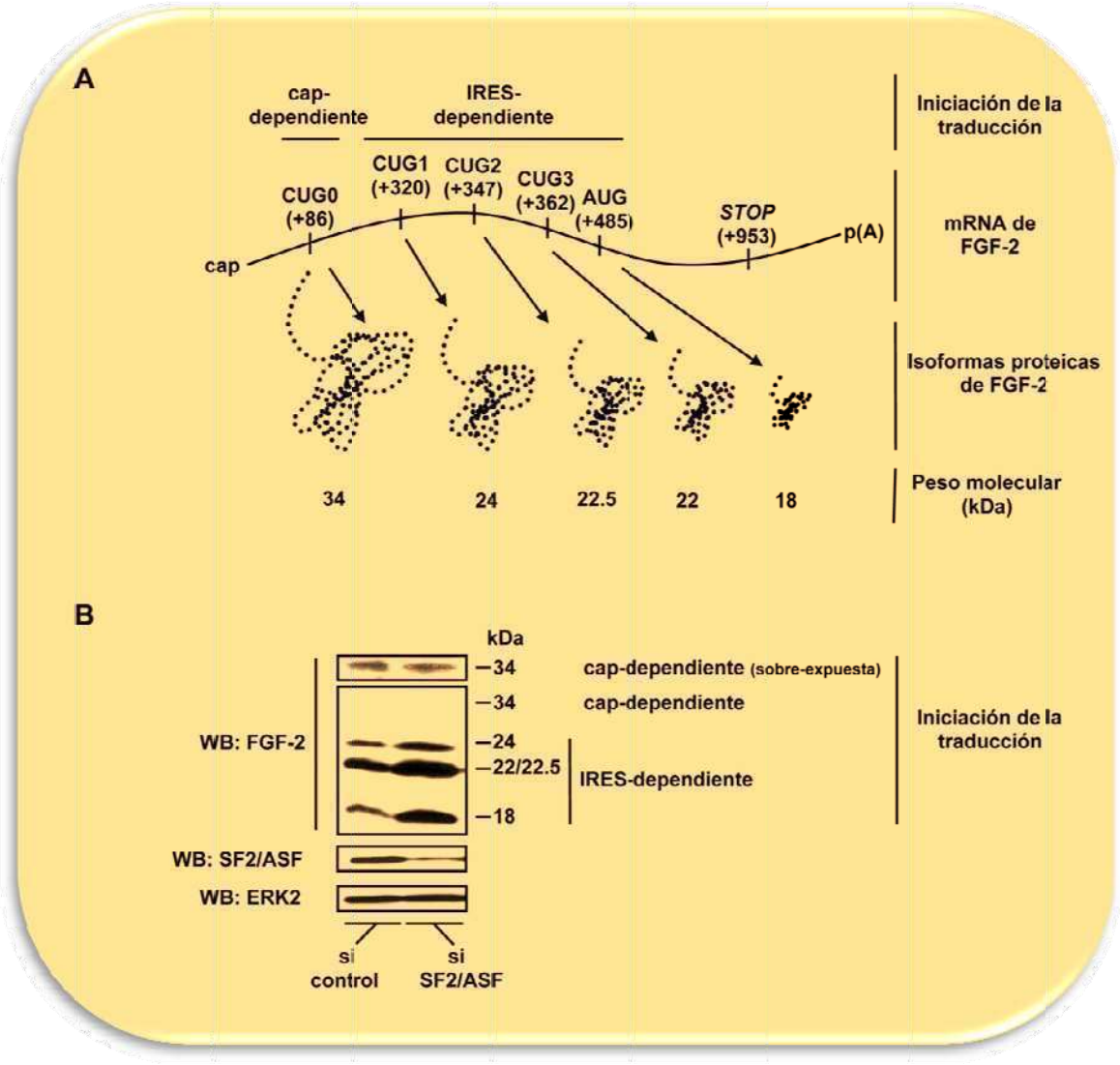

Figura 32: El *knock-down* de SF2/ASF cambia la traducción alternativa del mRNA endógeno de FGF-2. (A) Esquema del mRNA de FGF-2 humano y de las proteínas derivadas de su traducción alternativa. **(B)** Células HeLa (las Hep3B producen muy bajas cantidades de FGF-2) fueron transfectadas con diferentes siRNAs y colectadas 72 h después. Se muestra el análisis de *western blot* con anticuerpos contra FGF-2, SF2/ASF y ERK2.

DISCUSIÓN

Actualmente sabemos que las proteínas SR, primeramente descriptas como factores regulatorios del *splicing*, también participan en exportación, estabilidad, control de calidad y traducción del mRNA. Los datos presentados en esta tesis refuerzan la concepción de que estas proteínas son reguladores excepcionales y multifacéticos.

Al 2007, existe un creciente número de trabajos explorando la influencia de las señales extracelulares en la regulación del *splicing* alternativo a través de la activación de diversas vías de transducción de señales (Stamm, 2002; Lynch, 2004; Shin y Manley, 2004; Blaustein *et al.*, 2007). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la cascada de señalización completa conectando el estímulo extracelular con la maquinaria nuclear de *splicing* no ha sido definida.

En este trabajo se muestra que diferentes FC, tales como HGF/SF, así como el MCmes son capaces de regular el *splicing* de dos de las tres regiones alternativas del transcripto primario de FN. Específicamente, son capaces de provocar un aumento en la inclusión de EDI y IIICS pero no de EDII, en diferentes líneas celulares. El reporte de esta co-regulación del *splicing* alternativo de IIICS y EDI es novedoso y sugiere que estas dos regiones podrían estar reguladas por secuencias similares en *cis*, por los mismos factores en *trans* o, eventualmente, por diferentes factores que responden a las mismas vías de señalización. La FN es ligando para al menos una docena de miembros de la familia de receptores conocidos como integrinas. EDI es capaz de unirse a las integrinas α9β1 y α4β1 (Liao *et al.*, 2002) y IIICS contiene sitios de unión para las integrinas α4β1 y α4β7 (Humphries *et al.*, 1986). Recientemente, un nuevo sitio de unión a glicosaminoglicanos ha sido identificado dentro de IIICS, mostrando que la cooperación entre los proteoglicanos de superficie y las integrinas es importante para mediar la adhesión de las células a FN (Mostafavi-Pour *et al.*, 2001). La señalización cooperativa a partir de las integrinas α5β1 y α4β1 ha sido propuesta para modular la expresión de metaloproteinasas tales como la colagenasa, la gelatinasa de 92-kDa y la stromelisina-1 en respuesta a FN (Huhtala *et al.*, 1995). Por lo tanto, la inclusión o exclusión de EDI y IIICS en el mRNA maduro de FN puede generar o remover sitios de reconocimiento para integrinas, alterando el comportamiento celular.

Los resultados de los experimentos con Act D nos permiten descartar la posibilidad de que el efecto de los FC en el patrón de isoformas alternativas estuviera causado por una estabilidad diferencial de las diferentes isoformas de mRNA. El análisis del patrón de isoformas alternativas en el núcleo y en el citosol nos permite, en principio, descartar procesos de exportación diferencial de ambas isoformas. Hemos encontrado que estos efectos no dependen de la síntesis *de novo* de proteínas, dado que no son bloqueados por un inhibidor de la traducción como CHX. El hecho de que la CHX potencie el efecto de los FC sugiere que podría estar activando una vía de transducción de señales

sinergística (La CHX puede estimular vías de señalización por estrés celular), o inhibiendo una represora o, alternativamente, bloqueando la síntesis de una proteína inhibitoria (Blaustein *et al.*, 2004).

HGF/SF actúa a través del RTK Met, expresado en células epiteliales. Es sabido que la vía de PI(3)K es activada río abajo de Met y es requerida para la inducción de la tubulogénesis y la motilidad celular por HGF/SF. Sin embargo, otros procesos como la ramificación morfogenética, si bien inducidos por la actividad constitutiva de PI(3)K, son dependientes de la vía de ERK. Más aún, el desensamblado de las uniones adherentes inducido por HGF/SF requiere la activación de Ras-ERK río abajo de Met (Rosario y Birchmeier, 2003). Las quinasas de estrés p38 y JNK son también activadas ocasionalmente por FC (Recio y Merlino, 2002). Ciertamente, el orquestado de respuestas celulares complejas requiere la activación de diferentes cascadas de señalización y es necesaria una importante interacción entre ellas, haciendo la disección de cada vía involucrada una tarea difícil. Nuestros resultados revelan que la vía de Ras-PI(3)K-AKT/PKB es clave para conectar HGF/SF con la maquinaria nuclear de *splicing* (Blaustein *et al.*, 2004; Blaustein *et al.*, 2005). Aquí, a diferencia de lo observado en experimentos con inhibidores de la vía de JNK, p38 y MEK-ERK, mostramos que un inhibidor de la vía de PI(3)K es capaz de bloquear drásticamente los efectos producidos por los FC sobre el *splicing* alternativo de FN EDI y IIICS. Esto demuestra un papel protagónico de la vía de PI(3)K y revela parte de la hasta aquí desconocida cascada de señales que media la regulación del *splicing* alternativo de FN. El hecho de que los efectos del MCmes no son totalmente inhibidos por LY en contraste con el efecto mediado por HGF/SF, junto a la observación de que es necesario agregar también un bloqueante de la vía de MEK-ERK, sugiere que existe/n activador/es en el MCmes que contribuye/n al aumento de inclusión de EDI por medio de ambas cascadas de señalización. Por otro lado, y complementando estos resultados, la sobre-expresión de los mutantes constitutivamente activos de Ras (que se encuentra río arriba de PI(3)K), Ras(V12) y Ras(V12C40), así como la sobre-expresión de un mutante constitutivamente activo de AKT/PKB (que se encuentra río abajo de PI(3)K), AKT Myr, son suficientes para reproducir el efecto de los FC, a diferencia de lo observado para la sobre-expresión de Rac(QL).

