Biblioteca Digital
FCEN-UBA

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

Tesis Doctoral

Regulación epigenética del splicing alternativo mediante RNAs pequeños y argonauta 1

Alló, Mariano

2010

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

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

Cita tipo APA:
Alló, Mariano. (2010). Regulación epigenética del splicing alternativo mediante RNAs pequeños y argonauta 1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Alló, Mariano. "Regulación epigenética del splicing alternativo mediante RNAs pequeños y argonauta 1". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES / UBA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL SPLICING ALTERNATIVO MEDIANTE RNAS PEQUEÑOS Y ARGONAUTA 1

Mariano Alló

80343

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Director de tesis y Consejero de Estudios: Alberto R. Kornblihtt
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEyN, IFIBYNE, UBA-CONICET

Buenos Aires, 2010

Regulación epigenética del splicing alternativo mediante RNAs pequeños y argonauta 1

Los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) son conocidos por mediar el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) promoviendo la degradación de mRNAs targets. Cuando son dirigidos contra regiones promotoras, los siRNAs participan en una vía alternativa conocida como silenciamiento transcripcional de genes (TGS) que promueve la metilación de histonas, formación de heterocromatina e inhibición de la transcripción. Mostramos aquí que los siRNAs dirigidos contra secuencias ubicadas en cercanías al exón alternativo EDI del gen de la fibronectina son capaces de regular su splicing alternativo en células de mamíferos. El efecto necesita de dos proteínas claves de la vía de interferencia por RNA, AGO1 y AGO2. Sin embargo, como sólo AGO1 es necesario para el TGS concluimos que ésta es la principal vía involucrada.

Por otra parte, la importancia del estado de la cromatina ha sido resaltada al mostrar que los efectos son eliminados o reducidos por factores que favorecen una estructura cromatínica más relajada o que aumentan la elongación de la transcripción. Más aun, el mecanismo involucra la presencia de marcas epigenéticas de heterocromatina facultativa (H3K9me2 y H3K27me3) intragénicas en la región target y la función de la proteína asociada a heterocromatina HP1α.

Utilizando tecnología genome-wide encontramos que aproximadamente el 40% de los eventos de splicing alternativo contenidos en un panel de RT-PCR relacionado a cáncer fueron afectados tras la depleción de AGO1 o Dicer. Mediante experimentos de ChIP-seq hemos encontrado un enriquecimiento de clusters de AGO1 en promotores de genes con alta expresión y en exones ubicados en genes con baja tasa transcripcional. Adicionalmente, descubrimos un aumento del solapamiento de marcas de histonas sobre sitios target de AGO1.

Finalmente, hemos detectado un evento de splicing alternativo endógeno del gen SYNE2 (exón 107) que podría estar siendo afectado fisiológicamente por AGO1.

Palabras clave: splicing alternativo, transcripción, cromatina intragénica, interferencia por RNA, siRNAs, AGO1, TGS

Epigenetic regulation of alternative splicing by means of small RNAs and argonaute 1

Small interfering RNAs (siRNAs) are known to mediate post-transcriptional gene silencing (PTGS) by promoting degradation of target mRNAs. When targeted at promoter regions, siRNAs participate in an alternative pathway known as transcriptional gene silencing (TGS) by promoting histone methylation, heterochromatin formation and inhibition of transcription. Here we show that siRNAs targeting sequences located close to the alternative exon EDI from the fibronectin gene are able to regulate its alternative pre-mRNA splicing in mammalian cells. The effect needs both key players of RNA interference pathway AGO1 and AGO2, however since AGO1 is only needed for TGS we concluded that this should be the main pathway involved. On the other hand, the importance of chromatin has been highlighted showing that the effect is abolished or reduced by factors that favor an open chromatin structure or increase transcriptional elongation. Moreover, the mechanism involves the presence of intragenic facultative heterochromatin epigenetic marks (H3K9me2 and H3K27me3) at the target site and the function of heterochromatin associated protein HP1α.

Using genome-wide technology we have found that approximately 40% of alternative splicing events from an RT-PCR cancer related panel were affected upon AGO1 or Dicer depletion. By means of ChIP-seq experiments we have found enrichment for AGO1 clusters in highly expressed promoters and in exons located in genes with low expression levels. Additionally, we found enrichment of histone mark overlapping on AGO1 target sites.

Finally, we have detected an endogenous alternative splicing event from SYNE2 gene (exon 107) that could be physiologically affected by AGO1 binding.

Keywords: Alternative splicing, transcription, intragenic chromatin, RNA interference, siRNAs, AGO

AGRADECIMIENTOS

Cada momento importante en la vida de una persona supone una marca, una delimitación, un antes y un después de ese instante fugaz de existencia. A mi modesto entender es una hermosa invitación para reflexionar un poco acerca del camino recorrido, pero fundamentalmente para recordar y agradecer a todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron para que se haya subido ese pequeño escalón en el recorrido de la vida.

He decidido intentar llevar adelante los agradecimientos de esta tesis de una manera poco convencional. En lugar de enumerar una interminable lista de personas y un gracias por esto o aquello, voy a narrar temporalmente eventos, vivencias, o experiencias puntuales con aquellas personas que hayan jugado un rol decididamente importante para que esta tesis doctoral pudiera desarrollarse.

Mis padres han sido el pilar sobre el cual mi vida se ha desarrollado mucho más allá de la biología, gestores de gran parte de mis virtudes y defectos, me han dejado un legado lleno de amor y un sinfín de enseñanzas que, sin duda, me acompañaran por el resto de mi vida. A mi viejo lamentablemente lo perdí hace ya más de 15 años y no estuvo para recorrer junto a mí el camino de mi formación académica que sin duda tanto hubiese disfrutado. A él le debo en gran medida la capacidad de soñar, de pensar que todo es posible y a valorar el esfuerzo que en el camino debemos hacer. Más allá de lo mucho que lo he necesitado y extrañado no puedo dejar de sentir cuanto desearía que estuviera aquí en este momento.

Mi vieja ha sido un motor de amor incondicional y a ella le debo entre muchas otras cosas la confianza necesaria para poder emprender un camino tan desafiante como una carrera universitaria a una edad a la cual la mayoría de mis compañeros estaban iniciando sus doctorados. Pero no hace falta que diga más sobre ellos pues ellos ya lo saben todo.

El primer compañero de viaje en el camino de mi vida, sin duda, ha sido mi hermano Luciano. Nos llevamos tan solo 2 años y recorrimos juntos un arduo camino. Primero con muchas diferencias, luego con encuentros y finalmente desde hace ya mucho años disfrutamos de una

hermosa amistad que nos une más allá del lazo sanguíneo. ¿Cuánto habremos aprendido el uno del otro? ¿Cuántas veces nos habremos apoyado mutuamente en los momentos más difíciles? Imposible de saber... lu...

Mis dos hermanos menores, Agustín y María Celeste, "los chiquitos" aunque ya nada tienen de chiquitos fueron un regalo fantástico de la vida y con 10 y 12 años (menos que yo) de diferencia respectivamente me enseñaron muchísimo más de lo que ellos mismos pueden imaginar. También los he extrañado mucho, y tenerlos lejos junto al resto de mi familia ha sido el enorme precio a pagar por decidir seguir este camino.

Otros dos miembros destacadísimos de la jerarquía familiar cuyo legado es invaluable son mis abuelos Raúl y Nelly. Mi abuela fue realmente una segunda madre que nunca parecía cansarse de malcriarnos, y también estuvo allí cuando más se la necesitaba. Mi abuelo omnipresente en las malas, siempre tuvo un consejo con el cual guiar y alumbrar los caminos más oscuros. Al menos tres cosas vitales he aprendido de él: La honestidad como herramienta fundamental del vínculo entre las personas. La visión positiva de la vida, siempre la mirada posada en la búsqueda de salidas y la generación de oportunidades en lugar de hacerlo en los problemas (que de hecho siempre sobran). Finalmente y probablemente la más importante: hacerme hincha de independiente!!! Gracias Abuelo, por aquel día que me regalaste la primera camiseta del bocha, o aquella réplica de la copa libertadores!!! Pasamos muchos momentos difíciles, pero... ¿la vida no es así también?

Párrafo aparte para mi tío Walter y Cristina, se cargaron a sus hombros un peso enorme tras la muerte de mi viejo, y su apoyo y ayuda incondicional son y serán una piedra fundamental de cualquier logro que alcance en mi vida, desde el más pequeño hasta el más grande.

Trazando una línea de tiempo el siguiente paso fue el colegio secundario, que tiempos inolvidables... sin embargo, probablemente la única enseñanza verdadera de toda esa etapa "adrenalínica" de mi vida haya sido el valor de la amistad, el de compartir infinitas conversaciones, ideas locas y sueños de todo tipo. Sólo el tiempo y la distancia ponen en la verdadera perspectiva a estas cuestiones, cuando después de años volves a encontrarte con

alguno de aquellos amigos y es como si el tiempo no hubiese pasado nunca. Gastón, Homero, Juan Manuel, "El Pocho", Carlitos, Martín, Jorge, Miguel y cuantos más...

Y algún día llegó la hora de encontrar otro camino... Así fue que una universidad muy pequeña en el sur del país me lleno de ilusiones y sueños. Tuve algunos profesores excelentísimos que no sólo se dedicaron a transmitir conocimientos sino que además me marcaron un camino, me demostraron que aún en el medio de las dificultades más grandes que uno pueda imaginarse siempre hay forma de salir adelante. Ellos ayudaron a agudizar el ingenio para suplir las falencias y las carencias. Miguel Harvey y José Saravia son dos clarísimos ejemplos en este sentido. Pero la verdadera mentora de mi camino académico fue Mónica Albertali, quién además de ser mi consejera de estudios en el ciclo superior de la carrera fue quien me alentó de mil maneras diferentes a explorar este fantástico mundo de la biología molecular y la genética. También fue gracias a ella que llegué a conocer a quien años más tarde sería el director de la tesis que acompaña este texto: Alberto R. Kornblihtt.

Pero la carrera universitaria también me regalo excelentes amigos. Nacho fue el primero que conocí. Una de las personas más inteligentes y misteriosas que quizás haya conocido. Me lleno de sabios consejos a lo largo de toda la carrera que me allanaron el camino de manera notable. «Mauri» fue el último regalo de la carrera, con su inmensurable bondad y excelente sentido del humor se convirtió en la primer visita obligada cada vez que pisaba Trelew en vacaciones. En el medio pasaron Mariel, Mati, Luis, «el chori» y Germán. Todos aportaron su cuota particular de buenos oídos, prudentes palabras y por sobre todo muchísima diversión que ayudo a que el trayecto sea tanto más llevadero.

Un día tras dar un final de Genética y Evolución, las dos profesoras (una de ellas era Mónica) me llamaron y me pasaron un papel que contenía un mail y me dijeron: "Tenes que contactar a esta persona". El mail comenzaba con ark@... Estaba en segundo año de la carrera y esa fue la primera vez que alguien me nombró a Alberto Kornblihtt. En el medio de la Patagonia y en una facultad que tenía menos alumnos (contando todas las carreras) que inscriptos a la materia Introducción a la Biología Celular y Molecular en la UBA, me parecía difícil hasta recibir una

respuesta. Sin embargo, creo que lo que voy a contar a continuación describe claramente a la persona que dirigió mi doctorado...

Finalmente un día me anime y le envié un mail a ese famoso personaje que se había transformado ya en un mito viviente para mí desde aquel final de G&E. Para ser honesto, ni siquiera esperaba una respuesta a mi pedido de algunos papers de su grupo. Para mi sorpresa obtuve una respuesta casi instantánea, en la cual Alberto no sólo me enviaba los últimos trabajos de su grupo sino que además me pedía si en una semana le podía enviar algunos comentarios sobre estos trabajos. Je! Todavía recuerdo el momento en el que leí ese mail, sí hasta me debo haber puesto colorado de la sorpresa y de los nervios!! Y claro que no salía de mi asombro... Si muchos de los investigadores a los que les había escrito para pedirle papers (ya que en la facultad no teníamos acceso a ninguna revista científica) ni siquiera se habían tomado la molestia de responder... Bueno, pero Alberto fue un mar de gratas sorpresas desde ese mismísimo primer momento. Como un padre científico me ha dejado una infinidad de aprendizajes, sin embargo, las cosas que más le valoro y admiro están mucho más allá del ámbito estrictamente científico. Su honradez intelectual, su valoración y preocupación por el lado humano de sus "becarios", su interminable generosidad a todo nivel, su compromiso educativo y social son algunas de la larga lista de cosas que ojalá haya sabido aprehender de él. Gracias por confiar en mí, gracias por la oportunidad y gracias por estar siempre.

Una vez en Buenos Aires, en el labo encontré otra de las grandes sorpresas de mi nuevo camino: Mis compañeros. Quizás por la trascendencia del lugar... quizás por venir del interior... esperaba encontrar un ambiente completamente diferente. En poco tiempo y casi sin quererlo se habían gestado valiosas amistades. El primero de los ARK que conocí (aunque en realidad era un Anabello) fue Matías Blaustein, alias "el queru". Ni el más aventurado de los videntes hubiese pronosticado que íbamos a terminar siendo tan amigos después de la forma en que interactuamos por primera vez en Ingeniería Genética. Con un corazón de niño y un cerebro agudizado tras el cual suele esconderse muchas veces, queru se trasnformó rápidamente en uno de mis mejores amigos y estuvo incondicionalmente, en las buenas y en las malas (como dice la canción).

El "pampa" de la Mata o simplemente "manu" fue el segundo a quien conocí y probablemente sea a uno de los que más deba agradecerles por lo mucho que me ayudo desde el primer día en que pise el LFBM, abriéndome las puertas del labo, alentándome, dándome ideas y por sobre todas las cosas ayudando a que me sintiera cómodo en un lugar tan extraño para mí. Supongo que por ser un «extranjero» como yo debe haber sabido lo importante de estas cuestiones.

Luego lo conocí a Juan (JPF) con quien hemos construido una sólida amistad que fue gestándose con el paso del tiempo. A pesar de haber compartido un ámbito de trabajo, donde hizo aportes invaluables para este proyecto, Juan es otra de las personas que me han dejado enseñanzas fundamentalmente por su forma de ser y valoración de las cosas fuera del lab. Días de pezca en Ibicuy (donde estaba lleno de BAGRES!) y viajes varios han sido una infaltable excusa para compartir charlas interminables y mil y una formas de ver la vida.

Pero hubo alguien que inicialmente fue un desconocido, luego se transformó en un compañero de trabajo, más tarde en un amigo y finalmente en un hermano. ¿Estoy exagerando? No, en absoluto. Le dicen Petry y hoy su fama trasciende las fronteras de nuestro país, quizás hasta de nuestro planeta. Algún día competimos sin saberlo por un lugar en el labo, pero gracias a Celi que decidió irse a Oxford, ambos tuvimos nuestra oportunidad. Perty (como le dice manu) también estuvo incondicionalmente (genuinamente cuando él quería), Je! si hasta me vio llorar varias veces. Es que es mi hermano... Pero también discutimos ciencia y me fascinó con locas ideas a la vez que siempre fue el más exigente con los controles y los resultados. Pero también fue quien reveló el primer gel de toda esta tesis cuando yo estaba en Alemania. Que más se puede decir... gracias quizás...

Con Nacho compartimos un tema de trabajo sumamente relacionado que muchas veces llegó a solaparse. En esos momentos vi algunas de las virtudes más destacables que un compañero de trabajo puede tener. Siempre fue justo, supo escuchar y respetar. Su honestidad intelectual al igual que su interés siempre genuino y sus ganas de sumar realizaron invaluables aportes a este trabajo.

"You have never been in love... until you´ve seen the stars...", alguien alguna vez me hizo escuchar Morrissey y también hizo que me guste Morrissey, y que hoy en día cada vez que lo escucho vengan a mi mente mil imágenes de esos primeros dos años de mi doctorado. Ese alguien hiperactivo y «gallina» hasta los dientes fue también la cuota de fútbol infaltable en el día a día de mesada. Ese alguien que cada vez que lo veo tiene un look diferente es "manolet"!! El Dr. Manuel Muñoz.

Otro párrafo aparte para la más grande de todas: Vale. Buena onda todo el tiempo, experimentos exitosos (también todo el tiempo!) y una infinidad de valores que atesoran una persona que vale (VALE!) muchiiiiisimo! Gracias por todo VAL!

A Lu (por Luciana) más que agradecerle tengo que pedirle disculpas por no haber podido estar cuantitativa y cualitativamente. Pero siempre hay tiempo para corregir así que gracias por bancar, por la buena onda y los mates! Ah y por ser del rojo!!!

Con Fedi un día vimos "flores rotas" en el cine, pero en realidad, los que estábamos rotos éramos nosotros... por suerte todo pasa. Gracias por hacerme caso y dejar de hacer cuello con Petry en el gym! Mirá ahora como no paras de crecer!!

Los últimos que conocí para cerrar esta historia laboratoril fueron Guille y Ana Q. También Anabellos, que al igual que Anabella están allí si los necesitas. Con Guille compartimos un hermoso día en Barcelona con baño en el mediterráneo incluido y aunque otro día se me enojó porque se me cayó su desodorante de la mano en Bariloche... yo sé que le caigo bien!

Ana Q, es una de las últimas incorporaciones en el club de amigos de Urquiza! Una sabia consejera y una amiga que siempre está para poner el oído a disposición. Junto a Lau y Naty hemos armado una hermosa amistad que se nutre de películas, de pizzas de Kentucky (¿por qué no decirlo?), y de conversaciones siempre interesantes y reflexivas que espero se mantengan por mucho tiempo.

Por último, debo mencionar a un ser hermoso (de adentro hacia afuera), al más importante y en realidad debo agradecerle al LFBM por haberme dado la posibilidad de conocerla: Pao es una

fuente constante de desafíos y de ideas. Pero también es la persona que da sentido a todo lo que transcurre día a día en mi vida y a todos los proyectos que juntos construimos hacia el futuro. Gracias por la paciencia, por el esfuerzo constante que una pareja siempre exige, por ayudarme a crecer cada minuto, por el empuje, por las ganas, por la inspiración, por entenderme y por compartir todo. Por esta tesis.

PUBLICACIONES

Trabajos originales:

- Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, **Alló M**, Kornblihtt AR.
  Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing.
  Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 17;106(11):4325-30. Epub 2009 Feb 26.

- **Alló M**, Buggiano V, Fededa JP, Petrillo E, Schor I, de la Mata M, Agirre E, Plass M, Eyras E, Elela SA, Klinck R, Chabot B, Kornblihtt AR.
  Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing.
  Nat Struct Mol Biol. 2009 Jul;16(7):717-24. Epub 2009 Jun 21.

Revisiones:

- Kornblihtt AR, Schor IE, **Alló M**, Blencowe BJ.
  When chromatin meets splicing.
  Nat Struct Mol Biol. 2009 Sep;16(9):902-3.

- Schor IE, **Alló M**, Kornblihtt AR.
  Intragenic chromatin modifications: A new layer in alternative splicing regulation.
  Epigenetics. 2010 Apr 27;5(3).

- **Alló M**, Kornblihtt AR.
  Gene silencing: small RNAs control RNA polymerase II elongation.
  Curr Biol. 2010 Sep 14;20(17):R704-7.

ÍNDICE

íNDICE 1

1 INTRODUCCIóN 1

1.1 La transcripción y el *splicing* alternativo 1

1.1.1 Transcripción en los organismos eucariotas 1

1.1.2 Elongación de la RNA polimerasa II 4

1.1.3 Corte y empalme de exones, el splicing 7

1.1.4 El splicing alternativo y su regulación 10

1.1.5 ¿La “calidad” de la transcripción es capaz de afectar el splicing alternativo? 13

1.1.6 El gen de la fibronectina como modelo de estudio del splicing alternativo 17

1.2 Cromatina y código de histonas 20

1.2.1 Conceptos básicos 20

1.2.2 Modificaciones post-traduccionales de las histonas: código de histonas 21

1.2.3 Heterocromatina y silenciamiento 24

1.2.4 Eucromatina y genes activos 27

1.2.5 Cromatina y splicing alternativo 28

1.3 Interferencia por RNA 31

1.3.1 Los RNA pequeños ingresan al campo 31

1.3.2 Las diferentes vías de acción de los RNA pequeños 33

1.3.3 Los miRNAs y el splicing 38

1.3.4 siRNAs endógenos 39

1.3.5 Otros tipos de RNA pequeños endógenos 40

1.3.6 TGS y argonautas 41

2 OBJETIVOS 45

2.1 Objetivo general 45

2.2 Objetivos específicos 45

3 Capítulo I 46

3.1 Resultados I 48

3.1.1 Diseño de los siRNAs intrónicos 48

3.1.2 Efecto de los siRNAs intrónicos sobre el splicing alternativo de EDI en células Hep3B 48

3.1.3 Controles de especificidad de los efectos de los siRNAs 52

3.1.4 Efecto de los siRNAs en células HeLa 55

3.1.5 La maquinaria de interferencia por RNA es requerida para el efecto de los siRNA sobre el splicing alternativo 56

3.1.6 El estado de la cromatina y el efecto de I33as 57

3.1.7 Elongación: el eslabón perdido 61

3.1.8 Efecto de siRNAs con targets en exones 64

4 Capítulo II 67

4.1 Resultados II 68

4.1.1 RNA pequeños endógenos: ¿materia prima del TGS? 68

4.1.2 La depleción de AGO1 y Dicer afecta muchos eventos de splicing alternativo 68

4.1.3 Genome-wide screening: ChIP-seq en células MCF7 74

4.1.4 Análisis de los datos de ChIP-seq 75

4.1.5 AGO1 se encuentra enriquecido en promotores con alta actividad transcripcional 76

4.1.6 AGO1 y H3K9me2 enriquecido en exones de genes con baja expresión 80

4.1.7 Aumento de convergencia de marcas de histonas en los sitios blanco de AGO1 82

4.1.8 AGO1 y las secuencias repetitivas 83

4.1.9 Estudio de un gen candidato 85

5 Discusión 88

5.1 La convergencia de 3 áreas: TGS-AS 88

5.1.1 ARN pequeños, cromatina y splicing alternativo 88

5.1.2 Modificaciones cromatínicas intragénicas como motor del TGS-AS 89

5.1.3 Elongación: el nexo entre la cromatina, los RNA pequeños y el splicing alternativo 90

5.1.4 siRNAs intrónicos vs exónicos 92

5.1.5 El mecanismo 93

5.1.6 ¿Existe algún ejemplo endógeno de TGS-AS? 95

5.1.7 Conclusiones finales 99

6 CONCLUSIONES 101

6.1 Conclusiones finales 101

7 MATERIALES Y MÉTODOS 104

7.1 Detalle de los experimentos 104

7.1.1 Transfección de células HeLa y Hep3B 104

7.1.2 Transfección con RNAs pequeños interferentes 105

7.1.3 Tratamientos de células con inhibidores farmacológicos 105

7.1.4 Extracción de RNA total de cultivos celulares 106

7.1.5 Evaluación de los patrones de splicing alternativo por RT-PCR 106

7.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa semi-cuantitativa (PCR radiactiva) 107

7.1.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa 108

7.1.8 Evaluación de la relación de pre-mRNA distal/proximal 110

7.1.9 Inmunoprecipitación de la cromatina nativa (nChIP) 110

7.1.10 Medición del transcripto antisentido 114

7.1.11 Panel de RT-PCR y electroforesis capilar 114

7.1.12 ChIP-seq de células MCF7 115

7.2 Oligonucleótidos utilizados 119

7.2.1 Primers para PCR 119

7.2.2 Primers para RT 120

7.2.3 Oligonucleótidos de siRNAs 121

8. Bibliografía 122

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La transcripción y el *splicing* alternativo

1.1.1 Transcripción en los organismos eucariotas

El proceso que conocemos como transcripción implica una serie de reacciones biológicas que llevan a cabo el pasaje de la información genética desde la secuencia de bases del ácido desoxirribonucleico (DNA) pasando primeramente por la generación de un transcripto primario o inmaduro de ácido ribonucleico (RNA), hasta la confección final de un RNA mensajero (mRNA) maduro. En este sentido, el flujo de la información genética desde al DNA hasta el mRNA maduro está finamente regulado en cada uno de sus pasos: transcripción y procesamiento.

A nivel general, la transcripción de la gran mayoría de los genes de organismos eucariotas es llevada a cabo por la RNA polimerasa II (Pol II), mientras que la RNA polimerasa I transcribe los RNA ribosomales 28S, 18S y 5.8S y la RNA polimerasa III transcribe RNA de transferencia y ribosomales 5S. Hace cinco años un grupo de investigadores rusos descubrió una cuarta RNA polimerasa eucariota de origen mitocondrial (RNA polimerasa IV), involucrada en la transcripción de algunos RNA mensajeros nucleares (Kravchenko et al., 2005). Las RNA polimerasas son reclutadas a diferentes secuencias promotoras de la transcripción mediante la participación de distintos factores auxiliares llamados factores de transcripción.

Antiguamente se creía que este flujo de la información estaba "escalonado" temporalmente, primero ocurría la transcripción y luego el procesamiento que a su vez estaba dividido en tres etapas (Fig. 1):

I. **Capping o agregado del Cap:** un nucleótido GTP modificado es agregado al mRNA naciente formando un "capuchón" o caperuza de 7 metil-guanosina en el extremo 5'.

II. ***Splicing*:** dado que sólo una parte del gen contiene información para la síntesis proteica y que además esta información esta interrumpida por muchas secuencias internas, se produce la escisión de dichos segmentos internos por medio de reacciones

de corte y empalme. Las regiones cortadas y eliminadas se llaman intrones, mientras que las empalmadas se conocen como exones. Este proceso también se da en muchos genes no codificantes como los *non-coding RNAs*, *pseudo*genes, etc.

III. **Corte y poliadenilación:** finalmente el mRNA naciente sufre un corte en el extremo 3´ y la posterior adición de varios nucleótidos de adenina, generando así una "cola" de poli-A; en algunos casos sufre también la modificación de ciertos nucleótidos, proceso denominado edición.

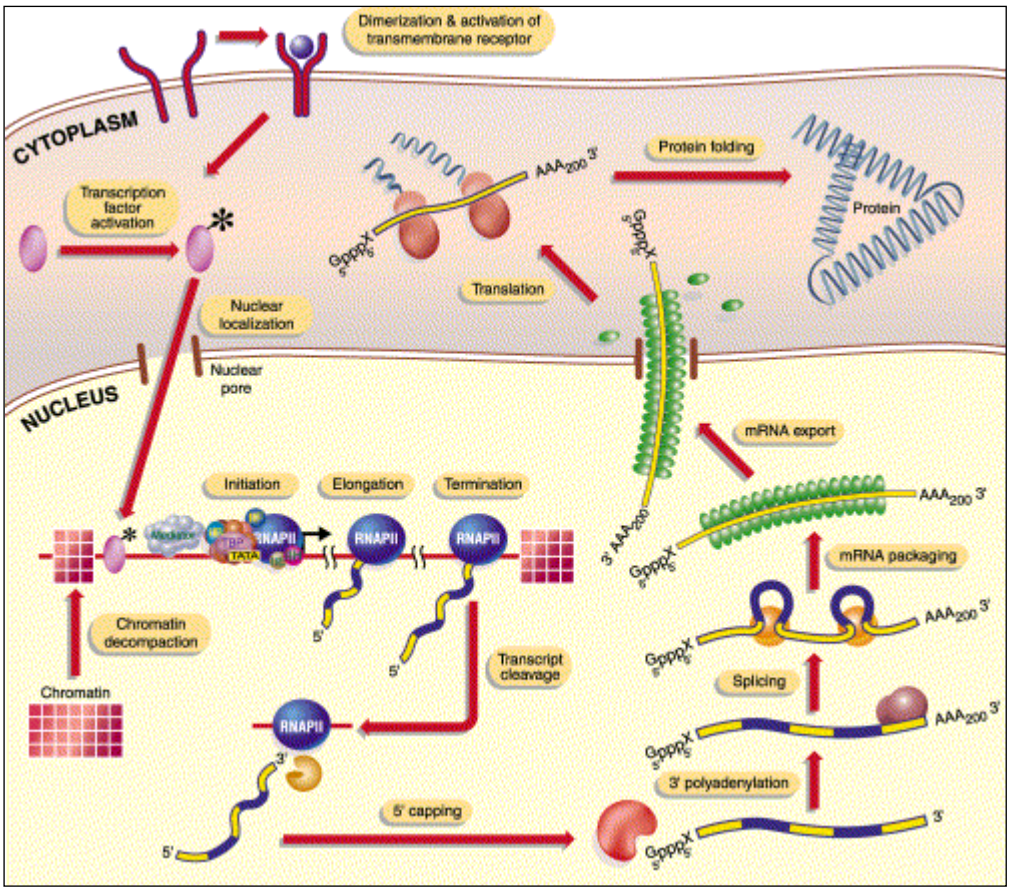


Figura 1. Visión clásica del flujo de la información genética. *Cada uno de los procesos de la vía: capping, splicing y poliadenilación son mostrados como eventos independientes (Orphanides y Reinberg, 2002b).*

Sin embargo, esta visión ha cambiado dramáticamente durante la última década. Se ha descripto con gran claridad que todos estos procesos ocurren en forma simultánea y acoplada a la vez, donde cada uno actúa como una suerte de control de calidad antes de comenzar el paso subsiguiente (Orphanides y Reinberg, 2002b).

ı a visión actual de este proceso (Fig. 2) nos muestra que la transcripción de los genes codificantes para proteínas comienza con la formación del denominado complejo de pre-iniciación (PIC), que consiste en el reclutamiento de los factores de transcripción generales y la Pol II a la región promotora basal. En estas condiciones la polimerasa todavía no es capaz de iniciar la transcripción ya que requiere previamente de un cambio conformacional. Este cambio es producido tras una fosforilación de las serinas 5 de las héptadas repetidas en el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la Pol II, realizado por Cdk7, la subunidad catalítica del factor de transcripción general TFIIH (Akoulitchev et al., 1995). Tras el cambio conformacional se produce la liberación de la polimerasa del promotor y el consiguiente inicio de la transcripción. Muchos de los factores utilizados durante todo el proceso permanecerán allí conformando un andamiaje de factores basales (Yudkovsky et al., 2000) que, según se cree, es el responsable de la mayor velocidad observada en el re-inicio de la transcripción en rondas subsiguientes (Jiang y Gralla, 1993).

Durante esta primera fase la Pol II no sintetiza más que 20-40 nt antes de quedarse "pausada" y contando con una marcada tendencia a liberarse del molde (iniciación abortiva). Para poder salir de esa condición de pausado (generalmente entre las posiciones +20 y +40) y pasar a la fase de elongación, necesita la acción de otros factores como P-TEFb (Price, 2000), compuesto por la quinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9) y distintas ciclinas, como la T1, T2 o K (Mancebo et al., 1997; Peng et al., 1998; Yang et al., 1997) que producen un aumento en la fosforilación en las serinas 2 de las héptadas del CTD. Esta "marca" particular del extremo carboxilo usualmente es utilizada para identificar RNA polimerasa II en fase de elongación de la transcripción.

Por último, la finalización de la transcripción ocurre varios nucleótidos después de superar la señal de corte y poli-adenilación. Si bien existen varios modelos propuestos para explicar este fenómeno, uno de los más aceptados es el denominado "torpedo". Este modelo propone la acción de una exonucleasa 5' -> 3' encargada de degradar "co-transcripcionalmente" al fragmento de RNA ubicado río abajo del sitio de corte, hasta alcanzar a la polimerasa y provocar así su desprendimiento del DNA (West et al., 2004) y concomitantemente la finalización de la transcripción.

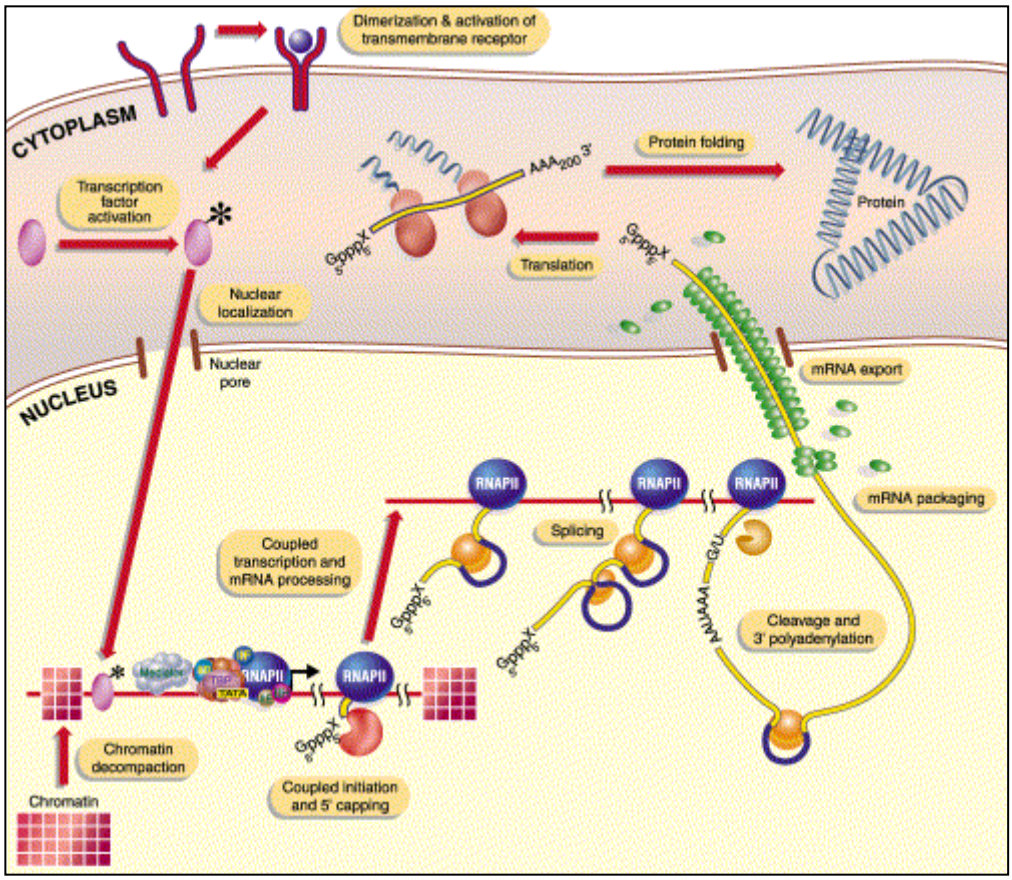


Figura 2. Visión moderna del flujo de la información genética. *Cada paso que regula la expresión genética es una subdivisión de un proceso continuo que se encuentra física y funcionalmente conectado entre sí (Orphanides y Reinberg, 2002b).*

1.1.2 Elongación de la RNA polimerasa II

ı a Pol II transcribe los genes con una tasa de elongación que está determinada, entre otras cosas, por las características propias del molde transcripcional incluyendo la estructura de la cromatina y por la acción de factores auxiliares que la afectan positiva o negativamente.

En este punto es importante diferenciar dos características del proceso de transcripción que generalmente están asociadas pero que actúan de manera independiente: tasa de elongación y procesividad. El primero corresponde a la definición intrínseca de actividad catalítica de la polimerasa, medido en número

promedio de nucleótidos añadidos por unidad de tiempo. El segundo está relacionado con la capacidad de la Pol II, en este caso, de recorrer un molde de manera continua sin desprenderse, y podría medirse como número promedio de nucleótidos adicionado por evento de iniciación. Si bien estos dos parámetros están inter-relacionados, pueden ser afectados en forma conjunta o en forma diferencial por diversos factores (Mason y Struhl, 2005). Aun así, y como consecuencia de las dificultades técnicas para poder medirlos *in-vivo* y por separado, lo más usual es que se los utilice como una única medida de lo mismo.

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 et al., 2007; Muñoz et al., 2009). Sin embargo, el sistema es muy limitado experimentalmente, ya que no permite medir la tasa de elongación de cualquier gen, sino únicamente del modificado e incorporado genéticamente.

La Pol II es considerada una enzima muy procesiva, siendo capaz de transcribir largos genes de hasta cerca del millón de pares de bases. Sin embargo, también es una enzima propensa a pausas y arrestos transcripcionales (Sims et al., 2004). Se cree que muchas de estas pausas son generadas por un desalineamiento entre el extremo 3' del RNA naciente y el sitio activo de la polimerasa. Dichas pausas son completamente reversibles y están reguladas por la actividad de varios factores de elongación, tanto positivos como negativos. Dentro del grupo de factores positivos se destacan TFIIF, elonguina, y EIII, los que son considerados factores estimuladores de la elongación llevada a cabo por la RNA polimerasa II (Bengal et al., 1991; Bourgeois et al., 2002; Bradsher et al., 1993; Morillon et al., 2003a; Rondon et al., 2003; Shilatifard et al., 1996);.

En la vereda de enfrente, el factor de elongación negativo más caracterizado es NEIF, un complejo formado por cinco proteínas (denominadas NEIF-A/B/C/D/E) que promueve el pausado de la Pol II (Yamaguchi et al., 1999).

En cuanto a los arrestos transcripcionales, se acepta que también son causados por un «fuerte» desalineamiento de la polimerasa respecto del extremo 3' del RNA naciente, que puede deberse al llamado *back-tracking* (movimiento hacia atrás de la polimerasa) de la Pol II (Sims et al., 2004). A su vez, una pausa que no es resumida con

cierta celeridad puede llevar a un arresto (Gu y Reines, 1995). Para poder abandonar este estado, la Pol II debe recurrir a un mecanismo que implica el corte del transcripto naciente con posterior re-alineación del extremo del RNA, el molde y el sitio activo de la polimerasa (Fig. 3B). En este sentido, TFIIS ha sido descripto como uno de los factores más importantes para para superar los arrestos transcripcionales. Su estudio ha realizado importantes contribuciones acerca del mecanismo por el cual se reasume la transcripción después de un arresto (Conaway et al., 2003; Fish y Kane, 2002).

