

Tesis Doctoral

# Regulación del splicing alternativo en células neuronales y su relación con la estructura de la cromatina

Schor, Ignacio Esteban

2009

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

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

Cita tipo APA:

Schor, Ignacio Esteban. (2009). Regulación del splicing alternativo en células neuronales y su relación con la estructura de la cromatina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Schor, Ignacio Esteban. "Regulación del splicing alternativo en células neuronales y su relación con la estructura de la cromatina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Regulación del *splicing* alternativo en células neuronales y su relación con la estructura de la cromatina.**

Ignacio Esteban Schor

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

Director de tesis y Consejero de Estudios: Alberto R. Kornblihtt

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEyN, IFIBYNE, UBA-CONICET

Buenos Aires, 2009

# Regulación del *splicing* alternativo en células neuronales y su relación con la estructura de la cromatina.

## Resumen

Cambios en la tasa de elongación de la ARN polimerasa II (pol II) modulan los patrones de *splicing* alternativo, debido a que afectan el tiempo en el cual los sitios de *splicing* del pre-ARNm naciente son presentados a la maquinaria de *splicing* (un efecto conocido como acoplamiento cinético). Mostramos aquí un nuevo exón alternativo que responde a la elongación de la pol II: el exón 18 de la molécula de adhesión celular neural (NCAM), cuya inclusión es regulada durante la diferenciación y la plasticidad sináptica. Buscando estímulos que afecten al *splicing* alternativo a través de su acoplamiento cinético con la transcripción, encontramos que la despolarización del potencial de membrana de células neuronales provoca la exclusión del exón 18 del ARNm maduro. El efecto se observa tanto en cultivos primarios de neuronas hipocámpales como en una línea de neuroblastoma murino, y es independiente de la vía de las quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs). Un análisis de los niveles de modificaciones de histonas a lo largo del *locus* endógeno de *Ncam* revela una disminución local de marcas asociadas a transcripción activa y elongación de la pol II, como tri-metilación de H3K36 y acetilación de histonas, en la vecindad del exón 18. El tratamiento de despolarización afecta la cromatina de este gen en forma específica, causando un incremento en acetilación de H3K9 en una región interna que incluye a este exón alternativo. Esta acetilación intragénica está asociada a mayor apertura de la cromatina, mayor procesividad de la pol II y tri-metilación de H3K36 en esta región, pero no es acompañada por cambios en el promotor del gen. En base a los resultados de la tesis presentamos un modelo donde la excitación neuronal dispara cambios en la estructura de la cromatina intragénica del gen de NCAM, que facilita la elongación de la pol II en esta región y subsecuentemente causa la exclusión del exón 18 del ARNm. Este modelo señala un rol fisiológico de la modulación de la cromatina intragénica en la biogénesis de los ARNm en las células eucariotas.

**Palabras clave:** *splicing* alternativo, transcripción, cromatina intragénica, acetilación de histonas, actividad neuronal

# Regulation of alternative splicing in neuronal cells and its relation with chromatin structure

## Abstract

Changes in RNA polymerase II (pol II) elongation rates modulate alternative splicing choices, affecting the timing at which nascent pre-mRNA splice sites and regulatory sequences are presented to the spliceosome (an effect known as kinetic coupling). We show here a new case of an alternative exon that responds to pol II elongation: the exon 18 from the neural cell adhesion molecule (NCAM), whose inclusion is modulated during differentiation and synaptic plasticity. In search for physiological pathways affecting alternative splicing through its kinetic coupling with transcription, we found that membrane depolarization of neuronal cells triggers the skipping of exon 18 from mature mRNA. The effect is seen in both primary cultured neurons and N2a murine neuroblastoma cells, and is independent of the calcium/calmodulin protein kinase (CaMK) pathway. Analysis of histone modifications across the endogenous Ncam locus revealed a local decrease in marks of transcriptional elongation and active transcription, such as H3K36 tri-methylation and histone acetylation, in the neighbourhood of exon 18. Depolarization affects the chromatin template in a specific way, by causing an increase in H3K9 acetylation on an internal region of the NCAM gene surrounding the alternative exon. This intragenic histone hyperacetylation is associated with chromatin relaxation, increased pol II processivity and is linked to H3K36 tri-methylation, but is not paralleled by changes at the promoter. The effects on acetylation and splicing are reverted when the depolarizing conditions are withdrawn and can be both duplicated and potentiated by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. Based on these evidences, we present a model where neuronal excitation acts by promoting changes in the intragenic chromatin structure of the NCAM gene, which allows higher pol II elongation rates and the subsequent skipping of exon 18. This model points at a physiological role of intragenic chromatin modulation in eukaryotic mRNA biogenesis.

**Keywords:** alternative splicing, transcription, intragenic chromatin, histone acetylation, neuronal activity

## Agradecimientos

*A los ARK/AS, porque nadie hace nada sólo y nada sale de la nada. Esta tesis es tanto suya como mía:*

A Alberto, primeramente, por haberme recibido en su grupo con brazos abiertos, a pesar de la falta de espacio, becas, líneas, etc. Por preocuparse constantemente por el bienestar y crecimiento de la gente de su grupo. Por permitirse hablar de cualquier cosa con nosotros. Por caminar ágilmente por esa fina línea entre la libertad y la guía que un director debe darles a sus becarios. Principalmente, por constituir un ejemplo vivo de que la buena ciencia y los buenos resultados tienen mucho que ver con el amor y muy poco que ver con los abusos, la explotación y el autoritarismo. Y por entender que la formación y el crecimiento del becario es un resultado en sí mismo.

A Vale, fuente generadora de vitalidad de todo lo que en este grupo se hace y se deshace. No sólo por tooodo el trabajo que hace para que nosotros podamos dar rienda sueltas a nuestras muchas veces desorbitadas ideas. Ni por toda la paciencia de la que hace gala para soportarnos, que sé muy bien que es mucha. Más que nada por mantener esa alegría por la vida que la hace ser Vale, por abrirnos con placer las puertas de su casa y su familia, por estar a nuestra par (¡o más adelante incluso!) en todos los festejos y por hacer que todo sea menos cuesta arriba.

A Manu y Juan, dos muy grandes, como científicos y como personas. Y por qué no, también grandes fuerzas balanceadas, llenando de orden y des-orden, de calma y tormenta, nuestro pequeño mundo laboratoril. Espero que llenen Suiza de pampeanidad y de gorditud por algún tiempo, y que después vuelvan a donde siempre los vamos a estar esperando. Sepan que los dos marcaron estándares muy difíciles de igualar en lo que se puede enseñar dentro de un laboratorio, sin ni siquiera pretenderlo.

A Petry, por ser el alma indiscutible del grupo. Por haber desarrollado esa extraña habilidad de llevar a cualquiera al borde del asesinato y seguir siendo querible. Por vivir tirando ideas locas que algunas veces hasta podrían tener sentido. Por haber engañado tan bien a Vale haciéndole creer que sos bueno. Por acompañar siempre en el canto de cualquier hitazo que suene en los parlantes. Por alentarme y festejarme los ataques de locura de varias horas de estar sentado delante de una computadora. Y por el Pity, Pomelo y tantos otros personajes que conozco casi más que si estuvieran trabajando con nosotros todos los días.

A Nolo, por su incondicional amor al rock, el asado con vino, la picada con cerveza, el fútbol, el café, y demás cosas importantes. Por ayudar a mantener a raya a Petry. Por aparecer cada mañana como tromba independientemente del grado de sueño y

arruine que se trasluzca en tu cara. Por estar siempre más que dispuesto a mostrar, preguntar, discutir, proponer experimentos. Y por siempre ponerle pilas adentro y afuera del labo.

A Marian, por el futbol de cada finde. Por tener compasión de mi en los peores momentos de Racing. Por compartir conmigo todo el proceso y la tensión de los papers. Por haberte puesto las pilas para que se compre la Real Time y así ayudarnos mucho a todos. Por ser tan pingüino y aportarle el contrapunto necesario al clima del labo.

A Celi, por haber aparecido de un día para otro y encajado tan bien en el labo. Por soportar tan estoicamente la de huevadas que debés oír por día. Por ese incremento de participación en el mundo que se detecta en tu cara cuando suenan las palabras “comida” o “runon”. Por ser la persona perfecta para esas discusiones colgadas que uno no podría tener con nadie más.

Al Rosco, que quien sabe que será de su vida... Por llenar el laboratorio de vida, aun en una forma de vida colgada y ruidosa. Por haber llevado al límite el concepto de sonar humano. Por ser capaz de hablar con quien sea en cada momento de pipeteo. Por llenar el labo de experimentos de todo tipo. Por llenar nuestra cabeza (incluso en contra de nuestra voluntad) de preguntas sin respuesta, respuestas a preguntas que no existen y conceptos superiores sobre la metafísica de la vida. Porque lo creas no, de algo nos sirvió. Porque lo creas o no, tratamos de surfearla.

A las chicas nuevas, Mica y Lu (y próximamente Anita), por traer toda su energía al grupo y soportar nuestros achaques.

A Anabell, por sus comentarios siempre irónicos que una vez acostumbrado ayudan a tomarte la vida con humor. Por su inestimable y desprendida ayuda a la hora de enfrentar las cosas indeseables de esta carrera, sea un trámite burocrático o una voz en inglés al otro lado del teléfono. Por tener siempre como más importante a la persona, y por preocuparte de que sigamos vivos.

A Fede, por compartir conmigo tu visión particular del mundo. Por tus charlas, que siempre están, afortunadamente, en las antípodas del hablar por hablar. Por haber compartido grandes momentos. Por estar siempre de acuerdo en cuando da para poner Pink Floyd, especialmente empezar con Echoes. Y también, claro, por ser el principal responsable de mantener a raya a Petry.

Al Guille, por haber peleado palmo a palmo con Rosco el liderazgo del torneo de cuelgue y buen humor. Por tener siempre algo para decir. Por tu adorable testarudez.

Por el reggae de todos los días. Por tu capacidad para responder pedidos de temas para tocar en la viola. Sobre todo, por ser tan pero tan CARETAAAAAA.

A Mati, que no sé bien donde ponerlo pero siempre me sale con los AS. Por tu aguante gigante, para todo lo que nos depara la vida. Por estar guiado por la preocupación por los demás. Por no conformarte con lo que tenés y seguir dándole vueltas a lo que no cierra. Por tratar siempre de llegar al fondo de las cosas. Por los viajes (vacaciones y los otros) compartidos. Por ser el principal responsable de mi llegada al labo. Por ser también un importante responsable de mis intentos de cambiar las cosas. También por los momentos compartidos en la carrera, por los ejemplos que me diste, por el aliento, por los consejos, por todo... Quién sabe si hoy estaría haciendo ciencia si no fuera por tus intervenciones.

*Al resto del LFBM, por proveer un lugar tan impresionante y sorprendente (¡no me van a decir que cada día no nos depara una sorpresa nueva!) para hacer ciencia.*

*En especial a los becarios, que siguen poniéndole el hombro a las adversidades:*

A los EAs, porque a pesar de que uno los quiere matar por la entropía que generan día a día, el labo no tendría sentido sin ustedes. Porque de tantos que son, le ponen onda al mundo laboratoril (quizás porque deforman el espacio con su presencia). Porque siempre está alguno de ustedes el fin de semana y uno se siente menos solo, aunque solo crucemos un hola y un chau. ¡¡Porque casi casi que nos vamos entendiendo!! Sobre todo porque la siguen peleando ante condiciones claramente adversas.

A los ACLs, porque han definido nuevas marcas de capacidad de generación de conocimiento/área ocupada. Porque siempre se puede tomar un mate en su labo. Por haber soportado con estoicismo las injustas acusaciones de contaminar todo el LFBM con levaduras. Pero sobre todo, por mantener ocupado a Colman tiempo suficiente para permitir la vida en la Tierra (va con cariño Ale, eh).

A los habitantes del lado sur, OACs, PCs, SRs y Sczupaks. A Solcis, Diego Caballito, Bernon (sin h), Juli, Flor, Dai, etc. Por construir un mundo alternativo, similar pero completamente distinto al norte... ¡casi un refugio! Por los miles de mates y cientos de galletitas que me convidan cuando tengo que esperar a que alguien (lease un EA) salga del cuarto de revelado o a que Alberto se libere. Por la buena onda constante y las tan interesantes conversaciones con las que uno se cruza al entrar al LFBM austral.

A los demás integrantes del LFBM, NDIs, ODUs, FMs, MPs, y asociados, por contribuir con la buena onda (a veces más, a veces menos) y el clima del laboratorio.

A los que pasaron y ya no están, pero dejaron su huella. En particular a Tama que la extrañamos mucho. También a Gustavo e Itatí, dos grandes personas siempre dispuestos a ayudar y aportar. Y a Refojo también, por hacer convivir el mal y el bien tan cercanamente como sea posible.

*También a los investigadores del LFBM, en particular a los que trabajan sin mezquindades para construir un buen lugar donde investigar, enseñar y formar nuevos científicos. Más allá de las diferencias.*

*A los Jóvenes Científicos Precarizados, en particular a los que trabajan sin mezquindades para que se abandone la insensatez institucionalizada de considerar al becario doctoral como un niño privilegiado que debe vivir en perpetua gratitud con la mano que lo alimenta.*

*A los amigos de la facu, por ser tan grata compañía en este mundo que tanta facilidad tiene para chuparte y por enseñarme tantas cosas:*

A las chicas, Car, Sil, Noe, Cha, por la compañía siempre amena en diferentes momentos de este doctorado. A Monky, Diegui y Lu, Ceci, Dani, Nouki, May, Tami, Ari y Flor, por esas memorables cenas y reuniones que hacen de la vida algo más lindo. A los demás NEIs (¡jaguante!) Nico, Euge, Bernon, Tincho, Paula, Anibal, etc. simplemente por animarse a tratar de cambiar las cosas y por crear amistad y compañía en el camino.

A los ex-compañeros del INGEBI, por las pasadas tardes de cerveza y ping pong, por los reencuentros en los Congresos y por la buena onda siempre. A los nuevos compañeros de los alrededores del segundo piso de la FCEyN, por esas frases que se sueltan en los pasillos al ir de un lado al otro y que constituyen ya una nueva forma de comunicación. Por la buena onda para aconsejar, prestar reactivos, prestar apoyo psicológico, etc.

*A mi familia y amigos de la vida, por dar sentido a las cosas:*

A mis viejos, por salir adelante a pesar de todo. Por enseñarme un montón de cosas más que importantes, y que recién llegué a valorar con los años y la distancia. Por

darle toda la libertad, el apoyo y la confianza para salir adelante. Por la inmensa comprensión y el aguante que me tuvieron. Los quiero mucho.

A mis hermanas, por sorprenderme cada día. A Eva, por mostrarme como se le puede buscar la vuelta a la vida. Por nuestra esporádica pero no por eso menos importante relación. Por los chocolates y las cervezas de Bélgica. A Ceci, por perdonarme los olvidos y cuelgues. Por traer al mundo a la sobrina más hermosa y compradora que pueda haber nacido. Y por dejarme malcriarla un poco.

Al resto de mi familia, Alicia y María, Silvina y cia, y demás tíos y primos, por el cariño y el aguante y por las tardes de fines de semana de mate y charla.

A la banda de siempre, que últimamente viene incorporando promesas de la nueva generación: Sapo y Ale, Negro y Lu + Juli y Santi, Santi y Cele + Mati, Pablín y Lore, Capín y Gisella. También a Ceci, allá lejos, con su hermosa noticia. Simplemente porque sé lo importante que es que ustedes estén ahí, más allá que la vida vaya separando nuestros caminos. Siempre fueron y siguen siendo de las cosas más valiosas que llevo conmigo.

A los que te va cruzando la vida. Al Ale, por ser el Ale, por tocar tantos instrumentos, por la onda y la amistad. A Juani, por las míticas tardes de cañoncito. A la gente de percu, con la que tanto tiempo compartí en un tiempo y de la que tanto aprendí. A Ani, por darme un par de golpes hermosos y necesarios e irse, y así todo seguir siendo mi amiga. A Nu, por estar siempre incluso sin estar.

A Lu, porque sos todo lo que importa. Porque nada tiene sentido si no tiene que ver con vos. Porque mi vida con vos es mi proyecto máspreciado. Porque no necesito explicarte en esta hoja de papel cuanto te quiero.

## Reconocimientos

Escribo en esta hoja los merecidos reconocimientos a los que hicieron aportes al trabajo realizado en esta tesis:

- A Nicolás Rascován (a.k.a. Rosco) por su ayuda en experimentos varios y particularmente por el trabajo para el clonado del promotor en el minigén, los primeros experimentos y puestas a puntos del minigén y el análisis de la sobreexpresión de las SRs.
- A Kaitlyn Coil (a.k.a. Katie) por su participación en los experimentos de silenciamiento de proteínas SRs.
- A Mariano Allo (a.k.a. Mary Ann) por la puesta a punto y el invaluable asesoramiento del nChIP.
- A Federico Pelisch (a.k.a. El Fede) por experimentos y consejos varios, particularmente con su ayuda con los westerns.
- A Matías Blaustein (a.k.a. Matius) por su ayuda permanente, sugerencia de experimentos y consejos con los inhibidores.
- A Manuel de la Mata (a.k.a. Pampa) por poner a punto el sistema de la polimerasa lenta y por la cantidad y calidad de asesoramiento y consejos que me dio en estos años.
- A Valeria Buggiano por todo lo que hace por todos nosotros (mantenimiento de líneas, plaqueo de células, preparación de soluciones varias, autoclavado de material, etc.) y por su invaluable e imprescindible ayuda con los cultivos primarios.
- A Lucía Durrieu por el consejo constante y por la lectura y corrección de esta tesis.
- A Itatí Ibañez por su ayuda con los cultivos primarios y a los demás integrantes del grupo Uchitel por su asesoramiento con canales e inhibidores.
- A Manuel Muñoz, Ezequiel Petrillo, Juan Pablo Fededa, Celina Lafaille y Guillermo Risso por consejos y discusiones varios.
- A Flavia Bollati y Alfredo Cáceres por enseñarme a preparar los cultivos primarios.
- A Adrian Senderowicz por el flavopiridol.
- A Benoit Chabot por los plásmidos de NCAM.

## Publicaciones

### Trabajos originales

**Schor, I.E.**, Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., Kornblihtt, A.R. (2009) Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009 106(11):4325-4330. Epub 2009 Feb 26.

Alló, M., Buggiano, V., Fededa, J. P., Petrillo, E., **Schor, I.E.**, de la Mata, M., Agirre, E., Plass, M., Eyra, E., Abou Elela, S., Klinck, R., Chabot, B. and Kornblihtt, A. R. siRNA-mediated epigenetic control of alternative splicing. (2009) Enviado a Nature Structural & Molecular Biology.

### Revisiones y comentarios

**Schor, I.E.** & Kornblihtt, A.R. (2009) Playing inside the genes: Intragenic histone acetylation after membrane depolarization of neural cells opens a path for alternative splicing regulation. Communicative & Integrative Biology, Volume 2 (Issue 4).

## Abreviaturas

<b>5aC:</b>	5-aza-citidina (inhibidor de metil-transferasas de ADN)
<b>Act D:</b>	actinomicina D
<b>ADN:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc:</b>	ADN copia (proveniente de retro-transcripción de un ARN)
<b>ARN:</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm:</b>	ARN mensajero
<b>CaMKs:</b>	kinasa dependiente de calcio/calmodulina
<b>CaRRE:</b>	elemento de ARN que responde a CaMKIV
<b>CHX:</b>	cicloheximida
<b>CTD:</b>	dominio carboxi-terminal del la ARN pol II
<b>DMSO:</b>	di-metil-sulfóxido
<b>dNTPs:</b>	desoxirribonucleósidos tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<b>DRB:</b>	5, 6-di-cloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol (inhibidor de P-TEFb)
<b>E18:</b>	exón 18 (de NCAM)
<b>EDI:</b>	dominio extra I (exón alternativo de fibronectina)
<b>EST:</b>	etiquetas de secuencias expresadas
<b>FN:</b>	fibronectina
<b>FP:</b>	flavopiridol (inhibidor de P-TEFb)
<b>H3 S10P K14ac:</b>	histona H3 fosforilada en serina 10 y acetilada en serina 14
<b>H3ac:</b>	histona H3 acetilada en lisinas 9 y 14
<b>H3K27me3:</b>	histona H3 tri-metilada en lisina 27
<b>H3K36me3:</b>	histona H3 tri-metilada en lisina 36
<b>H3K4me3:</b>	histona H3 tri-metilada en lisina 4
<b>H3K9ac:</b>	histona H3 acetilada en lisina 9
<b>H3K9me2:</b>	histona H3 di-metilada en lisina 9
<b>H3K9me3:</b>	histona H3 tri-metilada en lisina 9
<b>H3S10P:</b>	histona H3 fosforilada en serina 10
<b>H4ac:</b>	histona H4 acetilada en lisinas 5, 8, 12 y 16
<b>H4K16ac:</b>	histona H4 acetilada en lisina 16
<b>HAT:</b>	acetil-transferasa de histonas
<b>HDAC:</b>	des-acetilasa de histonas
<b>hnRNP:</b>	ribonucleoproteína nuclear heterogénea
<b>LTP:</b>	potenciación a largo plazo
<b>NCAM:</b>	molécula de adhesión celular neural
<b>nChIP:</b>	inmunoprecipitación de la cromatina nativa o nucleosomal
<b>NMDA:</b>	ácido N-metil-D-aspartico
<b>nt:</b>	nucleótidos
<b>NTPs:</b>	ribonucleósidos tri-fosfato (ATP, CTP, GTP, UTP)
<b>pb:</b>	pares de bases
<b>PBS:</b>	<i>buffer</i> salino de fosfato
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>pol:</b>	ARN polimerasa
<b>pre-ARNm:</b>	ARN precursor del mensajero
<b>RPA:</b>	ensayo de protección contra la RNasa
<b>RT:</b>	retro-transcripción
<b>SA:</b>	splicing alternativo
<b>siRNA:</b>	ARN pequeño interferente
<b>snRNP:</b>	ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
<b>STP:</b>	potenciación a corto plazo
<b>TSA:</b>	trichostatina A (inhibidor de HDACs)

## Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	<i>El splicing alternativo y su relación con la transcripción</i> .....	1
1.1.1.	<b>Generación y procesamiento de ARNm en los organismos eucariotas</b> .....	1
1.1.2.	<b>Significado del <i>splicing</i> alternativo</b> .....	2
1.1.3.	<b>Regulación del <i>splicing</i> alternativo</b> .....	6
1.1.4.	<b><i>Splicing</i> co-transcripcional</b> .....	8
1.1.5.	<b>Influencia de la transcripción en el <i>splicing</i> alternativo</b> .....	11
1.2.	<i>La transcripción y el rol de la cromatina en la expresión génica</i> .....	14
1.2.1.	<b>El ciclo de la transcripción</b> .....	14
1.2.2.	<b>Regulación de la elongación de la ARN pol II</b> .....	15
1.2.3.	<b>Transcripción en un molde cromatinizado</b> .....	18
1.2.4.	<b>Acetilación de histonas</b> .....	21
1.2.5.	<b>Otras modificaciones de histonas</b> .....	24
1.2.6.	<b>Metilación del ADN</b> .....	26
1.3.	<i>Regulación de la expresión génica y el <i>splicing</i> alternativo en sistema nervioso</i> .....	28
1.3.1.	<b>El sistema nervioso como modelo</b> .....	28
1.3.2.	<b>Importancia de la modulación de la cromatina en el sistema nervioso</b> .....	29
1.3.3.	<b>Vías de regulación de modificadores de histonas involucradas en respuesta a la actividad neuronal</b> .....	32
1.3.4.	<b><i>Splicing</i> alternativo en el sistema nervioso</b> .....	33
1.3.5.	<b><i>Splicing</i> alternativo regulado por actividad neuronal</b> .....	36
1.4.	<i>Modelo de trabajo: <i>splicing</i> alternativo del exon 18 de NCAM</i> .....	38
1.4.1.	<b>El gen y la proteína NCAM</b> .....	38
1.4.2.	<b>El <i>splicing</i> alternativo del exon 18 de NCAM</b> .....	40
1.4.3.	<b>Regulación del <i>splicing</i> alternativo de NCAM</b> .....	42
2.	Objetivos .....	43
	Objetivo general .....	43
	Objetivos específicos .....	43
3.	Resultados.....	44
3.1.	<i>Sistema de trabajo. Regulación del <i>splicing</i> alternativo (SA) del exon 18 de NCAM</i> .....	44
3.1.1.	<b>Modelo de trabajo</b> .....	44
3.1.2.	<b>Diferenciación celular</b> .....	45
3.1.3.	<b>Proteínas reguladoras de <i>splicing</i></b> .....	47
3.1.4.	<b>La tasa de elongación de la ARN pol II afecta el SA del E18 de NCAM</b> .....	49
3.1.5.	<b>La acetilación de histonas afecta el SA del E18 en células neuronales</b> .....	51
3.2.	<i>Efecto de la actividad neuronal en el <i>splicing</i> alternativo del exon 18 de NCAM</i> .....	53
3.2.1.	<b>La excitación de células neuronales con altas concentraciones de K<sup>+</sup> provoca un cambio en el SA del E18</b> .....	53
3.2.2.	<b>El efecto de despolarización es directo y reversible</b> .....	56
3.2.3.	<b>Participación de elementos regulatorios del <i>splicing</i> en el efecto de la despolarización sobre el SA del exón 18</b> .....	60

3.2.4.	<b>Participación de la transcripción en el efecto de la despolarización sobre el SA del exón 18</b> .....	62
3.3.	<i>Modificaciones cromatínicas en el locus de NCAM y su influencia en el splicing alternativo del exon 18.</i> .....	64
3.3.1.	<b>La excitación neuronal aumenta los niveles globales de histonas acetiladas</b> .....	64
3.3.2.	<b>La región intragénica cercana al exón 18 de NCAM muestra una distribución particular de marcas cromatínicas</b> .....	65
3.3.3.	<b>La despolarización causa cambios de las modificaciones de histonas en una región intragénica de NCAM</b> .....	68
3.3.4.	<b>El aumento en acetilación está asociado a mayor accesibilidad de la cromatina y procesividad de la pol II</b> .....	69
3.3.5.	<b>La acetilación de histonas es parte de la vía de regulación del SA en respuesta a la excitación neuronal</b> .....	72
4.	Discusión.....	75
4.1.	<i>El modelo cinético como marco explicativo de la regulación del splicing alternativo</i> .....	75
4.1.1.	<b>¿Cambian las propiedades de elongación de la pol II dentro del locus de NCAM en respuesta al tratamiento de despolarización?</b> 75	
4.1.2.	<b>¿Son los cambios en la cromatina causantes de los cambios en elongación y en <i>splicing</i> alternativo?</b> .....	77
4.1.3.	<b>¿Son los cambios en elongación responsables de la modulación en el <i>splicing</i> alternativo del E18?</b> .....	79
4.1.4.	<b>¿El modelo cinético es capaz de explicar la regulación del <i>splicing</i> de NCAM en respuesta al tratamiento con KCl?</b> .....	81
4.1.5.	<b>Relevancia del modelo cinético en la regulación del <i>splicing</i> alternativo</b> .....	84
4.2.	<i>La regulación del splicing en respuesta a la excitación neuronal</i> .....	86
4.2.1.	<b>Posibles mecanismos de regulación del SA del E18 de NCAM</b> .....	86
4.2.2.	<b>Posible significado funcional de la regulación del <i>splicing</i> alternativo de NCAM</b> .....	88
4.3.	<i>La modulación intragénica de la cromatina y sus posibles funciones</i> .....	90
4.3.1.	<b>Estructura de la cromatina en el locus de <i>Ncam</i></b> .....	90
4.3.2.	<b>La modulación de la cromatina en respuesta a la excitación neuronal</b> .....	92
4.3.3.	<b>¿Por qué cromatina intragénica?</b> .....	95
4.4.	<i>La acetilación de histonas, el splicing alternativo y la función neuronal: terreno fértil para explorar</i> .....	97
5.	Conclusiones.....	99
	Conclusiones principales.....	99
	Otras conclusiones.....	100
6.	Materiales y Métodos.....	101
6.1.	<i>Plásmidos utilizados</i> .....	101
6.1.1.	<b>Minigén reportero de splicing alternativo</b> .....	101
6.1.2.	<b>Vectores de expresión de ARN polimerasa II</b> .....	102
6.1.3.	<b>Vectores de expresión de proteínas reguladoras de splicing</b> ....	102
6.2.	<i>Preparación de plásmidos</i> .....	103
6.2.1.	<b>Transformación de bacterias</b> .....	103
6.2.2.	<b>Preparación de plásmidos a pequeña escala (minipreps)</b> .....	103
6.2.3.	<b>Preparación de plásmidos a mediana y gran escala (midi y maxiprep)</b> .....	103
6.2.4.	<b>Cuantificación del ADN y el ARN</b> .....	103

6.3.	<i>Cultivos celulares, transfecciones y tratamientos</i> .....	104
6.3.1.	<b>Cultivo de las líneas N2a y NIH-3T3</b> .....	104
6.3.2.	<b>Diferenciación de las células N2a</b> .....	105
6.3.3.	<b>Inmunofluorescencia indirecta</b> .....	105
6.3.4.	<b>Transfección de células N2a con ADN</b> .....	106
6.3.5.	<b>Transfección de células N2a con ARNs pequeños interferentes</b> .....	107
6.3.6.	<b>Obtención y cultivo de neuronas piramidales de hipocampo de rata</b> .....	107
6.3.7.	<b>Tratamientos de células con K<sup>+</sup> e inhibidores farmacológicos</b> ..	108
6.4.	<i>Extracción y análisis de ARN</i> .....	110
6.4.1.	<b>Extracción de ARN total de cultivos celulares</b> .....	110
6.4.2.	<b>Evaluación de los patrones de splicing alternativo por RT-PCR</b> .....	111
6.4.3.	<b>Ensayo de protección contra la RNasa (RPA)</b> .....	115
6.4.4.	<b>Evaluación de los niveles de ARNm</b> .....	119
6.4.5.	<b>Evaluación de la relación de pre-ARNm distal/proximal</b> .....	119
6.5.	<i>Ensayos de determinación de modificaciones de la cromatina</i> .....	121
6.5.1.	<b>Medición de la acetilación global de histonas</b> .....	121
6.5.2.	<b>Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)</b> .....	122
6.5.3.	<b>Ensayo de accesibilidad con MspI</b> .....	126
6.6.	<i>Oligonucleótidos utilizados</i> .....	128
6.6.1.	<b>Oligonucleótidos iniciadores para PCR</b> .....	128
7.	<i>Bibliografía</i> .....	131

# 1. Introducción

---

## 1.1. *El splicing alternativo y su relación con la transcripción*

### 1.1.1. **Generación y procesamiento de ARNm en los organismos eucariotas**

Los pasos bioquímicos que conducen el flujo de la información genética se muestran conservados en tal forma en todos los dominios de la vida, que esta conservación ha dado lugar, con algunas modificaciones, al llamado “dogma” de la biología molecular: la información presente en la molécula heredable y replicable de ADN (genes) da lugar a una molécula de ARN (mensajero) con la misma información por un proceso denominado **transcripción**; la información contenida en dicho mensajero será luego leída por la maquinaria de síntesis de proteínas (los ribosomas) en un proceso denominado **traducción**.

La transcripción de los distintos genes nucleares eucariotas es llevada a cabo típicamente por tres ARN polimerasas (pol): la ARN pol I transcribe los ARN ribosomales 28S, 18S y 5.8S, la ARN pol II transcribe todos los ARN mensajeros y distintas clases de ARN pequeños, mientras que la ARN pol III transcribe ARN de transferencia y ribosomales 5S. Recientemente, se ha descubierto una cuarta polimerasa eucariota de origen mitocondrial (ARN pol IV), al parecer involucrada en la transcripción de algunos ARN mensajeros (Kravchenko 2005). Cada una de estas polimerasas es reclutada a los sitios de transcripción por diferentes secuencias promotoras de la transcripción, con la participación de distintos factores auxiliares, llamados factores de transcripción.

En los procariotas (organismos sin núcleo) la transcripción genera moléculas de ARN mensajero (ARNm) que son, por su localización y estructura, sustrato directo de traducción. A diferencia de esta situación, en los eucariotas el metabolismo del ARN constituye un grupo mucho más complejo de pasos y mecanismos regulatorios. En primer lugar, la maduración del ARNm requiere una

serie de pasos de **procesamiento**: el ARN precursor (también llamado transcripto primario) debe sufrir el agregado de un nucleótido GTP modificado, llamado capuchón o *cap*, en el extremo 5'; debe también sufrir un corte hacia el extremo 3' del transcripto y la adición de varios nucleótidos de adenina, generando un extremo 3' definido; en algunos casos sufre también la modificación de ciertos nucleótidos, un proceso denominado edición. Sufre además un curioso proceso de escisión de segmentos internos por reacciones de corte y empalme, dando como resultado un ARNm maduro más corto, a través del proceso denominado ***splicing***. En segundo lugar, mientras que la traducción es llevada a cabo en el citoplasma, la transcripción y el procesamiento son procesos típicamente nucleares. Esta localización diferencial trae consigo la necesidad de una maquinaria de exportación de los mensajeros desde el núcleo hasta el citoplasma.

Es digno de mención el hecho de que, si bien todos los niveles de procesamiento y exportación resultan un importante gasto de energía para la células, dichos procesos son importantes para una correcta, eficiente y segura traducción de los mensajeros provenientes de genes celulares, a la vez que dan lugar a múltiples pasos de regulación de la expresión génica que pueden ser aprovechados por las células para regular diversas vías. Como una ventaja adicional, poco a poco fue siendo cada vez más claro que tanto la transcripción como el procesamiento del ARN en eucariotas pueden contribuir a la generación de variantes proteicas, a través de eventos de inicio de la transcripción alternativo (Quelle 1995), de corte y poli-adenilación alternativo (Gautheret 1998) o de ***splicing*** alternativo (Black 2000; Graveley 2001; Maniatis y Tasic 2002). La información con la que contamos hoy en día muestra que, de todos ellos, el ***splicing*** alternativo es el mayor contribuyente a la generación de variabilidad proteica, con cerca de un 70% de los genes humanos con múltiples exones mostrando al menos un evento de ***splicing*** alternativo (Johnson 2003).

### 1.1.2. Significado del ***splicing*** alternativo

Para entender el ***splicing*** alternativo es necesario describir primero cómo se produce el proceso de ***splicing*** normal (también llamado constitutivo) en las células. Un análisis de la estructura de la región transcripta de un gen eucariota

permite distinguir dos tipos de secuencias: las que estarán presentes en el ARNm maduro (o en alguno de los posibles ARNm alternativos), que forman los segmentos llamados **exones**; las que serán eliminadas del ARNm en el proceso de *splicing*, formando lo que conocemos como **intrones**. Estas secuencias no están caracterizadas así únicamente por cuál será su destino final, sino que contienen elementos que las definen como tales (Black 2003). En particular, los casos de *splicing* constitutivo muestran en los límites entre exones e intrones secuencias consenso características, conocidas como dador y aceptor de *splicing*, cuyo grado de conservación es variable en los distintos eucariotas (Fig. 1.1). Estos elementos reclutan factores de la maquinaria basal de *splicing* (como por ejemplo los complejos ribonucleoproteicos conocidos como snRNPs) y factores auxiliares, que promueven el reconocimiento de los intrones y exones y el apareamiento entre los sitios dadores y aceptores para permitir que la reacción de *splicing* ocurra en forma precisa y eficiente.



Figura 1.1. **Regiones del ARN que participan en el proceso de *splicing* en metazoos y algunos de los factores que las reconocen.** El esquema muestra dos exones (cajas amarillas) flanqueando un intrón. Se aclaran los sitios 3' y 5' de *splicing* y el sitio de ramificación con sus secuencias consenso. Las cajas azules corresponden a los distintos factores que participan en el reconocimiento inicial de dichas secuencias (tomado y modificado de Srebrow y Kornblihtt 2006).

Dos modelos alternativos se plantean para explicar cómo se reconocen exones e intrones (Berget 1995). El reconocimiento puede darse por **definición intrónica** (Fig 1.2, izq.), reconociendo ambos sitios de *splicing* en un mismo intrón y apareándose los dos extremos de la región que debe ser eliminada, como se observa típicamente en organismos como las levaduras que tienen intrones cortos y con sitios de *splicing* muy conservados (Ruby y Abelson 1991). Por el contrario,

en organismos eucariotas de genomas más complejos, como los mamíferos, la definición intrónica es complicada por la gran longitud de los intrones y por la menor conservación de los sitios de *splicing*, recurriéndose por lo tanto a la **definición exónica** (Fig 1.2, der.), donde el apareamiento de los complejos correspondientes a los extremos de un exón marca la región a ser mantenida en el ARNm maduro, debiéndose aparear luego a un exón definido adyacente para la eliminación del intrón (Berget 1995). En ambos casos, el acontecimiento clave es justamente la eliminación del intrón a través de un proceso que involucra varios pasos, en los cuales diferentes proteínas y complejos ARN-proteína, agrupados en un mega-complejo dinámico conocido como **spliceosoma**, van reclutándose y abandonando el ARNm (Staley y Guthrie 1998; Black 2003; House y Lynch 2008).

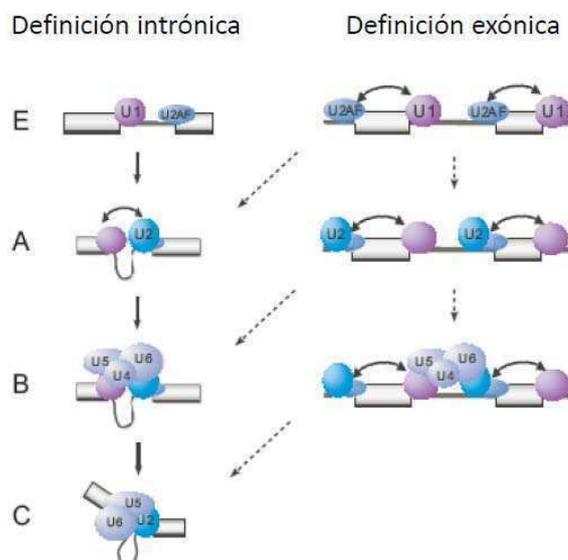


Figura 1.2. **Definición intrónica y exónica y pasos iniciales del proceso de splicing.** El esquema muestra los diferentes complejos (E, A, B y C) que se van sucediendo en los primeros pasos del proceso de splicing. Se presentan los modelos correspondientes a definición intrónica (*izquierda*) y exónica (*derecha*) (tomado de House y Lynch 2008).

El reconocimiento de exones e intrones y el apareamiento de complejos de *splicing* adyacentes constituyen condiciones fundamentales para que la reacción de *splicing* se lleve a cabo. Cualquier interferencia con el reconocimiento de los sitios de *splicing* o con el apareamiento de los complejos (por ejemplo por cambios de bases que alejen las secuencias del consenso, por aumento en la longitud de exones o intrones, por formación de estructuras secundarias o unión de proteínas que interfieran con los procesos, etc.) puede provocar una disminución de la eficiencia del *splicing*. Si bien esto podría llevar a la inhibición total de dicho evento de *splicing*, en muchos mensajeros esta menor eficiencia causa que algunas veces el sitio de *splicing* implicado sea utilizado y otras veces no, lo cual constituye el

principio del *splicing* alternativo. Dependiendo del sitio mutado, de la presencia de sitios alternativos cercanos y de la preeminencia de definición exónica o intrónica, distintos tipos de *splicing* alternativo pueden ser observados: exón *cassette*, sitios aceptores o dadores alternativos, exones mutuamente excluyentes o intrones retenidos (Fig. 1.3).

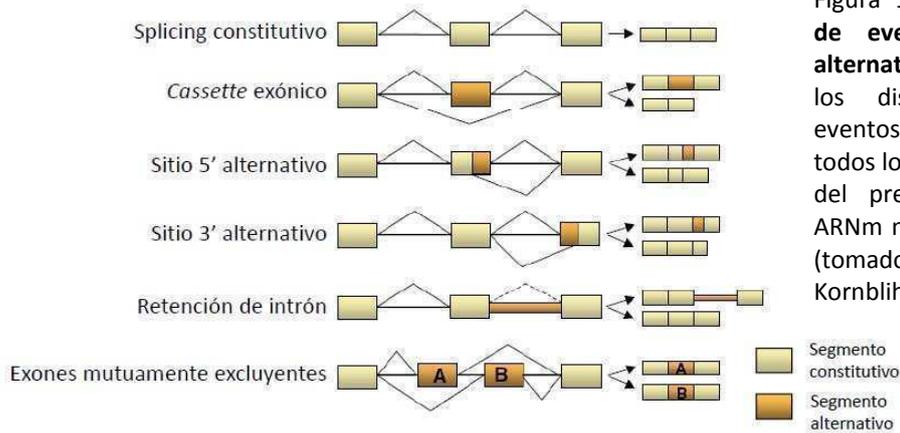


Figura 1.3. **Distintos tipos de eventos de *splicing* alternativo.** Se muestran los distintos tipos de eventos, indicando en todos los casos un esquema del pre-ARNm y de los ARNm maduros resultantes (tomado de Srebrow y Kornblihtt 2006).

Cabe considerar por qué existen en los organismos eucariotas estos casos de eventos de *splicing* inefficientes. Si son originados por mutaciones de sitios de *splicing* más fuertes, ¿por qué estas mutaciones no son eliminadas por selección negativa? Una explicación posible sería que los exones alternativos surjan a partir de secuencias intrónicas y que este estado de baja eficiencia de inclusión corresponda a un período de prueba, en el cual, además de producir la nueva variante, se sigue produciendo la variante antigua. La evolución podría luego favorecer la adquisición del nuevo evento o su eliminación. Los eventos de *splicing* alternativos corresponderían, por lo tanto a estados transitorios de exones que serán eliminados o serán constitutivos (Ermakova 2006).

Sin embargo, la conservación de muchos eventos de *splicing* alternativo en diferentes especies sugiere que al menos otra explicación existe. Y esta podría consistir en que para la célula resulta de gran utilidad mantener la capacidad de producir productos distintos a partir de un único gen, otorgándole una forma económica de aumentar su diversidad proteica. De hecho, se ha propuesto que en muchos casos, los eventos de *splicing* alternativo provienen de eventos de *splicing* constitutivo por aparición de un sitio de *splicing* competidor (Koren 2007). La situación en la cual esto consiste en una ventaja para la célula es que el proceso de

*splicing* alternativo puede ser regulado, y en este sentido se sabe que, por ejemplo, los exones que muestran regulación específica de tejido muestran un alto grado de conservación de secuencia entre especies y un gran sesgo hacia longitudes múltiplos de 3, sugiriendo una relevancia funcional de esta situación regulatoria (Xing y Lee 2005).

### 1.1.3. Regulación del *splicing* alternativo

Distintos elementos, actuando en *cis* o en *trans*, pueden combinarse para regular cuál será el patrón resultante de un evento de *splicing* alternativo. Entre los elementos regulatorios en *cis* encontramos secuencias lineales de pocos nucleótidos que pueden ser exónicas o intrónicas, y que pueden actuar tanto favoreciendo (*enhancers*) como desfavoreciendo (*silencers*) la utilización de un sitio de *splicing* sub-óptimo determinado (Caceres y Kornblihtt 2002). Sin embargo, también existen diferentes estructuras secundarias que pueden favorecer o desfavorecer la utilización de un sitio de *splicing*, o el reconocimiento de otra secuencia regulatoria, y que por lo tanto constituyen elementos regulatorios a tener en cuenta (Blanchette y Chabot 1997; Jacquenet 2001; Buratti y Baralle 2004; Buratti 2004; Graveley 2005). Posiblemente debido a la importancia de estos elementos regulatorios en *cis*, los intrones flanqueantes muestran secuencias evolutivamente más conservadas en los exones alternativos que en los constitutivos (Sorek y Ast 2003; Sugnet 2006).

La otra cara de este tipo de regulación está dada por la presencia de numerosas proteínas que, por unirse directamente al ARNm y/o a través de la interacción con proteínas de la maquinaria de *splicing*, regulan el resultado de un evento de *splicing* (Fig. 1.4). Estos reguladores se unen a los elementos en *cis* mencionados antes y, dependiendo de la proteína y del contexto, pueden actuar en forma positiva o negativa sobre el *splicing* alternativo (Caceres y Kornblihtt 2002), aunque también muestran funciones en otros pasos del metabolismo del ARN, como puede ser la transcripción (Lin 2008), la estabilidad (Lemaire 2002), la exportación (Reed y Cheng 2005) o la traducción (Sanford 2004). De hecho, las mismas o distintas proteínas pueden participar en distintos pasos del metabolismo de un determinado ARNm (Blaustein 2005; Bjork 2009).

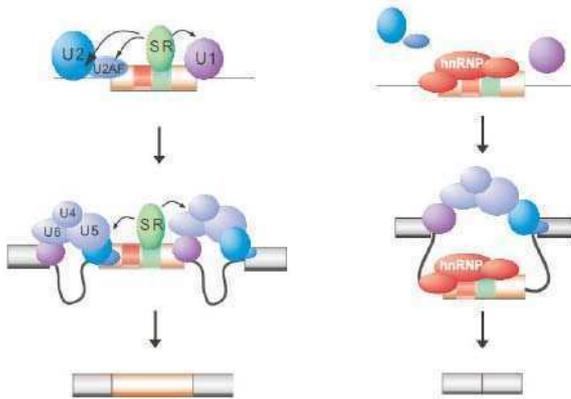


Figura 1.4. **Elementos reguladores del splicing alternativo.** Se esquematiza sobre un exón alternativo (en amarillo) con sus intrones y exones constitutivos adyacentes (en gris), la participación y el posible mecanismo de acción de elementos en *cis* (cuadros de colores) y en *trans* (óvalos). En este caso los elementos en *trans* positivos son proteínas SR y los negativos, hnRNPs. En verde se indican los elementos positivos y en rojo los negativos (tomado de House y Lynch 2008).

Una de las familias más numerosas y estudiadas de estos reguladores de *splicing* es la constituida por las proteínas SR, un grupo de proteínas altamente conservadas en los metazoos con funciones en *splicing* tanto constitutivo como alternativo (Fu 1995; Graveley 2000). Estas proteínas tienen una estructura modular (Caceres 1997), caracterizada por la presencia de uno o más dominios de unión al ARN tipo RRM y un dominio rico en serinas y argininas (dominio RS) que es blanco de extensas fosforilaciones y participaría en la interacción de las proteínas SR con otras proteínas.

Otro importante grupo de proteínas con funciones regulatorias en *splicing* constitutivo y alternativo, son las llamadas ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs), un grupo de proteínas muy abundantes en el núcleo eucariota, que contienen dominios de unión al ARN tipo RRM y KH, y se unen con distinto grado de especificidad a las moléculas de ARN de alto peso molecular (incluyendo los ARNm) regulando diversos pasos de su metabolismo (Krecic y Swanson 1999). A nivel de *splicing*, generalmente se unen a elementos silenciadores, disminuyendo la eficiencia de utilización de los sitios de *splicing* proximales (Yang 1994).

Justamente a este nivel se han descrito varios casos de antagonismo entre proteínas SR y hnRNPs (Mayeda y Krainer 1992; Caceres 1994). También distintas proteínas SRs pueden tener roles opuestos en la regulación del mismo evento de *splicing* alternativo (Jumaa y Nielsen 1997; Cramer 1999). Estas circunstancias indican que sobre el mismo evento de *splicing* alternativo pueden actuar diferentes elementos regulatorios a la vez y que el patrón de *splicing* resultante responderá a

la contribución relativa de todos esos elementos, un modelo que se denominó regulación combinatorial del *splicing* alternativo (Smith y Valcarcel 2000). El patrón de *splicing* resultante puede por lo tanto variar en los diferentes tipos celulares, en función de la abundancia relativa de las diferentes proteínas reguladoras. A su vez, el *splicing* alternativo puede ser regulado dinámicamente en respuesta a estímulos externos o internos de la célula. Los mecanismos de regulación dinámica más caracterizados se basan en cambios en la localización o modificaciones post-traduccionales de proteínas reguladoras (Blaustein 2007; Lynch 2007).

El panorama se complejiza un poco más al considerar la regulación del *splicing* en genes con más de un evento de *splicing* alternativo. Aunque se desconoce el mecanismo preciso, se sabe que el resultado de un evento de *splicing* puede afectar positiva o negativamente a otro evento en el mismo ARNm (Romano 2001; Fededa 2005; Lenasi 2006), y existen fuertes evidencias de que la influencia mostraría una polaridad 5' -> 3': eventos alternativos proximales al promotor ejercen mayor influencia sobre eventos distales que viceversa (Fededa 2005).

#### **1.1.4. *Splicing* co-transcripcional**

Si bien hasta ahora hemos hablado de la transcripción y el procesamiento del ARN como eventos secuenciales e independientes, numerosos estudios muestran una realidad muy distinta. Aunque hace tiempo que se enseña que el primer paso de procesamiento (agregado del capuchón o *cap* en el extremo 5') ocurre mientras el gen se está transcribiendo, la evidencia reciente indica que el *splicing* y el corte y poli-adenilación son también, al menos en muchos casos, co-transcripcionales (Bentley 2002; Maniatis y Reed 2002; Neugebauer 2002; Proudfoot 2002; Kornblihtt 2004; Zorio y Bentley 2004; Bentley 2005). Este concepto rompió de alguna forma con la visión clásica de la transcripción, planteando la inexistencia de lo que hasta ese momento se llamaba transcrito primario (Fig. 1.5). Sin embargo, es bastante razonable pensar que para la célula resulta ineficiente "esperar" a que los larguísimos mensajeros presentes en muchos metazoos sean transcritos, para recién ahí comenzar su procesamiento. Justamente uno de los primeros casos de *splicing* co-transcripcional reportado en

humanos corresponde al gen de la distrofina, que con 2.400 kpb es el más largo del genoma humano (Tennyson 1995). El *splicing* co-transcripcional presenta además un marco explicativo para entender el reconocimiento de los exones y el *splicing* en genes de metazoos, caracterizados por pequeños exones flanqueados por intrones que pueden tener decenas o centenas de kpb de longitud (Goldstrohm 2001).

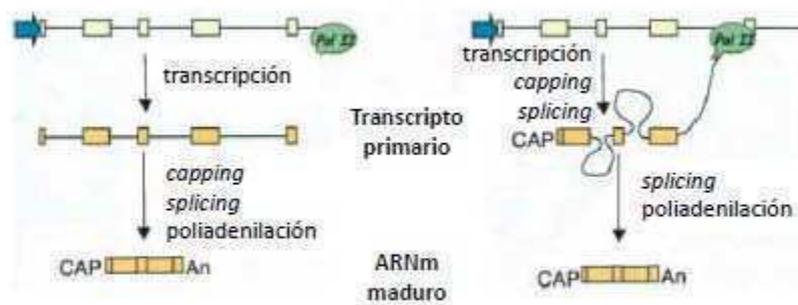


Figura 1.5. **Procesamiento co-transcripcional del ARNm.** Izq. Visión tradicional de la transcripción dando lugar a un transcripto primario, que luego será procesado para generar el ARNm maduro. Der. Visión actual, que contempla la co-transcripcionalidad (aunque con distintos tiempos) de todos los pasos de procesamiento (tomado de Kornblihtt 2004).