Utilizando una estrategia de RNAi, hemos encontrado que mientras que 9G8 tiene un importante papel en transducir la información desde el medio extracelular, SF2/ASF es requerido tanto para los niveles de inclusión basal de

EDI como para el aumento de estos niveles de inclusión por FC. SC35, por el contrario no parece ser relevante para la regulación estudiada. Esta aproximación, nos permitió disectar qué proteínas SR, de entre las que eran capaces de alterar el *splicing* alternativo de EDI por sobre-expresión (Cramer *et al.*, 1999), son requeridas para esta regulación fisiológica. El papel de 9G8 está robustecido por el hecho de que el *splicing* alternativo de un exón EDII al que se le agregó un ESE para 9G8 se vuelve capaz de ser afectado por las señales extracelulares estudiadas. Es concebible que la depleción de SF2/ASF por RNAi pueda en realidad estar inhibiendo la regulación de EDI inducida por FC o por AKT/PKB al prevenir la interacción entre 9G8 y el spliceosoma. En este sentido, se ha encontrado que estas dos proteínas SR interactúan para activar el *splicing* dependiente del ISE del intrón D del pre-mRNA de la hormona de crecimiento bovina (Li *et al.*, 2000).

Dado que el dominio RS de las proteínas SR contiene varios motivos consenso para la fosforilación de AKT/PKB, ésta resulta ser una potencial quinasa de proteínas SR. Nuestros datos proveen evidencia *in vivo* e *in vitro* a favor de un papel directo de AKT/PKB en la modificación de la actividad de SF2/ASF y de 9G8. Paralelamente, y de modo consistente con estas conclusiones, se encontró independientemente que AKT/PKB puede fosforilar a la proteína SR SRp40 y modificar el *splicing* alternativo del pre-mRNA de PKCβII (Patel *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestros datos indicarían que SRp40 no participa en la regulación presentada aquí, dado que el *splicing* alternativo de EDII es regulado por SRp40 (Du *et al.*, 1997) y sin embargo no es modificado por FC. Nuevos experimentos serán necesarios para determinar si AKT/PKB fosforila a las proteínas SR en el núcleo, en el citoplasma o en ambos compartimentos. La posibilidad de que dicha fosforilación tenga lugar en el citoplasma sería compatible con nuevas evidencias que indican que las proteínas SR dejan el núcleo en un estado hipofosforilado (Huang y Steitz, 2001; Huang *et al.*, 2003; Gilbert y Guthrie, 2004) y que muestran que la fosforilación de las proteínas SR es necesaria para la importación de las mismas al núcleo, (Lai *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001). Dado que la sobre-expresión de las quinasas SRPK y Clk, por el contrario, lleva a una localización anómala e incluso citoplasmática de las proteínas SR, AKT/PKB parece un buen candidato para aumentar la importación nuclear de las mismas. Por lo tanto, será interesante averiguar si la actividad de AKT/PKB afecta la reimportación de las proteínas SR al núcleo, sus propiedades de unión al RNA y/o su eficiencia en favorecer el *splicing* y la traducción. En referencia a este punto, encontramos efectos opuestos sobre el

splicing alternativo al sobre-expresar AKT/PKB por un lado y al sobre-expresar SRPK o Clk por el otro. No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de que los resultados obtenidos se deban a que la sobre-expresión de estas últimas quinasas cause una hiperfosforilación de las proteínas SR que vaya más allá de los niveles fisiológicos y que por lo tanto se esté provocando la inactivación de las mismas (Prasad *et al.*, 1999). De cualquier modo, es tentador especular que el balance de las actividades de todas estas quinasas y las concomitantes interacciones con las proteínas SR pueda determinar la actividad de las proteínas SR y por ende, alterar procesos río abajo de las mismas.

AKT/PKB aumenta la traducción a nivel del reclutamiento dependiente de cap de los RNAs a los polisomas, modificando la actividad de factores de iniciación de la traducción. La señalización de la cascada de PI(3)K-AKT/PKB lleva a la fosforilación e inactivación de represores de la traducción, las proteínas de unión a eIF4E, e involucra la actividad de mTor (Gingras *et al.*, 1998). Además, nuestros resultados indican una nueva actividad de AKT/PKB relacionada con la traducción que requiere la interacción de las proteínas SR con el mRNA. En este sentido, nuestras observaciones mostrando que los FC y AKT/PKB pueden alterar la traducción de una manera dependiente de proteínas SR no sólo confirman la existencia de funciones citoplasmáticas de las proteínas SR (Sanford *et al.*, 2004; Sanford *et al.*, 2005; Swartz *et al.*, 2007) sino que prueban que estas funciones son finamente reguladas en respuesta a información extracelular.

En conclusión, los FC tienen un profundo impacto sobre la regulación de la actividad nuclear y citoplasmática de las proteínas SR, es decir, sobre la regulación del *splicing* alternativo y la traducción. Estos resultados, basados en el análisis de transcriptos derivados de genes endógenos o de minigenes transfectados transitoriamente, así como en experimentos de *knock-down* y de sobre-expresión de proteínas, son consistentes con un modelo en el cual los agentes mitogénicos actúan a través de la vía de Ras-PI(3)K-AKT/PKB para alterar las actividad de las proteínas SR (Blaustein *et al.*, 2004; Blaustein *et al.*, 2005). Esto produce como consecuencia cambios en el metabolismo del mRNA a dos niveles diferentes, resultando en la regulación orquestada de dos procesos fisiológicos clave: el *splicing* alternativo y la traducción (Fig. 33). Los niveles incrementados de mRNA conteniendo ESEs serían el resultado del primer paso regulado. En el segundo paso, la presencia de proteínas SR unidas al transcripto convertiría a esta molécula en un mejor templado para la

traducción. Esto serviría para aumentar tanto la velocidad como la fuerza de la respuesta a la señalización evaluada como la producción de la proteína inducida.

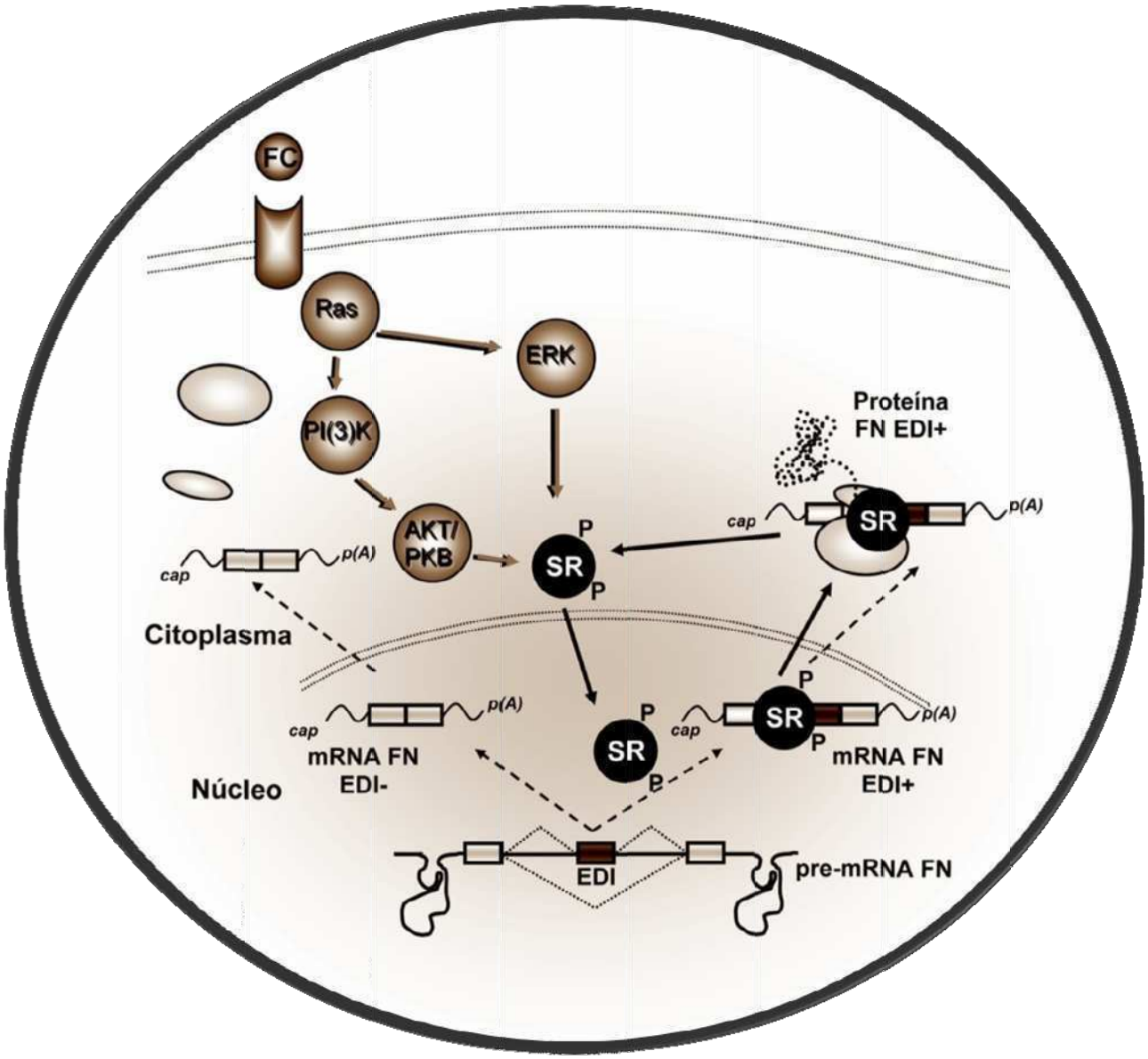

Figura 33: Regulación del metabolismo del mRNA de FN. Luego de la unión de los FC a sus receptores de superficie se activa Ras, intercambiando GDP por GTP y a su vez estimula a PI(3)K y a la vía de Raf-MEK-ERK (la vía de señalización de los FC es ilustrada con flechas color sepia). PI(3)K genera inositol fosfolípidos específicos que son reconocidos por AKT/PKB, la cual transloca a la membrana donde resulta activada. La fosforilación inducida por AKT/PKB estimula las actividades nucleares y citoplasmáticas de las proteínas SR, favoreciéndose la inclusión de EDI en el mRNA maduro (el destino del mRNA es esquematizado por flechas negras entrecortadas). Durante la reacción de *splicing*, las proteínas SR son defosforiladas y exportadas al citoplasma junto al mRNA. Finalmente, las proteínas SR aumentan la traducción de los mRNA conteniendo ESE (derecha) pero no de aquellos que carecen de los mismos (izquierda), luego de lo cual son liberadas para participar en ciclos subsecuentes (el ciclo de las proteínas SR es ilustrado con flechas negras sólidas).