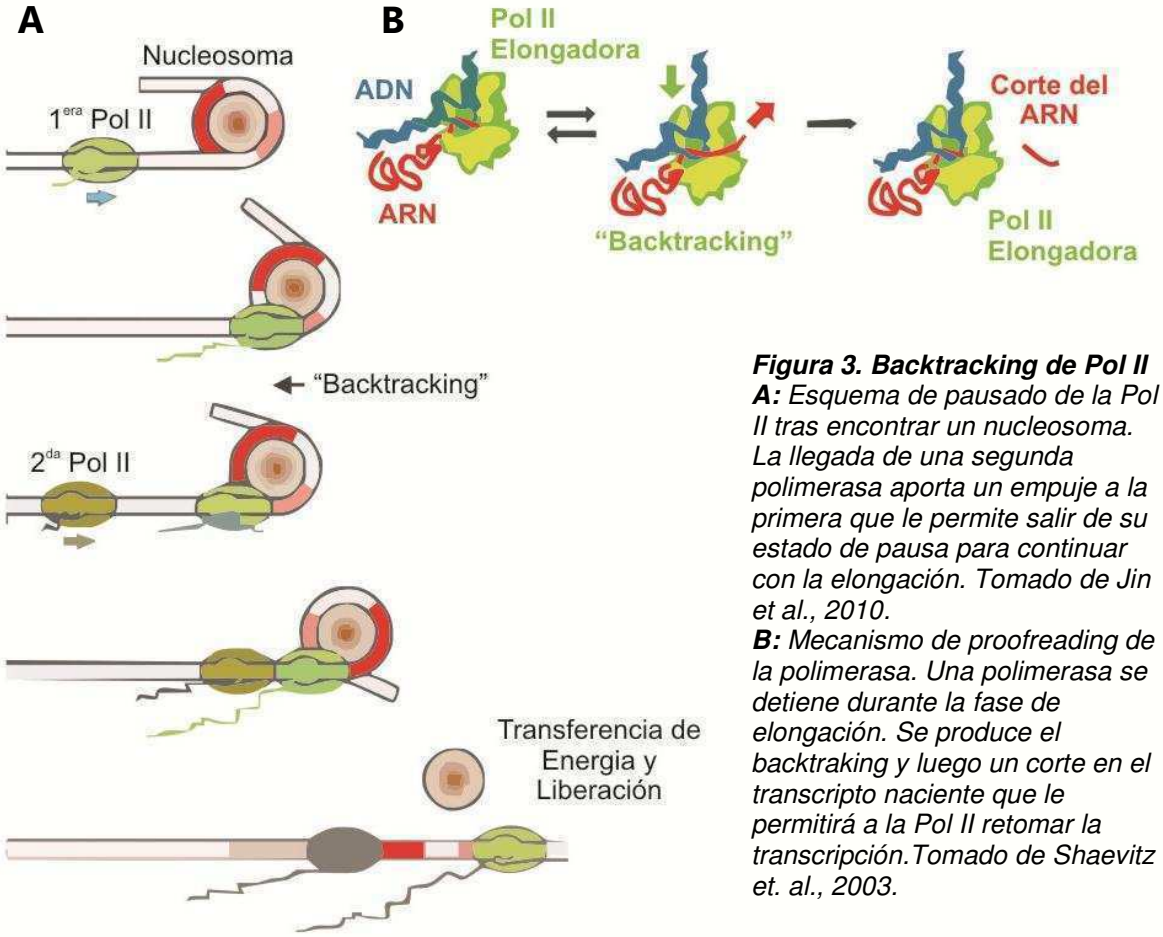


Figura 3. Backtracking de Pol II
A: *Esquema de pausado de la Pol II tras encontrar un nucleosoma. La llegada de una segunda polimerasa aporta un empuje a la primera que le permite salir de su estado de pausa para continuar con la elongación. Tomado de Jin et al., 2010.*
B: *Mecanismo de proofreading de la polimerasa. Una polimerasa se detiene durante la fase de elongación. Se produce el backtraking y luego un corte en el transcripto naciente que le permitirá a la Pol II retomar la transcripción.Tomado de Shaevitz et. al., 2003.*

Durante la transcripción los nucleosomas suponen una barrera importante a la elongación de las RNA polimerasas y se ha considerado que cuando varias transcriben juntas un gen, al mismo tiempo, su paso favorece la elongación. En estudios de seguimiento de moléculas únicas y utilizando la RNA polimerasa de *E. coli* se ha cuantificado este pausado y descripto un *backtracking* de 10-15 nucleótidos cada vez

que una polimerasa se encuentra con un nucleosoma ensamblado *in-vitro* (Fig. 3A). Sin embargo, cuando dos polimerasas elongan en proximidad, se favorece la elongación y se reduce el *backtracking* aumentando la tasa de transcripción 5 veces (Jin et al., 2010).

1.1.3 Corte y empalme de exones, el *splicing*

Un gen típico de animales y plantas posee secuencias que formarán parte del transcripto maduro, denominadas **exones**, y otras llamadas **intrones** que serán eliminadas durante el proceso que conocemos como *splicing*. Los límites exón-intrón están, en parte, definidos por secuencias denominadas "dador" y "aceptor" de *splicing*, las cuales poseen un grado de conservación variable dentro de los organismos eucariotas (Fig. 4). Pero estos límites también están definidos por las interacciones directas entre estas secuencias y los factores que conformar la maquinaria basal de *splicing*. Más de 300 proteínas junto a los complejos ribonucleoprotéicos (snRNPs) U1, U2, U4, U5 y U6 se ensamblan secuencialmente para formar dicha maquinaria (Jurica y Moore, 2003). El sitio dador de *splicing* (o sitio 5´) está formado por una única secuencia de 8 nucleótidos. Luego se encuentran tres elementos usualmente contenidos dentro de una región de 40 nucleótidos: el sitio de "ramificación", un trecho rico en pirimidinas y el sitio aceptor (también conocido como sitio 3´). U1 es el encargado de reconocer el sitio dador, U2 el sitio de ramificación, mientras que factores asociados a U2 (U2AF) reconocen el trecho de polipirimidinas (U2AF65) y el sitio aceptor (U2AF35) respectivamente (Fig. 4A).

Se ha mostrado que la relación entre el tamaño del exón y los intrones flanqueantes juega un rol muy importante en el reconocimiento del mismo (Marais et al., 2005) y se han postulado dos modelos de reconocimiento de los sitios de *splicing* (Berget, 1995): i) definición intrónica, cuando el reconocimiento es llevado a cabo a través de la identificación directa de los sitios intrónicos 5´ y 3´ como una unidad de *splicing*. ii) definición exónica, cuando el reconocimiento se produce inicialmente a través de los sitios que delimitan un exón (Fig. 4B).

La definición intrónica es utilizada cuando el tamaño del intrón está dentro del rango 200-250 nucleótidos. A medida que los intrones se vuelven más largos este tipo

de reconocimiento se vuelve ineficiente y comienza a operar preferentemente la definición exónica (Hertel, 2008).

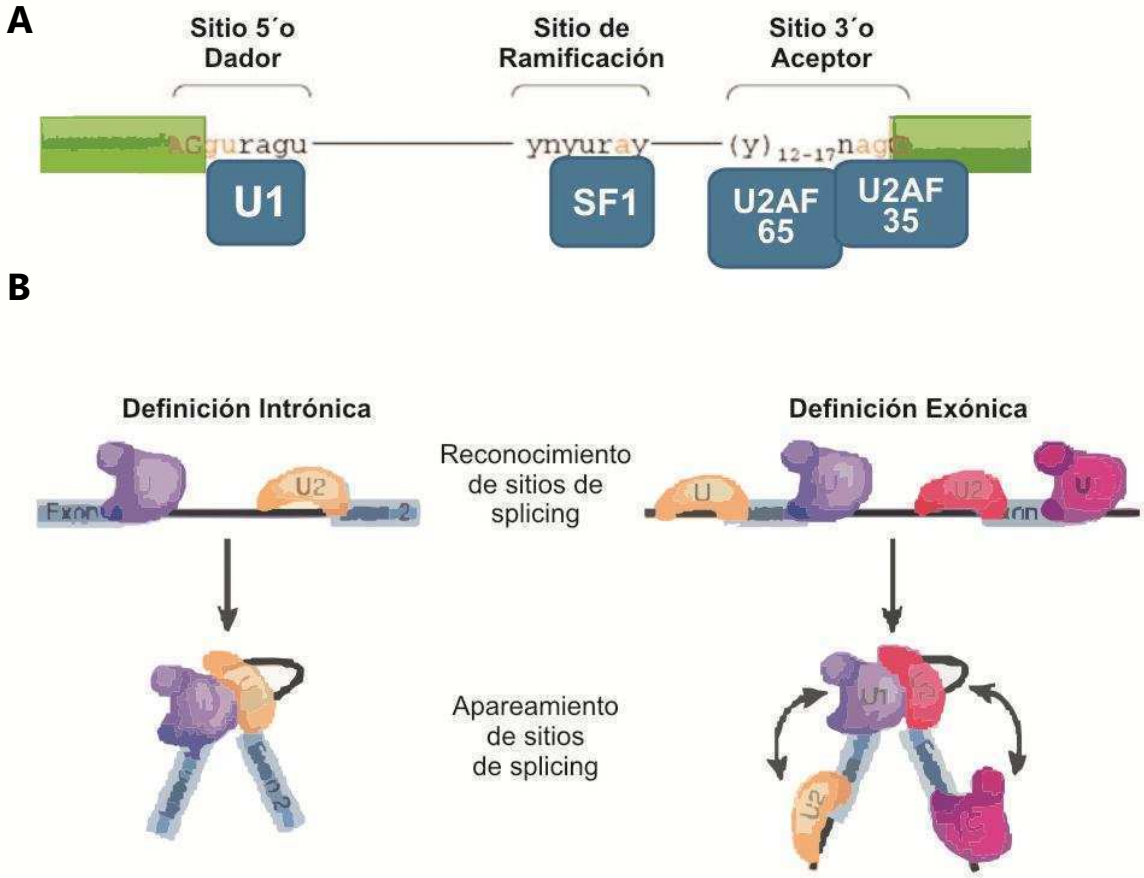


Figura 4. Sitios de empalme y reconocimiento de exones.
A. *Representación de los sitios importantes para el proceso de splicing y las proteínas encargadas de reconocerlos (cajas azules). En amarillo se observan dos exones flanqueando un intrón. Tomado de Schor, I. 2009.*
B. *Los sitios de empalme de intrones con un tamaño menor a 250 nucleótidos son reconocidos a lo largo del intrón (definición intrónica) y los componentes del spliceosoma se ensamblan sobre el intrón. Los sitios de empalme de intrones más largos son reconocidos a través de los exones (definición exónica). Tomado y modificado de Hertel, 2008.*

Independientemente de cual sea el modo de reconocimiento utilizado, el proceso fundamental que debe producirse es la eliminación del intrón mediante el *splicing*. Un mega-complejo dinámico denominado ***"spliceosoma"*** es el que realiza esta tarea (Black, 2003; House y ı ynch, 2008; Staley y Guthrie, 1998). Este proceso fue descubierto por los grupos de Phillip Sharp y Richard Roberts en 1977, valiéndole a

ambos el premio Nobel de Medicina en 1993. Teniendo en cuenta la cantidad de proteínas intervinientes y la complejidad inherente a su funcionamiento, el *splicing* es comparable a la síntesis de proteínas y al inicio de la transcripción.

Como se mencionó anteriormente, durante muchos años la transcripción y el procesamiento del mRNA fueron concebidos como procesos independientes que ocurren de manera continuada en el núcleo celular, aunque separados temporalmente. A través de evidencias bioquímicas, citológicas y funcionales se ha demostrado que las tres reacciones de procesamiento (*capping*, *splicing*, y poliadenilación) del RNA están fuertemente acopladas a la transcripción por la RNA polimerasa II (Bentley, 1999; Hirose y Manley, 2000; Proudfoot, 2000; Proudfoot et al., 2002). El papel central en el acoplamiento de la transcripción y el procesamiento del mRNA lo ocupa el dominio inusual presente en el extremo carboxilo de la RNA polimerasa II, llamado CTD (Fig. 5). En mamíferos este dominio consta de 52 repeticiones del heptapéptido Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (Y-S-P-T-S-P-S), 45 repeticiones en moscas, y 26 en levaduras (Palancade y Bensaude, 2003). Durante el inicio de la transcripción el dominio es hiperfosforilado en su serina 5 (Ser-5) por el factor de transcripción basal TFIIH, posteriormente se produce el arresto de la polimerasa, los factores encargados de producir la caperuza de 7'metil guanosina se asocian al CTD (fosforilado en Ser-5) y modifican el transcripto naciente, posteriormente la proteína pTEFb es reclutada y tras fosforilar al CTD en Ser-2, la transcripción prosigue (Orphanides y Reinberg, 2002b). El *splicing* puede ocurrir tanto co-transcripcionalmente como post-trancripcionalmente, y en algunos casos de ambas maneras. Un buen ejemplo es el de los genes de los anillos de Balbiani en *Chironomus tentans*, donde los primeros intrones son eliminados co-transcripcionalmente, mientras que sus intrones terminales son removidos post-transcripcionalmente (Neugebauer, 2002).

Son numerosos los ejemplos que demuestran la co-transcripcionalidad del *splicing in vivo*, desde la observación al microscopio electrónico de la formación de lazos intrónicos en el RNA naciente durante su transcripción (Beyer y Osheim, 1988) hasta la co-inmunoprecipitación de proteínas que participan en el *splicing* junto al RNA procesado, asociados a la cromatina de genes transcripcionalmente activos

(Gornemann et al., 2005; Kotovic et al., 2003; ı acadie y Rosbash, 2005; ı isterman et al., 2006). También se ha mostrado *in vivo* que la Pol II es capaz de reclutar factores de *splicing* a los focos de transcripción (Misteli y Spector, 1999).

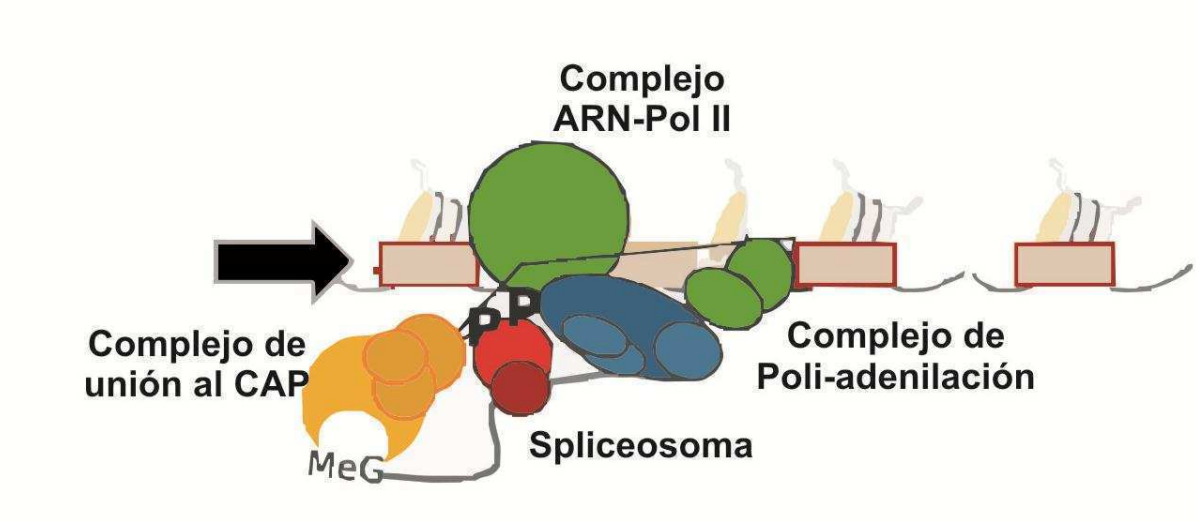


Figura 5. Acoplamiento entre la transcripción y el splicing. *El extremo carboxilo terminal (CTD) de la Pol II fosforilado (verde) recluta diferentes factores de procesamiento del RNA como el factor de unión al Cap (amarillo), factores de splicing (rojo) e incluso factores asociados con el complejo de poli-adenilación (azul).*

Curiosamente, uno de los primeros casos de *splicing* co-transcripcional reportado en humanos fue descubierto en el gen más largo de nuestro genoma (2.400 kb), el de la distrofina (Tennyson et al., 1995). En este mismo sentido, el *splicing* co-transcripcional representa un marco explicativo que ayuda a entender el reconocimiento de los exones y el *splicing* en genes conformados por pequeños exones rodeados por intrones que pueden tener decenas o centenas de kb de longitud (Goldstrohm et al., 2001).

1.1.4 El *splicing* alternativo y su regulación

Hace casi diez años se publicaba el primer borrador del Proyecto del Genoma Humano (PGH), y sorprendía a la comunidad científica con el escaso número de genes estimado, aproximadamente 25.000. Desde ese momento muchos trabajos se han

focalizado en aquellos procesos moleculares capaces de generar diversidad proteica a partir de un número limitado de genes. De esta manera, las miradas se han posado sobre otros personajes que forman parte del "diseño de la vida" más allá del DNA. El *splicing* alternativo es uno de ellos. Antiguamente se creía que este proceso era una rareza encontrada en una docena de genes de mamífero. Sin embargo, ya para el momento en que los resultados del PGH fueron publicados se estimaba que el 35% de los genes humanos podía generar isoformas mediante *splicing* alternativo (Croft et al., 2000). Este porcentaje ha ido creciendo paulatinamente con el correr de los años hasta alcanzar el sorprendente número de 92% según lo ha mostrado el grupo de Chris Burge haciendo uso de la novedosa tecnología de ultra-secuenciación (Wang et al., 2008).

Los exones alternativos generalmente comparten una característica común: presencia de sitios de *splicing* flanqueantes pobremente definidos, es decir, que se alejan de la secuencia consenso. Empero, la presencia de un sitio de *splicing* débil no brinda ninguna información respecto a la tasa de inclusión/exclusión del exón involucrado. La visión más reduccionista acerca de cómo puede regularse un evento de *splicing* alternativo nos muestra, por un lado, la presencia o ausencia de secuencias reguladoras y por el otro, la presencia o ausencia de las proteínas encargadas de reconocer dichas secuencias los que finalmente serán las efectoras de la actividad regulatoria. Así, la regulación del *splicing* alternativo es un proceso altamente complejo donde interviene una gran cantidad de factores y secuencias reguladoras, conformando una red de interacciones que finalmente "decide" el destino de dicho exón (Fig. 6).

Las secuencias reguladoras pueden actuar tanto favoreciendo (*enhancers*) como desfavoreciendo (*silencers*) la utilización de un sitio de *splicing* sub-óptimo determinado (Cáceres y Kornblihtt, 2002). A su vez, la estructura secundaria del mRNA naciente es capaz de favorecer o desfavorecer el reconocimiento de sitio de *splicing* o una secuencia regulatoria (Blanchette y Chabot, 1997; Buratti y Baralle, 2004; Buratti et al., 2004; Graveley, 2005; Jacquenet et al., 2001).

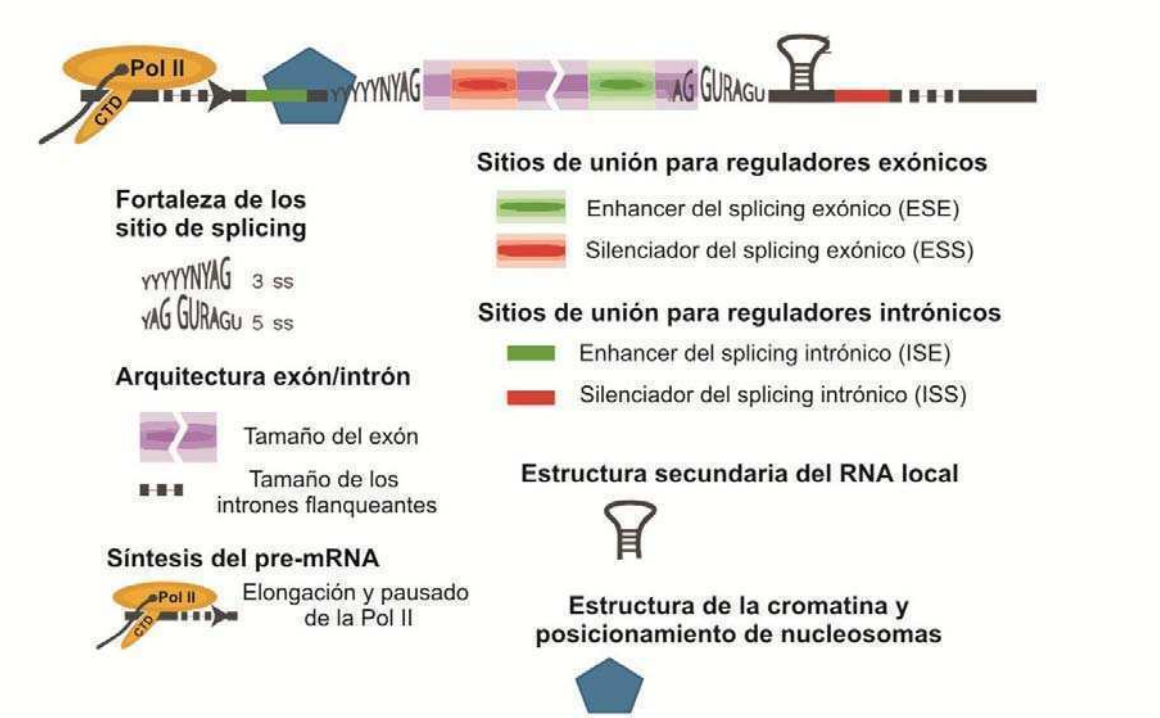


Figura 6. Algunos de los componentes que regulan el splicing alternativo. *El reconocimiento eficiente de un sitio de splicing es mediado por muchos parámetros. Entre ellos se incluye la fortaleza del sitio, la arquitectura exón/intrón, la presencia o ausencia de sitios silenciadores o enhancers, la presencia o ausencia de estructuras secundarias en el ARN, la cromatina y la tasa de elongación de la Pol II. Tomado y adaptado de Hertel, 2008.*

Por otro lado, existen numerosas proteínas que afectan el proceso de *splicing* alternativo por unión directa al mRNA y/o a través de la interacción con proteínas de la maquinaria de *splicing*. Estos reguladores también son capaces de actuar favoreciendo o desfavoreciendo la inclusión de un exón alternativo en el transcripto maduro (Cáceres y Kornblihtt, 2002). No es sorprendente que estas proteínas también muestren funciones en otros pasos del metabolismo del RNA, como la transcripción (ı in et al., 2008), la exportación (Reed y Cheng, 2005) o la traducción (Sanford et al., 2004), pudiendo participar en distintos pasos del metabolismo de un determinado mRNA (Bjork et al., 2009; Blaustein et al., 2005).

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 mRNA (Fededa et al., 2005; ı enasi et al., 2006; Romano et al., 2001), y las evidencias

indican que la influencia de un evento sobre otro se rige de una polaridad 5′ -> 3′: eventos alternativos proximales al promotor ejercen mayor influencia sobre eventos distales que viceversa (Fededa et al., 2005).

Durante los últimos años la investigación se ha focalizado en dos nuevos factores capaces de regular el *splicing* alternativo, los cuales serán abordados en mayor detalle en las siguientes secciones: la tasa de elongación de la Pol II y el estado de la cromatina.

1.1.5 ¿La "calidad" de la transcripción es capaz de afectar el *splicing* alternativo?

A fines de la década del ´90 nuestro grupo inició el camino para intentar responder a esta pregunta mediante la utilización de reporteros de *splicing* alternativo (minigenes) a los cuales se les modificó la secuencia promotora que dirigía su transcripción alternando entre diferentes promotores. Se encontró que efectivamente la "calidad" de la transcripción, en este caso determinada por el tipo de promotor utilizado, era capaz de modificar el patrón de *splicing* alternativo del minigén en cuestión sin afectar su tasa de síntesis. Esto fue observado en diferentes sistemas, bajo la acción de diversos promotores (Cramer et al., 1999; Cramer et al., 1997) o por un mismo promotor con o sin sitios de respuesta a hormonas (Auboeuf et al., 2002). De manera relacionada, se ha encontrado que el reclutamiento diferencial de factores de transcripción y co-activadores a un mismo promotor genera modificaciones en el *splicing* alternativo (Auboeuf et al., 2004a; Auboeuf et al., 2004b; Nogués et al., 2002).

Se han planteado dos modelos, que no son mutuamente excluyentes y que de hecho podrían actuar en paralelo, para explicar cómo la transcripción puede afectar el *splicing* alternativo (Kornblihtt, 2007):

i. Por un lado, el **"modelo de reclutamiento"** plantea que la maquinaria transcripcional podría reclutar factores de *splicing* o co-activadores transcripcionales al mRNA naciente, quienes en última instancia actuarían favoreciendo o desfavoreciendo el reconocimiento de un exón alternativo. De acuerdo con este modelo, el

reclutamiento diferencial llevado a cabo en diversos contextos celulares daría lugar a una amplia variedad de eventos de *splicing* alternativo diferentes (Fig. 7B).

Se han reportado tanto co-activadores reclutados a promotores capaces de regular el *splicing* alternativo (Guillouf et al., 2006; ı ai et al., 1999; Monsalve et al., 2000), como el de factores de *splicing* asociados a la maquinaria transcripcional. Posiblemente uno de los casos mejores estudiados 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).

Otro caso interesante ha sido publicado, mostrando que el reclutamiento selectivo de la proteína "adaptadora" MRG15 a sitios marcados con trimetilación de lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) preferentemente ubicados en algunos eventos de *splicing* alternativo (Fig. 7B), genera el reclutamiento de uno de los represores del *splicing* mejor caracterizados, el *polypyrimidine tract binding protein* (PTB), hacia el transcripto naciente favoreciendo la exclusión de dichos eventos (ı uco et al., 2010).

ii. Por otro lado, el **modelo cinético** sostiene que la tasa de elongación y/o procesividad de la Pol II es capaz de brindar diferentes ventanas temporales para la exposición de sitios de *splicing* capaces de competir entre sí, favoreciendo o desfavoreciendo la inclusión de exones alternativos en el transcripto maduro. ı a idea original fue sugerida por los trabajos de Eperon y colaboradores (Eperon et al., 1988), quienes mostraron una influencia de la transcripción sobre la estructura secundaria del mRNA, lo que a su vez afectaba el *splicing*. Nuestro grupo ha sumado evidencias sobre la competencia de sitios de *splicing* débiles contra sitios fuertes mediada por la velocidad de síntesis del RNA (Nogués et al., 2003).

ı a idea subyacente es que debido a que el splicing es un proceso co-transcripcional y dinámico, mientras el RNA precursor es sintetizado, diversas proteínas comienzan a unirse a la vez que la maquinaria de *splicing* inicia su procesamiento. El tiempo que transcurra desde que una secuencia es sintetizada y por lo tanto expuesta a las proteínas y complejos del entorno, marcará en gran parte su destino final. Si existen dos sitios de splicing en competencia, cuanto mayor sea el tiempo que transcurra entre

la síntesis del primero y la síntesis del segundo, mayor será el tiempo para que la maquinaria de splicing pueda reconocer y marcar al primero favoreciendo su identifica-

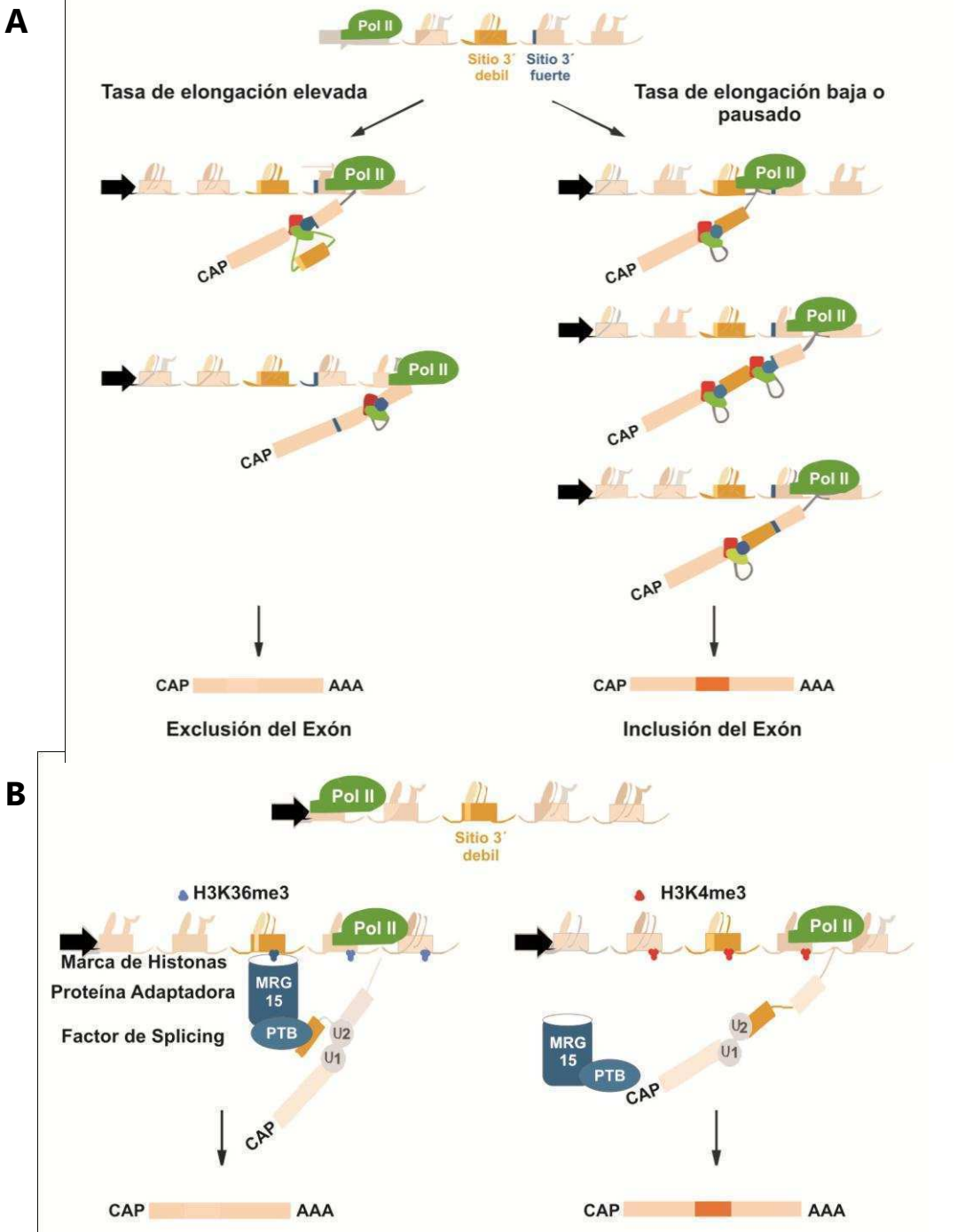


Figura 7. Modelo de acoplamiento cinético vs Modelo de reclutamiento.
A. *Una elevada tasa de elongación favorece la exclusión de un evento de splicing alternativo (naranja). Una disminución de la tasa de elongación o pausado brinda más tiempo a la maquinaria de splicing para detectar el sitio de empalme débil (rojo) favoreciendo la inclusión del exón en el transcripto maduro.*
B. *Las modificaciones de las "colas" de las histonas a lo largo de un gen determinan el reclutamiento y la unión de factores de splicing específicos vía proteínas adaptadoras encargadas de "leer" dichas modificaciones. En este caso PTB es reclutado a través de MRG15 favoreciendo la exclusión del exón alternativo.*

ción en detrimento del segundo (Fig. 7A). Muchas son las evidencias que indican que la tasa de elongación afecta el *splicing* alternativo, desde las acciones de distintos factores de transcripción (Kadener et al., 2001; Nogues et al., 2002), pasando por el efecto de secuencias responsables de pausas transcripcionales (Roberts et al., 1998; Robson-Dixon y Garcia-Blanco, 2004), siguiendo por la influencia de la estructura cromatínica (Batsché et al., 2006; Kadener et al., 2002), hasta las pruebas más sólidas y directas de este fenómeno obtenidas a partir de la utilización de RNA polimerasas mutantes. El ejemplo más concreto es la utilización de una mutante de la subunidad mayor de la Pol II denominada "C4", la cual posee una menor tasa de elongación y es capaz de incrementar el reconocimiento del exón EDI del gen de la fibronectina (de la Mata et al., 2003) mediante el mismo modelo. Anteriormente se creía que esa ventana temporal entre la síntesis del primer y segundo sitio de empalme era aprovechada por la maquinaria de *splicing* para efectivamente producir el corte del primer intrón favoreciendo así la inclusión del exón alternativo en lo que se conoce como "first come, first serve". Sin embargo un estudio reciente de nuestro grupo ha mostrado que, al menos para este ejemplo, la Pol II le daría más tiempo a la maquinaria de *splicing* para que "marque" y comprometa al primer sitio sintetizado por sobre el segundo (de la Mata et al., 2010), aunque este último se procesaría en primer lugar.

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 mRNA. 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 et al., 2005).

1.1.6 El gen de la fibronectina como modelo de estudio del *splicing* alternativo

La fibronectina es una glicoproteína de elevado peso molecular y dominios múltiples, encontrada en tejido conectivo, adherida a la superficie celular, en el plasma u otros fluidos corporales. Interactúa con una enorme variedad de macromoléculas incluidos algunos componentes del citoesqueleto, la matriz extracelular (MEC), receptores en la superficie celular de fibroblastos, neuronas, fagocitos y bacterias. La fibronectina, además, puede interactuar consigo misma adquiriendo una estructura fibrilar. Además ha sido reportada su unión a varias moléculas pequeñas como iones Ca^{++} y azúcares. En cuanto a su función, está involucrada en muchos procesos celulares, abarcando desde la reparación de tejidos, coagulación sanguínea, migración y adhesión celular, hasta procesos tan complejos como el cáncer (Akiyama et al., 1995; Kornblihtt et al., 1996).

Básicamente existen dos formas de FN: i) insoluble dimérica formando fibrillas en la MEC, o ii) como un dímero soluble unido por puentes disulfuro principalmente encontrada en el plasma. La primera es sintetizada en los fibroblastos, condrocitos, células endoteliales, macrófagos y algunas células epiteliales; mientras que la segunda es sintetizada en los hepatocitos. Ambas poseen un peso molecular cercano a los 250 kDa.

La importancia de la fibronectina en el correcto desarrollo de los mamíferos es fundamental y ha quedado demostrada por el efecto letal en ratones Knock-out para este gen (George et al., 1993). Además, Muro y colaboradores (Muro et al., 2003) han demostrado que ratones modificados por ingeniería genética, de manera que el exón alternativo EDA sea incluido o excluido constitutivamente, sufrieron una cicatrización de heridas de la piel anormal y un tiempo de vida media de las líneas modificadas sustancialmente menor a los ratones control.

En cuanto a su estructura tridimensional, podría decirse es similar a un vástago, compuesta por tres tipos diferentes de módulos homólogos y repetitivos, denominados de Tipo I, II y III. Estos módulos forman parte de la misma cadena polipeptídica y pueden ser imaginados como "cuentas en un collar", cada una unida a la siguiente por un pequeño conector (Fig. 8). Existen 12 repeticiones del módulo de tipo I, 2 del tipo II y 17 del tipo III. Cada módulo constituye una unidad plegada independiente (dominio). La secuencia de aminoácidos de estos módulos se encuentra altamente conservada.

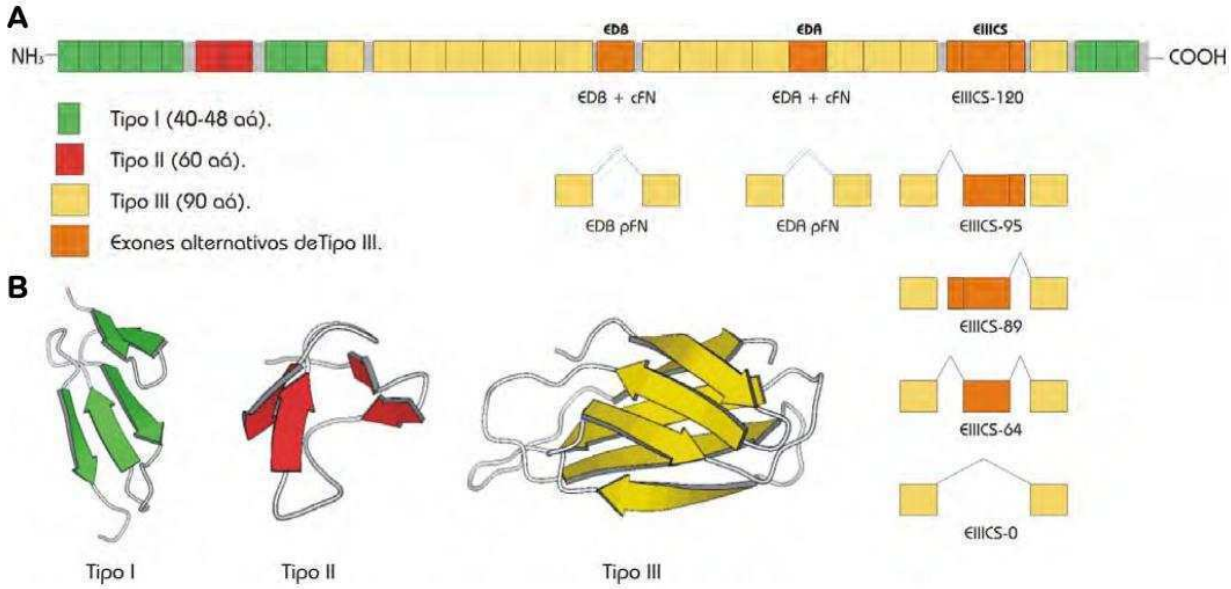


Figura 8. Estructura de la fibronectina y sus isoformas.
A. *En la representación puede apreciarse la estructura primaria de la fibronectina y las 3 regiones que sufren splicing alternativo (EDA, EDB y IIICS).*
B. *Modelo tridimensional de los módulos de tipo I, II y III.*
(+) inclusión. cFN: fibronectina celular; pFN: fibronectina plasmática

El genoma haploide humano, al igual que muchos otros mamíferos posee una única copia del gen de la fibronectina (Kornblihtt et al., 1983). Dicho gen tiene una extensión de 75 kb, 50 exones y la transcripción es iniciada a partir de un único promotor. El *splicing* alternativo de la fibronectina fue descubierto de manera independiente por dos grupos de investigación a principios de la década del '80 (Kornblihtt et al., 1984; Schwarzbauer et al., 1983), y desde ese momento ha sido "un

modelo clásico" de trabajo en dicha área, además de ser utilizado para ilustrar el valor adaptativo del barajado de exones.

El transcripto primario de la FN puede sufrir *splicing* alternativo en tres regiones independientes denominadas EDI (Extra Domain I) o EDA, EDII (Extra Domain II) o EDB y III-CS (Type III Connecting Segment), dando lugar a 20 polipéptidos diferentes en humanos, 8 en pollo y 12 en rata (Kornblihtt et al., 1996). ı as tres regiones involucran exones codificados por repeticiones de tipo III y su regulación es específica de tejidos y está íntimamente ligada al desarrollo. Por ejemplo, en la FN del hígado adulto se encuentran ausentes las secuencias correspondientes a EDI y EDII, mientras que todos los mRNA embriónicos de FN los contienen. EDA es incluido en la fibronectina celular, principalmente en fibroblastos y otros tipos celulares. En la MEC de los tejidos adultos está pobremente representado a diferencia de lo que ocurre en tejidos con alta proliferación como embriones y células cancerosas.

1.2 Cromatina y código de histonas

1.2.1 Conceptos básicos

La cromatina es un polímero que provee una plataforma dinámica capaz de controlar los diferentes procesos involucrados en el flujo de información genética. Como se ha mencionado anteriormente, la unidad básica de la cromatina está constituida por el nucleosoma, octámero de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) sobre el cual se enrollan casi 2 vueltas de DNA (Fig. 9). Diferentes disposiciones de los nucleosomas generan, básicamente, dos tipos de cromatina: eucromatina (laxa) y heterocromatina (compacta).

Cada histona posee un dominio globular central que media la interacción entre las diferentes histonas y que organiza la unión del DNA al nucleosoma. Además, cada histona posee un dominio amino-terminal especialmente rico en aminoácidos básicos que se extienden más allá de la superficie de dicho nucleosoma. H2A posee un extremo carboxilo terminal adicional de aproximadamente 37 aa que también protruysobresale fuera del núcleo de histonas.

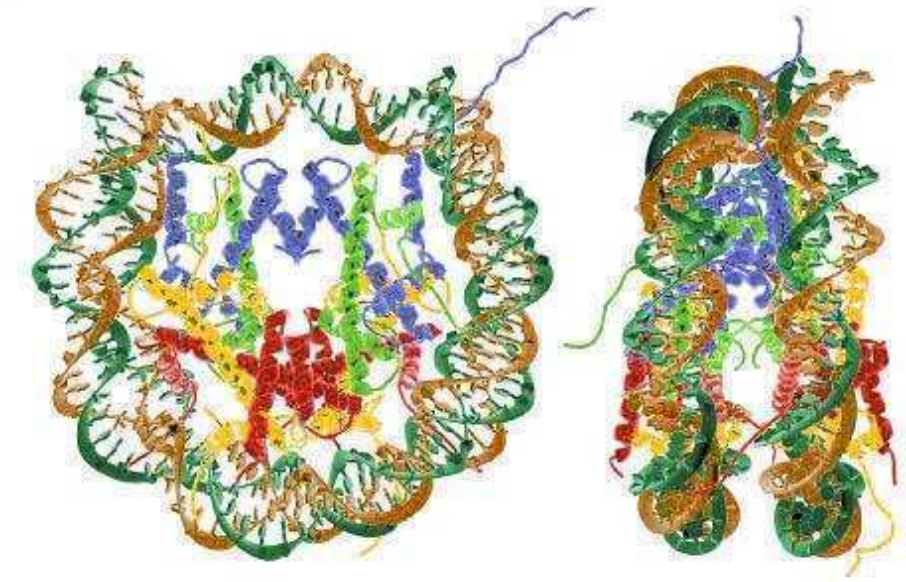


Figura 9. Estructura tridimensional del nucleosoma.
Pueden apreciarse las casi dos vueltas del DNA (doble hebra en amarillo y verde) alrededor del "core" de histonas, simbolizadas con su estructura 3D en azul, verde, rojo y amarillo, en el centro de la imagen de la izquierda. También pueden observarse las "colitas" de las histonas sobresaliendo por fuera del nucleosoma.