Diversas evidencias demuestran la co-transcripcionalidad del *splicing in vivo*, desde la observación en el microscopio electrónico de la formación de los lazos intrónicos en los ARN siendo transcriptos (Beyer y Osheim 1988) hasta la co-immunoprecipitación de proteínas que participan en el *splicing* y de ARN procesado asociados a la cromatina de genes transcripcionalmente activos (Kotovic 2003; Gornemann 2005; Lacadie y Rosbash 2005; Listerman 2006) o factores de *splicing* asociados a la ARN polimerasa II (Das 2007). Se ha mostrado *in vivo* que la ARN pol II recluta factores de *splicing* a los focos de transcripción (Misteli y Spector 1999). También se ha trabajado en sistemas *in vitro*, donde se puede estudiar mecánicamente la relevancia funcional de este acoplamiento. Estos trabajos han mostrado en general que el reclutamiento co-transcripcional de proteínas de *splicing*, cuando la transcripción es llevada a cabo por la ARN pol II, aumenta en gran medida la eficiencia del *splicing* y la estabilidad del mensajero (Hicks 2006; Das 2007), aunque en algunas hay evidencias de que, al menos en ciertas condiciones la co-transcripcionalidad no es suficiente para aumentar la eficiencia del *splicing* (Lazarev y Manley 2007). Lo que sí es claro es que esta alta eficiencia de *splicing* no ocurre cuando la transcripción es mediada por otras polimerasas, como la ARN pol I, la pol III o la ARN polimerasa del fago T7.

Siendo que las tres polimerasas características de los eucariotas comparten varias de sus subunidades, debe haber alguna característica distintiva en la pol II que explique esta capacidad, característica por demás acorde al hecho de que la pol II es la polimerasa que sintetiza todos los ARNm celulares. La clave de la importancia central que la pol II tiene en el acoplamiento entre transcripción y *splicing* (y los demás pasos de procesamiento del ARNm) parece ser el dominio carboxi-terminal, o CTD, de su subunidad mayor Rbp1 (McCracken 1997; Misteli y Spector 1999; Bentley 2005). El CTD de la pol II es un dominio de estructura muy dinámica, compuesto por distintas repeticiones (26 en levaduras, 52 en mamíferos) de un consenso de siete aminoácidos, YSPTSPS, con distinto grado de conservación en cada una de las repeticiones. Si bien la actividad catalítica de la pol II no parece depender directamente del CTD, ya que esta puede iniciar la transcripción desde algunos promotores (Thompson 1989; Kang y Dahmus 1993), este dominio es esencial para la transcripción de genes *in vivo* en su contexto cromatínico (Meininghaus 2000) y para el correcto y eficiente procesamiento de los ARNm resultantes (McCracken 1997), aparentemente debido a que permite la interacción de la polimerasa con factores accesorios de transcripción y procesamiento. Cinco de los aminoácidos que conforman la héptada repetida pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, algunas de las cuales tienen roles claves en el ciclo de la transcripción, siendo la más estudiada la fosforilación (Phatnani y Greenleaf 2006). Tanto la pol II íntegra (Hirose 1999) como el fragmento CTD de la subunidad mayor (Zeng y Berget 2000) pueden activar el *splicing in vitro*, en este último caso la activación se observa sólo en el caso en que el reconocimiento de los sitios de *splicing* sea vía definición exónica, sugiriendo que parte de la función de este dominio puede ser el acercar a los diferentes exones para permitir el corte y empalme. Llamativamente, se ha podido demostrar, mediante la inserción en un gen de una secuencia que al ser transcripta adopta la estructura y función de una ribozima que cataliza el corte de la molécula de ARN, que aún en el caso de que se corte el transcrito co-transcripcionalmente, el *splicing* puede seguir ocurriendo (Dye 2006), sugiriendo nuevamente que tanto la definición exónica como el apareamiento de exones adyacentes son co-transcripcionales.

Una consideración a ser tomada en cuenta es que la co-transcripcionalidad no es estricta, en el sentido que no todos los intrones son eliminados a medida que son transcritos ni todos son eliminados antes de que la transcripción finalice. Puede darse el caso de un mismo gen en el cual algunos intrones sean procesados co-transcripcionalmente y otros post-transcripcionalmente. Por ejemplo, en el gen de BR1 (*Balbani ring 1*) en *Drosophila* el intrón 3 es procesado casi siempre en forma co-transcripcional, mientras que el intrón 4 sólo lo es en el 10% de los casos (Bauren y Wieslander 1994).

#### **1.1.5. Influencia de la transcripción en el *splicing* alternativo.**

Si bien la co-transcripcionalidad del *splicing* es un pre-requisito para que haya influencia funcional entre los dos procesos, no implica por sí sola dicha influencia. Evidencias independientes debieron ser presentadas para desarrollar esta idea. Los primeros estudios se realizaron utilizando reporteros de *splicing* (llamados minigenes), a los cuales se les modificaba la secuencia promotora que dirigía su transcripción. Para diferentes sistemas se vio que la transcripción por diferentes promotores (Cramer 1997; Cramer 1999) o por el mismo promotor basal con o sin sitios de respuesta a hormonas (Auboeuf 2002) modifica el patrón de *splicing* alternativo obtenido, y que dicho cambio no responde a un mero cambio de la cantidad de mensajero sintetizado. Un cambio cualitativo en la transcripción es entonces responsable del efecto.

Si bien el cambio de un promotor por otro difícilmente refleja un hecho que pueda ocurrir en la célula, el efecto puede estar relacionado a la acción de distintos factores de transcripción regulatorios. De hecho, el reclutamiento de diferentes factores de transcripción y co-activadores a un mismo promotor da como resultado diferentes patrones de *splicing* (Nogues 2002; Auboeuf 2004a; Auboeuf 2004b). También el reclutamiento de co-activadores transcripcionales a un promotor puede afectar el *splicing* constitutivo y el procesamiento del extremo 3' del mensajero (Rosonina 2003).

Dos modelos posibles, que no son excluyentes y podrían actuar en conjunto, se han planteado para explicar la influencia de la transcripción sobre el *splicing* alternativo (Kornblihtt 2007):

- a) El **modelo de reclutamiento**, que plantea que la maquinaria transcripcional podría reclutar factores de *splicing* o co-activadores transcripcionales con funciones regulatorias del *splicing* al ARNm nascente. Este reclutamiento podría darse en forma diferencial en distintos contextos celulares, dando así lugar a diferentes resultados de los eventos de *splicing*. Se conocen diferentes co-activadores transcripcionales que son capaces de regular *splicing* alternativo de ciertos genes, y en algunos casos se ha demostrado que esta regulación del *splicing* es dependiente de su reclutamiento al promotor (Lai 1999; Monsalve 2000; Guillouf 2006). En cuanto a reclutamiento de factores de *splicing* por la maquinaria transcripcional, posiblemente el caso mejor estudiado corresponde al efecto dependiente del CTD de la proteína SRp20 sobre el *splicing* alternativo del exon EDI del gen de fibronectina (de la Mata y Kornblihtt 2006).
- b) El **modelo cinético**, que plantea que la velocidad de elongación de la polimerasa afectaría el momento en el cual los sitios constitutivos y regulatorios de *splicing* son presentados, favoreciendo o desfavoreciendo su reconocimiento por los factores que los unen. Esta visión fue originalmente sugerida por los trabajos de Eperon y colaboradores (Eperon 1988), que mostraron una influencia de la tasa de elongación sobre la estructura secundaria del ARNm, lo que a su vez afectaba el *splicing*. Evidencias posteriores sugieren que la velocidad de síntesis del ARN puede regular el *splicing* afectar también la competencia de sitios de *splicing* débiles contra sitios fuertes (Nogues 2003b) o la aparición de elementos regulatorios (Gromak 2008). El mensaje que estos estudios sugieren es que, si consideramos al *splicing* como un proceso co-transcripcional y a la vez dinámico, las elecciones que la maquinaria de *splicing* tome dependerán de los elementos con los que cuenta en un momento dado. Dado que muchos de esos elementos

corresponden a secuencias del ARN que está siendo traducido, el tiempo en el cual se transcriban influirá en su disponibilidad para la maquinaria de *splicing*. Si bien la influencia de la tasa de elongación sobre el *splicing* alternativo es apoyada por las acciones de distintos factores de transcripción (Kadener 2001; Nogues 2002), por el efecto de secuencias responsables de pausas transcripcionales (Roberts 1998; Robson-Dixon y Garcia-Blanco 2004) o por la influencia de la estructura cromatínica (Kadener 2002; Batsche 2006), la prueba más directa de este fenómeno lo constituyen los experimentos realizados con mutantes de polimerasas, que muestran que una polimerasa intrínsecamente más lenta causa un aumento en el uso de sitios de *splicing* débiles, tal como se muestra en la figura 1.6 (de la Mata 2003).

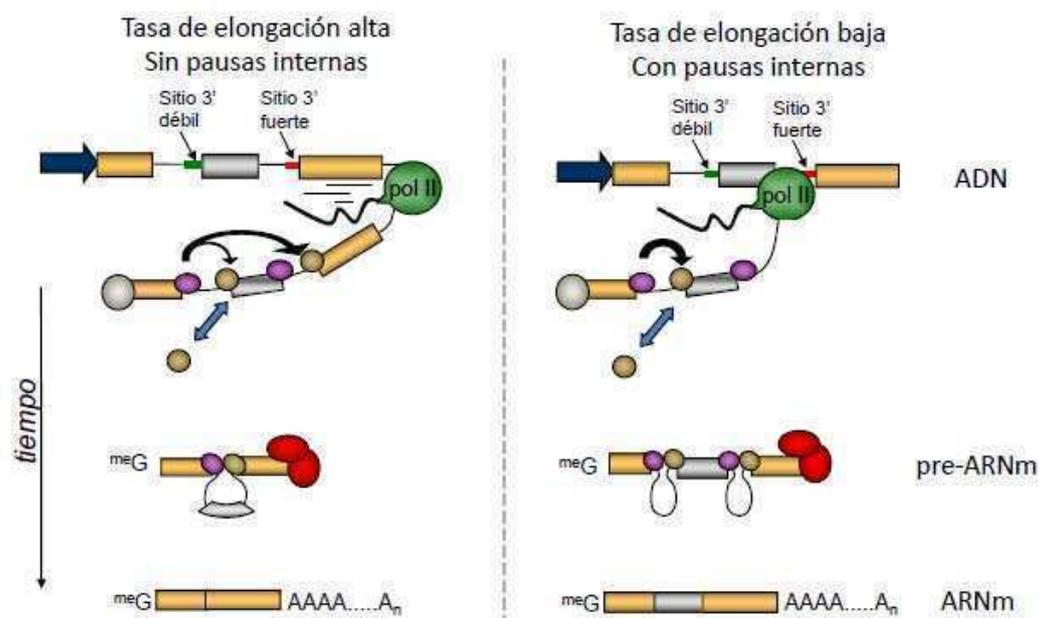


Figura 1.6. El modelo cinético de acoplamiento funcional entre transcripción y *splicing* alternativo. Esquema que muestra el modelo más simple propuesto para explicar por qué la tasa de elongación puede favorecer la inclusión de un exón alternativo con un sitio de *splicing* sub-óptimo.

El concepto de *splicing* co-transcripcional permitiría explicar también el ya mencionado fenómeno de polaridad que muestra la coordinación entre diversos eventos de *splicing* alternativo en el mismo ARNm. En principio, si la transcripción es lenta, el resultado del primer evento en ser transcripto puede influir en el segundo, pero cuando el segundo es transcripto el primer evento de *splicing* ya ha

sido completado. Efectivamente, experimentos con distintos promotores muestran que un promotor con alta tasa de transcripción disminuye la polaridad del efecto (Fededa 2005).

Una evidencia más de la condición co-transcripcional del *splicing* y del íntimo acoplamiento que existe entre ambos procesos es que el proceso de *splicing* y/o los factores involucrados en él pueden afectar la transcripción, tanto a nivel de iniciación (Furger 2002) como de la elongación (Lin 2008).

## 1.2. *La transcripción y el rol de la cromatina en la expresión génica*

### 1.2.1. **El ciclo de la transcripción**

Llegado este punto se hace necesario dar algunas explicaciones más sobre el ciclo transcripcional y las modificaciones que sufre la ARN pol II a lo largo del mismo y sobre el rol que juega la cromatina en la transcripción y el procesamiento del ARN.

Como ya mencionamos, la transcripción de los genes codificantes para proteínas es llevada a cabo en eucariotas por la ARN pol II. El proceso de la transcripción es complejo y consiste de diferentes etapas. A lo largo del mismo la pol II sufre varias modificaciones, de las cuales las más estudiadas son la fosforilación de las serinas ubicadas en las posiciones 2 y 5 de la héptada repetida en su dominio carboxi-terminal (CTD). A la vez, distintas proteínas van asociándose al ADN en la región promotora o al mismo complejo transcripcional, modificando las características de la polimerasa y regulando las distintas etapas del ciclo.

Describiremos muy someramente las distintas fases de la transcripción por la pol II, un tema que puede ser consultado con mayor detalle en distintas revisiones publicadas en los últimos años (Orphanides y Reinberg 2000; Hahn 2004; Saunders 2006). El ciclo transcripcional comienza con la formación del denominado complejo de pre-iniciación (PIC), que consiste en el reclutamiento de los factores de transcripción generales y la ARN pol II a la región promotora basal

o mínima. En este estado, la polimerasa no es capaz de comenzar la transcripción, por lo que un cambio conformacional es requerido para iniciarla. Este cambio está asociado a una fosforilación de las serinas 5 del CTD por Cdk7, la subunidad catalítica del factor de transcripción general TFIIF (Akoulitchev 1995), lo cual permite la iniciación de la transcripción y la liberación de la polimerasa del promotor, donde queda armado un andamiaje de factores basales (Yudkovsky 2000) supuestamente responsable de la mayor velocidad observada en el re-inicio de la transcripción en rondas subsiguientes (Jiang y Gralla 1993).

Esta primera etapa de transcripción, que en general no supera los 20-40 nt, está caracterizada por una fuerte tendencia de la polimerasa a liberarse del molde (iniciación abortiva), al pausado y al arresto, características que se revierten cuando la polimerasa logra superar los 23 nt (Pal y Luse 2003). Sin embargo, la polimerasa permanece aun en un estado de pausa en una posición cercana al promotor (generalmente entre +20 y +40) y necesita la acción de otros factores para pasar al estado de elongación productiva. Este último cambio está asociado con un incremento en la fosforilación en las serinas 2 del CTD, del cual es responsable el factor de elongación positivo P-TEFb (Price 2000), compuesto por la kinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9) y distintas ciclinas, como la T1, T2 o K (Mancebo 1997; Yang 1997; Peng 1998).

La finalización de la transcripción ocurre varios nucleótidos después de superar la señal de corte y poli-adenilación. El principal modelo propuesto es el mecanismo denominado “torpedo”, que implica la acción de una exonucleasa 5' -> 3' que va degradando el fragmento de cadena de ARN que corresponde a la región río abajo del sitio de corte, hasta alcanzar a la polimerasa y provocar su desprendimiento del ADN (West 2004).

### **1.2.2. Regulación de la elongación de la ARN pol II**

Una vez en el estado de elongación productiva, la polimerasa transcribe los genes con una tasa de elongación determinada por características propias del molde transcripcional y por la acción de factores auxiliares que afectan positiva o negativamente la elongación.

Antes de avanzar en la discusión de este tema, es necesario distinguir entre dos conceptos relacionados pero diferentes: **tasa de elongación y procesividad**. El primero corresponde a la definición de velocidad de la polimerasa, medido en cantidad media de nucleótidos añadidos por unidad de tiempo. El segundo está relacionado a la capacidad de la polimerasa en poder recorrer un molde en forma completa sin desprenderse, y podría medirse como cantidad media de nucleótidos adicionado por evento de iniciación. Si bien estos dos parámetros están relacionados, pueden ser afectados en forma conjunta o en forma independiente por diferentes factores (Mason y Struhl 2005), por lo que es necesario distinguirlos. A pesar de ello, normalmente se los suele tratar como una medida de lo mismo, lo cual se debe principalmente a la dificultad de medir ambos parámetros por separado *in vivo*. En particular resulta complicado medir *in vivo* la velocidad de elongación, si bien *in vitro* esta tarea es más sencilla ya que es posible controlar con precisión el tiempo de inicio de la transcripción (ver por ejemplo Renner 2001). Recientemente se ha desarrollado un sistema que permite, gracias a una línea celular obtenida por modificación genética, medir la tasa de elongación *in vivo* en células únicas (Boireau 2007). Sin embargo este sistema no es aplicable para medir la tasa de elongación en cualquier gen, por lo que muchas veces sólo es posible obtener estimaciones de la procesividad y asumir que los factores que afectan la procesividad estarán afectando también la velocidad de elongación.

Si bien la ARN pol II es característicamente una enzima muy procesiva, capaz de transcribir genes de hasta cerca del millón de bases, es también propensa a pausas y arrestos transcripcionales que determinarán la tasa de elongación media observada. Las pausas transcripcionales son eventos normales en la transcripción de todas las ARN polimerasas dependientes de ADN y tendrían funciones regulatorias de la elongación transcripcional (Sims 2004). Se supone que están causadas por un des-alineamiento entre el extremo 3' del ARN naciente y el sitio activo de la polimerasa, son reversibles y están reguladas por la participación de diversos factores de elongación, tanto positivos como negativos. Entre los factores positivos podríamos contar a TFIIF, elonguina y ELL, todos factores que permiten un alivio de las pausas y por lo tanto estimulan la elongación de la ARN pol II (Bengal 1991; Bradsher 1993; Shilatifard 1996). Otro factor considerado como positivo para la elongación de la pol II es DSIF, compuesto en mamíferos por

los ortólogos de las proteínas Spt4 y Spt5 de levaduras, ambas implicadas en promover la elongación transcripcional (Bourgeois 2002; Morillon 2003; Rondon 2003).

El factor de elongación negativo más caracterizado es NELF, un complejo de cinco proteínas (denominadas NELF-A a -E) que promueve el pausado de la pol II (Yamaguchi 1999). Llamativamente, NELF sólo muestra este efecto en presencia del ya mencionado factor DSIF, razón por la cual se le asignó inicialmente a este último un rol negativo en la elongación transcripcional. De hecho, ambos factores fueron descubiertos al realizar estudios *in vitro* en busca de los factores proteicos que otorgaban a la maquinaria transcripcional sensibilidad a la droga DRB (5, 6-dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosilbenzimidazol), lo cual explica el nombre de DSIF (factor inductor de sensibilidad a DRB) (Wada 1998; Yamaguchi 1999). Estos dos factores en conjunto son responsables por la detención de la polimerasa en los primeros nucleótidos de un nuevo transcripto, pausa cuya funcionalidad sería permitir la adición del capuchón o *cap* al extremo 5' (Sims 2004). El tercer factor necesario para obtener sensibilidad al DRB es P-TEFb, cuya actividad kinasa es necesaria para contrarrestar el efecto negativo de NELF/DSIF, siendo su subunidad Cdk9 la que es inhibida por drogas que inhiben la elongación transcripcional como el DRB o el más potente flavopiridol (Marshall 1996; Chao 2000). Si bien el rol más caracterizado de este complejo es a nivel de la transcripción temprana, experimentos *in vitro* muestran que, tanto la presencia de NELF/DSIF en ausencia de P-TEFb como la incubación de extractos nucleares con DRB, llevan a disminución de la tasa de elongación media y a pausado de la pol II en distintos puntos a lo largo de la transcripción (Renner 2001, ver figura 1.7).

El arresto transcripcional es causado por un fuerte des-alineamiento de la polimerasa respecto del extremo 3' del ARN naciente, que puede deberse al llamado *back-tracking* de la pol II (movimiento hacia atrás de la polimerasa) (Sims 2004). Una pausa que no es resumida rápidamente puede llevar a un arresto (Gu y Reines 1995). Este estado no es reversible por la polimerasa, debiendo recurrir a un mecanismo que implica el corte del transcripto naciente para volver a alinear el extremo del ARN, el molde y el sitio activo de la polimerasa. Un importante factor para superar los arrestos transcripcionales, y cuyo estudio ha echado luz sobre el

mecanismo por el cual se re-asume la transcripción después de un arresto, es TFIIS (Fish y Kane 2002; Conaway 2003).

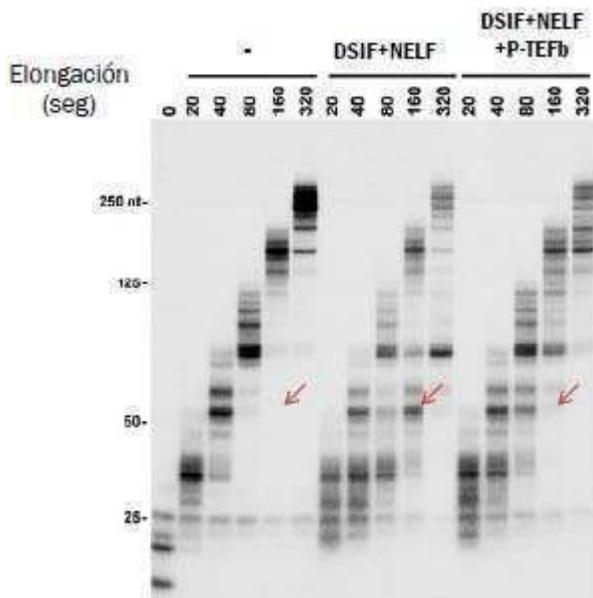


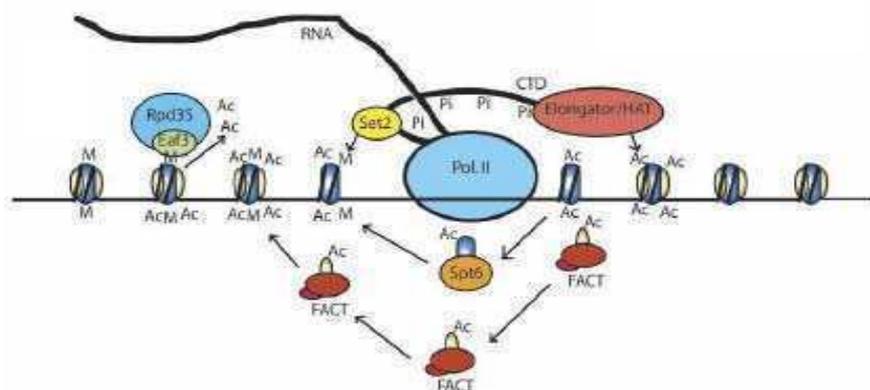
Figura 1.7. La acción de factores negativos de elongación provoca el pausado de la polimerasa en varios puntos de la transcripción. Experimento realizado por Renner y colaboradores, utilizando un sistema de transcripción *in vitro* altamente puro, al cual pueden no agregarle ningún factor extra, agregarle DSIF y NELF o agregarle éstos en presencia del factor positivo P-TEFb. Luego se deja transcribir a la polimerasa por los tiempos indicados, se detiene la transcripción y se observa el patrón de bandas correspondientes a los ARNs transcriptos. Las flechas marcan una de las muchas bandas diferenciales que indican que, a un tiempo dado, los factores negativos causan el pausado de la polimerasa y que este efecto es parcialmente reversible por la presencia de P-TEFb (tomado de Renner 2001).

### 1.2.3. Transcripción en un molde cromatinizado

Los factores arriba mencionados afectan la transcripción de la ARN pol II incluso al transcribir *in vitro* un molde de ADN desnudo. Sin embargo, es bien sabido que la cromatinización del molde disminuye considerablemente la tasa de transcripción (Wasylyk y Chambon 1979; Izban y Luse 1991; Hansen y Wolffe 1992). El principal elemento de la cromatina es el nucleosoma, un complejo multimérico formado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (un heterotretámero de  $(H3/H4)_2$  unido a dos heterodímeros H2A/H2B) alrededor del cual se enrollan 146 pb del ADN. El nucleosoma representa una barrera para la polimerasa que causa su pausado, lo cual puede revertirse *in vitro* si se disminuye la interacción entre histonas y ADN por medio de alta sal o detergentes (Izban y Luse 1991). Las histonas que forman el corazón (o *core*) del nucleosoma interactúan fuertemente entre sí, dejando sin embargo su región N-terminal sobresaliendo del núcleo central del nucleosoma. La presencia de estos dominios N-terminal o “colas” constituye por sí misma un obstáculo para el pasaje de la polimerasa (Protacio 2000). Los nucleosomas están unidos por un tramo de ADN que interacciona con

otras proteínas conocidas como “ligadoras”, como la histona H1, que participa formando estructuras cromatínicas de más alto orden (Khorasanizadeh 2004).

Una serie de experimentos realizados *in vitro* con ARN polimerasas de virus bacteriófagos (Clark y Felsenfeld 1992; Studitsky 1994) y con la pol III eucariota (Studitsky 1997) ha mostrado que estas polimerasas son capaces de superar la presencia de un nucleosoma sin desarmar su estructura, posiblemente haciendo que el mismo se traslade hacia atrás del complejo transcripcional por un mecanismo similar al enrollamiento de un carretel (Studitsky 1995). Sin embargo, el pasaje de la ARN pol II eucariota a través de zonas con nucleosomas parece ser un evento más complejo, que necesita de factores auxiliares y que de alguna forma desbarata la estructura cromatínica resultando, por ejemplo, en la pérdida de dímeros H2A/H2B (Sathyanarayana 1999; Kireeva 2002; Workman 2006, ver figura 1.8).



**Figura 1.8. Participación de factores accesorios para la transcripción por ARN pol II en un molde cromatinizado.** Se esquematizan distintos factores que pueden actuar durante la transcripción para permitir el pasaje de la pol II a través de los nucleosomas en la levadura. El factor multi-proteico Elongator viaja sobre el CTD de la polimerasa y puede acetilar histonas gracias a la función HAT de Elp3. A su vez, FACT actuaría como chaperona de histonas facilitando la remoción de dímeros de H2A/H2B. Spt6 también actúa como chaperona, pero interacciona con H3-H4; podría ayudar a la polimerasa a superar el obstáculo del nucleosoma. La metil-transferasa de histonas Set2 metilaría la lisina 36 de la histona H3 durante la elongación transcripcional. Se ha propuesto que, en levaduras, la Rpd35 es reclutada por esta marca y des-acetila histonas después del paso de la polimerasa para evitar inicios internos de la transcripción (tomado de Workman 2006).

Algunos de estos factores han sido identificados mediante aproximaciones genéticas, bioquímicas o combinadas (Orphanides y Reinberg 2000; Hartzog 2002; Sims 2004). Podemos mencionar al complejo Elongator (Otero 1999; Kim 2002), el complejo FACT (Orphanides 1998), el ya mencionado DSIF (Hartzog 1998;

Morillon 2003) y la proteína Spt6 (Hartzog 1998; Kaplan 2003). Dado que la polimerasa encontrará nucleosomas a lo largo de toda la unidad transcripcional, y que en metazoos estas unidades pueden ser muy largas, es esperable que alguna de estas actividades auxiliares estén asociadas con la polimerasa activa o, dicho de otra manera, viajen con la pol II. En ese sentido, el complejo Elongator (compuesto por las proteínas Elp1, 2 y 3) se asocia con el CTD de la pol II, preferentemente en el estado hiperfosforilado característico de la polimerasa activa (Otero 1999; Wittschieben 1999).

La transcripción en un molde cromatinizado es fuertemente regulada por factores que, no actuando directamente sobre la polimerasa, modifican la estructura cromatínica (Narlikar 2002). Esto puede ocurrir de dos formas: o bien por complejos remodeladores de cromatina capaces de desplazar nucleosomas en forma dependiente de ATP o bien por proteínas que produzcan modificaciones post-traduccionales en las histonas, especialmente en sus colas N-terminales.

Los complejos remodeladores de la cromatina, formados por un número de subunidades proteicas que puede superar la decena, causan el desplazamiento de nucleosomas con gasto de energía en forma de ATP (Flaus y Owen-Hughes 2001). Esto podría liberar secuencias de ADN importantes y también ayudar a la polimerasa a atravesar nucleosomas. Otro tipo de proteínas importantes para la transcripción por pol II son las chaperonas de histonas, que podrían servir asociándose a las histonas durante eventos de traslocación nucleosomal que permitan a la polimerasa superar el obstáculo. De hecho, existe evidencia de que tanto Spt6 como FACT cumplen funciones de chaperonas de histonas (Bortvin y Winston 1996; Belotserkovskaya 2003).

Sobre las modificaciones post-traduccionales que pueden observarse en los dominios N-terminales de las histonas (Fig. 1.9), que incluyen acetilación, metilación, fosforilación, glicosilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación y sumoilación, haremos a continuación un breve resumen, centrándonos en la acetilación de histonas y su rol en la elongación de la pol II.

### 1.2.4. Acetilación de histonas

Las colas N-terminales de las histonas, que como ya dijimos protruyen desde el centro nucleosomal, contienen varios residuos lisina que pueden ser acetilados (Fig. 1.9). Las mismas dificultan la transcripción en al menos dos formas: la carga positiva de estas lisinas permite a las colas N-terminales interactuar fuertemente con el ADN, lo cual dificulta el desplazamiento de los nucleosomas (Protacio 2000) y además estas regiones median interacciones con nucleosomas adyacentes (Dorigo 2003; Gordon 2005).

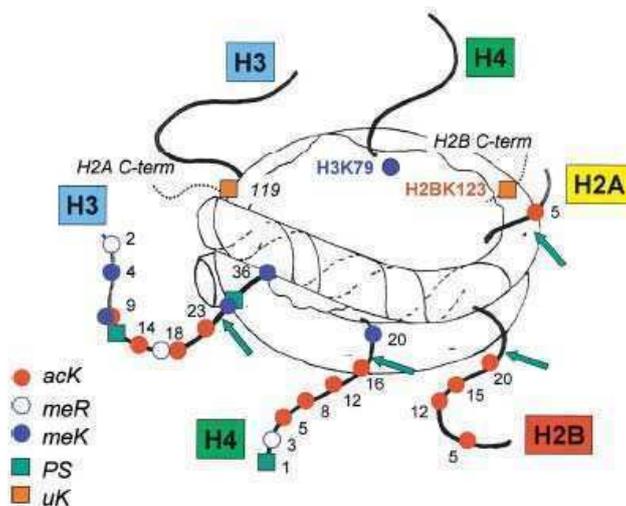


Figura 1.9. Los dominios N-terminales de las histonas son blancos de múltiples modificaciones post-traduccionales. Se esquematiza un nucleosoma del cual sobresalen las colas N-terminales de las diferentes histonas. Se señalan los posibles sitios de acetilación en lisina (*ac*), metilación en lisinas o argininas (*me*), fosforilación en serina (*P*) y ubiquitinación en lisina (*u*) (tomado de Turner 2002).

Dado que la acetilación se caracterizó desde un principio como una marca asociada a transcripción activa, la función que le fue inicialmente asignada es la de neutralizar estas cargas positivas, debilitando la interacción entre los nucleosomas y el ADN y permitiendo así desbaratar más fácilmente su estructura (Ito 2000; Protacio 2000). En este modelo, la acetilación de diferentes residuos tendría un efecto acumulativo (se sabe que las histonas H2A, H3 y H4 tienen lisinas acetilables), no importando demasiado cuál es el residuo que se acetila. Evidencias posteriores muestran que la acetilación de histonas podría en ciertos genes facilitar el pasaje de la polimerasa por la cromatina, incluso previniendo la pérdida de nucleosomas observada en otros genes transcripcionalmente activos, sugiriendo que en diferentes genes la elongación transcripcional podría recurrir a mecanismos distintos (Kristjuhan y Svejstrup 2004).

Con el tiempo fue creciendo la visión de que la acetilación de ciertos residuos particulares tiene funciones definidas (para una revisión reciente ver Shahbazian y Grunstein 2007). Por ejemplo, la acetilación en lisina 16 de histona H4 (H4K16ac) tiene el efecto de desbaratar interacciones entre distintos nucleosomas para formar estructuras cromatínicas de mayor orden (Shogren-Knaak 2006) o de impedir la interacción de remodeladores asociados con compactación de la cromatina (Corona 2002). Este conocimiento, sumado a la asociación que existe entre distintas modificaciones en residuos particulares y diferentes funciones en la transcripción, han llevado a plantear una suerte de “código de histonas”, en el cual diferentes residuos modificados son leídos por distintos factores que llevan a cabo funciones particulares (Turner 2002; Kurdistani 2004; Li 2007a). Este modelo, si bien resulta una alternativa al modelo clásico, podría fácilmente ser complementario.

La acetilación de las histonas es regulada por la acción contrapuesta de dos tipos de enzimas: las acetil-transferasas de histonas (HATs) y las des-acetilasas de histonas (HDACs). Del equilibrio dinámico entre estas dos actividades resultará el nivel de acetilación en las distintas partes del genoma.

Las HATs generalmente son proteínas que forman parte de grandes complejos, muchos con funciones de co-activadores transcripcionales. Las demás subunidades de dichos complejos dan especificidad y regulación a la actividad HAT, además de poder participar en otras funciones por sí mismas. Además, las HATs pueden ser reclutadas por la misma maquinaria de transcripción. Por ejemplo, la subunidad Elp3 del complejo Elongator muestra actividad HAT (Winkler 2002, ver figura 1.8) y diferentes evidencias sugieren que parte de la función de este complejo es ir acetilando las histonas de los nucleosomas que la pol II va encontrando durante la elongación transcripcional (Wittschieben 1999; Kim 2002). También la proteína HAT p300/CBP (estas dos proteínas presentan un altísimo grado de identidad y muchas veces se las refiere indistintamente) ha sido detectada asociada con la pol II hipo-fosforilada (típica de los complejos de iniciación), mientras que a otra HAT, PCAF, se la encuentra asociada a la pol II hiper-fosforilada y, por lo tanto, asociada con elongación transcripcional (Cho

1998). Un reporte reciente indica que en el díptero *Chironomus tentans*, la HAT p2D10 puede ser reclutada por el mismo ARNm naciente (Sjolinder 2005).

La acetilación de histonas es muchas veces parte de un conjunto de actividades trabajando en forma coordinada para permitir la transcripción. Existe, por ejemplo, una fuerte conexión entre la acetilación de histonas y la remodelación de la cromatina: mientras que el desplazamiento de nucleosomas por complejos remodeladores puede descubrir secuencias que permitan el reclutamiento de HATs (Krebs 1999), la acetilación de histonas puede regular la actividad de los complejos remodeladores de cromatina (Carey 2006; Ferreira 2007). Una forma en que esto ocurre es reclutando directamente remodeladores como los complejos SWI/SNF y RSC, a través de dominios conocidos como bromodominios, especializados en el reconocimiento de lisinas acetiladas (Agalioti 2002; Hassan 2002; Kasten 2004). Al mismo tiempo la acetilación puede incluso estimular la acción de las mismas acetilasas, algunas de las cuales, como Gcn5 (parte de los complejos SAGA y SLIK) y PCAF, tienen bromodominios (Dhalluin 1999; Hassan 2002). Esto permitiría mantener la asociación de las HATs incluso en ausencia de los cofactores responsables de su reclutamiento en primer lugar. La participación de distintas modificaciones de histonas ayudaría al reclutamiento secuencial de diferentes factores para lograr alcanzar el estado de elongación productiva (Agalioti 2002; Sharma 2007).

Las HDACs pueden también ser reclutadas a genes específicos, muchas veces formando parte de complejos represores de la transcripción (Shahbazian y Grunstein 2007). Parte de esta acción podría deberse simplemente a contrarrestar el efecto de la acetilación, aunque algunos represores pueden ser reclutados directamente a histonas con lisinas des-acetiladas, a través de dominios conocidos como SANT (de la Cruz 2005). Sin embargo, las HDACs pueden jugar también roles importantes en los genes activos. Al parecer, muchos genes requieren de un equilibrio dinámico entre acetilación y des-acetilación, por lo que ambas actividades serían importantes para la activación transcripcional (Clayton 2006). También se ha sugerido una interesante nueva función para las HDACs en levaduras, relacionada con la elongación transcripcional. Al parecer, el complejo HDAC Rpd3S va removiendo los acetilos depositados sobre las histonas por la

maquinaria transcripcional, lo cual volvería a la cromatina a un entorno más represivo una vez que la polimerasa pasó, evitando de esta forma eventos de iniciación de la transcripción espurios (Carrozza 2005; Joshi y Struhl 2005).

Tanto las HATs como las HDACs parecen tener al mismo tiempo funciones a nivel global, acetilando y des-acetilando histonas en una forma relativamente inespecífica, aunque el alcance de esta función genómica está mayormente estudiado en levaduras y particularmente para las HDACs (Berger 2000; Vogelauer 2000; Peterson 2002; Robyr 2002).

### **1.2.5. Otras modificaciones de histonas**

Mencionaremos a continuación en forma breve algunas otras modificaciones de histonas que creemos importantes o representativas del conocimiento actual.

Una de las modificaciones más estudiadas es la metilación de histonas en lisinas o argininas. En particular, la metilación de lisinas se ha encontrado hasta ahora solamente en las histonas H3 y H4. Distintas lisinas metiladas se asocian a distintos procesos, y además el nivel de metilación (mono-, di- o tri-metilación) afecta el reconocimiento de la marca. Distintas metilaciones pueden estar involucradas tanto en la activación como en la represión de la transcripción, no existiendo una tendencia clara como en el caso de la acetilación. Los residuos metilados pueden ser reconocidos por proteínas que contienen diferentes dominios, como los cromodominios, los dominios Tudor o los WD40 (ver Martin y Zhang 2005 para una revisión actualizada).

Una de las funciones clásicas en las que participa la metilación de histonas es la formación de heterocromatina. Por ejemplo, la metil-transferasa específica lisina 9 de histona H3 participa en la función de la heterocromatina (Melcher 2000; Rea 2000) y en metazoos se encuentra un enriquecimiento de tri-metilación en lisina 9 de H3 en las regiones de heterocromatina peri-céntromérica, mientras que la mono- y di-metilación se encuentran en zonas inactivas de eucromatina (Peters 2003; Rice 2003). Ésta funcionaría reclutando HP1 $\alpha$  y HP1 $\beta$ , ambas proteínas con cromodominios (Bannister 2001; Lachner 2001). Sin embargo, en regiones

euromáticas, la marca de tri-metilación en lisina 9 (H3K9me3) puede estar asociada a la elongación transcripcional en genes activos, aunque en estos casos reclutando a HP1 $\gamma$  (Vakoc 2005). Como ya mencionamos, la di-metilación en lisina 9, así como la tri-metilación en lisina 27, están más robustamente asociadas a la inactivación génica en zonas euromáticas (Rice 2003; Cao y Zhang 2004).

En cuanto a los genes activos, las marcas más comúnmente asociadas a las regiones transcritas de los mismos son la di- y tri-metilación en lisina 4 de histona H3 y la tri-metilación en lisina K36 de histona H3; la primera se encuentra en las regiones más proximales al promotor, mientras que la última crece a medida que nos alejamos del mismo y es alta en las regiones distales del gen (Martin y Zhang 2005). La tri-metilación de H3K4 (H3K4me3) es catalizada en levaduras por el complejo COMPASS que contiene la metil-transferasa Set1 (que también cataliza la mono- y di- metilación) y es dependiente de otra marca previa, la mono-ubiquitinación de la histona H2B en lisina 123, llevada a cabo por el complejo Bre1-Rad6 que es reclutado al promotor por activadores transcripcionales (Dover 2002; Sun y Allis 2002; Kao 2004). Esta marca de H3K4m3 puede ser reconocida por una serie de proteínas co-activadoras, como la proteína con cromodominio Chd1, parte del complejo HAT SAGA (Pray-Grant 2005). Además de su posible rol transcripcional, se ha reportado recientemente que esta marca puede reclutar factores de *splicing* a los focos de transcripción, colaborando así en el acoplamiento entre transcripción y *splicing* (Sims 2007).

La tri-metilación de H3K36 es catalizada por la metil-transferasa Set2 en levaduras, asociada con el complejo transcripcional durante la elongación a través de la fosforilación del CTD de la pol II, lo cual explica en cierta forma su localización (Krogan 2003; Li 2003; Xiao 2003). Uno de los principales roles que se le conocen en levaduras es el reclutamiento del ya mencionado complejo HDAC Rpd3S, que des-acetila los nucleosomas luego del pasaje de la polimerasa (Carrozza 2005; Joshi y Struhl 2005). Un reporte muy reciente mostró un interesante patrón de distribución de esta marca en el gusano *Caenorhabditis elegans* y en mamíferos: la misma se encuentra enriquecida en las regiones exónicas con respecto a las intrónicas, y en los exones constitutivos con respecto a

los exones alternativos, sugiriendo una conexión funcional entre la marca de K36me3 y el proceso de *splicing* (Kolasinska-Zwierz 2009).

### 1.2.6. Metilación del ADN

La metilación del ADN en citosinas se cuenta, junto con las modificaciones post-transcripcionales de las histonas, dentro de los mecanismos denominados epigenéticos. La epigenética abarca entonces cambios relativamente estables relacionados con el ADN y la cromatina, que no se deben a cambios en la secuencia del ADN. En mamíferos, prácticamente toda la citosina metilada (5-metilcitosina) es encontrada en di-nucleótidos CpG (Goll y Bestor 2005), aunque también se la puede encontrar en CpA o CpT (Ramsahoye 2000). Los di-nucleótidos CpG están sub-representados en el genoma de mamíferos, y generalmente se los encuentra agrupados en regiones ricas en ellos, denominadas “islas CpG”.

Tres enzimas caracterizadas catalizan la adición del grupo metilo al carbono 5 de las citosinas: las metil-transferasas de ADN (Dnmt) 1, 3a y 3b (Goll y Bestor 2005). Dnmt 1 solo puede metilar nucleótidos CpG donde la citosina de la hebra complementaria ya esté metilada (CpGs hemi-metilados) y es llamada en consecuencia una metil-transferasa de mantenimiento: es responsable de mantener los patrones de metilación luego de la replicación semi-conservativa del ADN. Dnmt 3a y 3b pueden metilar *de novo*, y son responsables de la masiva metilación del ADN que se observa en el cigoto después de la implantación (Li 2002).

Aunque muchos autores plantean que debería existir una enzima o camino enzimático que pueda remover la marca de metilación, no hay evidencias bioquímicas y genéticas claras que indiquen la existencia de de-metilinas de ADN (Ooi y Bestor 2008). Hasta hoy muchos creen que la pérdida de metilación sólo podía darse en forma pasiva en células en división, por ejemplo si la presencia de una proteína que se una al ADN bloquea el acceso a la citosina (Lin 2000). Sin embargo, evidencias recientes sugieren que Dnmt 3a y 3b podrían causar también de-metilación en células de mamífero (Kangaspeska 2008; Metivier 2008).

Las principales consecuencias de la metilación a nivel de la transcripción están caracterizadas en los promotores, donde tiene un efecto inhibitor del inicio de la transcripción. El mismo se debe mayormente al reclutamiento de complejos represores de la transcripción a través de proteínas que reconocen citosinas metiladas, la más caracterizada de las cuales es la proteína MeCP2 (Nan 1997). Dichos complejos suelen contener enzimas con actividad de HDAC y la inhibición de las mismas con tricostatina A puede contrarrestar el efecto represor (Nan 1998). Llamativamente, se ha reportado que MeCP2 puede actuar como regulador del *splicing* alternativo (Young 2005).

También se ha analizado el efecto de la metilación intragénica, mostrándose que la misma causa des-acetilación local y la formación de una región de cromatina más compacta (Fig. 1.10). Si esta es cercana al promotor inhibe el inicio de la transcripción (Appanah 2007) mientras que si es más lejana causa una disminución local en la procesividad de la polimerasa (Lorincz 2004). Esto sugiere fuertemente que el estado de la cromatina intragénica puede regular las propiedades de elongación de la pol II.

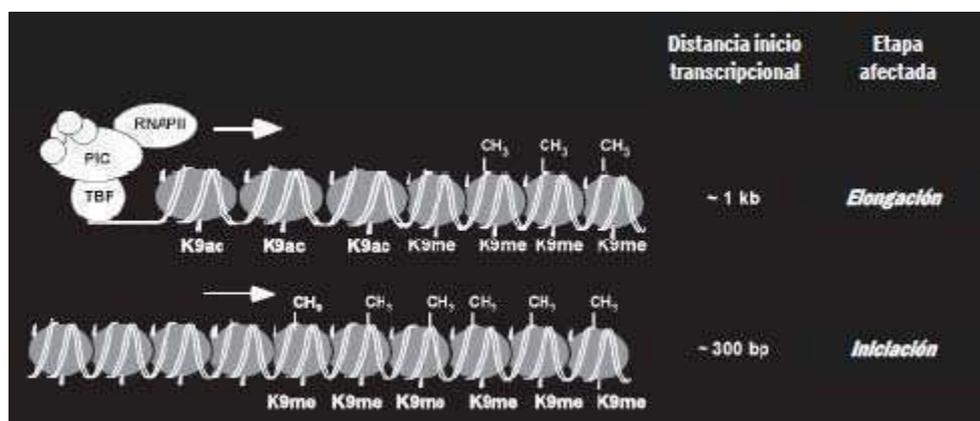


Figura 1.10. La metilación del ADN en regiones intragénicas provoca des-acetilación de histonas y compactación de la cromatina y puede afectar la elongación de la pol II. La presencia de secuencias de ADN con CpG metiladas provoca alteraciones en la cromatina. Si éstas se encuentran lejos del promotor (*arriba*), no afectan la iniciación de la transcripción, pero sí la elongación. Si se encuentran próximas al promotor (*abajo*) directamente inhiben el inicio de la transcripción (tomado y modificado de Appanah 2007).

### 1.3. Regulación de la expresión génica y el *splicing* alternativo en sistema nervioso

#### 1.3.1. El sistema nervioso como modelo

El sistema nervioso proporciona a los metazoos una gran capacidad de adaptación a un ambiente siempre cambiante, independientemente de las fuerzas evolutivas que actúan a tiempos mucho más largos. Dado que nuestro interés es estudiar la expresión génica desde una perspectiva que involucre la integración de eventos transcripcionales y co-transcripcionales, el sistema nervioso provee un modelo muy interesante donde estudiar las implicancias de esta integración, debido a sus finas necesidades regulatorias y a la variedad de mecanismos a los que recurre para lograrlas (Colvis 2005; Ule y Darnell 2006).

Varias características de este sistema sugieren que involucra una gran complejidad regulatoria. La variedad de tipos celulares neuronales y no neuronales incluidos, que aparentemente derivan del mismo tipo de célula precursora, lo cual implica una muy fina regulación durante el desarrollo para el establecimiento de la identidad celular. La necesidad de establecer y mantener precisas conexiones entre los distintos tipos neuronales y de estos con las células efectoras implica eventos de migración, remodelación, crecimiento, e incluso eliminación de sinapsis y muerte celular programada. Las células neurales adultas deben no sólo mantener la homeostasis, sino que es necesaria una importante capacidad de plasticidad en los componentes del sistema, tanto para amoldarse y responder a los eventos que ocurren en la vida de un organismo, como para sostener la posibilidad del aprendizaje y la memoria.

Los últimos años han sido ricos en investigaciones que justamente subrayan separadamente la importancia que tienen en el sistema nervioso los dos mecanismos que trata de integrar esta tesis: la estructura de la cromatina (ver revisiones actualizadas en Levenson y Sweatt 2005; Borrelli 2008; Jiang 2008) y el *splicing* alternativo (Ule y Darnell 2006; Li 2007b). Dicha importancia se hace evidente en la existencia de patologías del sistema nervioso asociadas a mutaciones o cambios en la actividad de reguladores de estos dos procesos (Alarcon 2004; Licatalosi y Darnell 2006; Moretti 2006; Ranum y Cooper 2006).

### **1.3.2. Importancia de la modulación de la cromatina en el sistema nervioso**

Si bien la modificación de la cromatina es clave para la expresión génica en cualquier tejido, diversos reportes hacen hincapié en la necesidad de su correcta regulación para procesos complejos en el sistema nervioso.

El correcto balance entre acetilación y des-acetilación es importante para la correcta progresión de linaje durante la diferenciación de los precursores neurales, dado que inhibidores de HDACs como el ácido valproico causan la diferenciación hacia neuronas en condiciones que favorecen los linajes no neurales (Marin-Husstege 2002). Además, la represión de genes por complejos conteniendo HDACs reclutadas por el factor de transcripción REST es crucial para el silenciamiento de genes al tomar las células un linaje no neural (Ballas 2001). Una forma de regulación recientemente reportada para la HDAC2 es la S-nitrosilación en cisteínas por óxido nítrico (NO), que causa su liberación de la cromatina y el aumento en la expresión de genes involucrados en el desarrollo neural (Nott 2008).

Ya en neuronas maduras, la acetilación de histonas juega un rol importante en el establecimiento de memorias a largo término. La acetilación de histona H3 se incrementa en determinadas zonas del hipocampo de ratones entrenados por el paradigma de condicionamiento contextual por miedo (Levenson 2004). En el mismo trabajo se muestra que los inhibidores de HDACs tricostatina A (TSA) y butirato de sodio pueden facilitar la potenciación sináptica a largo término (LTP) a nivel celular, e incluso el tratamiento de ratones con butirato facilita el aprendizaje de los mismos. Sorprendentemente en ratones la recuperación de las capacidades cognitivas, después de un episodio de neuro-degeneración experimental, observada en respuesta a la exposición a un ambiente rico y estimulante, está asociada a niveles incrementados de acetilación en hipocampo y córtex, y es facilitada por la aplicación de butirato de sodio (Fischer 2007).

Si bien los inhibidores utilizados pueden afectar la expresión de muchos genes, estudios posteriores (Vecsey 2007) mostraron que el efecto de los inhibidores de HDACs es sobre paradigmas contextuales que requieren la

participación del hipocampo y depende particularmente de la presencia del factor de transcripción CREB y la interacción de éste con su co-activador CBP. A la vez, la aplicación de TSA solamente no produce cambios apreciables en los perfiles de expresión de genes controlados por CREB, y aplicada conjuntamente con el entrenamiento actúa selectivamente sobre unos pocos genes. Otra modificación de histonas importante en los procesos de aprendizaje parece ser la fosforilación en serina 10 de histona 3 (H3S10P), que normalmente está acoplada a la acetilación en lisina 14 y a la apertura de la cromatina (Crosio 2003; Chwang 2007).

Ciertamente, la proteína CBP y su actividad HAT en particular, parecen tener un importante rol en los procesos cognitivos. En principio, la enfermedad neurológica humana conocida como síndrome de Rubinstein-Tabi, una de cuyas consecuencias es el retardo mental, es causada por mutaciones en dicha proteína (Petrij 1995). Modelos en ratones *knock-out* heterocigotas para CBP o transgénicos que sobre-expresan una versión mutante de CBP sin actividad HAT muestran un marcado déficit para el establecimiento de memorias a largo término con distintos paradigmas, que es aliviado por la administración de inhibidores de HDACs (Alarcon 2004; Korzus 2004). También la mutación de la proteína homóloga de CBP p300 causa déficit de aprendizaje en el mismo tipo de paradigmas (Oliveira 2007). La figura 1.11 muestra un resumen simplificado del rol de CBP y los inhibidores de HDACs en memoria y plasticidad sináptica.

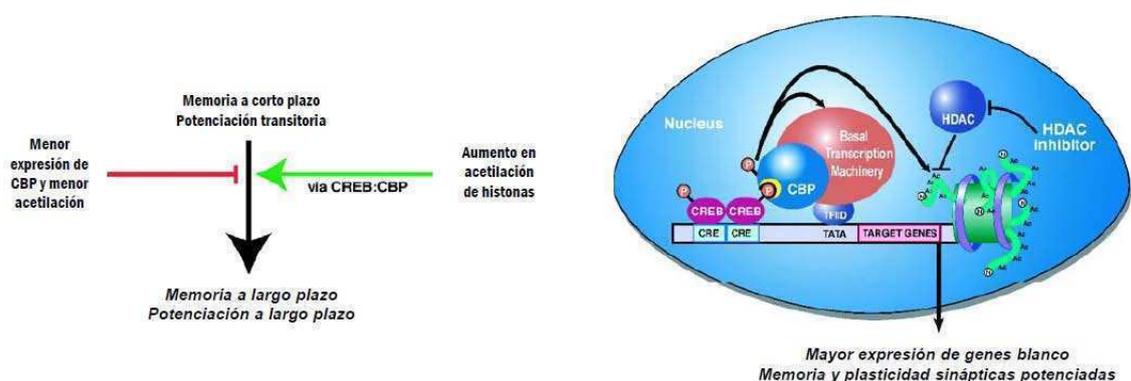


Figura 1.11. **Importancia del balance entre acetilación y des-acetilación de histonas para la memoria y la plasticidad sináptica a largo plazo.** Resumen y esquema mostrando los roles de la HAT CBP y los inhibidores de HDACs en la transcripción génica asociada a la inducción de LTP o la formación de memorias de largo término (tomado y modificado de Vecsey 2007).