La respuesta sería rápida, porque la traducción de cualquier mRNA preexistente conteniendo el exón alternativo sería incrementada preferencial e inmediatamente; sería fuerte porque más mRNAs conteniendo el exón alternativo serían producidos y estos, a su vez, serían traducidos más eficientemente (Graveley, 2005).

Queda planteado el desafío de hallar, en un futuro próximo, genes endógenos y contextos fisiológicos para los cuales pueda ser relevante esta doble regulación de la expresión génica ejercida por las proteínas SR. Es de destacar, en este sentido, el reciente hallazgo que muestra que la unión de FN a integrinas β1 es capaz de aumentar la traducción dependiente de cap, vía PI(3)K (Gorrini *et al.*, 2005). Esto es de especial interés sobre todo teniendo en cuenta nuestros experimentos mostrando que la inclusión de los exones alternativos EDI y IIICS en la proteína madura es exacerbada por esta misma vía de señalización y dado que la inclusión de estos exones genera una FN con mayor capacidad de unión a las integrinas α4β1, α5β1 y α9β1. Esto habla a las claras de un potencial mecanismo de retroalimentación positiva.

Finalmente, describimos que SF2/ASF puede regular la traducción alternativa (Blaustein *et al.*, manuscrito enviado para su publicación). La sobre-expresión de SF2/ASF aumenta el cociente de traducción dependiente de cap *versus* dependiente de IRES en mRNAs derivados de minigenes bicistrónicos transfectados transitoriamente. Estos resultados fueron observados para dos IRESs eucariotas celulares derivados de los genes cat1 y BiP y para el IRES viral de HCV. De modo coherente, la depleción de SF2/ASF por RNAi produce una disminución del cociente de traducción dependiente de cap *versus* dependiente de IRES, no sólo en reporteros bicistrónicos sino también en un transcripto endógeno como es el caso del mRNA de FGF-2.

Los resultados presentados aquí no responden si los efectos ejercidos por SF2/ASF en la traducción alternativa son causados por una unión directa al mRNA. Sin embargo, la inserción de sitios de unión de SF2/ASF en un reportero de LUC aumenta la traducción dependiente de cap *in vivo* (Sanford *et al.*, 2004). Más aún, experimentos de traducción *in vitro* muestran que el agregado de SF2/ASF recombinante aumenta la traducción dependiente de cap (Sanford *et al.*, 2004), sugiriendo un papel directo para SF2/ASF en la traducción de los mRNAs estudiados. No obstante, no se pueden descartar hasta aquí efectos de SF2/ASF que puedan ser independientes de su unión a los

reporteros utilizados en este trabajo. En este sentido, ha sido recientemente demostrado que la sobre-expresión de SF2/ASF en células en cultivo regula el patrón de *splicing* de los pre-mRNAs transcriptos a partir de los genes *RPS6KB1* y *MNK2*. Las proteínas codificadas por ambos genes están involucradas en la regulación de la traducción. El primer gen codifica para S6K1, una quinasa que fosforila a la proteína S6 de la subunidad menor del ribosoma, mientras que el segundo codifica para una de las dos quinasas que se sabe son capaces de fosforilar al factor de iniciación de la traducción 4E, una proteína capaz de unirse a cap (Karni *et al.*, 2007).

Nuestros experimentos *in vivo* apoyan fuertemente la hipótesis de que SF2/ASF regula la traducción al nivel de la iniciación de la traducción.

Resulta destacable el hecho de que haya sido reportado que varias proteínas SR se inactivan por defosforilación durante la infección de tres familias diferentes de virus: adenovirus (Kanopka *et al.*, 1998), vaccinia virus (Huang *et al.*, 2002) y herpes simplex virus (Sciabica *et al.*, 2003). Estos estudios probaron que el *splicing* del pre-mRNA puede ser un blanco común de la interferencia viral. Las estrategias de infección viral están normalmente asociadas con la inhibición de diferentes pasos del metabolismo celular de modo de maximizar la replicación viral. La interferencia viral con la actividad de las proteínas SR sería entonces un mecanismo importante en el remodelado de la maquinaria de expresión génica del hospedador. De hecho, los picornavirus, flavivirus, retrovirus y algunos DNA virus inhiben la traducción dependiente de cap de la célula hospedadora como una estrategia de infección clave (Vagner *et al.*, 2001). Nuestros resultados predicen que luego de la infección por estas últimas familias de virus podría tener lugar la inactivación de SF2/ASF. Sin embargo, en este caso, la inactivación de SF2/ASF sería importante no tanto para interferir con la maquinaria de *splicing* como para reprimir la maquinaria de traducción dependiente de cap de la célula favoreciendo la traducción dependiente de IRES de los RNAs virales. En esta línea de evidencia, y como se ha descripto líneas arriba, tanto SF2/ASF como AKT/PKB son capaces, por sobre-expresión o activación, de potenciar la inclusión de ciertos exones alternativos y de estimular la traducción dependiente de cap. Notablemente, se ha encontrado que el interferón-α, un conocido factor antiviral, promueve la supervivencia celular activando la vía de AKT/PKB (Yang *et al.*, 2001) e inhibe la traducción dependiente de IRES en seis genotipos diferentes de HCV (Hazari *et al.*, 2005). Por lo tanto, será de enorme interés buscar un papel para las proteínas SR como blancos potenciales de la vía de AKT/PKB en la

regulación de la traducción.

La traducción independiente de cap no está restringida a RNAs virales. Como fue mencionado para el caso de cat1, BiP y FGF-2, varios mRNAs eucariotas poseen secuencias IRESs. Se ha demostrado que la traducción alternativa es fisiológicamente regulada durante la mitosis, quiescencia, diferenciación y en respuesta a estrés (Vagner *et al.*, 2001). Por lo tanto, la alteración de la actividad de las proteínas SR, que ha sido asociada a cambios en el *splicing* alternativo en todos estos procesos (Blaustein *et al.*, 2007), debería ser también investigada dentro del campo de la regulación de la traducción. En este sentido, la proteína SR SRp38 ha sido caracterizada como un represor general del *splicing* que es activado por defosforilación en células sometidas a estrés térmico así como en células en fase M. SRp38 defosforilada interactúa fuertemente con U1 snRNP interfiriendo con el reconocimiento de los ss 5´ (Shin *et al.*, 2004). SRp38 co-localiza con U1 snRNP no sólo en el núcleo sino también en el citoplasma, lo que lleva a la especulación de que estas estructuras que contienen a ambas proteínas podrían corresponder a gránulos de estrés, dominios citoplasmáticos que albergan mRNAs arrestados traduccionalmente, y por lo tanto SRp38 podría estar actuando en la represión traduccional en respuesta al estrés térmico (Shin *et al.*, 2005). Más aún, trabajos recientes han mostrado que un aumento en la fosforilación de hnRNP A1 en respuesta a estrés osmótico conlleva la acumulación de esta proteína unida a mRNAs que son reclutados a los gránulos de estrés (Guil *et al.*, 2006).

En concordancia con nuestros hallazgos reportando la participación de factores de *splicing* en la traducción alternativa, pero modificando la traducción alternativa en un sentido inverso al que nosotros encontramos, el grupo de Semler ha descripto recientemente que la proteína SRp20 favorece la traducción dependiente de IRES de poliovirus (Bedard *et al.*, 2007). En el mismo sentido, hnRNP A1 es capaz de aumentar la traducción dependiente de IRES de FGF-2 (Bonnal *et al.*, 2005). Al igual que lo que ocurre en la regulación del *splicing* alternativo, cada proteína SR y cada hnRNP puede influir positiva o negativamente, según el caso estudiado.

La relevancia del acoplamiento entre los procesos de *splicing* alternativo y de traducción alternativa se pone de manifiesto en un trabajo reciente que muestra que la actividad del IRES de la ornitina decarboxilasa es incrementada luego de la inclusión de secuencias alternativas generadas por *splicing* en ss crípticos. Más aún, este IRES se vuelve más sensible a cambios dependientes del ciclo celular en la tasa de traducción (Pyronnet *et al.*, 2005). Esta regulación

resulta de particular importancia en cuanto conlleva la acumulación de la proteína ornitina decarboxilasa, capaz de contribuir a la transformación celular.

Por ende, el nivel de expresión, junto con el balance de fosforilación/activación de ciertas proteínas SR y hnRNPs, pueden ser blancos clave no sólo para la regulación del *splicing* sino para la regulación de la traducción alternativa y, en particular, para estrategias virales y antivirales.