Estas "colas" de histonas no contribuyen demasiado en la estructura individual del nucleosoma, pero sí son muy importantes y desarrollan un papel central controlando el plegamiento de éstos y conformando las diferentes estructuras de orden superior de la cromatina.

1.2.2 Modificaciones post-traduccionales de las histonas: código de histonas

Las histonas están sujetas a una enorme cantidad de modificaciones post-traduccionales, que incluyen acetilación y metilación de lisinas (Lys, K) y argininas (Arg, R), fosforilación de serinas (Ser, S) y treoninas (Thr, T), ubicuitinación, ribosilación y sumoilación de lisinas. Pero además debemos considerar que cada residuo de Lys puede aceptar uno, dos o tres grupos metilo, mientras que cada Arg puede aceptar uno o dos grupos, complejizando aún más este fenómeno (Peterson y Laniel, 2004).

Hace casi una década se propuso que las combinaciones de modificaciones podrían generar un "código de histonas", que sería leído por diversas proteínas encargadas de transformar ese lenguaje químico en variadas funciones biológicas como la activación o silenciamiento de la transcripción, la diferenciación celular, la replicación, el estadio del ciclo celular, recombinación, entrada en apoptosis, etc. (Jenuwein y Allis, 2001; Orphanides y Reinberg, 2002a; Strahl y Allis, 2000; Turner, 2000).

La combinación precisa de modificaciones histónicas en un locus determinado puede ser asignada a la combinación de dos efectos: la direccionabilidad de las enzimas modificadoras de las histonas (HAT, acetilasas de histonas; HDAC, desacetilasas de histonas; HMT, metiltransferasas de histonas, etc.) hacia un locus específico, por un lado, y la especificidad propia (inherente al sustrato) de dicha enzima, por otro.

En el caso de la activación de la transcripción se considera de suma importancia la interacción de las enzimas modificadoras con reguladores transcripcionales dependientes de secuencias del ADN, como por ejemplo el complejo la interacción de SAGA (un complejo HAT) con varias proteínas activadoras específicas de genes en levaduras (Peterson y ı aniel, 2004). Sin embargo, no puede ser descartado que muchos de los activadores, a su vez, tengan algún tipo de actividad modificadora de las histonas.

En cuanto al silenciamiento, normalmente es utilizada una estrategia muy diferente que involucra a RNAs no codificantes como disparadores que son utilizados para identificar mediante apareamiento con transcriptos nacientes las regiones a silenciar. ı as estrategias de silenciamiento serán abordadas con más detalle en la sección siguiente (1.3).

Volviendo a la hipótesis del código de histonas, puede decirse que ésta descansa en la suposición de que deberían existir dos tipos de actividades bioquímicas (Fig. 10): (1) enzimas capaces de escribir el código, agregando o quitando modificaciones en aminoácidos específicos de los extremos amino-terminales de las histonas, y (2) proteínas capaces de interpretar dicho código, las cuales deberían interactuar con histonas (portadoras de un patrón de modificaciones específico y preciso) y con otros complejos proteicos capacitados para desencadenar diversas funciones biológicas (Dutnall, 2003).

En favor del código de histonas han sido descubiertas muchas enzimas capaces realizar estas modificaciones, y por otro lado, muchas proteínas capaces de interpretarlas (Jenuwein y Allis, 2001; ı egube y Trouche, 2004; Morillon et al., 2003b). Más aún, se han reconocido diferentes dominios proteicos encargados de modificar aminoácidos específicos de las histonas como los SET (dominios de metilación) y los HAT (dominios de acetilación), y además, también se han identificado dominios de reconocimiento y unión a histonas con ciertas modificaciones específicas. ı os denominados cromodominios reconocen histonas metiladas en H3K9. Por su parte los

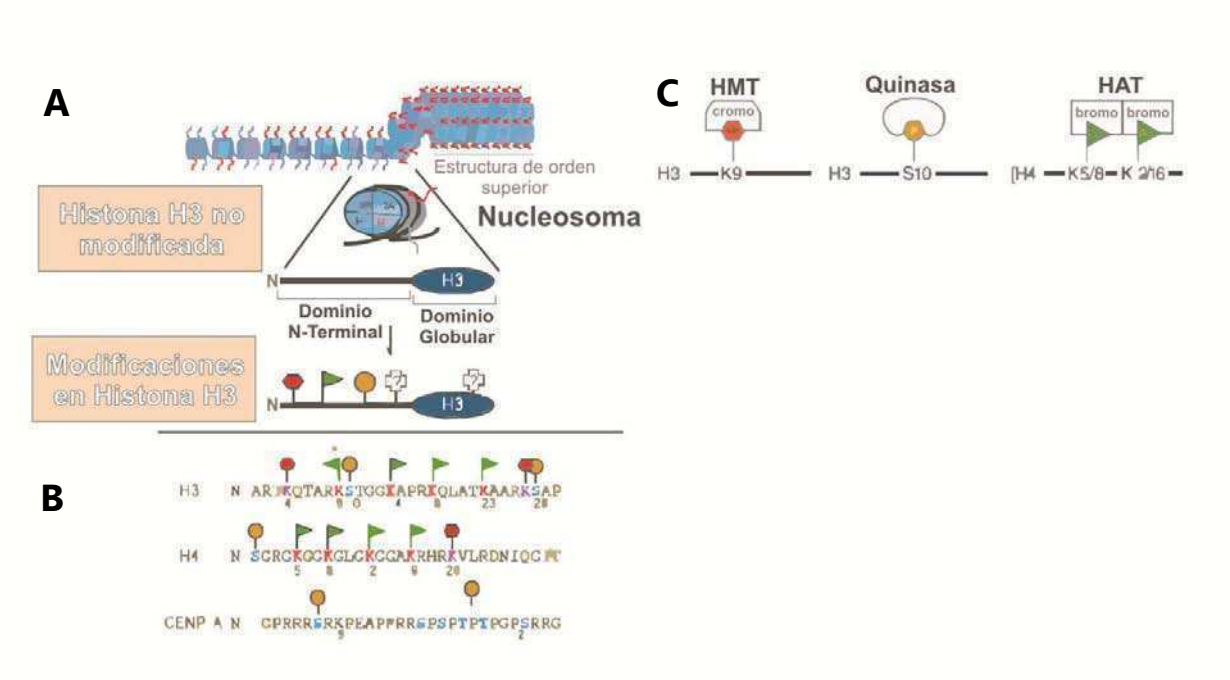


Figura 10. Código de histonas.
A. *Ensamblaje de estructura de orden superior de la cromatina a partir del monómero (nucleosoma). Se destacan el dominio globular (círculo celeste) y la cola (extremo rojo) de las histonas, además de las diferentes modificaciones posibles: metilación (rombo amarillo), acetilación (triangulo verde) y fosforilación (círculo blanco).*
B. *Algunas de las posibles marcas sobre los extremo amino-terminales de la histona H3 y H4.*
C. *Las marcas y las proteínas adaptadoras que pueden reconocerlas de acuerdo a la presencia de dominios particulares como los cromodominios (lisinas metilada) y los bromodominios (lisinas acetiladas).*

bromodominios reconocen histonas acetiladas en H3 y H4 (Jenuwein y Allis, 2001; Richards y Elgin, 2002). Muchos bromodominios se encuentran localizados en los complejos modificadores de la cromatina dependientes de ATP, como la familia SWI2/SNF, ISWI y Mi-2 (Narlikar et al., 2002).

Durante los últimos 5 años nuevas investigaciones en el ámbito del código de histonas han agregado capas de complejidad adicionales, indicando la existencia de un lenguaje más que un código (ı ee et al., 2010), donde ahora las combinaciones de marcas de histonas se asocian con diferentes funciones biológicas de manera dependiente del contexto. Así, el orden y el mecanismo por el cual se generan o "borran" las marcas de histonas es sumamente importante para la interpretación que la maquinaria celular deba realizar. Un ejemplo es la fosforilación en serina 10 de la histona H3 (H3S10p) realizada por PIM1 en el *enhancer* y MSK en la región promotora

del gen FOSı 1, ambas marcas son reconocidas por la proteína 14-3-3, que a su vez recluta a la HAT MOF que consecutivamente produce la acetilación de lisina 16 en la histona H4 (Fig. 11). Esta acetilación terminará reclutando a BRD4 y P-TEFb para finalmente producir la activación del gen (Zippo et al., 2009). Sin embargo estas modificaciones de histonas, en teoría necesarias para la activación de genes, han sido agregadas artificialmente produciendo un reclutamiento de la Pol II pero siendo insuficientes para generar la activación transcripcional, denotando la necesidad de un determinado contexto celular y eventos de señalización ligados necesarios para emular la actividad completa (Wang et al., 2009).

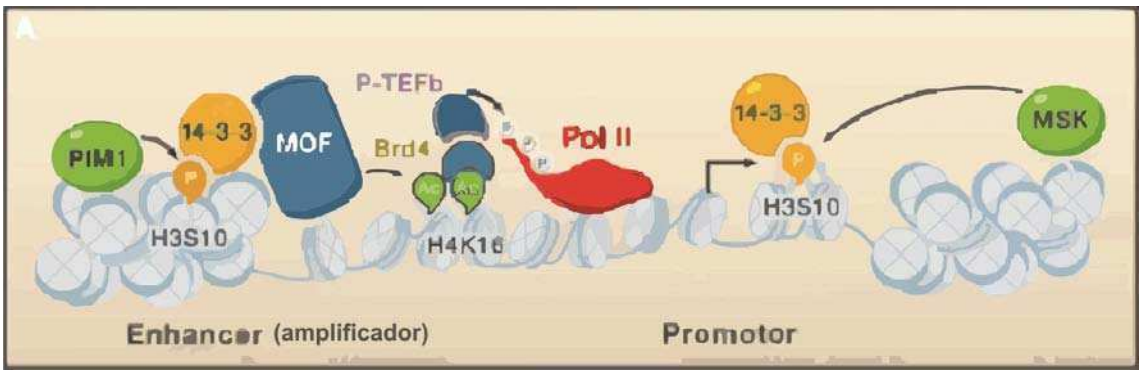


Figura 11. Un lenguaje de modificaciones.
La activación del gen FOSL mediada por suero requiere de la unión de PIM1 al enhancer. Una vez allí PIM1 (una quinasa) produce la fosforilación de serina 10 (H3S10P) creando un sitio de unión para la proteína 14-3-3, la cual a su vez se asocia con MOF que finalmente acetilará H4K16. A su vez, esta modificación puede ser detectada por Brd4, a través de su bromodominio, que reclutará a P-TEFb la quinasa encargada de fosforilar el CTD de la Pol II para permitir el inicio de la transcripción. Sin embargo, rápidamente después de la estimulación con suero la proteína MSK fosforila serina 10 en el promotor, aunque esta vez MOF no será reclutado. Probablemente el momento, la ubicación y el contexto definen que la misma marca durante el mismo proceso actúe de manera diferente. Más que un código… un lenguaje. Tomado de Wang, et. al. 2009.

1.2.3 Heterocromatina y silenciamiento

Determinados patrones de modificación particulares en las histonas han sido asociados con distintos estados de la cromatina, tanto sea con regiones de gran compactación (heterocromatina) y silenciamiento génico, como con regiones laxas donde se encuentran mayoritariamente los genes activos (eucromatina).

Dentro de la primera categoría, las modificaciones encontradas con más frecuencia y amplia distribución han sido las metilaciones en lys 9/lys 27 de la histona H3 y en lys 20 en la histona H4 (Fischle et al., 2003; lachner et al., 2003; Schotta et al., 2004).

Como ya fue mencionado, los residuos de lisina pueden ser mono, di o trimetilados extendiendo así del lenguaje de las histonas. De hecho, diferencias entre di y trimetilación en H3K4 y H3K9 han sido asignadas como relevantes para la regulación de la transcripción o el silenciamiento génico mediado por el complejo Polycomb (Grewal y Moazed, 2003; Santa Rosa et al., 2002; Schneider et al., 2004; Schotta et al., 2004).

las histonas con H3K9me3, H3K27me1 y H4K20me3 normalmente se encuentran asociadas a regiones centroméricas, pericentroméricas, conjuntamente con algunos loci heterocromáticos. Estas marcas se encuentran asociadas al silenciamiento de retroposones, transposones y algunos genes en organismos que van desde las levaduras hasta los mamíferos (Kirmizis et al., 2004; Schotta et al., 2004). Por otro lado, han sido descriptas como "marcas" del *imprinting* la ya mencionada H3K27me3 conjuntamente con la H3K9me2 (Okamoto et al., 2003; Plath et al., 2003; Silva et al., 2003).

En levaduras la formación de una región heterocromática comienza con la unión de Cir4 (una metiltransferasa específica de H3K9) a centros de nucleación, sitios donde se inicia el "señalización" de una región heterocromática. Esta modificación inicial es mediada por la maquinaria de interferencia de RNA, ya que la formación de RNA pequeños de doble cadena a partir de secuencias repetitivas en la región cenH actuará como disparador del evento. Allí comienza a realizarse la metilación de las histonas en H3K9. Seguidamente, Swi6 (homologo a HP1) reconoce esta marca mediante su cromodominio y comienza a esparcir el silenciamiento del locus. Swi6 además se encarga de reclutar nuevas proteínas como Cir4 (amplificando el efecto) y HDACs (Hall et al., 2002a). la expansión de la zona heterocromática se produce hasta alcanzar un "*insulator*" o "*boundary*", sitios que delimitan las regiones eucromáticas/

heterocromáticas. Los *insulators* han sido caracterizados por su propiedad de bloquear la interacción entre promotores y *enhancers* de genes diferentes, evitando así que los genes pueden recibir señales inapropiadas provenientes del entorno genómico que los rodea (Bell et al., 2001; Fahrner y Baylin, 2003; West et al., 2002). Se ha propuesto que las regiones separadas por los *insulators* son bioquímicamente diferentes constituyendo compartimientos locales de cromatina muy condensada (heterocromatina), y dominios de expresión génica (eucromatina), donde las fibras cromáticas se posicionan en loops por fuera de los compartimientos heterocromáticos (Labrador y Corces, 2002). Los insulators son reconocidos por proteínas denominadas CTCF. Pueden ser modificados químicamente, y como consecuencia CTCF dejaría de unirse y la región heterocromática se extendería hasta el próximo insulator, expandiéndose de esta manera. Mientras que cuando CTCF se encuentra unido al boundary impide que Swi6 y otras proteínas encargadas de mantener las "marcas" heterocromáticas avancen más allá de dicho sitio (Grewal y Moazed, 2003; Hall et al., 2002b; Labrador y Corces, 2002).

Se cree que en mamíferos el mecanismo es básicamente el mismo, pero a diferencia de lo que ocurre en levaduras una de las principales proteínas encargadas de esparcir el silenciamiento es HP1 (*Heterochromatin Protein 1*). Sin embargo lo más interesante, es que se han identificado muchos genes que pueden ser silenciados por este mecanismo, donde los promotores servirían como sitios de nucleación, y a partir de estos se propagaría el silenciamiento (Ayyanathan et al., 2003; Bastow et al., 2004; Fahrner y Baylin, 2003). La vía de interferencia por RNA y el TGS también serían piezas fundamentales de este modelo.

Finalmente, la metilación del DNA en citosina, es otra «señalización» de regiones heterocromáticas con genes silenciados, normalmente asociada con H3K9me3 (Richards y Elgin, 2002).

1.2.4 Eucromatina y genes activos

Ciertas modificaciones también han sido asociadas a la presencia de genes activos. Además de las clásicas acetilaciones, se han detectado H3K4me 2, H3K4me3, H3K36me3 y H3K79me2.

En realidad la acetilación fue la primera marca en ser caracterizada como asociada a transcripción activa, y se creía que su función era neutralizar las cargas positivas de los grupo amino, debilitando la interacción entre los nucleosomas y el DNA y desarmando su estructura (Ito et al., 2000; Protacio et al., 2000). De acuerdo a esta concepción, no importaba que residuos fueran modificados, ya que la sumatoria de acetilaciones y cargas reprimidas era la fuente de su actividad. Evidencias posteriores han mostrado que la acetilación no siempre está asociada a transcripción activa y que el "efecto de cargas" no explica la función de muchas de estas modificaciones (Gilbert et al., 2004; Kurdistani et al., 2004). Así, con el correr del tiempo fue creciendo la visión según la cual modificaciones particulares se asocian a funciones definidas (para una revisión ver Shahbazian y Grunstein, 2007). Por ejemplo, la acetilación en lisina 16 de histona H4 (H4K16ac) actúa desorganizando las interacciones entre distintos nucleosomas necesarias para formar estructuras cromatínicas de orden superior (Shogren-Knaak et al., 2006).

Se ha identificado que los niveles de H3K4me2 y H3K4me3 son muy bajos en las regiones 3' de genes activos, siendo muy altos en las regiones 5' y promotores. Por el contrario, H3K36me3 se encuentra fundamentalmente enriquecida en las regiones 3´ de genes activos (Barski et al., 2007).

Por su parte, H3K79me2 ha sido reportada como una marca asociada en forma exclusiva a promotores de genes activos y fundamentalmente promotores bidireccionales (Im et al., 2003; Seila et al., 2008).

También ha sido descripta la fosforilación en H2B S33 como una marca relacionada con genes activos. En este caso, H2B sería fosforilada por la actividad del CTK (dominio quinasa carboxilo-terminal) de la subunidad TAF1 del factor general de la transcripción TFIID, en el promotor durante el inicio de la transcripción (Maile et al., 2004).

Durante los últimos años una explosión de trabajos publicados ha mostrado que el posicionamiento de nucleosomas al igual que algunas marcas de histonas particulares se encuentran enriquecidos en exones como H3K36me3 o H3K27me2, pero fundamentalmente en exones alternativos (Andersson et al., 2009; Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009). Un estudio posterior ha señalado que este panorama es aún más complejo, donde el patrón de marcas asociado con los exones-intrones o con el proceso de *splicing* es dependiente del contexto y tipo celular (Dhami et al., 2010).

1.2.5 Cromatina y *splicing* alternativo

Ciertas modificaciones también han sido asociadas a la presencia de genes activos. Además de las clásicas acetilaciones, se han detectado H3K4me2, H3K4me3, H3K36me3 y H3K79me2.

Una de las primeras evidencias que sugerían un rol de la cromatina sobre el splicing alternativo fue establecida en 1991 (Adami y Babiss, 1991) cuando encontraron que dos copias del genoma del adenovirus dentro de un mismo núcleo celular daban lugar a RNAs con distintos patrones de splicing alternativo. Infecciones sucesivas de dos genomas virales distinguibles resultaron en la presencia simultánea de un genoma replicado y uno no replicado, de manera que cada uno generaba variantes de splicing diferentes del gen E1a. Dado que la diferencia residía en las propiedades del molde del DNA, los autores especularon que las bases moleculares del cambio debían yacer en la organización cromatínica diferencial adquirida tras la replicación del DNA. Si la replicación viral promoviese una estructura cromatínica más compacta que a su vez redujese la tasa de elongación de la Pol II, se le daría más tiempo a la maquinaria de splicing para ensamblar los complejos necesarios sobre el dador de splicing ubicado río arriba, favoreciendo su uso en detrimento del ubicado río abajo, generando así una isoforma más corta. Años más tarde Manuel de la Mata demostró que efectivamente este era el caso (de la Mata et al., 2003).

La observación realizada sobre el adenovirus fue una pista que posteriormente permitió entender la influencia del contexto cromatínico sobre splicing alternativo de

minigenes transfectados transitoriamente. Se sabe que estos minigenes ensamblan un contexto cromatínico (Cereghini y Yaniv, 1984; Tong et al., 2006), cuya compactación se incrementa luego de la replicación. En nuestro laboratorio se confirmó que la replicación favorece una cromatización más compacta del reportero de splicing alternativo generando una menor tasa de elongación (Kadener et al., 2001), la cual a su vez, ocasionó un aumento de la inclusión del exón alternativo utilizado en dicho estudio. La idea fue reforzada tras encontrar que la tricostatina A (TSA), un potente inhibidor de desacetilasas de histonas, favoreció la exclusión de exones alternativos cuya inclusión había sido estimulada por una baja tasa de elongación.

De todas formas, los experimentos realizados sobre minigenes eran insuficientes para concluir un rol general de la cromatina sobre el splicing. La demostración de que cambios a nivel de la cromatina podían afectar el splicing alternativo de un gen endógeno fue aportada por Batsché y colaboradores (Batsché et al., 2006) quienes estudiaron el mecanismo por el cual el factor remodelador de la cromatina SWI/SNF es capaz de regular el splicing alternativo del gen CD44. SWI/SNF promueve la inclusión en el mRNA maduro de un bloque de 10 exones alternativos ubicados en el centro del gen. La subunidad Brahma (Brm) de SWI/SNF interacciona con la Pol II, los factores de splicing snRNPs U1 y U5, y la proteína de unión al RNA Sam 68. Esta última se une a un elemento regulador del splicing presente en la región variable del gen CD44, la cual se sabía que estimula la inclusión de dicha región mediante la activación de las quinasas de la vía ERK-MAP. El complejo macromolecular se acumula sobre el gen CD44, con un aumento marcado sobre la región de splicing alternativo y causando un frenado de la Pol II, lo cual favorece la inclusión de los exones variables de acuerdo al modelo de acoplamiento cinético.

Más recientemente y gracias a la enorme cantidad de información disponible tras la realización de experimentos a nivel genómico de ultrasecuenciación de DNA generados tras la digestión con nucleasa micrococal y posterior aislamiento de mononucleosomas, se ha ampliado la visión del rol de la cromatina sobre la regulación del *splicing* alternativo. Así, varios artículos publicados durante el año 2009 han dado cuenta del papel primordial que ejercen el posicionamiento de nucleosomas y las

diferentes marcas de histonas asociadas con la arquitectura exón/intrón sobre la regulación del *splicing* (Andersson et al., 2009; Hon et al., 2009; Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Nahkuri et al., 2009; Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009).

La idea detrás de estos trabajos es que sí el splicing ocurre co-transcripcionalmente, el pausado de la transcripción como consecuencia de barreras generada por nucleosomas bien posicionados en cercanías a sitios de *splicing* débiles, le daría más tiempo a la maquinaria de *splicing* para poder identificarlos y favorecer su inclusión. En el caso de exones constitutivos, esto podría ser determinante para ayudar a detectarlos cuando están localizados en medio de grandes "océanos" intrónicos (Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009).

1.3 Interferencia por RNA

1.3.1 Los RNA pequeños ingresan al campo

A principios de la década del 90 Richard Jorgensen y colaboradores realizaron una observación curiosa. Intentando aumentar la pigmentación de Petunias mediante la sobre-expresión del gen de la chalcona sintasa (CSH) involucrado en la biosíntesis de antocianinas, se encontraron con el efecto opuesto: las plantas transgénicas eran blancas (Napoli et al., 1990). Inesperadamente, observaron una inhibición de la expresión del gen CSH cercana a las 50 veces. Si bien no pudieron determinar el mecanismo que conllevaba a dicho silenciamiento hipotetizaron que la metilación del DNA podría estar involucrada.

Cinco años más tarde Kempheus y Guo intentaban silenciar el gen *par-1* en *C. elegans* con el fin de averiguar su función mediante la utilización de una secuencia antisentido. Tal cual esperaban, la introducción de dicha secuencia produjo el *knockdown* del gen *par-1*, sin embargo e inesperadamente, la secuencia sentido también fue capaz de silenciar del gen (Guo y Kemphues, 1995).

Finalmente el gran salto en el descubrimiento de la hoy llamada "vía de interferencia por RNA" (RNAi) lo dieron Andrew Fire y Craig Mello (galardonados con el premio Nobel de Medicina o Fisiología en el año 2006) en trabajos realizados también en *C. elegans*. En este caso los investigadores inyectaron RNA pequeños (siRNAs) de doble cadena con secuencias del gen *unc-22*. Los siRNAs inyectados fueron capaces de generar un silenciamiento sumamente eficiente de dicho gen, pero sólo cuando ambas hebras eran utilizadas al mismo tiempo. Los investigadores pudieron observar que además este efecto aun se mantenía en la siguiente generación de gusanos (Fire et al., 1998).

Una vez encontrado el fenómeno la comunidad científica se focalizó en la búsqueda de los actores principales y del mecanismo de acción.

La vía de interferencia por RNA fue posteriormente encontrada en levaduras, plantas y animales. Inicialmente se la describió como un mecanismo de defensa

genómico, una suerte de sistema inmune primitivo capaz de proteger la integridad del genoma ante la actividad de algunos virus, transposones y otros elementos genómicos transponibles (Plasterk, 2002).

Durante la siguiente década cientos de artículos publicados en todo tipo de revistas científicas inundaron las páginas con contenidos asociados a la flamante y novedosa vía que en plantas fue llamada PTGS (por *post-transcriptional gene silencing*). Allí también fueron detectados RNA pequeños, de aproximadamente 25 nucleótidos, como disparadores de una vía de defensa contra RNA viral y endógeno (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Por otro lado, en *Drosophila melanogaster* se encontró que los RNA pequeños se asociaban a un multi-complejo efector del silenciamiento al cual se lo llamó RISC (*RNA induced silencing complex*), a la vez que se identificó una enzima encargada de producir el corte de los RNA precursores largos de doble cadena en RNAs de doble cadena pequeños (21-25 nucleótidos). Se la llamo Dicer (DCR), una RNA nucleasa de tipo III con un dominio helicasa (Bernstein et al., 2001; Zamore et al., 2000).

Al mismo tiempo y en la misma especie otra nucleasa fue identificada, ésta era capaz de degradar mRNA con secuencias homologas a los siRNAs transfectados previamente en *Drosophila* (Hammond et al., 2000). En 2004, fue el grupo de Greg Hannon el que completó este estudio identificando a esta proteína, «la» efectora del silenciamiento llevado a cabo por RISC, se trataba de Argonauta 2 (AGO2) (ı iu et al., 2004; Song et al., 2004).

A su vez, se ligó al silenciamiento de secuencias repetitivas en *Schizosaccharomyces pombe* mediante la vía de interferencia por RNA con la presencia de metilación del DNA y de H3K9 y la formación de estructuras heterocromatínicas (Martienssen, 2003). A este proceso, que también fue encontrado en plantas, moscas y mamíferos se lo llamo TGS (por *transcripcional gene silencing*). RNAs no codificantes, junto con RNAs pequeños son capaces de direccionar y disparar la actividad de maquinaria de silenciamiento con la presencia de dimetilación de la histona H3 en lisina 9 (H3K9me2) o la trimetilación de la histona H3 en lisina 27 (H3K27me3). Estas marcas servirían para el reclutamiento de diferentes proteínas encargadas de generar

y/o mantener un estado de heterocromatina como HP1 alfa o proteínas del grupo Polycomb como Suz12 (Hall et al., 2002a; Jenuwein, 2002; Mercer et al., 2009; Ponting et al., 2009; Richards y Elgin, 2002; Volpe et al., 2002). Más aún, se ha demostrado que procesos fisiológicos tan complejos como la hibernación en plantas están relacionados al silenciamiento mediado por modificaciones químicas en las histonas (Bastow et al., 2004). En este caso la exposición prolongada a bajas temperaturas genera una significativa disminución de la transcripción en el gen FLC (un represor de la floración), producto de un silenciamiento transcripcional de genes (TGS por transcriptional gene silencing) disparado por H3K27me2 y H3K9me2 (Bastow et al., 2004; Simpson y Dean, 2002).

Adicionalmente, en plantas se mostró que los RNA pequeños de doble cadena eran capaces de producir el silenciamiento de genes con metilación del DNA en promotores (Mette et al., 2000).

1.3.2 Las diferentes vías de acción de los RNA pequeños

Al menos tres tipos diferentes de RNA pequeños han sido descriptos inicialmente, de acuerdo a su origen o función: RNA pequeños interferentes (siRNAs), microRNAs (miRNAs) y Piwil RNAs (piRNAs). En la naturaleza los siRNAs pueden ser producidos por la polimerización llevada a cabo por una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), por ejemplo de virus, o por la hibridación de dos moléculas de RNA complementarias, por ejemplo en secuencias repetitivas o durante la transcripción de parejas de genes *sense/antisense*. Estas fuentes de RNA pequeños suelen originar los siRNAs endógenamente, los cuales a su vez, podrían afectar la transcripción de diversos genes blanco ya sea produciendo la degradación del mRNA con secuencia homologa o modificando la cromatina de su entorno genómico (Fig. 12).

Por otro lado, la mayoría de los llamados miRNA poseen sus propias unidades transcripcionales y se encuentran localizadas en regiones intergénicas o en antisentido a genes codificantes (Lau et al., 2001; Lee et al., 2004; Rodriguez et al., 2004). Cerca del 40% está localizado en intrones e incluso algunos lo hacen en regiones codificantes (Tay et al., 2008). Usualmente los precursores de los miRNAs generan una estructura

secundaria en el RNA con forma de horquilla con un *loop* que separa dos regiones con alta complementariedad (entre 20-50 pb). El primer miRNA en ser descubierto fue *lin-4* hace más de 15 años y fue detectado como un gen capaz de controlar el tiempo desarrollo larval en *C. elegans* (Bartel, 2004). Desde aquel momento y hasta la fecha se han descubierto casi un millar de miRNAs en el genoma humano.

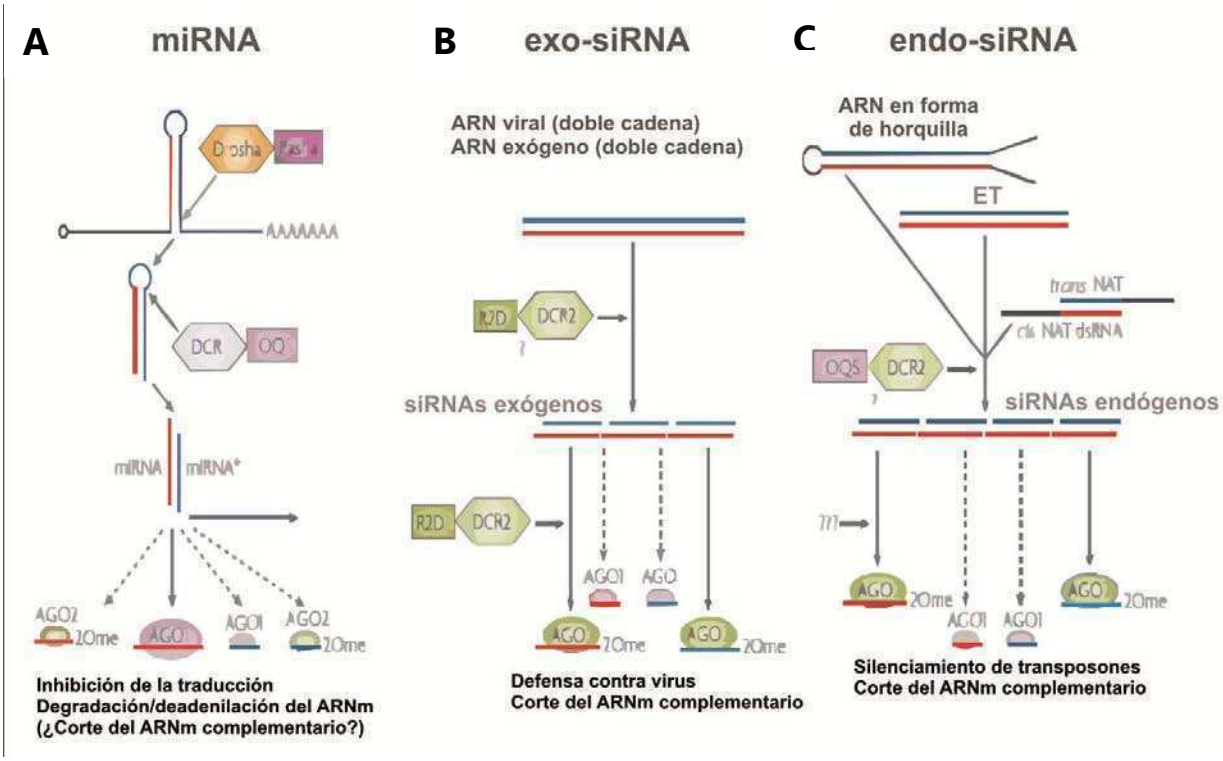


Figura 12. Distintas vías de RNA pequeños en D. melanogaster.
El esquema representa las principales vías de utilización de RNA pequeños. ***A.*** *La producción de un miRNA a partir de un precursor que es escindido por Drosha y luego por Dicer (DCR1) podrá unirse a distintos complejos realizando distintas actividades como represión de la traducción, degradación del mRNA blanco, etc.* ***B.*** *RNA pequeños de doble cadena de origen exógeno son procesados por una segunda Dicer (DCR2).* ***C.*** *siRNAs endógenos generados a partir de elementos transponibles (ET) o genes antisentido naturales (NATs) son procesados por Dicer para finalmente unirse a complejos AGO. Tomado y modificado de Okamura y Lai 2008.*

Por su lado, los piRNAs poseen un tamaño levemente mayor al de los siRNA y miRNA, aproximadamente 30 nucleótidos y se asocian exclusivamente a proteínas PIWI. Usualmente están localizados en clusters, que pueden albergar entre 10 y cientos de piRNAs a lo largo del genoma y su expresión estaría limitada durante la embriogénesis y espermatogénesis. Su función principal también se encuentra asociada

con el silenciamiento génico tanto a nivel transcripcional mediante cambios a nivel epigenéticos como post-transcripcionales, controlando particularmente la actividad de transposones (Aravin et al., 2006; Aravin y Bourc'his, 2008; Aravin et al., 2008).

En cuanto a la maduración, los siRNAs serían directamente procesados por Dicer, mientras que los miRNAs recorren un camino gradual que involucra a otra RNAasa tipo III conocida como Drosha y la ya mencionada Dicer. Drosha es requerida específicamente para el procesamiento de los precursores de los miRNAs (Lee et al., 2002) en el núcleo celular. Este procesamiento origina un RNA de doble cadena largo que es exportado al citoplasma vía exportina 5, donde Dicer realizará el último paso en su procesamiento generando RNA pequeños de doble cadena de 21 nucleótidos de longitud aproximadamente. Se sabe bastante menos de la biogénesis de los piRNAs, aunque se cree que derivan de precursores largos asociados exclusivamente a una de las dos hebras del DNA.

Una vez procesados, los RNA pequeños son cargados en el complejo efector RISC en forma ATP dependiente. Se cree que este requerimiento de energía está asociado con la necesidad de producir la separación de la doble hebra del RNA pequeño ya que solo una será cargada en el complejo de silenciamiento y se la conoce como "hebra guía". Mientras que la hebra restante será degradada y se la conoce como "hebra pasajera".

De acuerdo a qué proteínas formen parte del ensamblaje y a la forma en que éste se realice pueden formarse varios tipos de efectores diferentes que varían en tamaño y que probablemente también difieran en función y actividad. La masa molecular estimada para dichos complejos en células humanas van desde los 130 a los 160 kDa (Martinez et al., 2002; Martinez y Tuschl, 2004).

En el intento de analizar la especificidad de secuencia de los RNA pequeños para guiar el corte del RNA mensajero complementario, se descubrió que la selección de la hebra cargada en RISC no es un proceso azaroso sino que depende de la estabilidad termodinámica de sus extremos 5´. De manera tal que, la hebra que posea el extremo 5´ con menor contenido de citosina y guanina se "abrirá" primero y será cargada, mientras que la otra será degradada (Schwarz et al., 2003). De esta manera es

posible utilizar esta «regla de asimetría termodinámica» para diseñar los siRNAs favoreciendo que la hebra *sense o antisense* se cargue en el complejo efector.

Las moléculas de RNA pequeños de simple cadena cargadas en estos complejos se encuentran fuertemente unidas a proteínas Argonauta (AGO). Como hemos mencionado, estas proteínas tienen un peso aproximado de 100 kDa y dos dominios conservados: PAZ (piwi-argonaute-zwille) y PIWI (Carmell et al., 2002). El primero se cree que está involucrado en la interacción entre AGO y la doble hebra del RNA pequeño, mientras que el dominio PIWI formaría parte de la interacción entre AGO y Dicer.

El número de miembros de la familia argonauta varia notablemente entre especies, siendo 1 en *S. pombe*, 5 en *Drosophila*, 8 en humanos, 10 en *Arabidopsis* y más de 20 en *C. elegans*. En humanos AGO1, AGO2, AGO3 y AGO4 se asocian con siRNAs y miRNAs, sin embargo solo AGO2 posee la actividad catalítica capaz de producir un corte en el mRNA *target* de un siRNA (Meister et al., 2004).

Los RNA pequeños simple cadena cargados en RISC pueden operar de tres formas diferentes. En el citoplasma son capaces de producir la degradación de mRNA maduros cuando poseen 100% de complementariedad entre la hebra guía el RNA blanco. Esta actividad se encuentra usualmente asociada a los siRNAs. Análogamente, cuando poseen un cierto número de nucleótidos no apareados (con *mismatches*) los RNA pequeños provocan una inhibición de la traducción del mensajero blanco (Fig. 13). Este sería el mecanismo de acción de la mayoría de los miRNAs descriptos hasta la fecha. Sin embargo, un miRNA con complementariedad total es capaz de producir el corte del RNA target. De manera similar un siRNA con complementariedad parcial con su "blanco" es capaz de impedir su traducción (Dykxhoorn et al., 2003; Hutvagner y Zamore, 2002). Finalmente, tanto los siRNAs como los miRNAs son capaces de reclutar maquinaria de modificación de la cromatina en el interior del núcleo celular y alterar el estado de la misma en la región genómica complementaria.

Inesperadamente, se encontró que los miRNAs también eran capaces de producir un incremento en la tasa de traducción de algunos mRNAs. Shobha Vasudevan descubrió que miR369-3 dirige la asociación de AGO2, FXR1 y factores

asociados a micro-ribonucleoproteínas produciendo un aumento de la expresión del gen TNF-alfa. Adicionalmente han mostrado que ı et7 y miRcxcr4 inducen un aumento de la traducción de genes *target* durante el arresto de ciclo celular, aun cuando estos mismos reprimen la traducción en células proliferantes (Vasudevan y Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007).

RISC produce el corte endonucleolítico del mensajero blanco sin necesidad de gasto de energía y el corte es realizado en el medio de la región de complementariedad, esto es, 10 nucleótidos río arriba del sitio de apareamiento con el extremo 5´ de la hebra guía del siRNA (Elbashir et al., 2001).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la inhibición de la traducción por parte de los miRNAs es menos conocido. ı a mayoría de los sitios *target* de los miRNAs yacen en las regiones 3´ no codificantes. Tanto los miRNAs como sus *targets* han sido encontrados junto a polirribosomas, lo que indicaría que el mecanismo afecta la elongación y/o terminación de la traducción preferencialmente sin afectar la abundancia del mRNA (Olsen y Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002). A su vez, en células de mamífero estos complejos también han sido encontrados asociados con polisomas (Kim et al., 2004). Estudios más recientes han puesto en duda estos conceptos y la idea original acerca de que los miRNAs no afectan la tasa de degradación de los mensajeros blanco. Contrariamente a lo que se pensaba, estos estudios describen un incremento en la degradación vía deadenilación seguida por una pérdida del cap y la concomitante degradación del resto del RNA (Jackson y Standart, 2007), aunque esta vía degradativa es completamente diferente a la endonucleolítica disparada por los siRNAs. Por otro lado, también se ha mostrado que los miRNAs pueden silenciar genes mediando la inhibición del inicio de la traducción (Mathonnet et al., 2007).