Los procesos moleculares involucrados en plasticidad neuronal también son importantes en condiciones patológicas como la adicción a drogas y la depresión. En modelos de administración crónica de cocaína, se observó en las neuronas del cuerpo estriado un incremento de histona acetilada y fosfoacetilada (H3 S10P K14ac) en distintos promotores de genes importantes para la regulación de la expresión génica en respuesta a activación neuronal, como fosB, BDNF y Cdk5 (Kumar 2005; Levine 2005). Al mismo tiempo, la aplicación de butirato o TSA potencia los efectos comportamentales de la droga, mientras que la sobreexpresión de HDAC4 o la ausencia de CBP los contrarresta (Kumar 2005; Levine 2005). Mientras que el gen *c-fos* es inducido por tratamientos agudos, su inducción es inhibida por tratamientos crónicos con anfetaminas, y la desacetilación de histonas y di-metilación en H3K9 en su región promotora, por HDAC1 y la metil-transferasa KMT1A respectivamente, está involucrada en dicha inhibición (Renthal 2008).

En un modelo de depresión por estrés social, se observa en el hipocampo un decremento en la expresión de ciertas isoformas de BDNF, asociado con metilación de H3K27 y desacetilación de histonas en la región promotora (Tsankova 2006). El tratamiento con el anti-depresivo imipramina revierte los efectos comportamentales, a la vez que aumenta los niveles de acetilación de histonas, en parte por inhibición de la expresión HDAC5, y su efecto es bloqueado por la sobreexpresión de esta proteína (Tsankova 2006). HDAC5 parece tener un rol importante integrando las respuestas de depresión y adicción en el núcleo accumbens, una zona del cerebro con un rol importante en las sensaciones de recompensa (Renthal 2007, ver figura 1.12).

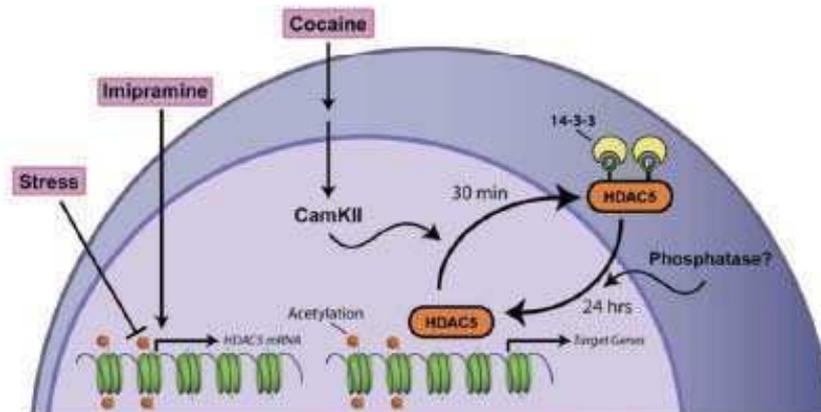


Figura 1.12. La des-acetilasa de histonas HDAC5 tiene un rol central en los procesos moleculares asociados a stress y adicción. Esquema mostrando la regulación de la transcripción y de la localización y actividad de HDAC5 en respuesta a tratamientos generadores de stress, a tratamientos con anti-depresivos (imipramina) o con drogas de abuso (cocaína) (tomado de Renthall 2007).

### 1.3.3. Vías de regulación de modificadores de histonas involucradas en respuesta a la actividad neuronal

En la sección previa hemos remarcado la importancia de ciertas HATs (como CBP) y HDACs (como HDAC5) en la modulación de las respuestas neuronales dependientes de actividad neuronal. Es necesario sin embargo mencionar algunos ejemplos mostrando en qué formas la actividad de estas proteínas puede ser regulada.

Un evento clave en la regulación de la expresión génica en respuesta a la actividad neuronal es la entrada de calcio ( $Ca^{++}$ ) al citosol de la célula desde el medio extracelular (o liberación de los depósitos internos, como el retículo endoplásmico), por intermedio de canales regulados por voltaje (como los canales tipo L) o de receptores de NMDA, regulados por voltaje y glutamato. Una acción directa del incremento citosólico de calcio es la activación de las kinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs) II y/o IV. Esta vía participa, junto con la vía de Erk que es también modulada por calcio, en la activación del factor de transcripción CREB, uno de los más importantes factores que reclutan CBP a los promotores de genes blanco, por fosforilación de su serina 133 (Wu 2001). Sin embargo, la vía de las CaMKs puede activar CBP en forma directa por fosforilación,

aumentando su actividad independientemente de su reclutamiento (Chawla 1998; Impey 2002).

La entrada de calcio, y particularmente la vía de las CaMKs, podrían también aumentar la acetilación de histonas por otros mecanismos. Uno es promover la exportación nuclear de HDACs a través de su fosforilación y posterior asociación de proteínas 14-3-3 que la mantienen en el citosol (Chawla 2003; Linseman 2003; Renthall 2007, ver figura 1.12). Otro es fosforilar e inducir la liberación del ADN de la proteína MeCP2 que, como dijimos, recluta HDACs (Chen 2003; Zhou 2006).

Otra vía importante en la regulación de la cromatina depende de la kinasa Erk, capaz de regular no sólo la fosforilación de factores de transcripción como CREB, sino de promover directamente la acetilación de histonas a través de la fosforilación de la serina 10 de histona H3 (Levenson 2004; Chwang 2006), posiblemente a través de la kinasa MSK1 (Chwang 2007). Otra kinasa capaz de promover fosforilación en serina 10 de histona H3 y acetilación de histonas es la de IKK $\alpha$ , conocida por su rol en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, pero capaz de paralelamente traslocar al núcleo y actuar directamente sobre la cromatina (Anest 2003; Lubin y Sweatt 2007).

#### **1.3.4. *Splicing* alternativo en el sistema nervioso**

Distintos estudios a escala genómica resaltan la gran prevalencia de eventos de *splicing* alternativo, y particularmente de casetes exónicos, en el sistema nervioso central (Modrek 2001; Xu 2002; Yeo 2004, ver figura 1.13). Estudios que combinan microarreglos específicos para eventos de *splicing* alternativo con análisis de ESTs y ADNc reportados en bases de datos, muestran que los tejidos nerviosos tienen un porcentaje mayor de eventos de SA específicos de tejido, que estas regiones alternativas están más conservadas evolutivamente que las no específicas de sistema nervioso y que además muestran menor porcentaje de cambios de fase, codones *stop* prematuros o disrupción de dominios proteicos (Fagnani 2007). Todo esto muestra que a lo largo de la evolución parece haberse seleccionado con más fuerza en este sistema la generación de variantes funcionales por *splicing* alternativo, lo cual como dijimos es esperable dadas las características

en cuanto a variabilidad proteómica y capacidad de regulación fina que un sistema tan complejo requiere.

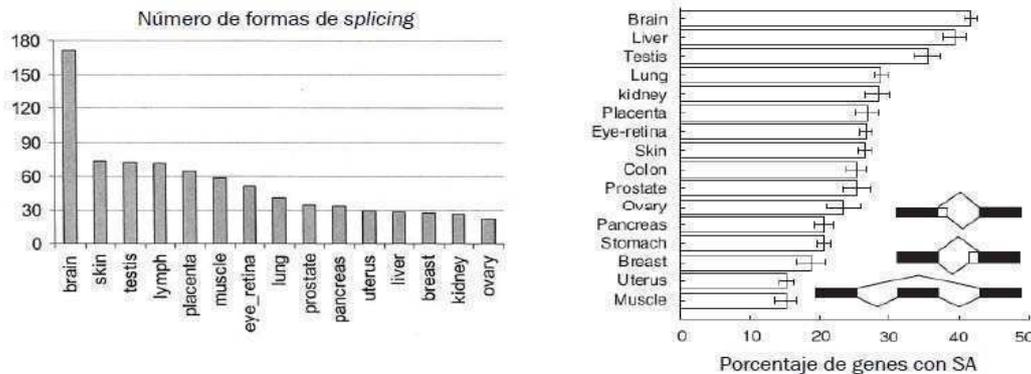


Figura 1.13. **Prevalencia del splicing alternativo en el sistema nervioso central.** Análisis de ESTs mostrando el número de formas de splicing (*izquierda*) y el porcentaje de genes con splicing alternativo (*derecha*) en diversos tejidos. Se puede observar en ambos casos que el cerebro (*brain*) tiene los valores más altos (tomado de Lee y Irizarry 2003; Yeo 2004).

El primer aspecto a analizar es la variabilidad que el *splicing* alternativo ofrece en cuanto a la generación de variantes proteicas. Quizás el caso más contundente sea el de la proteína de adhesión Dscam en *Drosophila* que, con cuatro regiones alternativas distintas, es capaz de generar teóricamente 38.016 isoformas diferentes que varían en su región extracelular (Schmucker 2000). Esta proteína participa del crecimiento de las prolongaciones nerviosas y la guía del axón, por lo que su altísima variabilidad aseguraría diversidad en la interacción con células vecinas. De hecho, Dscam presenta interacción homofílica específica de isoforma (Wojtowicz 2004) y la interacción con otras moléculas es crucial para la correcta identificación de células vecinas y la correcta morfogénesis dendrítica durante el desarrollo de la mosca (Hughes 2007; Matthews 2007; Soba 2007). Otros ejemplos en los que el *splicing* alternativo provee importante variabilidad funcional incluyen, además de moléculas de adhesión, canales iónicos como los canales de potasio activados por calcio BK en las células del oído (Navaratnam 1997), factores secretados en forma parácrina como FGF (Olsen 2006), moléculas que regulan liberación sináptica como SNAP25 (Sorensen 2003), receptores para neurotransmisores como dopamina (Dal Toso 1989), o para péptidos como el receptor APOER2 (Beffert 2005).

El segundo aspecto a recalcar es el regulatorio. Como planteamos en su momento, el control combinatorial permite una regulación muy fina de los niveles de inclusión, posiblemente integrando diferentes entradas que controlen un mismo evento de *splicing* alternativo. Otra característica observada en sistema nervioso es la presencia de determinados reguladores de *splicing* alternativo específicos de tejido, que pueden controlar simultáneamente la expresión de grandes grupos de genes. Un ejemplo de esto último lo proveen la proteína de unión al trecho de poli-pirimidinas, PTB, y su homóloga nPTB. PTB es un regulador de *splicing* alternativo de la familia de las hnRNPs, que une secuencias ricas en C y U, y actúa normalmente en una variedad de tejidos inhibiendo la inclusión de exones alternativos (Wagner y Garcia-Blanco 2001). En los precursores neuronales, esta proteína está presente y reprime la inclusión de muchos exones específicos de neuronas, pero en las neuronas post-mitóticas es reemplazada por nPTB, que tiene diferente especificidad de unión, y este cambio regula simultáneamente el *splicing* alternativo de muchos genes involucrados en la función neuronal (Boutz 2007).

Otro ejemplo importante es el de las proteínas NOVA1 y 2, reguladores de *splicing* específicos de sistema nervioso, que unen agrupamientos de secuencias YCAY en el ARN, promoviendo distintos efectos sobre los sitios alternativos. A lo largo de los años, el grupo de R. Darnell ha demostrado con una serie de elegantes técnicas (incluyendo uso de ratones *knock-out*, *crosslinking* e inmunoprecipitación del ARN, microarreglos, secuenciación en gran escala y herramientas computacionales) que estas proteínas regulan concertadamente un sub-grupo de eventos de *splicing* alternativo correspondiente a genes involucrados en funciones sinápticas (Fig. 1.14), que el tipo de regulación que opera depende no sólo de la combinación con otros factores sino de la posición dentro del ARN en que se una, y que en muchos casos también se unen en las regiones 3' no codificantes y regulan poli-adenilación alternativa (Ule 2003; Ule 2005; Ule 2006; Licatalosi 2008). Un dato interesante, es que el de NOVA2 es uno de los pocos casos en que se ha demostrado que un regulador de *splicing* alternativo es requerido para una forma de plasticidad sináptica a largo término (Huang 2005).

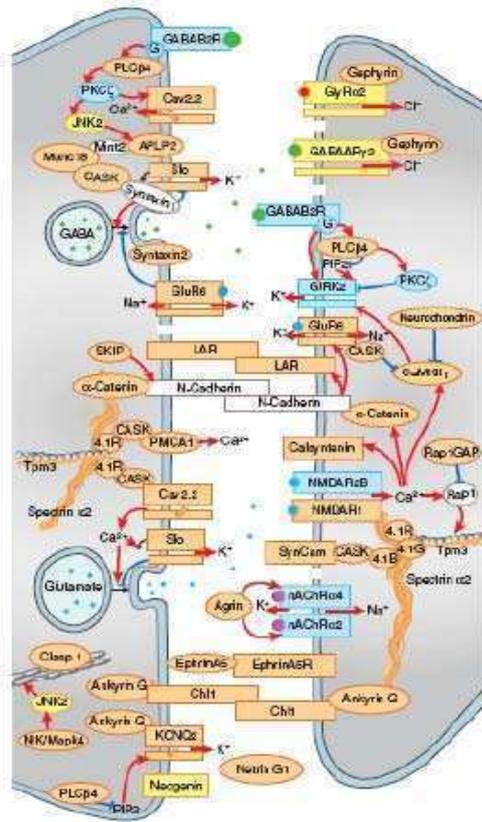


Figura 1.14. Un único factor de splicing alternativo puede controlar una red de eventos relacionados con la formación y función de la sinapsis. Esquema mostrando todas las proteínas que presentan variantes alternativas y que se conoce que son regulados por Nova2 a través de experimentos con microarreglos de splicing alternativo (en naranja), de experimentos bioquímicos (en amarillo) o que se sabe que son blancos de unión de Nova2 (en azul) (tomado de Ule 2005).

### 1.3.5. *Splicing* alternativo regulado por actividad neuronal

Se conocen varios casos de genes con *splicing* alternativo regulado por incubación con altas concentraciones de potasio en el medio extracelular, lo cual activa la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (Fig. 1.15). Algunos ejemplos incluyen los canales de potasio Kv3.1 (Liu y Kaczmarek 1998) y BK/Slo (Xie y Black 2001), el receptor de NMDA NR1 (Vallano 1999; Mu 2003), la bomba de Ca<sup>2+</sup>/ATPase (Zacharias y Strehler 1996), la proteína de adhesión neurexina 2 $\alpha$  (Rozic-Kotliroff y Zisapel 2007), la proteína sinaptosomal SNAP25 (Hepp 2001) y la ciclina asociada a expresión génica ania 6 (Berke 2001; Sgambato 2003).

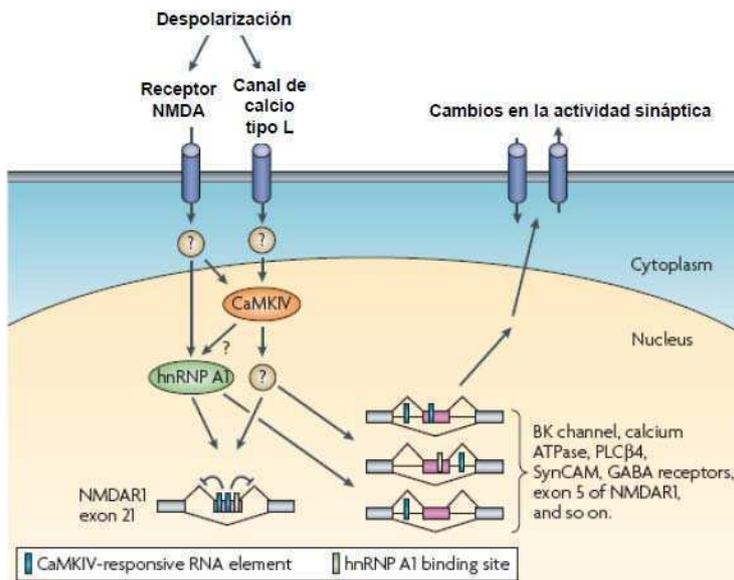


Figura 1.15. La despolarización de células neuronales afecta el splicing alternativo de distintos ARNm que codifican para canales iónicos y otras proteínas de función sináptica. Se marcan las vías que actúan sobre el modelo más estudiado (el exón 21 del NMDA-R), que incluye elementos que responden a CaMKIV y a hnRNP A1. A su vez, estas vías pueden afectar a otros genes cuyo splicing alternativo también responde a despolarización (tomado de Li 2007b).

Mecánicamente el avance más importante para caracterizar la regulación del *splicing* alternativo a través de la actividad neuronal quizás sea la identificación de elementos en *cis* que otorgan respuesta a esta señal en distintos exones (Fig. 1.15). En el 2001, el grupo de Black encontró el primero de estos elementos en el exón STREX del gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  del canal de potasio BK o Slo (Xie y Black 2001), cuya inclusión otorga a dicho canal mayor sensibilidad para la activación por calcio o voltaje. Dado que la respuesta del exón dependía de la vía de calcio y CaMKIV, se nombró al elemento CaRRE (elemento de ARN que responde a CaMKIV). Elementos similares fueron encontrados cerca de exones alternativos de otros canales iónicos como en el exon 5 del gen de NR1 (receptor de NMDA), estando el elemento cerca del extremo 3' del intrón y actuando como represor de la inclusión (Xie y Black 2001; Xie 2005).

Sin embargo, otros exones que responden a despolarización a través de la activación de CaMKIV no parecían poseer dicho elemento. Mediante el estudio de uno de estos exones, el exon 21 de NR1, se identificaron dos secuencias exónicas distintas, una de las cuales es similar al CaRRE anteriormente descrito, que fueron llamadas CaRRE1 y 2 (Lee 2007) a los que se unen factores aún no identificados. Además se identificó un rol de hnRNP A1 en la represión de este exón durante la despolarización, uniéndose a secuencias exónicas UAGG (An y Grabowski 2007). La presencia de distintos elementos que regulan la inclusión de un mismo exón alternativo nos habla de nuevo de la importancia del control

combinatorial. A su vez, estos elementos fueron encontrados también en otros exones alternativos, resultando su presencia un buen predictor de regulación por despolarización, aunque no en todos los casos el resultado fuera de inhibición (An y Grabowski 2007; Lee 2007).

#### 1.4. Modelo de trabajo: *splicing* alternativo del exon 18 de NCAM

##### 1.4.1. El gen y la proteína NCAM

La Molécula de Adhesión Celular Neural (*Neural Cell Adhesion Molecule* o NCAM) es una proteína de membrana perteneciente a la súper-familia de inmunoglobulinas, que participa en el reconocimiento y la adhesión célula-célula a través de interacciones homofílicas. Originalmente fue identificada por su capacidad de permitir la agregación de células disociadas de retina, actividad que era inhibida por anticuerpos bloqueantes contra esta proteína (Thiery 1977).

Es codificada por un único gen de más de casi 300 kpb en mamíferos ubicado en el cromosoma 9 del ratón y en el cromosoma 11 del humano (Kolkova 2008) y su transcripción es dirigida por un promotor sin *TATA-box* (Barton 1990; Hirsch 1990) a partir del cual se originan diversas isoformas por *splicing* alternativo y poli-adenilación diferencial (Fig. 1.16). Las tres más comunes (NCAM 120, 140 y 180) difieren en la región carboxi-terminal, incluyendo la región anclaje a membrana (que se realiza a través de un anclaje por glicofosfatidil-inositol en la forma NCAM 120, y a través de un péptido hidrofóbico en las dos formas mayores) y la región citoplasmática (Cunningham 1987). Tal como muestra la figura 1.16, la isoforma 120 es generada por inclusión del exón 15 que contiene su propia secuencia de poli-adenilación, mientras que las isoformas 140 y 180 no incluyen a dicho exón y contienen en cambio los exones 16 al 19, excluyendo el exón 18 en el ARNm que da origen a la isoforma 140. Otras dos regiones de variabilidad se encuentran entre los exones 7 y 8, donde se puede insertar un exón de 30 nt denominado VASE que otorga diferentes propiedades de unión a la proteína, y entre los exones 12 y 13, donde 4 diferentes segmentos cortos pueden dar origen en diferentes combinaciones al llamado dominio específico de músculo o MSD

(Kolkova 2008). Se han detectado por diferentes combinaciones de estas regiones hasta 27 diferentes ARNm durante el desarrollo del corazón en la rata (Reyes 1991).

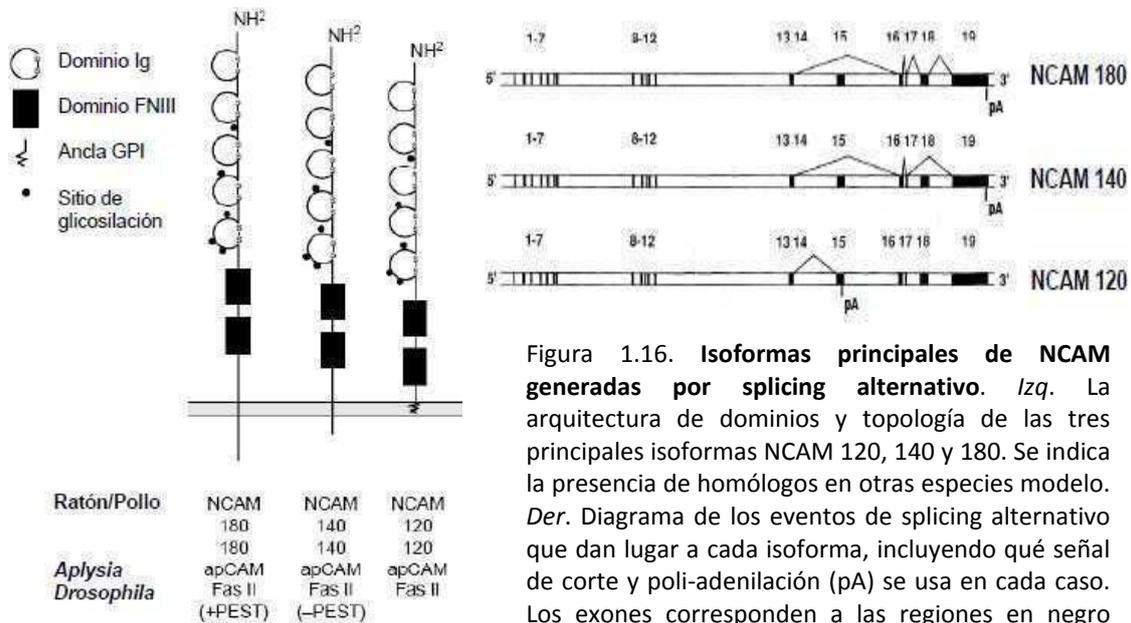


Figura 1.16. **Isoformas principales de NCAM generadas por splicing alternativo.** *Izq.* La arquitectura de dominios y topología de las tres principales isoformas NCAM 120, 140 y 180. Se indica la presencia de homólogos en otras especies modelo. *Der.* Diagrama de los eventos de splicing alternativo que dan lugar a cada isoforma, incluyendo qué señal de corte y poli-adenilación (pA) se usa en cada caso. Los exones corresponden a las regiones en negro (tomado de Cunningham 1987; Fields y Itoh 1996).

La proteína es sintetizada en el retículo endoplásmico como una glicoproteína, y antes de llegar a membrana es modificada en el aparato de Golgi, principalmente debido a la adición de varios residuos de ácido siálico, proceso al cual nos referiremos como poli-sialidación de NCAM (Finne 1983; Alcaraz y Goridis 1991). La poli-sialidación es alta en el embrión y va decreciendo durante el desarrollo (Finne 1983), y actuaría reduciendo la fuerza de contacto entre moléculas y, por lo tanto, modulando la adhesión celular. Se conocen dos enzimas implicadas en la transferencia de ácido siálico a NCAM denominadas ST8Sia II (o STX) y IV (o PST), de las cuales la primera tiene un rol clave durante el desarrollo mientras que la segunda juega un papel importante en la plasticidad neuronal en adultos (Angata 1997; Hildebrandt 1998; Eckhardt 2000; Angata 2004).

Además, la proteína sufre otras alteraciones post-traduccionales que regulan su actividad, como extensivas fosforilaciones en serina y treonina, *O*- y *N*-glicosilación, sulfatación y palmitoilación (Kolkova 2008).

Un gran número de evidencias muestra que las moléculas de adhesión en general y NCAM en particular participan tanto en el establecimiento de sinapsis en forma dependiente de actividad, como en la remodelación de sinapsis maduras asociada a plasticidad neuronal y a procesos de aprendizaje (Fields y Itoh 1996; Martin y Kandel 1996; Ronn 2000; Hartz y Ronn 2008). Desde los trabajos pioneros mostrando que el bloqueo de NCAM y otras moléculas de adhesión por medio de la administración de anticuerpos o péptidos es capaz de inhibir el aprendizaje y la potenciación sináptica a largo plazo (Doyle 1992; Luthl 1994; Ronn 1995), fue ganando terreno la hipótesis de que la plasticidad neuronal requiere remodelación estructural de las sinapsis mediada por cambios de expresión de moléculas de adhesión. Este modelo se ha estudiado en diferentes sistemas, destacándose los trabajos realizados con los homólogos de NCAM en los invertebrados *Aplysia* (ApCAM) (Mayford 1992; Schacher 2000) y *Drosophila* (Fasciclina II) (Davis 1996; Schuster 1996b; Schuster 1996a). En mamíferos, estudios con ratones *knock-out* para NCAM (Cremer 1994; Cremer 1998) o para las enzimas encargadas de transferirle ácido siálico (Eckhardt 2000; Angata 2004) permitieron determinar la necesidad de esta molécula para los procesos de aprendizaje y para la potenciación a largo plazo (LTP), pero no a corto plazo (STP), en el hipocampo de ratones adultos.

#### **1.4.2. El *splicing* alternativo del exon 18 de NCAM**

Las formas NCAM 140 y 180 difieren por la exclusión o inclusión de un único exón alternativo, el exón 18 (de 801 nucleótidos en el ratón). La inclusión de este exón, con el correspondiente cambio de la forma NCAM 140 a la NCAM 180, se observa durante la diferenciación neuronal, predominando la primera isoforma en los precursores neuronales, distribuida homogéneamente en la membrana celular, y aumentando la proporción de la segunda en las neuronas ya diferenciadas, donde se acumula en los puntos de contacto entre células (Pollerberg 1985; Murray 1986).

Funcionalmente, la inclusión de este exón añade a la proteína un dominio intracelular que es capaz de unirse a componentes del citoesqueleto a través de la proteína adaptadora espectrina, reduciendo su movilidad y localizándose en los

sitios de contacto celular (Pollerberg 1986; Pollerberg 1987), al mismo tiempo que se promueve su asociación con vesículas provenientes del Golgi *trans*, mediando su acumulación en las sinapsis (Sytnyk 2002). También se ha demostrado que la isoforma NCAM 140 une espectrina, aunque con más baja afinidad, y solo la isoforma 180 une el heterodímero  $\alpha\beta$  considerado como funcional mientras que la isoforma 140 une monómeros (Leshchyns'ka 2003). El andamiaje de espectrina generado en los terminales sinápticos por la presencia de NCAM 180 es importante para la localización y función de proteínas como el receptor de NMDA y la CaMKII $\alpha$  (Sytnyk 2006). Todas estas evidencias apuntan a un rol de NCAM 180 en la estabilización de la sinapsis madura.

Las vías de señalización asociadas a estas dos isoformas también presentan diferencias. La isoforma 140 resulta más eficiente para promover el crecimiento y la movilidad de neuritas (Doherty 1992; Buttner 2004), una característica que podría estar asociada a su capacidad para unir a la proteína Fyn y reclutar a la quinasa de adhesión focal (FAK) y activar las vías de Erk1 y 2 en respuesta a la unión homofílica (Beggs 1997; Schmid 1999). Otras proteínas que unen diferencialmente a estas dos isoformas podrían estar mediando también la activación de vías diferenciales y las diferentes propiedades biológicas (Buttner y Horstkorte 2008).

El *knockout* específico de la isoforma NCAM 180 provoca defectos en el desarrollo del sistema nervioso central, siendo el más evidente un subdesarrollo del bulbo olfatorio, probablemente ocasionado por un problema en la migración de las células precursoras (Tomasiewicz 1993). Además, se detectan efectos más sutiles en otras áreas como cerebelo, retina e hipocampo, y problemas en la formación y función de las conexiones neuromusculares (Tomasiewicz 1993; Polo-Parada 2004).

Las diferentes isoformas varían su representación en respuesta a distintos estímulos que involucran actividad neuronal. Por ejemplo, en la facilitación a largo plazo de sinapsis neuro-motoras en *Aplysia*, al inducir facilitación mediante la aplicación de serotonina se observa un incremento en la proporción de isoformas más cortas de ApCAM (Schacher 2000). En particular en el hipocampo de ratones,

se sabe que la activación de receptores de NMDA induce cambios específicos de isoforma (Hoffman 2001) y que la inducción de LTP en animales adultos incrementa el número de sinapsis positivas para la isoforma NCAM 180, a la vez que provoca modificaciones estructurales en las sinapsis (Schuster 1998) y redistribución de receptores para glutamato (Fux 2003).

#### **1.4.3. Regulación del *splicing* alternativo de NCAM**

Se han realizado algunos estudios mecanísticos tempranos sobre los mecanismos moleculares que regulan el *splicing* alternativo del exón 18 de NCAM. Como ya dijimos, su tamaño (801 nt en ratón) es bastante superior al de la media en vertebrados (entre 100 y 150 nt), sabiéndose que el incremento en la longitud de los exones dificulta la definición exónica (Berget 1995). Además, se ha demostrado que la presencia de un sitio 5' de reconocimiento sub-óptimo contribuye a su condición de exón alternativo y, por lo tanto, su capacidad de ser regulado (Tacke y Goridis 1991).

Deleciones en el exón afectan la regulación del *splicing* en forma no coherente con la presencia en el mismo de un único elemento regulador (Tacke y Goridis 1991), sugiriendo que la regulación es compleja y que pueden participar elementos intrónicos o incluso en otros exones. De hecho, una región del exón 17 (constitutivo) es capaz de unir proteínas SR y modular la utilización del sitio 5' sub-óptimo del exón 18 (Cote 1999). Otros estudios subrayan la importancia de apareamientos internos o estructura secundaria del ARN, que impediría el correcto reconocimiento del sitio 5' de este exón alternativo (Cote y Chabot 1997).

Esta complejidad regulatoria sugiere que cambios a nivel transcripcional que afecten o bien el reclutamiento de proteínas accesorias o bien el tiempo en el cual las secuencias regulatorias son transcritas, podrían afectar significativamente el *splicing* alternativo de este exón.

## 2. Objetivos

---

### Objetivo general

Estudiar los mecanismos de regulación del splicing alternativo en la función neuronal en relación con la influencia transcripcional, haciendo especial hincapié en la modulación de la estructura de la cromatina como forma de regulación del splicing alternativo acoplado a la transcripción.

### Objetivos específicos

- Caracterizar la influencia transcripcional sobre el splicing alternativo del exón 18 del ARNm de NCAM, utilizando como modelo celular la línea de neuroblastoma murino N2a.
- Poner a prueba la hipótesis de que el splicing alternativo del exón 18 de NCAM es regulado por la actividad neuronal y caracterizar mecanismos moleculares que puedan mediar dicha regulación.
- Determinar la influencia de la tasa de elongación transcripcional en la regulación del splicing alternativo del exón 18.
- Determinar la influencia de la cromatina en la regulación del splicing alternativo del exón 18.

## 3. Resultados

---

### 3.1. Sistema de trabajo. Regulación del *splicing* alternativo (SA) del exon 18 de NCAM.

En base a los trabajos previos del grupo y a los avances desarrollados simultáneamente por otros laboratorios, el modelo cinético de regulación transcripcional del *splicing* alternativo (SA) fue cobrando fuerza como marco explicativo alternativo, aunque no antagónico, al modelo paradigmático de control del SA por factores reguladores en *trans* (ver Introducción). Sin embargo, dado que la mayoría de los estudios realizados se valieron de o bien minigenes reporteros o bien transfección de polimerasas mutantes, la principal duda que quedaba sin resolver en dicho modelo era su real implicancia en la regulación fisiológica de diferentes genes endógenos. Es con la premisa de contribuir al abordaje esta cuestión con la que comienza este trabajo.

#### 3.1.1. Modelo de trabajo

En parte para expandir las conclusiones más allá del modelo habitual del grupo (el gen de fibronectina, y en particular su exon EDI), y en parte también para aprovechar su relevancia fisiológica a nivel de células neuronales, se decidió utilizar como modelo el exon 18 (E18) del gen de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM). A partir de un análisis en la literatura referida al estudio del SA de dicho exon se decidió utilizar como modelo celular neuronal la línea de neuroblastoma murino Neuro-2a (o N2a). Como línea no neuronal se optó por las células fibroblásticas de ratón NIH-3T3.

La primera parte del trabajo consistió en la puesta a punto de distintas técnicas de evaluación de los patrones de *splicing* para el exón 18 del gen de NCAM murino y de las condiciones de cultivo de la línea N2a. Para el caso de las técnicas de evaluación del *splicing*, la técnica utilizada habitualmente en el grupo (RT-PCR radiactiva semicuantitativa con un par de oligonucleótidos iniciadores que amplifica simultáneamente las dos isoformas) presentó una dificultad: el gran

tamaño del exón alternativo E18 (801 nt) hacía que la eficiencia de amplificación de la isoforma de inclusión fuera mucho menor que la eficiencia de la isoforma de exclusión. Es por esto que, incluso en las condiciones de amplificación más favorables a la isoforma mayor, la relación medida entre inclusión y exclusión era mucho más baja que la reportada para estas células. Para corroborar la relación real entre las isoformas se utilizó el ensayo de protección contra la RNasa (RPA), que mostró un nivel de inclusión de alrededor de 30% para las células N2a (Fig. 3.1A), similar al reportado en literatura (Tacke y Goridis 1991).

### 3.1.2. Diferenciación celular

Una de las condiciones en las cuales se testeó inicialmente la modulación del SA del E18 es la diferenciación celular. Para promover la diferenciación de las células N2a se estudiaron distintas condiciones de medios, confluencia, tiempos de incubación y agregado de agentes diferenciadores (ácido retinoico, dimetilsulfóxido). Mientras que la incubación con ácido retinoico mostró ya al primer día células con cambios morfológicos asociados a diferenciación (por ejemplo extensión de neuritas), el patrón de SA del E18 de NCAM no presentó cambios hasta el día 4 o 5 de tratamiento. Por el contrario, el método de diferenciación en medio con bajo suero y dimetilsulfóxido (ver Materiales y Métodos) mostró una mayor correlación entre la diferenciación morfológica y el cambio en SA para las N2a. En la figura 3.1A se muestra el patrón de *splicing* de células indiferenciadas y de hasta 4 días de diferenciación, determinado por RPA o por RT-PCR radiactiva. De acuerdo con lo reportado previamente, se observa un aumento en la proporción de la isoforma de inclusión que, en células N2a diferenciadas, pasa a ser la isoforma predominante. Este patrón fue comparado al correspondiente a células de cerebro de ratón adulto, mostrando que las células N2a diferenciadas tienen un nivel de inclusión del E18 similar al de neuronas maduras.

A los 4 días de diferenciación con este tratamiento ya pueden apreciarse cambios morfológicos en las células N2a, mientras que a los 8 días un porcentaje variable entre el 30 y el 60% de las células muestra extensión de neuritas, a la vez que se detecta una alta expresión de distintos marcadores neuronales, como

proteínas del neurofilamento o APC (Fig. 3.1B). Sin embargo, cabe aclarar que muchas de las células N2a muestran ya un nivel bajo pero detectable de marcadores sin inducir diferenciación, lo cual sugiere que al menos algunas de las células del cultivo se encuentran parcialmente diferenciadas. De aquí en adelante se optó por usar para los experimentos con N2a diferenciadas células tratadas por este protocolo durante 7 u 8 días, para asegurarse de que la población esté enriquecida en células totalmente diferenciadas.

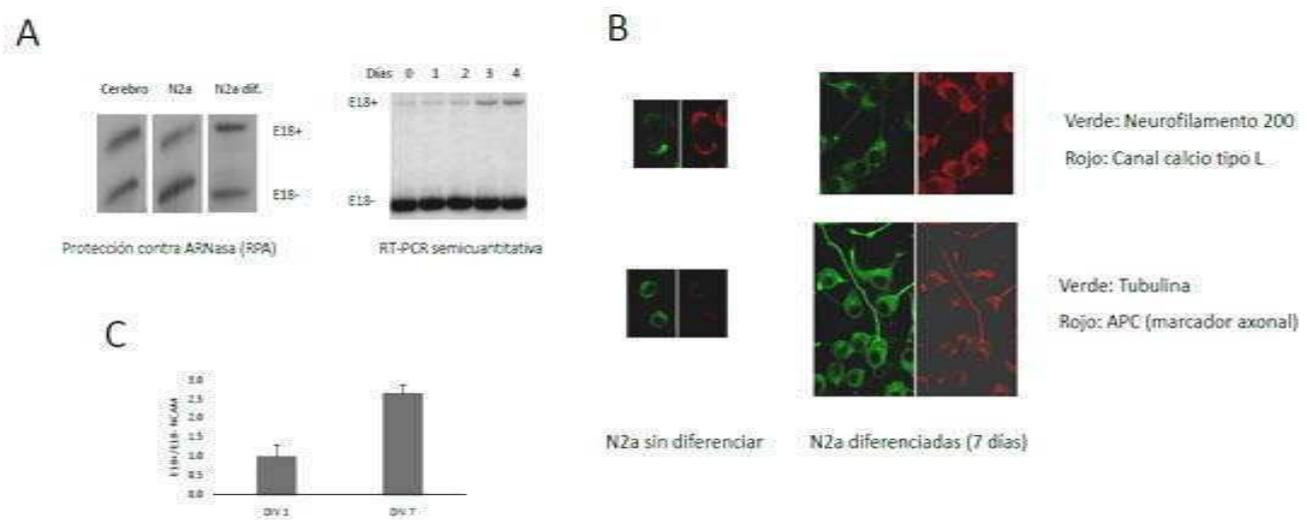


Figura 3.1. Sistema de trabajo y modulación del *splicing* alternativo del exón 18 de NCAM con la diferenciación celular. **A.** Izquierda: determinación de los patrones de *splicing* alternativo (SA) del exón 18 (E18) de NCAM en células de cerebro de ratón adulto, células de neuroblastoma murino (N2a) y células N2a a las que se indujo a diferenciar (ver Materiales y Métodos) por 4 días, determinado por ensayo de protección contra ARNasa (RPA); derecha: patrones de SA de células N2a incubadas en medio de diferenciación por los días indicados, determinado por RT-PCR radiactiva semicuantitativa. **B.** Inmunofluorescencia indirecta (ver Materiales y Métodos) sobre células N2a sin diferenciar y diferenciadas por 7 días, utilizando anticuerpos primarios contra los marcadores indicados. **C.** Patrones de SA del E18 de NCAM en neuronas hipocámpales en cultivo primario de 1 o 7 días (DIV 1 o DIV 7), determinados por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar (DE) de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

Si bien el RPA es un ensayo confiable y no sesgado para detectar la proporción de distintas especies de ARN presentes en una muestra, resulta engorroso para procesar un gran número de muestras simultáneamente y requiere una masa de ARN apreciablemente mayor que la RT-PCR. Por esta razón decidimos determinar si la detección por RT-PCR semicuantitativa, aunque subestimando en nivel de inclusión, era igualmente sensible para determinar diferencias entre los niveles de inclusión de distintas muestras. Se determinó que las diferencias de *splicing* entre tratamientos medidas por RT-PCR sí se correspondían fielmente a

las medidas por métodos más cuantitativos como el RPA y la PCR en tiempo real (ver figuras 3.1 y 3.7A), por lo que se utilizaron indistintamente la PCR radiactiva semicuantitativa y la PCR cuantitativa en tiempo real como técnicas de evaluación estándar.

Como un sistema celular que complemente los estudios realizados en N2a, añadiendo en particular mayor relevancia fisiológica a los tratamientos ensayados, se utilizaron cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo de embrión de rata (ver Materiales y Métodos). Los niveles de inclusión del E18 en células cultivadas *in vitro* por entre 1 y 7 días fueron evaluados utilizando RT-PCR en tiempo real, observándose el esperado aumento en la inclusión del E18, correlacionado con la diferenciación celular (Fig. 3.1C).

### **3.1.3. Proteínas reguladoras de splicing**

Decidimos evaluar la capacidad de distintas proteínas reguladoras del *splicing* de modular el nivel de inclusión del E18 de NCAM, incluyendo en un primer análisis a varias proteínas SR y a la ya mencionada hnRNP A1. Como primera aproximación, se co-transfectaron vectores de expresión para las distintas proteínas con un minigén reportero del E18 de NCAM (ver Materiales y Métodos) en células N2a, y 48 hs después se analizó el patrón de SA resultante. Como controles se transfectaron sólo el minigén (-) o el minigén con un vector vacío. Como muestra la figura 3.2, el efecto estimulatorio más importante lo muestra la proteína SRp20, capaz de incrementar en 10 veces la inclusión del E18, con efectos mucho más modestos de SC35 y 9G8. En cuanto a la inhibición de la inclusión, hnRNP A1 muestra un efecto que parece ser más consistente a dosis bajas (comparar 50 ng contra 250 ng), mientras que SRp40 parece también afectar negativamente a la inclusión del E18.

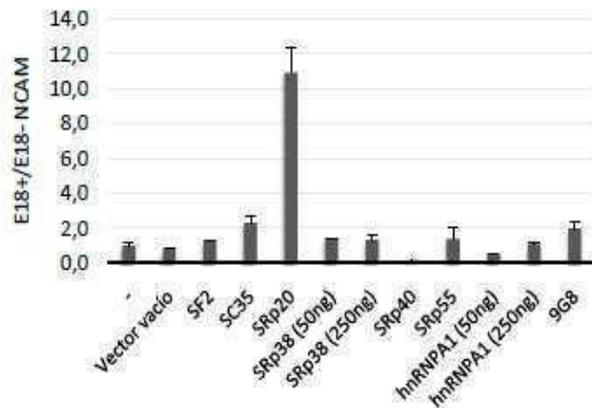


Figura 3.2. Efecto de la sobreexpresión de proteínas reguladoras del splicing en la inclusión del exón 18 de NCAM. Células N2a fueron co-transfectadas con un minigén reportero del E18 de NCAM y con vectores de sobreexpresión de distintas proteínas SR y de hnRNP A1. En los casos en que no se indica la masa, se transfectaron 250 ng de plásmido. 48 horas después de la transfección se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM correspondiente al minigén. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente a las células transfectadas sólo con el minigén (-).

Para evaluar la relevancia funcional de los niveles endógenos de estas proteínas, se optó por inhibir la expresión de alguna de ellas transfectando ARN pequeños interferentes (siRNAs) diseñados contra las SRp20, SF2/ASF, SC35 y hnRNP A1. Como control se transfectó un siRNA dirigido contra la proteína luciferasa (Luc), no presente en estas células. La evaluación del patrón de SA en el gen endógeno de NCAM (Fig. 3.3A) muestra que la proteína SRp20 está actuando en las células para mantener los niveles basales de inclusión del E18 de NCAM, por lo que la modulación en la expresión y/o actividad de dicha proteína es relevante para los patrones de SA de este evento. El silenciamiento de hnRNP A1 muestra también un efecto parcial, coherente con el resultado de la sobreexpresión (ver Fig. 3.2), mientras que SF2/ASF y SC35 parecen no jugar un rol relevante en los niveles de SA basales del E18 de NCAM. Cabe aclarar que las eficiencias de silenciamiento no fueron altas (Fig. 3.3, recuadro), por lo que en algunos casos los niveles de la proteína remanente pueden ser suficientes para enmascarar un posible efecto de los siRNAs.

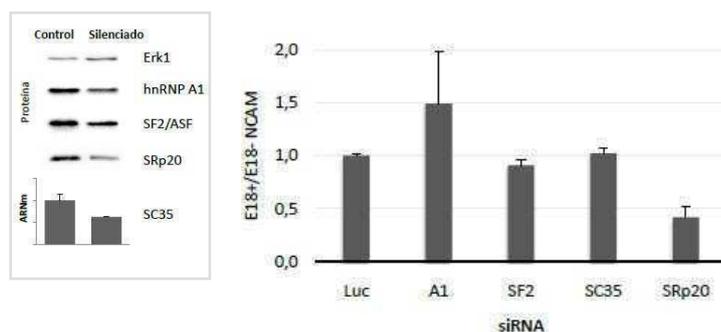


Figura 3.3. Efecto del silenciamiento de los niveles endógenos de proteínas reguladoras del splicing en la inclusión del exón 18 de NCAM. Células N2a fueron transfectadas con siRNAs contra hnRNP A1 (A1), contra distintas proteínas SR (SF2, SC35 o SRp20) o con un siRNA control (siLUC) y 72 hs después se analizaron los patrones de SA del E18 de NCAM endógeno. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente a las células transfectadas con el siRNA control.

### 3.1.4. La tasa de elongación de la ARN pol II afecta el SA del E18 de NCAM

Alternativamente al clásico control por proteínas reguladoras del *splicing*, decidimos investigar posibles cambios transcripcionales que pudieran estar afectando el SA de este evento. En particular, nos preguntamos inicialmente si el SA del E18 de NCAM responde a cambios en la cinética transcripcional en forma acorde al modelo cinético planteado.

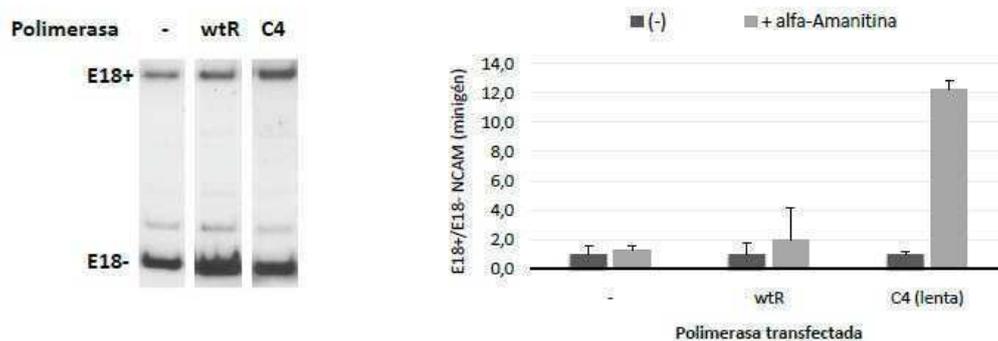


Figura 3.4. La inclusión E18 de NCAM es regulada por la tasa de elongación de la pol II. Células N2a fueron co-transfectadas con un minigén reportero del E18 de NCAM y con vectores de expresión de la subunidad mayor de la ARN pol II (Rbp1), en variantes resistentes a  $\alpha$ -amanitina con tasas de elongación normal ( $wt^R$ ) o lenta (C4), o bien vector vacío (-). Un día después, algunas de las células fueron incubadas por otras 24 hs con el inhibidor de la polimerasa endógena,  $\alpha$ -amanitina, analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM correspondiente al minigén. En el gel se muestran sólo los patrones de bandas obtenidos para las células tratadas con  $\alpha$ -amanitina. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente a las células sin  $\alpha$ -amanitina.

Como primera aproximación directa a esta pregunta se investigó el efecto de una mutante “lenta” de la ARN polimerasa II (pol II), denominada C4, cuyo efecto sobre el SA había sido investigado previamente (de la Mata 2003) y cuya menor tasa de elongación ha sido recientemente corroborada (Boireau 2007). El experimento consiste en co-transfectar el minigén reportero del E18 de NCAM con vectores de expresión de variantes de la pol II resistentes a la droga  $\alpha$ -amanitina. Las polimerasas pueden bien tener características de elongación normales ( $wt^R$ ) o lentas (C4). Una vez transfectados los plásmidos y pasado cierto tiempo para permitir la expresión de las polimerasas, se aplica la droga  $\alpha$ -amanitina a algunos de los cultivos. La droga inhibirá a la pol II endógena de las células, haciendo que la mayor parte de la transcripción que se desarrolle a partir de ese momento corresponda a las polimerasas resistentes transfectadas. Un día después de aplicar

la  $\alpha$ -amanitina se evaluó el patrón de SA correspondiente al minigén reportero (Fig. 3.4), apreciándose que cuando la transcripción del minigén de NCAM es llevada a cabo por la polimerasa lenta C4, la inclusión del E18 es considerablemente mayor. Esta observación concuerda plenamente con la predicción desarrollada por el modelo cinético y nos permite interpretar la regulación transcripcional de este exón en el marco de dicho modelo.

Como aproximación complementaria, y para estudiar también el efecto de la transcripción en el gen endógeno, utilizamos una estrategia farmacológica: un inhibidor muy potente y específico de la proteína Cdk9, el flavopiridol (FP) (Chao 2000). La kinasa Cdk9 es la subunidad catalítica del factor de elongación P-TEFb, responsable de fosforilar a la pol II en los residuos Ser2 del dominio carboxi-terminal, promoviendo el estado de fosforilación de la pol II comúnmente asociado a la etapa de activa elongación. El tratamiento de las células con FP o con un inhibidor relacionado, DRB (Nogues 2002), causa en el exon EDI de fibronectina el mismo efecto que la polimerasa lenta. En el caso del E18 de NCAM el tratamiento de las células N2a con FP muestra un aumento de la inclusión, aunque dicho aumento sólo se observa en presencia de CHX (Fig. 3.5). Esto último podría indicar la existencia de un efecto indirecto del FP que actúa en sentido contrario a su efecto transcripcional, y que se anula al tratar las células con CHX.