En definitiva, al día de la fecha sabemos que muchas cascadas de señalización (Tabla I) controlan la regulación del metabolismo del RNA (van der Houven van Oordt *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2001; Matter *et al.*, 2002; Srebrow *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2003; Blaustein *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004; Allemand *et al.*, 2005; Blaustein *et al.*, 2005; Buxade *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005; Pelisch *et al.*, 2005; Rothrock *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005; Batsche *et al.*, 2006; Cheng y Sharp, 2006; House y Lynch, 2006; Thornton *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Melton *et al.*, 2007) y que las células utilizan un determinado repertorio de moléculas de señalización para transducir la información desde el medio extracelular y regular la expresión génica a diferentes niveles incluyendo, entre otros, la actividad transcripcional del promotor, el procesamiento del pre-mRNA, la exportación del mRNA, su estabilidad y su traducción. El panorama es aún más complejo si consideramos que estos niveles pueden influirse mutuamente o pueden tener lugar de una manera concertada (Cramer *et al.*, 1997; Cramer *et al.*, 1999; Cramer *et al.*, 2001; Kadener *et al.*, 2001; Kadener *et al.*, 2002; Nogués *et al.*, 2002; de la Mata *et al.*, 2003; Nogues *et al.*, 2003; Blaustein *et al.*, 2004; Kornblihtt *et al.*, 2004; Fededa *et al.*, 2005; Graveley, 2005; de la Mata y Kornblihtt, 2006; Kornblihtt, 2006). Otros niveles adicionales de complejidad pueden existir, derivados de la extensa comunicación entre diferentes vías de señalización que tiene lugar cuando las células responden a múltiples señales simultáneamente.

Hemos aprendido de los operones bacterianos que un estímulo externo puede regular la transcripción de varios genes que codifican para componentes proteicos de una misma vía metabólica. Es probable que esta situación pueda ser extrapolada a organismos multicelulares y encontrar que una determinada señal extracelular afecta varios eventos de *splicing* en una variedad de pre-mRNAs de modo de regular una función celular completa o de coordinar diferentes funciones, por ejemplo por fosforilación de un determinado factor de *splicing*. De hecho, se ha reportado que un grupo de exones alternativos regulados por depolarización y probablemente involucrados en la función neuronal poseen elementos de RNA capaces de sensar la actividad de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina o CaMK IV (Lee *et al.*,

2007). Más aún, se ha demostrado que un factor de *splicing* neuronal específico llamado Nova regula el *splicing* alternativo de un grupo de transcriptos que codifican para una red de proteínas capaces de interactuar entre sí y que funcionan en la sinapsis (Ule *et al.*, 2005; Ule y Darnell, 2006).

Gen	***Función de la proteína***	***Exón***	***Estímulo***	***Proteínas de seña-lización***	***Factores de splicing***
Slo	Canal de potasio BK	STREX	Depolariza-ción	**CaMK IV**	?
NR1	Subunidad de NMDAR involucrada en procesos neuronales	21 22	Depolariza-ción Activación/ inhibición de la actividad neuronal	**CaMK IV** **?**	? ?
CD44	Molécula de superficie involucrada en proliferación, supervivencia y diferenciación	v5 v6	Activación de las células T Suero, FC	**Ras-Raf-MEK-ERK** **Ras-ERK**	Sam68, SRm160 y hnRNP A1 ?
CD45	Fosfatasa de tirosinas transmembrana	4,5 y 6	Activación de las células T	**Ras**	hnRNP L y otros
FN	Glicoproteína de la matriz extracelular involucrada en comportamien-tos adhesivos y migratorios	EDI y IIICS	Membrana basal rica en laminina FC	**JNK y ERK** **Ras-PI(3)K-AKT/ PKB**	? SF2/ASF y 9G8 (determina-do sólo para EDI)
PKC	Proteína de señalización	βII	Insulina	**PI(3)K-AKT/ PKB**	SRp40
E1A	Proteína de adenovirus involucrada en la regulación de la transcripción y de la síntesis de DNA	Sitios de *splicing* alter-nativos	Estrés osmótico o radiación UVC	**MKK3/6-p38-Mnk1/2**	hnRNP A1

Tabla I: Señales extracelulares, señalización y *splicing* alternativo. Resumen de los sistemas modelo utilizados para disectar los efectos de las señales extracelulares que repercuten en la regulación del *splicing* alternativo y sus vías de transducción de señales asociadas. Los colores de fondo indican moléculas de señalización compartidas por diferentes procesos de regulación del *splicing* alternativo en respuesta a señales extracelulares.

De modo similar, pero en un sentido más restringido, el control de la elongación transcripcional puede modular el *splicing* alternativo de varios exones en el mismo gen (Fededa *et al.*, 2005).

Finalmente, la arquitectura global del genoma parece ser un nivel clave para la coordinación del *splicing* alternativo. Una característica distintiva del núcleo de células de mamífero es la presencia de dominios estructurales y funcionales que carecen de fronteras membranosas. La organización espacial

del genoma es establecida por arreglos no aleatorios de cromosomas en el núcleo en interfase, con cromosomas ocupando posiciones intranucleares preferenciales (Lamond y Earnshaw, 1998; Gorski y Misteli, 2005). Por lo tanto, los *speckles* podrían estar distribuidos en el núcleo de modo de orquestar el *splicing* alternativo de moléculas de pre-mRNA transcriptas a partir de genes que co-localizan en la misma región cromatínica. La integración de los procesos nucleares descriptos y la adquisición de una visión del núcleo desde la perspectiva de la biología de sistemas es un campo emergente y su estudio presenta un atractivo desafío para los investigadores especializados en este área de la biología molecular y celular (Hieronymus y Silver, 2004). También en este sentido, resulta más que atractivo realizar un estudio a nivel de las poblaciones celulares. Poco se sabe acerca de la variación del *splicing* alternativo célula-célula, dentro de un grupo de células respondiendo a un determinado estímulo extracelular (Fededa y Colman-Lerner, resultados no publicados).

Dada la necesidad de orquestar el comportamiento de varios tipos y linajes celulares diferentes, los sistemas de señalización son vitales para la función de los organismos multicelulares. Al menos el 15% de la capacidad de codificación de proteínas de vertebrados está destinada a receptores, componentes del sistema de señalización y proteínas reguladoras de la transcripción (Manning *et al.*, 2002; Bertrand *et al.*, 2004; Koonin *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta la importancia de la señalización en el desarrollo y función de los metazoos, no es sorprendente que su disfunción se encuentre asociada a patologías. En el caso del cáncer, los cambios en la función de los sistemas de señalización son tan importantes que constituyen uno de los modos más usuales para definir y clasificar los diferentes tipos de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). El diseño de drogas para inhibir la actividad de las moléculas de señalización es una de las técnicas más relevantes hoy día en la terapia contra el cáncer (Sebolt-Leopold y English, 2006). Es sabido que la desregulación de las vías de señalización ocurre en una amplia variedad de tumores humanos y también que el patrón de *splicing* de diferentes genes es alterado en esta compleja patología (Faustino y Cooper, 2003; Brinkman, 2004; Srebrow y Kornblihtt, 2006; Venables, 2006; Pajares *et al.*, 2007). Existen varios ejemplos en los cuales determinadas isoformas de *splicing* se acumulan en los tumores y la sobre-expresión de la isoforma asociada al tumor es suficiente para transformar células en cultivo (Collesi et al., 1996; Zhou et al., 2003; Singh et al., 2004; Radisky et al., 2005). El análisis del patrón de *splicing* específico de distintos tumores y sus consecuencias moleculares es

prometedor y el uso del *splicing* alternativo como fuente potencial para nuevas herramientas diagnósticas, pronósticas, predictivas y terapéuticas para el cáncer resulta, hoy por hoy, muy atractivo (Pajares *et al.*, 2007).

Evidentemente, más trabajo es necesario para definir cómo diferentes redes de señalización controlan de modo preciso la actividad de los factores de *splicing* y cuáles son las consecuencias de su desregulación en los patrones de *splicing* de las células, los tejidos y, en última instancia, los organismos multicelulares.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, N. N., H. L. Grimes, A. Bellacosa, T. O. Chan y P. N. Tsichlis (1997). "*Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3627-32.

Akiyama, S. K., K. Olden y K. M. Yamada (1995). "*Fibronectin and integrins in invasion and metastasis*." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 173-89.

Allemand, E., S. Guil, M. Myers, J. Moscat, J. F. Caceres y A. R. Krainer (2005). "*Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3605-10.

Arai, H., H. Hirano, S. Mushiake, M. Nakayama, G. Takada y K. Sekiguchi (1997). "*Loss of EDB+ fibronectin isoform is associated with differentiation of alveolar epithelial cells in human fetal lung*." Am J Pathol **151**(2): 403-12.

Ares, M., Jr., L. Grate y M. H. Pauling (1999). "*A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA*." RNA **5**(9): 1138-9.

Barnes, J. L., R. R. Hastings y M. A. De la Garza (1994). "*Sequential expression of cellular fibronectin by platelets, macrophages, and mesangial cells in proliferative glomerulonephritis*." Am J Pathol **145**(3): 585-97.

Barone, M. V., C. Henchcliffe, F. E. Baralle y G. Paolella (1989). "*Cell type specific trans-acting factors are involved in alternative splicing of human fibronectin pre-mRNA*." Embo J **8**(4): 1079-85.

Batsche, E., M. Yaniv y C. Muchardt (2006). "*The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing*." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 22-9.

Bedard, K. M., S. Daijogo y B. L. Semler (2007). "*A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation*." EMBO J **26**(2): 459-67.