En medio de este gran debate, el grupo de David Bartel ha revitalizado la polémica recientemente. Un trabajo de su grupo ha medido simultáneamente la producción de proteína y mRNA en genes blanco de miRNAs endógenos y exógenos, concluyendo que más del 84% de la reducción en la producción de una proteína por miRNAs está signado por la desestabilización del RNA mensajero (Guo et al., 2010).

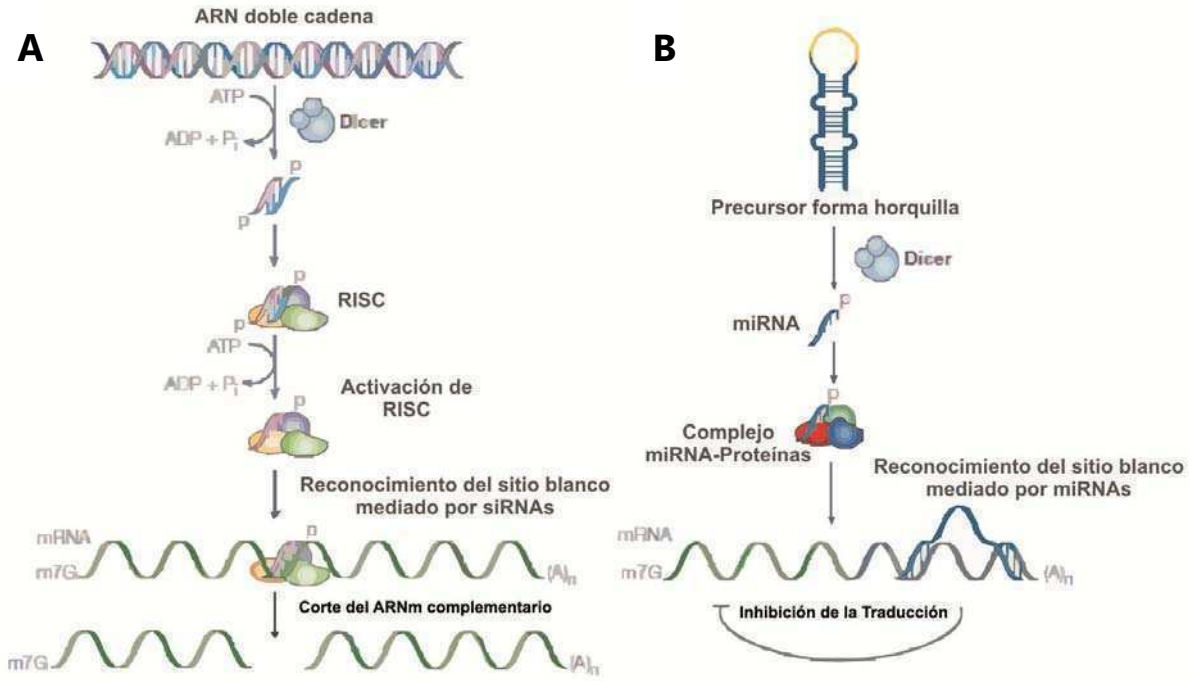


Figura 13. Las vías clásicas de silenciamiento por RNA.
A. *siRNAs: un RNA pequeño de doble cadena es procesado por Dicer. Luego la "hebra guía" (violeta) se una al complejo RISC. Este complejo "escanea" mRNA hasta encontrar una secuencia 100% complementaria. Al hacerlo escinde el mRNA blanco.*
B. *miRNAs: Un RNA precursor con forma de horquilla es procesado por Dicer, la habrá guía (naranja) se une al microprocesador. Tras encontrar una secuencia parcialmente complementaria el microprocesador inhibirá la traducción. Tomado y modificado de Dykxoorn, et. al. 2003.*

1.3.3 Los miRNAs y el *splicing*

Ha sido demostrada la existencia de un *crosstalk* entre maquinaria transcripcional y de *splicing* con la biogénesis de ciertos miRNAs. Particularmente el grupo de Javier Cáceres en Edimburgo ha mostrado que la ribonucleoproteina heterogénea A1 (hnRNP A1) se une al pre-miR-18a antes de su procesamiento por Drosha, favoreciéndolo. De esta manera, hnRNP A1 se uniría a un *loop* en dicho precursor relajando la estructura secundaria del mismo y generando un sitio con mejor accesibilidad para Drosha (Guil y Cáceres, 2007; Michlewski et al., 2008). Pero adicionalmente, el mismo grupo ha señalado recientemente que la misma proteína es capaz de generar una acción completamente opuesta en otro contexto, es decir, inhibir el procesamiento de otro precursor. Así, hnRNP A1 ha sido caracterizada como un

regulador negativo de la biogénesis de let-7a al unirse a un loop ubicado en la región terminal del pre-let-7a (Michlewski y Cáceres, 2010).

Por otro lado, algunos trabajos han mostrado la importancia de algunos miRNAs directamente sobre el *splicing* alternativo. Dos ejemplos sumamente relacionados son los de miR-124 y miR-133. Este último se expresa especialmente en tejido muscular, y durante la diferenciación de mioblastos reprime a nPTB, un conocido regulador del *splicing* alternativo, alterando así el patrón de *splicing* alternativo de varios exones específicos de músculo (Boutz et al., 2007). Por su parte, miR-124 juega un rol similar durante la diferenciación del sistema nervioso reprimiendo a PTBP1 (PTB/hnRNPA1) otro regulador sumamente importante del *splicing* específico de tejidos, en este caso en neuronas (Makeyev et al., 2007).

Más recientemente se ha mostrado que miR-23a/b hace lo propio durante el desarrollo del corazón en ratones, inhibiendo CUGBP y ETR-3-like factor (CEı F), dos proteínas clave que regulan la mitad de los eventos de *splicing* alternativo regulados durante el desarrollo del corazón (Kalsotra et al., 2010).

Finalmente, otra conexión entre estos dos procesos ha surgido del estudio de la biogénesis de algunos miRNAs, donde se ha observado cierta dependencia con el proceso de *splicing*. Estos miRNAs se alojan en intrones y también se los conoce como *mirtrons*. Su biogénesis parece ser independiente de Drosha pero dependiente del *splicing* del intrón que los hospeda (Kim y Kim, 2007). Aunque todavía se trata de un área sumamente controvertida se asume que la maquinaria de *splicing* es capaz de afectar al micropocesador (complejo encargado de procesar el pre-miRNA) y vice-versa (Shomron y ı evy, 2009).

1.3.4 siRNAs endógenos

ı a existencia de siRNAs naturales generados en forma endógena en animales fue incierta hasta el año 2006 cuando fueron detectados por primera vez en *C. elegans* (Ruby et al., 2006). Poco tiempo después también fueron encontrados en *Drosophila* y ratones.

Diversos mecanismos de "defensa" han surgido evolutivamente como respuesta a la capacidad mutagénica de los elementos transponibles (ET). En particular, durante la formación de gametas masculinas los piRNAs serían los encargados de mantener silenciada la actividad de estos parásitos genómicos, mientras que durante la formación de ovocitos, siRNAs endógenos llevarían a cabo esta tarea.

En ratones se han encontrado siRNAs derivados de retrotransposones capaces de silenciar ı INES (*long interspersed nuclear elements*) en *trans* (Watanabe et al., 2006; Yang y Kazazian, 2006).

Otra fuente de generación de siRNAs endógenos sería la presencia de transcriptos antisentido en *cis*, conocidos como NATs (por natural *antisense* transcript). Este fenómeno es relativamente común y la producción de siRNAs podría estar enriquecida en regiones de solapamiento entre transcriptos bidireccionales, a la vez que sería dependiente de la actividad de Dicer (Okamura y ı ai, 2008).

Finalmente, los genomas de mamíferos poseen un gran número de pseudo-genes que en principio no cumplen ninguna función biológica, sin embargo, en oocitos de ratón se encontraron pseudogenes que podrían tener una función muy particular: generar siRNAs a partir de la hibridación en *trans* con sus "progenitores" (Tam et al., 2008). Análisis realizados por microarreglos y PCR cuantitativa en oocitos "carentes" de Dicer han mostrado una notable activación de genes con complementariedad para dichos siRNAs sugiriendo que este sistema podría regular endógenamente la expresión de genes (Watanabe et al., 2008).

1.3.5 Otros tipos de RNA pequeños endógenos

El avance de la tecnología de ultra-secuenciación ha permitido detectar una gran cantidad de nuevos tipos de RNA pequeños en células humanas en los últimos dos años. Por un lado, investigadores del proyecto ENCODE (*The Encyclopedia of DNA Elements*) realizaron la secuenciación de RNA pequeños, con tamaños menores a 200 nucleótidos, provenientes de las líneas celulares humanas Heı a y HepG2 (Encode, 2009). Encontraron muchos RNA pequeños asociados a secuencias internas de genes codificantes de proteínas y no codificantes incluyendo junturas exón-exón. También

describieron un nuevo grupo de RNA pequeños llamado PASRs (*promoter associated small RNAs*) asociados a los sitios de iniciación de la transcripción (hasta 500 nucleótidos).

Por otro lado, el grupo de John Mattick describió otros dos nuevos grupos de RNA pequeños nucleares conservados evolutivamente en metazoos: tiRNAs (por *transcription initiation RNAs*) y spliRNAs (por *splice-site RNAs*). Los primeros fueron detectados en células humanas THP-1, poseen un tamaño menor a 22 nucleótidos y se encuentran entre las posiciones -60 y +120 a partir del sitio de inicio de la transcripción, fundamentalmente en promotores activos y con transcripción bidireccional (Taft et al., 2009). Los spliRNAs fueron encontrados en la misma línea celular y se localizan fundamentalmente en cercanías de los sitios dadores de *splicing* (Taft et al., 2010). La biogénesis de ambos no estaría relacionada con la de los miRNAs y siRNAs ya que es independiente de Dicer y Drosha.

Otro mecanismo sumamente novedoso fue publicado recientemente en la revista *Nature* donde muestran que la subunidad catalítica de la telomerasa humana (TERT) se asocia con un RNA no codificante mitocondrial. Este complejo posee actividad RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), actividad sumamente importante para la generación de RNA pequeños endógenos en otras especies y que se creía inexistente en mamíferos. Pero además esta supuesta RdRp es capaz de producir RNA pequeños de doble cadena de manera dependiente de Dicer (Maida et al., 2009).

1.3.6 TGS y argonautas

Como ya se ha mencionado los RNA pequeños pueden dirigir el reclutamiento de maquinaria de remodelación de la cromatina en el interior del núcleo celular. Para hacerlo se unen a un complejo diferente a RISC, conocido como RITS (por *RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*). Este complejo necesario para la formación de heterocromatina en levaduras fue purificado por primera vez en *S. pombe* (Verdel et al., 2004). Contiene a Ago1, Chp1 (una proteína con cromodominio asociada a heterocromatina), y Tas3. También se encontraron siRNAs producidos por Dicer

cargados en el complejo, con secuencias homologas a las regiones repetitivas centroméricas requeridas para la localización de RITS en dominios heterocromatínicos.

Inicialmente RITS se une a una secuencia repetitiva llamada cenH y que actúa como centro de nucleación. A partir de allí RITS comienza a esparcirse a través de 20 kb provocando la heterocromatinización de dicha región (Noma et al., 2004). Una vez establecida, la heterocromatinización es mantenida por la maquinaria de silenciamiento y en especial por la proteína Swi6 (homóloga a HP1, *heterocrhomatin protein 1*, en humanos) que reconoce metilaciones en la lisina 9 de la histona H3 mediante sus cromodominios.

Un fenómeno similar ha sido descripto en *Drosophila*, donde se ha mostrado que la eliminación de miembros importantes de la vía de interferencia por RNA es capaz de producir la reducción de H3K9me3 con la subsiguiente pérdida de localización de HP1 (Pal-Bhadra et al., 2004).

Se ha llamado TGS (por *transcriptional gene silencing*) al mecanismo responsable del silenciamiento de genes mediante la formación de estructuras de cromatina cerrada. El TGS ha sido muy bien caracterizado en levaduras y moscas, sin embargo, su universalidad y en particular su existencia en mamíferos han sido muy discutidas.

En medio de este marco, Kevin Morris mostró que era posible producir un TGS dirigido contra un gen en particular mediante la introducción de siRNAs complementarios a la secuencia promotora de un gen determinado en células humanas. Utilizando un reportero con un promotor del gen viral EF1A seguido de GFP integrado en células Heı a, Morris mostró que es posible silenciar dicha construcción a nivel transcripcional mediante cambios cromatínicos que incluyen un aumento de la metilación del DNA en la región blanco de los RNA pequeños (Morris et al., 2004).

Estudios posteriores del mismo grupo mostraron que para que el TGS fuera eficiente se necesitaba una transcripción basal del promotor "blanco" de manera tal que el siRNA cargado en el complejo de silenciamiento pudiera reconocer una secuencia de RNA complementaria en dicho promotor por medio de una hibridación

RNA::RNA (Han et al., 2007). Estos siRNAs «escanearían» los transcriptos nacientes cargados en la proteína AGO1 que sería la encargada de dirigir el TGS (Kim et al., 2006).

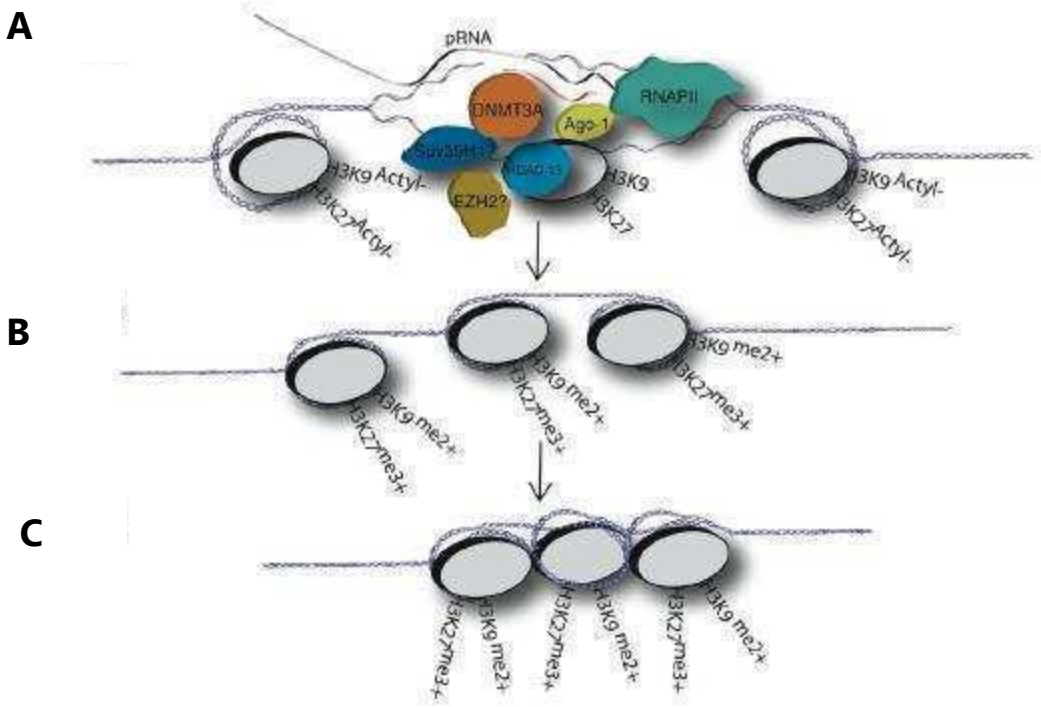


Figura 14. Modelo propuesto para el TGS en promotores.
A. *Moléculas de RNA sintetizadas por la Pol II (verde) sobre una región promotora (pRNA) son escaneadas por AGO1 (amarillo) que forma parte de una complejo con la DNA metiltransferasa (DNMT3A), la desacetilasa de histonas (HDAC) y proteínas silenciadoras como Suv39 y EZH2.* ***B.*** *Este complejo produciría un incremento en H3K9me2 y H3K27me3, y en última instancia un mayor grado de compactación de la cromatina* ***(C)****. Tomado de Hang et. al. 2007.*

Muchos trabajos de diferentes grupos han enriquecido la evidencia de que el TGS es un proceso presente en mamíferos (Fig. 14). El mismo fenómeno de silenciamiento dirigido por siRNAs contra promotores fue corroborado en otros genes, conjuntamente con la presencia de dos marcas usualmente asociadas a heterocromatina facultativa, H3K9me2 y H3K27me3, el reclutamiento de HDAC1 junto a proteínas silenciadoras del grupo Polycomb como EZH2 y cambios en la accesibilidad al DNA (Kim et al., 2008; Suzuki et al., 2008).

Más oscuro es el entendimiento acerca del mecanismo por el cual opera el TGS dirigido por siRNAs. El grupo de Manuel Serrano, en Madrid, arrojó un poco de luz en este sentido mostrando claramente que los siRNAs requieren transcripción solapante y que el reconocimiento RNA::RNA es sobre la hebra transcripta. Adicionalmente, González et al. muestran que miR17-5p y miR20a son capaces de inducir TGS en un reportero cuyo promotor posee secuencias complementarias a la semilla (nucleótidos 1-8 del miRNA) de estos miRNAs (González et al., 2008). Más interesante aún fue el aporte realizado por Kim et. al. quienes han mostrado que un miRNA muy conservado, miR-320, que se ubica en el promotor del gen POI R3D pero en antisentido puede regular a este gen en *cis* a nivel transcripcional reclutando AGO1, proteínas silenciadoras de la vía Polycomb (que también habían sido relacionadas previamente con el TGS) y la presencia de H3K27me3 (Kim et al., 2008).

Paradójicamente al menos dos reportes han sido publicados mostrando un efecto de activación de genes mediante la utilización de siRNAs (Janowski et al., 2007; I i et al., 2006). Si bien se desconoce la amplitud del fenómeno no debe descartarse la posibilidad de que la vía de interferencia por RNA pueda tener un rol extra en la activación endógena de genes. De todas formas, aún hoy éste es un campo muy poco explorado sobre el cual existen muchas más dudas que certezas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la regulación del *splicing* alternativo a través de mecanismos que afecten el estado de la cromatina, focalizando particularmente el estudio sobre modificaciones epigenéticas intragénicas cercanas a eventos de *splicing* alternativo.

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar la vía de interferencia por RNA con el fin de intentar modificar la estructura cromatínica del gen de la fibronectina humana de manera dirigida.
- Poner a prueba la hipótesis de que dichas modificaciones generadas a partir de transfecciones con siRNAs podrían ser capaces de afectar la elongación y consecuentemente el *splicing* alternativo del exón EDI de FN1.
- Caracterizar las proteínas o complejos esenciales para el correcto funcionamiento del mecanismo predicho.
- Investigar si el mecanismo opera en forma natural en células humanas.

3 CAPÍTULO I

RNAs pequeños capaces de afectar la estructura de la Cromatina, la elongación de la Polimerasa II y el *Splicing* Alternativo

Nuestro laboratorio contaba con una extensa y creciente cantidad de resultados que aportaban evidencias convergentes sobre el papel fundamental llevado a cabo por la tasa de elongación de la Pol II y el estado cromatínico del DNA molde sobre el proceso de *Splicing* Alternativo (de la Mata et al., 2003; de la Mata y Kornblihtt, 2006; Kadener et al., 2001; Kadener et al., 2002). Sin embargo, no existía ninguna demostración que revelara la integración de estos procesos en la regulación propiamente dicha del *splicing* alternativo. Es decir, que modificando uno de estos eventos podían simultáneamente y de manera acoplada afectarse los otros como una reacción en cadena.

Nuestro trabajo se originó en la convergencia de estas dos disciplinas sumada la aparición del reciente campo de la interferencia por RNA. Nuestra hipótesis de trabajo puede desprenderse entonces, de la convergencia de las tres áreas desarrolladas durante la introducción. Pensamos que podíamos utilizar los siRNAs como herramienta para disparar la formación de una estructura heterocromatínica intragénica en cercanía de un evento de *splicing* alternativo, en pos de ver si esta modificación era capaz de afectar la tasa de elongación de la Pol II y como consecuencia el nivel de inclusión del evento involucrado. Para ello decidimos trabajar con el gen "modelo" de nuestro laboratorio para estudiar el *splicing* alternativo: el gen de la fibronectina.

En este Capítulo desarrollaremos la evidencia que sugiere que dichos siRNAs son capaces de afectar la estructura de la cromatina en la región *target*, a la vez que estos cambios pueden actuar sobre la tasa de elongación y/o procesividad de la Pol II, alterando finalmente los niveles de inclusión del exón EDI del gen de la fibronectina.

El efecto de los siRNAs sobre el SA depende de la presencia de maquinaria fundamental de la vía de interferencia por RNA (AGO1 y AGO2), de la proteína HP1α involucrada en el mantenimiento de regiones heterocromáticas y la estructura de la cromatina.

3.1 Resultados I

3.1.1 Diseño de los siRNAs intrónicos

En la introducción se ha explicado el fenómeno termodinámico que subyace al cargado de la hebra del RNA pequeño en el complejo de silenciamiento (ver 1.3.2). Se ha mostrado que si la molécula de RNA pequeño posee una asimetría termodinámica en sus extremos de manera tal que uno posea mayor contenido de AU y el otro de CG, entonces el primero en desnaturalizarse será aquel con mayor contenido de AU o menor contenido de CG, y en consecuencia la hebra cuyo extremo 5´este localizado sobre esta región será cargada en el complejo de silenciamiento. En forma contraria, la otra hebra (con mayor contenido de CG en su extremo 5´) será degradada (Schwarz et al., 2003; Tomari et al., 2004).

Basándonos en este principio hemos podido diseñar diferentes oligos de siRNA, de manera tal que la hebra "guía" estuviera localizada tanto *sense* como en *antisense* (con respecto al transcripto de FN). Así por ejemplo, el siRNA que hemos llamado I33as, tiene su *target* en el intrón 33 de fibronectina (intrón ubicado río abajo a EDI) y esperábamos que la hebra a cargarse en el complejo de silenciamiento estuviese en antisentido respecto al mRNA de FN.

Dicho de otra manera, hemos diseñado los siRNAs favoreciendo su cargado por asimetría seleccionando secuencias con menores valores de ΔG para el extremo 5´de la hebra que pretendíamos que ingresara en la vía de silenciamiento.

En la figura 15 se pueden apreciar las secuencias de los diferentes siRNAs utilizados con los correspondientes valores termodinámicos de cada extremo. En todos los casos se observa una marcada diferencia de ΔG entre los dos extremos de la doble hebra.

3.1.2 Efecto de los siRNAs intrónicos sobre el *splicing* alternativo de EDI en células Hep3B

Para poner a prueba nuestra hipótesis original decidimos transfectar los diferentes siRNAs en células en cultivo de hepatoma humano, Hep3B. Luego de 72 horas purificamos el RNA y por medio de una RT-PCR cuantitativa (ya sea en tiempo

real o radiactiva) medimos el cociente de inclusión/exclusión del exón EDI (EDI+/EDI-). Como control, transfectamos las mismas células con un siRNA dirigido contra una secuencia del gen de la luciferesa que no está presente en el genoma humano (Fig. 16A).

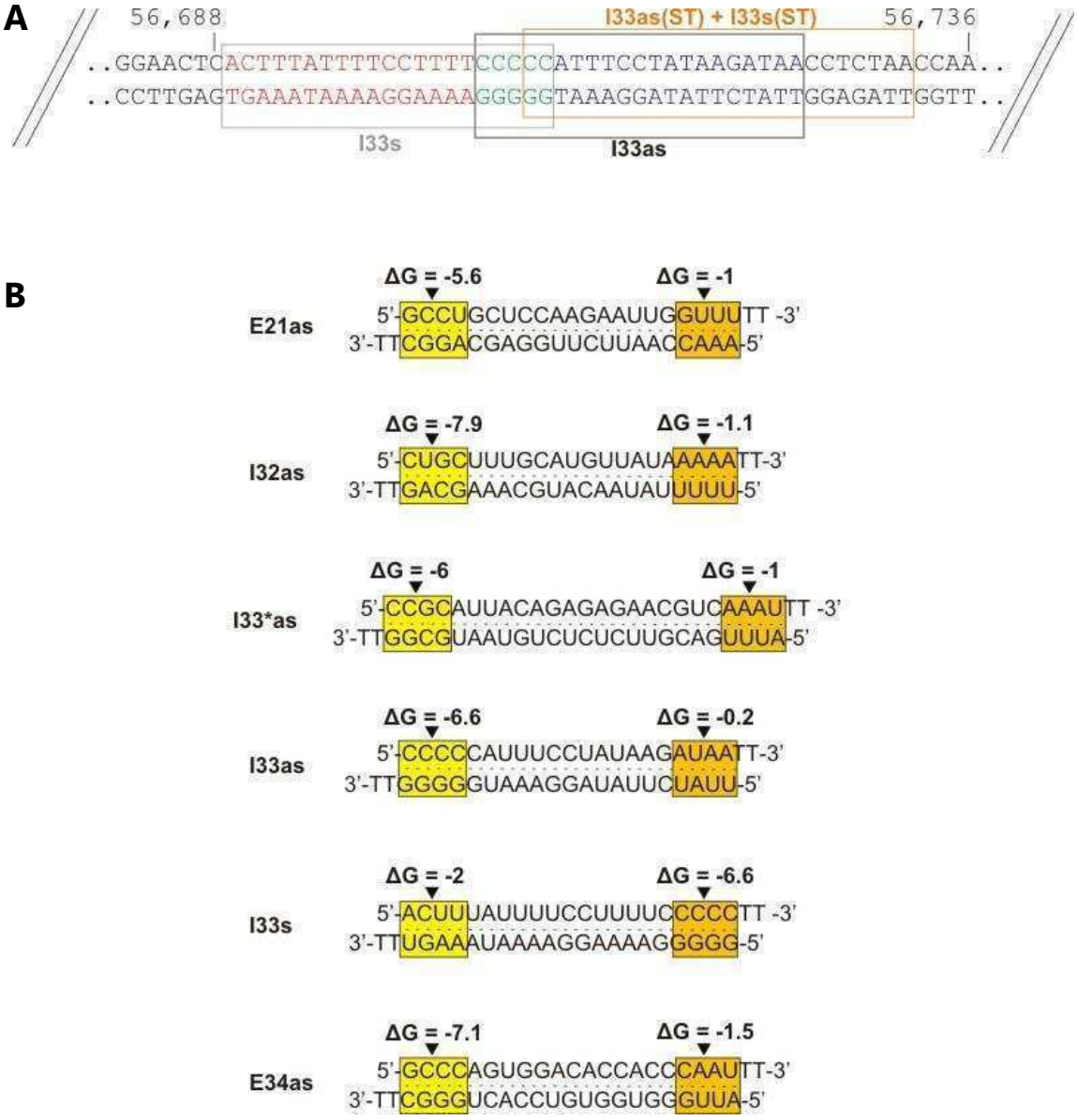


Figura 15. Secuencia y diseño asimétrico de los siRNAs.
A. *Secuencias blanco de los siRNAs intrónicos I33s (gris), I33as (negro), I33as (ST) y I33s(ST)(naranja). Los números indican la distancia en pares de bases a partir del sitio de inicio de la transcripción.*
B. *Secuencias completas de los siRNAs intrónicos y exónicos utilizados durante el desarrollo de esta tesis. La energía libre (ΔG) de cada extremo 5´ fue calculada utilizando las primeras cuatro bases.*

Dos de los siRNAs que hacían blanco contra el intrón ubicado río debajo de EDI fueron capaces de incrementar los niveles de inclusión de dicho exón en el mRNA maduro (Fig. 16B izquierda). Ambos (I33*as e I33as) poseen su hebra "guía" en orientación antisentido, es decir, capaz de aparear con el transcripto naciente de FN. Mientras que un siRNA capaz de hacer blanco a una distancia similar respecto a EDI (I33s) pero cuya hebra guía estaba orientada en *sense* fue incapaz de hacerlo. De la misma manera un oligo dirigido contra el intrón ubicado río arriba de EDI (I32as) no tuvo ningún efecto sobre su *splicing* alternativo. Los mismos resultados fueron observados con mediciones realizadas tanto por PCR en tiempo real (qPCR) como radiactiva (rPCR)(Fig. 16C). A partir de este punto hemos utilizado I33as como modelo de estudio.

Como control positivo sobre la transfección de siRNAs en células Hep3B y su correcto funcionamiento en la vía clásica de PTGS, utilizamos un siRNA diseñado contra una región exónica (E34as) del mismo gen. Luego de 72 hs medimos por RT-qPCR los niveles de mRNA de fibronectina observando una significativa disminución de más del 80% (Fig. 16B derecha).

Aun así, ¿podía este cambio en el *splicing* alternativo de EDI ser causado por la vía de PTGS? Para responder esta pregunta realizamos dos experimentos en paralelo. Por un lado, medimos por RT-qPCR la cantidad de mensajero maduro de FN transfectando células Hep3B con siLuc como control e I33as, sin observar cambios significativos entre los dos experimentos (Fig. 16D izquierda). Por otro lado y teniendo en cuenta que quizás I33as podría ser capaz de disparar el corte del mRNA precursor (pre-mRNA) en el intrón vía PTGS sin afectar los niveles del mensajero maduro, es que realizamos otra RT-qPCR con *primers* ubicados a ambos lados del sitio blanco de I33as. En este caso tampoco pudimos detectar ningún cambio en los niveles relativos del precursor de FN siendo transfectado con siLuc o I33as, indicando que éste último no estaba produciendo un corte en el pre-mRNA a nivel del intrón ubicado río debajo de EDI (Fig. 16D derecha).

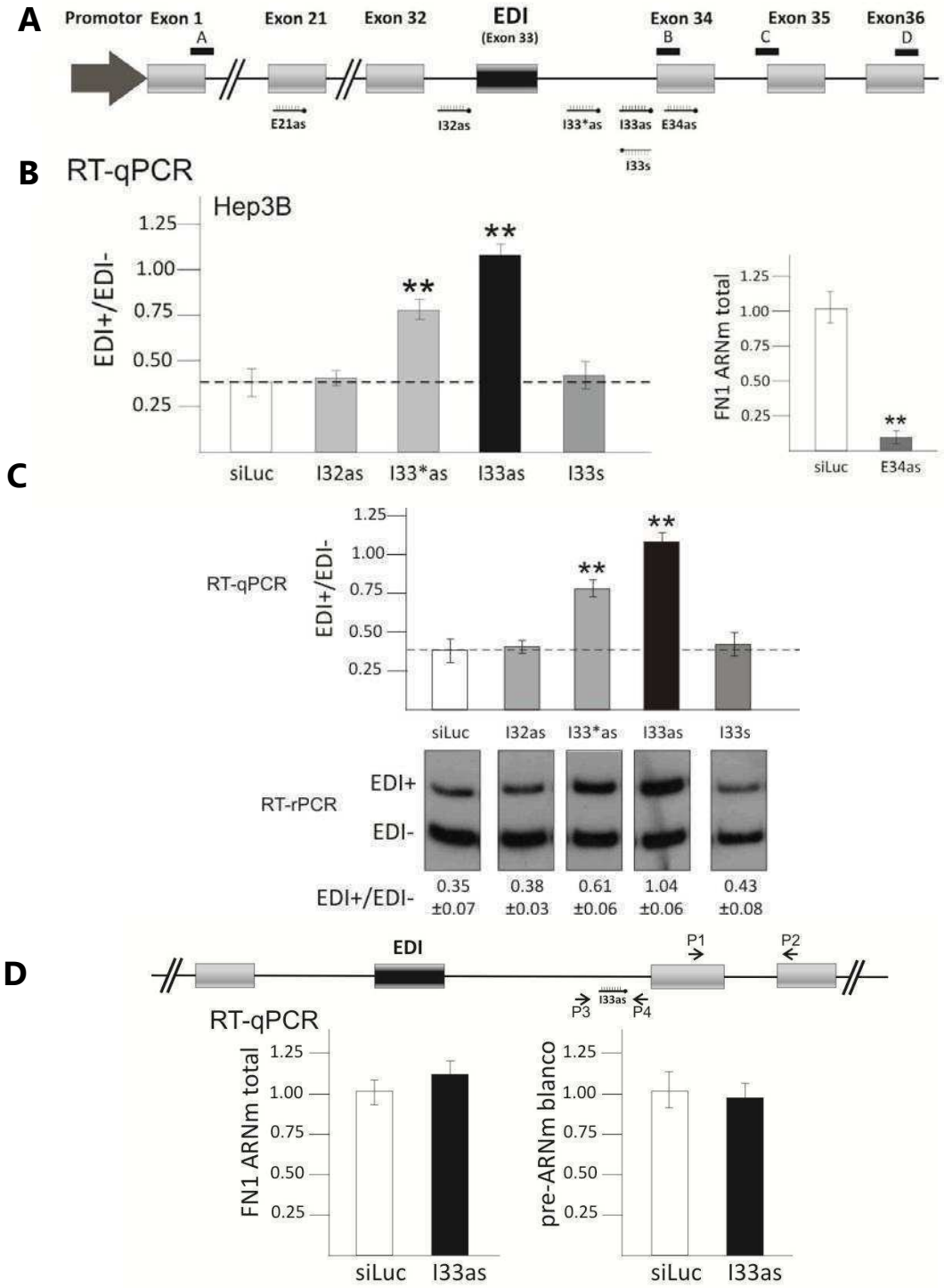


Figura 16. Efecto de los siRNAs intrónicos sobre el splicing de EDI
A. *Diagrama con las regiones del gen FN1 analizadas en esta tesis y ubicación de los sitios blancos de los siRNAs.*
B. *Efecto de los diferentes siRNAs intrónicos sobre el splicing alternativo de EDI en células Hep3B. La relación EDI+/EDI- fue calculada tras la cuantificación realizada por medio de una PCR en tiempo real.*
C*. Efecto de los siRNAs medidos por PCR radiactiva.*
D. *El diagrama muestra los primers utilizados para medir el mRNA maduro (P1 y P2) y precursor (P3 y P4) del gen de FN1 (arriba). I33as no cambia los niveles totales del mensajero de fibronectina maduro (izquierda) ni del precursor (derecha).*

3.1.3 Controles de especificidad de los efectos de los siRNAs

Teniendo en cuenta que existían muy pocos casos reportados de TGS en células de mamífero consideramos primordial realizar una serie de controles que pudieran descartar la posibilidad de efectos indirectos e inespecíficos (*off-target effects*) producto de la transfección con siRNAs.

En primer lugar decidimos utilizar una estrategia diferente a la del diseño asimétrico para favorecer el cargado de una de las dos hebras en el complejo de silenciamiento. En este caso utilizamos Stealth™ (ST, Invitrogen) siRNAs comerciales, los cuales poseen una modificación química en una de las dos hebras que impide su ingreso a la vía de silenciamiento. De esta manera seleccionamos la hebra "guía" en orientación *sense* (I33sST) o *antisense* (I33asST) (Fig. 15A). Al transfectar con estos oligos células Hep3B obtuvimos resultados comparables a los siRNAs originales, es decir, I33asST fue capaz de afectar el *splicing* alternativo de EDI a diferencia de I33sST (Fig. 17A). Este experimento es importante como control adicional, ya que si bien I33as e I33s están ubicados en la misma región y poseen un alto porcentaje de solapamiento, sus hebras guías no son totalmente complementarias, a diferencia de I33asST e I33sST que sí los son (Fig. 15A). Aunque la modificación química realizada sobre los oligos *Stealth* es secreta y propiedad de la firma INVITROGEN, la estrategia ha sido validada por medio de cotransfecciones en líneas celulares de mamífero con *Stealth duplexes* diseñadas para favorecer el ingreso de la hebra *antisense* en el complejo de silenciamiento, en forma conjunta con reporteros de expresión de ı acZ con un promotor eucariota en orientación *forward* o *reverse*. Bajo estas condiciones la actividad de β-galactosidasa fue inhibida en un 90% cuando el vector fue expresado en orientación *forward*, pero sólo un 10% cuando lo hizo en orientación *reverse* (K. Wiedrholt, INVITROGEN, comunicación personal).

En segundo lugar, probamos que un siRNA (I33asSCR) con una secuencia que contiene las mismas bases que I33as pero ordenadas al azar (*scrambled*) no afecta el *splicing* alternativo de EDI (Fig. 17B izquierda). Por otro lado, observamos que I33as es

capaz de aumentar la inclusión del exón alternativo con concentraciones tan bajas como 5 nM (lo recomendado en el protocolo original de INVITROGEN es 10 veces mayor) y que, además, su magnitud se mantiene constante hasta los 50 nM (Fig. 17B derecha). Estudios previos habían mostrado que los efectos inespecíficos e indirectos producidos por siRNAs eran mayores al aumentar la concentración de siRNAs y prevalecían a concentraciones de 50 nM. El efecto que nosotros observamos fue insensible a concentraciones crecientes de siRNAs a diferencia de los *off-target effects (Kim et al., 2005; Persengiev et al., 2004)*.

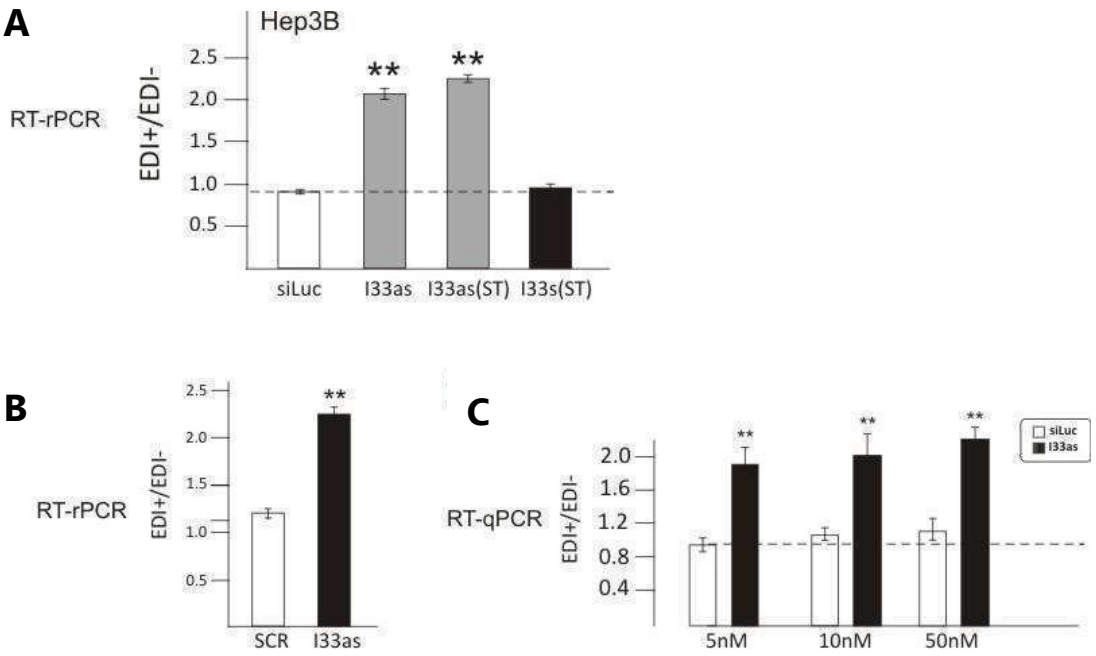


Figura 17. Escpecificidad de los efectos mediados por siRNAs.
A. *Relación EDI+/EDI- medida PCR en tiempo real utilizando el siRNA intrónico con mayor efecto (I33as) y dos nuevos oligos portadores de una modificación química que solo permite que una de las dos hebras ingrese en la vía de silenciamiento (Stealth TM, Invitrogen).*
B. *El efecto de I33as es reproducible utilizando una secuencia scrambled (ordenada al azar) como control en lugar de siLuc.*
C. *Curva de concentración de siRNAs. No hay dependencia de la concentración de siRNAs utilizada. Se muestra el cociente EDI+/EDI-.*

Por último, confirmamos la especificidad sobre la región genómica del efecto mostrando que al utilizar I33as no varía el patrón de *splicing* de otro exón alternativo de fibronectina (IIICS) ni de otros siete eventos de *splicing* alternativo ubicados en genes diferentes: Bcl-X, APAF1 (NM_001160), BCı 2ı 11 (NM_006538), BMP4

(NM_130851), CCNE1 (NM_057182), CHEK2 (NM_007194) y PCSK6 (NM_002570). Estos resultados fueron medidos por RT-rPCR tanto en la línea celular Hep3B como Heı a (Fig. 18).