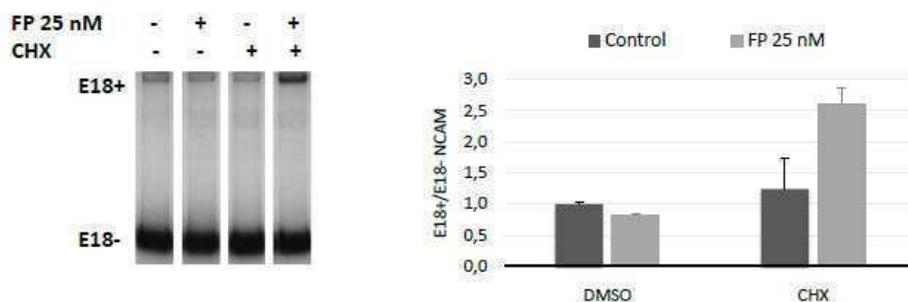


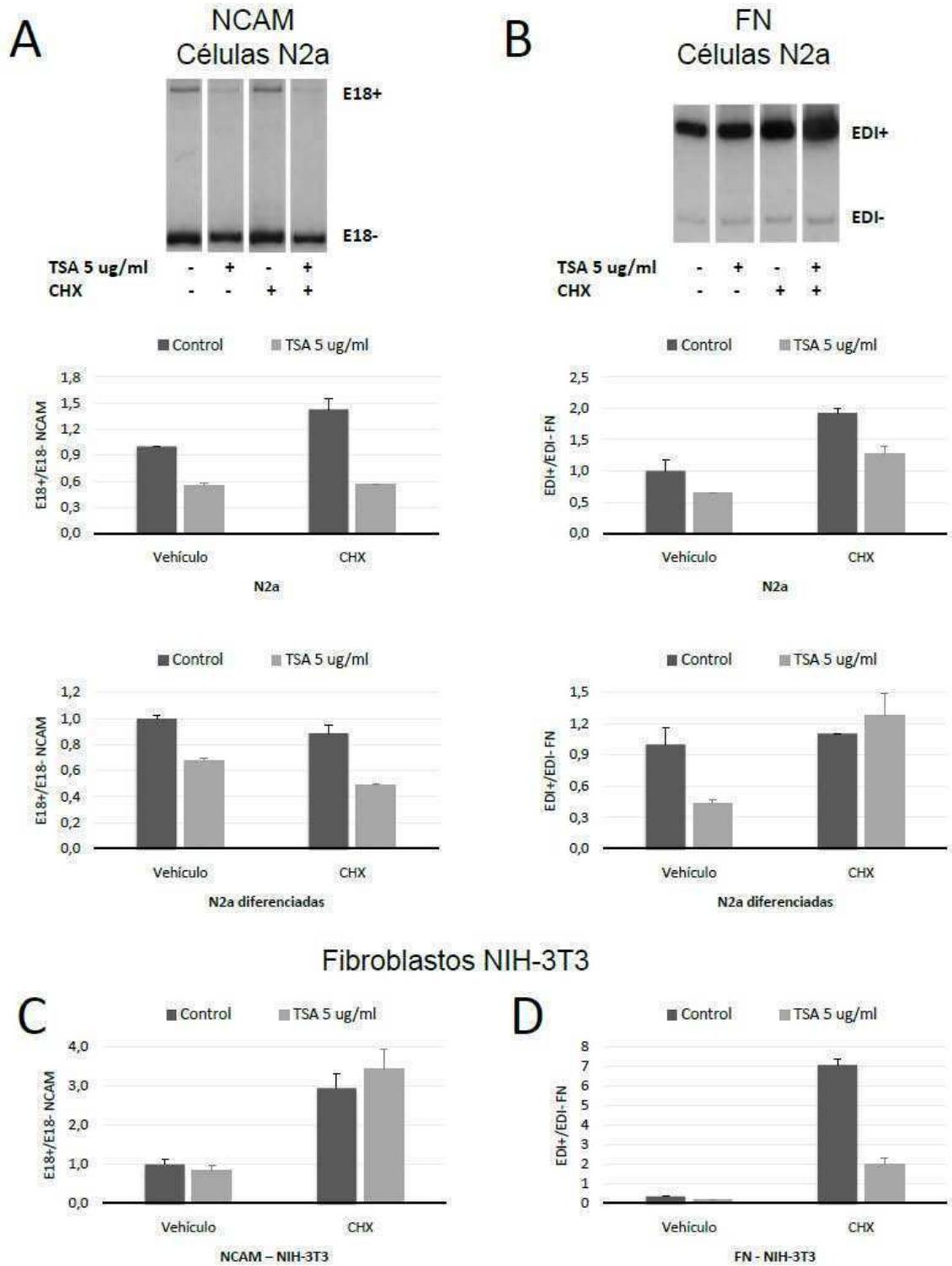
Figura 3.5. Un inhibidor farmacológico que afecta la tasa de elongación de la pol II muestra efecto similar a la transcripción por la polimerasa lenta. Células N2a fueron tratadas por 16 hs con vehículo o con 25 nM flavopiridol (FP), inhibidor específico de la Cdk9. Los tratamientos fueron realizados en ausencia y presencia de 5  $\mu$ g/ml CHX. Luego se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control sin CHX.

### 3.1.5. La acetilación de histonas afecta el SA del E18 en células neuronales

Otra estrategia farmacológica utilizada previamente en el grupo es la utilización de la droga tricostatina A (TSA), un inhibidor bastante específico de las des-acetiladas de histonas (HDACs). El tratamiento con esta droga causa hiperacetilación general de histonas y apertura de la cromatina. Según el modelo cinético, al ofrecer la cromatina menor obstáculo a la transcripción, el tratamiento con TSA debería causar niveles de inclusión más bajos, que es lo que se observa para el exon EDI de fibronectina (Nogues 2002). De la misma forma, al tratar células N2a con TSA se observa una disminución de la inclusión del E18 de NCAM, tanto en ausencia como en presencia de CHX (Fig. 3.6A). El efecto de TSA sobre NCAM también puede apreciarse en células N2a diferenciadas (Fig. 3.6A, abajo). Llamativamente en estas células el exon EDI de fibronectina, a pesar de tener una inclusión basal mucho mayor, muestra una menor respuesta al tratamiento con TSA (Fig. 3.6B). Por el contrario, en células fibroblásticas NIH-3T3 es el E18 de NCAM quien no responde a la droga (Fig. 3.6C), mientras que EDI responde en mucho mayor medida (Fig. 3.6D). Esto sugiere que la modulación del SA por esta droga es específica de gen, a la vez que es diferente en los distintos tipos celulares, dependiendo probablemente del estado de la cromatina para el gen en cuestión en determinado tipo celular.

*(en página siguiente)*

Figura 3.6. **Una droga que induce hiperacetilación de histonas provoca sobre el SA de NCAM el efecto opuesto a la transcripción por la polimerasa lenta.** **A.** Células N2a cultivadas normalmente o inducidas a diferenciarse fueron tratadas por 16 hs con vehículo o 5 µg/ml tricostatina A (TSA), en presencia o ausencia de 5 µg/ml CHX, analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM. Se muestra el gel correspondiente a las células N2a sin diferenciar. **B.** Idem A, pero se analizó el patrón de SA del exon EDI de FN. **C y D.** Fibroblastos murinos NIH-3T3 fueron tratados de la misma forma que en A, analizándose los patrones de SA del E18 de NCAM (**C**) y de EDI (**D**). Las barras corresponden al promedio ± DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control sin CHX.



### 3.2. Efecto de la actividad neuronal en el splicing alternativo del exon 18 de NCAM.

#### **3.2.1. La excitación de células neuronales con altas concentraciones de K<sup>+</sup> provoca un cambio en el SA del E18**

De acuerdo a lo desarrollado en la Introducción, existen en la literatura observaciones que sugieren una posible regulación del SA del exon 18 de NCAM por la actividad neuronal. Como aproximación para evaluar esta posibilidad, se incubaron las células N2a indiferenciadas en medio con distintas concentraciones extracelulares de cloruro de potasio (KCl), de forma de producir una despolarización sostenida del potencial de membrana, que pueda disparar la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje. Se ensayaron distintas concentraciones de KCl (Fig. 3.7A) y distintos tiempos de incubación (Fig. 3.7B), observando que la presencia de altas concentraciones de KCl induce un menor nivel de inclusión del E18, y que la incubación con 60 mM KCl durante 12-16 horas mostró los resultados más claros y reproducibles. La ausencia de efecto al reemplazar potasio por sodio (Fig. 3.7C) sugiere que el efecto no es debido a la modificación de la concentración salina, sino a la presencia de altas concentraciones de K<sup>+</sup> y, por lo tanto, a la despolarización del potencial de membrana. La co-incubación con bloqueantes de canales de Ca<sup>++</sup> dependientes de voltaje muestra que al menos una parte del efecto es debido a la apertura de canales tipo L (Fig. 3.7D). Por inmunofluorescencia se pudo detectar la presencia de estos canales en células N2a, tanto indiferenciadas como diferenciadas (Fig. 3.1B).

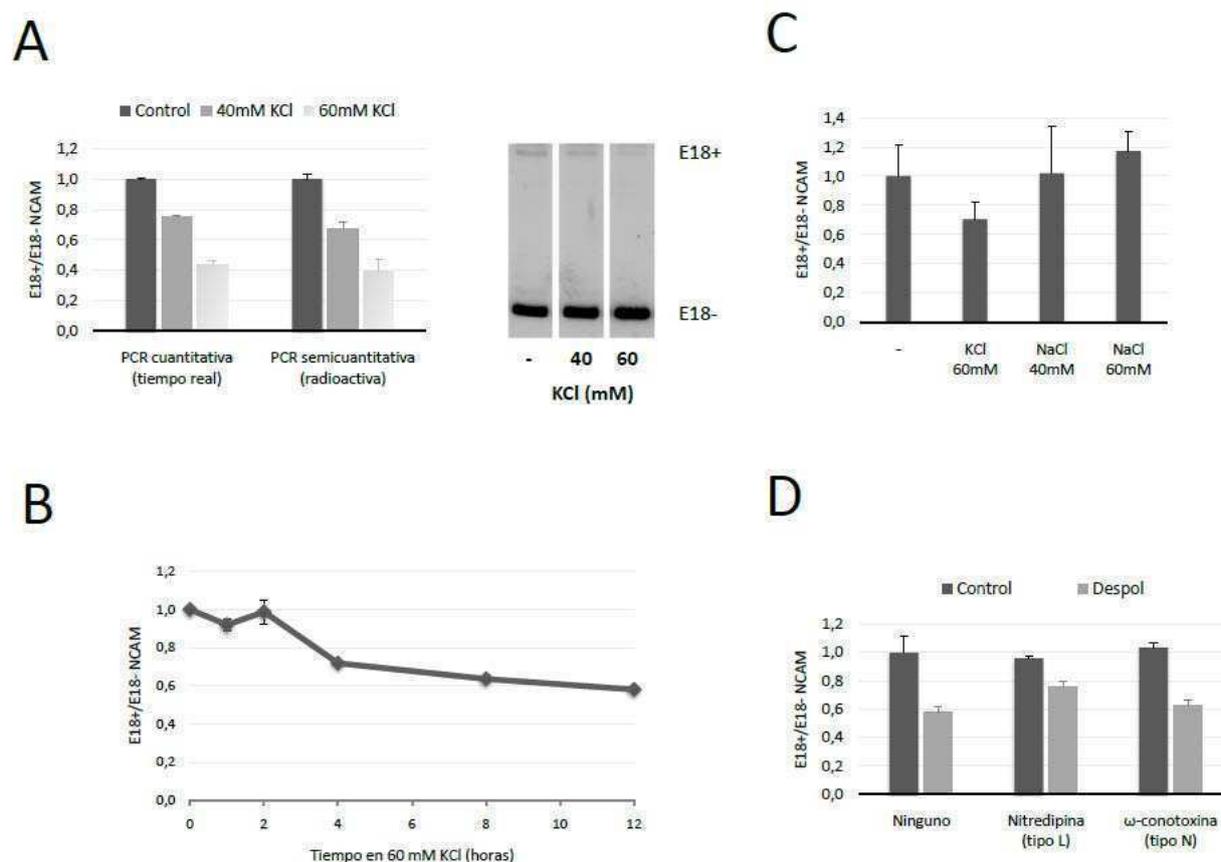


Figura 3.7. La despolarización del potencial de membrana de células de neuroblastoma N2a disminuye el nivel de inclusión del exon 18 de NCAM. **A.** Células N2a fueron incubadas durante 16 hs en medio DMEM suplementado con las concentraciones de KCl indicadas. Se extrajo el ARN, se realizó transcripción reversa con oligo-dT y se analizó el patrón de *splicing* alternativo (SA) de los mensajeros de NCAM comparando la metodología de PCR en tiempo real (barras izquierda) y PCR radiactiva semicuantitativa (barras derecha y gel). Se indica en el esquema los eventos de SA y la posición de los oligonucleótidos iniciadores utilizados.  $n=3$ . **B.** Idem A, pero las células fueron incubadas con 60 mM KCl por los tiempos indicados;  $n=2$ . **C.** Idem A, pero las células fueron incubadas en medio control o suplementado con 60 mM KCl, 40 o 60 mM NaCl;  $n=3$ . **D.** Células N2a fueron incubadas por 16 hs en medio control o con 60 mM KCl (Desp.), en ausencia o presencia de inhibidores de canales de calcio voltaje-dependientes tipo L (nitredipina) o tipo N ( $\omega$ -conotoxina);  $n=3$ . En todos los casos, el ARN se extrajo y se analizó como se indica en Materiales y Métodos. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar (DE) de  $n$  replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

Como control de la magnitud del efecto, se realizaron sobre las mismas muestras determinaciones por PCR semicuantitativa y PCR en tiempo real, obteniéndose resultados cuantitativamente comparables por ambos métodos (Fig. 3.7A). Para controlar que el efecto no se debiera a una modificación general del proceso de *splicing* o de la definición exónica, se evaluaron los patrones de SA de otros dos exones: el exon EDI de fibronectina (Fig. 3.8A), por ser un modelo muy conocido por el grupo; y el exon correspondiente a la región B-box del gen CPEB4

(Fig. 3.8B), por ser un gen con importancia en sistema nervioso y cuya expresión en hipocampo es regulada por la excitación neuronal (Theis 2003). Para estos dos casos, no se detectaron cambios significativos en los patrones de SA.

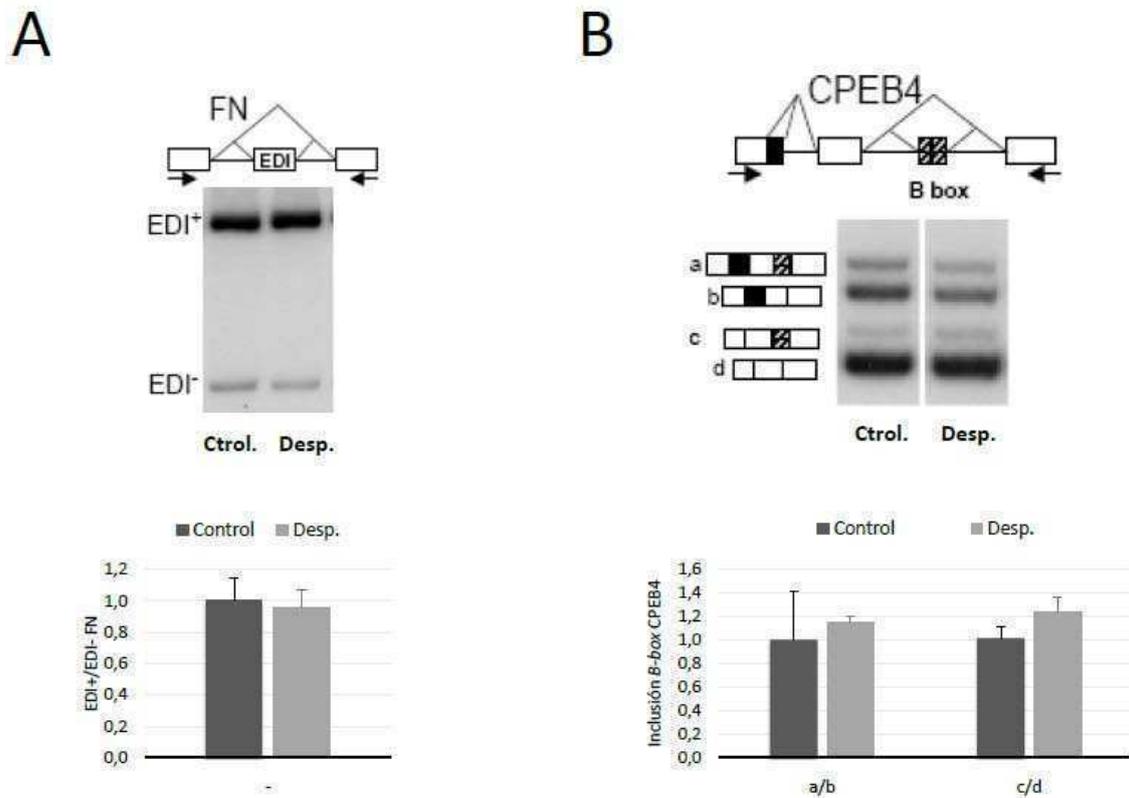


Figura 3.8. **El efecto de despolarización es gen-específico.** Células N2a se incubaron por 16 hs en ausencia o presencia de 60 mM KCl (Desp.). Se muestran los esquemas de SA (arriba) y los patrones de SA observados, correspondientes a los exones EDI de fibronectina (**A**) y *B-box* de CPEB4 (**B**). En este último caso, se grafican por separado los niveles de inclusión/exclusión correspondientes a ARNm que contienen (a/b) o no (c/d) a la primer región alternativa. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control, relativizado al valor correspondiente al control.

Se evaluó asimismo si las células N2a que previamente habían sido inducidas a diferenciarse y las que no, se comportaban de igual forma frente al tratamiento con KCl. Como se observa en la figura 3.9, si bien las células diferenciadas muestran un nivel de inclusión basal más alto, la magnitud del efecto de despolarización es similar en ambos tipos de células, lo que sugiere que la modulación del SA del E18 en respuesta a la diferenciación y al tratamiento con alto KCl actúan en forma independiente. De igual forma, se evaluó el efecto de la despolarización por alto KCl en neuronas hipocampales en cultivo primario,

observándose el mismo tipo de regulación que en las células N2a (Fig. 3.10). En conjunto, los resultados apuntan a la existencia de una vía de señalización en neuronas disparada por la despolarización del potencial de membrana que es capaz de regular el SA del E18 de NCAM.

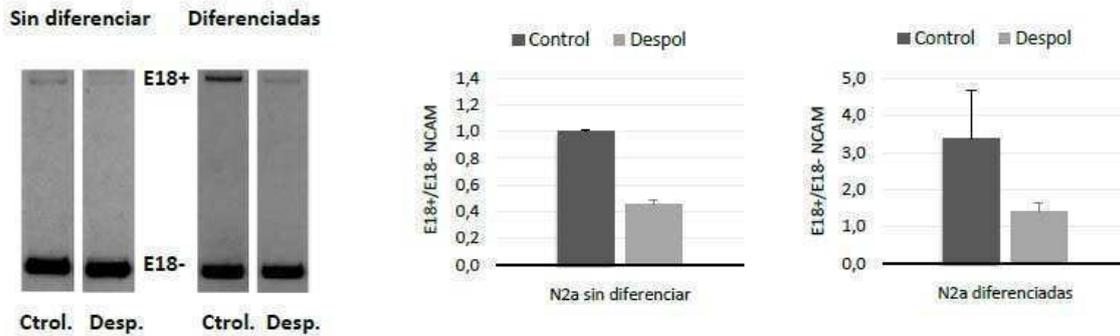


Figura 3.9. Los efectos de la despolarización y de la diferenciación neuronal son independientes. Células N2a mantenidas normalmente ( $n=2$ ) o inducidas a diferenciarse durante 7 ( $n=4$ ) días fueron tratadas con medio control o con el agregado de 60 mM KCl (Desp.) durante 16 hs, analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de  $n$  replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control de las células sin diferenciar.

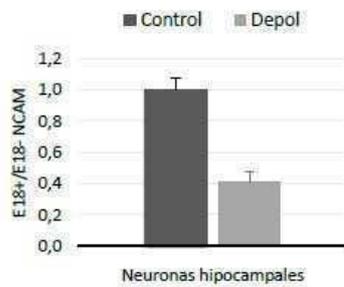


Figura 3.10. El efecto de la despolarización del potencial de membrana sobre el exon 18 de NCAM se observa en neuronas hipocampales en cultivo primario. Neuronas hipocampales mantenidas 6 días en cultivo fueron tratadas por 20 horas con medio normal (Control) o suplementado con 40 mM KCl (Desp.), analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

### 3.2.2. El efecto de despolarización es directo y reversible

Dada la longitud de los tratamientos, queríamos descartar que los cambios observados en el patrón de *splicing* se produjeran por una alteración irreversible de las células. Para evaluar esto, realizamos el tratamiento habitual por 16 hs, luego del cual algunas de las células fueron incubadas en medio normal por un día más (Fig. 3.11). La recuperación en medio normal vuelve la inclusión del E18 a niveles similares a las células sin tratar, mostrando la naturaleza dinámica de la regulación de este evento de SA. Otra posibilidad que queríamos descartar era que

los efectos observados puedan ser indirectos, en el sentido que la vía de señalización disparada no actúe directamente sobre el SA de NCAM, sino que modifique la expresión de algún factor que a su vez regule el *splicing* del E18. Para comprobar si el efecto era indirecto, se realizó el tratamiento en presencia de cicloheximida (CHX), inhibidor de la traducción en células eucariotas, de forma de impedir síntesis de nuevas proteínas. Los resultados mostrados en la figura 3.12 muestran que el efecto se mantiene en presencia de CHX, sugiriendo que el efecto actúa en forma directa, y no mediante cambios en la expresión de otras proteínas. La mayor magnitud del efecto en presencia de CHX se debe a un aumento en la inclusión basal de este y otros exones alternativos observado en presencia del inhibidor, a la vez que se mantiene el nivel de inclusión de las células después del tratamiento con KCl.

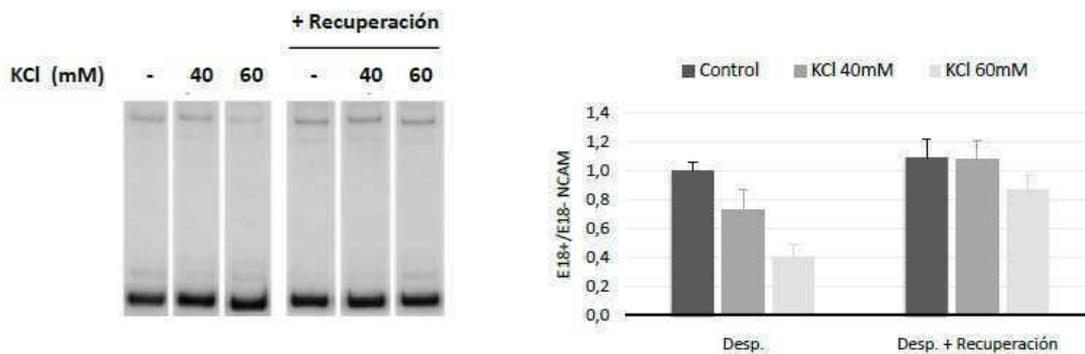


Figura 3.11. **El efecto de despolarización sobre el SA de NCAM es reversible.** Células N2a fueron tratadas con las concentraciones de KCl indicadas por 16 hs (Desp.) o tratadas y luego incubadas durante 24 horas extra en medio normal (Desp. + Recuperación), analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control de las células sin recuperar, relativizado al valor correspondiente al control.

A continuación se verificó si el efecto de la incubación con alto KCl se observaba de igual forma en el minigén reportero del E18 de NCAM, para ver si se podía contar con esta herramienta para el estudio del efecto. Para esto, se transfectaron células N2a con el minigén y al día siguiente se inició el tratamiento de despolarización en ausencia o presencia de CHX (Fig. 3.13), observándose en ambos casos respuestas similares a las del gen endógeno.

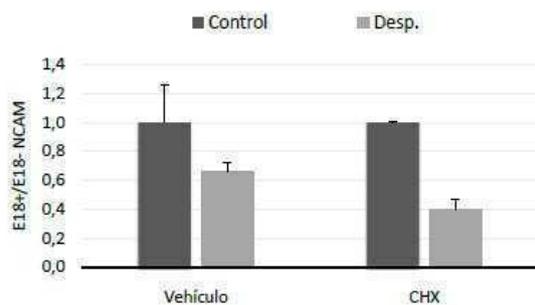


Figura 3.12. **El efecto de despolarización no depende de cambios en la expresión de otras proteínas.** Células N2a fueron tratadas por 16 hs en ausencia (Vehículo) o presencia (CHX) de 5  $\mu\text{g/ml}$  del inhibidor de la traducción, cicloheximida. Luego se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

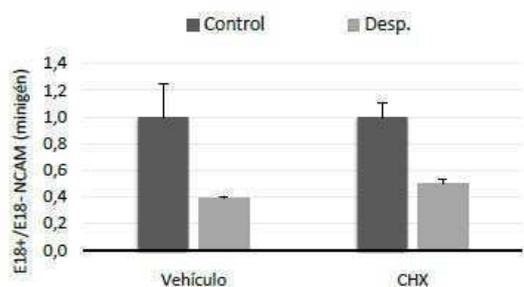


Figura 3.13. **El minigén reportero para el E18 de NCAM reproduce el efecto de despolarización.** Idem figura R7, pero los tratamientos fueron realizados sobre células previamente transfectadas con un minigén reportero, analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM correspondiente al minigén. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor

Dado que la evidencia sugiere que el efecto del tratamiento con alto KCl sobre el cambio del patrón de isoformas de NCAM es directo, una posibilidad es que no sea el SA del E18 el proceso afectado, sino que el efecto esté mediado por un cambio en la estabilidad de alguna de las isoformas. Para descartar esta posibilidad, se agregó actinomomicina D (Act D) al mismo tiempo que la incubación con alto KCl. La Act D inhibe la transcripción, por lo que es su presencia no se generan nuevas moléculas de ARNm. Si aun así se detectara un efecto de la despolarización, debería atribuírselo a un cambio en la estabilidad de los ARNm ya presentes. Como muestra la figura 3.14, mientras que en ausencia de Act D se observa un claro efecto de la despolarización tanto para el gen endógeno como para el minigén, en presencia del inhibidor las células tratadas o no tratadas muestran niveles comparables de inclusión de E18 a los distintos tiempos ensayados. Esta observación implica que la despolarización actúa sobre los nuevos mensajeros sintetizados y sugiere que la regulación es a nivel del *splicing*.

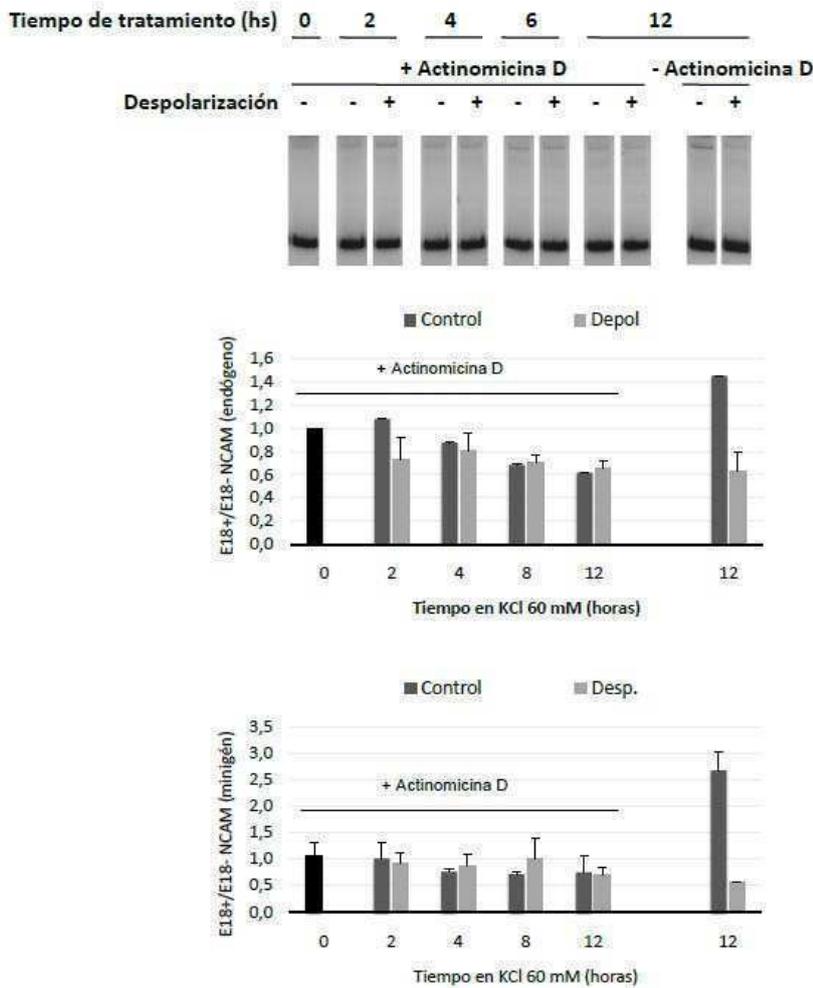


Figura 3.14. El efecto de despolarización requiere transcripción de nuevos mensajeros. Células N2a fueron tratadas con o sin agregado de 60 mM KCl por los tiempos indicados, en presencia o ausencia de 5  $\mu$ g/ml Actinomicina D, inhibidor de la transcripción. El gel y las bandas de arriba corresponden al patrón de SA del E18 del gen endógeno de NCAM, mientras que las bandas de abajo muestran el patrón de minigén transfectedo. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control a tiempo 0.

El tratamiento con Act D permite también estimar la cinética de decaimiento de los mensajeros de NCAM (Fig. 3.15) y en base a ella calcular la vida media de los mismos, que en estas células resulta de aproximadamente 5,4 horas. La vida media de los mensajeros permite explicar, al menos en parte, el tiempo de incubación necesario para observar con claridad el efecto de la despolarización en el SA del E18. De acuerdo con lo visto en la figura 3.7B, recién a las 4 horas este efecto era evidente, necesitándose de entre 8 horas más de incubación para alcanzar la magnitud observada en los tratamientos utilizados (que en general corresponden a 16 hs). Dado que para observar el efecto en una población de moléculas de ARNm en estado estacionario es necesario lograr un recambio en dicha población, el efecto no puede ser detectado por esta metodología a tiempos cortos.

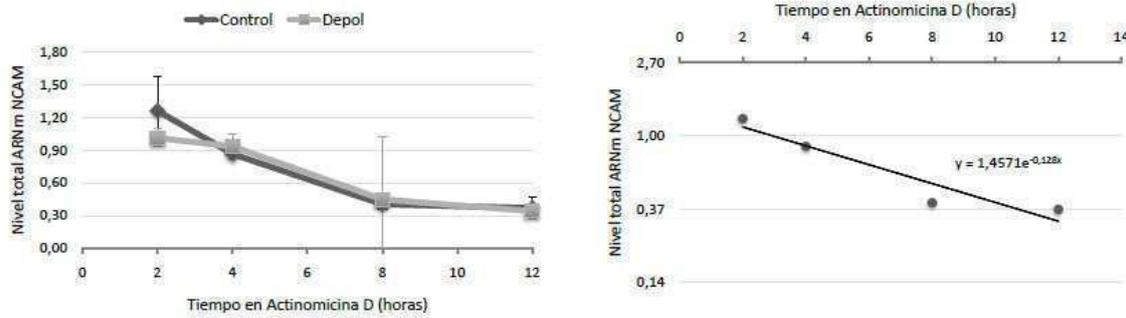


Figura 3.15. La estabilidad de los ARNm de NCAM no se modifica con el tratamiento. Se realizó el mismo tratamiento que en la figura R9, pero se midió el nivel total de ARNm de NCAM, tal como se explica en Materiales y Métodos. A la izquierda se muestra el nivel de ARNm a distintos tiempos para células no tratadas (Control) o incubadas con alto KCl (Desp.). A la derecha se muestra una transformación logarítmica de las muestras Control, a partir de la cual se obtuvo la ecuación mostrada y se estimó la vida media de los mensajeros.

### 3.2.3. Participación de elementos regulatorios del splicing en el efecto de la despolarización sobre el SA del exón 18

La importante regulación del SA de NCAM por la proteína SRp20 (ver figuras 3.2 y 3.3) nos llevó a preguntarnos si dicho factor podía estar participando de alguna forma en la respuesta a la despolarización. Para responder esta pregunta, realizamos el tratamiento de despolarización en células transfectadas 48 horas antes con siRNA contra SRp20 o con un siRNA control (siLuc), observándose (Fig. 3.16) que la falta de SRp20 causa una disminución tan grande de los niveles de inclusión (más aún que el tratamiento de despolarización) que no es posible observar efecto alguno del tratamiento.

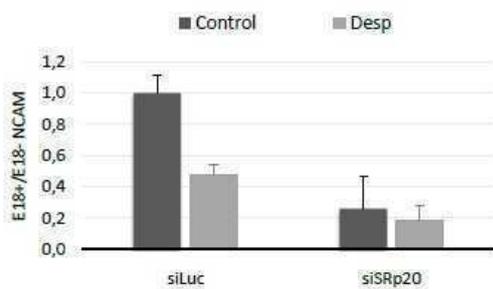


Figura 3.16. Los niveles endógenos de SRp20 permiten la modulación del splicing alternativo del E18 de NCAM. Células N2a fueron transfectadas con el siRNAs contra SRp20 (siSRp20) o un siRNA control (siLuc) y 48 hs después fueron tratadas con medio normal o con 60 mM KCl por 16 hs. Luego se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM endógeno. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor del control transfectado con siLuc e incubado en medio normal.

Uno de los casos de regulación del SA por despolarización neuronal mejor estudiados corresponde al exon 21 del receptor de NMDA, NR1 (An y Grabowski 2007; Lee 2007). En este caso, se ha caracterizado la participación de la vía de kinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMK), fosforilando factores aún no identificados que actuarían sobre elementos respondedores (CaRREs) presentes en el RNA (ver Introducción). La figura 3.17A muestra que el efecto de la despolarización sobre el exon 21 de NR1 se observa también en las células N2a, y que dicha modulación es afectada por el inhibidor de CaMKII y CaMKIV KN93, aunque en estas células el nivel basal es modificado también por el inhibidor. En contraste, el efecto sobre el E18 de NCAM se mantiene en presencia del KN93, tanto en presencia como en ausencia de CHX (Fig. 3.17B y C), lo cual sugiere la existencia de una vía alternativa a las CaMKs en la regulación de este evento de SA.

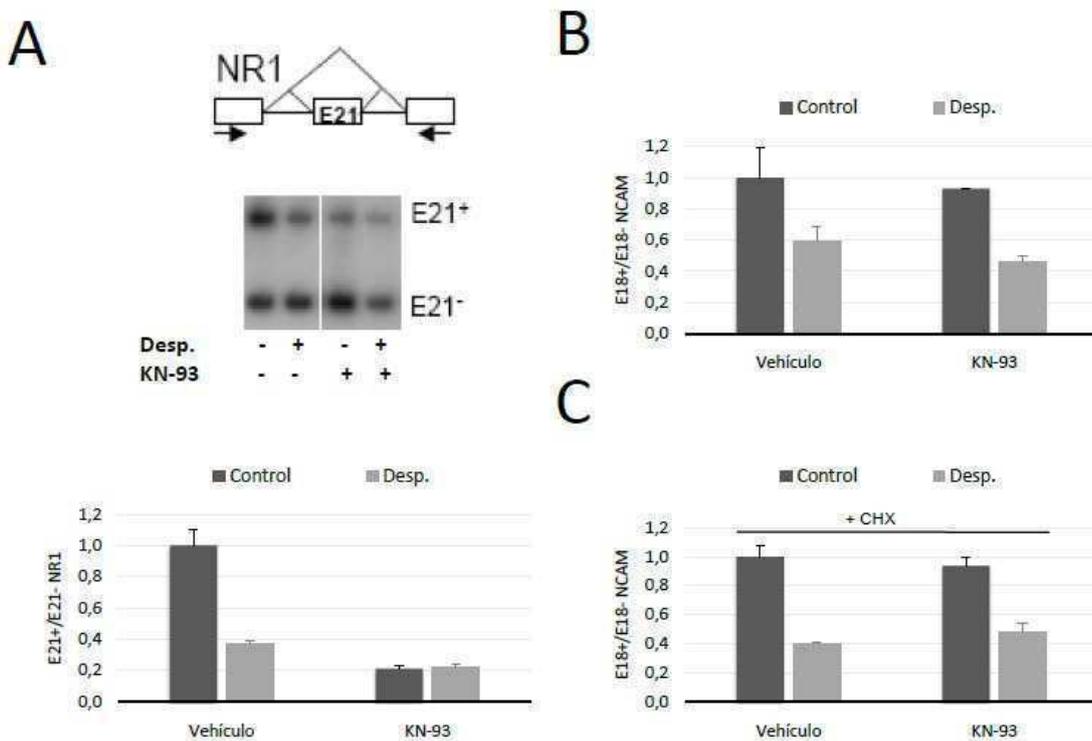


Figura 3.17. El efecto de despolarización sobre el E18 de NCAM no depende de la vía de las CaMK. **A.** Células N2a fueron tratadas en presencia o ausencia de 20  $\mu$ M KN-93, un inhibidor de las kinasas dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) II y IV, analizándose luego el patrón de SA del E21 del gen NR1. **B.** Igual que A, pero se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM. **C.** Igual que B, pero los tratamientos se realizaron en presencia de 5  $\mu$ g/ml CHX. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control, sin inhibidor.

### 3.2.4. Participación de la transcripción en el efecto de la despolarización sobre el SA del exón 18

El cuerpo de evidencias descrito en la sección anterior sugiere una regulación directa del SA del E18 en respuesta a la despolarización, no relacionada con el mencionado mecanismo de factores reguladores de SA activados por la vía de CaMK. Es digno de mención que en el transcurso de los experimentos observamos también un leve pero significativo aumento en la cantidad de ARNm total de NCAM (Fig. 3.18, entendiendo total como el correspondiente a las isoformas 140 y 180 sumadas), lo cual sugiere algún cambio a nivel transcripcional en el *locus* de NCAM.

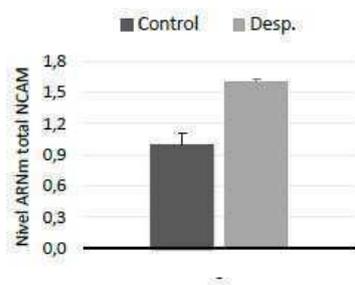


Figura 3.18. **La despolarización provoca un aumento en la cantidad total de ARNm de NCAM.** Se determinó por PCR en tiempo real la cantidad total (E18+ y E18-) de ARNm de NCAM correspondiente a células N2a incubadas por 16 hs en medio normal o con 60 mM KCl (Desp.). Se determinó como referencia el nivel de un mensajero de expresión constitutiva (HSPCB). Los niveles de ARNm mostrados corresponden al cociente del valor obtenido para NCAM sobre el obtenido para HSPCB. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

Dado que tanto la despolarización por alto KCl como el tratamiento con TSA causan una disminución en la inclusión del E18 de NCAM, nos preguntamos si ambos efectos podrían estar relacionados. Como muestra la figura 3.19A, el efecto de disminución de la inclusión del E18 causado por ambos tratamientos es de similar magnitud. Además, la aplicación conjunta de ambos tratamientos no causa mayor cambio en el *splicing* del E18, lo cual es esperable si ambos tratamientos son saturantes y actúan por el mismo mecanismo. Esto nos llevó a pensar que la despolarización podría actuar, al menos en parte, a través de un cambio en la cromatina. Probamos asimismo la interacción del tratamiento de alto KCl con otra droga que actúa sobre el ADN y la cromatina, en este caso la droga 5-aza-citidina (5aC), un inhibidor de metil-transferasas de ADN (DNMTs). La figura 3.19B muestra que, en células N2a diferenciadas, la 5aC muestra el mismo efecto y la misma interacción con el efecto de la despolarización que la TSA.

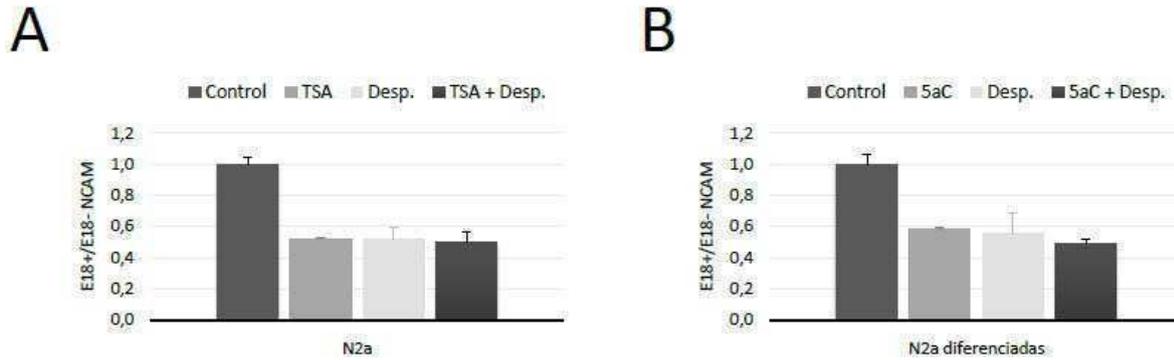


Figura 3.19. **Tratamientos farmacológicos que inducen apertura de la cromatina reproducen el efecto de despolarización sobre el E18 de NCAM.** **A.** Células N2a fueron tratadas por 16 hs con 1  $\mu\text{g/ml}$  tricostatina A (TSA), 60 mM KCl (Desp.) o ambos tratamientos en conjunto;  $n=2$  para Control y  $n=3$  para Desp. **B.** Células N2a diferenciadas fueron tratadas por 3 días con 3  $\mu\text{M}$  5-aza-citidina (5aC), 16 hs con 60 mM KCl (Desp.) o ambos tratamientos en conjunto;  $n=2$ . Para ambos casos se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de  $n$  replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

También analizamos el efecto de despolarización en condiciones de menor tasa de elongación transcripcional, particularmente el tratamiento con FP y la transcripción por polimerasa lenta. Como se observa en la figura 3.20, ambas condiciones parecen mostrar efectos aditivos con el efecto de la despolarización: la baja tasa de la elongación provoca mayores niveles de inclusión, el tratamiento con KCl disminuye la inclusión y ambos tratamientos conjuntamente muestran un nivel de inclusión intermedio del E18 de NCAM.

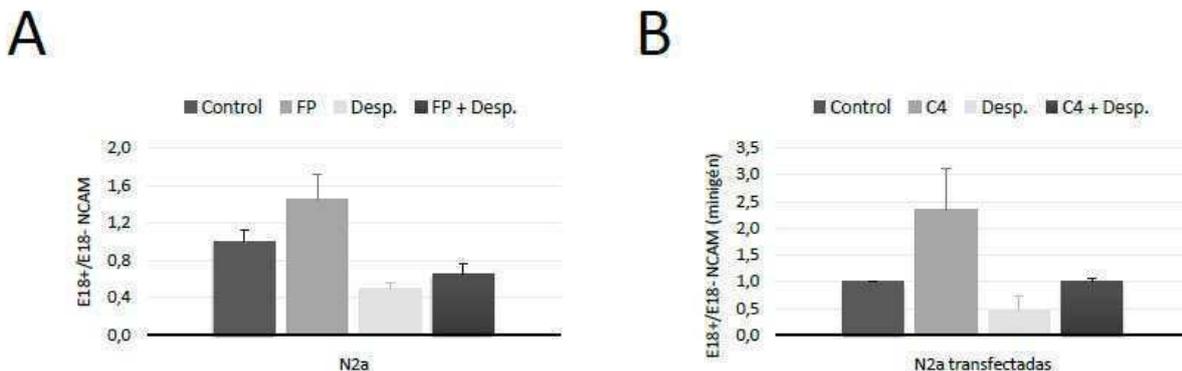


Figura 3.20. **Tratamientos que inducen menor tasa de elongación muestran efectos opuestos y compensatorios al efecto de la despolarización.** **A.** Células N2a fueron tratadas por 16 hs con 25  $\mu\text{M}$  flavopiridol (FP), 60 mM KCl (Desp.) o ambos tratamientos en conjunto, analizándose los patrones de SA del E18 de NCAM;  $n=3$ . **B.** Células N2a fueron co-transfectadas con un minigén reportero del E18 de NCAM y con vectores de expresión de la subunidad mayor de la ARN pol II (Rbp1), en variantes resistentes a  $\alpha$ -amanitina con tasas de elongación normal ( $\text{wt}^{\text{R}}$ ) o lenta (C4). Un día después, las células fueron incubadas por 16 hs con el inhibidor de la polimerasa endógena,  $\alpha$ -amanitina, en medio normal o con 60 mM KCl (Desp.), analizándose luego el patrón de SA del E18 de NCAM correspondiente al minigén;  $n=2$ . Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de  $n$  replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

En conjunto, esta serie de experimentos sugieren que, si la despolarización está actuando sobre el SA del E18 de NCAM por un mecanismo transcripcional, parecería hacerlo a nivel de cambios en la cromatina más que a nivel de un cambio de actividad de la pol II que altere sus propiedades de elongación.

### 3.3. *Modificaciones cromatínicas en el locus de NCAM y su influencia en el splicing alternativo del exon 18.*

De acuerdo a lo planteado en la sección anterior, estaba latente la posibilidad de que el tratamiento con alto KCl pudiera ejercer modificaciones a nivel de la cromatina. Para explorar dicha posibilidad, decidimos realizar una serie de determinaciones por diferentes metodologías. Si bien los patrones de SA son evaluados entre 12 y 16 horas después del tratamiento por las razones ya expuestas, el razonamiento en este caso fue que, de existir modificaciones cromatínicas y transcripcionales que afecten al locus de NCAM, estas deberían poder observarse a tiempos más cortos. Si observamos la curva de tiempo en la figura 3.4B, notamos que ya a las 4 horas de tratamiento se observa la tendencia a disminuir la inclusión en forma sostenida. Es por eso que esta serie de experimentos fue realizada con tratamientos de entre 4 y 6 horas.

#### **3.3.1. La excitación neuronal aumenta los niveles globales de histonas acetiladas**

Decidimos evaluar primero si la despolarización afecta los niveles de acetilación de histonas en células N2a. Para ello realizamos una determinación por *western blot* de extractos nucleares básicos provenientes de células N2a tratadas y no tratadas con alto KCl. Se utilizaron anticuerpos contra histonas H3 y H4 acetiladas (ver Materiales y Métodos) y contra H3 total para relativizar. Efectivamente, la despolarización provoca en las células N2a un incremento en los niveles de H3 y H4 acetiladas que es revertido si las células son recuperadas luego del tratamiento en medio normal (Fig. 3.21A).

Paralelamente, analizamos cambios en la expresión de distintas proteínas con actividad de acetil-transferasa de histonas (HATs) que pudieran dar cuenta de este aumento global de acetilación. Analizando los niveles de ARNm de las proteínas CBP, GCN5 y PCAF detectamos un aumento en la expresión de dos veces de una de ellas, CBP (Fig. 3.21B).

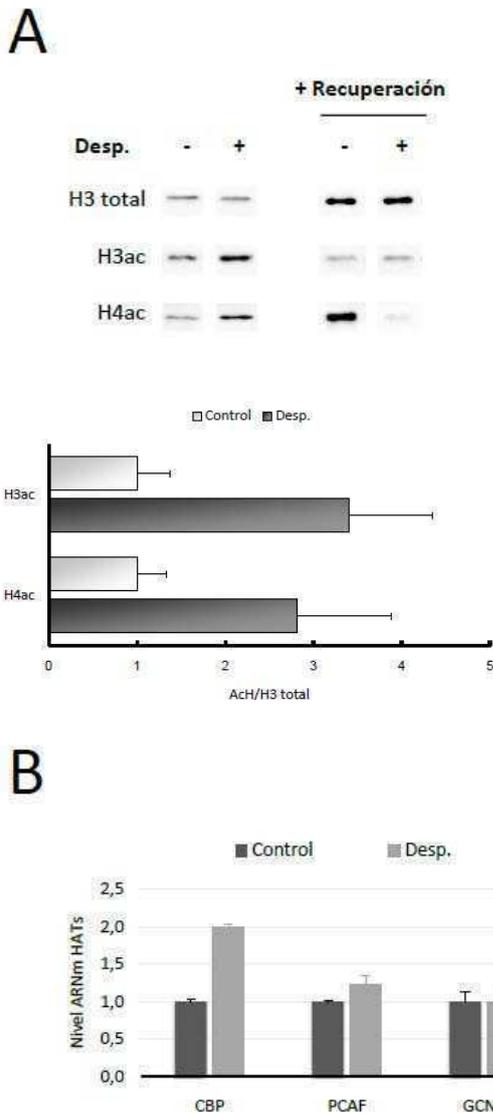


Figura 3.21. **La despolarización induce aumento en la acetilación global de histonas.**

**A.** Células N2a fueron tratadas por 6-8 hs en medio normal o con 60 mM KCl (Desp.). Algunas fueron recuperadas por otras 18 hs en medio normal. Luego, se extrajeron proteínas nucleares básicas (ver Materiales y Métodos) y se realizó análisis de los niveles de acetilación en histonas H3 y H4, y de histona H3 total, por *western blot*. Se muestra un gráfico con los niveles de histona acetilada sobre histona H3 total para las células. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 experimentos, cada uno con 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control de cada experimento. **B.** Los niveles de ARNm tres acetiltransferasas de histonas (HATs), CBP, PCAF y GCN5, fueron evaluados en células tratadas por 8 hs con medio normal o con 60 mM KCl (Desp.). Los valores se expresan como el nivel de ARNm de cada HAT, obtenido por PCR en tiempo real, dividido el valor del gen de expresión constitutiva HSPCB. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control. promedio  $\pm$  DE de 2 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente al control.

### 3.3.2. La región intragénica cercana al exón 18 de NCAM muestra una distribución particular de marcas cromatínicas

Para caracterizar si el cambio en el patrón de acetilación de histonas estaba afectando alguna región del *locus* de NCAM, en particular las regiones cercanas al exón 18, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina nativa o nucleosomal (nChIP, ver Materiales y Métodos). Los amplicones elegidos (Fig.

3.22A) cubren densamente el área comprendida entre el exon 16 y el comienzo de la región 3' no codificante en el exon 19, incluyéndose también amplicones sobre el intron 14, la región promotora y comienzo del exon 1 y una región intergénica localizada río arriba del gen. Primeramente analizamos la distribución de histona H3 acetilada en lisina 9 (H3K9ac, Fig. 3.22B) y H4 acetilada en cuatro residuos lisina diferentes (H4ac, Fig. 3.22C) inmunoprecipitando nucleosomas con anticuerpos específicos para estas modificaciones y analizando la cromatina resultante con los pares de oligonucleótidos iniciadores indicados. El perfil obtenido para las células no tratadas muestra un esperado enriquecimiento de las modificaciones en la zona promotora, una disminución de H3K9ac en la región codificante mientras que H4ac se mantiene alta, y luego una fuerte disminución de ambas marcas a partir de la región correspondiente al exon 17 (que incluye al exon alternativo).

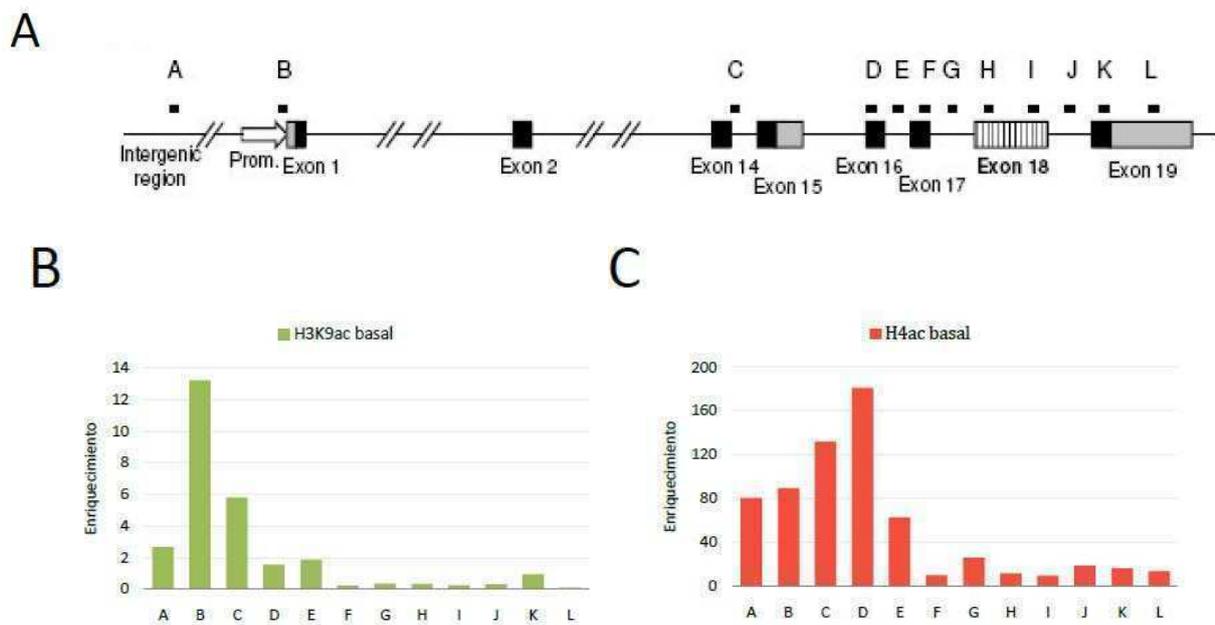


Figura 3.22. **Perfil de acetilación de histonas en el locus de NCAM.** **A.** Diagrama indicando la ubicación de los diferentes amplicones utilizados en el trabajo. **B.** Se realizó inmunoprecipitación de la cromatina en condiciones nativas (nChIP) sobre células N2a crecidas en medio normal, utilizando un anticuerpo contra histona H3 acetilada en lisina 9 (H3K9ac). **C.** Idem B, pero con un anticuerpo contra histona H4 tetra-acetilada (H4ac). Se indica el enriquecimiento de la marca (ver Materiales y Métodos) para un experimento representativo.