Berget, S. M., C. Moore y P. A. Sharp (1977). "*Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA*." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3171-5.

Bertrand, S., F. G. Brunet, H. Escriva, G. Parmentier, V. Laudet y M. Robinson-Rechavi (2004). "*Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems*." Mol Biol Evol **21**(10): 1923-37.

Black, D. L. (2000). "*Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology*." Cell **103**(3): 367-70.

Black, D. L. (2003). "*Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*." Annu Rev Biochem **72**: 291-336.

Blaustein, M., F. Pelisch, O. A. Coso, M. J. Bissell, A. R. Kornblihtt y A. Srebrow (2004). "*Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase*." J Biol Chem **279**(20): 21029-37.

Blaustein, M., F. Pelisch y A. Srebrow (2007). "*Signals, pathways and splicing regulation*." Int J Biochem Cell Biol **39**(11): 2031-2048.

Blaustein, M., F. Pelisch, T. Tanos, M. J. Munoz, D. Wengier, L. Quadrana, J. R. Sanford, J. P. Muschietti, A. R. Kornblihtt, J. F. Caceres, O. A. Coso y A. Srebrow (2005). "*Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT*." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1037-44.

Bonnal, S., F. Pileur, C. Orsini, F. Parker, F. Pujol, A. C. Prats y S. Vagner (2005). "*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA*." J Biol Chem **280**(6): 4144-53.

Bork, P. y R. F. Doolittle (1992). "*Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 8990-4.

Bos, J. L. (1989). "*ras oncogenes in human cancer: a review*." Cancer Res **49**(17): 4682-9.

Boudrez, A., M. Beullens, P. Groenen, A. Van Eynde, V. Vulsteke, I. Jagiello, M. Murray, A. R. Krainer, W. Stalmans y M. Bollen (2000). "*NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry*." J Biol Chem **275**(33): 25411-7.

Bourgeois, C. F., F. Lejeune y J. Stevenin (2004). "*Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA*." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **78**: 37-88.

Brinkman, B. M. (2004). "*Splice variants as cancer biomarkers*." Clin Biochem **37**(7): 584-94.

Brown, L. F., D. Dubin, L. Lavigne, B. Logan, H. F. Dvorak y L. Van de Water (1993). "*Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing*." Am J Pathol **142**(3): 793-801.

Buratti, E. y F. E. Baralle (2004). "*Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process*." Mol Cell Biol **24**(24): 10505-14.

Buratti, E., A. F. Muro, M. Giombi, D. Gherbassi, A. Iaconcig y F. E. Baralle (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): 1387-400.

Buxade, M., J. L. Parra, S. Rousseau, N. Shpiro, R. Marquez, N. Morrice, J. Bain, E. Espel y C. G. Proud (2005). "*The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1*." Immunity **23**(2): 177-89.

Cáceres, J. F., T. Misteli, G. R. Screaton, D. L. Spector y A. R. Krainer (1997). "*Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity*." J Cell Biol **138**(2): 225-38.

Cáceres, J. F., G. R. Screaton y A. R. Krainer (1998). "*A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm*." Genes Dev **12**(1): 55-66.

Cáceres, J. F., S. Stamm, D. M. Helfman y A. R. Krainer (1994). "*Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors*." Science **265**(5179): 1706-9.

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

Cartegni, L., S. L. Chew y A. R. Krainer (2002). "*Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.*" Nat Rev Genet **3**(4): 285-98.

Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M. Q. Zhang y A. R. Krainer (2003). "*ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers.*" Nucleic Acids Res **31**(13): 3568-71.

Cavaloc, Y., C. F. Bourgeois, L. Kister y J. Stevenin (1999). "*The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers.*" Rna **5**(3): 468-83.

Colman-Lerner, A., M. L. Fischman, G. M. Lanuza, D. M. Bissell, A. R. Kornblihtt y J. L. Barañao (1999). "*Evidence for a role of the alternatively spliced ED-I sequence of fibronectin during ovarian follicular development.*" Endocrinology **140**(6): 2541-8.

Colwill, K., T. Pawson, B. Andrews, J. Prasad, J. L. Manley, J. C. Bell y P. I. Duncan (1996). "*The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution.*" Embo J **15**(2): 265-75.

Collesi, C., M. M. Santoro, G. Gaudino y P. M. Comoglio (1996). "*A splicing variant of the RON transcript induces constitutive tyrosine kinase activity and an invasive phenotype.*" Mol Cell Biol **16**(10): 5518-26.

Cramer, P., J. F. Cáceres, D. Cazalla, S. Kadener, A. F. Muro, F. E. Baralle y A. R. Kornblihtt (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): 251-8.

Cramer, P., C. G. Pesce, F. E. Baralle y A. R. Kornblihtt (1997). "*Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing.*" Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11456-60.

Cramer, P., A. Srebrow, S. Kadener, S. Werbajh, M. de la Mata, G. Melen, G. Nogués y A. R. Kornblihtt (2001). "*Coordination between transcription and pre-mRNA processing.*" FEBS Lett **498**(2-3): 179-82.

Chalfant, C. E., B. Ogretmen, S. Galadari, B. J. Kroesen, B. J. Pettus y Y. A. Hannun (2001). "*FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1.*" J Biol Chem **276**(48): 44848-55.

Chalfant, C. E., K. Rathman, R. L. Pinkerman, R. E. Wood, L. M. Obeid, B. Ogretmen y Y. A. Hannun (2002). "*De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1.*" J Biol Chem **277**(15): 12587-95.

Chang, L. y M. Karin (2001). "*Mammalian MAP kinase signalling cascades.*" Nature **410**(6824): 37-40.

Chauhan, A. K., A. Iaconcig, F. E. Baralle y A. F. Muro (2004). "*Alternative splicing of fibronectin: a mouse model demonstrates the identity of in vitro and in vivo systems and the processing autonomy of regulated exons in adult mice.*" Gene **324**: 55-63.

Chen, W. y L. A. Culp (1996). "*Adhesion mediated by fibronectin's alternatively spliced EDb (EIIIB) and its neighboring type III repeats.*" Exp Cell Res **223**(1): 9-19.

Chen, W. y L. A. Culp (1998). "*Adhesion to fibronectin's EDb domain induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in Balb/c 3T3 cells.*" Clin Exp Metastasis **16**(1): 30-42.

Cheng, C. y P. A. Sharp (2006). "*Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion.*" Mol Cell Biol **26**(1): 362-70.

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

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker y R. J. Roberts (1977). "*An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA.*" Cell **12**(1): 1-8.

Davis, R. J. (1993). "*The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.*" J Biol Chem **268**(20): 14553-6.

de la Mata, M., C. R. Alonso, S. Kadener, J. P. Fededa, M. Blaustein, F. Pelisch, P. Cramer, D. Bentley y A. R. Kornblihtt (2003). "*A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo.*" Mol Cell **12**(2): 525-32.

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

Denegri, M., I. Chiodi, M. Corioni, F. Cobianchi, S. Riva y G. Biamonti (2001). "*Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors.*" Mol Biol Cell **12**(11): 3502-14.

Desprez, P. Y., Roskelley, C., Campisi, J. and Bissell, M.J. (1993). "*Isolation of functional cell lines from a mouse mammary epithelial cell strain: the importance of basement membrane and cell-cell interaction.*" Mol Cell Differenciation **1**(1): 99-110.

Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinol-Roma y C. G. Burd (1993). "*hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA.*" Annu Rev Biochem **62**: 289-321.

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

Duncan, P. I., D. F. Stojdl, R. M. Marius, K. H. Scheit y J. C. Bell (1998). "*The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing.*" Exp Cell Res **241**(2): 300-8.

Enard, W., P. Khaitovich, J. Klose, S. Zollner, F. Heissig, P. Giavalisco, K. Nieselt-Struwe, E. Muchmore, A. Varki, R. Ravid, G. M. Doxiadis, R. E. Bontrop y S. Paabo (2002). "*Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns.*" Science **296**(5566): 340-3.

English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu y M. H. Cobb (1999). "*New insights into the control of MAP kinase pathways.*" Exp Cell Res **253**(1): 255-70.

Faustino, N. A. y T. A. Cooper (2003). "*Pre-mRNA splicing and human disease.*" Genes Dev **17**(4): 419-37.

Fededa, J. P., E. Petrillo, M. S. Gelfand, A. D. Neverov, S. Kadener, G. Nogues, F. Pelisch, F. E. Baralle, A. F. Muro y A. R. Kornblihtt (2005). "*A polar mechanism coordinates different regions of alternative splicing within a single gene.*" Mol Cell **19**(3): 393-404.

Fernandez, J., I. Yaman, R. Mishra, W. C. Merrick, M. D. Snider, W. H. Lamers y M. Hatzoglou (2001). "*Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability.*" J Biol Chem **276**(15): 12285-91.

ffrench-Constant, C., L. Van de Water, H. F. Dvorak y R. O. Hynes (1989). "*Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat.*" J Cell Biol **109**(2): 903-14.

Fichter, M., R. Hinrichs, G. Eissner, B. Scheffer, S. Classen y M. Ueffing (1997). "*Expression of CD44 isoforms in neuroblastoma cells is regulated by PI 3-kinase and protein kinase C.*" Oncogene **14**(23): 2817-24.

Fu, X. D., A. Mayeda, T. Maniatis y A. R. Krainer (1992). "*General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection.*" Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11224-8.

Ge, H. y J. L. Manley (1990). "*A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro.*" Cell **62**(1): 25-34.

Ge, H., P. Zuo y J. L. Manley (1991). "*Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators.*" Cell **66**(2): 373-82.

George, E. L., E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn y R. O. Hynes (1993). "*Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin.*" Development **119**(4): 1079-91.