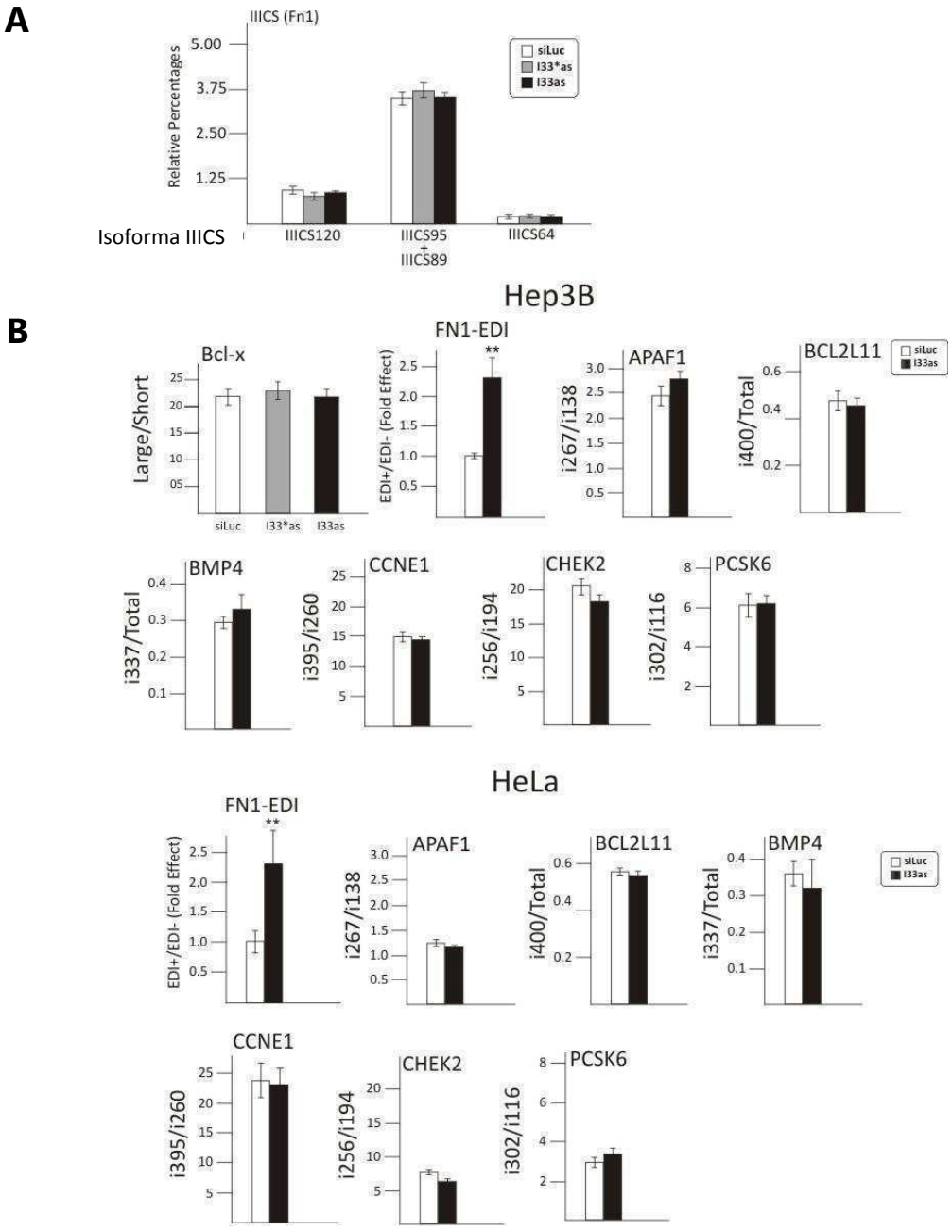


Figura 18. Más pruebas de escpecificidad de los efectos mediados por siRNAs.
A. *La transfección con I33as o I33as* no afecta los patrones de splicing de IIICS, otro evento de splicing alternativo de FN.*
B. *I33as tampoco afecta a otros 6 eventos de splicing alternativo correspondientes a otros genes tomados al azar de un panel de 96 eventos. Todas las mediciones fueron realizadas por PCR radiactiva.*

3.1.4 Efecto de los siRNAs en células HeLa

Intentamos averiguar si los efectos observados al transfectar RNA pequeños en células Hep3B serían reproducibles en otra línea celular, con diferentes niveles de transcripción de fibronectina, diferente inclusión/exclusión de EDI y diferente contexto cromatínico. Para ello, utilizamos la línea celular humana derivada de hepatoma cervical, HeLa, donde FN1 se expresa aproximadamente 100 veces menos que en Hep3B y el nivel de inclusión de EDI es entre 6-8 veces mayor. Al transfectar estas células con los diferentes oligos encontramos que I33as tenía un efecto similar al observado en Hep3B (Fig. 19A). Inesperadamente, I33s también fue capaz de aumentar la inclusión del exón alternativo en forma significativa. Los trabajos pioneros en el área de TGS habían mostrado que para inducir este fenómeno por medio de la incorporación exógena de siRNAs debía existir un apareamiento entre la hebra "guía" cargada en el complejo de silenciamiento y un transcripto naciente complementario. Como se ha señalado en la introducción, esta característica es incluso necesaria cuando los siRNAs son dirigidos contra regiones promotoras las cuales, por lo tanto, deben tener una tasa mínima de transcripción basal o abortiva (Han et al., 2007; Weinberg et al., 2006). Teniendo en cuenta estas consideraciones, el resultado inesperado de I33s podía ser explicado si en células HeLa existiese algún tipo de transcripción antisentido que pudiera ser reconocida por el complejo de silenciamiento cargado con la hebra "guía" de I33s. Mediante la utilización de una RT-qPCR con *primers* específicos para la retrotranscripción del RNA precursor *sense* y *antisense* en la región blanco de los siRNAs (Fig. 19B) pudimos detectar, tanto en células HeLa como en Hep3B, un nivel de transcripción basal en antisentido. De hecho, la relación *antisense*/*sense* del ARNm-precursor fue 20 veces mayor en HeLa que en Hep3B (Fig. 19C).

Una búsqueda bioinformática en distintas bases de datos nos permitió encontrar en Ensembl, la existencia de un "expressed sequence tag" (EST;ENSETT00000078687) antisentido a FN1 (asFN1), cuyo precursor se extiende al menos, por un tercio del gen de fibronectina incluyendo los exones alternativos EDI y EDII, por lo tanto, la región blanco de I33as e I33s. Debido a la existencia de un

solapamiento parcial entre el exón 2 y 3 del EST antisentido con el exón 22 y 26 de fibronectina hemos podido amplificar por RT-rPCR ambos transcriptos maduros en forma simultánea (Fig. 19D y E). Como se puede apreciar en la figura, en Hep3B el producto de PCR de asFN1 es indetectable en comparación con el de fibronectina. Sin embargo, en Heı a los dos productos son igualmente abundantes (Fig. 19D).

De esta manera, la presencia del mRNA precursor, pero además de transcripto maduro antisentido sobre la región blanco de los siRNAs podría explicar el efecto de I33s observado en células Heı a, y corroborar la necesidad de apareamiento RNA::RNA para que se produzca el efecto sobre el *splicing* alternativo.

3.1.5 La maquinaria de interferencia por RNA es requerida para el efecto de los siRNA sobre el *splicing* alternativo

En el año 2004 el grupo de Thomas Tuschl demostró que la proteína AGO2 era la única de la familia argonauta necesaria para que la vía de PTGS funcionara correctamente en células humanas T47D y Heı a (Meister et al., 2004). Por otro lado, se ha reportado que AGO1 es necesario para la vía de TGS, la cual requiere de ambas proteínas (ver sección 1.3.6)

Teniendo en cuenta que estas dos proteínas resultaban ser claves para la vía de interferencia por RNA y más aún, que la presencia de AGO1 era sólo necesaria para el TGS, decidimos estudiar la dependencia del efecto de I33as sobre el *splicing* alternativo tras la depleción de ambas. Para ello llevamos adelante un experimento de *knockdown* de AGO1 y AGO2 en células Hep3B por medio de la utilización de siRNAs. Como se puede apreciar en la figura 20, la co-transfección de I33as con siAGO1 o siAGO2 elimina el efecto de éste sobre el *splicing* alternativo de EDI, indicando que ambas proteínas son esenciales para que I33as sea capaz de aumentar la inclusión de EDI. Más aún, el hecho de que se pierda completamente el efecto tras la eliminación de AGO1 nos da la posibilidad de separar ambas vías y reconocer que el mecanismo operante es el de TGS, ya que el PTGS no requiere de la presencia de esta proteína.

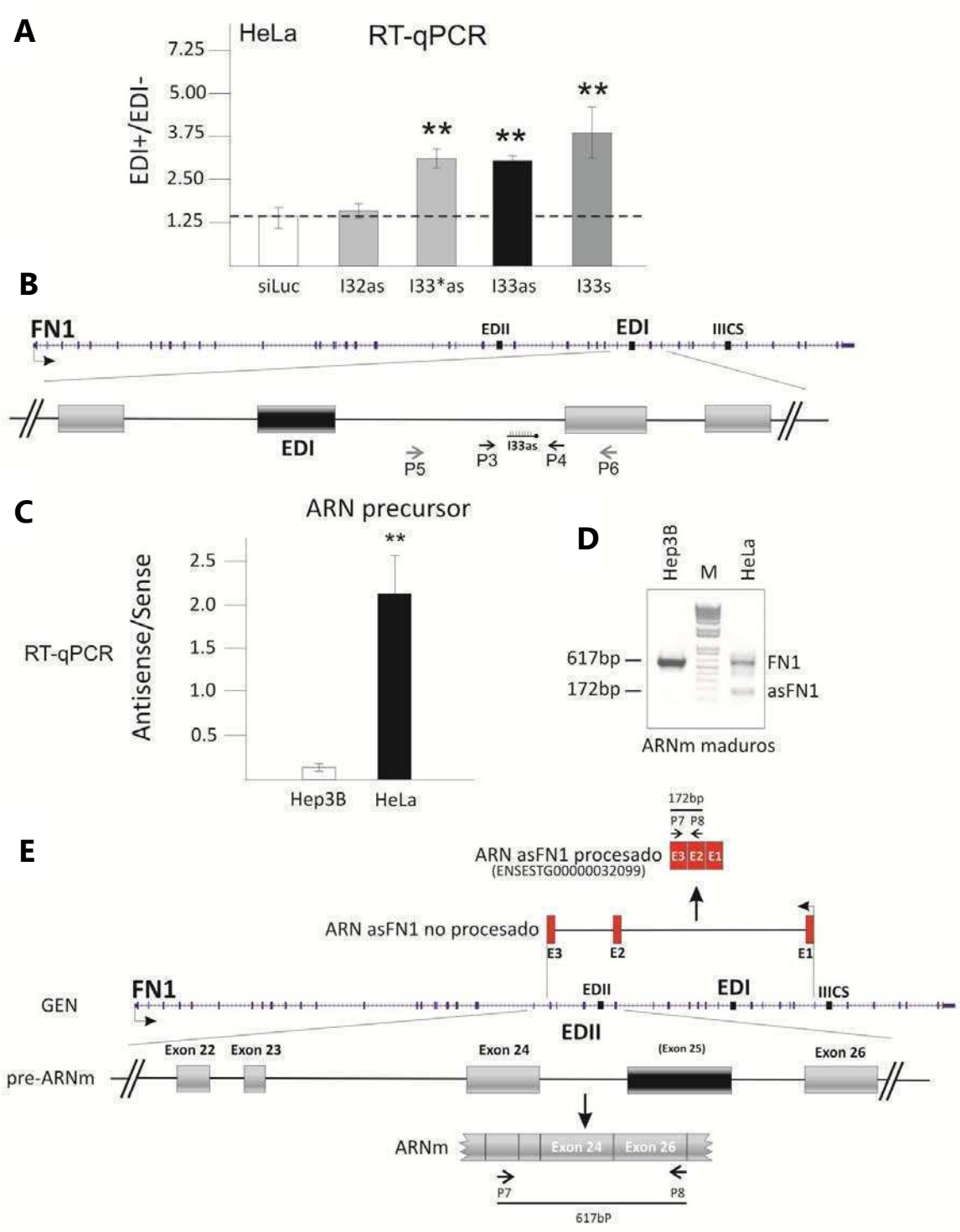
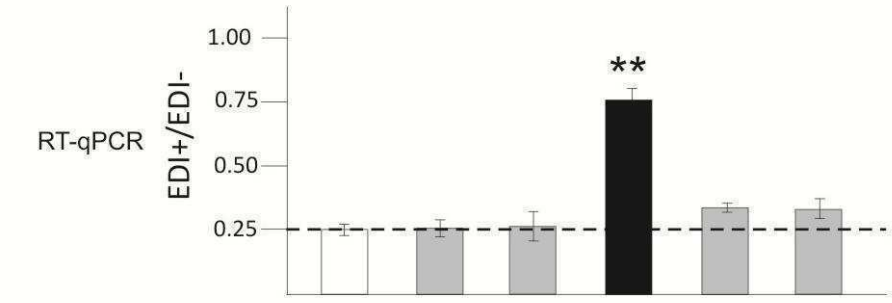


Figura 19. siRNAs intrónicos en células HeLa.
A. *A diferencia de Hep3B en HeLa I33s posee un efecto sobre el aumento de inclusión de EDI.* ***B.*** *Esquema de primers utilizados para medir la presencia de transcripción antisentido.* ***C.*** *Relación transcripción antisense/sense en las dos líneas celulares.* ***D.*** *Comparación de los niveles de transcripto procesado de FN1 y del gen ubicado en antisentido en Hep3B y HeLa.* ***E.*** *Diagrama del gen FN1 mostrando el transcripto antisentido solapante (arriba rojo).*

3.1.6 El estado de la cromatina y el efecto de I33as

Según nuestra hipótesis inicial, el estado de la cromatina debía jugar un rol muy importante para que los siRNAs fueran capaces de afectar el *splicing* alternativo mediante el TGS. Para indagar sobre esta idea decidimos tratar células en cultivo con compuestos químicos que fueran capaces de modificar la estructura de la cromatina. En primer lugar utilizamos TSA (tricostatina A) y 5´azadeoxicitidina (5azadC), dos drogas comúnmente usadas para alterar el estado de la cromatina ya que son inhibidores de desacetilasas de histonas (TSA) y metil transfererasas del DNA (5azadC). Ambas son capaces de producir una relajación general de la estructura de la cromatina de manera indiscriminada a lo largo del genoma. Al transfectar células con I33as y dejarlas durante 72 hs con 5azadC o 24 hs con TSA, o la combinación de ambas, pudimos observar una pérdida casi completa del efecto sobre el *splicing* alternativo en los tres tratamientos (Fig. 21A).



AGO1 ARNm niveles relativos	100±5	7.6±0.5	105±3	99±4	5.9±0.7	103±3
AGO2 ARNm niveles relativos	100±2	120±7	8.5±1	102±3	125±6	10±2

Figura 20. AGO1 y AGO2 son necesarias para el efecto de I33as.
El knockdown de AGO1 así también como el de AGO2 disminuye significativamente el efecto de I33as sobre el splicing alternativo de EDI. Los niveles de expresión de ambas proteínas fueron controlados mediante la cuantificación del RNA mensajero por PCR en tiempo real (tabla inferior).

Luego utilizamos una nueva droga, recientemente desarrollada, llamada BIX 01294, la cual inhibe con mucha especificidad metil transferasas de histonas capaces de modificar la lisina 9 de la histona H3 mediante el agregado de un grupo dimetilo. Es importante recordar que la bibliografía mostraba que la transfección de siRNAs era capaz de disparar TGS aumentando la presencia de dos marcas de histonas

relacionadas a heterocromatina facultativa: H3K27me3 y H3K9me2. BIX es entonces, capaz de inhibir la enzima que realiza esta última modificación. El tratamiento con esta droga durante 72 hs fue capaz de eliminar el efecto del siRNA intrónico sobre el SA de EDI (Fig. 21B).

Los resultados obtenidos hasta este punto con TSA, 5azadC y BIX resaltan la posibilidad de la ocurrencia de dos fenómenos contrapuestos de manera simultánea y en competencia. Por un lado, la utilización del siRNA "intentando" compactar la cromatina en su región blanco y por otro lado, la administración de drogas que inhiben enzimas claves de la vía de silenciamiento favoreciendo una relajación del estado cromatínico.

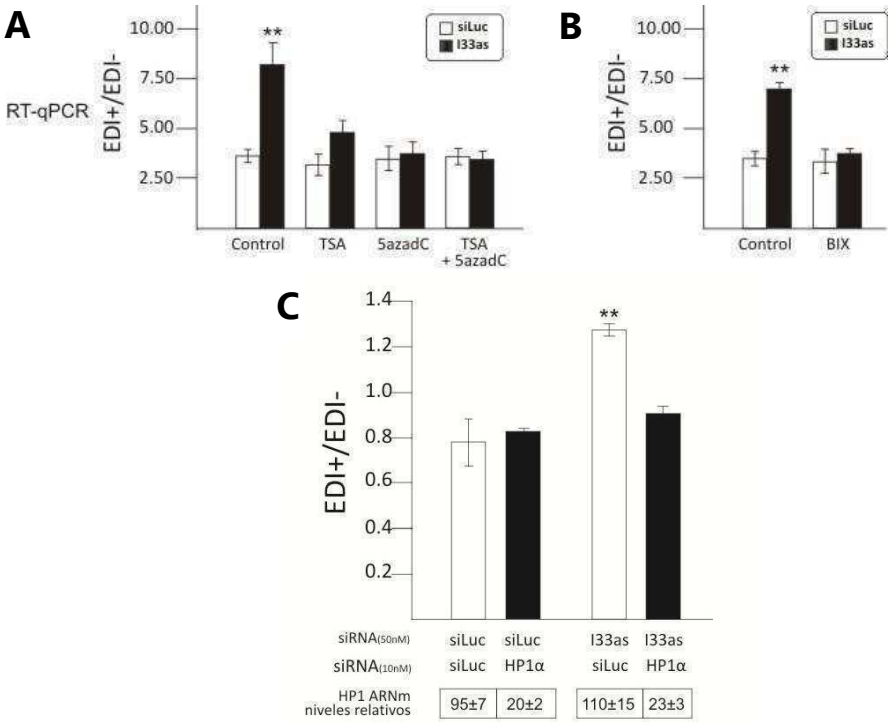


Figura 21. El estado de la cromatina afecta la actividad de I33as.
A. *El efecto de I33as es reducido con la utilización de un inhibidor de desacetilasas de histonas (TSA) y completamente eliminado con la utilización de un inhibidor de metil transferasas del DNA (5azadC).*
B. *Adicionalmente, un inhibidor especifico de metil transferasas de H3K9 (BIX) también suprime el efecto de I33as.*
C. *El knockdown de HP1 alfa, una proteína clave en el mantenimiento de estructuras heterocromatínicas, anula la capacidad de I33as de afectar el splicing alternativo de EDI.*

Adicionalmente llevamos a cabo el *knockdown* de HP1α (heterochromatin protein 1), un componente fundamental para el mantenimiento de la heterocromatina facultativa, y también encontramos una dependencia del efecto de I33as con respecto a la presencia de la proteína en cuestión (Fig. 21C).

En este contexto, y de acuerdo a lo observado, el estado de la cromatina al igual que las proteínas involucradas en su mantenimiento parecerían ser ejes fundamentales en el mecanismo de regulación del *splicing* alternativo que hemos estado estudiando.

Pero… ¿I33as era capaz de afectar el estado cromatínico o modificar marcas epigenéticas en las histonas sobre su región blanco? Con la idea de poder responder a esta pregunta realizamos una inmunoprecipitación de la cromatina nativa (nChIP) con anticuerpos capaces de reconocer H3K9me2 y H3K27me3. El nChIP es una técnica especialmente utilizada para explorar la presencia de marcas de histonas debido a que al no utilizar *crosslinking* (ver sección 7.1.9) ni sonicación, las colas de histonas altamente lábiles se mantienen mejor conservadas y aumentan notablemente la eficiencia de la inmunoprecipitación (Umlauf et al., 2004).

De esta manera, transfectamos células HeLa con siLuc o I33as, luego de 72 hs purificamos núcleos y llevamos a cabo el protocolo de nChIP con anticuerpos contra H3K9me2 y H3K27me3. Medimos por PCR en tiempo real cuatro amplicones diferentes (Fig. 22A), uno en ubicado en el exón1 (A), otro en el exón 34 (B) río abajo de EDI en cercanías de I33as, otro en el exón 35 (C) y el restante en el exón 36 (D). Pudimos observar que la transición con I33as, pero no con siLuc, provoca un aumento significativo de las dos marcas, H3K9me2 (Fig. 22B arriba) y H3K27me3 (Fig. 22B abajo) en las regiones B y C, pero no así en el promotor. Este incremento de marcas asociadas a heterocromatina facultativa en la región blanco de I33as, conjuntamente con la dependencia de maquinaria modificadora de la cromatina ilustran que no sólo es importante el estado previo de la cromatina, sino que además los siRNAs intrónicos por sí mismos son capaces de modificar algunas de éstas marcas epigenéticas.

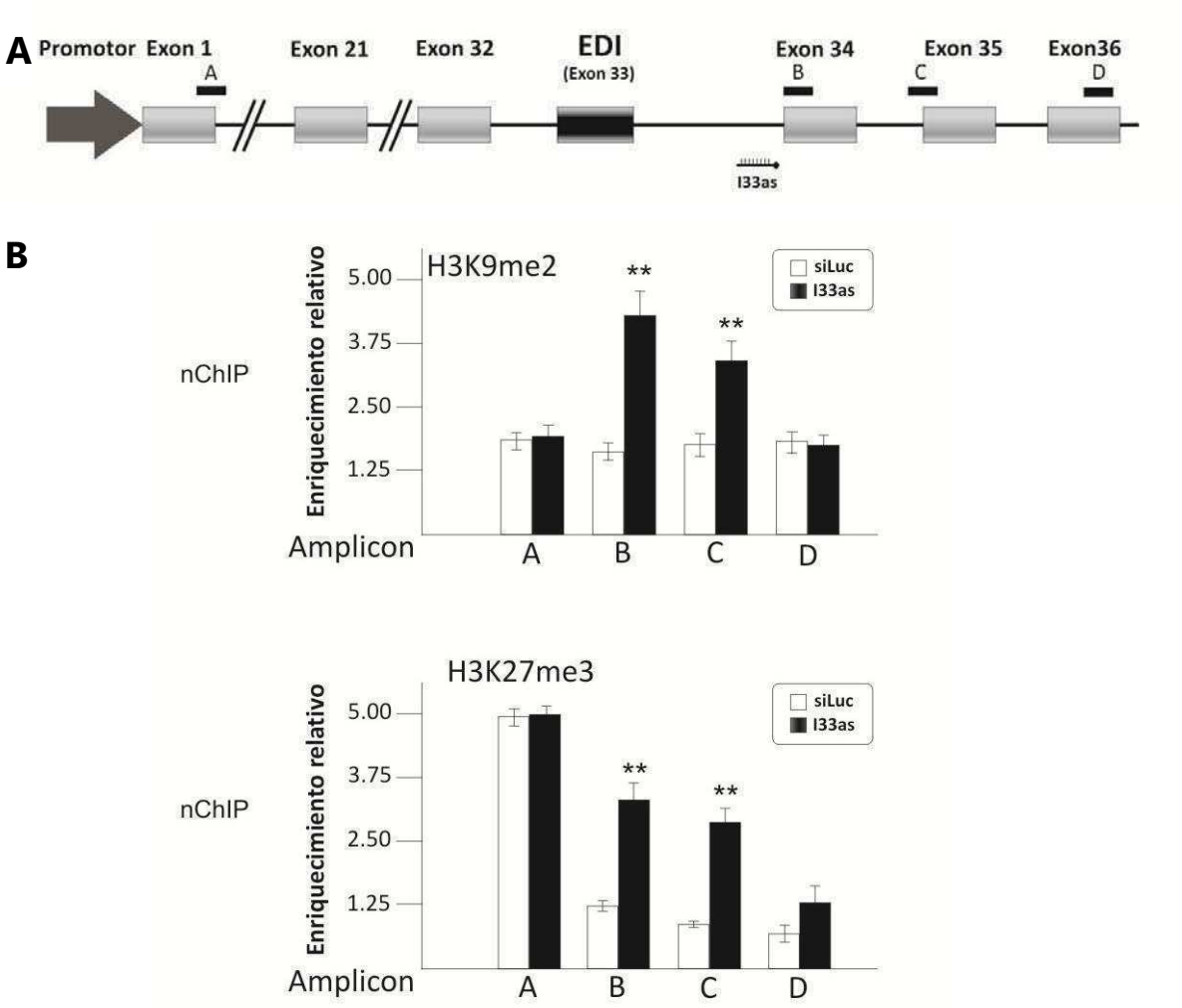


Figura 22. I33as genera marcas de silenciamiento en cercanías de la región blanco.
A.*Diagrama del gen FN1 con los 4 amplicones utilizados en este experimento.*
B. *Analisis realizado por nChIP mostrando que la transfección con I33as en células HeLa aumenta el nivel de H3K9me2 (arriba) y H3K27me3 (abajo) en las regiones ubicadas río abajo del sitio blanco, pero no afectan al exón 1 en cercanías del promotor.*

3.1.7 Elongación: el eslabón perdido

Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de la regulación del *splicing* alternativo por medio de la elongación de la RNA polimerasa II. Como ya se ha mencionado en la introducción una polimerasa más "lenta" le brinda más tiempo a la maquinaria de *splicing* para que ésta sea capaz de reconocer un exón alternativo y así aumentar su tasa de inclusión (ver sección 1.1.5). A los fines de poder indagar sobre el rol de la elongación en los efectos de I33as sobre el *splicing* alternativo de EDI decidimos trasladarnos a un modelo de estudio cuyas herramientas ya habían sido

utilizadas por nuestro laboratorio para tal fin: los minigenes. En primer lugar nos aseguramos que I33as fuera capaz de afectar el *splicing* alternativo de EDI en el minigén clásico de fibronectina que contiene el promotor original del gen conjuntamente con el exón EDI, sus intrones y parte de los exones flanqueantes (-1 y +1) ubicados sobre un "esqueleto" de globina (Fig. 23A, izquierda). Bajo estas condiciones obtuvimos resultados equiparables a los efectos endógenos de la utilización del siRNA cuando medimos la relación inclusión/exclusión de EDI por rRT-PCR en células Hep3B transfectadas con siı uc o I33as (Fig. 23A izquierda). Posteriormente utilizamos un minigén de FN inducible por tetraciclina generado en nuestro laboratorio por Manuel de la Mata (de la Mata y Kornblihtt, 2006). Este minigén puede ser inducido por un transactivador fuerte como VP16 o uno débil como SP1. En la figura 23A (medio) se puede ver que cuando se utiliza SP1, que solamente promueve iniciación, el efecto de I33as sobre el aumento de la inclusión es de aproximadamente 3 veces (panel de la izquierda), sin embargo, se ve reducido significativamente cuando el transactivador utilizado es VP16 que promueve tanto iniciación como elongación de la transcripción (panel de la derecha). Para poder desdoblar la actividad de VP16 y entender si la disminución en el reconocimiento de EDI estaba dada por el aumento en elongación concomitante a la utilización de dicho transactivador, decidimos utilizar otro sistema de minigenes inducibles de fibronectina que poseen el exón EDI bajo las ordenes de un promotor de HIV-Gal4. Para este sistema además de contar con el clásico VP16 podíamos utilizar un mutante de VP16 denominado SW6 portador de cuatro mutaciones puntuales en residuos Phe. SW6 es capaz de estimular la iniciación de manera análoga a VP16, pero es incapaz de estimular elongación. Bajo este nuevo sistema, la transfección con I33as aumentó la inclusión de EDI más de 2 veces cuando se utilizó SW6 como transactivador, pero su efecto fue nulo cuando se utilizó transactivó con VP16 salvaje (Fig. 23A derecha).

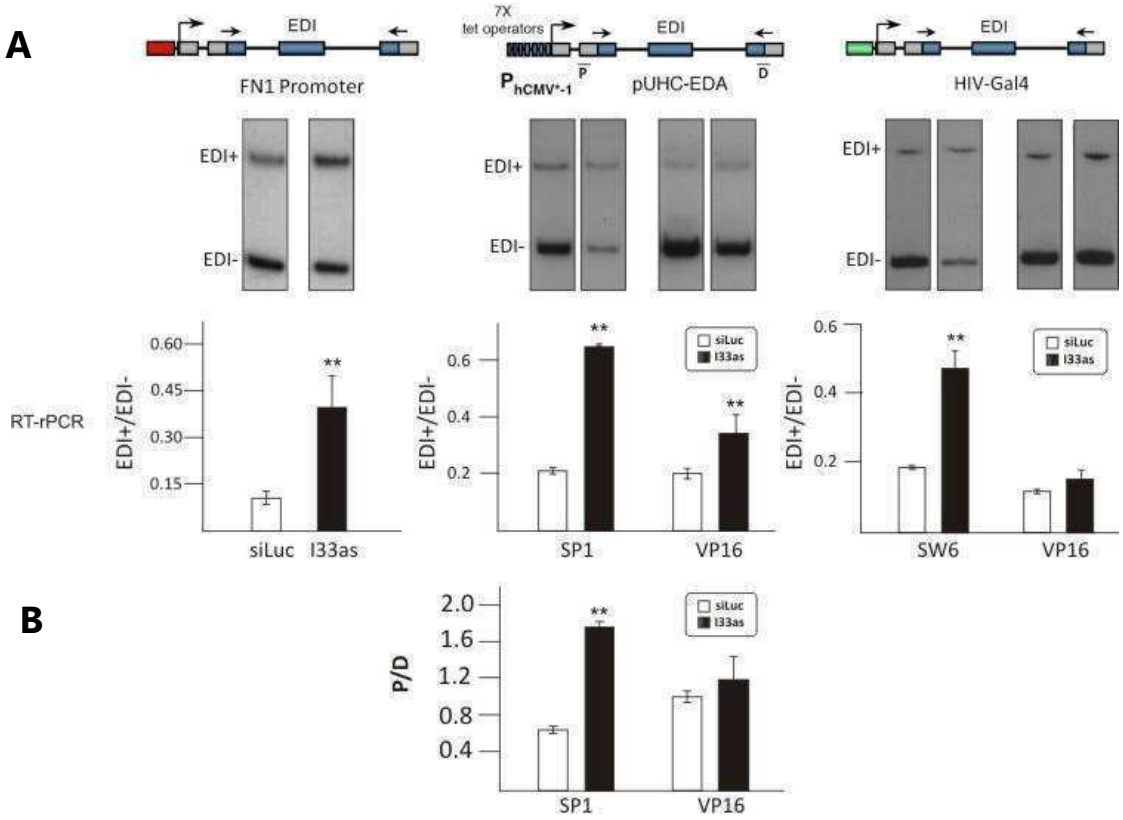


Figura 23. La elongación es afectada por I33as.
A. *Efecto de I33as sobre minigenes reporteros del splicing alternativo de EDI, expresados bajo el control de diversos promotores y transactivadores. Promotor de fibronectina (izquierda), Promotor inducible por tetraciclina, transactivado por tTA-Sp1 o tTA-VP16 (centro) y Promotor HIV-Gal4, transactivado por Gal4-VP16 o Gal4-SW6 (derecha).*
B. *Medición de elongación/procesividad de Pol II sobre el minigén inducible por tetraciclina co-transfectado con siLuc o I33as, utilizando tTA-Sp1 o tTA-VP16 como transactivadores.*

Como se ha argumentado en el introducción (ver sección 1.1.2) la medición de cambios en la tasa de elongación de la Pol II *invivo* es una tarea extremadamente dificultosa. Una forma indirecta de hacerlo es mediante la medición de acumulación de un precursor proximal (P) respecto a uno distal (D) tras un determinado estimulo. En nuestro caso ese estímulo fue la transfección con siı uc o I33as utilizando el minigén inducible por tetraciclina. ı uego utilizamos primers ubicados río arriba (P) y río abajo (D) del sitio blanco de I33as y potencial lugar de pausado o disrupción de la elongación de la Pol II, para cuantificar en tiempo real por qRT-PCR la relación Proximal/Distal (P/D). En la figura 23B se puede apreciar un aumento de más de 3 veces en esta relación entre I33as y siı uc cuando se utilizó SP1, en contraposición con lo observado con VP16 donde no se observa ningún cambio significativo.

Estos resultados son sumamente consistentes con la hipótesis original de nuestro trabajo según la cual la utilización de los siRNAs intrónicos sería capaz de afectar el estado de la cromatina en la región blanco y esto a su vez interferir sobre la tasa de elongación de la Pol II, enlenteciéndola y por ende favoreciendo la inclusión del exón alternativo en cuestión.

3.1.8 Efecto de siRNAs con *targets* en exones

Nos propusimos dilucidar si los efectos sobre el *splicing* alternativo vía TGS de los RNA pequeños estaban restringidos a secuencias intrónicas. Para ello, diseñamos dos siRNAs dirigidos contra el exón 21 (E21as), lejano a EDI, y el exón 34 (E34as), ubicado río abajo de EDI y a menos de un centenar de bases del sitio blanco de I33as. En la figura 24 (arriba) se observa que ambos fueron eficientes para disminuir la cantidad de mRNA de fibronectina en más de un 85%. Sin embargo, únicamente E34as fue capaz de afectar los niveles de inclusión del exón alternativo (Fig. 24, abajo), aumentando su inclusión de manera similar a I33as. Este resultado puede ser interpretado a la luz de que E34as está localizado en una región muy cercana a EDI, a diferencia de lo que ocurre con E21as, pero además también hace blanco en cercanías a la región de I33as, en el cual hemos identificado y caracterizado los efectos sobre el *splicing* alternativo.

ı o expuesto anteriormente nos lleva a concluir que existen, al menos, dos mecanismos que actúan de manera simultánea e independiente cuando se transfectan siRNAs dirigidos a exones en células humanas; por un lado el PTGS afectando los niveles de mRNA en el citoplasma y por el otro, el TGS modificando la estructura de la cromatina y en este caso el procesamiento del RNA precursor.

Un experimento adicional que agrega evidencia en pos de esta idea fue realizar la transfección de siı uc y E34as en Hep3B conjuntamente con el minigén inducible de FN1. Tras purificar el mRNA a las 48 hs y realizar una rRT-PCR (RT-PCR radiactiva) pudimos observar un claro efecto sobre la tasa de inclusión de EDI, pero no se apreciaron diferencias detectables en los niveles de mRNA (Fig. 25, panel de la

izquierda). En tanto que a las 72 hs se produjo una notable disminución de la cantidad de RNA mensajero, pero aun así en el mRNA remanente pudimos observar un efecto de I33as sobre el *splicing* alternativo comparable al medido a las 48 hs (Fig. 25, panel de la derecha).

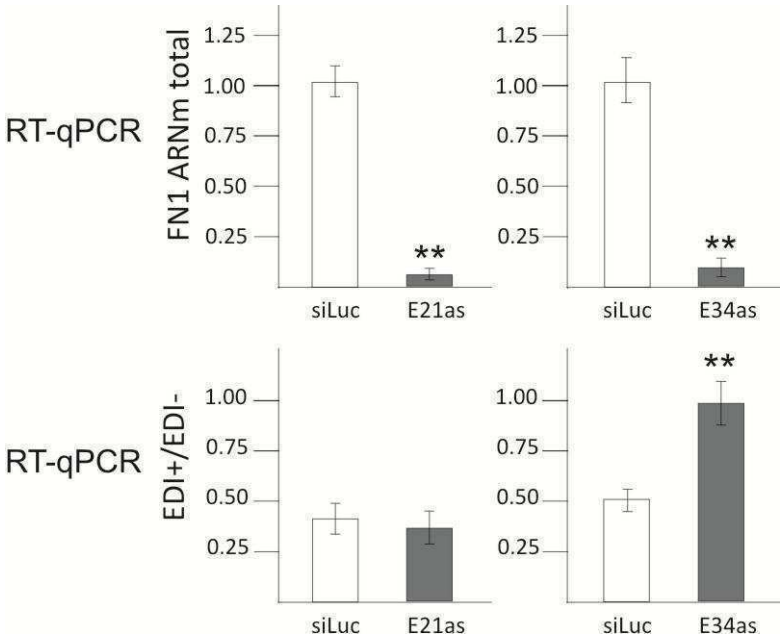


Figura 24. Efecto de siRNAs exónicos sobre EDI.
En la parte superior de la figura se puede observar que dos siRNAs dirigidos contra exones (E21as y E34as) disminuyen significativamente la concentración de mRNA de FN1. Sin embargo, solo aquel dirigido contra una región cercana al exón EDI (E34as) es capaz de alterar su patrón de splicing alternativo.

Aunque la realización de una RT-PCR radiactiva no es cuantitativa a la hora de medir niveles de transcripción podemos interpretar, con cierto reparo, que a las 48 hs predomina el efecto de TGS sobre el *splicing* alternativo de EDI, a la vez que a las 72 hs se suma el efecto de PTGS actuando sobre los niveles de mensajero total. El hecho de que aún en este último caso la relación inclusión/exclusión se mantenga equiparable hace suponer que ambas vías actúan efectivamente de manera independiente.

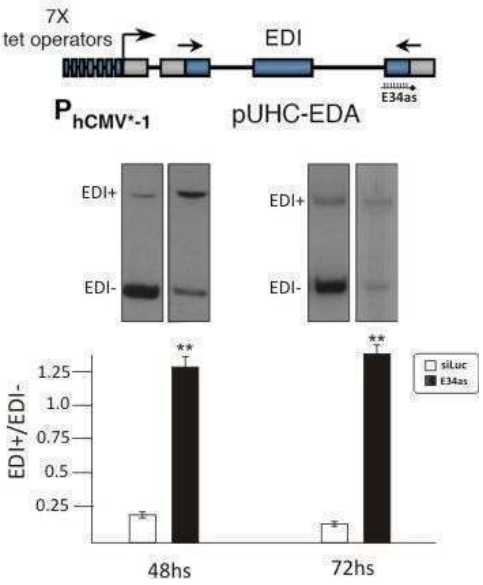


Figura 25. TGS vs PTGS
Efecto de E34as sobre el splicing alternativo y expresión del minigén inducible por tetraciclina de EDI tras 48 y 72 hs.
A las 48 hs, panel de la izquierda, se observa principalmente el efecto sobre el splicing alternativo. Mientras que a las 72 hs, panel de la derecha, se puede apreciar la suma de los dos efectos: variación en el patrón de splicing alternativo, pero también en la cantidad de mRNA.