Con el objetivo de extender el análisis a otras modificaciones de histonas, utilizamos anticuerpos específicos para tri-metilación de histona H3 en lisinas 9 (H3K9me3), 27 (H3K27me3) y 36 (H3K36me3), así como di-metilación en lisina 9

(H3K9me2). Mientras que H3K27me3 y H3K9me2 (Fig. 3.23A y B), típicas marcas de genes inactivos y heterocromatina facultativa (Rice 2003), se muestran bajas a lo largo de toda la región analizada, la marca de H3K9me3 (Fig. 3.23C), asociada a regiones 5' de genes activos (Vakoc 2005), muestra enriquecimiento en los amplicones correspondientes a región intergénica 5' y región promotora. A su vez, H3K36me3 muestra un enriquecimiento en las regiones transcritas del gen (Fig. 3.23D), esperable dado que esta marca está asociada a la elongación transcripcional (Martin y Zhang 2005). Por otro lado, en este caso se observa un llamativo decrecimiento de la marca en la zona correspondiente a los exones 17 a 19, correlacionando con la bajada en acetilación.

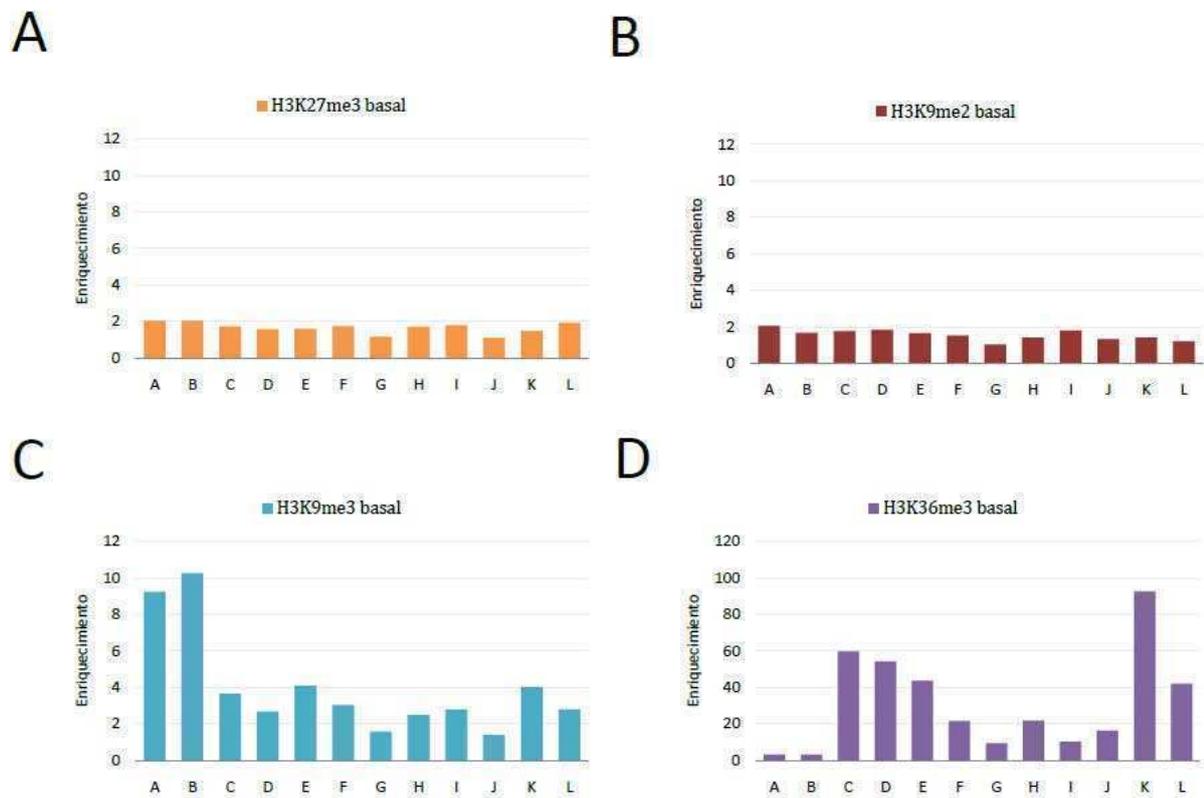


Figura 3.23. **Perfil de metilación de histonas en el locus de NCAM.** Idem figura R19, pero se utilizaron anticuerpos contra histona H3 tri-metilada en lisina 27 (H3K27me3, **A**), di-metilada en lisina 9 (H3K9me2, **B**), tri-metilada en lisina 9 (H3K9me3, **C**) o tri-metilada en lisina 36 (H3K36me3, **D**). Se indica el enriquecimiento de la marca para un experimento representativo.

### 3.3.3. La despolarización causa cambios específicos de las modificaciones de histonas en una región intragénica del *locus* de NCAM

Analizamos a continuación los cambios producidos en estos perfiles de modificaciones de histonas al incubar las células con alto KCl. En la figura 3.24 se muestran las variaciones de las diferentes marcas en células tratadas con respecto a células control.

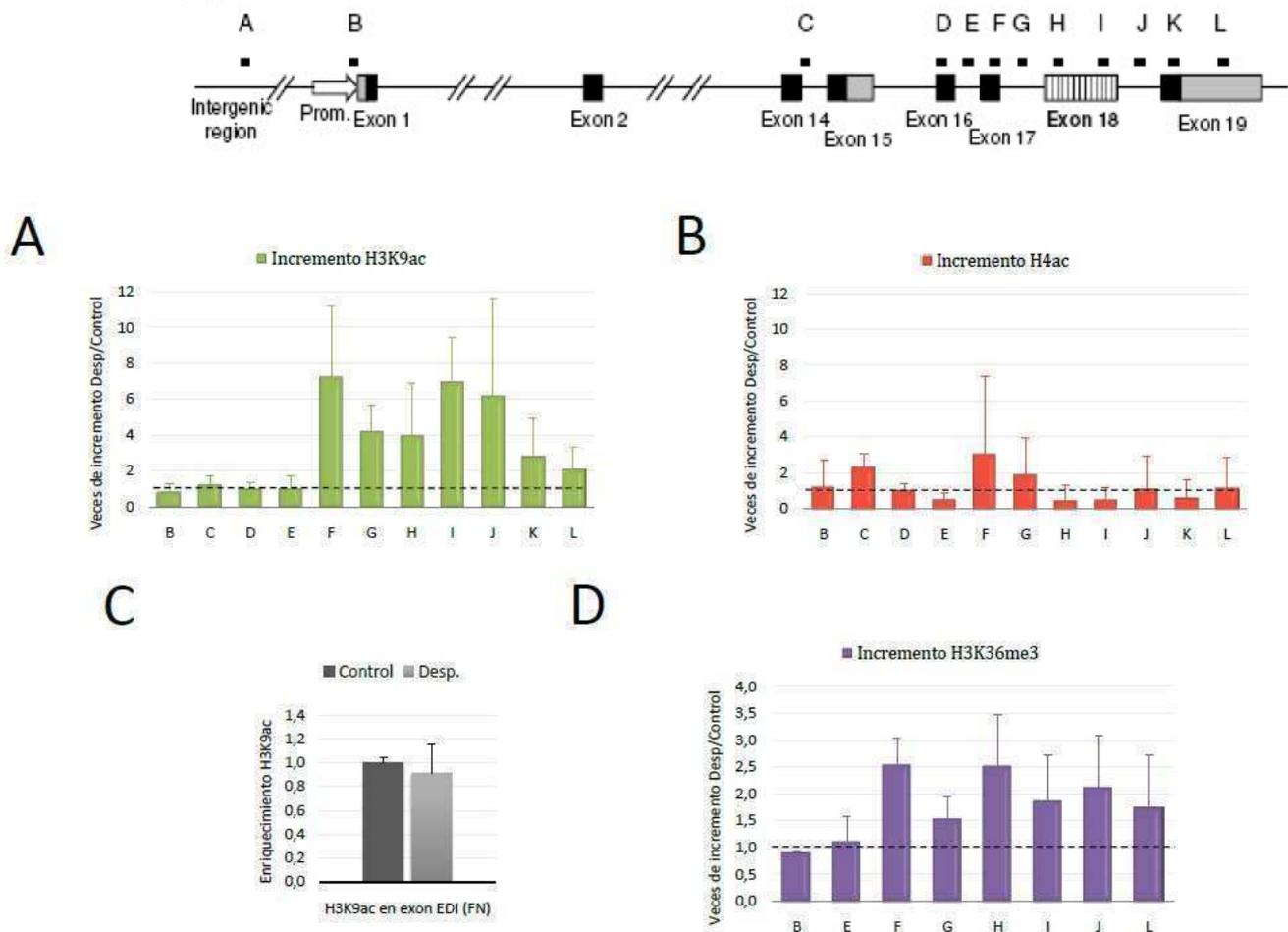


Figura 3.24. **La despolarización causa un aumento en la acetilación en H3K9 circunscrito a una región intragénica.** **A.** Células N2a fueron incubadas durante 4-6 horas en medio normal o con 60 mM KCl, y luego se analizaron sus perfiles de H3K9ac por nChIP. Se grafica el cociente del valor obtenido para la marca en células tratadas con alto KCl con respecto a células control. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes relativizando para cada experimento los valores de todos los amplicones al valor correspondiente a la región intergénica (amplicón A). La línea punteada indica el valor 1 para el cociente, que equivale a niveles iguales de la marca para células control y despolarizadas. **B.** Idem A, pero se analizó la marca de H4ac. **C.** Enriquecimiento de H3K9ac en células tratadas como en A, correspondiente a una región del exon alternativo EDI de fibronectina. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 experimentos independientes, relativizado al valor correspondiente al control. **D.** Idem A, pero se analizó la marca de H3K36me3. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 2 replicas de inmunoprecipitación del mismo experimento, relativizado al valor correspondiente al control. Se incluyen sólo algunos amplicones representativos.

Encontramos un aumento de H3K9ac en la región correspondiente a los exones 17 a 19 (Fig. 3.24A), la misma que mostraba los niveles más bajos de acetilación basales. Este cambio no fue significativo para la marca de H4ac (Fig. 3.24B), aunque cabe la posibilidad de que la acetilación en alguna lisina particular de esta zona esté aumentando. Como control, la acetilación en la zona del exon EDI de fibronectina (que no responde a la despolarización en células N2a) no es modificada por el tratamiento (Fig. 3.24C). No se detectaron cambios en los perfiles de H3K9me2 y me3 ni de H3K27me3 (no mostrado), pero sí se observó un leve aumento de la marca de H3K36me3 en la misma zona entre los exones 17 y 19 (Fig. 3.24D).

Dado que la acetilación de histonas está asociada a una cromatina más laxa (y por lo tanto más permisiva para la transcripción) y que la metilación en lisina 36 de H3 está asociada a activa elongación, los resultados eran coherentes con la idea de que la despolarización estaba provocando un aumento local de la acetilación de histonas en una región que basalmente se encuentra en una conformación más compacta. A su vez, este cambio podría ir asociado a una elongación más activa o a un aumento de procesividad de la polimerasa, lo cual traería aparejado una disminución en la inclusión del exon alternativo.

#### **3.3.4. El aumento en acetilación intragénico está asociado a mayor accesibilidad de la cromatina y a mayor procesividad de la pol II**

Para poner a prueba la hipótesis de que el aumento local en la acetilación de histonas está asociado en este caso a una apertura de la cromatina, realizamos un ensayo de accesibilidad utilizando la enzima de restricción *MspI* para digerir cromatina en núcleos intactos. La enzima *MspI* reconoce y corta secuencias CCGG sin importar el estado de metilación del ADN, pero en las condiciones utilizadas es sensible a conformaciones cerradas de la cromatina (Lorincz 2004).

La figura 3.25A esquematiza el principio del ensayo, cuyo resultado se revela realizando PCR cuantitativa en tiempo real sobre las zonas a ser testeadas. En nuestro caso, se utilizaron amplicones correspondientes a la región del exón 18 (que incluye dos sitios de corte para la enzima) y para la región promotora (tres

sitios de corte). Además de realizar la determinación con células N2a no tratadas y con células incubadas con alto KCl, se añadió un control con células tratadas con TSA, en parte para evaluar a otro nivel la similitud de su efecto sobre NCAM con el del tratamiento de despolarización y en parte por ser un conocido agente que produce hiper-acetilación y apertura de la cromatina. De acuerdo a lo mostrado en la figura 3.25B, ambos tratamientos causaron un incremento de la accesibilidad en la zona correspondiente al exon 18, mientras que no se detectaron mayores cambios en la región promotora. Este resultado es coherente con la noción de que la cromatina se encuentra en un estado parcialmente cerrado en la zona del E18, estado que es relajado al despolarizar las células; mientras, la cromatina en la región promotora se espera que esté basalmente en un estado laxo, lo cual explicaría que no se detecten cambios en la accesibilidad con los tratamientos.

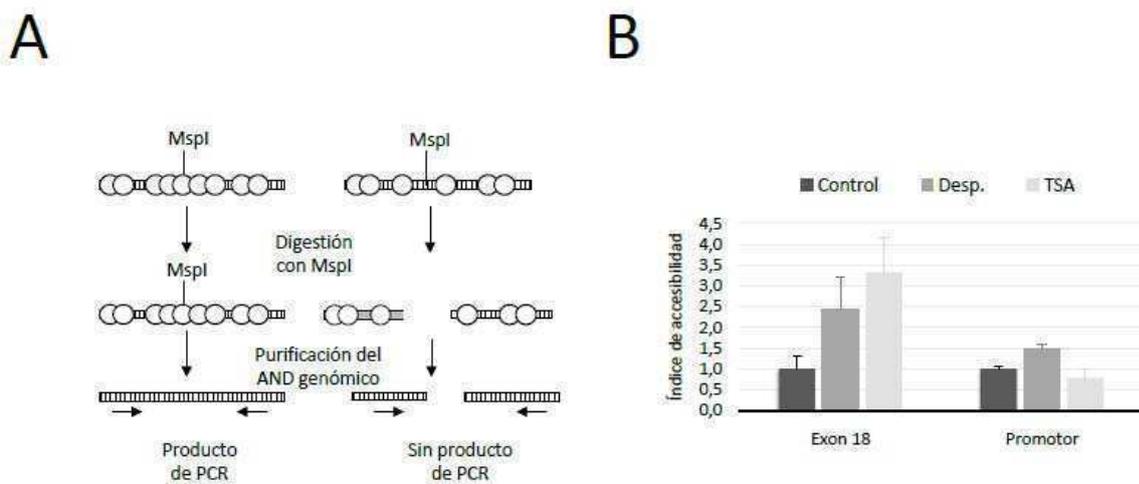


Figura 3.25. **La despolarización causa un aumento en la accesibilidad de la cromatina en una región intragénica.** **A.** Diagrama del ensayo de accesibilidad utilizado, basado en el corte de la enzima *MspI* sobre núcleos intactos. **B.** Células N2a fueron tratadas por 5 horas con medio normal (Control), con 60 mM KCl (Desp.) o con 1  $\mu$ M tricostatina A (TSA). Luego se extrajeron núcleos y se realizó el ensayo de accesibilidad, analizándose una región ubicada en el exon 18 y otra en la zona del promotor. Se grafica el índice de accesibilidad para cada región (ver Materiales y Métodos). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  error estándar de 3 digestiones del mismo experimento, relativizando al valor correspondiente al control para cada región.

Para poner a prueba la hipótesis de que la despolarización produce un aumento de la polimerasa transcripcionalmente activa en la región afectada por la despolarización se realizó un ensayo que, si bien es indirecto, puede dar idea de la procesividad de la pol II en determinadas regiones. Dicho ensayo está basado en la medición cuantitativa de ARN no procesado, bajo la asunción de que dicho ARN corresponde a moléculas recientemente transcriptas, y ha sido utilizado previamente para estudiar la procesividad de la polimerasa lenta C4 (de la Mata 2003). En la figura 3.26A se esquematizan los amplicones utilizados (ver también Materiales y Métodos), uno correspondiente a una zona arbitrariamente designada como “proximal” (intron 14) y tres correspondientes a zonas que son, en consecuencia, “distales” (intrones 16, 17 y 18). La magnitud a comparar entre tratamientos es la relación entre producto distal sobre proximal (D/P) para cada uno de los tres intrones distales. Como puede observarse, la despolarización (Fig. 3.26B) causa un leve pero significativo aumento en la relación D/P para los intrones 17 y 18 (incluidos en la región que aumenta su nivel de acetilación) pero no para el intron 16, mientras que el tratamiento con TSA (Fig. 3.26C) aumenta la relación D/P para los tres intrones distales, sugiriendo que su efecto es más extendido e inespecífico que el del tratamiento con alto KCl. Como un control extra, y reafirmando lo observado sobre el patrón de *splicing* (Fig. 3.11) y la acetilación general de histonas (Fig. 3.21A), este efecto es revertido al recuperar las células en medio normal después de la incubación con alto KCl (Fig. 3.26D).

Una posible explicación alternativa de este resultado sería que la despolarización esté disminuyendo la tasa de remoción de los intrones adyacentes al E18, lo cual causaría una mayor acumulación del precursor en estas regiones. Sin embargo, la medición de la relación pre-ARNm/ARNm (indicativa de la acumulación de intrones) no muestra correlación con la relación D/P para ninguno de los dos intrones (Fig. 3.26E), sugiriendo que esta explicación no da cuenta del fenómeno observado.

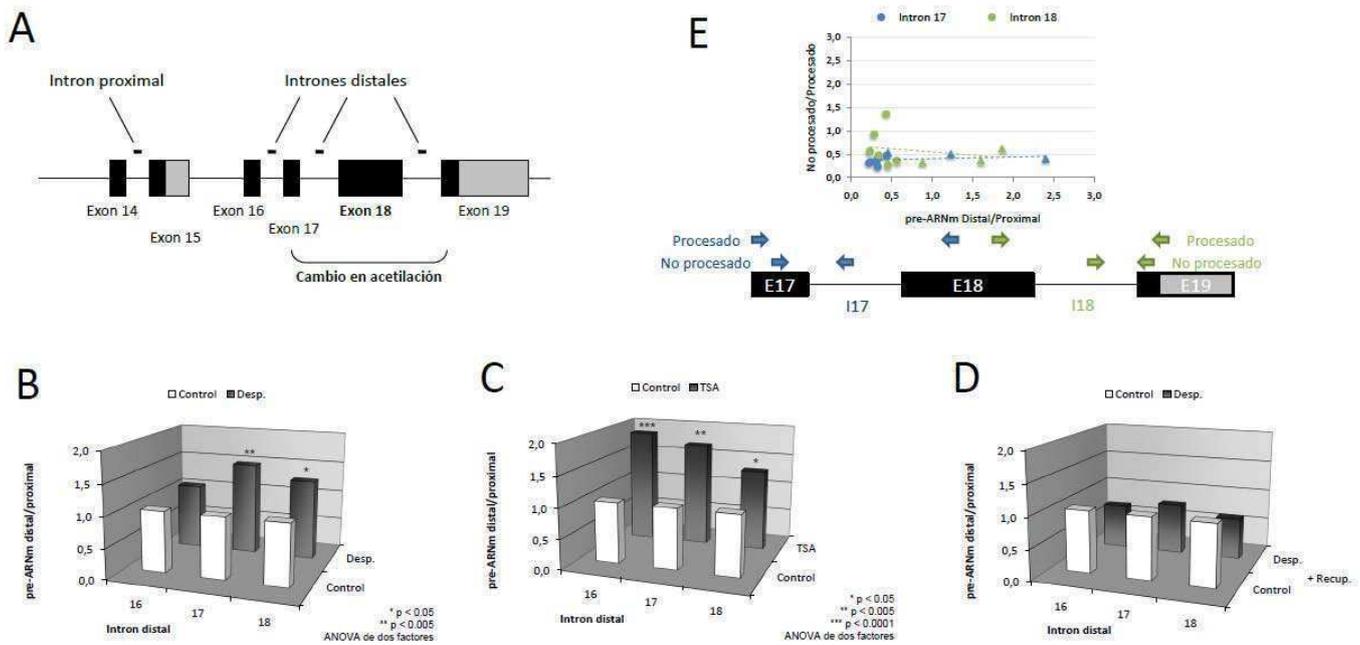


Figura 3.26. Los tratamientos con alto KCl y con TSA causan un aumento en la acumulación de pre-ARNm distal. **A.** Esquema mostrando el amplicón correspondiente a la región proximal y los 3 amplicones correspondientes a regiones distales (se nombran de acuerdo a los intrones donde están ubicados) utilizados para el ensayo (ver Materiales y Métodos). Se indica cual es la región donde se detectó el incremento en la marca de H3K9ac. **B.** Células N2a fueron tratadas por 4-6 horas con medio normal o con 60 mM KCl (Desp.), analizándose luego los niveles de pre-ARNm correspondientes a las regiones indicadas en A. Se grafica el cociente de ARN distal sobre proximal, para cada uno de los amplicones distales utilizados. Las barras corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, cada tratamiento con 3 réplicas, relativizando al valor correspondiente al control para cada región. Para evaluar la significancia estadística de las diferencias se utilizó un test de análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, siendo un factor el tipo de tratamiento y otro los diferentes experimentos realizados. No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes experimentos, ni se detectó interacción significativa entre los dos factores. Se indican con asteriscos los casos de diferencias significativas entre los tratamientos. **C.** Idem B, pero las células fueron tratadas con medio normal o con 1  $\mu\text{g/ml}$  TSA. Se realizaron 2 experimentos independientes, cada tratamiento por triplicado. **D.** Idem B, pero después de los tratamientos se dejó a las células recuperar por 20 hs más. Las barras corresponden al promedio de 3 réplicas de un mismo experimento. **E.** Gráfico de correlación entre los cocientes de ARN no procesado sobre procesado y de ARN distal sobre proximal, para los intrones 17 y 18. Los triángulos muestran los puntos correspondientes a células tratadas por 6 hs con 60 mM KCl, mientras que los círculos muestran los correspondientes a células tratadas con medio normal o con 60 mM KCl pero sólo por 2 hs. Se incluye abajo un esquema de los amplicones utilizados para la determinación por PCR en tiempo real de los niveles de ARN no procesado y procesado.

### 3.3.5. La acetilación de histonas es parte de la vía de regulación del SA en respuesta a la excitación neuronal

Si bien las modificaciones observadas, sumadas al efecto de la TSA sobre el *splicing* alternativo del exon 18 de NCAM, sugieren una relación entre ambos fenómenos, creemos necesario aportar mayores evidencias que apoyen una relación causal entre la acetilación de histonas y la modulación del SA en respuesta

a la despolarización. Volviendo a la similitud de los efectos de la despolarización y la TSA, la suposición de que dicha similitud se debe a que ambos tratamientos actúan sobre el mismo mecanismo (en este caso la acetilación de histonas) conduce a la consecuencia comprobable de que ambos tratamientos al ser aplicados en condiciones no saturantes deberían mostrar una interacción sinérgica. Como muestra la figura 3.27, ambos tratamientos no muestran efecto significativo por sí mismos en las condiciones sub-óptimas usadas, pero se potencian al ser aplicados en conjunto, sugiriendo interacción funcional. Esto se ve también en presencia de CHX, apoyando que la interacción se da a partir de efectos directos de ambos tratamientos.

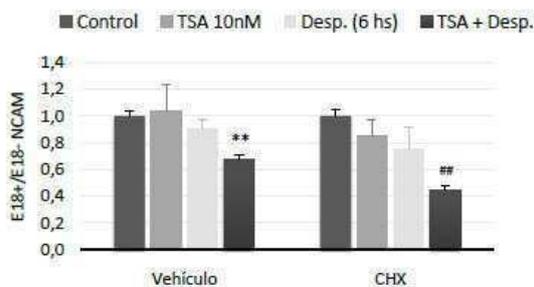


Figura 3.27. **Los efectos de despolarización y de TSA muestran interacción sinérgica.** Células N2a fueron tratadas por 6 hs con medio normal, con 10 nM TSA, con 60 mM KCl (Desp.) o ambos tratamientos a la vez, tanto en ausencia como en presencia de 5 µg/ml CHX. Luego se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 replicas por tratamiento, relativizado al valor correspondiente a cada control. \*\*:  $p < 0,0005$  (vs Control),  $p < 0,005$  (vs Desp.) y  $p < 0,05$  (vs TSA); #:  $p < 0,0001$  (vs Control),  $p < 0,005$  (vs TSA),  $p < 0,05$  (vs Desp.) test *t* de Student. No hay diferencias significativas entre los demás

Como forma de aproximarnos al estudio del mecanismo de acción de la despolarización, decidimos estudiar la necesidad de distintas acetil-transferasas de histonas (HATs) para el efecto observado. Para ello inhibimos su expresión mediante la transfección de células N2a con mezclas de ARNs pequeños interferentes (siRNAs) dirigidos separadamente contra tres conocidas HATs: CBP, GCN5 y PCAF. La tabla I muestra los niveles de ARNm correspondientes a estas tres HATs después de transfectar las células e incubarlas por 72 hs. En estas condiciones, los niveles basales de inclusión del E18 de NCAM se ven disminuidos por la transfección de los siRNAs contra CBP y GCN5, y aumentados con el siRNA contra PCAF (Fig. 3.28A). Al evaluar el efecto de despolarización, observamos que la magnitud del efecto se mantiene con el siRNA contra GCN5 y es incluso algo mayor con el siRNA contra PCAF, pero disminuye a un 60% con el siRNA contra

CBP (Fig. 3.28B), sugiriendo que esta proteína podría estar implicada en algún paso del mecanismo de acción de la despolarización sobre el SA del e18 de NCAM.

	siLUC	siCBP	siPCAF	siGCN5
CBP	100 ± 19%	25 ± 6%	92 ± 8%	106 ± 6%
PCAF	100 ± 4%	81 ± 3%	21 ± 1%	156 ± 13%
GCN5	100 ± 11%	93 ± 19%	101 ± 10%	24 ± 3%

Tabla I. **Eficiencia y especificidad de los tratamientos con RNAi.** Los niveles de mensajeros de las distintas HATs analizadas fueron medidos 72 hs después de la transfección de células N2a con los siRNAs indicados. La determinación se realizó por PCR en tiempo real, utilizándose como referencia el valor para el gen de expresión constitutiva HSPCB. Se muestran los porcentajes correspondientes al promedio ± DE de 3 replicas de transfección por siRNA, tomando como 100/ el valor correspondiente a células transfectadas con el siRNA control (siLUC).

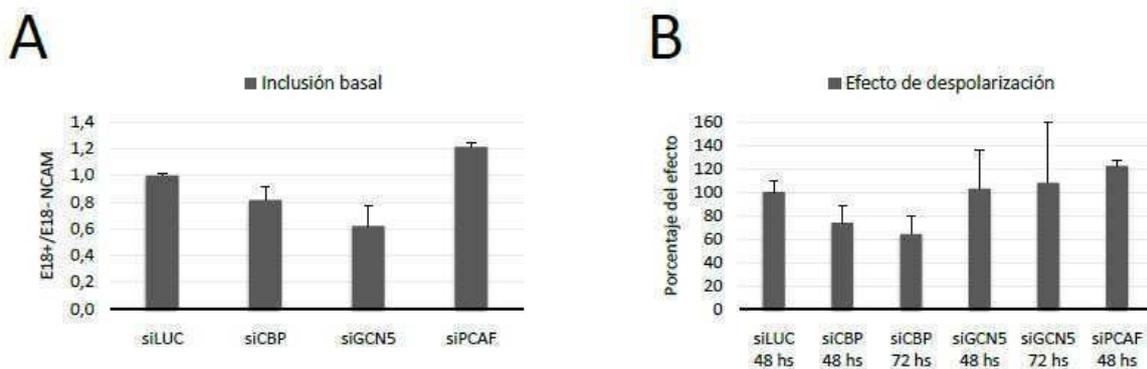


Figura 3.28. **La disminución de los niveles de CBP causa una disminución en el efecto de despolarización.** **A.** Células N2a fueron transfectadas con siRNAs contra distintas HATs (siCBP, siGCN5 y siPCAF) o con un siRNA control (siLUC) y 72 hs después se analizaron los patrones de SA del E18 de NCAM. Las barras corresponden al promedio ± DE de 3 replicas de transfección por siRNA, relativizado al valor correspondiente células transfectadas con el siRNA control (siLUC). **B.** Células N2a fueron transfectadas con los distintos siRNAs, y a los tiempos indicados fueron tratadas con medio normal o con 60 mM KCl por 16 hs. Luego se analizó el patrón de SA del E18 de NCAM, graficándose como porcentaje de efecto (E18+/E18- Control sobre E18+/E18- Desp.) tomándose como 100/ el efecto obtenido para las células transfectadas con el siLUC. Las barras corresponden al promedio ± DE de 3 replicas por tratamiento.

## 4. Discusión

---

### 4.1. *El modelo cinético como marco explicativo de la regulación del splicing alternativo*

Es probable que cualquier aproximación a la realidad que busque entender cómo funciona en fenómeno natural se plantee *a priori*, sea uno más o menos consciente de ello, una hipótesis que le permita interpretar lo que observa. Para estudiar fenómenos complejos, como los que ocurren en el interior del núcleo de una célula eucariota, estas hipótesis toman la forma de modelos que plantean explicaciones a los fenómenos observados y que permiten hacer predicciones. Esto no debería limitarnos como investigadores, siempre y cuando uno acepte los límites de un modelo y esté abierto a modificarlo, incorporarle nuevos conceptos, complejizarlo o directamente cambiarlo por un nuevo modelo que abarque y explique un mayor número de fenómenos con mayor precisión.

Mirado a través del cristal del modelo cinético presentado en la Introducción, el cuerpo de resultados presentado en esta tesis indica que **un estímulo extracelular puede disparar un cambio de la cromatina en una región intragénica el cual, a su vez, causa una modulación en los niveles de inclusión de un exón alternativo a través de cambios en la elongación de la ARN pol II** (Fig. 4.1). Discutiremos entonces las evidencias que sustentan esta afirmación.

#### 4.1.1. **¿Cambian las propiedades de elongación de la pol II dentro del *locus* de NCAM en respuesta al tratamiento de despolarización?**

Lo primero que uno podría preguntarse es si realmente se está produciendo un cambio en la tasa de elongación de la pol II en una región intragénica acotada, como es la que va desde el exón 17 en adelante. La principal evidencia que sustenta un cambio en la elongación de la pol II en respuesta al tratamiento con KCl, y en respuesta a la mayor acetilación de histonas, es el experimento que muestra un incremento en la proporción de pre-ARNm distal (Fig. 3.26). Dado que los niveles

de pre-ARNm detectados en la célula dependerán de la tasa de generación de nuevo transcripto y de la tasa de eliminación (remoción de intrones), partimos de la premisa de que las tasas de remoción de los intrones 17 y 18 no están afectadas. De cumplirse, esta premisa implicaría que el pre-ARNm detectado sería proporcional al ARN naciente, por lo que los cambios observados se deberían a una mayor procesividad de la pol II. Evidencia para apoyar esta premisa es presentada en la figura 3.26E.

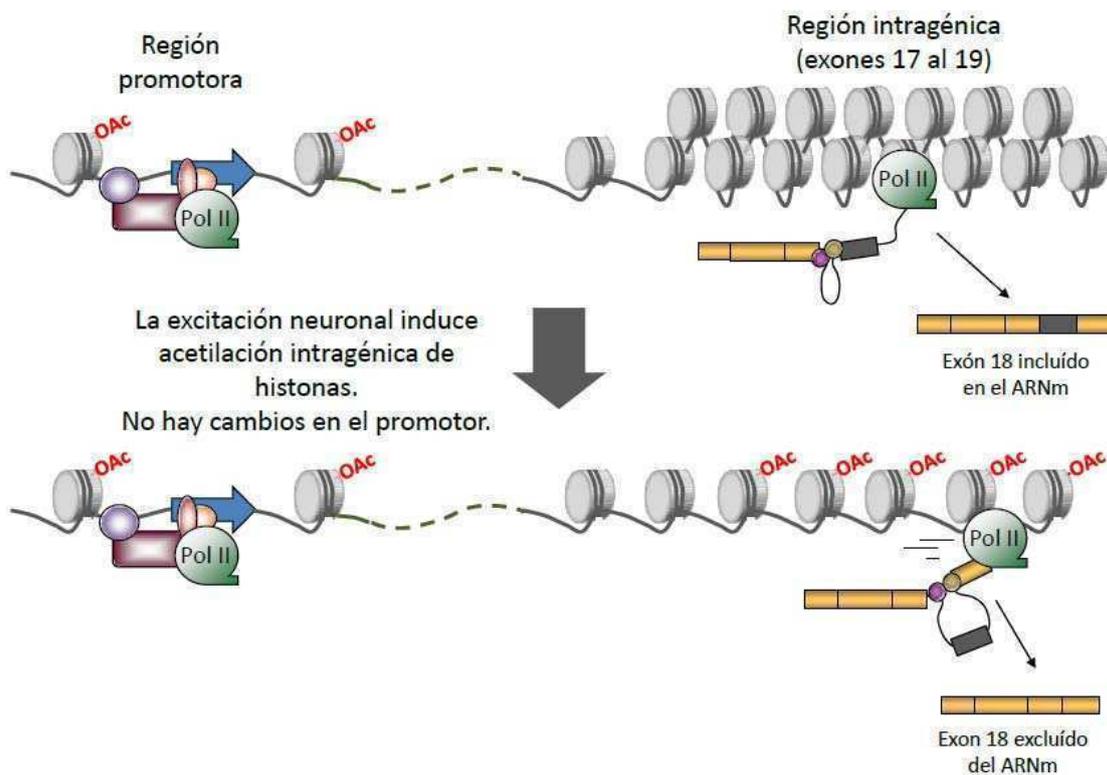


Figura 4.1. **Modelo propuesto para explicar la regulación del SA del E18 de NCAM inducida por la excitación neuronal.** Las histonas ubicadas en la región intragénica ente los exones 17 y 19 están basalmente hipo-acetiladas, lo que causa una conformación cerrada de la cromatina (*arriba*). Al inducir la despolarización del potencial de membrana con una alta concentración de KCl extra-celular, se produce un incremento en la acetilación de histonas y una relajación de la cromatina en esta región (*abajo*). En consecuencia, la ARN pol II encuentra menor obstáculo para su avance, observándose un incremento en su procesividad y/o tasa de elongación. Esta situación está asociada a la exclusión de un exon alternativo como el E18 de NCAM (exón en gris oscuro), dado que la maquinaria de *splicing* dispone de menos tiempo para su reconocimiento. Los cambios en la cromatina afectarían sólo la etapa de elongación transcripcional, dado que no se detectan modificaciones de acetilación de histonas ni accesibilidad en la región promotor (marcada con una flecha azul).

Como comentamos en la introducción (ver 1.2.2), si bien la procesividad no refleja necesariamente la tasa de elongación, muchos cambios afectan simultáneamente ambos parámetros (Mason y Struhl 2005). En principio, este

hecho podría estar relacionado con que en muchas circunstancias los cambios en la velocidad media de elongación pueden deberse a un mayor número de pausas y/o arrestos a lo largo del transcripto, y la presencia de pausas y arrestos afectan negativamente a la procesividad de la enzima. Otra forma de verlo sería que mientras más tiempo pase la polimerasa recorriendo una determinada longitud de molde (menor tasa de elongación), mayor será la probabilidad de que se disocie del mismo (menor procesividad).

Si bien el ensayo utilizado es una determinación de la procesividad, y no de la tasa de elongación, ensayos similares han sido utilizados en diferentes sistemas confirmando los cambios de elongación esperados teóricamente (Kadener 2001; Nogues 2002; de la Mata 2003; Robson-Dixon y Garcia-Blanco 2004). La prueba más fuerte de que este ensayo permite detectar diferencias en la tasa de elongación consiste en sensibilidad a la transcripción por la pol II mutante C4 (de la Mata 2003). Aunque, como se comentó en la Introducción, la tasa de elongación *in vivo* es muy difícil de medir, se ha logrado confirmar para esta mutante que efectivamente muestra menor velocidad de elongación *in vivo* (Boireau 2007).

#### **4.1.2. ¿Son los cambios en la cromatina causantes de los cambios en elongación y en *splicing* alternativo?**

La primera indicación de que los efectos en acetilación de histonas y elongación de la pol II están relacionados es su superposición espacial. Tanto el incremento en las marcas de H3K9ac y H3K36me3 (Fig. 3.24A y D) como el aumento en la relación distal/proximal (Fig. 3.26B) en respuesta a la despolarización se dan entre el exón 17 y el final del gen. Una relación causal más fuertemente sugerida por el hecho de que el tratamiento con tricostatina A (TSA) estimula tanto la apertura de la cromatina (Fig. 3.25) como el aumento en la procesividad de la pol II (Fig. 3.26C). Cabe hacer un comentario acerca de la diferente respuesta observada en la acumulación de pre-ARNm sobre el intrón 16 al tratar con TSA (Fig. 3.26C), mostrando un efecto sobre el intrón 16 aún mayor que sobre los intrones 17 y 18. Si comparamos esto con el resultado obtenido para el tratamiento de despolarización (3.26B), donde no se observa efecto en el intrón 16, y donde el aumento de procesividad se limita a la región donde se encuentra un

aumento en acetilación, vemos que la especificidad de ambos tratamientos difiere. Podríamos verlo simplemente como que la TSA provoca un aumento inespecífico en la acetilación de histonas, que en el locus de NCAM causa un aumento en la procesividad de la pol II, pero que está dado por el mismo mecanismo que causa el cambio más localizado en respuesta a la despolarización. Esto indicaría que la despolarización no estaría actuando simplemente por inhibición de las HDACs que son afectadas por la aplicación de la TSA.

En cuanto a la relación entre acetilación de histonas y disminución en la inclusión del E18 a consecuencia del tratamiento con KCl, tanto las similares magnitudes en las respuestas a TSA y despolarización (Fig. 3.19A), la no aditividad en condiciones saturantes de dichos tratamientos (Fig. 3.19A) y la interacción sinérgica en condiciones sub-óptimas (Fig. 3.27) son coherentes con una relación causal. Si bien la TSA podría afectar la expresión de otros genes y modular el SA del E18 indirectamente, la observación de que los efectos de la droga se observan igualmente en presencia del inhibidor de la traducción cicloheximida (Fig. 3.18) contradice esta noción.

El efecto de la TSA podría también deberse a la acetilación de otras proteínas no histonas causando cambios en su actividad que pudieran afectar la transcripción y/o el *splicing* del gen de NCAM. La participación de la cromatina en la regulación del *splicing* alternativo se empezó a demostrar con experimentos realizados sobre minigenes reporteros del exón EDI de fibronectina transfectados en forma transitoria, que mostraban que la replicación del plásmido, normalmente asociada al establecimiento de una estructura cromatínica más compacta, aumentaba la inclusión del EDI a la vez que disminuían la procesividad de la pol II (Kadener 2001). A la vez, la influencia de la TSA sobre el *splicing* alternativo a través de su acción sobre las histonas es fuertemente sugerida por experimentos en este sistema mostrando que la droga sólo tenía efecto si se permitía la replicación de los plásmidos (Nogues 2002). Además, para el caso de NCAM, el hecho de que un tratamiento completamente distinto (la inhibición de metilación del ADN por 5-aza-citidina en células N2a diferenciadas) pueda mostrar un comportamiento prácticamente idéntico al observado con TSA (Fig. 3.19, comparar A y B) refuerza la visión de que un factor que promoviera la formación de una cromatina más laxa favorecería la exclusión del exón 18 de NCAM.

En un paradigma mecanicista como es el de la biología molecular hoy en día, la prueba necesaria para establecer una relación causal firme entre dos procesos es describir en detalle el mecanismo que los conecta. En ese sentido, cabe reconocer que la presente tesis plantea más preguntas que respuestas. Un inicio para ahondar en el mecanismo involucrado es la evaluación de la necesidad de diferentes acetil-transferasas de histonas (HATs). Los experimentos que evalúan la respuesta a la excitación neuronal en células transfectadas con siRNAs dirigidos contra diferentes HATs (CBP, GCN5 y PCAF) muestran dos cosas (Fig. 3.28): las diferencias en expresión de las HATs pueden causar cambios *per se* en los patrones de SA, si bien resta evaluar si esos cambios son directos o mediados por cambios en la expresión de otros genes; las diferentes HATs participarían en diferentes formas de la regulación, con CBP favoreciendo el efecto de despolarización, PCAF desfavoreciéndolo y GCN5 afectando sólo la inclusión basal. Queda pendiente el indagar más en el mecanismo preciso por el cual estas proteínas actúan en la regulación de este exón, en el porqué de las diferencias en sus efectos y en su participación global en la regulación del *splicing* alternativo. Sin embargo, la presencia y la especificidad de la regulación del SA por las diferentes HATs constituyen otra evidencia más de que cambios en la cromatina pueden afectar las decisiones de SA.

Como comentario final a este respecto, la contribución de la acetilación de histonas al efecto observado podría ser sólo parcial, dependiendo parte del efecto de otros mecanismos tales como reclutamiento de proteínas reguladoras de *splicing*. De hecho, al evaluar la interacción entre la despolarización y la TSA a 6 horas de tratamiento, se detecta un leve efecto del KCl solo (Fig. 3.27B, barras 1 y 3), lo cual puede ser indicativo de que hay una vía independiente de la acetilación de histonas que está actuando paralelamente.

#### **4.1.3. ¿Son los cambios en elongación responsables de la modulación en el *splicing* alternativo del E18?**

De acuerdo a las consideraciones ya desarrolladas, creemos que hay evidencias que sugieren que la elongación de la polimerasa cambia en la región

final del gen de NCAM. Paralelamente, se muestra en esta tesis que el E18 de NCAM es, de la misma forma que el exón EDI de fibronectina entre otros, sensible a las tasas de elongación de la polimerasa, aumentando su inclusión al disminuir la tasa de elongación. Esto se sustenta con dos aproximaciones diferentes: la transcripción de un minigén reportero por la polimerasa lenta C4 (Fig. 3.4) y la inhibición de la actividad del factor de elongación P-TEFb por medio de la droga flavopiridol (Fig. 3.5).

El uso de un inhibidor farmacológico como el flavopiridol muestra ciertas debilidades, sobre todo por la posibilidad de efectos indirectos de la droga. De hecho el efecto sólo se observa en presencia de cicloheximida, lo cual sugiere que existen efectos indirectos dependientes de síntesis proteica que regulan el *splicing* del E18 en sentido contrario al planteado. La utilización de la droga 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB), un inhibidor de P-TEFb menos específico que el flavopiridol, para modular eventos de *splicing* alternativo ha mostrado resultados coherentes con la noción de que su efecto se debe a una disminución de la elongación (Nogues 2002; Nogues 2003b; Fededa 2005). Incluso esta noción podría explicar resultados tempranos mostrando que el DRB puede favorecer la utilización de sitios de corte y poli-adenilación proximales (Gallinaro 1988). En el sistema del E18 de NCAM, el inhibidor DRB no tiene efecto sobre el *splicing* alternativo ya sea en ausencia o en presencia de cicloheximida (no mostrado), pero sí se observa que el más específico flavopiridol favorece la inclusión del exón 18 en presencia de cicloheximida, por lo cual el único efecto observado en las condiciones de mayor especificidad es coherente con una disminución en la elongación.

Más allá de las debilidades de esta enfoque experimental, el uso de inhibidores farmacológicos muestra una ventaja importante: puede usarse para evaluar regulación del SA en genes endógenos, algo que resulta más complicado con la herramienta de las polimerasas mutantes. El resultado que muestra un aumento de la inclusión del E18 con la polimerasa lenta (mutante C4), aun siendo sobre un minigén transfectado, habla directamente de un control de los patrones de SA de este exón por la velocidad de elongación. En combinación con el resultado de flavopiridol (cuyo efecto es similar en minigenes y en el gen endógeno, no mostrado) sugiere en forma bastante fuerte que los niveles de inclusión del E18

pueden ser regulados por condiciones que afecten la tasa de elongación y/o procesividad de la pol II.

En resumen, las evidencias que sugieren que el cambio en la elongación observado en respuesta a la excitación neuronal es el causante del cambio en el SA del E18 durante dicho tratamiento, son: el hecho de que se observan cambios en la procesividad de la pol II en la región del E18; el hecho de que el SA del E18 es regulable por la velocidad de elongación de la pol II; el hecho de que la acetilación de histonas es capaz de modular ambos fenómenos. Así como marcamos en la sección anterior que existen experimentos que testean la relación causal entre la acetilación de histonas observada y la menor inclusión del E18, podemos ver que las conexiones que unen los cambios en la elongación y en el *splicing* alternativo son correlaciones. Los efectos aditivos de la despolarización y la inhibición de la elongación (Fig. 3.20) no ayudan a probar ni a descartar la supuesta relación causal, dado que bien puede ser que las pausas transcripcionales generadas por el molde (cromatina) y la inhibición de la elongación causada por los nombrados tratamientos actúen en forma independiente. Asumimos entonces una relación causal debido a que es coherente con el modelo cinético y que permite explicar el fenómeno, pero no podemos descartar que los cambios observados en la transcripción y el *splicing* estén ocurriendo paralelamente, incluso siendo ambos disparados por los cambios en la acetilación de histonas. De hecho, parte de los cambios en el SA causados por las modificaciones de la cromatina podría deberse a que diferentes reguladores de *splicing* alternativo interactuaran con histonas modificadas en ciertos residuos, tal como se ha mostrado para factores de *splicing* constitutivo (Sims 2007).

#### **4.1.4. ¿El modelo cinético es capaz de explicar la regulación del *splicing* alternativo del E18 de NCAM en respuesta al tratamiento con KCl?**

Aceptando que la transcripción es capaz de influir en los patrones de *splicing* alternativo y aceptando que al menos parte de los efectos observados en

NCAM se deben a cambios en la transcripción, la cuestión de fondo que se plantea es la validez del modelo cinético como marco teórico para describir esta influencia. A partir de los primeros trabajos que mostraban que los patrones de *splicing* varían según el promotor utilizado y los factores reclutados para dirigir la transcripción (Cramer 1997; Cramer 1999), el modelo lógico planteado era que el reclutamiento de factores reguladores de *splicing* estaba siendo afectado. Justamente a partir de experimentos donde se analizaba la influencia de la cromatinización del molde transcripcional sobre el *splicing* alternativo (Kadener 2001) surge la visión alternativa de que la tasa de elongación puede ser una de las claves que explique el acoplamiento funcional entre transcripción y *splicing* alternativo. Esta visión retomó una idea que había sido planteada por trabajos desarrollados más de 10 años antes (Eperon 1988): la transcripción y el *splicing* son dos procesos dinámicos y eso implica que el sustrato del *splicing* va siendo reconocido por la maquinaria de procesamiento a medida que se va generando.

Para poner a prueba la hipótesis de la tasa de elongación se recurrió a diferentes aproximaciones, incluyendo la manipulación de *enhancers* transcripcionales (Kadener 2002), el reclutamiento de factores de transcripción que afecten diferencialmente iniciación y/o elongación (Nogues 2002), el uso de inhibidores farmacológicos de elongación (Nogues 2002; Howe 2003; Nogues 2003b), la inserción de secuencias que producen pausado transcripcional (Roberts 1998; Robson-Dixon y Garcia-Blanco 2004) y la utilización de ARN polimerasas mutantes con defectos en la elongación (de la Mata 2003; Howe 2003). Durante el desarrollo de estos estudios, se fue descartando experimentalmente la explicación más trivial, consistente en que diferentes cantidades de mensajeros generadas pudieran llevar a ver diferencias en los patrones de *splicing*, algo que podría sugerir que lo determinante para la regulación del proceso es la cantidad de factores de *splicing* presentes.

Si bien algunas de los enfoques utilizados eran indirectos, la variedad de métodos y de sistemas en los cuales se evidencia un efecto de la tasa de elongación sobre el *splicing* alternativo deja pocas dudas sobre la existencia del efecto cinético. Sin embargo, la complejidad de la regulación del *splicing* alternativo sí puede poner en duda la simpleza mecánica del modelo cinético originalmente planteado, que consistía en pensar que una tasa de elongación más lenta obligaba a utilizar el sitio

3' acceptor de *splicing* del exón alternativo y eliminar el primer intrón, retrasando la transcripción del sitio 3' acceptor del exón siguiente y obligando a la inclusión del exón alternativo (Nogues 2003a, ver figura 1.6). Las diferentes evidencias que la estructura secundaria juega un rol importante y dinámico en la regulación del *splicing* (Buratti y Baralle 2004; Graveley 2005), la presencia de elementos reguladores en *cis* que actúan co-transcripcionalmente (Pagani 2003; Gromak 2008) y las evidencias de que el orden de remoción de intrones no cambia necesariamente en respuesta a cambios en la tasa de elongación (de la Mata y Kornblihtt, resultados no publicados) indican que la tasa de elongación influye en la acción de distintos factores, y que el resultado del evento de *splicing* alternativo cambiará de acuerdo a la suma de esos muchos factores, por lo que el modelo cinético no escapa a la lógica del control combinatorial.

En el caso del exón 18 de NCAM, es difícil dar mayores precisiones sobre el mecanismo de regulación de forma de explicar el efecto cinético, debido a los pocos conocimientos sobre secuencias y proteínas regulatorias que modulen sus niveles de inclusión. Los trabajos del grupo de B. Chabot han develado la presencia de dos elementos regulatorios en *cis* que controlarían negativamente la inclusión del exon 18: un apareamiento interno entre el sitio 5' del exón 18 y la región de ramificación del intrón 18 (Cote y Chabot 1997) y un elemento rico en trechos de purinas y motivos A/C presente en el exón 17 (Cote 1999). En este segundo caso, este motivo era capaz de unir proteínas SR *in vitro*, aunque se desconoce qué proteína en particular es la implicada y cuál es la real implicancia de esta unión en el *splicing in vivo*. Además, experimentos de deleciones sobre el exón 18 muestran resultados no coherentes con la presencia de un único elemento regulador, sugiriendo la presencia de múltiples elementos exónicos negativos y positivos o la formación de estructuras secundarias sobre el exón (Tacke y Goridis 1991).