George, J., S. S. Wang, A. M. Sevcsik, M. Sanicola, R. L. Cate, V. E. Koteliansky y D. M. Bissell (2000). "*Transforming growth factor-beta initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform.*" Am J Pathol **156**(1): 115-24.

Gilbert, W. (1978). "*Why genes in pieces?*" Nature **271**(5645): 501.

Gilbert, W. y C. Guthrie (2004). "*The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA.*" Mol Cell **13**(2): 201-12.

Gingerich, T. J., J. J. Feige y J. LaMarre (2004). "*AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability.*" Anim Health Res Rev **5**(1): 49-63.

Gingras, A. C., S. G. Kennedy, M. A. O'Leary, N. Sonenberg y N. Hay (1998). "*4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway.*" Genes Dev **12**(4): 502-13.

Glukhova, M. A., M. G. Frid, B. V. Shekhonin, T. D. Vasilevskaya, J. Grunwald, M. Saginati y V. E. Koteliansky (1989). "*Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent.*" J Cell Biol **109**(1): 357-66.

Gorrini, C., F. Loreni, V. Gandin, L. A. Sala, N. Sonenberg, P. C. Marchisio y S. Biffo (2005). "*Fibronectin controls cap-dependent translation through beta1 integrin and eukaryotic initiation factors 4 and 2 coordinated pathways*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9200-5.

Gorski, S. y T. Misteli (2005). "*Systems biology in the cell nucleus*." J Cell Sci **118**(Pt 18): 4083-92.

Graveley, B. R. (2000). "*Sorting out the complexity of SR protein functions*." Rna **6**(9): 1197-211.

Graveley, B. R. (2001). "*Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world*." Trends Genet **17**(2): 100-7.

Graveley, B. R. (2005). "*Coordinated control of splicing and translation*." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1022-3.

Graveley, B. R. y T. Maniatis (1998). "*Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing*." Mol Cell **1**(5): 765-71.

Gui, J. F., H. Tronchere, S. D. Chandler y X. D. Fu (1994). "*Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10824-8.

Guil, S., J. C. Long y J. F. Caceres (2006). "*hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response*." Mol Cell Biol **26**(15): 5744-58.

Gutman, A. y A. R. Kornblihtt (1987). "*Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7179-82.

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

Hanahan, D. y R. A. Weinberg (2000). "*The hallmarks of cancer*." Cell **100**(1): 57-70.

Hastings, M. L. y A. R. Krainer (2001). "*Pre-mRNA splicing in the new millennium*." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 302-9.

Hazari, S., A. Patil, V. Joshi, D. E. Sullivan, C. D. Fermin, R. F. Garry, R. M. Elliott y S. Dash (2005). "*Alpha interferon inhibits translation mediated by the internal ribosome entry site of six different hepatitis C virus genotypes*." J Gen Virol **86**(Pt 11): 3047-53.

Hellen, C. U. y P. Sarnow (2001). "*Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules*." Genes Dev **15**(13): 1593-612.

Hernandez, F., M. Perez, J. J. Lucas, A. M. Mata, R. Bhat y J. Avila (2004). "*Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease*." J Biol Chem **279**(5): 3801-6.

Hieronymus, H. y P. A. Silver (2004). "*A systems view of mRNP biology*." Genes Dev **18**(23): 2845-60.

Hirai, Y., A. Lochter, S. Galosy, S. Koshida, S. Niwa y M. J. Bissell (1998). "*Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells*." J Cell Biol **140**(1): 159-69.

Hochbaum, D., T. Tanos, F. Ribeiro-Neto, D. Altschuler y O. A. Coso (2003). "*Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger*." J Biol Chem **278**(36): 33738-46.

House, A. E. y K. W. Lynch (2006). "*An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition.*" Nat Struct Mol Biol **13**(10): 937-44.

Huang, T. S., C. E. Nilsson, T. Punga y G. Akusjarvi (2002). "*Functional inactivation of the SR family of splicing factors during a vaccinia virus infection.*" EMBO Rep **3**(11): 1088-93.

Huang, Y., R. Gattoni, J. Stevenin y J. A. Steitz (2003). "*SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export.*" Mol Cell **11**(3): 837-43.

Huang, Y. y J. A. Steitz (2001). "*Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA.*" Mol Cell **7**(4): 899-905.

Huang, Y. y J. A. Steitz (2005). "*SRprises along a Messenger's Journey.*" Mol Cell **17**(5): 613-5.

Huang, Y., T. A. Yario y J. A. Steitz (2004). "*A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export.*" Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9666-70.

Huh, G. S. y R. O. Hynes (1993). "*Elements regulating an alternatively spliced exon of the rat fibronectin gene.*" Mol Cell Biol **13**(9): 5301-14.

Huh, G. S. y R. O. Hynes (1994). "*Regulation of alternative pre-mRNA splicing by a novel repeated hexanucleotide element.*" Genes Dev **8**(13): 1561-74.

Huhtala, P., M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb y C. H. Damsky (1995). "*Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin.*" J Cell Biol **129**(3): 867-79.

Humphries, M. J., S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden y K. M. Yamada (1986). "*Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type-specific adhesion.*" J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2637-47.

Imagawa, W., V. K. Pedchenko, J. Helber y H. Zhang (2002). "*Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis.*" J Steroid Biochem Mol Biol **80**(2): 213-30.

Inoue, T., K. Nabeshima, Y. Shimao y M. Koono (1999). "*Hepatocyte growth Factor/Scatter factor (HGF/SF) is a regulator of fibronectin splicing in MDCK cells: comparison between the effects of HGF/SF and TGF-beta1 on fibronectin splicing at the EDA region.*" Biochem Biophys Res Commun **260**(1): 225-31.

Inoue, T., K. Nabeshima, Y. Shimao, J. Y. Meng y M. Koono (2001). "*Regulation of fibronectin expression and splicing in migrating epithelial cells: migrating MDCK cells produce a lesser amount of, but more active, fibronectin.*" Biochem Biophys Res Commun **280**(5): 1262-8.

Jarnagin, W. R., D. C. Rockey, V. E. Koteliansky, S. S. Wang y D. M. Bissell (1994). "*Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis.*" J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 2037-48.

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

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

Kalliampakou, K. I., M. Kalamvoki y P. Mavromara (2005). "*Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation.*" J Gen Virol **86**(Pt 4): 1015-25.

Kan, Z., E. C. Rouchka, W. R. Gish y D. J. States (2001). "*Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs.*" Genome Res **11**(5): 889-900.

Kanopka, A., O. Muhlemann, S. Petersen-Mahrt, C. Estmer, C. Ohrmalm y G. Akusjarvi (1998). "*Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins.*" Nature **393**(6681): 185-7.

Karni, R., E. de Stanchina, S. W. Lowe, R. Sinha, D. Mu y A. R. Krainer (2007). "*The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene.*" Nat Struct Mol Biol **14**(3): 185-93.

Ko, T. K., E. Kelly y J. Pines (2001). "*CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles.*" J Cell Sci **114**(Pt 14): 2591-603.

Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Luhrmann, M. A. Garcia-Blanco y J. L. Manley (1994). "*Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors.*" Nature **368**(6467): 119-24.

König, H., H. Ponta y P. Herrlich (1998). "*Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator.*" Embo J **17**(10): 2904-13.

Koonin, E. V., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, D. M. Krylov, K. S. Makarova, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, I. B. Rogozin, S. Smirnov, A. V. Sorokin, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin y D. A. Natale (2004). "*A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes.*" Genome Biol **5**(2): R7.

Kornblihtt, A. R. (2006). "*Chromatin, transcript elongation and alternative splicing.*" Nat Struct Mol Biol **13**(1): 5-7.

Kornblihtt, A. R., M. de la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz y G. Nogues (2004). "*Multiple links between transcription and splicing.*" Rna **10**(10): 1489-98.

Kornblihtt, A. R., C. G. Pesce, C. R. Alonso, P. Cramer, A. Srebrow, S. Werbajh y A. F. Muro (1996). "*The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies.*" Faseb J **10**(2): 248-57.

Kornblihtt, A. R., K. Vibe-Pedersen y F. E. Baralle (1983). "*Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins.*" Proc Natl Acad Sci U S A **80**(11): 3218-22.

Kornblihtt, A. R., K. Vibe-Pedersen y F. E. Baralle (1984). "*Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain.*" Embo J **3**(1): 221-6.

Krainer, A. R., G. C. Conway y D. Kozak (1990a). "*Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells.*" Genes Dev **4**(7): 1158-71.

Krainer, A. R., G. C. Conway y D. Kozak (1990b). "*The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites.*" Cell **62**(1): 35-42.

Krainer, A. R., A. Mayeda, D. Kozak y G. Binns (1991). "*Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators.*" Cell **66**(2): 383-94.

Kuhn, C., 3rd, J. Boldt, T. E. King, Jr., E. Crouch, T. Vartio y J. A. McDonald (1989). "*An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis.*" Am Rev Respir Dis **140**(6): 1693-703.

Kuroyanagi, N., H. Onogi, T. Wakabayashi y M. Hagiwara (1998). "*Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles.*" Biochem Biophys Res Commun **242**(2): 357-64.

Lai, M. C., R. I. Lin, S. Y. Huang, C. W. Tsai y W. Y. Tarn (2000). "*A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins.*" J Biol Chem **275**(11): 7950-7.

Lai, M. C., R. I. Lin y W. Y. Tarn (2001). "*Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins.*" Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10154-9.

Lamond, A. I. y W. C. Earnshaw (1998). "*Structure and function in the nucleus.*" Science **280**(5363): 547-53.

Lavigueur, A., H. La Branche, A. R. Kornblihtt y B. Chabot (1993). "*A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding.*" Genes Dev **7**(12A): 2405-17.