4 CAPÍTULO II

El *splicing* alternativo y la vía de TGS endógena

Conociendo que los RNA pequeños introducidos en células humanas por medio de transfecciones eran capaces de afectar la estructura de la cromatina y, dependiendo su cercanía a un evento de *splicing* alternativo, el reconocimiento del mismo, nuestro trabajo se vio directamente enfocado en tratar de responder a la siguiente pregunta:

¿Existen RNA pequeños endógenos capaces de alterar el *splicing* alternativo mediante la vía de TGS de manera natural?

En este capítulo describiremos los experimentos realizados en la búsqueda de una respuesta para esta pregunta.

Utilizando diferentes estrategias a nivel genómico y con la ayuda de herramientas bioinformáticas hemos abordado esta cuestión. En colaboración con el grupo de Benoit Chabot, en Canadá, hemos analizado el *splicing* alternativo de 96 eventos luego de producir el *knock-down* de AGO1 y Dicer para ver qué porcentaje de dichos eventos era afectado por la eliminación de proteínas claves de la vía de TGS, arrojando luz sobre potenciales candidatos endógenos.

Por otro lado, y en colaboración con los grupos de Juan Valcárcel y Eduardo Eyras en Barcelona hemos realizado un ChIP-seq (ChIP seguido por ultrasecuenciación) con anticuerpos contra AGO1 y varias marcas de histonas (H3K9me2, H3K27me3 y H3K36me3) con el fin de poder hallar sitios de pegado de ambas proteínas a nivel genómico e indagar sobre la posible convergencia de estos sitios con marcas de histonas y eventos de *splicing* alternativo.

4.1 Resultados II

4.1.1 RNA pequeños endógenos: ¿materia prima del TGS?

La potencial relevancia fisiológica del proceso que hemos estudiado y descripto en el Capítulo I de este trabajo de tesis ha sido resaltada por el hecho de que se hayan encontrado recientemente siRNAs endógenos y miRNAs capaces de regular la expresión de genes de mamíferos mediante modificaciones de histonas y metilación del DNA (González et al., 2008; Khraiwesh et al., 2010; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Zhang et al., 2008a; Zhang et al., 2008b). Este panorama nos hizo focalizar en los distintos tipos de RNA pequeños endógenos que podrían llegar a disparar esta vía.

Los miRNA son, sin duda, los primeros candidatos a analizar debido a su importancia biológica, el conocimiento que de ellos se tiene y los antecedentes que muestran son capaces de generar silenciamiento vía TGS (González et al., 2008; Khraiwesh et al., 2010). La búsqueda bioinformática nos ha revelado que 289 precursores de miRNAs (sobre un total de 689 en la base de datos de UCSC, http://genome.ucsc.edu; tabla wgRNA de sno/miRNAs) están alojados en intrones, de los cuales 110 (casi el 40%) lo hacen flanqueando algún evento de *splicing* alternativo. Pero este escenario podría ser dramáticamente mayor si tenemos en cuenta que los miRNAs pueden disparar TGS aún con algunas bases mal apareadas (*mismatches*) con el mRNA naciente de acuerdo a la evidencia publicada por el grupo de John Rossi (Kim et al., 2008) en células HeLa y 293T.

4.1.2 La depleción de AGO1 y Dicer afecta muchos eventos de *splicing* alternativo

Debido a una imposibilidad metodológica y económica de poder estudiar uno a uno los diferentes miRNAs y sus posibles blancos intrónicos, es que decidimos ir por el camino inverso. Si existieran RNA pequeños endógenos (miRNAs, piRNAs, siRNAs, etc.) regulando de manera directa el *splicing* alternativo por TGS, entonces, la eliminación de la maquinaria básica de esta vía debería afectar los eventos de *splicing* por ellos regulados. Así, realizamos el "*knockdown*" de AGO1 (efector) y Dicer (generadora de algunos precursores como los miRNAs y siRNAs) en células HeLa y Hep3B. Luego de 72

hs extrajimos el RNA y lo utilizamos en un experimento "*high-throughput*" por medio de la utilización de un panel automatizado de RT-PCR con la capacidad de verificar 96 eventos de *splicing* alternativo. Estos eventos han sido seleccionados por su interés biológico e importancia en procesos relacionados al cáncer.

Al analizar los resultados encontramos que el 35% y 37% de los eventos de *splicing* del panel cambiaban sus patrones de isoformas con el *knockdown* de AGO1 en Hep3B y HeLa respectivamente (Fig. 26 y Tabla 1), siendo esta la primera evidencia experimental de una posible regulación endógena por medio del TGS y la primera demostración de la importancia de AGO1 sobre la regulación del *splicing* alternativo.

Adicionalmente, encontramos que un 22% (HeLa) y 29% (Hep3B) de los eventos modificados con el *knockdown* de AGO1 también se modificaban (y en el mismo sentido) con el *knockdown* de Dicer (Fig. 26 y Tabla 2).

Por otro lado, el 53% (Hep3B) y 51% (HeLa) de los eventos no mostraron cambios significativos tras la depleción de AGO1 o Dicer.

Detalladamente podemos señalar que un 18% (Hep3B) y 27% (HeLa) de los eventos fueron afectados únicamente por siAGO1 y podrían reflejar aquellos casos de TGS independientes de Dicer. Mientras que un 12% (Hep3B y HeLa) fueron modificados por el *knockdown* de Dicer exclusivamente pudiendo reflejar el grupo de eventos que podría estar asociado a una regulación clásica de PTGS por medio de miRNAs, en este caso puntual afectando el *splicing* alternativo de manera independiente de AGO1.

Si los cambios en *splicing* alternativo luego del *knockdown* de AGO1 fuesen debidos a un mecanismo de TGS-elongación de Pol II, entonces podríamos esperar encontrar alguna similitud estructural en aquellos eventos que responden a este fenómeno. De hecho, un profundo análisis de las longitudes de los intrones flanqueantes a los eventos de *splicing* alternativo afectados por la depleción de AGO1 nos ha revelado que los intrones ubicados río arriba de dichos eventos son significativamente más cortos, tanto en HeLa (P=0,0268) como en Hep3B (P=0,0201),

respecto al resto de los eventos. En contraposición, no encontramos diferencias significativas en los intrones ubicados río abajo de los eventos de *splicing* alternativo.

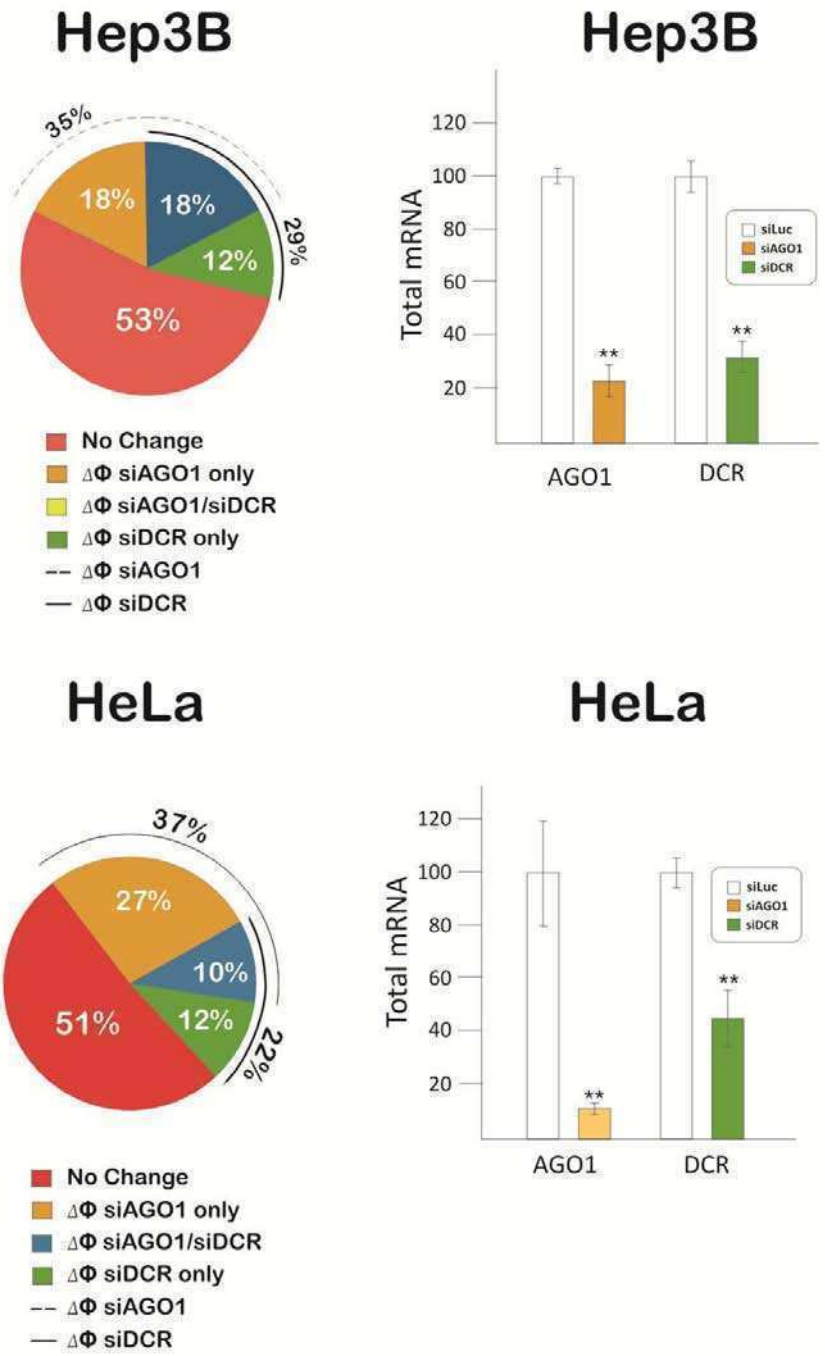


Figura 26. Efecto de la depleción de AGO1 y Dicer sobre múltiples eventos de splicing alternativo.

Hemos utilizado una plataforma capaz de medir 96 eventos de splicing alternativos en forma simulánea. Distribución del $\Delta\Psi$ (porcentaje de genes de la plataforma) significativamente afectados y no afectados por la eliminación de AGO1 y Dicer en células Hep3B (arriba) y HeLa (abajo).La expresión de AGO1 y Dicer tras el knockdown fue contralada por medio de PCR en tiempo real (derecha).

Hep3B

	siAGO1	
	p value	ΔΨ
ECT2	2.E-05	41.40
DNMT3B	6.E-05	39.56
INSR	1.E-04	15.38
CHEK2	2.E-04	7.39
AKAP13	3.E-04	18.35
NUP98	4.E-04	4.62
FN1 (IIICS ↡)	5.E-04	34.61
DRF1	7.E-04	18.59
MYO18A	9.E-04	60.91
UTRN	1.E-03	1.54
TLK1	2.E-03	3.7
CASP9	3.E-03	16.76
FANCL	4.E-03	3.10
SYNE2	4.E-03	74.81
LIG4	5.E-03	3.10
OPA1	5.E-03	21.00
FN1 (EDII)	8.E-03	0.97
FGFR2	8.E-03	21.48
TOPBP1	9.E-03	13.89
POLB	1.E-02	12.25
BCL2L11	1.E-02	8.14
APC	2.E-02	46.01
CCNE1	2.E-02	1.10
C11orf17	2.E-02	10.47
C1orf16	2.E-02	32.89
SHC1	3.E-02	2.09
PTPRB	3.E-02	8.49
C11ORF4	3.E-02	3.93
MCL1	4.E-02	5.44
SDCCAG8	4.E-02	4.55
LRDD	5.E-02	21.34
FN1 (IIICS ‡)	5.E-02	3.36
PCSK6	5.E-02	12.65
FN1 (EDI)	5.E-02	19.98

HeLa

	siAGO1	
	p value	ΔΨ
TIAF1	4.E-04	11.67
KITLG	6.E-04	17.11
SHC1	7.E-04	6.31
IGSF4	8.E-04	31.39
SHMT1	9.E-04	11.63

DDR1	1.E-03	24.99
RUNX2	1.E-03	29.09
DRF1	1.E-03	13.22
BCL2L11	2.E-03	32.34
C11ORF4	3.E-03	9.43
HSC20	3.E-03	6.69
TOPBP1	3.E-03	11.74
APP	4.E-03	11.10
BCL2L12	4.E-03	27.77
STIM1	5.E-03	2.03
CASC4	6.E-03	15.45
AKAP13	6.E-03	8.40
PAXIP1	6.E-03	50.33
CHEK2	7.E-03	11.18
PPP3CB	7.E-03	4.83
HNRPAB	1.E-02	8.89
LGALS9	1.E-02	27.77
C11orf17	1.E-02	17.92
FN1 (IIICS ↓)	1.E-02	27.93
HMMR	1.E-02	9.33
LIG3	2.E-02	4.93
MAPT	2.E-02	15.35
CCNE1	2.E-02	0.75
PCSK6	2.E-02	13.94
FGFR4	2.E-02	34.32
BTC	2.E-02	19.83
DSC3	3.E-02	38.20
PTPN13	4.E-02	7.78
SDCCAG8	4.E-02	5.80
CAPN3	4.E-02	36.21
FGFR1OP	5.E-02	10.94

Tabla 1. Cambios en splicing alternativo tras el knockdown de AGO1
Se detectaron cambios en 36 eventos de splicing alternativo en células HeLa y 34 eventos en Hep3B. Para cada evento de splicing se calculó el cociente entre la concentración de la isoforma más larga y la suma de concentraciones del resto de las isoformas. Este cociente ha sido expresado como un porcentaje, y con él se ha calculado un índice de porcentaje de splicing: Ψ.

HeLa				
	siAGO1		siDCR	
	p value	ΔΨ	p value	ΔΨ
BCL2L12	4.E-03	27.77	4.E-02	32.73
CHEK2	7.E-03	11.18	5.E-03	7.96
MAPT	2.E-02	15.35	2.E-02	47.07
PCSK6	2.E-02	13.94	2.E-03	18.63
SHMT1	9.E-04	11.63	2.E-02	8.89
MYO18A	4.E-04	11.67	3.E-02	23.54

Hep3B				
	siAGO1		siDCR	
	p value	ΔΨ	p value	ΔΨ
C11ORF4	3.E-02	3.93	8.E-04	3.04
CHEK2	2.E-04	7.39	1.E-02	6.96
DRF1	7.E-04	18.59	3.E-02	5.48
FGFR2	8.E-03	21.48	3.E-02	24.13
INSR	1.E-04	15.38	4.E-02	4.59
NUP98	4.E-04	4.62	2.E-02	4.26
PCSK6	5.E-02	12.65	3.E-02	12.15
POLB	1.E-02	12.25	3.E-02	4.89
SYNE2	4.E-03	74.81	1.E-02	64.44
MYO18A	9.E-04	60.91	2.E-03	46.53

Tabla 2. Cambios en splicing alternativo similares tras el knockdown de AGO1 y Dicer
Se muestran eventos de splicing alternativo con cambios similares en los valores de índice de porcentaje de splicing ΔΨ.

4.1.3 *Genome-wide screening*: ChIP-seq en células MCF7

Decidimos utilizar otra estrategia en la búsqueda de potenciales candidatos a regular el *splicing* alternativo vía TGS: la realización de experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) seguido de ultrasecuenciación (Barski et al., 2007) con anticuerpos contra AGO1 y varias marcas de histonas (H3K9me2, H3K27me3 y H3K36me3) además de histona total. Utilizamos las dos marcas de heterocromatina facultativa que habíamos visto que se incrementaban por medio del TGS en la región blanco del siRNA, conjuntamente con trimetilación de lisina 36, una marca que ha sido asociada al proceso de *splicing* (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; ı uco et al., 2010). Decidimos utilizar como modelo experimental células MCF7 debido a que en la literatura contábamos con datos en dicha línea celular de RNA-seq, esto es purificación de RNA y retrotranscripción seguido de ultrasecuenciación (Wang et al., 2008); ChIP-seq de Pol II (Welboren et al., 2009) y también de RNA pequeños por ultrasecuenciación (Mayr y Bartel, 2009). ı a idea general es poder cruzar toda la información de sitios de pegado de AGO1 a nivel genómico con las marcas de histonas, posibles sitios de pausado o acumulación de Pol II y finalmente con la presencia de algún RNA pequeño previamente descripto. ı uego filtrar todas las convergencias para quedarnos con aquellos sitios de unión de AGO1 que estuvieran cerca de algún evento de *splicing* alternativo. Como ya hemos señalado, el trabajo fue realizado en colaboración con los laboratorios de Juan Valcárcel y Eduardo Eyras, ambos ubicados en Barcelona.

ı a secuenciación del DNA purificado tras el ChIP fue realizada por un equipo Solexa ı td (Illumina Inc.) que normalmente produce pequeñas lecturas de aproximadamente 40 nucleótidos. En el caso de nuestro trabajo obtuvimos cerca de 10 millones de lecturas (*reads*) alineadas correctamente con el genoma humano, para cada muestra con cada anticuerpo, de una longitud promedio de 36 nucleótidos. El alineamiento fue llevado a cabo con el programa GEM (http://gemlibrary.sourceforge.net). Una vez realizado, se eliminaron las secuencias repetidas y nos quedamos con aquellos alineamientos perfectos, es decir, que no

contuvieran *mismatches.* Posteriormente y mediante la utilización de herramientas bioinformáticas analizamos la distribución de los *reads* a nivel genómico para cada muestra en la búsqueda de regiones donde pudiéramos detectar un *cluster* o acumulación de *reads*, que nos indicara un sitio de pegado (o pico) de la proteína detectada por el anticuerpo. Una vez determinados todos los picos y con el mismo software bioinformático se eliminaron los falsos positivos mediante la resta de picos en el control realizado sin anticuerpo. Este trabajo fue llevado a cabo en paralelo por el grupo de Eyras en Barcelona con un software propio en desarrollo y por nosotros con la utilización del programa MACS (Zhang et al., 2008c) (http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/).

4.1.4 Análisis de los datos de ChIP-seq

La tabla 3 muestra la cantidad de reads y la cantidad de picos (*clusters*) obtenidos para cada muestra. La columna de la derecha indica los resultados obtenidos con el programa MACS, mientras que la del medio hace referencia a los obtenidos por el grupo de Eyras. Es importante señalar que existe una diferencia metodológica en la utilización de los dos programas que puede llevar a diferentes números de *clusters* totales y diferentes tamaños de cada *cluster*. Así, un *cluster* de MACS puede estar representado por dos o tres *cluster* de Eyras y viceversa.

Por un lado, el software "Eyras" toma cada *read* alineado y lo extiende desde los 36 nucleótidos hasta el tamaño promedio del material que se utilizó al inicio de la secuenciación. En el caso de nuestro ChIPs ese tamaño es de 250 nucleótidos. Luego procede a analizar los sitios donde existe un solapamiento parcial de los *reads* extendidos y guarda únicamente aquellos *clusters* donde existan al menos 3 *reads* solapándose, por encima del "ruido" generado por el *background* del control. Por el otro lado, MACS utiliza directamente los *reads* de 36 nucleótidos pero con la salvedad que analiza las lecturas de las dos hebras (sentido y antisentido) por separado, como se supone que cada *cluster* debería estar representado en promedio por la misma cantidad de *reads* de cada hebra, el programa filtra de manera de quedarse

únicamente con aquellos *clusters* que cumplan con este requisito, es decir, que estén formados tanto por *reads* en orientación *sense* como *antisense*. Como MACS no realiza una extensión de los reads utiliza ventanas de 500 nucleótidos aproximadamente para poder detectar los *clusters*. En cada ventana analiza la cantidad de *reads* sentido y antisentido por encima del ruido. Cuando encuentra una cantidad significativamente superior (usando un test de *Poisson*) MACS modela un "pico" con una altura y extensión relacionada con la cantidad de reads y su distribución en ambas hebras.

	Eyras	MACS
AGO1	20.441	24.692
H3	7.043	64.382
K9	38.963	23.085
K27	48.767	51.517
K36	42.988	77.530

Tabla 3. Número de clusters totales para cada IP.
En la tabla se pueden comparar la cantidad total de clusters obtenidos para cada IP tras la utilización del software desarrollado por el grupo del Dr. Eduardo Eyras (PICOS) o MACS.

4.1.5 AGO1 se encuentra enriquecido en promotores con alta actividad transcripcional

El primer paso luego de haber generado el *clustering* de *reads* fue conocer la distribución de AGO1 y las marcas de histonas a nivel genómico. Con tal fin analizamos los datos de los *clusters* obtenidos por el grupo del Dr. Eyras y como se puede apreciar en la figura 27A, encontramos que AGO1 (56%), H3K36me3 (69%) y H3 total (53%) presentan una mayor representación en regiones génicas. Luego realizamos un análisis más profundo de esta distribución dividiéndola en cuatro regiones génicas (promotores: desde el sitio de inicio de la transcripción hasta la posición -1.500, exones, intrones y cola: desde el sitio de terminación de la transcripción hasta 1.500 nucleótidos ubicados río abajo) de acuerdo a la base de datos de RefSeq

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) y relativizando los resultados a la cantidad de nucleótidos totales de cada región (Fig. 27B). Así descubrimos que AGO1 estaba enriquecido fundamentalmente en promotores y en exones al igual que H3 total. Como era esperable de acuerdo a los datos bibliográficos H3K36me3 estaba enriquecido principalmente en exones, acompañado de un aumento en la "cola" de los genes. Mientras que K9me2 y K27me3 se distribuyen de manera relativamente homogénea en nuestro experimento.

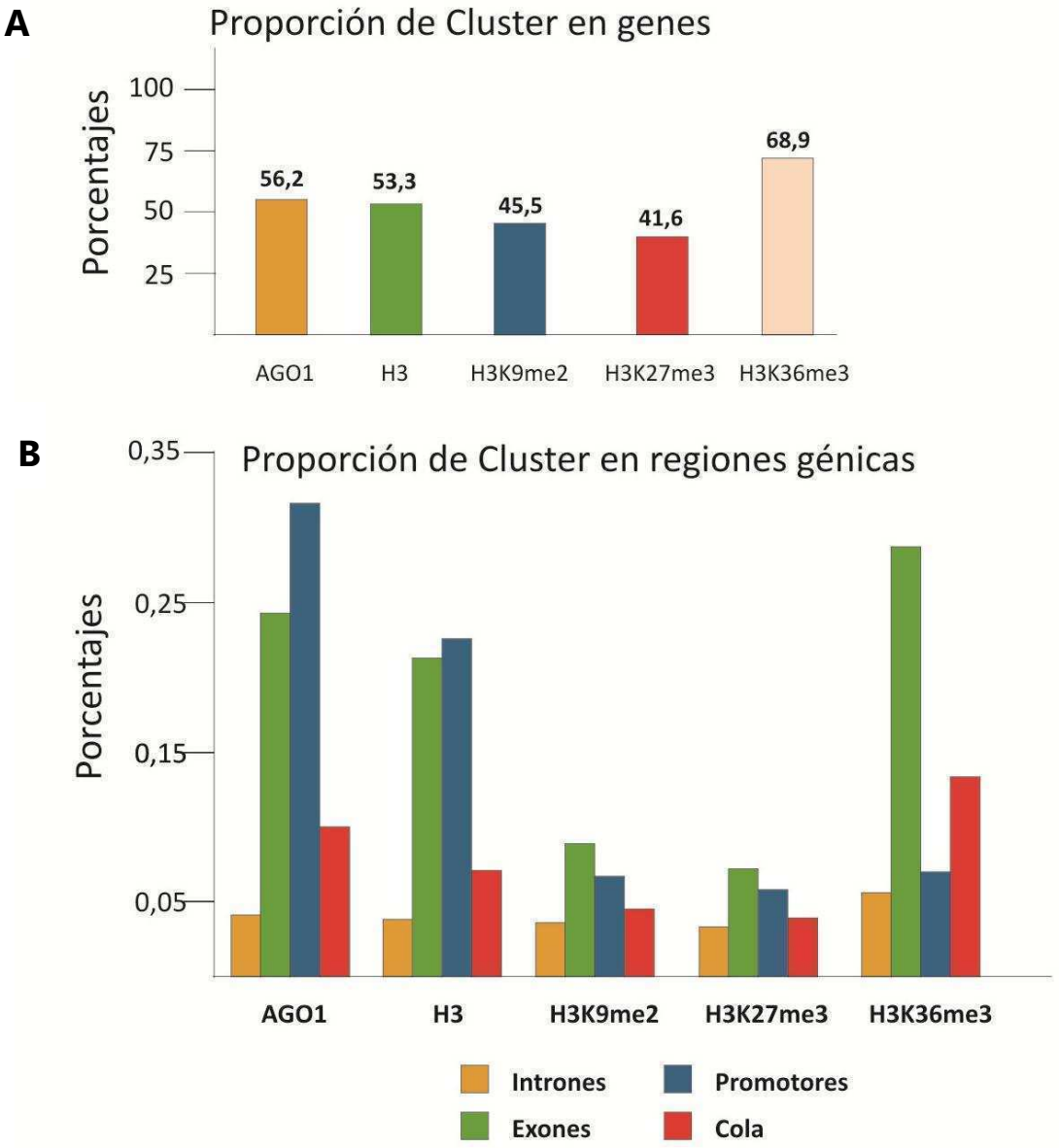


Figura 27. Distribución de los clusters a nivel genómico.
A. *Porcentaje de clusters totales que se encuentran alojados sobre regiones génicas.*
B. *Distribución de clusters dentro de genes de acuerdo a la localización en Promotores, Intrones, Exones y Cola. Las proporciones han sido relativizadas de acuerdo a las longitudes totales de cada región.*

ı uego utilizamos un software llamado CEAS desarrollado por el mismo grupo que desarrolló MACS (http://liulab.dfci.harvard.edu/CEAS/) en Harvard (Shin et al., 2009). Esta herramienta permite caracterizar la interacción proteínas-DNA a nivel genómico a partir de datos de ChIP-seq entregando información estadística sobre la distribución de estas interacciones y el enriquecimiento en regiones puntuales.

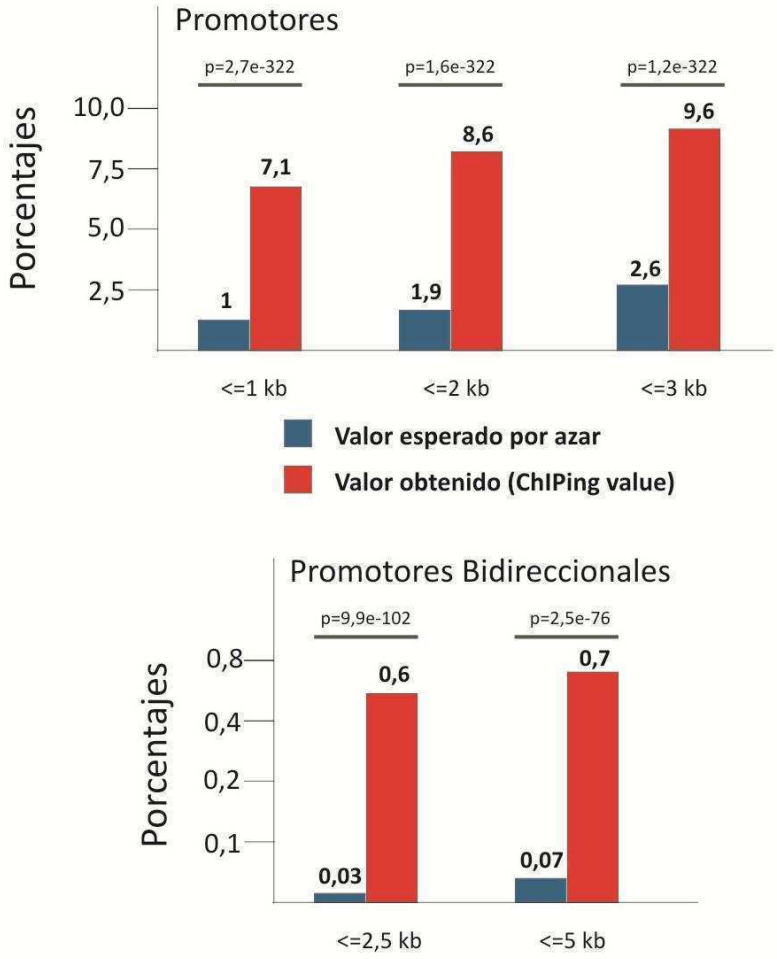


Figura 28. AGO1 enriquecido en promotores.
Porcentaje de clusters esperados por azar en cada una de las regiones (barra azul) y el porcentaje obtenido en el experimento (barras rojas). En la parte superior de la imagen se muestran el conjunto de todos los promotores de Refseq tomando 1.000, 2.000 y 3.000 pb río arriba del inicio de la transcripción. En la parte inferior se ha utilizado únicamente el subgrupo de promotores bidireccionales.

Puede apreciarse claramente el enriquecimiento de AGO1 en promotores (Fig. 28, arriba, barra rosa) tanto a 1000 pb (izquierda), a 2000 pb (centro) y 3000 pb (derecha) de aproximadamente 7 veces respecto al valor esperado por azar de acuerdo

al *background* genómico (barras azules). ı os valores *p* fueron calculados por CEAS con un test binomial a una cola. Este resultado es aún más notorio cuando se utiliza el grupo de promotores bidireccionales aumentando el enriquecimiento a más de un órden de magnitud, es decir, siendo 10 veces mayor al valor esperado por azar (Fig. 28 abajo).

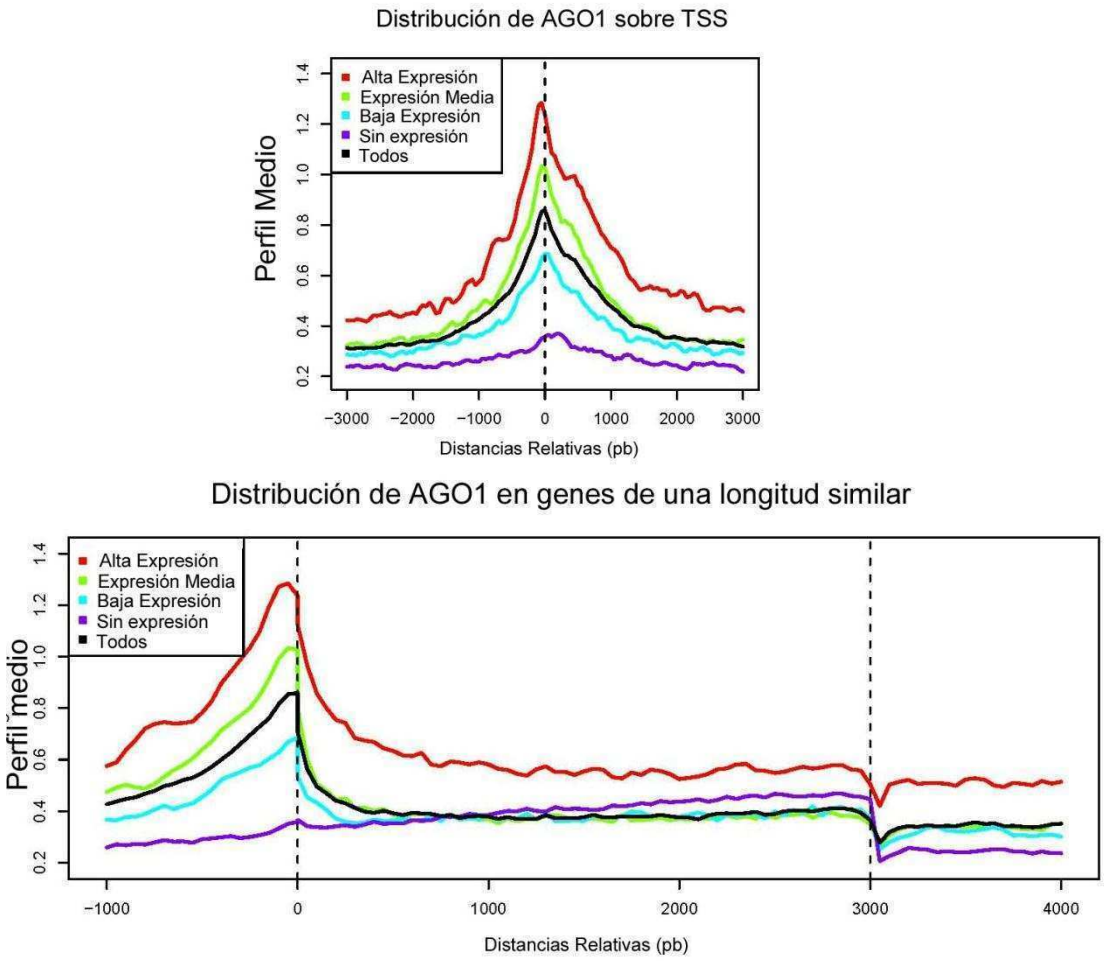


Figura 29. AGO1 enriquecido en promotores con alta actividad transcripcional. *AGO1 se encuentra enriquecido en promotores de genes que se transcriben activamente. A mayor actividad transcripcional, mayor es la cantidad de clusters de AGO1 en dicha región. Esto se puede apreciar tomando todos los promotores (arriba) o solamente los de aquellos genes que poseen una longitud similar a 3 kb (abajo).*

Por otro lado, CEAS es capaz de graficar la distribución de los *clusters* a lo largo de un alineamiento de genes que ordena a todos los genes contenidos en la base de datos a partir de su sitio de inicio de la transcripción (Fig. 29 arriba) o solo aquellos

genes de una longitud comparable a 3 kb (Fig. 29 abajo). En ambos casos, se puede observar un enriquecimiento de *clusters* de AGO1 río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por *transcriptional start site*) e incluso esparciéndose río abajo del TSS. Este enriquecimiento es mayor cuanto mayor es la actividad transcripcional (comparar línea roja vs línea verde o celeste en la figura 29) y nulo en genes que no se expresan (Fig. 29 arriba línea violeta). Los datos de expresión en MCF7 fueron obtenidos, como ya se ha mencionado, a partir de experimentos de RNA-seq publicados por el grupo de Christopher Burge (Wang et al., 2008).

Como control del análisis realizado con AGO1, hicimos el mismo análisis con H3K36me3 que es una marca muy estudiada en este tipo de experimentos y observamos el enriquecimiento de H3K36me3 descripto en la bibliografía, dependiente de la actividad transcripcional y aumentando hacia la región 3´ de los genes (datos no mostrados). Es importante mencionar que utilizando los *clusters* generados por el programa MACS obtuvimos los mismos resultados que con los generados por el grupo de Eyras.

4.1.6 AGO1 y H3K9me2 enriquecido en exones de genes con baja expresión

Dado que el análisis realizado previamente indicaba que AGO1 también estaba enriquecido en regiones exónicas decidimos en forma adicional utilizar la información de MACS y el programa "*sitepro*" del paquete de CEAS para analizar la distribución de los *clusters* de AGO1 y las diferentes marcas de histonas sobre los exones.

De acuerdo a este análisis se puede apreciar un pico de H3K36me3 en exones localizados en genes con alta expresión (Fig. 30, líneas sólidas), que disminuye en exones ubicados en genes con baja expresión (Fig. 30, líneas punteadas), algo que ya ha sido reportado en varias ocasiones. El gráfico nos muestra además un pico de AGO1 (línea roja) y en menor medida uno de H3K9me2 (línea celeste), pero fundamentalmente en genes con baja actividad transcripcional.

Como control utilizamos un conjunto de pseudoexones publicados por el grupo de Guigó (Tilgner et al., 2009), los cuales poseen rasgos característicos de exones pero no son utililzados como tal. En estas circunstancias ambos picos (AGO1 y H3K9me2) desaparecen independientemente de que el análisis se realice sobre los sitios dadores o aceptores de *splicing*.

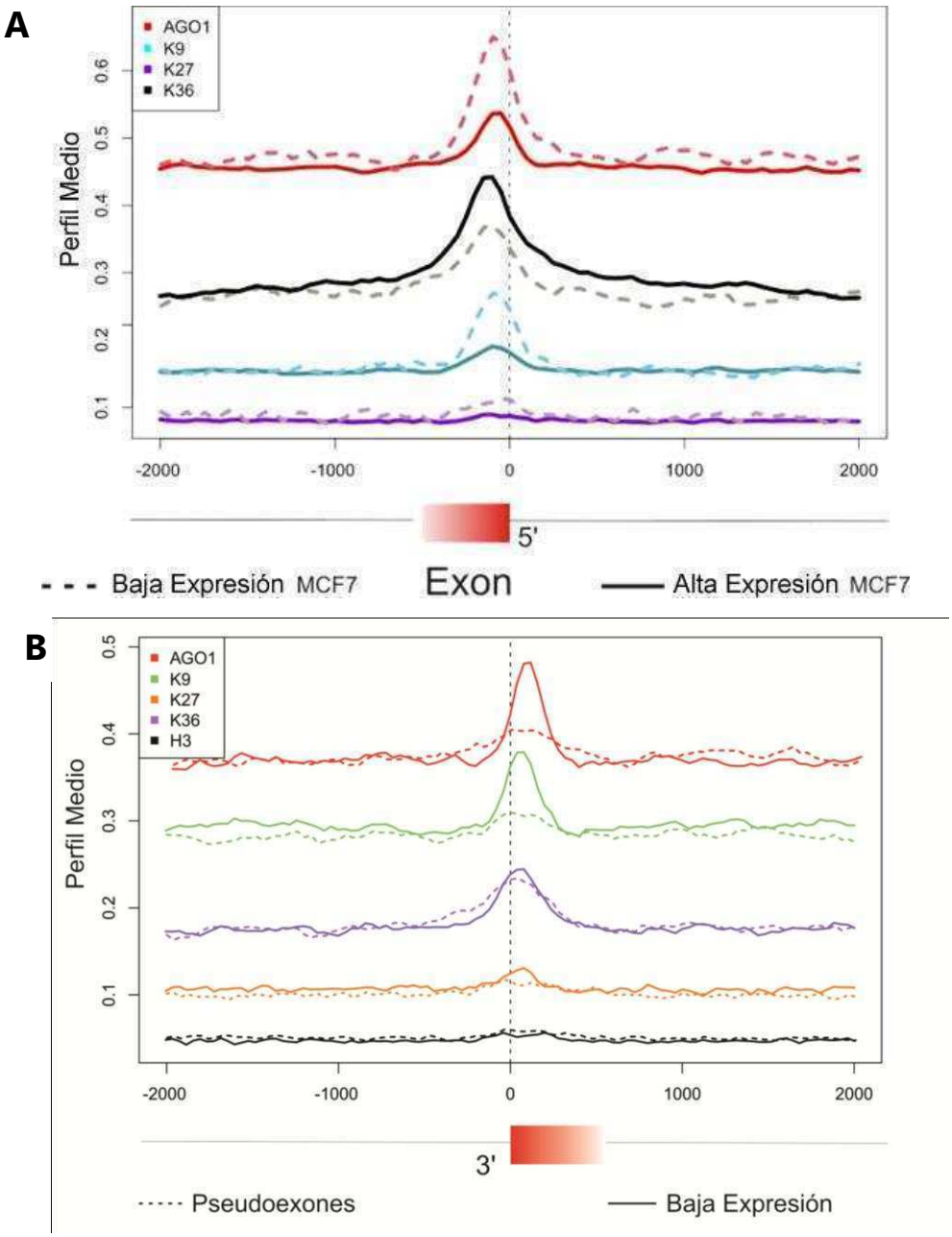


Figura 30. AGO1 y H3K9me2 enriquecido en exones con baja expresión.
A. *Utilizando el software "sitepro" detectamos un enriquecimiento de clusters de AGO1 y H3K9me2 en exones (líneas rojas y azules) fundamentalmente localizados en genes con baja actividad transcripcional (líneas punteadas).*
B. *Sin embargo, cuando utilizamos un set de pseudoexones (Tilgner et al., 2009) ambos picos desaparecen. Estos resultados son independientes de que el gráfico se realice sobre los sitios dadores o aceptores de splicing.*

4.1.7 Aumento de convergencia de marcas de histonas en los sitios blanco de AGO1

Más allá de conocer la distribución de los *clusters* de AGO1, nos interesamos por saber si los mismos mostraban alguna correlación con las marcas de histonas independientemente de su ubicación y contexto en el genoma. A tal efecto, analizamos bioinformaticamente la convergencia de marcas de histonas a nivel genómico y posteriormente la convergencia sobre los sitios blancos de AGO1. Sorprendentemente hallamos que todas las marcas de histonas aumentan notoriamente su convergencia sobre los *target* de AGO1. En la tabla 4, arriba, podemos apreciar los porcentajes de convergencia, entre todas las marcas de histonas, a nivel genómico. Mientras que en la misma tabla, debajo, podemos apreciar los porcentajes de dichas convergencias pero sobre las regiones blanco de AGO1. Por ejemplo, si observamos a nivel genómico podemos apreciar que el 7,87% de los *clusters* de H3K27me3 solapan parcialmente con al menos un *cluster* de H3K9me2. Sin embargo, cuando observamos esa convergencia pero sobre los sitios blancos de AGO1 (Tabla 4 abajo) vemos que ahora el 55,37% de los *clusters* de H3K27me3 solapan con algún *cluster* de H3K9me2. Lo mismo puede apreciarse con todas las posibles combinaciones de convergencia de marcas.