Analizando la conservación evolutiva de la secuencia del exón 18 y sus regiones flanqueantes se observa un alto grado de conservación en distintas zonas de este exón e incluso en regiones intrónicas cercanas al mismo (Fig. 4.2). Esto sugiere la presencia de elementos regulatorios importantes, que deben ser analizados funcionalmente para determinar su capacidad de ser reconocidos por diferentes factores y su funcionalidad en la modulación de la inclusión durante la diferenciación o la actividad neuronal. Los experimentos realizados durante el

desarrollo de esta tesis implican a la proteína SRp20 como factor positivo de la inclusión del E18 (Fig. 3.2 y 3.3). Buscando posibles secuencias que correspondan al sitio consenso de unión SRp20 (C/U) (A/U) CUUCAU (Cavaloc 1999) en el exón 18 y en sus intrones y exones adyacentes se encontró una única secuencia que corresponde perfectamente al consenso y cinco secuencias con una base diferente (recuadradas en la Fig. 4.3), ubicados mayormente en el intrón anterior, y cuya funcionalidad debe ser evaluada. La necesidad de mantener niveles elevados de SRp20 para observar el efecto de despolarización (Fig. 3.16) no implica necesariamente una participación de esta proteína en el mecanismo de respuesta a dicho tratamiento, sino que podría simplemente ser que los niveles de inclusión son tan bajos que no pueden ser modulados por el tratamiento.

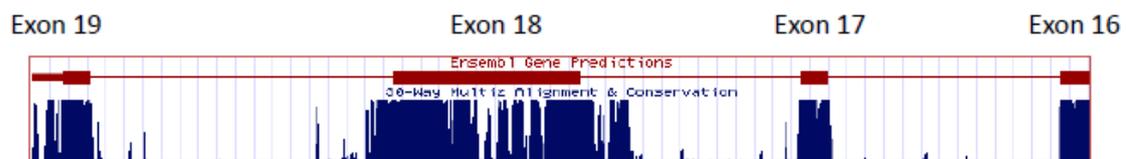


Figura 4.2. **Conservación de secuencia del gen de NCAM en la región cercana al exón 18.** El esquema muestra la región del gen de NCAM correspondiente a los exones 16 a 19 y sus respectivos intrones intermedios (en rojo) con un gráfico que muestra el grado de similitud de dichas secuencias entre treinta especies de mamíferos placentarios (en azul), obtenido del sitio *web* de *UCSC Genome Browser*. El gen está diagramado de derecha a izquierda debido a su orientación con respecto a la numeración de los cromosomas de *Mus musculus*. Puede verse que los exones tanto constitutivos como alternativos se mantienen bastante conservados, pero que en el caso del exón 18 la conservación se extiende a los intrones flanqueantes.

#### 4.1.5. Relevancia del modelo cinético en la regulación del *splicing* alternativo

Si bien los trabajos antes mencionados aportaron mucho para el planteamiento del modelo cinético, fueron realizados en condiciones en las cuales los cambios de las propiedades de elongación de la polimerasa eran de alguna forma forzados. Sin embargo, en los últimos años, se han empezado a aportar evidencias de una participación del modelo cinético en la regulación del *splicing* alternativo en distintos sistemas. Un ejemplo claro lo constituye el trabajo de Batsche y colaboradores, mostrando que un bloqueo en el avance de la polimerasa

causado por la sub-unidad Brm del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF favorece la inclusión de exones alternativos en el gen endógeno de CD44 (Batsche 2006). Resulta una observación llamativa en este trabajo que la polimerasa asociada al pausado transcripcional muestra un aumento en la fosforilación en serinas 2 y 5 de las héptadas del CTD de la pol II, sugiriendo que cambios en la fosforilación del CTD participan en la regulación de la elongación incluso en regiones alejadas del promotor.

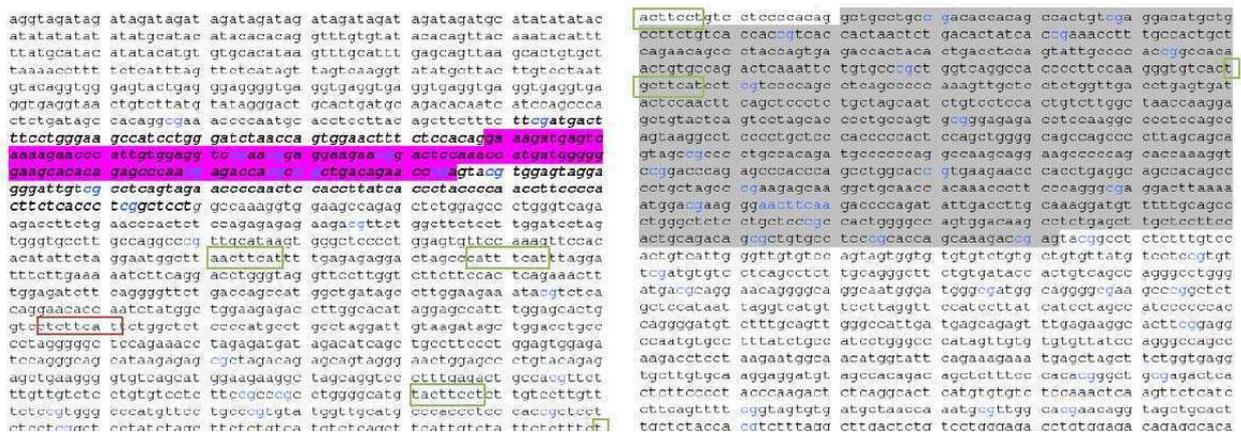


Figura 4.3. Sitos de unión de SRp20 y di-nucleótidos CpG en la región cercana al exón 18. Se muestra la secuencia de parte del intrón 16, el exon 17 (en fucsia), el intrón 18, el exón 18 (en gris claro) y parte del intrón 18 correspondientes al gen de NCAM murino (NCBI GeneID: 17967). Los recuadros marcan secuencias que corresponden al consenso de unión de SRp20 (Cavaloc 1999), representando rojo al consenso perfecto y verde a las secuencias que muestran una base diferente. En letras azules se marcaron todos los di-nucleótidos CpG. Además, resaltada y en bastardilla se muestra una región de ADN que corresponde a la definición estadística de una isla CpG (relación CpG observada/esperada > 0,6 en ventanas de 200 pb; calculado con la utilidad de la Universidad de Alberta [http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/cpg\\_islands.html](http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/cpg_islands.html)).

En el mismo sentido, los experimentos realizados por Manuel Muñoz en nuestro laboratorio muestran que la hiper-fosforilación del CTD de la pol II en respuesta a la irradiación de las células con luz ultravioleta causa una disminución de la tasa de elongación de la misma, afectando los patrones de *splicing* alternativo de varios genes, entre ellos muchos con funciones en apoptosis (Muñoz y colaboradores, aceptado para su publicación en Cell). El trabajo presentado en esta tesis es una contribución más en este sentido, planteando una regulación del *splicing* alternativo mediada por cambios en la elongación de la pol II en respuesta a una señal externa.

#### 4.2. La regulación del *splicing* en respuesta a la excitación neuronal

##### 4.2.1. Posibles mecanismos de regulación del SA del E18 de NCAM

Como comentamos en la Introducción (ver sección 1.3.5), los mecanismos de regulación del *splicing* alternativo en respuesta a tratamientos de despolarización de membrana en células neuronales estudiados previamente se centran básicamente en la participación de secuencias en el ARN que pueden ser reconocidas por factores reguladores del *splicing*, muchos de ellos no identificados (Xie y Black 2001; Xie 2005; An y Grabowski 2007; Lee 2007). Al menos dos de estos elementos (CaRRE 1 y 2) parecen responder a factores activados por la vía de kinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs), y sus efectos son consistentemente bloqueados por la droga KN93, que inhibe la actividad de CaMKII y CaMKIV. En nuestro caso, la vía de las CaMKs no parece ser necesaria para observar el efecto de la despolarización sobre el SA del E18 de NCAM en las células N2a, debido a que el efecto se observa aun en presencia de 20  $\mu$ M KN93, una concentración que afecta enormemente el *splicing* alternativo del bien estudiado exón 21 del gen NR1 (Fig. 3.17). Tampoco pudimos observar una disminución del efecto por inhibidores MEK, PI3K o JNK (resultados no mostrados), vías de señalización implicadas en la regulación del *splicing* alternativo de fibronectina en respuesta a señales extracelulares (Blaustein 2004; Pelisch 2005).

Si bien el cambio en el *splicing* del E18 no parece depender de la vía de las CaMKs, sí parece depender, al menos en parte, de la entrada de calcio, dado que un inhibidor de canales de calcio de tipo L es capaz de bloquear parcialmente el efecto (Fig. 3.7D). El calcio puede además tener un rol en el mantenimiento de la inclusión basal de este exón, dado que el tratamiento con el inhibidor 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), un bloqueante de la liberación de calcio del retículo endoplásmico, estimula la inclusión del E18 en células N2a (resultados no mostrados). Sin embargo no hemos podido avanzar en la caracterización de las vías de señalización río abajo del calcio.

Uno de los trabajos mencionados (An y Grabowski 2007) describe un rol de hnRNP A1 en la inhibición de la inclusión de exones alternativos en respuesta a despolarización de neuronas corticales en cultivo, a través de su unión a

secuencias UAGG exónicas. Tanto la cantidad de hnRNP A1 en núcleo como la presencia de hnRNP A1 unido a oligonucleótidos conteniendo dichas secuencias son incrementadas en respuesta al tratamiento. Aunque el exón 18 de NCAM y sus secuencias intrónicas cercanas carecen de secuencias UAGG, la posibilidad de que hnRNP A1 esté mediando parte del efecto se mantiene plausible dado que los niveles de inclusión del E18 son afectados por la sobre-expresión y el silenciado de esta proteína (Fig. 3.2 y 3.3). Se sabe además que los niveles de hnRNP A1 aumentan durante la diferenciación de células madres neuronales (Skalnikova 2007). Sería por lo tanto importante profundizar en el rol de esta proteína en la modulación de los patrones de *splicing* del E18 durante la diferenciación y la función neuronal.

De acuerdo a lo planteado, proponemos la existencia de un mecanismo de regulación novedoso actuando en respuesta a la excitación neuronal, donde la regulación de la elongación transcripcional mediante cambios en la cromatina tiene el rol protagónico en vez de una o varias proteínas reguladoras del *splicing* que actúen por unión al ARN. Estos dos mecanismos no son de ninguna forma excluyentes, y bien pueden estar actuando conjuntamente, ya sea en la regulación de este exón como de otros tantos exones cuya inclusión es regulada en respuesta a despolarización de membrana en neuronas. De hecho, es sabido que diferentes promotores (y por lo tanto diferente "calidad" transcripcional) pueden cambiar las curvas dosis - respuesta de un evento de *splicing* alternativo a una proteína reguladora del *splicing* (ver por ejemplo Cramer 1999; Pagani 2003). Es entonces razonable pensar que un factor de *splicing* cuya cantidad es muy limitante o que no es reclutado eficientemente al sitio de transcripción verá afectada su capacidad de influir en el *splicing* alternativo de acuerdo a la velocidad transcripcional. Dado que tanto la disponibilidad y la actividad de los factores de *splicing* como la velocidad de elongación pueden ser reguladas en respuesta a un estímulo, ambos mecanismos pueden contribuir conjuntamente para asegurar una respuesta más robusta.

#### **4.2.2. Posible significado funcional de la regulación del *splicing* alternativo de NCAM**

Uno de los atractivos de utilizar NCAM como modelo para estudiar la regulación del *splicing* alternativo en la función neuronal es su implicancia en importantes procesos como la migración celular, la formación de sinapsis y los mecanismos de plasticidad (Tomasiewicz 1993; Fields y Itoh 1996; Ronn 2000; Hartz y Ronn 2008). En este contexto, las diferentes funciones asociadas a las isoformas 140 y 180 de NCAM pueden ayudar a entender el significado que puede tener la regulación del evento de *splicing* aquí estudiado.

Si bien el principal tratamiento (incubación continuada con altas concentraciones extracelulares de KCl) utilizado durante esta tesis dista mucho de constituir una situación fisiológica, el extremar la situación de excitación neuronal nos permitió estudiar una modulación en el *splicing* alternativo del exón 18 de NCAM que puede jugar un papel en procesos fisiológicamente relevantes, acaso mediante cambios muchos más sutiles y transitorios que los observados en nuestro sistema. Cabe aclarar que mínimos cambios en la cantidad de NCAM en membrana pueden tener grandes efectos sobre la actividad biológica de dicha proteína (Hoffman y Edelman 1983; Doherty 1990).

Podemos tomar como ejemplo la plasticidad sináptica. En el hipocampo adulto parece ser claro que la isoforma NCAM 180 se encuentra predominantemente en los terminales sinápticos (Persohn y Schachner 1990). Como mencionamos en la introducción, la excitación neuronal puede provocar una pérdida de esta proteína debido a proteólisis extracelular (Hoffman 1998; Endo 1999) y el clivaje de los complejos intracelulares NCAM 180 - espectrina por la proteasa calpaina (Covault 1991; Vanderklish 1995). Esta aparente necesidad de rápido recambio parece estar respaldada en el caso de la isoforma 180 por la presencia de un motivo PEST (asociado a rápida degradación) evolutivamente conservado (Mayford 1992) y una mayor tasa de recambio (Rafuse y Landmesser 1996). Esta proteína perdida debe ser reemplazada por una nueva población, por lo que un efecto paralelo en la transcripción y/o el procesamiento del ARN puede tener importantes consecuencias sobre la nueva población que la neurona presenta. Es plausible plantearse que esta población temprana de ARNm generada podría estar enriquecida en transcritos que excluyen el exón 18, favoreciendo un

aumento en la proporción de la isoforma 140. Esta situación se asemejaría a la observada en el sistema de facilitación a largo plazo de la sinapsis neurona sensorial – neurona motora del molusco *Aplysia*, donde el tratamiento facilitador con serotonina induce un incremento de las isoformas más cortas del homólogo de NCAM, ApCAM, en la neurona sensorial (Schacher 2000). También se ha reportado un leve pero significativo incremento transitorio en la proteína NCAM 140 presente en sinaptosomas de neuronas hipocámpales, durante entrenamiento de ratones que implica memoria espacial (Venero 2006).

De acuerdo al modelo planteado sobre el rol de las moléculas de adhesión en los procesos de plasticidad sináptica (Dalva 2007, figura 4.4), esta desaparición rápida de la isoforma 180, asociada a la estabilización de la sinapsis, y su reemplazo transitorio por la isoforma 140, asociada a crecimiento de neuritas, permitiría la remodelación de la sinapsis. En este contexto, la caracterización de un mecanismo que induzca la exclusión del exón 18 en respuesta a la excitación neuronal tiene importancia fisiológica. Luego de este primer paso, una segunda población de ARNm podría contar con una mayor proporción de transcritos incluyendo al exón 18, de forma de asegurar la funcionalidad de las nuevas sinapsis. Esto podría explicar el aumento en las sinapsis positivas para NCAM observado con determinados protocolos de potenciación a largo plazo en hipocampo de roedores (Schuster 1998). Sin duda, un factor muy importante a tener en cuenta en el caso de estudiar funcionalidad de NCAM en las sinapsis es evaluar las diferentes respuestas en las neuronas pre- y post-sinápticas.

Es interesante analizar cómo la regulación de NCAM podría estar relacionada también al efecto del estrés sobre el aprendizaje y la consolidación de la memoria. Si bien situaciones de estrés crónico suelen ser negativas para la mayoría de las funciones de un organismo, se cree que en muchos casos el estrés agudo durante una tarea de aprendizaje facilita la formación de memorias más fuertes, y existen muchas evidencias que implican a NCAM en este mecanismo (ver Bisaz 2009 para una revisión actualizada). Experimentos realizados hace varios años muestran que la administración de anticuerpos bloqueantes de NCAM inhiben la potenciación de la memoria inducida por glucocorticoides (Sandi 1995). También se ha mostrado que tratamientos de estrés crónico que reducen la capacidad de aprendizaje reducen específicamente la isoforma NCAM 140

(Touyarot 2004), mientras que el estrés agudo extrínseco puede provocar una reducción en los niveles hipocampales de NCAM 180 (Sandi 2005). Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por los cuales los diferentes tipos de estrés actúan sobre la memoria puede ser la regulación del *splicing* alternativo que module la respuesta de NCAM a la excitación neuronal.

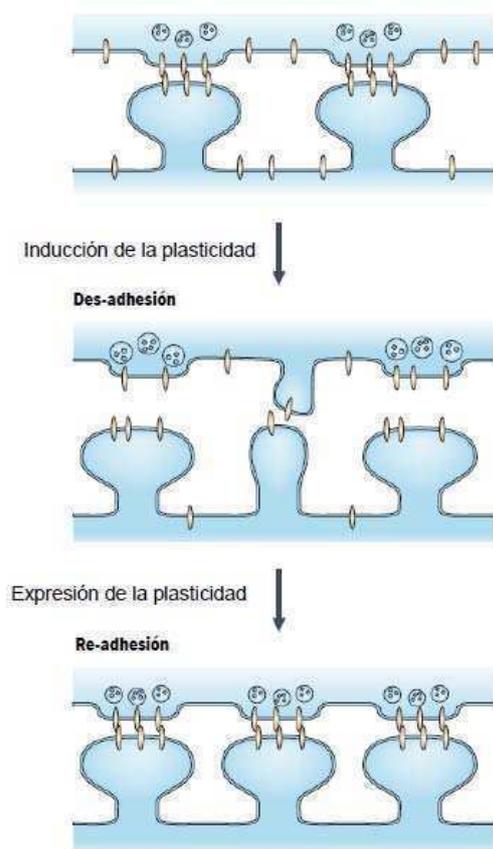


Figura 4.4. **Modelo del rol de las moléculas de adhesión (CAMs) en la remodelación de sinapsis.** Durante la inducción de la plasticidad la adhesión entre los terminales pre- y post-sinápticos debe perderse temporalmente para permitir los eventos de remodelación. Esto puede ocurrir de diferentes formas, que incluyen clivaje de CAMs, internalización, poli-sialidación o expresión de diferentes formas de *splicing* alternativo (ver texto y referencias citadas). Luego, las nuevas sinapsis deben estabilizarse, con lo cual nuevas CAMs propias de sinapsis maduras participan en la fase final de la remodelación (figura tomada de Dalva 2007).

#### 4.3. La modulación intragénica de la cromatina y sus posibles funciones

##### 4.3.1. Estructura de la cromatina en el locus de *Ncam*

La región del gen cercana a la secuencia correspondiente al exón 18 muestra características cromatínicas muy particulares (ver Fig. 3.22 y 3.23). En principio, si bien los niveles de acetilación de H3K9 son bajos a lo largo de todo el gen en comparación con la región promotora, bajan aún más a partir del exón 17 (ver Fig. 3.22B, amplicones F en adelante). El mismo fenómeno se observa para la acetilación de histona H4 (Fig. 3.22C), lo cual parece indicar una característica

particular de esta región. Analizando los niveles de H3K36me3, marca asociada a la forma elongadora de la pol II, se evidencia también una disminución de la misma en la región entre el exón 17 y el intrón 18 (Fig. 3.23D), sugiriendo que los bajos niveles de acetilación están asociados a una menor elongación transcripcional en esa región.

Como mencionamos en la Introducción, existe un evento de *splicing* alternativo asociado a la inclusión del exón 15 de NCAM. Dado que la inclusión de este exón lleva a la utilización de una señal de corte y poli-adenilación presente en el mismo, y teniendo en cuenta que la terminación de la transcripción está asociada al corte del transcrito naciente (West 2004), es posible que la inclusión de este exón en parte de los ARNm esté causando que menos polimerasa de la que inició la transcripción llegue efectivamente a transcribir la región final del gen. Dado que tanto la acetilación de histonas como la tri-metilación en H3K36 son actividades asociadas a la polimerasa, la particular distribución de estas marcas podría ser explicada de esta forma. Este modelo plantea una hipótesis comprobable: si se modula la inclusión del exón 15 deberían alterarse los niveles de estas marcas en la región final del gen. De hecho, esto podría también alterar por sí mismo la inclusión del exón 18, pudiendo constituir un mecanismo posible para la coordinación polar de eventos de *splicing* alternativo en un mismo transcrito (Fededa 2005).

Otros mecanismos podrían estar actuando para causar la particular distribución de histona acetilada observada. Por ejemplo, el reclutamiento o la actividad de enzimas que regulan el balance entre acetilación y des-acetilación podrían estar implicados. Como ya hemos mencionado (ver 1.2.4), tanto las HATs como las HDACs, además de participar en complejos específicos de regulación de la transcripción, muestra diferentes actividades a nivel global. Esto implica que pueden unirse a diferentes regiones del genoma en forma no dirigida, aunque se desconoce el mecanismo y la especificidad de dicha actividad. Otra posibilidad es planteada por el hecho de que la región de ADN cercana a los exones 17 y 18 muestra una proporción inesperadamente alta de di-nucleótidos CpG (Fig. 4.3), sumado al hecho de que un inhibidor de la metilación del ADN es capaz de mostrar en células diferenciadas el mismo efecto que la TSA (Fig. 3.19). Dado que la metilación del ADN es capaz de reclutar complejos conteniendo HDACs (Nan

1998), la menor acetilación de histonas en esta zona podría estar dirigida por esta característica del ADN.

#### **4.3.2. La modulación de la cromatina en respuesta a la excitación neuronal**

El tratamiento con KCl causa un aumento específico en la acetilación en H3K9 en la región final del gen, acompañado por un incremento más leve de H3K36me3 y por una apertura de la cromatina (Fig. 3.24 y 3.25). Si bien es aventurado plantear un mecanismo detallado que explique este fenómeno con las evidencias actuales, trataremos de sugerir posibles mecanismos coherentes con el efecto observado.

En principio, es necesario dejar en claro que los cambios en las modificaciones de histonas detectadas pueden no ser los únicos ni los más importantes. Incluso si bien no se detectaron cambios reproducibles para la tetra-acetilación de histona H4 (en lisinas 5, 8, 12 y 16), queda la posibilidad de que alguna lisina particular esté variando su grado de acetilación en respuesta al tratamiento. Lo mismo para otras lisinas acetilables de H3, H2A y H2B, y para otras modificaciones importantes no analizadas como la fosforilación en serina 10 de histona H3. También es posible que cambios transitorios se produzcan a tiempos más cortos que los analizados (4 a 6 horas), y que estos sean causales de las modificaciones detectadas.

Como mencionamos en la Introducción (ver 1.3.3), tanto la actividad de HATs como de HDACs en núcleo puede ser regulada por la actividad neuronal. Por ejemplo, la entrada de calcio en la célula puede favorecer la actividad de CBP (Chawla 1998; Impey 2002) y producir la exportación de HDAC5 del núcleo (Chawla 2003; Linseman 2003). Sin embargo, siendo que la vía de CaMK es la principal involucrada en estas actividades pero que no parece ser necesaria para el efecto de la despolarización en el SA del E18 de NCAM (Fig. 3.17), una vía alternativa debería estar implicada en reemplazo o además de la vía de las CaMKs.

Otro factor relacionado con la des-acetilación de histonas es MeCP2, cuya actividad es regulada por la excitación neuronal (Chen 2003; Zhou 2006). Resultados recientes muestran también una relevancia conjunta de la acetilación

de histonas y de la metilación del ADN en la formación de memoria (Miller 2008). Dada la presencia de CpG posiblemente metilados en las cercanías del exón 18, esta proteína podría estar participando en la regulación de la estructura de la cromatina en respuesta a la despolarización. Experimentos preliminares analizando el efecto de despolarización sobre células N2a transfectadas con siRNAs contra esta proteína no han mostrado resultados que apoyen esta hipótesis, aunque la baja eficiencia del silenciamiento observada puede estar oscureciendo un efecto sutil (resultados no mostrados).

Otra alternativa es que el incremento en la acetilación de histonas se deba a una estimulación de la fosforilación de H3S10 (ver 1.3.2 y 1.3.3). La principal vía implicada es la de MEK-Erk-MSK1 (Levenson 2004; Chwang 2006; Chwang 2007), que por lo dicho anteriormente tampoco parece ser necesaria para observar el efecto de la despolarización sobre el *splicing*. Una posibilidad no explorada es la participación de la kinasa IKK $\alpha$  en esta respuesta (Anest 2003; Lubin y Sweatt 2007). En este sentido, el tratamiento de células N2a con el inhibidor de IKK sulfazalacina puede inducir un aumento en la inclusión del E18 de NCAM (resultados no mostrados).

Un punto a tener en cuenta es que el tratamiento con KCl causa en las células N2a un aumento en la expresión de CBP, que no es detectado para otras HATs (Fig. 3.21B). El aumento en la cantidad de CBP podría causar un aumento global de acetilación (que se evidencia midiendo los niveles de histona acetilada por *western blot*, figura 3.21A) que afecte a distintas regiones dentro del genoma, entre ellas a la región final del *locus* de NCAM. Si bien este mecanismo puede dar cuenta de parte del efecto de la despolarización sobre el *splicing* del E18, el hecho de que una fuerte regulación se sigue observando en presencia de del inhibidor de síntesis proteica cicloheximida implica que otros mecanismos deben también estar actuando.

La participación de CBP en la regulación del *splicing* alternativo en respuesta a despolarización se sostiene sin embargo a partir de los experimentos sobre células N2a transfectadas con siRNAs contra las diferentes HATs (Fig. 3.28). Si bien el análisis de los resultados es complicado por el hecho de que la ausencia de CBP produce una bajada en los niveles basales de inclusión del E18, la respuesta a la despolarización es claramente disminuida por la transfección con siCBP, en

contraste con el efecto del silenciamiento de GCN5, que muestra aun mayor disminución de los niveles de inclusión basales del E18 pero mantiene el 100% de la capacidad de respuesta a la despolarización. Estos resultados parecen indicar que existen dos mecanismos diferentes pero superpuestos, que afectan los niveles basales y la respuesta a la despolarización de este evento de *splicing* alternativo. El efecto del silenciamiento de CBP sobre la respuesta del E18 a la despolarización, si bien consistente y reproducible, es leve. Pueden existir razones técnicas para no observar un efecto más grande, mayormente relacionadas con que los niveles remanentes de la proteína CBP pueden ser suficientes para observar una respuesta parcial, sobre todo teniendo en cuenta que el tratamiento induce la expresión de este gen. Como muestra la tabla I, los niveles de ARNm de CBP no pueden bajarse más que al 20-25% de los presentes en células control. Además, otras HATs relacionadas, como p300 (Lundblad 1995) pueden compensar funcionalmente la falta de CBP. En particular p300 es también inducida por la despolarización y, a pesar de tener un alto grado de identidad con CBP, sus niveles en las células transfectadas con siCBP se mantienen por encima del 60% de los de las células control (no mostrado).

El aumento en H3K9ac es acompañado por una apertura de la estructura cromatínica, determinada por un aumento en la accesibilidad de la enzima de restricción *MspI* (Fig. 3.25), sensible a conformaciones cerradas de la cromatina. Dado que sólo se analizaron dos regiones del *locus* de NCAM (una región cercana al promotor y otra cercana al exón 18), no podemos afirmar que se trata de un cambio localizado en la vecindad del exón 18. Sin embargo, sí podemos decir que, al igual que el de la marca de H3K9ac, no tiene paralelo en el promotor. De hecho, la accesibilidad en el promotor era ya alta en condiciones basales, lo cual es esperable en la región promotora de un gen activo, y permanece alta después del tratamiento con KCl (también equivalente a lo observado con H3K9ac). Como se mencionó en la Introducción (ver 1.2.4), la acetilación de histonas está muy fuertemente relacionada con una mayor apertura de la cromatina, ya sea directamente por desestabilización de las interacciones de las histonas con el ADN o entre nucleosomas, o indirectamente por otros factores como el reclutamiento de remodeladores de cromatina a través de bromodominios (Shahbazian y Grunstein

2007). Por lo tanto, resulta razonable la hipótesis de que la mayor accesibilidad observada es debida, al menos en parte, a una mayor acetilación de histonas.

El otro cambio observado es el aumento de H3K36me3 entre los exones 17 y 19 (Fig. 3.24D), si bien este incremento es menos marcado que el observado para H3K9ac. Es importante volver a resaltar que la relación entre la cromatina y la transcripción es bi-direccional, en el sentido en que ambas se influyen mutuamente. Por ejemplo, la metil-transferasa de levaduras Set2, que media la trimetilación en H3K36, se asocia preferentemente con la pol II fosforilada en serina 2 del CTD, o sea con la forma elongadora (Krogan 2003; Xiao 2003). La misma función la desarrolla en mamíferos su ortóloga, HYPB/Setd2 (Edmunds 2008), explicando de alguna forma la ubicación preferencial de esta marca en las regiones transcritas y relativamente alejadas del promotor. De acuerdo a los cambios observados en acetilación, accesibilidad y niveles de pre-ARNm en esta zona, el aumento en H3K36me3 apunta entonces también en dirección a una mayor procesividad de la pol II. En levaduras se ha descrito un mecanismo por el cual la marca de H3K36me3 recluta un complejo con actividad de histona des-acetilasa, cuya función sería prevenir el inicio de la transcripción en zonas intragénicas crípticas (Joshi y Struhl 2005; Keogh 2005), una observación que desafía la asociación que nosotros encontramos entre dicha marca y acetilación en H3K9. Las razones de esta divergencia podrían ser o bien que dicho mecanismo no opera en células de ratón, o bien que la actividad del complejo es inhibida por el tratamiento de despolarización o que la desacetilación pueda manifestarse a tiempos más largos de los que nosotros medimos.

#### 4.3.3. ¿Por qué cromatina intragénica?

Quizás uno de los resultados más llamativos de esta tesis es que los cambios encontrados en la región intragénica del *locus* de NCAM, no son acompañados por cambios similares en la región promotora. El resultado es interesante porque, como vimos en la sección anterior, propone preguntas mecánísticas que pueden proveer nuevas ideas y/o evidencias sobre cómo es regulada la estructura de la cromatina y las diferentes etapas de la transcripción durante la función neuronal. Al mismo tiempo, el resultado desafía la aparente preeminencia de la región promotora en lo que a regulación de la cromatina se refiere.

Existen sobrados ejemplos de modificaciones de histonas en la región promotora de diversos genes y sus posibles roles en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, prácticamente no hay estudios que aborden el papel que las diferentes modificaciones de la cromatina pueden jugar en las regiones génicas lejanas al promotor. Un ejemplo aislado lo constituye la demostración de que la tri-metilación de H3K4 puede ayudar al reclutamiento a los focos de transcripción de factores de *splicing*, como el complejo ribonucleoproteico U2, a través de la proteína Chd1, y que tanto los niveles de Chd1 como de H3K4me3 son críticos para asegurar un eficiente *splicing in vivo* de un gen inducible endógeno (Sims 2007). Este estudio marca un camino a seguir, y posiblemente sea cuestión de tiempo hasta que se encuentre que ésta u otras marcas de histonas pueden reclutar factores reguladores de *splicing*, afectando directamente las decisiones de *splicing* alternativo

Un mecanismo alternativo por el cual la estructura de la cromatina puede influir en la expresión génica es sugerido por el presente trabajo: la modulación de la acetilación de histonas puede causar un cambio de la cromatina que favorezca una conformación más laxa de los nucleosomas (Fig. 3.25), lo cual puede repercutir en la elongación de la polimerasa (Fig. 3.26). En el mismo sentido, evidencias de que la elongación transcripcional puede ser afectada por el grado de compactación de la cromatina son aportadas por los ya mencionados trabajos de Lorincz y colaboradores analizando el efecto de la metilación del ADN en diferentes regiones de una unidad transcripcional (Lorincz 2004; Appanah 2007). Los experimentos realizados muestran que, si bien la inducción de una cromatina más compacta en una región cercana al promotor inhibe la iniciación de la transcripción (Appanah 2007), si esto se produce a  $> 1$  Kpb del promotor la iniciación de la transcripción no es afectada, pero sí se produce una disminución de la procesividad de la pol II, asociada a una menor accesibilidad para *MspI*, y a menor acetilación de histonas y menor di- y tri-metilación de H3K4 (Lorincz 2004). Esto sugiere que la modificación de estructuras locales de la cromatina dentro de los genes puede afectar exclusivamente algunas características de la transcripción, permitiendo quizás modular el procesamiento del ARN sin afectar los niveles totales de transcripto producidos.

La evidencia más directa de que esto es posible lo constituyen los experimentos realizados por Mariano Alló en nuestro laboratorio mostrando que la inducción de una región intragénica más compacta en el gen endógeno de fibronectina a través del mecanismo de silenciamiento génico transcripcional (TGS, Kim 2006) produce un cambio en el *splicing* alternativo del exón EDI, que dicho cambio está asociado a una menor procesividad de la pol II y que es reversible por la aplicación de inhibidores farmacológicos, como la TSA, que contrarrestan el efecto del silenciamiento (Alló y colaboradores, enviado para su publicación).

#### 4.4. *La acetilación de histonas, el splicing alternativo y la función neuronal: terreno fértil para explorar*

Durante el desarrollo de estos experimentos y la escritura de esta tesis fue robusteciéndose la idea de que hay un importante campo que explorar en la intersección entre regulación de la cromatina y regulación del *splicing* alternativo, y de que el desarrollo y la función neuronal son un excelente sistema para explorarlo. En la sección 1.3 de la Introducción quisimos aportar algunos elementos que sostienen esta idea. Muchas veces usamos para ejemplificar esto procesos complejos como el aprendizaje y la formación de la memoria, sin por eso pretender que esta tesis aborde dichos procesos, sino más bien para sugerir posibles modelos en los que la relevancia de esta intersección pueda ser evaluada fisiológicamente.

Las modificaciones de la cromatina han sido normalmente relegadas a modificadores de la acción de los elementos regulatorios de la transcripción. Sin embargo, la importancia central de proteínas como CBP y HDAC5 para integrar procesos fisiológicos complejos subraya una visión alternativa: la regulación de la actividad de determinados factores que afectan a la cromatina puede ofrecer un nivel extra de regulación, afectando coordinadamente la expresión de diferentes genes para dar respuesta a determinados estímulos o situaciones y permitiendo integrar diferentes señales a través de una marca relativamente estable en los genes. Esta visión es ampliamente aceptada en el estudio de la diferenciación celular (Hsieh y Gage 2004) y ahora empieza a resultar necesario incorporarla al

estudio de la función neuronal, lo cual se evidencia en el creciente número de revisiones que tratan este tema publicadas en los últimos años (Colvis 2005; Levenson y Sweatt 2005; Borrelli 2008; Jiang 2008; Mehler 2008; Crepaldi y Riccio 2009).

Levantando la mirada del promotor del gen eucariota, deberemos considerar la posibilidad de que la regulación de la actividad de estos factores tenga consecuencias en la cromatina intragénica. El procesamiento del pre-ARNm y la terminación de la transcripción son eventos susceptibles de ser afectados por las características del molde cromatínico. Hemos comentado previamente que empiezan a encontrarse posibles funciones para la modulación de la cromatina dentro de los genes. Si agregamos la modulación del *splicing* alternativo dentro de estas funciones, las posibilidades regulatorias que este escenario ofrece son dignas de ser consideradas. De hecho, los cambios en la cromatina intragénica, si bien están relacionados con la transcripción, podrían afectar en forma completamente independiente la regulación del procesamiento de la regulación transcripcional clásica.

Esta tesis, además de describir un mecanismo de regulación del *splicing* alternativo aplicable al exón 18 de NCAM, propone entonces una hipótesis de trabajo a estudiar. Esta hipótesis se centra en que cambios en la actividad de acetilasas y des-acetilinasas podrían participar en las funciones neuronales complejas a través de modificaciones que afecten no sólo la transcripción, sino el *splicing* alternativo de diferentes genes. Avanzar en esta hipótesis requerirá el uso de herramientas variadas, incluyendo el estudio de la acción de proteínas como CBP sobre el *splicing* de otros genes, la utilización de herramientas de análisis global (como los microarreglos de *splicing* alternativo), la caracterización más precisa de los mecanismos de modificación de la cromatina y de los mecanismos por los cuales esta influye en el *splicing* alternativo, la utilización combinada de modelos celulares y fisiológicos.

# 5. Conclusiones

---

## Conclusiones principales

- Sumada a la ya conocida modulación durante la diferenciación neuronal, el exón 18 puede ser regulado en forma rápida en respuesta a la excitación neuronal producida al despolarizar el potencial de membrana por incubación con altas concentraciones extracelulares de KCl.
- Este efecto es directo, reversible y depende del splicing de nuevos transcriptos y no de cambios en la estabilidad de los distintos ARNm.
- La vía de las kinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs) no es necesaria para la respuesta del exón 18 a la despolarización
- La acetilación de histonas y la expresión de proteínas con actividad de acetil-transferasas de histonas (HATs) aumenta con la despolarización, sugiriendo una respuesta global de la célula en ese sentido.
- La región intragénica de NCAM ubicada entre los exones 17 y 19 se encuentra basalmente en un estado hipo-acetilado y de cromatina compacta, y muestra niveles reducidos de H3K36me3.
- La despolarización induce un aumento en la acetilación en H3K9ac en esta región intragénica, no observándose cambio alguno en la región promotora del gen.
- El cambio en la acetilación de histonas está asociado a mayor accesibilidad de la cromatina y a un aumento menos marcado de H3K36me3.
- Se detecta un incremento en la relación de pre-ARNm distales sobre proximales en esta región, tanto en respuesta a la despolarización como al

inducir hiper-acetilación de histonas con el inhibidor de des-acetasas tricostatina A (TSA), sugiriendo un aumento en la procesividad y/o tasa de elongación de la ARN polimerasa II.

- La TSA emula el efecto de despolarización, siendo también capaz de potenciarlo, evidenciando una relación funcional entre dicho efecto y la acetilación de histonas.

### Otras conclusiones

- El splicing alternativo del exón 18 del gen que codifica para la proteína NCAM es regulado por múltiples factores, subrayando la importancia del control combinatorial para la regulación del splicing alternativo. Incluimos dentro de los reguladores en *trans* a SRp20 como regulador positivo y hnRNP A1 como negativo.
- El exón 18 de NCAM se suma a la lista de *cassettes* exónicos para los cuales existe evidencia directa de control por la tasa de elongación de la polimerasa.
- Tratamientos farmacológicos que inducen una apertura de la cromatina emulan el efecto de la despolarización e impiden que éste se manifieste, mientras que condiciones que disminuyen la capacidad de elongación de la polimerasa muestran efectos independientes que se suman al de la despolarización.
- El silenciamiento de distintas HATs muestra efectos variados sobre la inclusión del exón 18 de NCAM. En particular CBP parece ser requerida como mediadora del efecto de la despolarización.

# 6. Materiales y Métodos

## 6.1. Plásmidos utilizados

### 6.1.1. Minigén reportero de *splicing* alternativo

La utilización de minigenes reporteros de *splicing* alternativo resulta de mucha utilidad para analizar el efecto de la sobreexpresión de distintas proteínas. Dado que la eficiencia de transfección de cualquier proteína no es del 100%, la lectura del efecto de la sobreexpresión de proteínas sobre el patrón de *splicing* de un gen endógeno resulta complicada por la presencia del ARNm proveniente de células que no fueron transfectadas. Al co-transfectar con un vector reportero, y dado que la eficiencia de co-transfección de dos vectores suele ser muy eficiente, se obtiene una lectura del efecto a partir de ARNm provenientes en su mayoría de células transfectadas con el vector de sobreexpresión.

Se utilizó un minigén reportero de *splicing* del exón 18 de NCAM consistente en los exones 17 a 19 del gen de NCAM, con sus respectivos intrones, bajo las órdenes del promotor correspondiente al mismo gen de NCAM. Un esquema de esta construcción se muestra en la figura 6.1.



Figura 6.1. **Esquema del minigén reportero de *splicing* alternativo del exón 18 de NCAM.** La construcción incluye 889 pb de la región promotora endógena de NCAM (flecha blanca), los exones 17 a 19 (incompleto) del gen de NCAM (cajas negras), una región 5' proveniente del vector y una región 3' conteniendo la señal de corte y poli-adenilación correspondiente a una región del virus SV40 (cajas grises). Las flechas negras marcan la posición de los iniciadores usados en la evaluación del *splicing* alternativo por RT-PCR semi-cuantitativa. Como la región inicial del transcripto no corresponde a una secuencia de NCAM, la PCR realizada con este par de iniciadores no amplifica el gen endógeno.

Para la construcción del plásmido, se clonó en el plásmido pBluescript KS+ (Stratagene) un fragmento conteniendo los exones e intrones, obtenido a partir del

plásmido pBALdef (amablemente cedido por el Dr. Benoit Chabot de Sherbrooke, Canada) por corte con las enzimas de restricción *AccI* y *ScaI*. Río arriba de dicho fragmento se insertó utilizando las enzimas *XhoI* y *Sall* un fragmento de 889 pb, conteniendo el promotor y parte de la región regulatoria del gen de NCAM, obtenido mediante PCR con los iniciadores TCTCGAGGATCCCAATACCAGTTTC (directo) y TGTCGACTGCCGAGCTGCGTTCAC (reverso). También se probó utilizar como promotor un fragmento más extenso, que abarcaba 1320 pb río arriba a partir del mismo iniciador reverso, obteniéndose resultados similares.

### **6.1.2. Vectores de expresión de ARN polimerasa II**

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

- pAT7Rpb1 $\alpha$ Amr (Nguyen 1996) expresa la subunidad mayor (hRpb1) de la pol II humana con una mutación puntual (N792D) que confiere resistencia a  $\alpha$ -amanitina.
- pAT7Rpb1 $\alpha$ AmrR749H (hC4) es un derivado de pAT7Rpb1 $\alpha$ Amr con una mutación en el codón 749 de hRpb1 (CGT a CAG), que produce el cambio de un único amino ácido (R749H) de modo equivalente a la mutación C4 de *Drosophila* (R741H) (Coulter y Greenleaf 1985).

### **6.1.3. Vectores de expresión de proteínas reguladoras de splicing**

Los vectores de expresión de proteínas SR y para hnRNP A1 han sido descritos previamente (Caceres 1997).

## 6.2. *Preparación de plásmidos*

### 6.2.1. **Transformación de bacterias**

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

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

Se utiliza esta técnica para producir una cantidad pequeña de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de 3 ml con el objetivo de verificar mediante digestiones por restricción o secuenciación la identidad de los diferentes clones plasmídicos generados. No se detalla esta técnica debido a que es realizada en cualquier laboratorio de biología molecular.

### 6.2.3. **Preparación de plásmidos a mediana y gran escala (midi y maxiprep)**

Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100  $\mu$ g de RNA plasmídico (columnas *tip* 100) o 500  $\mu$ g (columnas *tip* 500). Se realiza el protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.2.4. **Cuantificación del ADN y el ARN**

Para conocer la concentración de ADN o ARN en solución se midió absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (GeneQuant). Como alternativa se midieron concentraciones por fluorimetría, utilizando el lector Qubit y los reactivos Quant-iT RNA y dsDNA BR (Invitrogen). Paralelamente, para cuantificar fragmentos de ADN se realizó una cuantificación por electroforesis, corriendo alícuotas en un gel de agarosa con bromuro de etidio y comparando con estándares de masa (*High Mass* y *Low Mass Ladders*, Invitrogen).

### 6.3. *Cultivos celulares, transfecciones y tratamientos*

#### **6.3.1. Cultivo de las líneas N2a y NIH-3T3**

La línea celular N2a (o Neuro-2a) corresponde a un clon de células de neuroblastoma murino (ver <http://www.atcc.org> para más información). Son células adherentes, con morfología heterogénea pero mayormente redondeada (correspondiente a neuroblastos). Se mantienen cultivándolas en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo DMEM (Gibco) con alta glucosa y piruvato suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomycin). Ocasionalmente, si se quiere utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agrega también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/ml. Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a 37°C unos dos o tres minutos, se detiene la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaquea entre 1/5 y 1/20 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 10 ml de volumen final con medio completo. Las células son congeladas en N<sub>2</sub> líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales. Para los experimentos y transfecciones, se plaquean típicamente 250000 a 400000 células en un pocillo de un placa de 6 pocillos (entre 40 y 50% de confluencia), aunque este número puede variar para ciertos experimentos.

La línea NIH-3T3 corresponde a fibroblastos murinos (ver <http://www.atcc.org> para más información). Son adherentes con clásica morfología fibroblástica. Se mantienen cultivándolas en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo DMEM (Gibco) con baja glucosa suplementado con 5% de suero fetal bovino, o 10% de suero de ternera, y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomycin). Se repican dos veces por semana sin dejarlas llegar nunca a más de un 80% de confluencia. Para los experimentos se utilizaron 120000 a 150000 células en un pocillo de una placa de 6 pocillos (aproximadamente un 60-70% de confluencia).

### 6.3.2. Diferenciación de las células N2a

El protocolo utilizado mayormente en la tesis, tal como se menciona en la sección de Resultados, es el de diferenciación con bajo suero y DMSO (Pollerberg 1985). Brevemente, se plaquean 150000 a 250000 células por pocillo en medio completo como se describió en la sección anterior. Al día siguiente se lavan con PBS 1X y se les agrega a cada pocillo 1,5 ml de medio de diferenciación (DMEM suplementado con 0,2% suero fetal bovino y 2% DMSO). Se las deja en este medio el tiempo indicado, cambiando a medio fresco cada 2 o 3 días.

También se ensayó, tal como se comenta en la sección de resultados, la diferenciación con ácido retinoico (*all-trans retinoic acid*, Sigma). Para ello, se utilizaron concentraciones de este agente entre 1 y 10  $\mu\text{M}$ , con porcentajes de suero variables. El protocolo es similar al descrito para la diferenciación con DMSO.

#### Soluciones utilizadas

PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  c.s.p. 1 litro

### 6.3.3. Inmunofluorescencia indirecta

Para evaluar la diferenciación se realizó inmunofluorescencia indirecta sobre células N2a fijadas a distintos tiempos de tratamiento. Se utilizaron como marcadores de diferenciación anticuerpos primarios anti APC (marcador axonal, Santa Cruz, dilución 1/100, conejo) y anti-Neurofilamento 200 (Sigma, dilución 1/200, ratón). También se realizaron inmunofluorescencias anti  $\alpha$ -tubulina tirosinada (Sigma, dilución 1/500, ratón) y contra la sub-unidad  $\alpha 1$  de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (VDCC  $\alpha 1_c$ , Alomone Laboratories, dilución 1/200, conejo). Como anticuerpos secundarios se utilizaron el anticuerpo conjugado con Alexa 488 contra IgG de ratón para el canal verde, y el conjugado con Cy5 contra IgG de conejo para el canal rojo.

El protocolo se describe brevemente a continuación:

- Se remueve el medio y se lava una vez con PBS 1X.

- Se fija con metanol:acetona (1:1) durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , lavándose dos veces con PBS 1X.
- Se permeabiliza con 0,2% Triton X-100 durante 5 minutos, lavándose dos veces con PBS 1X.
- Se bloquea 30 minutos con 3% albúmina sérica bovina (BSA) en PBS 1X.
- Se incuba con el anticuerpo primario en solución de bloqueo 1 hora, lavándose 4 veces con PBS 1X.
- Se incuba con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo 1 hora, lavándose 4 veces con PBS 1X.

#### **6.3.4. Transfección de células N2a con ADN**

Se transfectaron células N2a con Lipofectamine (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se plaquean las células en placas de plástico de 6 pocillos (cada pocillo tiene un diámetro aproximado de 3,5 cm) el día anterior a realizar la transfección. La cantidad de plásmido total transfectado se ajustó a  $2\mu\text{g}$  para una cantidad de  $4\mu\text{L}$  de lipofectamina.

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

- Se coloca  $2\mu\text{g}$  totales de ADN plasmídico en un tubo *ependorf* que contiene  $100\mu\text{l}$  de DMEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se coloca  $4\mu\text{l}$  de lipofectamina en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene  $100\mu\text{l}$  de DMEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se transfiere el contenido del tubo *ependorf* al tubo con lipofectamina.
- Se incuba 30 minutos para que se formen los complejos entre el polícatión y el ADN.
- Se lavan con PBS 1X las células a transfectar para eliminar trazas de suero y antibióticos que inhiban la transfección, y se dejan en  $800\mu\text{l}$  de DMEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se agregan por goteo  $200\mu\text{l}$  de los complejos en cada pocillo
- Se dejan las células en el incubador durante 4 a 6 hs aproximadamente para que ocurra la transfección.

- Luego se aspira el medio para eliminar la lipofectamina, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.

### **6.3.5. Transfección de células N2a con ARNs pequeños interferentes**

Se transfectaron células N2a con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en medio Optimem (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para estas células, se determinó que 100 pmoles de siRNA con 10  $\mu$ l de lipofectamina 2000 por cada pocillo era la mejor condición de transfección (el volumen final en el pocillo de transfección es de 2,5 ml de medio Optimem). Al día siguiente de la transfección se les cambia el medio a medio completo, y típicamente se dejan entre 48 y 96 hs post-transfección para observar una buena eficiencia de inhibición.

Se utilizaron ARNs pequeños interferentes (siRNAs) contra los mensajeros de las proteínas murinas SRp20 (UGGGCCUGUCGGAGCGUUAGGAUUU), SC35 (CGCUCCAGAUAACCUCCAAGUCCA), SF2 (CCAUGCUCUUCAGACUGUGAUUUA) y hnRNP A1 (UGGAAACUUUGGUGGUGGUCGUGGA), ordenados a Invitrogen (Stealth RNAs). Como control se utilizó un siRNA estándar diseñado contra el gen de luciferasa GL3 (CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT).

Para silenciar los mensajeros de las acetil-transferasas de histonas CBP, GCN5 (o GCN5L2) y PCAF de *Mus musculus*, se compraron los reactivos *siGENOME SMARTpool* de Dharmacon (Cat. N° M-041130-00, M-040665-00 y M-049885-00, respectivamente). Se trata de mezclas de cuatro diferentes ARNs dirigidos contra distintas regiones de cada uno de los genes. La eficiencia y especificidad de la inhibición fue evaluada por RT-PCR cuantitativa.

### **6.3.6. Obtención y cultivo de neuronas piramidales de hipocampo de rata**

Cultivos disociados de neuronas piramidales de hipocampo fueron obtenidos a partir de embriones de ratas Wistar de 18 días (Banker y Cowan 1977). Brevemente, el protocolo utilizado es:

- Se extrae el hipocampo de ambos hemisferios del cerebro de todos los embriones de una rata con 18 días de preñez.
- Se colocan todos los hipocampos en un tubo cónico de 15 ml con 2,7 ml de solución salina de Hanks 1X (HBSS, Gibco).
- Se agregan 300  $\mu$ l de tripsina 2,5% y se incuba 15' a 37°C.
- Se dejan decantar los hipocampos y se retira la solución con tripsina.
- Se lava tres veces con 5 ml de HBSS 1X por 3 a 5' cada lavado.
- Se agrega a los hipocampos 1 a 1,5 ml de medio DMEM con 10% suero de caballo. Se disgrega pasando la suspensión por pipetas pasteur cuya punta se ha afinado previamente; ir disminuyendo progresivamente el diámetro y no pipetear más de 15 veces en total.
- Se siembran 100000 a 200000 células en placas de 35 mm o un pocillo de placa de 6 pocillos cuya superficie fue previamente cubierta con poli-L-lisina (Sigma).
- Se deja adherir las células durante 2 a 4 hs y luego se cambia a medio N2 suplementado.

Las células se cultivan en pocillos previamente cubiertos con poli-lisina (Sigma) entre 5 y 7 días antes del tratamiento. El medio de cultivo N2 suplementado es DMEM alta glucosa con piruvato al cual se le agrega 0.1% ovoalbúmina, y los suplementos B27 y N2 (Sigma). Cada 2 o 3 días se le cambia parte del medio de cultivo.

### 6.3.7. Tratamientos de células con K<sup>+</sup> e inhibidores farmacológicos

Para las incubaciones con altas concentraciones de K<sup>+</sup> extracelular se partió de una solución *stock* 3 M KCl en agua estéril. Esta solución fue agregada directamente al medio de cultivo hasta las concentraciones indicadas. En los casos indicados se incluyó paralelamente un control con las mismas concentraciones de NaCl.