Lee, J. A., Y. Xing, D. Nguyen, J. Xie, C. J. Lee y D. L. Black (2007). "*Depolarization and CaM kinase IV modulate NMDA receptor splicing through two essential RNA elements.*" PLoS Biol **5**(2): e40. doi:10.1371/journal.pbio.0050040.

Lemaire, R., J. Prasad, T. Kashima, J. Gustafson, J. L. Manley y R. Lafyatis (2002). "*Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins.*" Genes Dev **16**(5): 594-607.

Lemaire, R., A. Winne, M. Sarkissian y R. Lafyatis (1999). "*SF2 and SRp55 regulation of CD45 exon 4 skipping during T cell activation.*" Eur J Immunol **29**(3): 823-37.

Li, X., M. E. Shambaugh, F. M. Rottman y J. A. Bokar (2000). "*SR proteins Asf/SF2 and 9G8 interact to activate enhancer-dependent intron D splicing of bovine growth hormone pre-mRNA in vitro.*" Rna **6**(12): 1847-58.

Liao, Y. F., P. J. Gotwals, V. E. Koteliansky, D. Sheppard y L. Van De Water (2002). "*The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing.*" J Biol Chem **277**(17): 14467-74.

Lim, L. P. y P. A. Sharp (1998). "*Alternative splicing of the fibronectin EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats.*" Mol Cell Biol **18**(7): 3900-6.

Lynch, K. W. (2004). "*Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system.*" Nat Rev Immunol **4**(12): 931-40.

Lynch, K. W. y A. Weiss (2000). "*A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras.*" Mol Cell Biol **20**(1): 70-80.

Lynch, K. W. y A. Weiss (2001). "*A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer.*" J Biol Chem **276**(26): 24341-7.

Manabe, R., N. Oh-e y K. Sekiguchi (1999). "*Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction.*" J Biol Chem **274**(9): 5919-24.

Manabe, R., N. Ohe, T. Maeda, T. Fukuda y K. Sekiguchi (1997). "*Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment.*" J Cell Biol **139**(1): 295-307.

Maniatis, T. y B. Tasic (2002). "*Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans.*" Nature **418**(6894): 236-43.

Manley, J. L. y R. Tacke (1996). "*SR proteins and splicing control.*" Genes Dev **10**(13): 1569-79.

Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter y S. Sudarsanam (2002). "*The protein kinase complement of the human genome.*" Science **298**(5600): 1912-34.

Mardon, H. J. y G. Sebastio (1992). "*Regulation of alternative splicing in the IIICS region of human fibronectin pre-mRNA encoding cell binding sites CS1 and CS5.*" J Cell Sci **103 (Pt 2)**: 423-33.

Mardon, H. J., G. Sebastio y F. E. Baralle (1987). "*A role for exon sequences in alternative splicing of the human fibronectin gene.*" Nucleic Acids Res **15**(19): 7725-33.

Matlin, A. J., F. Clark y C. W. Smith (2005). "*Understanding alternative splicing: towards a cellular code.*" Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 386-98.

Matter, N., P. Herrlich y H. König (2002). "*Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68.*" Nature **420**(6916): 691-5.

Mayeda, A. y A. R. Krainer (1992). "*Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2.*" Cell **68**(2): 365-75.

Melton, A. A., J. Jackson, J. Wang y K. W. Lynch (2007). "*Combinatorial Control of Signal-Induced Exon Repression by hnRNP L and PSF.*" Mol Cell Biol **27**(19): 6972-84.

Mermoud, J. E., P. T. Cohen y A. I. Lamond (1994). "*Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism.*" EMBO J **13**(23): 5679-88.

Misteli, T., J. F. Cáceres, J. Q. Clement, A. R. Krainer, M. F. Wilkinson y D. L. Spector (1998). "*Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo.*" J Cell Biol **143**(2): 297-307.

Misteli, T. y D. L. Spector (1998). "*The cellular organization of gene expression.*" Curr Opin Cell Biol **10**(3): 323-31.

Modrek, B., A. Resch, C. Grasso y C. Lee (2001). "*Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes.*" Nucleic Acids Res **29**(13): 2850-9.

Mostafavi-Pour, Z., J. A. Askari, J. D. Whittard y M. J. Humphries (2001). "*Identification of a novel heparin-binding site in the alternatively spliced IIICS region of fibronectin: roles of integrins and proteoglycans in cell adhesion to fibronectin splice variants.*" Matrix Biol **20**(1): 63-73.

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

Muro, A. F., A. K. Chauhan, S. Gajovic, A. Iaconcig, F. Porro, G. Stanta y F. E. Baralle (2003). "*Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan.*" J Cell Biol **162**(1): 149-60.

Ngo, J. C., S. Chakrabarti, J. H. Ding, A. Velazquez-Dones, B. Nolen, B. E. Aubol, J. A. Adams, X. D. Fu y G. Ghosh (2005). "*Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2.*" Mol Cell **20**(1): 77-89.

Nogués, G., S. Kadener, P. Cramer, D. Bentley y A. R. Kornblihtt (2002). "*Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing.*" J Biol Chem **277**(45): 43110-4.

Nogues, G., S. Kadener, P. Cramer, M. de la Mata, J. P. Fededa, M. Blaustein, A. Srebrow y A. R. Kornblihtt (2003). "*Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better.*" IUBMB Life **55**(4-5): 235-41.

Norton, P. A. y R. O. Hynes (1987). "*Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells.*" Mol Cell Biol **7**(12): 4297-307.

Oliva, J. L., N. Zarich, N. Martinez, R. Jorge, A. Castrillo, M. Azanedo, S. Garcia-Vargas, S. Gutierrez-Eisman, A. Juarranz, L. Bosca, J. S. Gutkind y J. M. Rojas (2004). "*The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras.*" J Biol Chem **279**(32): 33480-91.

Oyama, F., S. Hirohashi, Y. Shimosato, K. Titani y K. Sekiguchi (1989). "*Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors.*" J Biol Chem **264**(18): 10331-4.

Pajares, M. J., T. Ezponda, R. Catena, A. Calvo, R. Pio y L. M. Montuenga (2007). "*Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology.*" Lancet Oncol **8**(4): 349-57.

Patel, N. A., C. E. Chalfant, J. E. Watson, J. R. Wyatt, N. M. Dean, D. C. Eichler y D. R. Cooper (2001). "*Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C beta II through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells.*" J Biol Chem **276**(25): 22648-54.

Patel, N. A., S. Kaneko, H. S. Apostolatos, S. S. Bae, J. E. Watson, K. Davidowitz, D. S. Chappell, M. J. Birnbaum, J. Q. Cheng y D. R. Cooper (2005). "*Molecular and Genetic Studies Imply Akt-mediated Signaling Promotes Protein Kinase C{beta}II Alternative Splicing via Phosphorylation of Serine/Arginine-rich Splicing Factor SRp40.*" J Biol Chem **280**(14): 14302-9.

Pelisch, F., M. Blaustein, A. R. Kornblihtt y A. Srebrow (2005). "*Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: a novel role for JNK.*" J Biol Chem **280**(27): 25461-9.

Pelletier, J. y N. Sonenberg (1988). "*Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*." Nature **334**(6180): 320-5.

Petersen, T. E., H. C. Thogersen, K. Skorstengaard, K. Vibe-Pedersen, P. Sahl, L. Sottrup-Jensen y S. Magnusson (1983). "*Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology*." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 137-41.

Potempa, S. y A. J. Ridley (1998). "*Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly*." Mol Biol Cell **9**(8): 2185-200.

Prasad, J., K. Colwill, T. Pawson y J. L. Manley (1999). "*The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing*." Mol Cell Biol **19**(10): 6991-7000.

Pyronnet, S., L. Pradayrol y N. Sonenberg (2005). "*Alternative splicing facilitates internal ribosome entry on the ornithine decarboxylase mRNA*." Cell Mol Life Sci **62**(11): 1267-74.

Radisky, D. C., D. D. Levy, L. E. Littlepage, H. Liu, C. M. Nelson, J. E. Fata, D. Leake, E. L. Godden, D. G. Albertson, M. A. Nieto, Z. Werb y M. J. Bissell (2005). "*Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability*." Nature **436**(7047): 123-7.

Recio, J. A. y G. Merlino (2002). "*Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1*." Oncogene **21**(7): 1000-8.

Reed, R. (2000). "*Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing*." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 340-5.

Reichmann, E., R. Ball, B. Groner y R. R. Friis (1989). "*New mammary epithelial and fibroblastic cell clones in coculture form structures competent to differentiate functionally*." J Cell Biol **108**(3): 1127-38.

Rosario, M. y W. Birchmeier (2003). "*How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase*." Trends Cell Biol **13**(6): 328-35.

Rossi, F., E. Labourier, T. Forne, G. Divita, J. Derancourt, J. F. Riou, E. Antoine, G. Cathala, C. Brunel y J. Tazi (1996). "*Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I*." Nature **381**(6577): 80-2.

Roth, M. B., A. M. Zahler y J. A. Stolk (1991). "*A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription*." J Cell Biol **115**(3): 587-96.

Rothrock, C., B. Cannon, B. Hahm y K. W. Lynch (2003). "*A conserved signal-responsive sequence mediates activation-induced alternative splicing of CD45*." Mol Cell **12**(5): 1317-24.

Rothrock, C. R., A. E. House y K. W. Lynch (2005). "*HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer*." Embo J **24**(15): 2792-802.

Ruskin, B., P. D. Zamore y M. R. Green (1988). "*A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly*." Cell **52**(2): 207-19.