Cabe aclarar que las tablas tienen una entrada doble debido a que un *cluster* de H3K27me3 puede solapar con más de un *cluster* de H3K9me2 y viceversa, por lo tanto, no existe una relación lineal entre las diferentes posibles convergencias. Es decir, que los porcentajes de convergencia varían de acuerdo a qué grupo de *clusters* estemos analizando.

En el mismo sentido, los porcentajes de convergencia con un solapamiento parcial (al menos un nucleótido) entre AGO1 y las diferentes marcas oscila entre un 14% y 17%. Siendo exactamente 14,43% para H3K9me2, 14,36% para H3K27me3 y 17,17% para K36me3.

Porcentaje de convergencia a nivel genómico

	K9me2	K27me3	K36me3
K9me2		17,70	21,62
K27me3	7,87		8,71
K36me3	6,45	9,84	

Porcentaje de convergencia sobre los *targets* de AGO1

	K9me2	K27me3	K36me3
K9me2		55,11	49,03
K27me3	55,37		45,39
K36me3	41,01	37,97	

Tabla 4. Convergencia de marcas de histonas.
Analisis de solapamiento entre marcas de histonas a nivel genómico (arriba) y sobre los sitios target de AGO1 (abajo). Ambas tablas muestran los porcentajes de convergencias entre las marcas ubicadas en las filas y columnas correspondientes.

Nuestra interpretación de los resultados sugiere la existencia de dos hipótesis para explicar este escenario. La primera hipótesis (cuantitativa) señala que podría existir una acumulación de nucleosomas en los sitios *target* de AGO1 y como consecuencia un aumento en la probabilidad de encontrar convergencia de marcas de acuerdo al contexto genómico de cada *cluster*. La segunda (cualitativa), hace referencia a un mayor posicionamiento de nucleosomas en dichas regiones, lo que también aumentaría la probabilidad de hallar convergencias de marcas.

4.1.8 AGO1 y las secuencias repetitivas

Ya en sus inicios, una de las primeras funciones que se le asignaron a la vía de interferencia por RNA fue la de un sistema inmune primitivo capaz de contrarrestar la actividad de ciertos virus con un RNA de doble cadena en alguna de sus fases y de silenciar a diversos "parásitos" genómicos remanentes de antiguas invasiones virales como los transposones (Plasterk, 2002). En el genoma humano encontramos una enorme cantidad de estos últimos, muchos de los cuales aún hoy son activos: 21%

ı INES (*long interspersed nuclear elements*), 13% SINES (*short interspersed nuclear elements*), 8% retrovirus y 3% transposones de DNA.

Con el paso del tiempo comenzó a encontrarse cada vez más evidencia que fortalece la visión de que la interferencia por RNA, a través de su vía de TGS juega un papel importante en el silenciamiento de secuencias repetitivas en grupos de seres vivos tan diversos como levaduras, plantas, gusanos, moscas, ratones y humanos (Assis y Kondrashov, 2009; Fagegaltier et al., 2009; Hartig et al., 2007; Kondo y Issa, 2003; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Qi et al., 2006). Se descubrieron algunos miembros de la familia de proteínas argonauta especialmente asociados a estas funciones en *Drosophila* y ratones: las ya mencionadas PIWI (Assis y Kondrashov, 2009; Hartig et al., 2007). Por otro lado, algunas de estas investigaciones demostraban una correlación entre el silenciamiento epigenético de secuencias repetitivas con presencia de marcas de histonas o metilación del DNA y la vía de interferencia por RNA (Fagegaltier et al., 2009; Kondo y Issa, 2003; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008).

En este contexto nos preguntamos si AGO1 tenía alguna especificidad por regiones con secuencias repetitivas y marcas de histonas.

En primer lugar describimos la distribución de *clusters* de AGO1 en función a la presencia de secuencias repetitivas y encontramos que el 58,3% de los *clusters* solapan con secuencias repetitivas a nivel genómico. Dentro de este grupo el 52% está localizado en regiones génicas y como es de esperar la mayoría (64,5%) se encuentra localizado en intrones, seguido por exones (18,7%), promotores (14,24%) y cola (2,6%).

A nivel genómico el 18,15% de las regiones intrónicas están cubiertas por secuencias repetitivas (197.698.422 nucleótidos de secuencias repetitivas en intrones sobre un total de 1.089.216.195 nucleótidos en intrones de acuerdo a los datos de Refseq a Julio del 2010), sin embargo, si nos focalizándonos sobre los *clusters* de AGO1 ubicados en intrones descubrimos que el 32% de esos *clusters* se encuentran alojados sobre secuencias repetitivas. Casi el doble de lo esperado por azar. Tras realizar un profundo análisis de la distribución genómica de secuencias repetitivas y compararlas

con las secuencias repetitivas blanco de AGO1 no encontramos ninguna diferencia en lo que se refiere a preferencia por alguna familia en particular (SINE, ı INE, ı TR, etc.), sino más bien una fiel representación de una distribución al azar de acuerdo a la representación genómica de cada familia (datos no mostrados).

4.1.9 Estudio de un gen candidato

Tras realizar un filtrado de toda la información obtenida en el experimento de ChIP-seq conjuntamente con la base de datos de Pol II (ChIP-seq en MCF7) y el panel de siAGO1-siDicer hemos encontrado un candidato endógeno potencial de modificar el *splicing* alternativo mediante la vía de TGS. Hemos identificado un *cluster* de AGO1 en el intrón ubicado río abajo del exón alternativo (exón 107) del gen SYNE2 humano que posee un solapamiento parcial con un *cluster* de Pol II y con H3K9me2, H3K27me3 y H3K36me3 analizando las muestras de ChIP-seq por PCR en tiempo real la región en cuestión (no mostrado). Es importante recordar que este evento de *splicing* alternativo es afectado por el *knockdown* de AGO1 y Dicer (Tabla 1 y 2).

El gen SYNE2 (spectrin repeat containing nuclear envelope 2), también llamado Nesprin-2 y NUANCE (nucleus and actin connecting element), se encuentra altamente conservado en vertebrados, y además está presente en C. elegans y D. melanogaster sugiriendo algún rol importante en procesos celulares básicos. El gen se encuentra localizado en el cromosoma 14 del genoma humano y codifica para una proteína gigante de 116 exones y 796 kDa, se extiende por una longitud genómica total de 373 Kb y su cDNA posee 21,8 Kb (Zhen et al., 2002). Se han reportado, al menos, 8 isoformas generadas a partir de *splicing* alternativo e iniciación alternativa de la transcripción (Zhang et al., 2005)

Diseñamos una serie de siRNAs haciendo blanco dentro del *cluster* de AGO1 con el fin de determinar si afecta el *splicing* alternativo del exón 107 de SYNE2 (Fig. 31A). Utilizamos nuevamente los siRNAs Stealth™ de Invitrogen con la hebra guía en orientación *sense* (SYNEsA y SYNEsB) o *antisense* (SYNEasA y SYNEasB). Cuando transfectamos estos siRNAs en células MCF7 no pudimos observar ningún efecto sobre

el patrón de *splicing* alternativo del gen SYNE (Fig. 31B izquierda). Cabe recordar que en esta línea celular habíamos identificado el *cluster* endógeno de AGO1, con lo cual era esperable que la introducción exógena de siRNAs que dirigieran a AGO1 hacia un sitio en el cual ya se "encontraba" naturalmente, no tuviera ninguna repercusión. Por lo tanto, realizamos la misma transfección en paralelo en otra línea celular donde el patrón de *splicing* alternativo del exón 107 de SYNE2 no había sido afectado tras la depleción de AGO1: HeLa. Allí sí pudimos encontrar un aumento significativo, de 3 veces, en la inclusión del exón alternativo con la transfección de siSYNE2asB (Fig. 31B derecha), pero únicamente con la hebra guía en orientación antisentido, de manera similar a lo observado en el Capítulo I con EDI.

Inesperadamente encontramos que el *cluster* de AGO1 en MCF7 solapante con Pol II se ubica sobre un promotor alternativo que origina la isoforma denominada Nesprin-2α2 (flecha amarilla en la Fig. 31). Dado que hemos identificado un enriquecimiento de AGO1 en promotores con alta actividad transcripcional podemos hipotetizar que dicho *cluster* se encuentra asociado a la actividad de ese promotor interno pudiendo afectar la constitución cromatínica de su entorno, en pos de favorecer su utilización y al estar ubicado en una región intragénica en cercanías a un evento de *splicing* alternativo, podría afectar su reconocimiento.

Si bien aún restan realizar muchos controles para descartar efectos indirectos o inespecíficos sobre este evento y además lograr identificar al RNA pequeño responsable de la unión original de AGO1 al intrón localizado río abajo del exón alternativo, creemos que SYNE2 representa un serio candidato endógeno de regulación directa o indirecta del *splicing* alternativo por siRNAs.

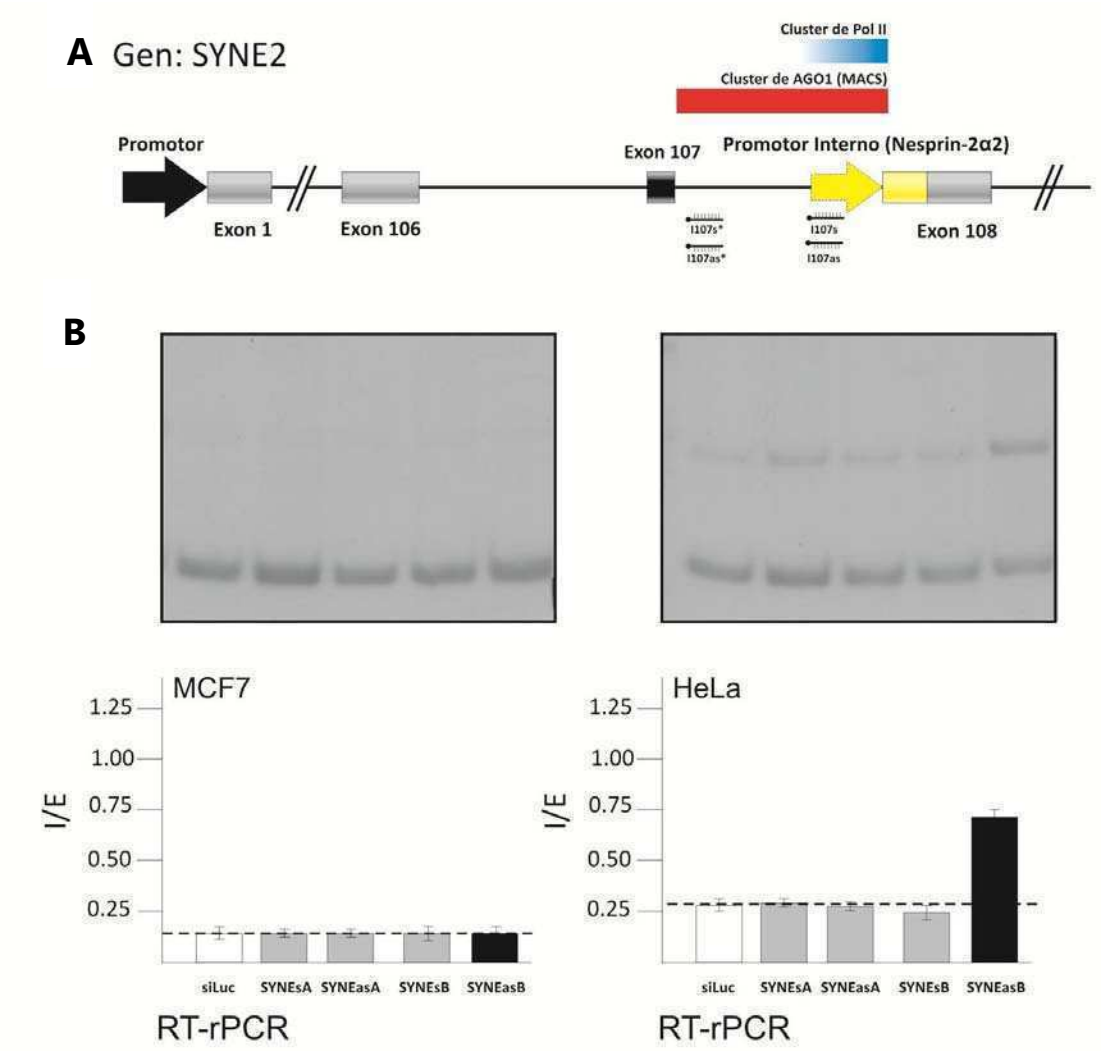


Figura 31. SYNE2 es afectado por siRNAs intrónicos.
A. *Diagrama del gen SYNE2 focalizado en la región del evento de splicing alternativo. EA: Exón Alternativo. Cuadro rojo: Cluster de AGO1. Cuadro celeste: Cluster de Pol II. Se muestra también la localización de la región blanco de los siRNAs.*
B. *En MFC7 ningún siRNA es capaz de modificar el patrón de splicing de SYNE2 (izquierda), sin embargo, en HeLa SYNEasB produce un incremento de 3 veces en la inclusión del exón alterantivo. Las cuantificaciones fueron realizadas con el software GEL4PRO.*

5 DISCUSIÓN

5.1 La convergencia de 3 áreas: TGS-AS

5.1.1 ARN pequeños, cromatina y *splicing* alternativo

Este trabajo de tesis se gestó en la convergencia de tres áreas muy importantes de la biología molecular pero anteriormente inconexas. A saber, el *splicing* alternativo, la epigenética y la vía de interferencia por RNA. El campo del *splicing* ha sido el tema de trabajo de nuestro grupo por muchos años y nos ha brindado un marco teórico sobre el cual comenzar a hilvanar las ideas que finalmente llevaron a la realización de esta tesis. El modelo de acoplamiento cinético nos ha permitido pensar en diversas maneras de afectar el *splicing* alternativo a través de poder modificar cuantitativa o cualitativamente la transcripción. A su vez, estudios previos de nuestro grupo y en especial un trabajo del grupo de Mark Groudine habían puesto énfasis en que la cromatina podía afectar la tasa de elongación de la Pol II. De hecho, en la publicación de Groudine (ı orincz et al., 2004) muestran que metilaciones intragénicas realizadas sobre DNA afectan la tasa de elongación de la Pol II sin afectar su iniciación. Además, dicha metilación del DNA conlleva a varias modificaciones en las histonas y genera una estructura interna cerrada de la cromatina, la cual en definitiva "frenaría" el avance de la Pol II. De esta manera, y «casi sin quererlo» se produjo el primer enlace conceptual entre el campo del *splicing* alternativo y el de la cromatina.

Por otro lado, hace mucho tiempo que se sabe que las secuencias repetitivas y otros elementos transponibles son capaces de afectar la expresión de genes cuando se localizan en cercanías de promotores mediante la inducción de estados de heterocromatinización. Siempre se especuló que la maquinaria celular "protegía" mediante un silenciamiento epigenético la integridad genómica impidiendo que estas secuencias se movieran libremente. En ese punto nos preguntamos: ¿qué ocurriría si estos elementos móviles cayeran en intrones o exones, particularmente cerca de algún

evento de *splicing* alternativo? ¿Se produciría una compactación de la cromatina impidiendo futuras transposiciones? Y si esto ocurría… ¿Esta heterocromatinización sería capaz de afectar la tasa de elongación de la Pol II de manera análoga a los experimentos de Groudine? Y finalmente ¿Esto podría afectar el *splicing* alternativo? Eran muchas preguntas… Pero afortunadamente para el momento en que comenzamos a realizarnos estos cuestionamientos, el desarrollo de la investigación en la vía de interferencia por RNA (que se creía involucrada en este tipo de silenciamientos) se encontraba en pleno apogeo. Fue así que descubrimos el trabajo de Kevin Morris que mostraba que podían inducirse cambios epigenéticos dirigidos contra secuencias particulares mediante la introducción de siRNAs con secuencias complementarias a la región blanco (Morris et al., 2004). Si bien este trabajo, al igual que los subsiguientes, fue realizado sobre secuencias promotoras nos dio una herramienta poderosa para intentar responder a todas estas preguntas. ¿Serían los siRNAs dirigidos contra secuencias internas de un gen capaces de afectar la estructura de la cromatina de forma similar a como lo hacían en los promotores?

5.1.2 Modificaciones cromatínicas intragénicas como motor del TGS-AS

En la sección 3.1 de esta tesis hemos demostrado que efectivamente los siRNAs exógenos transfectados en células de mamíferos son capaces de alterar la estructura de la cromatina mediante la generación de marcas epigenéticas asociadas a heterocromatina facultativa. Estas modificaciones intragénicas, a su vez, afectan la tasa de elongación de la Pol II (o su procesividad) y consecuentemente el *splicing* alternativo de un exón adyacente. En nuestro estudio lo demostramos para el exón 33 (EDI) del gen de la Fibronectina. También hemos demostrado que este mecanismo no involucra al clásico PTGS dirigido por siRNAs, ya que no observamos degradación del transcripto maduro de FN y tampoco detectamos disminución alguna en la concentración de RNA precursor en la región *target* utilizando cebadores alojados a ambos lados de dicha región (ver 3.1.2). Adicionalmente mostramos que el PTGS funciona correctamente cuando utilizamos siRNAs con secuencias complementarias a un exón, tanto el 21 como el 34 (ver 3.1.2). Deducimos que la vía de TGS es responsable

de los efectos observados, ya que estos desaparecen tras realizar el *knockdown* tanto de AGO1 como AGO2. Ésta última es necesaria para las dos vías, sin embargo, AGO1 solo es necesaria para el TGS (ver 3.1.5). Podemos entonces decir que es el mecanismo de TGS el que dirige los efectos aquí observados (Janowski et al., 2006; Kim et al., 2006; Meister et al., 2004).

Todos los reportes anteriores de TGS dirigido en mamíferos han sido hechos sobre regiones promotoras (Han et al., 2007; Janowski et al., 2006; Kim et al., 2008; Kim et al., 2006; Morris et al., 2004; Suzuki et al., 2008; Weinberg et al., 2006). Nuestro trabajo, por lo tanto, ha sido la primera demostración de que es posible disparar modificaciones epigenéticas internas en el cuerpo de un gen que no afectan la actividad del promotor pero sí producen una inhibición de la elongación/procesividad y consecuentemente afectan la selección de los sitios de *splicing* de un exón alternativo cercano. Hemos llamado a este fenómeno TGS-AS por *"transcriptional gene silencing regulation of alternative splicing"*.

En concordancia, otro trabajo de nuestro grupo llevado adelante por Ignacio Schor (Schor et al., 2009) ha demostrado que modificaciones cromatínicas intragénicas localizadas en cercanías a un evento de *splicing* alternativo y generadas a partir de un estímulo fisiológico en neuronas (despolarización de la membrana), también son capaces de afectar la tasa de elongación de la Pol II y luego el patrón de *splicing* alternativo del exón 18 del gen NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*).

5.1.3 Elongación: el nexo entre la cromatina, los RNA pequeños y el *splicing* alternativo

La verdadera conexión entre las modificaciones epigenéticas disparadas por los RNA pequeños y la alteración del *splicing* alternativo finalmente observada está dada por la inhibición de la elongación de la RNA Pol II. Los resultados mostrados en la sección 3.1.7 soportan este modelo. Como hemos señalado en la introducción, una de las tareas más dificultosas en este sentido es la medición de la elongación de la transcripción *invivo*. Hemos intentado abordar este problema con la utilización de un procedimiento utilizado y validado por Manuel de la Mata (de la Mata et al., 2003) con

la utilización de una RNA pen sus estudios de una RNA polimerasa II "lenta" conocida como C4. Este método se basa en la medición de la acumulación de un precursor proximal sobre uno distal, en nuestro caso, en células transfectadas con un siRNA control o un siRNA intrónico. La premisa es que si la Pol II fuera pausada entre estas dos regiones medidas deberíamos observar un aumento de la relación proximal/distal. Efectivamente esto fue lo que encontramos y si bien somos conscientes de la limitación de utilizar un sistema de medición de precursores proximales/distales como parámetro de acercamiento a la "elongación", el hecho de que los efectos de los siRNAs sobre los minigenes inducibles solo sean observados cuando se estimula la iniciación de la transcripción sin afectar a la elongación, refuerza esta hipótesis (Fig. 23).

Por otro lado, un fenómeno similar ha sido recientemente descripto en *C. elegans*, un organismo modelo en las investigaciones sobre la vía de interferencia por RNA. El trabajo en cuestión ha sido publicado este mismo año en la revista *Nature* y describe un mecanismo de alteración de la elongación de la Pol II mediante TGS de manera completamente coherente con nuestro modelo cinético (Guang et al., 2010). En dicho trabajo los autores describen la interacción de dos proteínas llamadas NRDE-3 (miembro de la familia Argonauta) y NRDE-2. La primera estaría involucrada en el transporte de RNA pequeños desde el citoplasma hacia el núcleo. Una vez allí NRDE-3 se asociaría con NRDE-2 formando un complejo que se dirigiría hacia la región genómica complementaria al RNA pequeño donde dispararía el TGS. Esto generaría una acumulación de Pol II y un aumento de H3K9me3 en la región blanco. Adicionalmente Kennedy y colaboradores han utilizado genética reversa para detectar proteínas involucradas en este fenómeno. Dentro del *"screening"* realizado han detectado a Rpb7, una de las subunidades de la RNA polimerasa II que es necesaria para la formación de heterocromatina mediada por siRNAs en *S. pombe*.

Los hallazgos realizados por el grupo de Kennedy indirectamente también sirven de soporte a nuestro modelo según el cual la los siRNAs afectarían la cromatina y ésta a su vez la elongación de la Pol II.

5.1.4 siRNAs intrónicos vs exónicos

Al iniciar nuestros estudios existía una gran controversia acerca de la funcionalidad del PTGS en el interior del núcleo celular eucariota. Gracias a la utilización de intrones como blanco, con nuestro trabajo hemos podido aportar algunos datos en este sentido y respecto al funcionamiento y *cross-talk* entre las diferentes vías de la interferencia por ARN.

Por un lado, hemos comprobado que ninguno de los siRNAs intrónicos afecta los niveles del mRNA *target* y que tampoco varía la cantidad de precursor. Estos resultados van de la mano con la hipótesis de que el mecanismo de TGS es el que gobierna en el núcleo la actividad de estos RNA pequeños y a su vez, también fortalecen la idea de que el proceso de PTGS no actúa en el núcleo. En más de 10 años de estudio sobre esta vía y cientos de trabajos publicados, solamente uno ha reportado degradación de un RNA nuclear mediante la utilización de siRNAs y se trata de un trabajo aún hoy muy discutido (Robb et al., 2005).

Por otro lado, al utilizar los clásicos siRNAs haciendo blanco en regiones exónicas observamos que estos efectivamente producían una significativa disminución en los niveles del mRNA de fibronectina. Adicionalmente, aquel siRNA dirigido contra el exón localizado río abajo a EDI, en cercanías al sitio blanco de I33as, fue capaz de aumentar la inclusión de EDI (ver 3.1.8). Esto, demuestra que ambas vías funcionan simultáneamente y de manera independiente: el TGS alterando la estructura de la cromatina en el núcleo y en consecuencia el *splicing* alternativo; y el PTGS actuando sobre el mRNA maduro en el citoplasma.

Entendemos que no se trata de un efecto trivial ya que todos los siRNAs utilizados en la práctica en todos los laboratorios del mundo con el fin de producir el *knockdown* de algún gen, podrían estar afectando la constitución cromatínica de dicho gen y por lo tanto alterando su transcripción cuantitativa y cualitativamente.

5.1.5 El mecanismo

La forma en que los RNA pequeños actúan para disparar el TGS-AS es aún poco clara. Nuestros resultados sugieren que, al igual que ocurre con aquellos dirigidos contra promotores, los siRNAs intrónicos necesitan aparearse con un transcripto naciente complementario enfatizando la necesidad de una hibridación ARN::ARN. Esto lo podemos deducir de la diferencia de efectos observada con el siRNA I33s en Hela y Hep3B, la cual ha sido explicada por la presencia de un RNA ubicado en antisentido al gen FN1. El balance entre la tasa de transcripción del gen de la fibronectina y su compañero en antisentido, brindarían una plataforma dinámica para la actividad de los siRNA dictando, al menos en parte, la eficiencia del proceso (ver 3.1.4). De hecho, se ha postulado que los genes en antisentido juegan un rol central en el reconocimiento de las secuencias promotoras mediada por siRNAs tanto para la activación como para el silenciamiento (Schwartz et al., 2008).

La utilización de drogas que "relajan" la estructura de la cromatina contrarresta los efectos de los siRNAs como en una suerte de competencia (ver 3.1.6) donde éstos dirigen el remodelado de la cromatina llevándola hacia un estado más cerrado o compacto. Pero además, estas drogas inhiben la actividad de enzimas que serían claves en el mecanismo del TGS-AS como metil-transferasas del ADN, metil transferasas de histonas (específicamente para H3K9me2) y desacetilasas de histonas.

En función a los resultados mostrados en esta tesis hemos elaborado el siguiente modelo explicativo para el mecanismo de TGS-AS (Fig. 32):

1. Un gen portador de un exón alternativo (barra naranja) es transcripto activamente por una Pol II a una elevada tasa de elongación. La maquinaria de *splicing* no cuenta con suficiente tiempo para reconocer los sitios débiles que definen al exon alternativo y se favorece la exclusión del mismo en el mRNA maduro.

2. Se introducen siRNAs dirigidos contra el intrón río abajo del evento de *splicing* alternativo.

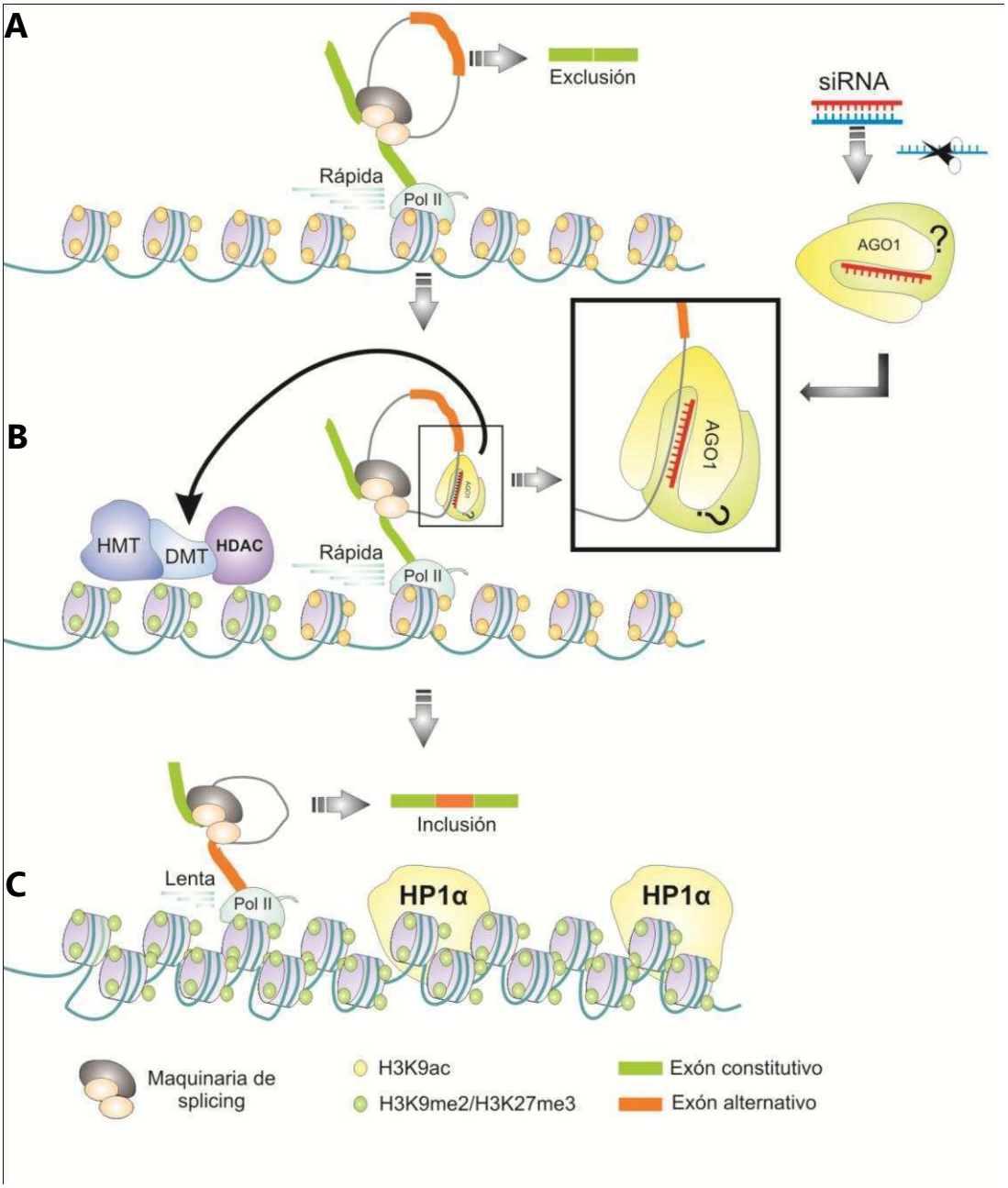


Figura 32. Modelo de acción del TGS-AS.
A. *La Pol II transcribe un evento de splicing alternativo con alta tasa de elongación (rápida). El evento no es reconocido por la maquinaria de splicing y se produce la exclusión del mismo. siRNAs son cargados en un complejo de silenciamiento.*
B. *Una vez en el núcleo el complejo "escanea" transcriptos nacientes hasta encontrar una región complementaria. Luego recluta maquinaria de remodelación de la cromatina a esa misma región.*
C. *La maquinaria remodeladora genera una estructura heterocromatínica local con aumento de H3K9me2 y H3K27me3 que frena el avance de la Pol II (lenta) y le da más tiempo a la maquinaria de splicing para reconocer las secuencias del evento de splicing alternativo favoreciendo su inclusión en el transcripto maduro.*

3. La hebra guía de los siRNAs es cargada en un complejo de silenciamiento que estaría formado, al menos, por AGO1. Una vez alcanzado el núcleo celular este complejo escanearía los RNA nacientes hasta encontrar una secuencia complementaria.

4. Tras encontrar la secuencia complementaria, el complejo provocaría el reclutamiento de maquinaria de remodelación de la cromatina. Entre ellos se encontrarían HDACs, metiltransferasas de histonas y del ADN, y HP1 alfa.

5. Se genera una estructura heterocromatínica intragénica.

6. Esta isla de heterocromatina genera un impedimento estérico para el avance de la Pol II "frenándola", otorgándole más tiempo a la maquinaria de *splicing* para reconocer al exón alternativo y favoreciendo, de esta manera, su inclusión en el transcripto maduro.

5.1.6 ¿Existe algún ejemplo endógeno de TGS-AS?

Sin lugar a dudas la gran pregunta que se desprende de este trabajo es si existe algún fenómeno de TGS-AS en la naturaleza. Realizamos dos enfoques diferentes en la búsqueda de una respuesta a este cuestionamiento.

i. En primer lugar la utilización del panel de PCR de *splicing* alternativo asociado a cáncer en células tratadas con siRNA contra AGO1 o Dicer arrojó un poco de luz en este sentido, señalando que aproximadamente el 37% de los eventos eran afectados por el *knockdown* de AGO1 o Dicer (ver 4.1.2) resaltando además, su importancia en el proceso de *splicing* alternativo. Dicer podría estar involucrada en la biogénesis de los RNA pequeños disparadores de un TGS-AS endógeno, a la vez que AGO1 sería directamente la efectora del proceso. En el mismo sentido se ha mostrado que el *knockdown* de Dicer ocasiona una activación del estado de la cromatina y de la transcripción en la región intergénica del locus β-Globina (Haussecker y Proudfoot, 2005). De hecho, otros trabajos han descripto que los miRNAs pueden disparar TGS (González et al., 2008; Kim et al., 2008), e incluso una publicación reciente en la revista

Cell ha revelado que miRNAs endógenos en *Physcomitrella patens* (un musgo que se utiliza en el estudio de la evolución, el desarrollo y la fisiología vegetal) generan un silenciamiento transcripcional de genes mediante formación de heterocromatina. En dicho trabajo los autores proponen que la relación entre las concentraciones de los miRNAs y sus blancos regularían la iniciación del silenciamiento epigenético (Khraiwesh et al., 2010). No es descabellado pensar que otros miRNAs pudieran hacer lo mismo y terminar afectando algún evento de *splicing* alternativo cercano al sitio blanco. Hemos logrado obtener una lista (datos no mostrados) de potenciales sitios de unión de miRNAs a intrones localizados en cercanías de los eventos de *splicing* alternativo que se modificaban con el *knockdown* de AGO1 y Dicer. Actualmente estamos desarrollando en nuestro laboratorio, conjuntamente con la estudiante Luciana Gómez Acuña, un sistema para estudiar el posible efecto de los miRNAs sobre el TGS-AS y focalizaremos nuestros esfuerzos en el análisis de esta lista de eventos y los posibles miRNAs disparadores.

Por otro lado, los resultados del panel sugieren que los posibles efectores del TGS-AS no deben ser limitados a los ARNs pequeños generados por Dicer, ya que existen varios eventos de *splicing* alternativo que son dependientes de AGO1 pero independientes de Dicer. Pero, entonces… ¿Qué otro tipo de mecanismo podría estar involucrado?

Existen muchos mecanismos a través de los cuales el TGS-AS podría ejercer su actividad *in-vivo*. RNA pequeños endógenos como los piRNAs, que son independientes de Dicer, podrían disparar TGS utilizando la vía de PIWI durante la diferenciación celular o incluso en células tumorales, ya que se ha mostrado que estas proteínas retoman su expresión en varios tipos de cánceres (Lee et al., 2006; Taubert et al., 2007). En otras enfermedades como alfa-talasemia o la leucemia, la expresión de genes en antisentido también es capaz de disparar un TGS de manera independiente a Dicer (Tufarelli et al., 2003; Yu et al., 2008). Si esto ocurriese en cercanías de un evento de *splicing* alternativo, éste podría verse afectado según el modelo expuesto en esta tesis, conformando otra posible vía de TGS-AS.

Todo un nuevo campo de investigación se ha abierto en torno a los llamados lincRNA (por el inglés large intervening non-coding RNAs), o RNA no codificantes largos. Estos lincRNA usualmente se ubican en antisentido a genes codificantes y suelen tener varios exones. No se conoce mucho acerca de su mecanismo, aunque sí se sabe que son capaces de generar silenciamiento de genes tanto en *cis* (Yap et al., 2010) como en *trans* (Huarte et al., 2010; Rinn et al., 2007) mediante la conformación de estructuras de cromatina cerrada, fundamentalmente a través de la presencia de proteínas del grupo Polycomb (PRC2) y la trimetilación de lisina 27 de la histona H3 (Gupta et al., 2010; Tsai et al., 2010). Se han descubierto más de 1.000 lincRNAs y nosotros mismos hemos encontrado uno ubicado en antisentido al gen de fibronectina. ¿Podría este lincRNA o cualquier otro afectar el *splicing* alternativo vía TGS-AS? Al menos desde la teoría deberíamos responder que sí, aunque aún queda un largo camino para poder demostrar que alguno de estos mecanismos independientes de Dicer también podría estar actuando en forma endógena.

ii. En paralelo hemos utilizado una estrategia complementaria en la búsqueda de un fenómeno endógeno de TGS-AS. Mediante la ultrasecuenciación de sitios *target* de AGO1 y diferentes marcas de histonas en células MCF7 hemos encontrado cerca de 1.000 sitios blanco de AGO1 en cercanías de eventos de *splicing* alternativo. Nos hemos quedado con una serie de posibles candidatos de acuerdo a la convergencia de marcas en la región *target*, más la presencia de *clusters* de Pol II en regiones vecinas.

El mejor candidato detectado hasta el momento ha sido el gen SYNE2 uno de cuyos eventos de splicing alternativo (exón 106) cambia con el knockdown de AGO1. Hemos encontrado que cuando hacemos transfecciones con siRNAs dirigidos contra el intrón 107 de SYNE2 en la línea celular MCF7 no vemos ningún efecto sobre el splicing alternativo del exón 107. Sin embargo, cuando estos siRNAs son transfectados en otra línea celular (Hela) donde el knockdown de AGO1 no afecta el patrón de splicing alternativo del exón 107, sí son capaces de aumentar la inclusión del exón alternativo de manera análoga a como lo hace I33as sobre EDI (Fig. 16). Si bien restan realizar muchos experimentos para controlar que efectivamente se trate de un caso de TGS-AS

creemos que se trata de un caso muy interesante cuyo estudio debemos profundizar. Más aún, el hecho de que exista un promotor interno caracterizado en dicha región solapando con el cluster de AGO1 y Pol II en la misma línea celular, abre las puertas a un nuevo enfoque donde AGO1 se puede unir a promotores internos activos modificando su entorno cromatínico. Este entorno es a su vez intragénico si tenemos en cuenta al promotor original ubicado río arriba. Esto permite especular que si un promotor interno está localizado en cercanías de un evento de splicing alternativo podría afectar el reconocimiento del mismo por diversos mecanismos.

Con los resultados obtenidos en la sección 4.1.9 podemos especular que el promotor interno que origina la isoforma proteica de SYNE2 conocida como nesprina-2α2 se encuentra activo en la línea celular mamaria MCF7, por lo que observamos un cluster de AGO1 y Pol II. Como consecuencia de la actividad de dicho promotor podríamos imaginar la presencia de un estado cromatínico abierto o relajado sobre esa región. Esto favorecería una mayor tasa de elongación dándole menos tiempo a la maquinaria de splicing para reconocer el exón 107 favoreciendo su exclusión del transcripto maduro. Efectivamente esto es lo que se observa en MCF7, donde la inclusión es sumamente baja. Al utilizar siRNAs dirigidos contra el intrón 107 el patrón de splicing del exón 107 no sufre modificaciones, ya que AGO1 se encuentra previamente unido en esa región, probablemente involucrado con la actividad transcripcional del promotor interno.

Por otro lado, también hemos encontrado que existe una convergencia de distintas marcas de histonas en los sitios *target* de AGO1, con un aumento significativo de todas las marcas. Hipotetizamos que esto podría reflejar un aumento de nucleosomas en torno al *target* de AGO1, o un posicionamiento de los mismos. En cualquiera de los dos casos el aumento de histonas aumentaría la probabilidad de encontrar convergencias entre las diferentes marcas en dichas regiones.