La tricostatina A (Sigma) se disolvió en etanol absoluto para preparar una solución *stock* de 5 mg/ml. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar las concentraciones indicadas en cada caso, o previamente se

le realizaron diluciones seriadas en etanol para alcanzar las concentraciones más bajas. La actividad de la droga fue controlada por western blot con anticuerpos anti H3ac y H4ac.

La 5-aza-citidina (Sigma) se disolvió en una solución 50% ácido acético en agua hasta una concentración de 20 mM. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 3  $\mu$ M.

La cicloheximida (Sigma) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución *stock* de 10 mg/ml. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 10  $\mu$ g/ml, al mismo tiempo que se aplicaba el tratamiento correspondiente. La actividad de la droga fue controlada por inhibición de la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, medida a través de un ensayo de actividad  $\beta$ -gal estándar con un extracto proveniente de células transfectadas con un reportero. La actimomicina D (Invitrogen) fue disuelta en DMSO y luego en medio de cultivo para una concentración final de 5  $\mu$ g/ml.

El flavopiridol (gentilmente provisto por el Dr. Adrian Senderowicz) se disolvió en DMSO para preparar una solución *stock* de 0,5 mM. Al momento de usarse se diluyó en DMSO hasta 50  $\mu$ M y luego en el medio de cultivo hasta la concentración indicada.

El KN93 (Calbiochem) disolvió en DMSO para preparar una solución *stock* de 20 mM. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 20  $\mu$ M.

Los tiempos de incubación son indicados en cada caso. En todos los casos, a los controles se les agregó un volumen equivalente del solvente de cada droga (vehículo).

#### 6.4. *Extracción y análisis de ARN*

##### **6.4.1. Extracción de ARN total de cultivos celulares**

Para obtener el RNA de las células transfectadas, se utiliza una adaptación del protocolo original de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi 1987). Con este protocolo se pueden obtener aproximadamente 5-20  $\mu\text{g}$  de RNA a partir de un pocillo de 35 mm de diámetro. El agua para preparar las distintas soluciones y disolver el ARN fue tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y luego autoclavada para inactivar posibles contaminaciones con ribonucleasas (RNAsas). A continuación se describe el protocolo típico de extracción:

- Se descarta el medio de las células, se lava una vez con PBS 1X y se aspira bien para que no queden restos de líquido.
- Se agrega 500  $\mu\text{l}$  de solución D, que ya contiene  $\beta$ -mercaptoetanol y glucógeno, a cada pocillo con células.
- Se levanta el lisado de células con pipeta y se las transfiere a un tubo eppendorf.
- Se agrega 1/10 de volumen (50  $\mu\text{l}$ ) de AcONa pH 4,2 2M y se mezcla por inversión.
- Se agrega un volumen (500  $\mu\text{l}$ ) de fenol ácido saturado en agua y se agita con un vortex.
- Se agregan 130  $\mu\text{l}$  de una mezcla 49:1 de cloroformo:alcohol isoamílico y se agita vigorosamente con un vortex.
- Se deja 30 min en hielo.
- Se centrifuga 20 min a 12.000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C.
- Se toma la fase acuosa (superior) y se la pasa a un nuevo tubo eppendorf.
- Se precipita con un volumen (500  $\mu\text{l}$ ) de isopropanol y se agita con un vortex.
- Se deja al menos 2 hs a -20°C.
- Se centrifuga 20 min a 12.000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C.
- Se vuelca el sobrenadante.

- Se agrega 500 µl de etanol 80% v/v y se agita con un vortex para lavar bien el precipitado.
- Se deja unos 15 min a temperatura ambiente.
- Se centrifuga 10 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente para disminuir la cantidad de sales precipitadas.
- Se vuelca el sobrenadante y se aspira bien para que no queden restos de etanol.
- Se seca el pellet al aire.
- Se agregan 20 µl de agua y se congela a -20 °C o -80°C.
- Para resuspender bien el ARN, se descongela en un baño de agua a 50 °C durante 5 min y se agita vigorosamente con un vortex.

Alternativamente (y en especial cuando se quiere detectar moléculas de ARN presentes en menor cantidad) se utilizó el reactivo de extracción TRI *Reagent* (Molecular Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se puede controlar la integridad del RNA extraído corriéndolo en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje relativamente alto y por poco tiempo, para disminuir la posible degradación durante la corrida. En una correcta preparación de ARN, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA.

### **Soluciones utilizadas**

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

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

Con el objetivo de evaluar el *splicing* del ARNm transcripto, se realiza una RT-PCR, es decir, una reacción de transcripción reversa (RT) para producir ADNc a partir del ARN, que servirá a su vez como molde de una reacción posterior de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se amplificará el fragmento de interés utilizando iniciadores específicos. En todos los casos, se obtienen

valores correspondientes a la presencia de la isoforma que incluye y a la que excluye un determinado evento de *splicing* alternativo (Fig. 6.2). Los resultados se informan como relación Inclusión/Exclusión, relativizando todas las relaciones del experimento a la del tratamiento Control (que entonces toma el valor de 1).

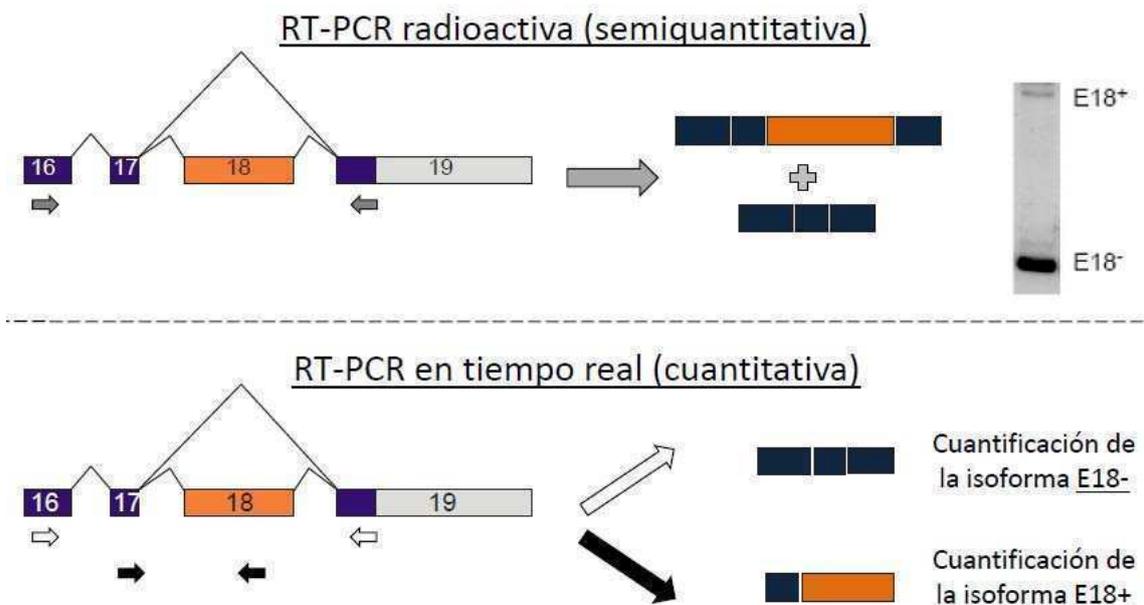


Figura 6.2. Evaluación de los patrones de *splicing* alternativo del gen endógeno de NCAM. Esquema de las estrategias de RT-PCR semi-cuantitativa (*arriba*) y cuantitativa (*abajo*) utilizadas para determinar las relaciones Inclusión/exclusión (E18+/E18-) de los ARNm de NCAM.

### Transcripción reversa (RT)

Oligonucleótido iniciador (oligo dT17): 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

- Se desnaturaliza 5  $\mu$ l de RNA colocándolo 5 min a 65  $^{\circ}$ C.
- Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la re-naturalización.
- Se agrega 15  $\mu$ l de mezcla de reacción a cada tubo.

La mezcla está compuesta de la siguiente manera:

- 4  $\mu$ l de *buffer* de RT 5X.
- 2  $\mu$ l de DTT 100 mM.

- 0,25 µl de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
  - 0,5 µl de inhibidor de RNAsas 40 U/µl.
  - 0,5 µl de oligo dT 100 µM (oligo de 12-18 nucleótidos).
  - 1,5 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl.
  - H<sub>2</sub>O c.s.p. 15 µl.
- Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo dT pueda aparearse a las colas de poliA de mRNAs poli-adenilados.
- Se incuba 1h a 35 °C para que ocurra la reacción.
- Se detiene la reacción incubando 5 min a 95 °C.

#### Reacción en cadena de la polimerasa semi-cuantitativa (PCR radiactiva)

Se utilizan 2 µl de reacción de RT que contiene el ADNc que será el molde para la reacción de PCR. A este ADNc se le agregan 48 µl de mezcla de reacción, compuesta de la siguiente manera (para cada muestra):

- 5 µl de *buffer* de PCR sin MgCl<sub>2</sub>
- 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- 2,5 µl de iniciador directo 20 µM
- 2,5 µl de iniciador reverso 20 µM
- 1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 0,3 a 0,6 µl de Taq polimerasa 5 U/µl
- 1µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (aprox. 0,1 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol )
- H<sub>2</sub>O c.s.p. 48 µl

Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo para evitar la evaporación. El programa para analizar el SA del exón 18 del gen endógeno de NCAM consiste en 30 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 67°C y 2' a 72°C. En el caso del minigén reportero del exón 18 de NCAM el programa es de 30 ciclos de 30" a 94°C, 15" a 63.5°C y 2' a 72°C. Para el exón 21 del gen de NR1 se utilizó el siguiente programa: 30 ciclos de 15' a 94°C, 15" a 60°C y 30" a 72°C. La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores se indica en la sección 6.6. El

análisis del SA del exón EDI de fibronectina se realizó como se reportó previamente (Werbajh 1998). Lo mismo para el caso de CPEB4 (Theis 2003).

Al finalizar la reacción de PCR radiactivas, se procede a separar los productos corriéndolos en un gel de poliacrilamida 6% nativo. Luego de la corrida, se seca el gel sobre un papel Whatmann y se lo expone a una película con orientadores para generar una auto-radiografía. De esta manera, se puede observar las bandas correspondientes al producto de PCR que incluye el exón y al que lo excluye. Para cuantificar estos productos, se orienta la película sobre el gel utilizando los orientadores, se recorta las bandas correspondientes a los productos de interés (con y sin exón alternativo), y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador beta. Debido a que utilizamos el isótopo  $^{32}\text{P}$ , que es un emisor beta de alta energía, podemos evitar el uso de líquido de centelleo para amplificar la señal, y contamos la radiactividad con el método Cerenkov, que es en seco. La eficiencia de este método en seco es algo menor que utilizando un líquido de centelleo pero, por otra parte, es más rápido y se evita el manipuleo de tolueno.

#### Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR en tiempo real)

Para evaluar los patrones de *splicing* alternativo por PCR en tiempo real (en un equipo *Eppendorf Mastercycler Realplex*), se realizaron sobre el ADNc de cada muestra dos reacciones de PCR diferentes, una correspondiente al producto de inclusión (con uno de los iniciadores correspondiente a una secuencia del exón alternativo) y otra al producto de exclusión (ambos iniciadores en exones constitutivos flanqueantes al exón alternativo). En este último caso, el programa de PCR es llevado a cabo en forma que, debido a los cortos tiempos de elongación, no se amplifique el producto de inclusión (que es 3 veces más grande que el de exclusión).

Paralelamente a las muestras se prepara una curva de calibración, obtenida por ocho diluciones sucesivas 1:2 a partir de una dilución 1:4 de una mezcla de todas las muestras a medir. Cada una de las muestras se diluye 1:50 para que entre en el rango medio de la curva de calibración. De estas diluciones,

se utilizan 5  $\mu\text{l}$  para la reacción, a los cuales se agregan 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción. La mezcla se compone de la siguiente forma (para cada muestra):

- 2,5  $\mu\text{l}$  de *buffer* de PCR sin  $\text{MgCl}_2$
- 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM
- 1  $\mu\text{l}$  de iniciador directo 20  $\mu\text{M}$
- 1  $\mu\text{l}$  de iniciador reverso 20  $\mu\text{M}$
- 0,5  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM
- 0,15  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa 5 U/ $\mu\text{l}$
- 0,025  $\mu\text{l}$  de SYBR *Green* (Roche) en dilución 1/30 en DMSO
- H<sub>2</sub>O c.s.p. 20  $\mu\text{l}$

El programa para analizar el SA del exón 18 del gen endógeno de NCAM de ratón consiste en 35 ciclos de 45'' a 95°C, 30'' a 64°C y 45'' a 72°C. En el caso del gen endógeno de rata (cuando se utilizaron cultivos primarios de neuronas de rata) el programa es de 35 ciclos de 30'' a 95°C, 15'' a 58°C y 40'' a 72°C. En el caso del minigén del exón 18 de NCAM, el programa es: 40 ciclos de 30'' a 94°C, 15'' a 65°C y 45'' a 72°C. En estos últimos dos casos la mezcla de reacción difiere en que se agregó 1,25  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (2,5 mM final) en vez de 2  $\mu\text{l}$  (4 mM final).

#### **6.4.3. Ensayo de protección contra la RNasa (RPA)**

Se utilizó este ensayo para contar con una aproximación más directa a los niveles de inclusión del exón 18 en las células N2a. La ventaja del mismo es que, no dependiendo de ninguna reacción de síntesis, no hay diferentes eficiencias asociadas a la detección de ambas isoformas, dando resultados más representativos de la real proporción de isoformas en las células.

Para realizar este ensayo se preparó un vector que contenía una porción del exón 18 (de 40 pb) y otra porción del exón 19 (de 100 pb), en orientación anti-sentido, bajo control del promotor del fago bacteriano T7. A partir de este plásmido (previamente linealizado con la enzima de restricción PstI) se obtiene la sonda por transcripción con la polimerasa T7. La sonda resultante tiene una longitud de 194 nt, de los cuales 54 son secuencias provenientes del vector

pBluescript. Al hibridar con un ARNm que contenga el exón 18, se protege entonces un fragmento de 140 nt, mientras que al hibridar con un ARNm que excluya al exón 18, el fragmento protegido será de 100 nt (ver esquema en figura 6.3).

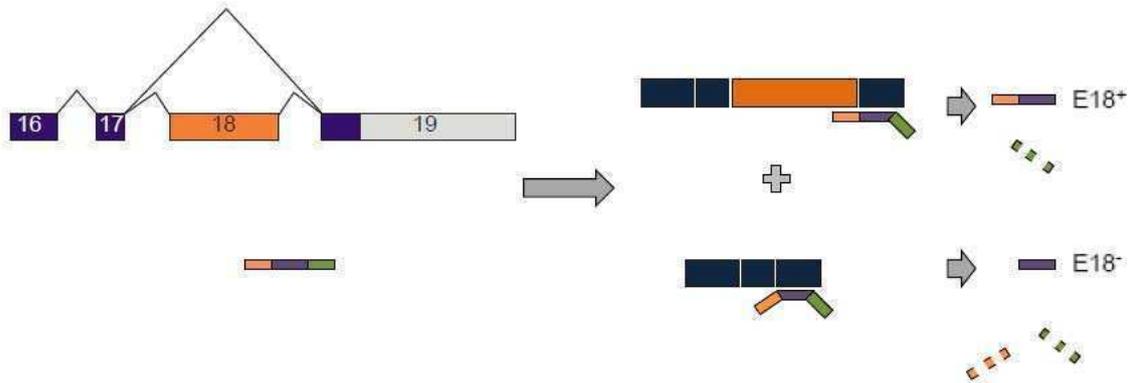


Figura 6.3. **Determinación de los patrones de splicing alternativo por ensayo de protección contra la RNasa (RPA).** Esquema de la estrategias utilizada para medir las relaciones Inclusión/exclusión (E18+/E18-) de los ARNm de NCAM por RPA.

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

- Se linealiza el plásmido con PstI.
- Se agrega proteinasa K hasta 0,1 mg/ml y se incuba 30 min a 37 °C.
- Se extrae 2 veces con un volumen de PIC (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1).
- Se extrae con cloroformo.
- Se precipita con 0,2 vol de NH<sub>4</sub>OAc 10 M y 2,5 vol de etanol.
- Se lava con etanol 75 % v/v y se deja secar.
- Se resuspende en 10 mM Tris-HCl pH 7.

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

- Se mezcla en un tubo los siguientes reactivos para la transcripción *in vitro*:
  - 5 µl de *buffer* de transcripción TSC 5X
  - 2 µl de DTT 100 mM

- 1  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAsas 40 U/ $\mu\text{l}$
  - 4,5  $\mu\text{l}$  de rATP, rCTP, rGTP 2,5 mM cada uno
  - 2,4  $\mu\text{l}$  de rUTP 100  $\mu\text{M}$
  - 6  $\mu\text{l}$  de rUTP radiactivo (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , act. esp.: 3000 Ci/mmol)
  - 1  $\mu\text{l}$  de RNA polimerasa T7 20 U/ $\mu\text{l}$
  - 500 ng de plásmido molde previamente linealizado
  - H<sub>2</sub>O c.s.p. 26,1  $\mu\text{l}$
- Se incuba una hora a 37 °C para que ocurra la reacción.
  - Se agrega 0,5  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAsas 40 U/ $\mu\text{l}$  y, para digerir el molde de DNA, se agrega DNAsa RQ1 a una concentración final de 1  $\mu\text{g}$  de molde.
  - Se incuba 15 min a 37 °C.
  - Se agrega 37,5  $\mu\text{l}$  de *buffer* de siembra (aprox. 1,5 volúmenes).
  - Se calienta 5 min a 90 °C para desnaturalizar el RNA, y se pasa a hielo inmediatamente.

Se siembra en un gel preparativo de 6% acrilamida, 42% urea (desnaturalizante) y se corre a 300 V. De esta manera se separa la sonda de interés de productos espurios y/o semidegradados de la transcripción in vitro. Luego de correr el gel, se lo expone a una película autoradiográfica para detectar la presencia de las moléculas radiactivas. Orientando bien, se procede a cortar la banda con la ribosonda de interés (corresponde al transcrito de mayor tamaño) y se la pasa a un tubo eppendorf. Se agrega 1 ml de *buffer* de elución y se incuba toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se cuenta en contador de centelleo una alícuota para estimar la actividad específica de la ribosonda.

### **Soluciones utilizadas**

*Buffer* de siembra: A 485  $\mu\text{l}$  de formamida deionizada se le agregan 5  $\mu\text{l}$  de Tris- HCl 1 M pH 7,5, 5  $\mu\text{l}$  de SDS 10 % p/v, y 5  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol 0,5 % p/v.

*Buffer* de elución: NH<sub>4</sub>OAc 2 M, SDS 1 % p/v, tRNA 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### Protocolo de RPA

- Se agrega a cada muestra de RNA (5-10 µg) el equivalente a 10<sup>5</sup> cpm de ribosonda en *buffer* de elución.
- Se precipita agregando NH<sub>4</sub>OAc hasta 0,5 M final (solución stock 5 M por ej.) y 2,5-3 vol de etanol.
- Se incuba 20 min a -20 °C y se centrifuga 15 min a velocidad máxima.
- Se retira el sobrenadante con pipeta y, sin dejar secar el pellet, se resuspende cada pellet en 25 µl de *buffer* de hibridación (tomar el *buffer* 5X y diluir una parte en 4 partes de formamida en el momento de usar).
- Se agita con un vortex, se centrifuga brevemente, se calienta 5 min a 60 °C, se vuelve a agitar con un vortex, se desnaturaliza 5 min a 90 °C, se agita con un vortex por última vez, se centrifuga brevemente y se incuba toda la noche en un baño a 45 °C.
- Al día siguiente, se agrega 300 µl de solución de RNasa a cada muestra y se incuba 30 min a 30 °C para que ocurra la digestión de las hebras de RNA simple cadena.
- Se agrega 10 µl de SDS 20 % p/v y 3 µl de proteinasa K 10 mg/ml (aprox 100 X) a cada muestra.
- Se incuba 15 min a 37 °C.
- Se extrae con un volumen de PIC (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1).
- Se agrega 1 µl de tRNA 10 mg/ml como *carrier*.
- Se agrega 1 ml de etanol y se incuba 30 min a -20 °C.
- Se centrifuga 15 min y se resuspende el pellet en 10 µl de *buffer* de siembra.
- Se calienta 5 min a 90 °C y se siembra inmediatamente en un gel desnaturalizante de 6% acrilamida y 42% urea.
- Se corre a 60 W aproximadamente.

Una vez corrido el gel, se lo seca sobre un papel Whatmann y se lo expone a una película auto-radiográfica. De esta manera se visualiza el resultado de la RPA, que puede ser escaneado.

### **Soluciones utilizadas**

*Buffer* de hibridación: PIPES pH 6,7 200 mM, NaCl 2M, EDTA 5 mM. Se congela a -20 °C, y antes de usar se diluye 1:4 en formamida deionizada.

Solución de RNasa: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM, NaCl 0,2 M, LiCl 0,1 M. Se mantiene a -20 °C y, antes de usar, se agrega las RNasas a partir de la siguiente solución stock 250 X: 500 µg/ml de RNasa A y 10.000 U/ml de RNasa T1.

#### **6.4.4. Evaluación de los niveles de ARNm**

Los niveles correspondientes al estado estacionario de ARNm de distintos genes fueron evaluados por PCR cuantitativa. Para la evaluación de los niveles del mensajero de NCAM endógeno se utilizó un iniciador correspondiente al exón 16 y otro al exón 17, con el siguiente programa: 35 ciclos de 30" a 95°C, 30" a 65,5°C y 45" a 72°C. Para la evaluación de los niveles de las HATs, se utilizó el siguiente programa: 35 ciclos de 15" a 95°C, 15" a 64°C y 20" a 72°C. En todos los casos, se utilizó el gen de expresión constitutiva HSPCB para relativizar la cantidad de ARNm obtenida. El procedimiento es similar al descrito para la evaluación del *splicing* alternativo, con la diferencia de que, para la medición de NCAM total, se utilizó 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

#### **6.4.5. Evaluación de la relación de pre-ARNm distal/proximal**

Para la evaluación de los niveles de pre-ARNm se partió de núcleos, obtenidos mediante la incubación de células en *buffer* RSB (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 0.5 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 0.1 % NP40, 1 mM DTT). El protocolo para la obtención de núcleos se describe brevemente a continuación (se debe realizar todo en frío):

- Partir de una placa de 10 cm semi-confluyente por cada muestra
- Remover el medio de cultivo y lavar una vez con PBS 1X
- Cosechar las células en 5 ml de PBS 1X en un tubo cónico de 15 ml
- Centrifugar 5' a 1000 rpm (4°C) y descartar el sobrenadante

- Resuspender las células en 2,5 ml de *buffer* RSB, agregándolo gradualmente mientras se vortexea con suavidad
- Incubar 5' en hielo y luego vortexear fuertemente por 30''
- Centrifugar 10' a 2000 rpm, descartando todo el sobrenadante

Luego, los núcleos se lisaron con el reactivo TRI *Reagent* (Molecular Research) y el ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante. A partir del ARN de cada muestra se realizaron cuatro reacciones de RT diferentes (una por cada PCR intrónica) utilizando iniciadores correspondientes a las juntas intrón – exón para enriquecer el ADNc en productos provenientes de pre-ARNm (Intrón 14: GTGCACTGGGTCCCCTG; Intrón 16: TGGGGCTGCCATTGGCTT; Intrón 17: TTTGACTCATCTTTCCTG; Intrón 18: GTGTCGGCAGGCAGCCTG). Las reacciones de RT se realizaron incubando primero el ARN con el oligo iniciador y con los dNTPs, calentando 5' a 65°C pasando inmediatamente a hielo, agregando luego todos los demás ingredientes de la mezcla de reacción e incubando una hora a 42°C en vez de a 37°C. Se incluyó para cada muestra un control sin enzima MMLV-RT para controlar la posible amplificación de contaminación con ADN genómico.

Los ADNc resultantes fueron luego cuantificados por PCR en tiempo real con iniciadores correspondientes a los intrones 14, 16, 17 y 18 respectivamente. El valor del pre-ARNm para cada región intrónica fue calculado sustrayendo los valores de los controles sin RT. Luego, los resultados se expresaron como relaciones Intrón distal/Intrón proximal (D/P), tomando al intrón 14 como proximal y todos los demás como las distintas regiones distales a ser evaluadas.

Para el control de la proporción pre-ARN/ARNm se realizaron dos reacciones de RT diferentes para evaluar la tasa de remoción de los intrones 17 y 18, usando iniciadores correspondientes al exón 18 (TTGGAGGTCTCTCCCGCAC) y al exón 19 (AAATGGTTTCAGGGAACGGAG) respectivamente. Los ADNc resultantes fueron analizados por PCR en tiempo real con iniciadores diseñados para amplificar las formas procesadas y no procesadas para ambos intrones. Estos productos procesados, dado que uno de los iniciadores hibrida sobre el exón 18, corresponden a eventos de *splicing* que incluyen a dicho exón. Los productos de *splicing* para los eventos que excluyen al exón alternativo fueron también evaluados, utilizando para la RT el iniciador correspondiente al exón 19. La relación pre-ARN/ARNm graficada

comprende los valores obtenidos para los eventos de inclusión y exclusión. Los resultados son similares si se consideran solo los eventos de inclusión o los de exclusión del exón alternativo.

## 6.5. *Ensayos de determinación de modificaciones de la cromatina*

### 6.5.1. **Medición de la acetilación global de histonas**

Se utilizó la técnica de *western blot* para evaluar el grado global de acetilación de las histonas H3 y H4. Para enriquecer las muestras en histonas, no se usaron extractos totales de proteínas de la célula, sino que se prepararon extractos de proteínas solubles en ácido (mayormente histonas), de acuerdo al siguiente protocolo, basado en el recomendado por el proveedor de los anticuerpos primarios:

- Se remueve el medio de las células y se lavan con PBS 1X.
- Se cosechan en 1 ml de PBS 1X frío y se centrifugan 10' a 200 g (4°C), descartando el sobrenadante.
- Se resuspenden en 100 µl de *buffer* de lisis frío (10mM HEPES pH 7.9, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 1,5 mM PMSF).
- Se agrega ácido clorhídrico concentrado hasta una concentración de 0,2 N y se incuba 30' en hielo.
- Se centrifuga 10' a 11000 g (4°C), transfiriendo luego a un tubo nuevo el sobrenadante que contiene las proteínas solubles en ácido y descartando el pellet con los restos celulares.
- Se precipita las proteínas agregando 1 ml de acetona a -20°C, incubando toda la noche.
- Se centrifugar 10' a máxima velocidad, descartando el sobrenadante.
- Se realizan dos lavados con 1 ml de acetona fría, manteniendo siempre las muestras en hielo, y dejando finalmente secar en frío hasta que los pellets se vuelvan transparentes, sin sobre-secar.
- Se agregan 30 a 100 µl de *buffer* de siembra, calentado previamente a 70°C, y se resuspende por vortex, calentamiento de las muestras por 3-

5' a 90°C, sonificado a baja potencia por 10 segundos, nuevo calentamiento y vortexeo.

Luego de la obtención de los extractos, se siembran inmediatamente en un SDS-PAGE 15% acrilamida. Generalmente se corren en paralelo dos electroforesis similares, una que se usará para cuantificar las histonas H3 y H4 acetiladas y otra para cuantificar la histona H3 total. La corrida se continúa hasta que el colorante azul de bromofenol llega al extremo inferior del gel. Luego se transfieren las proteínas a membrana de nitrocelulosa aplicando una tensión de 100 v durante 45' y se tiñen con el colorante rojo ponceau para asegurar una buena corrida y transferencia y una cantidad pareja de proteína entre todas las muestras.

La membrana se bloquea con una solución 3% leche en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, luego de lo cual se cambia la solución de bloqueo por solución fresca conteniendo los anticuerpos primarios, los cuales se incuban toda la noche a 4°C con agitación. Se lava cinco veces con agua des-ionizada para eliminar el anticuerpo pegado inespecíficamente y luego se incubaba la membrana con el anticuerpo secundario (conjugado a peroxidasa) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El revelado se realizó con el kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Pierce), y una vez obtenido el patrón de bandas se cuantificó con el programa *Gel Pro Analyzer 4.0* (Media Cybernetics), con el método de corrección de *rolling disk*.

Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de acetilación fueron anti-H3ac, que reconoce acetilación en lisinas 9 y 14 de H3, y anti-H4ac, que reconoce acetilación en lisinas 5, 8, 12 y 16 de H4 (Upstate 06-599 y 06-866 respectivamente, dilución 1:2000). Para la detección de histona total se utilizó anti-H3 total (Upstate 07-690, dilución 1:25000). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Biorad 170-6515, dilución 1:5000).

### **6.5.2. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Para determinar la presencia de distintas modificaciones de histonas se utilizó la técnica de ChIP nucleosomal o nativo (nChIP). A diferencia del ChIP

tradicional, se omite el paso de generación de entrecruzamientos o crosslinking por medio de la incubación con formaldehído y el sonicado del ADN para generar fragmentos pequeños es reemplazado por una incubación con nucleasa micrococcal (MNasa), que origina mono-nucleosomas conteniendo fragmentos de ~147 pb.

Las ventajas del método son su mayor facilidad técnica y reproducibilidad en la generación de fragmentos de tamaño acotado, sumado al hecho de que los fragmentos generados son de menor tamaño que los generados por sonicado, aumentando la resolución espacial de la técnica. Además, al partir de nucleosomas, la cantidad de ADN disponible (Input) para cada región en una muestra determinada es proporcional al número de histona total (o sea de nucleosomas) presentes en esa región, por lo que se hace innecesario realizar un control de inmunoprecipitación contra histona total.

La preparación de mono-nucleosomas y la precipitación de cromatina fueron realizadas a partir de la técnica descrita por Umlauf y colaboradores (Umlauf 2004). A continuación, describimos el protocolo:

#### Preparación de núcleos

- Se utilizan 1 o 2 placas de 14 cm semi-confluentes por cada tratamiento.
- Se lava una vez con PBS 1X, se agregan 1,5 de tripsina 0,25% y se deja incubar unos minutos a 37°C.
- Se agregan 6,5 ml de medio completo y se pasa la suspensión de células a un tubo cónico de 15 ml por cada placa original.
- Se centrifuga 5' a 1000 rpm (4°C) y se descarta el sobrenadante. De acá en adelante se trabaja siempre en hielo con las soluciones frías.
- Se resuspenden las células de cada tubo en 2 ml de *buffer* I (0,3 M sacarosa; 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EGTA; 15 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM DTT; inhibidor de proteasas – Complete Protesase Inhibitor, Roche).
- Se agregan 2 ml de *buffer* II (*buffer* I + 0,4% IGEPAL CA-630 o NP40) a cada tubo y se incuba 10' en hielo.
- Se van preparando por cada placa dos tubos cónicos de 15 ml conteniendo 8 ml de *buffer* III (*buffer* I con 1,2 M sacarosa).

- Pasados los 10', se depositan cuidadosamente 2 ml de cada suspensión de células sobre el colchón de *buffer* III, se tapa el tubo y se centrifuga inmediatamente por 20' a máxima velocidad (4°C).
- Se descarta el sobrenadante con pipeta pasteur de plástico, tomando cuidadosamente desde arriba y cambiando la pipeta dos veces durante el procedimiento para evitar el que los núcleos en el fondo entren en contacto con el detergente.
- Se resuspenden cuidadosamente los núcleos en 1 ml de *buffer* de MNasa (0,32 M sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; inhibidor de proteasas). La integridad de los núcleos puede ser evaluada por observación al microscopio.

#### Fraccionamiento de la cromatina

Se mezclan todos los núcleos correspondientes a una misma muestra y se alicuota 500 µl de los mismos en un eppendorf de 1,5 ml. Se agrega la nucleasa micrococcal (MNasa) a cada tubo y se incuba a 37°C. La cantidad de enzima y el tiempo de incubación son variables. En nuestras manos, 8 a 10 minutos de incubación con 30 a 50 unidades de MNasa (Amersham, solución de trabajo 10 U/µl en 50% glicerol) da como resultado una importante cantidad de mononucleosomas con una proporción menor de di-nucleosomas, lo cual puede ser controlado tomando 9 µl de la muestra, agregando 1 µl de 10% SDS y sembrándola en un gel de 1,5 a 2% agarosa con un marcador de peso molecular (Fig. 6.4). La reacción se detiene por el agregado de 20 µl de 20 mM EDTA pH 8, mezclado suave e incubación en hielo. Luego se centrifugan los tubos por 10' a 10000 g (4°C), pasando el sobrenadante a un eppendorf nuevo, pudiéndose juntar las distintas digestiones correspondientes a una misma muestra. Para cuantificar la cantidad de ADN en cada muestra se toma una alícuota, se diluye 1:50 en *buffer* de elución y se cuantifica la cantidad de ADN por fluorimetría utilizando el detector Qubit y el kit Quant-iT dsDNA BR (Invitrogen).

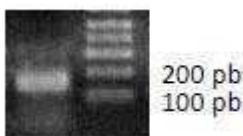


Figura 6.4. **Fraccionamiento de la cromatina por incubación de núcleos con nucleasa micrococcal.** Se muestra un gel de 1,5% agarosa con la muestra fraccionada (primer calle) y un marcador de peso molecular (segunda calle).

### Inmunoprecipitación y purificación

Como cromatina inicial para las inmunoprecipitaciones se utilizó el volumen equivalente a 15 µg de ADN. El volumen se lleva a 1 ml final con *buffer* de incubación (50 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; inhibidor de proteasas). Como anticuerpos primarios se utilizaron: 4 µg de anti-H3K9ac (Abcam ab4441), 5 µl de anti-H4ac (Upstate 06-866), 5 µg de anti-H3K36me3 (Abcam ab9050), 10 µg de anti-H3K9me2 (Upstate 07-441), 10 µg de anti-H3K9me3 (Abcam ab8898), 10 µg de anti-H3K27me3 (Upstate 07-449) y IgG de conejo control (Santa Cruz Biotechnology sc-10801) o suero normal de conejo (Santa Cruz sc-2338). El protocolo se desarrolla de la siguiente forma:

- Se agrega a cada tubo con la cromatina las cantidades necesarias de anticuerpo, se cierran los tubos (pueden sellarse con parafilm) y se dejan incubando toda la noche en rotación a 4°C.
- Se agrega 50 µl de proteína A/G acoplada a agarosa (Santa Cruz sc-2003). Es recomendable usar un *tip* con la punta cortada para tomar más fácilmente la suspensión de agarosa.
- Se deja rotando a 4°C por otras 4 horas, se centrifuga 3' a 1500 g para decantar la agarosa.
- Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo, constituyendo la fracción no unida.
- Se resuspenden las bolitas de agarosa en 1 ml de *buffer* de lavado A (50 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM EDTA; 75 mM NaCl) frío y se incuba en rotor por 3' a temperatura ambiente.
- Se centrifuga 3' a 1500 g para decantar la agarosa y se descarta el sobrenadante.
- Se repite el procedimiento con *buffer* de lavado B (50 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM EDTA; 125 mM NaCl) frío.
- Se repite el procedimiento con *buffer* de lavado C (50 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM EDTA; 175 mM NaCl) frío.
- Se eluye la cromatina agregando resuspendiendo las bolitas en 250 µl de *buffer* de elución (50 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 1% SDS) e incubando 30' con rotación a temperatura ambiente.

- Se centrifuga 3' a 250 g y transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo, constituyendo la fracción unida.
- Se purifica el ADN de las fracciones unidas y no unidas (primer sobrenadante). En este caso se utilizó el kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante

### Análisis del ADN

El análisis se realizó por PCR en tiempo real a partir de 2 µl de las muestras (generalmente en diluciones entre 1:4 y 1:10). Se utilizó una mezcla de las fracciones no unidas para preparar la curva de calibración. Debido al reducido tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos, se utilizaron iniciadores cuyo producto (amplicón) fuera de una longitud de alrededor de 100 pb; las secuencias de los iniciadores se muestran en la sección 6.6. Para mejorar la reproducibilidad de la detección, se trabajó con una mezcla de reacción comercial Mezcla Real 2X (Biodynamics), agregando a la muestra 5 µl de dicha mezcla y 3 µl de una mezcla de pares de iniciadores en concentración 3 µM cada uno, dando un volumen final de 10 µl. El programa de PCR utilizado consiste en 40 ciclos de 20" a 95°C, 20" a 60°C y 20" a 68°C, con la salvedad que para los amplicones correspondientes a la región promotora, intrón 16 y exón 17, la temperatura de anillamiento fue de 57°C.

Los enriquecimientos relativos fueron calculados dividiendo el cociente unido/no unido para el anticuerpo específico por el cociente unido/no unido para el anticuerpo control (IgG control o suero normal). Para comparar entre tratamientos y poder juntar distintos experimentos, los valores de cada amplicón fueron relativizados a los valores correspondientes al amplicón ubicado en la región intergénica.

### **6.5.3. Ensayo de accesibilidad con *MspI***

El protocolo utilizado en la tesis es una modificación del que se describe en el trabajo de Lorincz y colaboradores (Lorincz 2004). Básicamente se obtienen núcleos de células sometidas a diferentes tratamientos y se incuban los núcleos con la endonucleasa de restricción *MspI*, que en estas condiciones es sensible al grado de compactación de la cromatina. La purificación de núcleos es similar a la

descripta para el protocolo de nChIP. A partir de ese punto, el protocolo continúa de la siguiente forma:

- Aproximadamente 750000 núcleos por tratamiento se incuban por 30' a 37°C, con 20 unidades de *MspI* (New England Biolabs) en *buffer* 2 de NEB conteniendo 146 mM sacarosa (+ Enz) o solamente con el *buffer* (- Enz). Cada digestión se realiza por triplicado.
- A los 15 minutos se agregan 20 unidades de *EcoRI* (NEB) y 5 µg de RNase A (Sigma), para degradar el ARN nuclear y cortar el ADN genómico, lo cual facilita la posterior purificación.
- Pasados los 30', se detiene la reacción con 10µl de *stop buffer* (20 mM Tris-HCl pH 7.4; 1% SDS; 500 µg/ml Proteinasa K).
- Se vortexean brevemente las muestras y se incuban toda la noche a 55°C.
- Se purifica el ADN con dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- Se precipita con 2,5 vol de etanol absoluto, se lava una vez con 500 µl de 70% etanol y se resuspende en 50 µl de *buffer* TE.

La cantidad de ADN no cortado con la enzima en tres regiones diferentes fue evaluada por PCR en tiempo real: un amplicón corresponde a una región del exón 18 conteniendo dos sitios de corte para *MspI* (Uncut E18), otro corresponde a una región cercana al promotor que contiene tres sitios de corte para *MspI* (Uncut Prom) y otro corresponde a una región del intrón 16 sin sitios de corte para la enzima, por lo que da idea del ADN total recuperado (Total). La PCR se realizó de la forma habitual, con las siguientes modificaciones: se utilizó Taq Platinum (Invitrogen) como enzima para realizar una PCR *hot start* y se incubó previamente 15 minutos a 94°C para asegurar tanto la activación de la enzima como la correcta desnaturalización inicial de todo el ADN genómico. Para el amplicón Uncut Prom se utilizó 4 mM MgCl<sub>2</sub> y el siguiente programa: 40 ciclos de 20" a 95°C, 20" a 62.5°C y 30" a 72°C. Para el amplicón Uncut E18, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y el siguiente programa: 40 ciclos de 20" a 95°C, 20" a 68°C y 1' a 72°C, subiendo luego la temperatura a 90°C para realizar la lectura de fluorescencia. Las secuencias de los iniciadores son descritas en la sección 6.6. Para el ADN total se utilizaron los mismos iniciadores

y programa que se utilizaron para evaluar la región Intrón 16 en el nChIP, con las modificaciones ya comentadas y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 4 mM en la mezcla de reacción.

Un índice de accesibilidad fue calculado para el exon 18 y para el promotor independientemente, de acuerdo a la siguiente fórmula: (promedio de Uncut/Total en las muestras sin *MspI*) / (promedio de Uncut/Total en las muestras con *MspI*).

## 6.6. Oligonucleótidos utilizados

### 6.6.1. Oligonucleótidos iniciadores para PCR

#### Evaluación del *splicing* por PCR radiactiva

- E18 NCAM endógeno ratón      F: ATGGCAGCCCCACCGCAG  
R: TTTTGT TTTGTGTGGCATCGTTG
- Minigén E18 NCAM              F: GCAGCTCGGCAGTCGAGGTC  
R: CGCTGGCTTGGCTTCTGACTCC
- E21 NR1                            F: CCTACAAGCGACACAAGGATG  
R: AGCAGCAGGACTCATCAGTG

#### Evaluación del *splicing* por PCR en tiempo real

- E18 NCAM endógeno ratón ***Incl***    F: GAGTCAAAGAACCCATTGTG  
R: ACAGAAGGCAGCATGTCCTC
- E18 NCAM endógeno ratón ***Excl***    F: ATGGCAGCCCCACCGCAG  
R: TTTTGT TTTGTGTGGCATCGTTG
- E18 NCAM endógeno rata ***Incl***      F: CCATTGTGGGCATCCTCATTG  
R: GCTTCATTGGGGACCGTCTTG
- E18 NCAM endógeno rata ***Excl***      F: CCTCATTGTCATTTTCGTCTACTC  
R: TTTTGT TTTGTGTGGCATCGTTG
- Minigén E18 NCAM ***Incl***            F: GCAGCTCGGCAGTCGAGGTC  
R: GTGGTGTCCGCAGGCAGCTC
- Minigén E18 NCAM ***Excl***            F: GCAGCTCGGCAGTCGAGGTC

R: CGCTGGCTTGGCTTCTGACTCC

### Evaluación de los niveles de ARNm

- NCAM total F: ATGGCAGCCCCACCGCAG  
R: GGGTTCTGTCAGCGGCGTGG
- CBP F: ACGACACAGCCTCACAATC  
R: GAACATAAGCCAGACATCATCC
- GCN5 F: GTCTGAGGATGTCGCTACC  
R: GGAAGTGAGTGAGGATGAGG
- PCAF F: GCATCAACTACTGGCATCTG  
R: TTCCTGTCTGGCTTGTTC
- p300 F: CACTTCCTGCTGCTCCTTC  
R: CTGCTGGTTCTGGCTTATCC
- HSPCB F: CCAAAAAGCACCTGGAGATCA  
R: TGTCGGCCTCAGCCTTCT

### nCHIP y análisis de pre-ARNm

- Región intergénica (NCAM) F: GCAGCAGAGCATAGCAGAGG  
R: CAGAATGTAGTCCCAGGCAGTG
- Promotor F: CTCGGCAGTGGCTGGCAAG  
R: GACGGCGGCGGAGCAATG
- Intrón 14 F: AATGTGAGTGCCAGCGAGAG  
R: GGGTGGTTTGTGGGAATGTTC
- Exón 16 F: AACCACAGACCACTTCTTTCCC  
R: GACAATGAGGATGCCACAATG
- Intrón 16 F: TTCTTCCCACCAGCAGCATC  
R: TCTCACTCCATCCTTTCTCAGC
- Exón 17 F: GAAGCACACAGAGCCCAACG  
R: GCGACAATCCCTCCTACTCCAC
- Intrón 17 F: CGTCTCACAGGAACACCAATC  
R: AGCCAGAATGAAGAGGACCAG
- Exón 18 5' F: TGCCTTCTGTCACCACCGTCAC  
R: GGTCTCACTGGTAGGGCTGTTCTG

- Exón 18 3' F: CCCGCACCAGCAAAGACC  
R: GGACATAACACAGCACAGACAC
- Intrón 18 F: CCTGGGAGACCTGTGGAGAC  
R: GCCTGCTTGCTGTAAGAGACTG
- Exón 19 F: ACGGTCCCCAACGATGCC  
R: TCTGGTGAAGCCGCTGTGTC
- Exón 19 3' utr F: GCCACCTGCCTGTGTCTG  
R: TTCAACAAAGCCAAAGGAGTCC
- Exón EDI (fibronectina) F: CCCTAAAGGACTGGCATTCACTG  
R: GTCACCCTGTACCTGGAAACTTG

Ensayo de accesibilidad

- Uncut Prom F: CATCGTATCGTCCTTGCTTGG  
R: CCCAGCCTTATTGTTCACCTCTTC
- Uncut E18 F: CCAGCCCCTTAGCAGCAG  
R: GATGGCAGATAAAGGCACATTG

## 7. Bibliografía

---

- Agalioti, T., G. Chen and D. Thanos (2002). "Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene." *Cell* **111**(3): 381-92.
- Akoulitchev, S., T. P. Makela, R. A. Weinberg and D. Reinberg (1995). "Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II." *Nature* **377**(6549): 557-60.
- Alarcon, J. M., G. Malleret, K. Touzani, S. Vronskaya, S. Ishii, E. R. Kandel and A. Barco (2004). "Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration." *Neuron* **42**(6): 947-59.
- Alcaraz, G. and C. Goridis (1991). "Biosynthesis and processing of polysialylated NCAM by AtT-20 cells." *Eur J Cell Biol* **55**(1): 165-73.
- An, P. and P. J. Grabowski (2007). "Exon silencing by UAGG motifs in response to neuronal excitation." *PLoS Biol* **5**(2): e36.
- Anest, V., J. L. Hanson, P. C. Cogswell, K. A. Steinbrecher, B. D. Strahl and A. S. Baldwin (2003). "A nucleosomal function for I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  in NF- $\kappa$ B-dependent gene expression." *Nature* **423**(6940): 659-63.
- Angata, K., J. M. Long, O. Bukalo, W. Lee, A. Dityatev, A. Wynshaw-Boris, M. Schachner, M. Fukuda and J. D. Marth (2004). "Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior." *J Biol Chem* **279**(31): 32603-13.
- Angata, K., J. Nakayama, B. Fredette, K. Chong, B. Ranscht and M. Fukuda (1997). "Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST." *J Biol Chem* **272**(11): 7182-90.
- Appanah, R., D. R. Dickerson, P. Goyal, M. Groudine and M. C. Lorincz (2007). "An unmethylated 3' promoter-proximal region is required for efficient transcription initiation." *PLoS Genet* **3**(2): e27.
- Auboeuf, D., D. H. Dowhan, Y. K. Kang, K. Larkin, J. W. Lee, S. M. Berget and B. W. O'Malley (2004a). "Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2270-4.
- Auboeuf, D., D. H. Dowhan, X. Li, K. Larkin, L. Ko, S. M. Berget and B. W. O'Malley (2004b). "CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing." *Mol Cell Biol* **24**(1): 442-53.
- Auboeuf, D., A. Honig, S. M. Berget and B. W. O'Malley (2002). "Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators." *Science* **298**(5592): 416-9.
- Ballas, N., E. Battaglioli, F. Atouf, M. E. Andres, J. Chenoweth, M. E. Anderson, C. Burger, M. Moniwa, J. R. Davie, W. J. Bowers, H. J. Federoff, D. W. Rose, M. G. Rosenfeld, P. Brehm and G. Mandel (2001). "Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex." *Neuron* **31**(3): 353-65.
- Banker, G. A. and W. M. Cowan (1977). "Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture." *Brain Res* **126**(3): 397-42.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire and T. Kouzarides (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." *Nature* **410**(6824): 120-4.

- Barton, C. H., D. A. Mann and F. S. Walsh (1990). "Characterization of the human N-CAM promoter." *Biochem J* **268**(1): 161-8.
- Batsche, E., M. Yaniv and C. Muchardt (2006). "The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing." *Nat Struct Mol Biol* **13**(1): 22-9.
- Bauren, G. and L. Wieslander (1994). "Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription." *Cell* **76**(1): 183-92.
- Beffert, U., E. J. Weeber, A. Durudas, S. Qiu, I. Masiulis, J. D. Sweatt, W. P. Li, G. Adelman, M. Frotscher, R. E. Hammer and J. Herz (2005). "Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2." *Neuron* **47**(4): 567-79.
- Beggs, H. E., S. C. Baragona, J. J. Hemperly and P. F. Maness (1997). "NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn)." *J Biol Chem* **272**(13): 8310-9.
- Belotserkovskaya, R., S. Oh, V. A. Bondarenko, G. Orphanides, V. M. Studitsky and D. Reinberg (2003). "FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration." *Science* **301**(5636): 1090-3.
- Bengal, E., O. Flores, A. Krauskopf, D. Reinberg and Y. Aloni (1991). "Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **11**(3): 1195-206.
- Bentley, D. (2002). "The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory." *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 336-42.
- Bentley, D. L. (2005). "Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors." *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 251-6.
- Berger, S. L. (2000). "Gene regulation. Local or global?" *Nature* **408**(6811): 412-3, 415.
- Berget, S. M. (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." *J Biol Chem* **270**(6): 2411-4.
- Berke, J. D., V. Sgambato, P. P. Zhu, B. Lavoie, M. Vincent, M. Krause and S. E. Hyman (2001). "Dopamine and glutamate induce distinct striatal splice forms of Ania-6, an RNA polymerase II-associated cyclin." *Neuron* **32**(2): 277-87.
- Beyer, A. L. and Y. N. Osheim (1988). "Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts." *Genes Dev* **2**(6): 754-65.
- Bisaz, R., L. Conboy and C. Sandi (2009). "Learning under stress: a role for the neural cell adhesion molecule NCAM." *Neurobiol Learn Mem* **91**(4): 333-42.
- Bjork, P., S. Jin, J. Zhao, O. P. Singh, J. O. Persson, U. Hellman and L. Wieslander (2009). "Specific combinations of SR proteins associate with single pre-messenger RNAs in vivo and contribute different functions." *J Cell Biol* **184**(4): 555-68.
- 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.
- Blanchette, M. and B. Chabot (1997). "A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B." *RNA* **3**(4): 405-19.
- Blaustein, M., F. Pelisch, O. A. Coso, M. J. Bissell, A. R. Kornblihtt and 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 and A. Srebrow (2007). "Signals, pathways and splicing regulation." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(11): 2031-48.
- 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 and A. Srebrow (2005). "Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT." *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1037-44.

- Boireau, S., P. Maiuri, E. Basyuk, M. de la Mata, A. Knezevich, B. Pradet-Balade, V. Backer, A. Kornblihtt, A. Marcello and E. Bertrand (2007). "The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells." *J Cell Biol* **179**(2): 291-304.
- Borrelli, E., E. J. Nestler, C. D. Allis and P. Sassone-Corsi (2008). "Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity." *Neuron* **60**(6): 961-74.
- Bortvin, A. and F. Winston (1996). "Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones." *Science* **272**(5267): 1473-6.
- Bourgeois, C. F., Y. K. Kim, M. J. Churcher, M. J. West and J. Karn (2002). "Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences." *Mol Cell Biol* **22**(4): 1079-93.
- Boutz, P. L., P. Stoilov, Q. Li, C. H. Lin, G. Chawla, K. Ostrow, L. Shiue, M. Ares, Jr. and D. L. Black (2007). "A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons." *Genes Dev* **21**(13): 1636-52.
- Bradsher, J. N., S. Tan, H. J. McLaury, J. W. Conaway and R. C. Conaway (1993). "RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation." *J Biol Chem* **268**(34): 25594-603.
- Buratti, E. and 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 and 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.
- Buttner, B. and R. Horstkorte (2008). "Intracellular Ligands of NCAM." *Neurochem Res*.
- Buttner, B., W. Reutter and R. Horstkorte (2004). "Cytoplasmic domain of NCAM 180 reduces NCAM-mediated neurite outgrowth." *J Neurosci Res* **75**(6): 854-60.
- Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." *Trends Genet* **18**(4): 186-93.
- Caceres, J. F., T. Misteli, G. R. Sreaton, D. L. Spector and 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.
- Caceres, J. F., S. Stamm, D. M. Helfman and A. R. Krainer (1994). "Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors." *Science* **265**(5179): 1706-9.
- Cao, R. and Y. Zhang (2004). "The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 155-64.
- Carey, M., B. Li and J. L. Workman (2006). "RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation." *Mol Cell* **24**(3): 481-7.
- Carrozza, M. J., B. Li, L. Florens, T. Suganuma, S. K. Swanson, K. K. Lee, W. J. Shia, S. Anderson, J. Yates, M. P. Washburn and J. L. Workman (2005). "Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription." *Cell* **123**(4): 581-92.
- Cavaloc, Y., C. F. Bourgeois, L. Kister and J. Stevenin (1999). "The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers." *RNA* **5**(3): 468-83.
- Clark, D. J. and G. Felsenfeld (1992). "A nucleosome core is transferred out of the path of a transcribing polymerase." *Cell* **71**(1): 11-22.
- Clayton, A. L., C. A. Hazzalin and L. C. Mahadevan (2006). "Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective." *Mol Cell* **23**(3): 289-96.
- Colvis, C. M., J. D. Pollock, R. H. Goodman, S. Impey, J. Dunn, G. Mandel, F. A. Champagne, M. Mayford, E. Kozus, A. Kumar, W. Renthal, D. E. Theobald and E. J. Nestler (2005). "Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system." *J Neurosci* **25**(45): 10379-89.