Saito, S., N. Yamaji, K. Yasunaga, T. Saito, S. Matsumoto, M. Katoh, S. Kobayashi y Y. Masuho (1999). "*The fibronectin extra domain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mechanism*." J Biol Chem **274**(43): 30756-63.

Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanford, J. R., J. Ellis, D. Cazalla y J. F. Caceres (2005). "*Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 15042-47.

Sanford, J. R., N. K. Gray, K. Beckmann y J. F. Caceres (2004). "*A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation*." Genes Dev **18**(7): 755-68.

Sarkissian, M., A. Winne y R. Lafyatis (1996). "*The mammalian homolog of suppressor-of-white-apricot regulates alternative mRNA splicing of CD45 exon 4 and fibronectin IIICS*." J Biol Chem **271**(49): 31106-14.

Sciabica, K. S., Q. J. Dai y R. M. Sandri-Goldin (2003). "*ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation*." EMBO J **22**(7): 1608-19.

Schmidhauser, C., M. J. Bissell, C. A. Myers y G. F. Casperson (1990). "*Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine beta-casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(23): 9118-22.

Schwarzbauer, J. E., C. S. Spencer y C. L. Wilson (1989). "*Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants*." J Cell Biol **109**(6 Pt 2): 3445-53.

Schwarzbauer, J. E., J. W. Tamkun, I. R. Lemischka y R. O. Hynes (1983). "*Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region*." Cell **35**(2 Pt 1): 421-31.

Sebolt-Leopold, J. S. y J. M. English (2006). "*Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules*." Nature **441**(7092): 457-62.

Serini, G., M. L. Bochaton-Piallat, P. Ropraz, A. Geinoz, L. Borsi, L. Zardi y G. Gabbiani (1998). "*The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1*." J Cell Biol **142**(3): 873-81.

Sharp, P. A. (1994). "*Split genes and RNA splicing*." Cell **77**(6): 805-15.

Shen, H. y M. R. Green (2006). "*RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans*." Genes Dev **20**(13): 1755-65.

Shen, H., J. L. Kan y M. R. Green (2004). "*Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly*." Mol Cell **13**(3): 367-76.

Shimao, Y., K. Nabeshima, T. Inoue y M. Koono (1999). "*Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF-beta1*." Int J Cancer **82**(3): 449-58.

Shin, C., Y. Feng y J. L. Manley (2004). "*Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock*." Nature **427**(6974): 553-8.

Shin, C., F. E. Kleiman y J. L. Manley (2005). "*Multiple properties of the splicing repressor SRp38 distinguish it from typical SR proteins*." Mol Cell Biol **25**(18): 8334-43.

Shin, C. y J. L. Manley (2004). "*Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing.*" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 727-38.

Singh, A., A. E. Karnoub, T. R. Palmby, E. Lengyel, J. Sondek y C. J. Der (2004). "*Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation.*" Oncogene **23**(58): 9369-80.

Singh, R., J. Valcarcel y M. R. Green (1995). "*Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins.*" Science **268**(5214): 1173-6.

Smith, C. W. y J. Valcarcel (2000). "*Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control.*" Trends Biochem Sci **25**(8): 381-8.

Smith, M. A., G. R. Fanger, L. T. O'Connor, P. Bridle y R. A. Maue (1997). "*Selective regulation of agrin mRNA induction and alternative splicing in PC12 cells by Ras-dependent actions of nerve growth factor.*" J Biol Chem **272**(25): 15675-81.

Smith, P. J., C. Zhang, J. Wang, S. L. Chew, M. Q. Zhang y A. R. Krainer (2006). "*An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers.*" Hum Mol Genet **15**(16): 2490-508.

Srebrow, A., M. Blaustein y A. R. Kornblihtt (2002). "*Regulation of fibronectin alternative splicing by a basement membrane-like extracellular matrix.*" FEBS Lett **514**(2-3): 285-9.

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

Staley, J. P. y C. Guthrie (1998). "*Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things.*" Cell **92**(3): 315-26.

Stamm, S. (2002). "*Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome.*" Hum Mol Genet **11**(20): 2409-16.

Swartz, J. E., Y. C. Bor, Y. Misawa, D. Rekosh y M. L. Hammarskjold (2007). "*The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element.*" J Biol Chem **282**(27): 19844-53.

Tacke, R. y J. L. Manley (1995). "*The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities.*" Embo J **14**(14): 3540-51.

Tacke, R. y J. L. Manley (1999). "*Determinants of SR protein specificity.*" Curr Opin Cell Biol **11**(3): 358-62.

Tacke, R., M. Tohyama, S. Ogawa y J. L. Manley (1998). "*Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing.*" Cell **93**(1): 139-48.

Tarn, W. Y. y J. A. Steitz (1996). "*A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro.*" Cell **84**(5): 801-11.

Tavian, D., G. De Petro, M. Colombi, N. Portolani, S. M. Giulini, R. Gardella y S. Barlati (1994). "*RT-PCR detection of fibronectin EDA+ and EDB+ mRNA isoforms: molecular markers for hepatocellular carcinoma.*" Int J Cancer **56**(6): 820-5.

ten Dam, G. B., C. F. Zilch, D. Wallace, B. Wieringa, P. C. Beverley, L. G. Poels y G. R. Screaton (2000). "*Regulation of alternative splicing of CD45 by antagonistic effects of SR protein splicing factors*." J Immunol **164**(10): 5287-95.

Thornton, J. K., C. Dalgleish, J. P. Venables, K. A. Sergeant, I. E. Ehrmann, X. Lu, P. T. Saunders y D. J. Elliott (2006). "*The tumour-suppressor protein ASPP1 is nuclear in human germ cells and can modulate ratios of CD44 exon V5 spliced isoforms in vivo*." Oncogene **25**(22): 3104-12.

Tian, M. y T. Maniatis (1992). "*Positive control of pre-mRNA splicing in vitro*." Science **256**(5054): 237-40.

Ule, J. y R. B. Darnell (2006). "*RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity*." Curr Opin Neurobiol **16**(1): 102-10.

Ule, J., A. Ule, J. Spencer, A. Williams, J. S. Hu, M. Cline, H. Wang, T. Clark, C. Fraser, M. Ruggiu, B. R. Zeeberg, D. Kane, J. N. Weinstein, J. Blume y R. B. Darnell (2005). "*Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse*." Nat Genet **37**(8): 844-52.

Vagner, S., B. Galy y S. Pyronnet (2001). "*Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites*." EMBO Rep **2**(10): 893-8.

van der Houven van Oordt, W., M. T. Diaz-Meco, J. Lozano, A. R. Krainer, J. Moscat y J. F. Caceres (2000). "*The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation*." J Cell Biol **149**(2): 307-16.

Vartio, T., L. Laitinen, O. Narvanen, M. Cutolo, L. E. Thornell, L. Zardi y I. Virtanen (1987). "*Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues*." J Cell Sci **88 (Pt 4)**: 419-30.

Venables, J. P. (2006). "*Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer*." Bioessays **28**(4): 378-86.

Wang, J. y J. L. Manley (1995). "*Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways*." Rna **1**(3): 335-46.

Weg-Remers, S., H. Ponta, P. Herrlich y H. Konig (2001). "*Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway*." Embo J **20**(15): 4194-203.

Werbajh, S. E., A. J. Urtreger, L. I. Puricelli, E. S. de Lustig, E. Bal de Kier Joffe y A. R. Kornblihtt (1998). "*Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells*." FEBS Lett **440**(3): 277-81.

Whitmarsh, A. J. y R. J. Davis (2000). "*Regulation of transcription factor function by phosphorylation*." Cell Mol Life Sci **57**(8-9): 1172-83.

Will, C. L. y R. Luhrmann (2001). "*Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 290-301.

Wu, J. Y. y T. Maniatis (1993). "*Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing*." Cell **75**(6): 1061-70.

Xiao, S. H. y J. L. Manley (1997). "*Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing.*" Genes Dev **11**(3): 334-44.

Xiao, S. H. y J. L. Manley (1998). "*Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2.*" Embo J **17**(21): 6359-67.

Xie, J., J. A. Lee, T. L. Kress, K. L. Mowry y D. L. Black (2003). "*Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein.*" Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8776-81.

Yaman, I., J. Fernandez, H. Liu, M. Caprara, A. A. Komar, A. E. Koromilas, L. Zhou, M. D. Snider, D. Scheuner, R. J. Kaufman y M. Hatzoglou (2003). "*The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader.*" Cell **113**(4): 519-31.

Yang, C. H., A. Murti, S. R. Pfeffer, J. G. Kim, D. B. Donner y L. M. Pfeffer (2001). "*Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt.*" J Biol Chem **276**(17): 13756-61.

Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk y M. B. Roth (1992). "*SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors.*" Genes Dev **6**(5): 837-47.

Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, W. S. Lane y M. B. Roth (1993). "*Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing.*" Science **260**(5105): 219-22.

Zardi, L., B. Carnemolla, A. Siri, T. E. Petersen, G. Paolella, G. Sebastio y F. E. Baralle (1987). "*Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon.*" Embo J **6**(8): 2337-42.

Zhang, Y., M. E. Devries y J. Skolnick (2006). "*Structure modeling of all identified G protein-coupled receptors in the human genome.*" PLoS Comput Biol **2**(2): e13.

Zhang, Z. y A. R. Krainer (2004). "*Involvement of SR proteins in mRNA surveillance.*" Mol Cell **16**(4): 597-607.

Zhao, J. J., O. V. Gjoerup, R. R. Subramanian, Y. Cheng, W. Chen, T. M. Roberts y W. C. Hahn (2003). "*Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase.*" Cancer Cell **3**(5): 483-95.

Zhou, Y. Q., C. He, Y. Q. Chen, D. Wang y M. H. Wang (2003). "*Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential.*" Oncogene **22**(2): 186-97.