- Conaway, R. C., S. E. Kong and J. W. Conaway (2003). "TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers." *Cell* **114**(3): 272-4.
- Corona, D. F., C. R. Clapier, P. B. Becker and J. W. Tamkun (2002). "Modulation of ISWI function by site-specific histone acetylation." *EMBO Rep* **3**(3): 242-7.
- Cote, J. and B. Chabot (1997). "Natural base-pairing interactions between 5' splice site and branch site sequences affect mammalian 5' splice site selection." *RNA* **3**(11): 1248-61.
- Cote, J., M. J. Simard and B. Chabot (1999). "An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection." *Nucleic Acids Res* **27**(12): 2529-37.
- Coulter, D. E. and A. L. Greenleaf (1985). "A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro." *J Biol Chem* **260**(24): 13190-8.
- Covault, J., Q. Y. Liu and S. el-Deeb (1991). "Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin." *Brain Res Mol Brain Res* **11**(1): 11-6.
- Cramer, P., J. F. Caceres, D. Cazalla, S. Kadener, A. F. Muro, F. E. Baralle and 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 and A. R. Kornblihtt (1997). "Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11456-60.
- Cremer, H., G. Chazal, A. Carleton, C. Goriadis, J. D. Vincent and P. M. Lledo (1998). "Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13242-7.
- Cremer, H., R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff and et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." *Nature* **367**(6462): 455-9.
- Crepaldi, L. and A. Riccio (2009). "Chromatin learns to behave." *Epigenetics* **4**(1): 23-6.
- Crosio, C., E. Heitz, C. D. Allis, E. Borrelli and P. Sassone-Corsi (2003). "Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons." *J Cell Sci* **116**(Pt 24): 4905-14.
- Cunningham, B. A., J. J. Hemperly, B. A. Murray, E. A. Prediger, R. Brackenbury and G. M. Edelman (1987). "Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing." *Science* **236**(4803): 799-806.
- Chao, S. H., K. Fujinaga, J. E. Marion, R. Taube, E. A. Sausville, A. M. Senderowicz, B. M. Peterlin and D. H. Price (2000). "Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication." *J Biol Chem* **275**(37): 28345-8.
- Chawla, S., G. E. Hardingham, D. R. Quinn and H. Bading (1998). "CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV." *Science* **281**(5382): 1505-9.
- Chawla, S., P. Vanhoutte, F. J. Arnold, C. L. Huang and H. Bading (2003). "Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5." *J Neurochem* **85**(1): 151-9.
- Chen, W. G., Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A. E. West, E. C. Griffith, R. Jaenisch and M. E. Greenberg (2003). "Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2." *Science* **302**(5646): 885-9.
- Cho, H., G. Orphanides, X. Sun, X. J. Yang, V. Ogrzyzko, E. Lees, Y. Nakatani and D. Reinberg (1998). "A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure." *Mol Cell Biol* **18**(9): 5355-63.

- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Chwang, W. B., J. S. Arthur, A. Schumacher and J. D. Sweatt (2007). "The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation." *J Neurosci* **27**(46): 12732-42.
- Chwang, W. B., K. J. O'Riordan, J. M. Levenson and J. D. Sweatt (2006). "ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning." *Learn Mem* **13**(3): 322-8.
- Dal Toso, R., B. Sommer, M. Ewert, A. Herb, D. B. Pritchett, A. Bach, B. D. Shivers and P. H. Seeburg (1989). "The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing." *EMBO J* **8**(13): 4025-34.
- Dalva, M. B., A. C. McClelland and M. S. Kayser (2007). "Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse." *Nat Rev Neurosci* **8**(3): 206-20.
- Das, R., J. Yu, Z. Zhang, M. P. Gygi, A. R. Krainer, S. P. Gygi and R. Reed (2007). "SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing." *Mol Cell* **26**(6): 867-81.
- Davis, G. W., C. M. Schuster and C. S. Goodman (1996). "Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity." *Neuron* **17**(4): 669-79.
- de la Cruz, X., S. Lois, S. Sanchez-Molina and M. A. Martinez-Balbas (2005). "Do protein motifs read the histone code?" *Bioessays* **27**(2): 164-75.
- de la Mata, M., C. R. Alonso, S. Kadener, J. P. Fededa, M. Blaustein, F. Pelisch, P. Cramer, D. Bentley and A. R. Kornblihtt (2003). "A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo." *Mol Cell* **12**(2): 525-32.
- de la Mata, M. and A. R. Kornblihtt (2006). "RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20." *Nat Struct Mol Biol* **13**(11): 973-80.
- Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal and M. M. Zhou (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." *Nature* **399**(6735): 491-6.
- Doherty, P., M. Fruns, P. Seaton, G. Dickson, C. H. Barton, T. A. Sears and F. S. Walsh (1990). "A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth." *Nature* **343**(6257): 464-6.
- Doherty, P., G. Rimon, D. A. Mann and F. S. Walsh (1992). "Alternative splicing of the cytoplasmic domain of neural cell adhesion molecule alters its ability to act as a substrate for neurite outgrowth." *J Neurochem* **58**(6): 2338-41.
- Dorigo, B., T. Schalch, K. Bystricky and T. J. Richmond (2003). "Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail." *J Mol Biol* **327**(1): 85-96.
- Dover, J., J. Schneider, M. A. Tawiah-Boateng, A. Wood, K. Dean, M. Johnston and A. Shilatifard (2002). "Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6." *J Biol Chem* **277**(32): 28368-71.
- Doyle, E., P. M. Nolan, R. Bell and C. M. Regan (1992). "Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat." *J Neurochem* **59**(4): 1570-3.
- Dye, M. J., N. Gromak and N. J. Proudfoot (2006). "Exon tethering in transcription by RNA polymerase II." *Mol Cell* **21**(6): 849-59.
- Eckhardt, M., O. Bukalo, G. Chazal, L. Wang, C. Goriadis, M. Schachner, R. Gerardy-Schahn, H. Cremer and A. Dityatev (2000). "Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity." *J Neurosci* **20**(14): 5234-44.
- Edmunds, J. W., L. C. Mahadevan and A. L. Clayton (2008). "Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation." *EMBO J* **27**(2): 406-20.

- Endo, A., N. Nagai, T. Urano, Y. Takada, K. Hashimoto and A. Takada (1999). "Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus." *Neurosci Res* **33**(1): 1-8.
- Eperon, L. P., I. R. Graham, A. D. Griffiths and I. C. Eperon (1988). "Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase?" *Cell* **54**(3): 393-401.
- Ermakova, E. O., R. N. Nurtdinov and M. S. Gelfand (2006). "Fast rate of evolution in alternatively spliced coding regions of mammalian genes." *BMC Genomics* **7**: 84.
- Fagnani, M., Y. Barash, J. Y. Ip, C. Misquitta, Q. Pan, A. L. Saltzman, O. Shai, L. Lee, A. Rozenhek, N. Mohammad, S. Willaime-Morawek, T. Babak, W. Zhang, T. R. Hughes, D. van der Kooy, B. J. Frey and B. J. Blencowe (2007). "Functional coordination of alternative splicing in the mammalian central nervous system." *Genome Biol* **8**(6): R108.
- Fededa, J. P., E. Petrillo, M. S. Gelfand, A. D. Neverov, S. Kadener, G. Nogues, F. Pelisch, F. E. Baralle, A. F. Muro and A. R. Kornblihtt (2005). "A polar mechanism coordinates different regions of alternative splicing within a single gene." *Mol Cell* **19**(3): 393-404.
- Ferreira, H., A. Flaus and T. Owen-Hughes (2007). "Histone modifications influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms." *J Mol Biol* **374**(3): 563-79.
- Fields, R. D. and K. Itoh (1996). "Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity." *Trends Neurosci* **19**(11): 473-80.
- Finne, J., U. Finne, H. Deagostini-Bazin and C. Goridis (1983). "Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule." *Biochem Biophys Res Commun* **112**(2): 482-7.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, X. Wang, M. Dobbin and L. H. Tsai (2007). "Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling." *Nature* **447**(7141): 178-82.
- Fish, R. N. and C. M. Kane (2002). "Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors." *Biochim Biophys Acta* **1577**(2): 287-307.
- Flaus, A. and T. Owen-Hughes (2001). "Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling." *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 148-54.
- Fu, X. D. (1995). "The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors." *RNA* **1**(7): 663-80.
- Furger, A., J. M. O'Sullivan, A. Binnie, B. A. Lee and N. J. Proudfoot (2002). "Promoter proximal splice sites enhance transcription." *Genes Dev* **16**(21): 2792-9.
- Fux, C. M., M. Krug, A. Dityatev, T. Schuster and M. Schachner (2003). "NCAM180 and glutamate receptor subtypes in potentiated spine synapses: an immunogold electron microscopic study." *Mol Cell Neurosci* **24**(4): 939-50.
- Gallinaro, H., P. Vincendon, A. Sittler and M. Jacob (1988). "Alternative use of a polyadenylation signal and of a downstream 3' splice site. Effect of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole." *J Mol Biol* **204**(4): 1031-40.
- Gautheret, D., O. Poirot, F. Lopez, S. Audic and J. M. Claverie (1998). "Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering." *Genome Res* **8**(5): 524-30.
- Goldstrohm, A. C., A. L. Greenleaf and M. A. Garcia-Blanco (2001). "Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing." *Gene* **277**(1-2): 31-47.
- Goll, M. G. and T. H. Bestor (2005). "Eukaryotic cytosine methyltransferases." *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514.
- Gordon, F., K. Luger and J. C. Hansen (2005). "The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays." *J Biol Chem* **280**(40): 33701-6.
- Gornemann, J., K. M. Kotovic, K. Hujer and K. M. Neugebauer (2005). "Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex." *Mol Cell* **19**(1): 53-63.

- 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). "Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures." *Cell* **123**(1): 65-73.
- Gromak, N., G. Talotti, N. J. Proudfoot and F. Pagani (2008). "Modulating alternative splicing by cotranscriptional cleavage of nascent intronic RNA." *RNA* **14**(2): 359-66.
- Gu, W. and D. Reines (1995). "Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II." *J Biol Chem* **270**(19): 11238-44.
- Guillouf, C., I. Gallais and F. Moreau-Gachelin (2006). "Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner." *J Biol Chem* **281**(28): 19145-55.
- Hahn, S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery." *Nat Struct Mol Biol* **11**(5): 394-403.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Hansen, J. C. and A. P. Wolffe (1992). "Influence of chromatin folding on transcription initiation and elongation by RNA polymerase III." *Biochemistry* **31**(34): 7977-88.
- Hartz, B. P. and L. C. Ronn (2008). "NCAM in Long-Term Potentiation and Learning." *Neurochem Res*.
- Hartzog, G. A., J. L. Speer and D. L. Lindstrom (2002). "Transcript elongation on a nucleoprotein template." *Biochim Biophys Acta* **1577**(2): 276-86.
- Hartzog, G. A., T. Wada, H. Handa and F. Winston (1998). "Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in Saccharomyces cerevisiae." *Genes Dev* **12**(3): 357-69.
- Hassan, A. H., P. Prochasson, K. E. Neely, S. C. Galasinski, M. Chandy, M. J. Carrozza and J. L. Workman (2002). "Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes." *Cell* **111**(3): 369-79.
- Hepp, R., J. L. Dupont, D. Aunis, K. Langley and N. J. Grant (2001). "NGF enhances depolarization effects on SNAP-25 expression: induction of SNAP-25b isoform." *Neuroreport* **12**(4): 673-7.
- Hicks, M. J., C. R. Yang, M. V. Kotlajich and K. J. Hertel (2006). "Linking splicing to Pol II transcription stabilizes pre-mRNAs and influences splicing patterns." *PLoS Biol* **4**(6): e147.
- Hildebrandt, H., C. Becker, M. Murau, R. Gerardy-Schahn and H. Rahmann (1998). "Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development." *J Neurochem* **71**(6): 2339-48.
- Hirose, Y., R. Tacke and J. L. Manley (1999). "Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing." *Genes Dev* **13**(10): 1234-9.
- Hirsch, M. R., L. Gaugler, H. Deagostini-Bazin, L. Bally-Cuif and C. Goridis (1990). "Identification of positive and negative regulatory elements governing cell-type-specific expression of the neural cell adhesion molecule gene." *Mol Cell Biol* **10**(5): 1959-68.
- Hoffman, K. B., J. Larson, B. A. Bahr and G. Lynch (1998). "Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus." *Brain Res* **811**(1-2): 152-5.
- Hoffman, K. B., B. A. Murray, G. Lynch, S. Munirathinam and B. A. Bahr (2001). "Delayed and isoform-specific effect of NMDA exposure on neural cell adhesion molecules in hippocampus." *Neurosci Res* **39**(2): 167-73.
- Hoffman, S. and G. M. Edelman (1983). "Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(18): 5762-6.
- House, A. E. and K. W. Lynch (2008). "Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs." *J Biol Chem* **283**(3): 1217-21.

- Howe, K. J., C. M. Kane and M. Ares, Jr. (2003). "Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*." *RNA* **9**(8): 993-1006.
- Hsieh, J. and F. H. Gage (2004). "Epigenetic control of neural stem cell fate." *Curr Opin Genet Dev* **14**(5): 461-9.
- Huang, C. S., S. H. Shi, J. Ule, M. Ruggiu, L. A. Barker, R. B. Darnell, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2005). "Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition." *Cell* **123**(1): 105-18.
- Hughes, M. E., R. Bortnick, A. Tsubouchi, P. Baumer, M. Kondo, T. Uemura and D. Schmucker (2007). "Homophilic Dscam interactions control complex dendrite morphogenesis." *Neuron* **54**(3): 417-27.
- Impey, S., A. L. Fong, Y. Wang, J. R. Cardinaux, D. M. Fass, K. Obrietan, G. A. Wayman, D. R. Storm, T. R. Soderling and R. H. Goodman (2002). "Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV." *Neuron* **34**(2): 235-44.
- Ito, T., T. Ikehara, T. Nakagawa, W. L. Kraus and M. Muramatsu (2000). "p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone." *Genes Dev* **14**(15): 1899-907.
- Izban, M. G. and D. S. Luse (1991). "Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing." *Genes Dev* **5**(4): 683-96.
- Jacquet, S., D. Ropers, P. S. Bilodeau, L. Damier, A. Mougin, C. M. Stoltzfus and C. Branlant (2001). "Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing." *Nucleic Acids Res* **29**(2): 464-78.
- Jiang, Y. and J. D. Gralla (1993). "Uncoupling of initiation and reinitiation rates during HeLa RNA polymerase II transcription in vitro." *Mol Cell Biol* **13**(8): 4572-7.
- Jiang, Y., B. Langley, F. D. Lubin, W. Renthal, M. A. Wood, D. H. Yasui, A. Kumar, E. J. Nestler, S. Akbarian and A. C. Beckel-Mitchener (2008). "Epigenetics in the nervous system." *J Neurosci* **28**(46): 11753-9.
- Johnson, J. M., J. Castle, P. Garrett-Engele, Z. Kan, P. M. Loerch, C. D. Armour, R. Santos, E. E. Schadt, R. Stoughton and D. D. Shoemaker (2003). "Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays." *Science* **302**(5653): 2141-4.
- Joshi, A. A. and K. Struhl (2005). "Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation." *Mol Cell* **20**(6): 971-8.
- Jumaa, H. and P. J. Nielsen (1997). "The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation." *EMBO J* **16**(16): 5077-85.
- Kadener, S., P. Cramer, G. Nogues, D. Cazalla, M. de la Mata, J. P. Fededa, S. E. Werbajh, A. Srebrow and 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 and 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.
- Kang, M. E. and M. E. Dahmus (1993). "RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter." *J Biol Chem* **268**(33): 25033-40.
- Kangaspeska, S., B. Stride, R. Metivier, M. Polycarpou-Schwarz, D. Ibberson, R. P. Carmouche, V. Benes, F. Gannon and G. Reid (2008). "Transient cyclical methylation of promoter DNA." *Nature* **452**(7183): 112-5.
- Kao, C. F., C. Hillyer, T. Tsukuda, K. Henry, S. Berger and M. A. Osley (2004). "Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B." *Genes Dev* **18**(2): 184-95.

- Kaplan, C. D., L. Laprade and F. Winston (2003). "Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites." *Science* **301**(5636): 1096-9.
- Kasten, M., H. Szerlong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Werner and B. R. Cairns (2004). "Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14." *EMBO J* **23**(6): 1348-59.
- Keogh, M. C., S. K. Kurdistani, S. A. Morris, S. H. Ahn, V. Podolny, S. R. Collins, M. Schuldiner, K. Chin, T. Punna, N. J. Thompson, C. Boone, A. Emili, J. S. Weissman, T. R. Hughes, B. D. Strahl, M. Grunstein, J. F. Greenblatt, S. Buratowski and N. J. Krogan (2005). "Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex." *Cell* **123**(4): 593-605.
- Khorasanizadeh, S. (2004). "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation." *Cell* **116**(2): 259-72.
- Kim, D. H., L. M. Villeneuve, K. V. Morris and J. J. Rossi (2006). "Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells." *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 793-7.
- Kim, J. H., W. S. Lane and D. Reinberg (2002). "Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1241-6.
- Kireeva, M. L., W. Walter, V. Tchernajenko, V. Bondarenko, M. Kashlev and V. M. Studitsky (2002). "Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription." *Mol Cell* **9**(3): 541-52.
- Kolasinska-Zwierz, P., T. Down, I. Latorre, T. Liu, X. S. Liu and J. Ahringer (2009). "Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3." *Nat Genet* **41**(3): 376-81.
- Kolkova, K. (2008). "Biosynthesis of NCAM." *Neurochem Res*.
- Koren, E., G. Lev-Maor and G. Ast (2007). "The emergence of alternative 3' and 5' splice site exons from constitutive exons." *PLoS Comput Biol* **3**(5): e95.
- Kornblihtt, A. R. (2007). "Coupling transcription and alternative splicing." *Adv Exp Med Biol* **623**: 175-89.
- Kornblihtt, A. R., M. de la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz and G. Nogues (2004). "Multiple links between transcription and splicing." *Rna* **10**(10): 1489-98.
- Korzus, E., M. G. Rosenfeld and M. Mayford (2004). "CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation." *Neuron* **42**(6): 961-72.
- Kotovic, K. M., D. Lockshon, L. Boric and K. M. Neugebauer (2003). "Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5768-79.
- Kravchenko, J. E., I. B. Rogozin, E. V. Koonin and P. M. Chumakov (2005). "Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin." *Nature* **436**(7051): 735-9.
- Krebs, J. E., M. H. Kuo, C. D. Allis and C. L. Peterson (1999). "Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene." *Genes Dev* **13**(11): 1412-21.
- Krecic, A. M. and M. S. Swanson (1999). "hnRNP complexes: composition, structure, and function." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 363-71.
- Kristjuhan, A. and J. Q. Svejstrup (2004). "Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo." *EMBO J* **23**(21): 4243-52.
- Krogan, N. J., M. Kim, A. Tong, A. Golshani, G. Cagney, V. Canadien, D. P. Richards, B. K. Beattie, A. Emili, C. Boone, A. Shilatifard, S. Buratowski and J. Greenblatt (2003). "Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **23**(12): 4207-18.
- Kumar, A., K. H. Choi, W. Renthal, N. M. Tsankova, D. E. Theobald, H. T. Truong, S. J. Russo, Q. Laplant, T. S. Sasaki, K. N. Whistler, R. L. Neve, D. W. Self and E. J. Nestler (2005). "Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum." *Neuron* **48**(2): 303-14.

- Kurdistani, S. K., S. Tavazoie and M. Grunstein (2004). "Mapping global histone acetylation patterns to gene expression." *Cell* **117**(6): 721-33.
- Lacadie, S. A. and M. Rosbash (2005). "Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast." *Mol Cell* **19**(1): 65-75.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler and T. Jenuwein (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* **410**(6824): 116-20.
- Lai, M. C., B. H. Teh and W. Y. Tarn (1999). "A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing." *J Biol Chem* **274**(17): 11832-41.
- Lazarev, D. and J. L. Manley (2007). "Concurrent splicing and transcription are not sufficient to enhance splicing efficiency." *RNA* **13**(9): 1546-57.
- Lee, C. J. and K. Irizarry (2003). "Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation." *Biol Psychiatry* **54**(8): 771-6.
- Lee, J. A., Y. Xing, D. Nguyen, J. Xie, C. J. Lee and D. L. Black (2007). "Depolarization and CaM kinase IV modulate NMDA receptor splicing through two essential RNA elements." *PLoS Biol* **5**(2): e40.
- Lemaire, R., J. Prasad, T. Kashima, J. Gustafson, J. L. Manley and 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.
- Lenasi, T., B. M. Peterlin and P. Dovc (2006). "Distal regulation of alternative splicing by splicing enhancer in equine beta-casein intron 1." *RNA* **12**(3): 498-507.
- Leshchyn'ska, I., V. Sytnyk, J. S. Morrow and M. Schachner (2003). "Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via beta1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth." *J Cell Biol* **161**(3): 625-39.
- Levenson, J. M., K. J. O'Riordan, K. D. Brown, M. A. Trinh, D. L. Molfese and J. D. Sweatt (2004). "Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus." *J Biol Chem* **279**(39): 40545-59.
- Levenson, J. M. and J. D. Sweatt (2005). "Epigenetic mechanisms in memory formation." *Nat Rev Neurosci* **6**(2): 108-18.
- Levine, A. A., Z. Guan, A. Barco, S. Xu, E. R. Kandel and J. H. Schwartz (2005). "CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(52): 19186-91.
- Li, B., M. Carey and J. L. Workman (2007a). "The role of chromatin during transcription." *Cell* **128**(4): 707-19.
- Li, B., L. Howe, S. Anderson, J. R. Yates, 3rd and J. L. Workman (2003). "The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II." *J Biol Chem* **278**(11): 8897-903.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." *Nat Rev Genet* **3**(9): 662-73.
- Li, Q., J. A. Lee and D. L. Black (2007b). "Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing." *Nat Rev Neurosci* **8**(11): 819-31.
- Licatalosi, D. D. and R. B. Darnell (2006). "Splicing regulation in neurologic disease." *Neuron* **52**(1): 93-101.
- Licatalosi, D. D., A. Mele, J. J. Fak, J. Ule, M. Kayikci, S. W. Chi, T. A. Clark, A. C. Schweitzer, J. E. Blume, X. Wang, J. C. Darnell and R. B. Darnell (2008). "HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing." *Nature* **456**(7221): 464-9.
- Lin, I. G., T. J. Tomzynski, Q. Ou and C. L. Hsieh (2000). "Modulation of DNA binding protein affinity directly affects target site demethylation." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2343-9.
- Lin, S., G. Coutinho-Mansfield, D. Wang, S. Pandit and X. D. Fu (2008). "The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation." *Nat Struct Mol Biol* **15**(8): 819-26.
- Linseman, D. A., C. M. Bartley, S. S. Le, T. A. Laessig, R. J. Bouchard, M. K. Meintzer, M. Li and K. A. Heidenreich (2003). "Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor

- histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival." *J Biol Chem* **278**(42): 41472-81.
- Listerman, I., A. K. Sapa and K. M. Neugebauer (2006). "Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells." *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 815-22.
- Liu, S. J. and L. K. Kaczmarek (1998). "The expression of two splice variants of the Kv3.1 potassium channel gene is regulated by different signaling pathways." *J Neurosci* **18**(8): 2881-90.
- Lorincz, M. C., D. R. Dickerson, M. Schmitt and M. Groudine (2004). "Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1068-75.
- Lubin, F. D. and J. D. Sweatt (2007). "The IkkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories." *Neuron* **55**(6): 942-57.
- Lundblad, J. R., R. P. Kwok, M. E. Lurance, M. L. Harter and R. H. Goodman (1995). "Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP." *Nature* **374**(6517): 85-8.
- Luthi, A., J. P. Laurent, A. Figurov, D. Muller and M. Schachner (1994). "Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM." *Nature* **372**(6508): 777-9.
- Lynch, K. W. (2007). "Regulation of alternative splicing by signal transduction pathways." *Adv Exp Med Biol* **623**: 161-74.
- Mancebo, H. S., G. Lee, J. Flygare, J. Tomassini, P. Luu, Y. Zhu, J. Peng, C. Blau, D. Hazuda, D. Price and O. Flores (1997). "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro." *Genes Dev* **11**(20): 2633-44.
- Maniatis, T. and R. Reed (2002). "An extensive network of coupling among gene expression machines." *Nature* **416**(6880): 499-506.
- Maniatis, T. and B. Tasic (2002). "Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans." *Nature* **418**(6894): 236-43.
- Marin-Husstege, M., M. Muggironi, A. Liu and P. Casaccia-Bonnet (2002). "Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression." *J Neurosci* **22**(23): 10333-45.
- Marshall, N. F., J. Peng, Z. Xie and D. H. Price (1996). "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase." *J Biol Chem* **271**(43): 27176-83.
- Martin, C. and Y. Zhang (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-49.
- Martin, K. C. and E. R. Kandel (1996). "Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections." *Neuron* **17**(4): 567-70.
- Mason, P. B. and K. Struhl (2005). "Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo." *Mol Cell* **17**(6): 831-40.
- Matthews, B. J., M. E. Kim, J. J. Flanagan, D. Hattori, J. C. Clemens, S. L. Zipursky and W. B. Grueber (2007). "Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam." *Cell* **129**(3): 593-604.
- Mayeda, A. and A. R. Krainer (1992). "Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2." *Cell* **68**(2): 365-75.
- Mayford, M., A. Barzilai, F. Keller, S. Schacher and E. R. Kandel (1992). "Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in Aplysia." *Science* **256**(5057): 638-44.
- McCracken, S., N. Fong, K. Yankulov, S. Ballantyne, G. Pan, J. Greenblatt, S. D. Patterson, M. Wickens and D. L. Bentley (1997). "The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription." *Nature* **385**(6614): 357-61.
- Mehler, M. F. (2008). "Epigenetics and the nervous system." *Ann Neurol* **64**(6): 602-17.

- Meininghaus, M., R. D. Chapman, M. Horndasch and D. Eick (2000). "Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription." *J Biol Chem* **275**(32): 24375-82.
- Melcher, M., M. Schmid, L. Aagaard, P. Selenko, G. Laible and T. Jenuwein (2000). "Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression." *Mol Cell Biol* **20**(10): 3728-41.
- Metivier, R., R. Gallais, C. Tiffoche, C. Le Peron, R. Z. Jurkowska, R. P. Carmouche, D. Ibberson, P. Barath, F. Demay, G. Reid, V. Benes, A. Jeltsch, F. Gannon and G. Salbert (2008). "Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter." *Nature* **452**(7183): 45-50.
- Miller, C. A., S. L. Campbell and J. D. Sweatt (2008). "DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity." *Neurobiol Learn Mem* **89**(4): 599-603.
- Misteli, T. and D. L. Spector (1999). "RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo." *Mol Cell* **3**(6): 697-705.
- Modrek, B., A. Resch, C. Grasso and C. Lee (2001). "Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes." *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2850-9.
- Monsalve, M., Z. Wu, G. Adelmant, P. Puigserver, M. Fan and B. M. Spiegelman (2000). "Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1." *Mol Cell* **6**(2): 307-16.
- Moretti, P., J. M. Levenson, F. Battaglia, R. Atkinson, R. Teague, B. Antalffy, D. Armstrong, O. Arancio, J. D. Sweatt and H. Y. Zoghbi (2006). "Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome." *J Neurosci* **26**(1): 319-27.
- Morillon, A., N. Karabetsou, J. O'Sullivan, N. Kent, N. Proudfoot and J. Mellor (2003). "Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II." *Cell* **115**(4): 425-35.
- Mu, Y., T. Otsuka, A. C. Horton, D. B. Scott and M. D. Ehlers (2003). "Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors." *Neuron* **40**(3): 581-94.
- Murray, B. A., G. C. Owens, E. A. Prediger, K. L. Crossin, B. A. Cunningham and G. M. Edelman (1986). "Cell surface modulation of the neural cell adhesion molecule resulting from alternative mRNA splicing in a tissue-specific developmental sequence." *J Cell Biol* **103**(4): 1431-9.
- Nan, X., F. J. Campoy and A. Bird (1997). "MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin." *Cell* **88**(4): 471-81.
- Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman and A. Bird (1998). "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." *Nature* **393**(6683): 386-9.
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan and R. E. Kingston (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." *Cell* **108**(4): 475-87.
- Navaratnam, D. S., T. J. Bell, T. D. Tu, E. L. Cohen and J. C. Oberholtzer (1997). "Differential distribution of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea." *Neuron* **19**(5): 1077-85.
- Neugebauer, K. M. (2002). "On the importance of being co-transcriptional." *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3865-71.
- Nguyen, V. T., F. Giannoni, M. F. Dubois, S. J. Seo, M. Vigneron, C. Kedinger and O. Bensaude (1996). "In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin." *Nucleic Acids Res* **24**(15): 2924-9.
- Nogues, G., S. Kadener, P. Cramer, D. Bentley and 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 and A. R. Kornblihtt (2003a). "Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better." *IUBMB Life* **55**(4-5): 235-41.
- Nogues, G., M. J. Munoz and A. R. Kornblihtt (2003b). "Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength." *J Biol Chem* **278**(52): 52166-71.
- Nott, A., P. M. Watson, J. D. Robinson, L. Crepaldi and A. Riccio (2008). "S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons." *Nature* **455**(7211): 411-5.
- Oliveira, A. M., M. A. Wood, C. B. McDonough and T. Abel (2007). "Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits." *Learn Mem* **14**(9): 564-72.
- Olsen, S. K., J. Y. Li, C. Bromleigh, A. V. Eliseenkova, O. A. Ibrahimi, Z. Lao, F. Zhang, R. J. Linhardt, A. L. Joyner and M. Mohammadi (2006). "Structural basis by which alternative splicing modulates the organizer activity of FGF8 in the brain." *Genes Dev* **20**(2): 185-98.
- Ooi, S. K. and T. H. Bestor (2008). "The colorful history of active DNA demethylation." *Cell* **133**(7): 1145-8.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse and D. Reinberg (1998). "FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes." *Cell* **92**(1): 105-16.
- Orphanides, G. and D. Reinberg (2000). "RNA polymerase II elongation through chromatin." *Nature* **407**(6803): 471-5.
- Otero, G., J. Fellows, Y. Li, T. de Bizemont, A. M. Dirac, C. M. Gustafsson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and J. Q. Svejstrup (1999). "Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation." *Mol Cell* **3**(1): 109-18.
- Pagani, F., C. Stuani, E. Zuccato, A. R. Kornblihtt and F. E. Baralle (2003). "Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping." *J Biol Chem* **278**(3): 1511-7.
- Pal, M. and D. S. Luse (2003). "The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5700-5.
- Pelisch, F., M. Blaustein, A. R. Kornblihtt and A. Srebrow (2005). "Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: a novel role for JNK." *J Biol Chem* **280**(27): 25461-9.
- Peng, J., Y. Zhu, J. T. Milton and D. H. Price (1998). "Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb." *Genes Dev* **12**(5): 755-62.
- Persohn, E. and M. Schachner (1990). "Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse." *J Neurocytol* **19**(6): 807-19.
- Peters, A. H., S. Kubicek, K. Mechtler, R. J. O'Sullivan, A. A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J. H. Martens and T. Jenuwein (2003). "Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin." *Mol Cell* **12**(6): 1577-89.
- Peterson, C. L. (2002). "HDAC's at work: everyone doing their part." *Mol Cell* **9**(5): 921-2.
- Petrij, F., R. H. Giles, H. G. Dauwerse, J. J. Saris, R. C. Hennekam, M. Masuno, N. Tommerup, G. J. van Ommen, R. H. Goodman, D. J. Peters and et al. (1995). "Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP." *Nature* **376**(6538): 348-51.
- Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf (2006). "Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD." *Genes Dev* **20**(21): 2922-36.
- Polo-Parada, L., C. M. Bose, F. Plattner and L. T. Landmesser (2004). "Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice." *J Neurosci* **24**(8): 1852-64.

- Pollerberg, E. G., R. Sadoul, C. Goridis and M. Schachner (1985). "Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development." *J Cell Biol* **101**(5 Pt 1): 1921-9.
- Pollerberg, G. E., K. Burrige, K. E. Krebs, S. R. Goodman and M. Schachner (1987). "The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions." *Cell Tissue Res* **250**(1): 227-36.
- Pollerberg, G. E., M. Schachner and J. Davoust (1986). "Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule." *Nature* **324**(6096): 462-5.
- Pray-Grant, M. G., J. A. Daniel, D. Schieltz, J. R. Yates, 3rd and P. A. Grant (2005). "Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation." *Nature* **433**(7024): 434-8.
- Price, D. H. (2000). "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2629-34.
- Protacio, R. U., G. Li, P. T. Lowary and J. Widom (2000). "Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome." *Mol Cell Biol* **20**(23): 8866-78.
- Proudfoot, N. J., A. Furger and M. J. Dye (2002). "Integrating mRNA processing with transcription." *Cell* **108**(4): 501-12.
- Quelle, D. E., F. Zindy, R. A. Ashmun and C. J. Sherr (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." *Cell* **83**(6): 993-1000.
- Rafuse, V. F. and L. Landmesser (1996). "Contractile activity regulates isoform expression and polysialylation of NCAM in cultured myotubes: involvement of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C." *J Cell Biol* **132**(5): 969-83.
- Ramsahoye, B. H., D. Binizkiewicz, F. Lyko, V. Clark, A. P. Bird and R. Jaenisch (2000). "Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5237-42.
- Ranum, L. P. and T. A. Cooper (2006). "RNA-mediated neuromuscular disorders." *Annu Rev Neurosci* **29**: 259-77.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis and T. Jenuwein (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." *Nature* **406**(6796): 593-9.
- Reed, R. and H. Cheng (2005). "TREX, SR proteins and export of mRNA." *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 269-73.
- Renner, D. B., Y. Yamaguchi, T. Wada, H. Handa and D. H. Price (2001). "A highly purified RNA polymerase II elongation control system." *J Biol Chem* **276**(45): 42601-9.
- Renthal, W., T. L. Carle, I. Maze, H. E. Covington, 3rd, H. T. Truong, I. Alibhai, A. Kumar, R. L. Montgomery, E. N. Olson and E. J. Nestler (2008). "Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure." *J Neurosci* **28**(29): 7344-9.
- Renthal, W., I. Maze, V. Krishnan, H. E. Covington, 3rd, G. Xiao, A. Kumar, S. J. Russo, A. Graham, N. Tsankova, T. E. Kippin, K. A. Kerstetter, R. L. Neve, S. J. Haggarty, T. A. McKinsey, R. Bassel-Duby, E. N. Olson and E. J. Nestler (2007). "Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli." *Neuron* **56**(3): 517-29.
- Reyes, A. A., S. J. Small and R. Akeson (1991). "At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development." *Mol Cell Biol* **11**(3): 1654-61.
- Rice, J. C., S. D. Briggs, B. Ueberheide, C. M. Barber, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, Y. Shinkai and C. D. Allis (2003). "Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains." *Mol Cell* **12**(6): 1591-8.

- Roberts, G. C., C. Gooding, H. Y. Mak, N. J. Proudfoot and C. W. Smith (1998). "Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection." *Nucleic Acids Res* **26**(24): 5568-72.
- Robson-Dixon, N. D. and M. A. Garcia-Blanco (2004). "MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb." *J Biol Chem* **279**(28): 29075-84.
- Roby, D., Y. Suka, I. Xenarios, S. K. Kurdistani, A. Wang, N. Suka and M. Grunstein (2002). "Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases." *Cell* **109**(4): 437-46.
- Romano, M., R. Marcucci and F. E. Baralle (2001). "Splicing of constitutive upstream introns is essential for the recognition of intra-exonic suboptimal splice sites in the thrombopoietin gene." *Nucleic Acids Res* **29**(4): 886-94.
- Rondon, A. G., M. Garcia-Rubio, S. Gonzalez-Barrera and A. Aguilera (2003). "Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation." *EMBO J* **22**(3): 612-20.
- Ronn, L. C., V. Berezin and E. Bock (2000). "The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing." *Int J Dev Neurosci* **18**(2-3): 193-9.
- Ronn, L. C., E. Bock, D. Linnemann and H. Jahnsen (1995). "NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1." *Brain Res* **677**(1): 145-51.
- Rosonina, E., M. A. Bakowski, S. McCracken and B. J. Blencowe (2003). "Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels." *J Biol Chem* **278**(44): 43034-40.
- Rozic-Kotliroff, G. and N. Zisapel (2007). "Ca<sup>2+</sup> -dependent splicing of neurexin IIalpha." *Biochem Biophys Res Commun* **352**(1): 226-30.
- Ruby, S. W. and J. Abelson (1991). "Pre-mRNA splicing in yeast." *Trends Genet* **7**(3): 79-85.
- Sandi, C., S. P. Rose, R. Mileusnic and C. Lancashire (1995). "Corticosterone facilitates long-term memory formation via enhanced glycoprotein synthesis." *Neuroscience* **69**(4): 1087-93.
- Sandi, C., J. C. Woodson, V. F. Haynes, C. R. Park, K. Touyarot, M. A. Lopez-Fernandez, C. Venero and D. M. Diamond (2005). "Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex." *Biol Psychiatry* **57**(8): 856-64.
- Sanford, J. R., N. K. Gray, K. Beckmann and J. F. Caceres (2004). "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation." *Genes Dev* **18**(7): 755-68.
- Sathyanarayana, U. G., L. A. Freeman, M. S. Lee and W. T. Garrard (1999). "RNA polymerase-specific nucleosome disruption by transcription in vivo." *J Biol Chem* **274**(23): 16431-6.
- Saunders, A., L. J. Core and J. T. Lis (2006). "Breaking barriers to transcription elongation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 557-67.
- Schacher, S., F. Wu, Z. Y. Sun and D. Wang (2000). "Cell-specific changes in expression of mRNAs encoding splice variants of alysia cell adhesion molecule accompany long-term synaptic plasticity." *J Neurobiol* **45**(3): 152-61.
- Schmid, R. S., R. D. Graff, M. D. Schaller, S. Chen, M. Schachner, J. J. Hemperly and P. F. Maness (1999). "NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells." *J Neurobiol* **38**(4): 542-58.
- Schmucker, D., J. C. Clemens, H. Shu, C. A. Worby, J. Xiao, M. Muda, J. E. Dixon and S. L. Zipursky (2000). "Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity." *Cell* **101**(6): 671-84.
- Schuster, C. M., G. W. Davis, R. D. Fetter and C. S. Goodman (1996a). "Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth." *Neuron* **17**(4): 641-54.
- Schuster, C. M., G. W. Davis, R. D. Fetter and C. S. Goodman (1996b). "Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity." *Neuron* **17**(4): 655-67.

- Schuster, T., M. Krug, H. Hassan and M. Schachner (1998). "Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation." *J Neurobiol* **37**(3): 359-72.
- Sgambato, V., R. Minassian, A. C. Nairn and S. E. Hyman (2003). "Regulation of ania-6 splice variants by distinct signaling pathways in striatal neurons." *J Neurochem* **86**(1): 153-64.
- Shahbazian, M. D. and M. Grunstein (2007). "Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation." *Annu Rev Biochem* **76**: 75-100.
- Sharma, M., A. A. George, B. N. Singh, N. C. Sahoo and K. V. Rao (2007). "Regulation of transcript elongation through cooperative and ordered recruitment of cofactors." *J Biol Chem* **282**(29): 20887-96.
- Shilatifard, A., W. S. Lane, K. W. Jackson, R. C. Conaway and J. W. Conaway (1996). "An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene." *Science* **271**(5257): 1873-6.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie and C. L. Peterson (2006). "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." *Science* **311**(5762): 844-7.
- Sims, R. J., 3rd, R. Belotserkovskaya and D. Reinberg (2004). "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." *Genes Dev* **18**(20): 2437-68.
- Sims, R. J., 3rd, S. Millhouse, C. F. Chen, B. A. Lewis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. L. Manley and D. Reinberg (2007). "Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing." *Mol Cell* **28**(4): 665-76.
- Sjolinder, M., P. Bjork, E. Soderberg, N. Sabri, A. K. Farrants and N. Visa (2005). "The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes." *Genes Dev* **19**(16): 1871-84.
- Skalnikova, H., P. Halada, P. Vodicka, J. Motlik, P. Rehulka, O. Horning, J. Chmelik, O. Norregaard Jensen and H. Kovarova (2007). "A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells." *Proteomics* **7**(11): 1825-38.
- Smith, C. W. and J. Valcarcel (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." *Trends Biochem Sci* **25**(8): 381-8.
- Soba, P., S. Zhu, K. Emoto, S. Younger, S. J. Yang, H. H. Yu, T. Lee, L. Y. Jan and Y. N. Jan (2007). "Drosophila sensory neurons require Dscam for dendritic self-avoidance and proper dendritic field organization." *Neuron* **54**(3): 403-16.
- Sorek, R. and G. Ast (2003). "Intronic sequences flanking alternatively spliced exons are conserved between human and mouse." *Genome Res* **13**(7): 1631-7.
- Sorensen, J. B., G. Nagy, F. Varoqueaux, R. B. Nehring, N. Brose, M. C. Wilson and E. Neher (2003). "Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23." *Cell* **114**(1): 75-86.
- Srebrow, A. and A. R. Kornblihtt (2006). "The connection between splicing and cancer." *J Cell Sci* **119**(Pt 13): 2635-41.
- Staley, J. P. and C. Guthrie (1998). "Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things." *Cell* **92**(3): 315-26.
- Studitsky, V. M., D. J. Clark and G. Felsenfeld (1994). "A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template." *Cell* **76**(2): 371-82.
- Studitsky, V. M., D. J. Clark and G. Felsenfeld (1995). "Overcoming a nucleosomal barrier to transcription." *Cell* **83**(1): 19-27.
- Studitsky, V. M., G. A. Kassavetis, E. P. Geiduschek and G. Felsenfeld (1997). "Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase." *Science* **278**(5345): 1960-3.
- Sugnet, C. W., K. Srinivasan, T. A. Clark, G. O'Brien, M. S. Cline, H. Wang, A. Williams, D. Kulp, J. E. Blume, D. Haussler and M. Ares, Jr. (2006). "Unusual intron conservation near tissue-regulated exons found by splicing microarrays." *PLoS Comput Biol* **2**(1): e4.

- Sun, Z. W. and C. D. Allis (2002). "Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast." *Nature* **418**(6893): 104-8.
- Sytnyk, V., I. Leshchyns'ka, M. Delling, G. Dityateva, A. Dityatev and M. Schachner (2002). "Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts." *J Cell Biol* **159**(4): 649-61.
- Sytnyk, V., I. Leshchyns'ka, A. G. Nikonenko and M. Schachner (2006). "NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex." *J Cell Biol* **174**(7): 1071-85.
- Tacke, R. and C. Goridis (1991). "Alternative splicing in the neural cell adhesion molecule pre-mRNA: regulation of exon 18 skipping depends on the 5'-splice site." *Genes Dev* **5**(8): 1416-29.
- Tennyson, C. N., H. J. Klamut and R. G. Worton (1995). "The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced." *Nat Genet* **9**(2): 184-90.
- Theis, M., K. Si and E. R. Kandel (2003). "Two previously undescribed members of the mouse CPEB family of genes and their inducible expression in the principal cell layers of the hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9602-7.
- Thiery, J. P., R. Brackenbury, U. Rutishauser and G. M. Edelman (1977). "Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina." *J Biol Chem* **252**(19): 6841-5.
- Thompson, N. E., T. H. Steinberg, D. B. Aronson and R. R. Burgess (1989). "Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II." *J Biol Chem* **264**(19): 11511-20.
- Tomasiewicz, H., K. Ono, D. Yee, C. Thompson, C. Goridis, U. Rutishauser and T. Magnuson (1993). "Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system." *Neuron* **11**(6): 1163-74.
- Touyarot, K., C. Venero and C. Sandi (2004). "Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates." *Psychoneuroendocrinology* **29**(2): 290-305.
- Tsankova, N. M., O. Berton, W. Renthal, A. Kumar, R. L. Neve and E. J. Nestler (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." *Nat Neurosci* **9**(4): 519-25.
- Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." *Cell* **111**(3): 285-91.
- Ule, J. and R. B. Darnell (2006). "RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity." *Curr Opin Neurobiol* **16**(1): 102-10.
- Ule, J., K. B. Jensen, M. Ruggiu, A. Mele, A. Ule and R. B. Darnell (2003). "CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain." *Science* **302**(5648): 1212-5.
- Ule, J., G. Stefani, A. Mele, M. Ruggiu, X. Wang, B. Taneri, T. Gaasterland, B. J. Blencowe and R. B. Darnell (2006). "An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation." *Nature* **444**(7119): 580-6.
- 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 and R. B. Darnell (2005). "Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse." *Nat Genet* **37**(8): 844-52.
- Umlauf, D., Y. Goto and R. Feil (2004). "Site-specific analysis of histone methylation and acetylation." *Methods Mol Biol* **287**: 99-120.
- Vakoc, C. R., S. A. Mandat, B. A. Olenchock and G. A. Blobel (2005). "Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin." *Mol Cell* **19**(3): 381-91.
- Vallano, M. L., C. M. Beaman-Hall and S. Benmansour (1999). "Ca<sup>2+</sup> and pH modulate alternative splicing of exon 5 in NMDA receptor subunit 1." *Neuroreport* **10**(17): 3659-64.

- Vanderklish, P., T. C. Saido, C. Gall, A. Arai and G. Lynch (1995). "Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices." *Brain Res Mol Brain Res* **32**(1): 25-35.
- Vecsey, C. G., J. D. Hawk, K. M. Lattal, J. M. Stein, S. A. Fabian, M. A. Attner, S. M. Cabrera, C. B. McDonough, P. K. Brindle, T. Abel and M. A. Wood (2007). "Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation." *J Neurosci* **27**(23): 6128-40.
- Venero, C., A. I. Herrero, K. Touyarot, K. Cambon, M. A. Lopez-Fernandez, V. Berezin, E. Bock and C. Sandi (2006). "Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory." *Eur J Neurosci* **23**(6): 1585-95.
- Vogelauer, M., J. Wu, N. Suka and M. Grunstein (2000). "Global histone acetylation and deacetylation in yeast." *Nature* **408**(6811): 495-8.
- Wada, T., T. Takagi, Y. Yamaguchi, A. Ferdous, T. Imai, S. Hirose, S. Sugimoto, K. Yano, G. A. Hartzog, F. Winston, S. Buratowski and H. Handa (1998). "DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs." *Genes Dev* **12**(3): 343-56.
- Wagner, E. J. and M. A. Garcia-Blanco (2001). "Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition." *Mol Cell Biol* **21**(10): 3281-8.
- Wasylyk, B. and P. Chambon (1979). "Transcription by eukaryotic RNA polymerases A and B of chromatin assembled in vitro." *Eur J Biochem* **98**(2): 317-27.
- Werbajh, S. E., A. J. Urtreger, L. I. Puricelli, E. S. de Lustig, E. Bal de Kier Joffe and A. R. Kornblihtt (1998). "Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells." *FEBS Lett* **440**(3): 277-81.
- West, S., N. Gromak and N. J. Proudfoot (2004). "Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites." *Nature* **432**(7016): 522-5.
- Winkler, G. S., A. Kristjuhan, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and J. Q. Svejstrup (2002). "Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3517-22.
- Wittschieben, B. O., G. Otero, T. de Bizemont, J. Fellows, H. Erdjument-Bromage, R. Ohba, Y. Li, C. D. Allis, P. Tempst and J. Q. Svejstrup (1999). "A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme." *Mol Cell* **4**(1): 123-8.
- Wojtowicz, W. M., J. J. Flanagan, S. S. Millard, S. L. Zipursky and J. C. Clemens (2004). "Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding." *Cell* **118**(5): 619-33.
- Workman, J. L. (2006). "Nucleosome displacement in transcription." *Genes Dev* **20**(15): 2009-17.
- Wu, G. Y., K. Deisseroth and R. W. Tsien (2001). "Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2808-13.
- Xiao, T., H. Hall, K. O. Kizer, Y. Shibata, M. C. Hall, C. H. Borchers and B. D. Strahl (2003). "Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast." *Genes Dev* **17**(5): 654-63.
- Xie, J. and D. L. Black (2001). "A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels." *Nature* **410**(6831): 936-9.
- Xie, J., C. Jan, P. Stoilov, J. Park and D. L. Black (2005). "A consensus CaMK IV-responsive RNA sequence mediates regulation of alternative exons in neurons." *RNA* **11**(12): 1825-34.
- Xing, Y. and C. J. Lee (2005). "Protein modularity of alternatively spliced exons is associated with tissue-specific regulation of alternative splicing." *PLoS Genet* **1**(3): e34.
- Xu, Q., B. Modrek and C. Lee (2002). "Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome." *Nucleic Acids Res* **30**(17): 3754-66.

- Yamaguchi, Y., T. Takagi, T. Wada, K. Yano, A. Furuya, S. Sugimoto, J. Hasegawa and H. Handa (1999). "NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation." *Cell* **97**(1): 41-51.
- Yang, X., M. R. Bani, S. J. Lu, S. Rowan, Y. Ben-David and B. Chabot (1994). "The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15): 6924-8.
- Yang, X., M. O. Gold, D. N. Tang, D. E. Lewis, E. Aguilar-Cordova, A. P. Rice and C. H. Herrmann (1997). "TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12331-6.
- Yeo, G., D. Holste, G. Kreiman and C. B. Burge (2004). "Variation in alternative splicing across human tissues." *Genome Biol* **5**(10): R74.
- Young, J. I., E. P. Hong, J. C. Castle, J. Crespo-Barreto, A. B. Bowman, M. F. Rose, D. Kang, R. Richman, J. M. Johnson, S. Berget and H. Y. Zoghbi (2005). "Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17551-8.
- Yudkovsky, N., J. A. Ranish and S. Hahn (2000). "A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator." *Nature* **408**(6809): 225-9.
- Zacharias, D. A. and E. E. Strehler (1996). "Change in plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca<sup>2+</sup>." *Curr Biol* **6**(12): 1642-52.
- Zeng, C. and S. M. Berget (2000). "Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing." *Mol Cell Biol* **20**(21): 8290-301.
- Zhou, Z., E. J. Hong, S. Cohen, W. N. Zhao, H. Y. Ho, L. Schmidt, W. G. Chen, Y. Lin, E. Savner, E. C. Griffith, L. Hu, J. A. Steen, C. J. Weitz and M. E. Greenberg (2006). "Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation." *Neuron* **52**(2): 255-69.
- Zorio, D. A. and D. L. Bentley (2004). "The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways." *Exp Cell Res* **296**(1): 91-7.