Inesperadamente hemos detectado un enriquecimiento de *clusters* de AGO1 en promotores de genes con alta actividad transcripcional, y fundamentalmente en promotores bidireccionales. Estos sitios de AGO1 se encuentran asociados a la

presencia de tiRNAs, pero no muestran ninguna correlación con las marcas de histonas estudiadas en nuestro trabajo. Pensamos que la alta tasa de generación de RNA pequeños en estas regiones (Taft et al., 2009; Taft et al., 2010) podría estar involucrada en el reclutamiento, por algún mecanismo aún no estudiado, de AGO1 que "cargaría" estos tiRNAs o pasRNAs en los promotores de genes activos para luego actuar en *cis* o en *trans* en otras regiones genómicas. Futuros trabajos podrán ahondar sobre esta hipótesis.

Finalmente, hemos hallado un enriquecimiento de AGO1 en exones localizados en genes con baja actividad transcripcional. Algo similar hemos observado para H3K9me2 y en ambos casos este enriquecimiento es independiente de que se trate de exones alternativos o constitutivos. Podría tratarse de un fenómeno más global asociado directamente al proceso de *splicing* en general.

En conclusión y de acuerdo al análisis realizado podríamos pensar que AGO1 está vinculado al menos a dos funciones o actividades biológicas diferentes en el núcleo celular. Por un lado se asocia a promotores con alta actividad transcripcional y por el otro, a exones localizados en genes con baja tasa de transcripción.

5.1.7 Conclusiones finales

En esta tesis hemos demostrado que siRNAs dirigidos contra regiones intrónicas son capaces de afectar la estructura de la cromatina en regiones intragénicas, modificando la elongación de la RNA Polimerasa II y en consecuencia el *splicing* alternativo de eventos cercanos según el modelo de acoplamiento cinético. Muchos de nuestros experimentos sugieren que un mecanismo de TGS, al cual hemos llamado TGS-AS, es el encargado de llevar adelante esta actividad. En primer lugar, el efecto depende de la presencia de AGO1, proteína que sólo es necesaria para TGS. En segundo, el efecto es reducido o eliminado con tratamientos que promueven una relajación de la cromatina o que aumentan la tasa de elongación de la Pol II. En tercer lugar, la transfección de siRNAs genera un aumento de dos marcas usualmente asociadas a heterocromatina facultativa, H3K9me2 y H3K27me3, en el gen blanco.

Muchos tipos diferentes de RNA endógenos podrían disparar TGS-AS en células de mamífero desde siRNAs, miRNAs, piRNAs, lincRNAs, hasta parejas de transcripción sentido-antisentido. Por lo cual el fenómeno podría ser dependiente o independiente de Dicer.

Dado que muchas mutaciones y defectos en el proceso de *splicing* alternativo han sido asociados a enfermedades de diversa índole, incluyendo cáncer, la utilización de siRNAs podría ser una novedosa alternativa de terapia para corregir eventos de *splicing* alternativos aberrantes de manera específica de gen y de exón. Adicionalmente, el hecho de que existan marcas epigenéticas asociadas a este fenómeno podemos especular con que dichas modificaciones generen un cambio estable y permanente a través de las sucesivas divisiones celulares, que conlleve a tratamientos de corto plazo.

6 CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones finales

1. Hemos demostrado que RNAs interferentes pequeños (siRNAs) dirigidos contra regiones intrónicas son capaces de afectar la estructura cromatina intragénica de la región target con el aumento de marcas epigenéticas asociadas a heterocromatina facultativa como H3K9me2 y H3K27me3.

2. Estos cambios cromatínicos dirigidos contra el intrón 33, ubicado río abajo del exon alternativo EDI del gen endógeno de fibronectina (FN1), afectaron la tasa de elongación/procesividad de la Pol II y consecuentemente produjeron un aumento de la inclusión de EDI en el mRNA maduro de acuerdo al modelo cinético de acoplamiento entre la transcripción y el splicing.

3. El efecto de siRNAs intrónicos sobre el splicing alternativo es abolido por tratamientos con drogas que "abren' la cromatina tales como tricostatina A (TSA), BIX y 5 azadC.

4. El efecto requiere de las proteínas argonauta 1 (AGO1) y HP1.

5. El efecto requiere interacción RNA::RNA entre la hebra guía del siRNA y el RNA endógeno naciente.

6. El mecanismo descubierto se asemeja al del silenciamiento génico transcripcional (TGS) y lo hemos bautizado TGS-AS, por splicing alternativo regulado por TGS.

7. siRNAs dirigidos contra ciertas secuencias exónicas actúan simultáneamente en dos mecanismos: el mencionado TGS-AS y la clásica degradación del mRNA mensajero maduro (knockdown) conocida como silenciamiento génico post-transcipcional (PTGS).

8. Utilizando una plataforma para medir 96 eventos de splicing alternativo en forma simultánea describimos por primera vez que AGO1, al igual que Dicer, juegan un papel importante sobre la regulación del splicing alternativo de genes endógenos, afectando casi al 40% de los eventos medidos, y brindando de esta manera indicios de un posible rol fisiológico para el mecanismo estudiado durante esta tesis.

9. Mediante estudios a nivel genómico con tecnología de ultrasecuenciación encontramos que AGO1 se encuentra enriquecido en regiones promotoras de genes con alta actividad transcripcional y en exones localizados en genes con bajos niveles de transcripción al igual que lo hace H3K9me2.

10. Finalmente hemos detectado un evento de splicing alternativo en el gen SYNE2 endógeno cuyo patrón de splicing cambia tras la depleción de AGO1 y Dicer, y tras la transfección con siRNAs dirigidos contra el intrón ubicado río abajo de dicho evento. Adicionalmente, hemos detectado que AGO1 se une a ese mismo intrón en forma natural en la línea celular MCF7, donde coincide con una aumento de Pol II y la

presencia de un promotor alternativo intragénico pudiendo ser este evento el primer ejemplo fisiológico de regulación del splicing alternativo mediante TGS.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Detalle de los experimentos

7.1.1 Transfección de células HeLa y Hep3B

Se transfectaron células HeLa y Hep3B con lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se plaquearon aproximadamente 200.000 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 fue ajustada a 2 µg para una cantidad de 5 µl de lipofectamina.

Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina 2000 que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente:

- Se colocan 2 µg totales de DNA plasmídico en un tubo eppendorf que contiene 250 µl de OPTIMEM (Invitrogen) solo, sin suero ni antibióticos.
- Se colocan 5 µl de lipofectamina en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 250 µl de OPTIMEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se transfiere el contenido del tubo eppendorf al tubo con lipofectamina.
- Se incuba 15 minutos para que se formen los complejos entre el poli-catión 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 2 ml de OPTIMEM solo (sin suero ni antibióticos).
- Se agregan por goteo 500 µl de los complejos en cada pocillo
- Se deja crecer las células por 48 o 72 hs, de acuerdo al experimento.

A su vez, células Hep3B fueron co-transfectadas con un transactivador controlada por el sistema tet, ya sea tTA-Sp1 o tTAVP16, conjuntamente con el reportero tet-inducible. La tetraciclina (tet) (1 µg/mL) fue agregada rápidamente después de la transfección. 24 hs más tarde se lavó las células y se le agregó un medio

nuevo libre de tet para provocar la inducción del reportero. Las células fueron cosechadas 48 o 72 hs post-inducción.

7.1.2 Transfección con RNAs pequeños interferentes

Se transfectaron células HeLa y Hep3B con lipofectamina 2000 (Invitrogen) en medio Optimem (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para estas células, se utilizó una concentración de siRNAs entre 5-50 nM, según se indica en cada experimento, por cada pocillo.

El protocolo de transfección es idéntico al utilizado con los plásmidos, con las siguientes exepciones:

i. Cuando se transfectaron sólo siRNAs, se colocaron 6,25 µl (de un stock 20 µM) de siRNA en lugar del DNA plasmídico.

ii. En caso de cotransfección de plásmido y siRNA se sumaron las dos cantidades.

iii. Para las co-transfecciones de siRNAs (I33as, siAGO1 y siAGO2) se utilizó una concentración 50 nM de I33as y 10 nM de siAGO1 y siAGO2.

7.1.3 Tratamientos de células con inhibidores farmacológicos

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 la concetración indicada (300 nM), o previamente se le realizaron diluciones seriadas en etanol para alcanzar las concentraciones más bajas.

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

El compuesto BIX-01294 fue utilizado a una concentración 10 µM.

El TSA fue agregado a las 48 hs post-transfección y 24 hs antes de cosechar las células. Mientras que la 5 azadC y el BIX se agregaron luego de la transfección y se dejaron por 72 hs.

En todos los casos, a los controles se les agregó un volumen equivalente del solvente de cada droga (vehículo).

7.1.4 Extracción de RNA total de cultivos celulares

Para obtener el RNA de las células transfectadas se utilizó el reactivo TRIZOl (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

En caso de ser necesario se controló 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 RNA, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA y RNA de 5S.

7.1.5 Evaluación de los patrones de *splicing* alternativo por RT-PCR

Elegimos dos técnicas alternativas para la medición de los patrones de *splicing* alternativo que se utilizaron en paralelo en este estudio: RT-PCR radiactiva o RT-PCR en tiempo real. Esto implica una reacción de transcripción reversa (RT) para producir cDNA a partir del RNA, que servirá a su vez como molde de una reacción posterior de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se amplificará el fragmento de interés utilizando 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. Los resultados se informan cómo la relación Inclusión/Exclusión. En algunos experimentos puntuales se han relativizado todas las relaciones del experimento a la del tratamiento control (que entonces toma el valor de 1).

Transcripción reversa (RT)

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

- Se desnaturalizan 5 µl de RNA colocándolo 5 min a 65 °C.
- Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la re-naturalización.
- Se agregan 15 µl de mezcla de reacción a cada tubo.

ı a mezcla está compuesta de la siguiente manera:

- 4 µl de buffer de RT 5X.
- 2 µl 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-Mı V RT 200 U/µl.
- H2O 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.

7.1.6 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 MgCl2
- 1,5 µl de MgCl2 50 mM
- 2,5 µl de *primer forward* 20 µM
- 2,5 µl de *primer reverse* 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 [α-32P]dCTP (aprox. 0,1 µl de [α-32P]dCTP 10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol)
- H2O c.s.p. 48 µl

Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo para evitar la evaporación.

El análisis del SA del exón EDI de fibronectina se realizó como se reportó previamente (Werbajh et al., 1998). De la misma forma se midieron el resto de los eventos por PCR radioactiva.

Al finalizar la reacción de PCR radiactivas, se procedió a separar los productos corriéndolos en un gel de poliacrilamida 6% nativo. Luego de la corrida, se seca el gel sobre un papel Whatmann y se lo expone a una película con orientadores para generar una autoradiografía. De esta manera se pueden 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 recortan 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 P^{32}, 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.

7.1.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Para evaluar los patrones de *splicing* alternativo por PCR en tiempo real (en un equipo Eppendorf Mastercycler Realplex, se realizaron sobre el cDNA de cada muestra dos reacciones de PCR diferentes, una correspondiente al producto de inclusión (con uno de los *primers* correspondiente a una secuencia del exón alternativo) y otra al producto de exclusión (ambos *primers* en exones constitutivos flanqueantes al exón alternativo). En este último caso el programa de PCR es llevado a cabo en forma tal 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 µl para la reacción, a

los cuales se agregan 20 µl de la mezcla de reacción. La mezcla se compone de la siguiente forma (para cada muestra):

- 2,5 µl de buffer de PCR sin $MgCl_2$
- 2 µl de $MgCl_2$ 50 mM
- 1 µl de *primer forward* 20 µM
- 1 µl de *primer reverse* 20 µM
- 0,5 µl de dNTPs 10 mM
- 0,15 µl de Taq polimerasa 5 U/µl
- 0,025 µl de SYBR Green (Roche) en dilución 1/30 en DMSO
- H_2O c.s.p. 20 µl

Cada corrida fue completada con la realización de una curva de *melting* para confirmar la especificidad de la amplificación. En paralelo los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

Los programas utilizados fueron los siguientes:

- Para las isoformas de EDI, 95°C 2′, 35 ciclos de 95°C 15″ y 64°C 45″. Se utilizó el mismo programa para la secuencia blanco de I33as y el housekeeping β-actina.
- Para los niveles totales de mRNA de fibronectina humana, 95°C 2′, 35 ciclos de 95°C 15″, seguido por 62°C 15″ y 72°C 25″.
- Para AGO1 y AGO2 mRNAs, 95°C 2′, 35 ciclos de 95°C 15″, seguidos por 68°C 15″ y 72°C 30″.
- Fibronectina sentido y antisentido, 95°C 3′, 35 ciclos de 95°C 30″, seguidos por 57°C 30″ y 72°C 45″.
- Para el housekeeping HSPCB, 95°C 2′, 35 ciclos de 95°C 15″, seguidos por 63°C 30″ y 68°C 20″.
- Todas los amplicones de fibronectina (A-D) utilizados en el nChIP, 95°C 2′, 35 ciclos de 95°C 15″ y 66°C 45″.

7.1.8 Evaluación de la relación de pre-mRNA distal/proximal

Para la evaluación de los niveles de pre-mRNA se partió de núcleos, obtenidos de acuerdo al protocolo de nChIP (ver 6.1.9).

Luego, los núcleos se lisaron con el reactivo TRIZOL (Invitrogen) y el RNA se extrajo según las instrucciones del fabricante. A partir del RNA de cada muestra se realizaron cuatro reacciones de RT diferentes (una por cada PCR intrónica) utilizando iniciadores correspondientes a las junturas intrón – exón para enriquecer el cDNA en productos provenientes de pre-mRNA. Las reacciones de RT se realizaron incubando primero el RNA 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 DNA genómico.

Los cDNA resultantes fueron luego cuantificados por PCR en tiempo real con *primers* correspondientes. El valor del pre-mRNA para cada región intrónica fue calculado sustrayendo los valores de los controles sin RT. Luego, los resultados se expresaron como relaciones Intrón proximal/Intrón distal (P/D).

7.1.9 Inmunoprecipitación de la cromatina nativa (nChIP)

Para determinar la presencia de distintas modificaciones de histonas se utilizó la técnica de ChIP nativo (nChIP). A diferencia del ChIP tradicional, se omite el paso de generación de entrecruzamientos o crosslinking por medio de la incubación con formaldehido y el sonicado del DNA para generar fragmentos pequeños es reemplazado por una incubación con nucleasa micrococal (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 DNA 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 mononucleosomas y la precipitación de cromatina fueron realizadas a partir de la técnica descripta por Umlauf y colaboradores (Umlauf et al., 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 MgCl2; 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 MgCl2; 1 mM CaCl2; 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 micrococal (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 mono-nucleosomas 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 DNA en cada muestra se toma una alícuota, se diluye 1:50 en buffer de elución y se cuantifica la cantidad de DNA por fluorometría utilizando el detector Qubit y el kit Quant-iT dsDNA BR (Invitrogen).

Inmunoprecipitación y purificación

Como cromatina inicial para las inmunoprecipitaciones se utilizó el volumen equivalente a 15 µg de DNA. 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: 10 µg de anti-H3K9me2 (Upstate 07-441), 10 µg de anti-H3K27me3 (Upstate 07-449) y IgG de conejo control (Santa Cruz Biotechnology sc-10801). 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 DNA 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 DNA

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 fragamentos de DNA obtenidos, se utilizaron iniciadores cuyo producto (amplicón) fuera de una longitud de alrededor de 100 pb.

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 exón 1.

7.1.10 Medición del transcripto antisentido

Se purificó el RNA de células transfectadas con siLuc o L33as y se realizó una retrotranscripción por 50 minutos a 42°C usando 2 pM de cebadores específicos: RTFN1*sense*, RTasFN1 (antisentido) and RTHP1 (inespecifico) con (+RT) y sin (-RT) M-MLV. Las cantidades relativas fueron calculadas por PCR en tiempo real con los cebadores P3 y P4 (L33as secuencia blanco) haciendo: [FN1*sense* (+RT) – FN1*sense* (-RT)] – RTHP1 (retrotranscripción inespecífica). El mismo cálculo fue realizado con asFN1 y finalmente medimos la relación antisentido/sentido para cada línea celular.

7.1.11 Panel de RT-PCR y electroforesis capilar

El diseño, la ejecución y el análisis de los eventos de *splicing* alternativos seleccionados fue llevada a cabo según ha sido publicado (Klinck et al., 2008; Venables et al., 2008). Resumidamente, se diseñaron *primers* flanqueando eventos de *splicing* alternativo con el fin de poder detector las diferentes isoformas asociadas a cada evento. Los *primers* fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA USA). La RT (Omniscript reverse transcriptase, Qiagen Inc, Canada) fue realizada con 2 µg de RNA total en presencia de un inhibidor de RNAsas (Porcine RNAguard RNase inhibitor, Amersham Biosciences, Canada) según instrucciones del fabricante. Se utilizaron tanto (OligodT)21 y "random hexamers" a una concentración final de 1 µM y 0.9 µM respectivamente. La PCR fue hecha con 20 ng de cDNA en 10 µl de volumen final conteniendo 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.6 µM de cada *primers* y 0.2 unidades de Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen, Canada). El programa utilizado fue el siguiente: 95°C 2´, seguido por 35

ciclos de 94°C 30s, 55°C 30s, y 72°C 60s. ı os productos de amplificación de la PCR fueron analizados por un "automated chip-based microcapillary electrophoresis on Caliper ı C-90 instruments" (Caliper ı ifeSciences, Hopkinton, MA).

7.1.12 ChIP-seq de células MCF7

- Se plaquean 18 placas de 15 cm con 5 millones de células.
- ı uego de 72 hs se lavan una vez con PBS y luego se le agregan 13 ml de solución de crosslinking (50mM HEPES pH8; 0,1ml de NaCl; 1mM EDTA pH8; 0,5mM EGTA; 11% final de Formaldehido) diluido en medio de manera que quede una solución final 1% formaldehido en placa.
- Se incuba por 10 minutos a 37ºC.
- Se agregan 900ul de Solución STOP (glicina 2M) y se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizan dos lavados con PBS frío y luego se agregan 2 ml de PBS con inhibidores de proteasas (PIC, Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche).
- Se colectan las células (dos placas a un facón de 15 ml) con la utilización de un scraper y se incuba por 5 minutos en hielo.
- Se centrifuga 5 minutos a 1200 rpm a 4ºC
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 5 ml de Buffer de lisis I con inhibidores (5mM Pipes pH 8; 85mM KCl; 0.5% NP40; 1X PIC)
- Se incuba 10 minutos en hielo y se centrifuga 5 minutos a 1200 rpm a 4ºC

SONICADO

- Se resuspende el pellet en 800 µl de Buffer de ı isis II (1% SDS; 10mM EDTA; 50mM Tris-HCı pH8,1; 1X PIC) y se incuba 10 minutos en hielo.
- Se sonica a 4°C usando el equipo Bioruptor de DIAGENODE, utilizando 7 pulsos 30 segundos a máxima potencia con 30 segundos de pausa.
- Se deja toda la noche en hielo.

- Se centrifuga por 10 minutos a máxima velocidad a 4 ºC.
- Se toma el sobrenadante

CHEQUEO Y CUANTIFICACIÓN

- Se toman el 30ul del volumen sonicado por duplicado y se lleva a 400 µl con Buffer de lisis II.
- Se le agregan 10 µl de proteinasa K (20 µg/µl) y se deja toda la noche a 65°C para revertir el *crosslinking*.
- Se purifica el DNA con la utilización del "PCR purification Kit" de QIAGEN y se cuantifica.
- Se siembran entre 300 y 500 ng de DNA en un gel de agarosa 1%, se corre y se chequea el tamaño.

BLOQUEO DE *BEADS*, PRECLAREADO E INCUBACIÓN

- Se colocan 200 µl de beads (Proteína A, DIAGENODE) por inmunoprecipitación en un falcon de 15 ml y se agregan 10,5 ml de Buffer IP (DIAGENODE) frío. Luego se mezcla por inversión.
- Se centrifuga 3 minutos a 3000 rpm.
- Se saca el sobrenadante con cuidado de no mover las *beads* y se agregan 5 ml de Buffer IP y 50 µl de BSA 5%.
- Se deja rotando a 4ºC por 15 min y luego se centrifuga 2 minutos a 3.000 rpm
- Se resuspenden las *beads* en 525 µl de Buffer IP por IP.
- Se pasan 500 µl de *beads* aun tubo Eppendorf nuevo. Se utilizan tantos tubos como IP hubiese.
- Se centrifuga por 2 minutos a 3.000 rpm y se quita todo el sobrenadante.
- Al mismo tiempo se centrifuga la cromatina a velocidad máxima por 5 minutos a 4ºC y se rescata sobrenadante.
- Se agrega a cada tubo con *beads* Buffer IP con inhibidores de proteasas de manera que el volumen final sea de 1,2 ml incluyendo el posterior agregado de cromatina.

- Se agrega el volumen de cromatina correspondiente a 200 µg y se rota en frío 1 h.
- Se centrifuga por 2 minutos a 3.000 rpm
- Se toman 1.050 µl de cromatina preclareada para cada IP.
- Se agrega el anticuerpo y se deja rotar a 4°C toda la noche.

BLOQUEO DE BEADS E IP

- Se colocan 400 µl de *beads* por IP y se lleva a 15 ml de volumen final agregando Buffer IP.
- Se mezcla por inversión y se centrifuga 3 minutos a 3.000 rpm.
- Se descarta el sobrenadante con cuidado de no mover las beads y se agregan 5 ml de Buffer IP y 50 ul de BSA 5%.
- Se deja rotando a 4ºC por 15 minutos.
- Se centrifuga durante 2 minutos a 3.000 rpm.
- Se resuspenden las *beads* en Buffer IP (525 µl por IP).
- Se agregan 500 ul de *beads* a cada tubo de IP y se mezcla por inversión.
- Se deja rotando a 4°C por 3 horas.

LAVADOS

- Se centrifuga por 5 minutos a 3.500 rpm a 4ºC.
- Se resuspenden las *beads* en 1 ml de Buffer IP y se pasan a un tubo eppendorf de 1,5 ml.
- Se realizan 4 lavados de los pellets con 1 ml de Buffer de IP (con 5 minutos de rotación a 4°C).

ELUCIÓN

- Centrifugar por 2 minutos a 3.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante, agregar 500 µl de Buffer de elución (1% SDS y 0.1M NaHCO3) y dejar rotando a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Centrifugar por 5 minutos a 3.000 rpm
- Transferir 470 µl del sobrenadante (eluido) a un nuevo Eppendorf.
- Agregar 30 µl de Buffer de elución y agregar 20µl de NaCl (5M).
- Se deja toda la noche a 65°C para revertir el crosslinking.

- Se agregan 10 µl de 500mM EDTA, 20 µl de Tris 1M pH=6,5 y 2 µl de proteinasa K (20mg/ml).
- Se incuba por 1 hora a 45ºC.

EXTRACIÓN DE DNA

La extracción se realiza utilizando el "PCR purification Kit" de QIAGEN. Cada tubo de IP se divide en 2 tubos con 250 µl aproximadamente y a partir de allí se continúa siguiendo las instrucciones del Kit.

7.2 Oligonucleótidos utilizados

7.2.1 *Primers* para PCR

Evaluación del *splicing* por PCR radiactiva y en tiempo real

Fibronectina total: GCTCATCCGTGGTTGTATCAGG Forward (P1) TGGTCTGCTTGTCAAAGTGTCC Reverse (P2)

EDI Exclusión: TGACTATTGAAGGCTTGCAG (For)

AGTTGGTGCAGGAATAGTGG (Rev)

EDI Inclusión: CCGGGTTCTGAGTACACAGTC (For) AGTTGGTGCAGGAATAGCTG (Rev)

I33as secuencia blanco: CCTAGCCCAACAAGAACAATCC (P3) GGTGTGACCTGAGTGAACTTC (P4)

AGO1: GCCAGATCCCTGTTCCCTTG (For)

GTGAAAGCCGAACCAGACCTC (Rev)

AGO2: GCGAGACCACCAAGCACTG (For)

GCTGGCTGTCACGGAAGG (Rev)

HSPCB: CCAAAAAGCACCTGGAGATCA (For)

TGTCGGCCTCAGCCTTCT (Rev)

EDI radioactivo: AGCCCCGCAAGCAGCAAGCC (For)

GTAGCATCTGTCACACGAG (Rev)

Minigen EDI: CACTGCCTGCTGGTGACTCGA (For) GCGGCCAGGGGTCACGAT (Rev)

IIICS: GGCTACTATTACTGGCCTGG (For) CTGAGAGAGAGCTTCTTGTCC (Rev)

Bcl-X: AGCTGGAGTCAGTTTAGTGATGTG (For)

TGAAGAGTGAGCCCAGCAGAAC (Rev)

APAF1: GTGAAGTGTTGTTCGTGGTCTG (For)

CATCACACCATGAACCCAAC (Rev)

BCL2L11: TACCTCCCTACAGACAGAG (For)

CCTCCTTGCATAGTAAGCGT (Rev)

BMP4: CGAGAAGGCAGAGGAGGAG (For)

CAAACTTGCTGGAAAGGCTC (Rev)

CCNE1: CACAGGGAGACCTTTTACTTGG (For)

TCAAGGCAGTCAACATCCAG (Rev)

CHEK2: CAGCTCTCAATGTTGAAACAGAA (For)

TCTGGCTTTAAGTCACGGTGT (Rev)

PCSK6: GCCCTTTACTTCAACGACCC (For)

TCATTGCTGGCATCATATCG (Rev)

FN1sentido/antisentido: ACTGCTTACTTGTTAAGACCACTG (P7)

AGGAGAGGCACCACGAGAAG (P8)

HP1: GGAGCACAATACTTGGGA(For)

CGGCACTGTTTGAGAAAT(Rev)

Proximal: CAGGGCAGAGGATCAACG (For)

GAGGCTGACTCTCTCCGCTTGGAT (Rev)

Distal: TTGGAACTACGTTTATTTTCC (For)

GCGGCCAGGGGTCACGAT (Rev)

Regiones del nChIP:

A: AAGAGGCAGGCTCAGCAAATG (For)

TCGGCTTTAGGGTCCCATCC (Rev)

B: CACTCAGGTCACACCCACAAG (For)

CTGTCAGGAGCAAGGTTGATTTC (Rev)

C: TGGTCTGCTTGTCAAAGTGTCC (Rev)

ATGCTGTAGTGAAACTCCTTGGG (For)

D: AATGAGTTCCCTGACCTGTGATG (Rev)

GCTTCCAAGTTGATGCCGTTC (For)

7.2.2 *Primers* para RT

RTasFN1: TTCTTCTTACGCCGCATTACAG (P5)

RTFN1*sense*: CTGTCAGGAGCAAGGTTGATTTC (P6)

Oligo dT (oligo dT17): 5′-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3′

RT Proximal: ACCAACAAGTTCACTTTCCCTATG

RT Distal: CACCTTAACGGTATTTGGAGGCT

7.2.3 Oligonucleótidos de siRNAs

siRNAs Intrónicos:

I32as 5′-CUGCUUUGCAUGUUAUAAAAAdTdT-3′

I33*as 5′-CCGCAUUACAGAGAGAACGUCAAAUdTdT-3′

I33as 5′-CCCCCAUUUCCUAUAAGAUAAdTdT-3′

I33s 5′-ACUUUAUUUUCCUUUUCCCCCdTdT-3′

siRNAs exónicos:

E21as 5′- GCCUGCUCCAAGAAUUGGUUUdTdT-3′

E34as 5′-GCCCAGUGGACACCACCCAAUdTdT-3′

Control siRNAs:

I33as(ST) 5′- CCAUUUCCUAUAAGAUAACCUCUAA-3′ (S code)

I33as(ST) 5′- UUAGAGGUUAUCUUAUAGGAAAUGG-3′ (AS code)

I33s(ST) 5′- CCAUUUCCUAUAAGAUAACCUCUAA-3′ (AS code)

I33s(ST) 5′- UUAGAGGUUAUCUUAUAGGAAAUGG-3′ (S code)

siSCR 5′- GUCAAACCCUACACUAUCUUAdTdT-3′

I107s* 5′- AUGGUGGGUCGGGGAGAGCCCUGAG-3′

I107as* 5′- AUGGUGGGUCGGGGAGAGCCCUGAG-3′

I107s 5′- AUCCUCAACCUCGCUCCCAUGUCGU-3′

I107as 5′- AUCCUCAACCUCGCUCCCAUGUCGU-3′

Otros:

siAGO1 5′-GAGAAGAGGUGCUCAAGAAUU-3′

3′-UUCUUGAGCACCUCUUCUCUU-5′P

siAGO2 (stealth) 5′-UGGAACACAUGGUCCAGCACUUUAA-3′

siHP1α 5′-CCUGAGAAAAACUUGGAUUdTdT-3′

siLuc 5′-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3′

8. BIBLIOGRAFÍA

Adami, G., and Babiss, L. E. (1991). DNA template effect on RNA splicing: two copies of the same gene in the same nucleus are processed differently. EMBO J *10*, 3457-3465.

Akiyama, S. K., Olden, K., and Yamada, K. M. (1995). Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 14, 173-189.

Akoulitchev, S., Makela, T. P., Weinberg, R. A., and Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II. Nature *377*, 557-560.

Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C., and Komorowski, J. (2009). Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. Genome Res *19*, 1732-1741.

Assis, R., and Kondrashov, A. S. (2009). Rapid repetitive element-mediated expansion of piRNA clusters in mammalian evolution. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 7079-7082.

Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Kang, Y. K., Larkin, K., Lee, J. W., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (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*, 2270-2274.

Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Li, X., Larkin, K., Ko, L., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2004b). CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. Mol Cell Biol *24*, 442-453.

Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. Science *298*, 416-419.

Ayyanathan, K., Lechner, M. S., Bell, P., and Rauscher, F. J. (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. Genes & Development *17*, 1855-1869.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell *129*, 823-837.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell *116*, 281-297.

Bastow, R., Mylne, J. S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R. A., and Dean, C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature *427*, 164-167.

Batsche, E., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2006). The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. Nat Struct Mol Biol *13*, 22-29.

Bell, A. C., West, A. G., and Felsenfeld, G. (2001). Insulators and Boundaries: Versatile Regulatory Elements in the Eukaryotic Genome. Science *291*, 447-450.

Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, A., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991). Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol *11*, 1195-1206.

Bentley, D. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. Curr Opin Cell Biol *11*, 347-351.

Berget, S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. J Biol Chem *270*, 2411-2414.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature *409*, 363-366.

Beyer, A. L., and Osheim, Y. N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. Genes Dev *2*, 754-765.

Bjork, P., Jin, S., Zhao, J., Singh, O. P., Persson, J. O., Hellman, U., and Wieslander, L. (2009). Specific combinations of SR proteins associate with single pre-messenger RNAs in vivo and contribute different functions. J Cell Biol *184*, 555-568.

Blanchette, M., and Chabot, B. (1997). A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. RNA *3*, 405-419.

Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Munoz, M. J., Wengier, D., Quadrana, L., Sanford, J. R., Muschietti, J. P., Kornblihtt, A. R., Caceres, J. F*., et al.* (2005). Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. Nat Struct Mol Biol *12*, 1037-1044.

Boireau, S., Maiuri, P., Basyuk, E., de la Mata, M., Knezevich, A., Pradet-Balade, B., Backer, V., Kornblihtt, A., Marcello, A., and Bertrand, E. (2007). The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. J Cell Biol *179*, 291-304.

Bourgeois, C. F., Kim, Y. K., Churcher, M. J., West, M. J., and Karn, J. (2002). Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences. Mol Cell Biol *22*, 1079-1093.

Boutz, P. L., Chawla, G., Stoilov, P., and Black, D. L. (2007). MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. Genes Dev *21*, 71-84.

Bradsher, J. N., Tan, S., McLaury, H. J., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1993). RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation. J Biol Chem *268*, 25594-25603.

Buratti, E., and Baralle, F. E. (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. Mol Cell Biol *24*, 10505-10514.

Buratti, E., Muro, A. F., Giombi, M., Gherbassi, D., Iaconcig, A., and Baralle, F. E. (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*, 1387-1400.

Caceres, J. F., and Kornblihtt, A. R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. Trends Genet *18*, 186-193.

Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., and Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. Genes Dev *16*, 2733-2742.

Cereghini, S., and Yaniv, M. (1984). Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication. EMBO J *3*, 1243-1253.

Conaway, R. C., Kong, S. E., and Conaway, J. W. (2003). TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers. Cell *114*, 272-274.

Cramer, P., Caceres, J. F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A. F., Baralle, F. E., and Kornblihtt, A. R. (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*, 251-258.

Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., and Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 11456-11460.

Croft, L., Schandorff, S., Clark, F., Burrage, K., Arctander, P., and Mattick, J. S. (2000). ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. Nat Genet *24*, 340-341.

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

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

de la Mata, M., Lafaille, C., and Kornblihtt, A. R. (2010). First come, first served revisited: factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. RNA *16*, 904-912.

Dhami, P., Saffrey, P., Bruce, A. W., Dillon, S. C., Chiang, K., Bonhoure, N., Koch, C. M., Bye, J., James, K., Foad, N. S.*, et al.* (2010). Complex exon-intron marking by histone modifications is not determined solely by nucleosome distribution. PLoS One *5*.

Dutnall, R. N. (2003). Cracking the Histone Code:

One, Two, Three Methyls, You're Out. Cell *12*, 3-4.

Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., and Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 457-467.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev *15*, 188-200.

Encode (2009). Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs. Nature 457, 1028-1032.

Eperon, L. P., Graham, I. R., Griffiths, A. D., and Eperon, I. C. (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*, 393-401.

Fagegaltier, D., Bouge, A. L., Berry, B., Poisot, E., Sismeiro, O., Coppee, J. Y., Theodore, L., Voinnet, O., and Antoniewski, C. (2009). The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 21258-21263.

Fahrner, J. A., and Baylin, S. B. (2003). Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad. Genes & Development *17*, 1805-1812.

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

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature *391*, 806-811.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. Nature *425*, 475-479.

Fish, R. N., and Kane, C. M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. Biochim Biophys Acta *1577*, 287-307.

George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. Development 119, 1079-1091.

Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P., and Bickmore, W. A. (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. Cell *118*, 555-566.

Goldstrohm, A. C., Greenleaf, A. L., and Garcia-Blanco, M. A. (2001). Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. Gene *277*, 31-47.

Gonzalez, S., Pisano, D. G., and Serrano, M. (2008). Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. Cell Cycle *7*, 2601-2608.

Gornemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K., and Neugebauer, K. M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. Mol Cell *19*, 53-63.

Graveley, B. R. (2005). Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures. Cell *123*, 65-73.

Grewal, S. I. S., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression. Science *301*, 798-802.

Gu, W., and Reines, D. (1995). Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. J Biol Chem *270*, 11238-11244.

Guang, S., Bochner, A. F., Burkhart, K. B., Burton, N., Pavelec, D. M., and Kennedy, S. (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. Nature *465*, 1097-1101.

Guil, S., and Caceres, J. F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. Nat Struct Mol Biol *14*, 591-596.

Guillouf, C., Gallais, I., and Moreau-Gachelin, F. (2006). Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. J Biol Chem *281*, 19145-19155.

Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., and Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature *466*, 835-840.

Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell *81*, 611-620.

Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L.*, et al.* (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature *464*, 1071-1076.

Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K.-i., Ayoub, N., Cohen, A., and Grewal, S. I. S. (2002a). Establishment and Maintenance of a Heterochromatin Domain. Science *297*, 2232-2237.

Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., and Grewal, S. I. (2002b). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. Science *297*, 2232-2237.

Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science *286*, 950-952.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature *404*, 293-296.

Han, J., Kim, D., and Morris, K. V. (2007). Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 12422-12427.

Hartig, J. V., Tomari, Y., and Forstemann, K. (2007). piRNAs--the ancient hunters of genome invaders. Genes Dev *21*, 1707-1713.

Haussecker, D., and Proudfoot, N. J. (2005). Dicer-dependent turnover of intergenic transcripts from the human beta-globin gene cluster. Mol Cell Biol *25*, 9724-9733.

Hertel, K. J. (2008). Combinatorial control of exon recognition. J Biol Chem *283*, 1211-1215.

Hirose, Y., and Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. Genes Dev *14*, 1415-1429.

Hon, G., Wang, W., and Ren, B. (2009). Discovery and annotation of functional chromatin signatures in the human genome. PLoS Comput Biol *5*, e1000566.

House, A. E., and Lynch, K. W. (2008). Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. J Biol Chem *283*, 1217-1221.

Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A. M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M*., et al.* (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. Cell *142*, 409-419.

Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science *297*, 2056-2060.

Im, H., Park, C., Feng, Q., Johnson, K. D., Kiekhaefer, C. M., Choi, K., Zhang, Y., and Bresnick, E. H. (2003). Dynamic Regulation of Histone H3 Methylated at Lysine 79 within a

Tissue-specific Chromatin Domain. The Journal of Biological Chemistry *278*, 18346-18352.

Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W. L., and Muramatsu, M. (2000). p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. Genes Dev *14*, 1899-1907.

J.Bottomley, M. (2004). Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. EMBO reports *5*, 464-469.

Jackson, R. J., and Standart, N. (2007). How do microRNAs regulate gene expression? Sci STKE *2007*, re1.

Jacquenet, S., Ropers, D., Bilodeau, P. S., Damier, L., Mougin, A., Stoltzfus, C. M., and Branlant, C. (2001). Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3 3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing. Nucleic Acids Res *29*, 464-478.

Janowski, B. A., Huffman, K. E., Schwartz, J. C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D. S., Minna, J. D., and Corey, D. R. (2006). Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. Nat Struct Mol Biol *13*, 787-792.

Janowski, B. A., Younger, S. T., Hardy, D. B., Ram, R., Huffman, K. E., and Corey, D. R. (2007). Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. Nat Chem Biol *3*, 166-173.

Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the Histone Code. Science *293*, 1074-1080.

Jiang, Y., and Gralla, J. D. (1993). Uncoupling of initiation and reinitiation rates during HeLa RNA polymerase II transcription in vitro. Mol Cell Biol *13*, 4572-4577.

Jin, J., Bai, L., Johnson, D. S., Fulbright, R. M., Kireeva, M. L., Kashlev, M., and Wang, M. D. (2010). Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier. Nat Struct Mol Biol *17*, 745-752.

Jurica, M. S., and Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. Mol Cell *12*, 5-14.

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

Kadener, S., Fededa, J. P., Rosbash, M., and Kornblihtt, A. R. (2002). Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 8185-8190.

Kalsotra, A., Wang, K., Li, P. F., and Cooper, T. A. (2010). MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development. Genes Dev *24*, 653-658.

Khraiwesh, B., Arif, M. A., Seumel, G. I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., and Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. Cell *140*, 111-122.

Kim, D. H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M. S., Choi, S., and Rossi, J. J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nat Biotechnol *23*, 222-226.

Kim, D. H., Saetrom, P., Snove, O., Jr., and Rossi, J. J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 16230-16235.

Kim, D. H., Villeneuve, L. M., Morris, K. V., and Rossi, J. J. (2006). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. Nat Struct Mol Biol *13*, 793-797.

Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G. D., Kosik, K. S., Church, G. M., and Ruvkun, G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 360-365.

Kim, Y. K., and Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. EMBO J *26*, 775-783.

Kirmizis, A., Bartley, S. M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P. J. (2004). Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. Genes & Development *18*, 1592-1605.

Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Gervais-Bird, J., Madden, R., Paquet, E. R., Koh, C., Venables, J. P., Prinos, P.*, et al.* (2008). Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. Cancer Res *68*, 657-663.

Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X. S., and Ahringer, J. (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. Nat Genet *41*, 376-381.

Kondo, Y., and Issa, J. P. (2003). Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at Alu repeats in human cells. J Biol Chem *278*, 27658-27662.

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

Kornblihtt, A. R., Vibe-Pedersen, K., and Baralle, F. E. (1983). Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. Proc Natl Acad Sci U S A 80, 3218-3222.

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

Kornblihtt, A. R. (2007). Coupling transcription and alternative splicing. Adv Exp Med Biol *623*, 175-189.

Kotovic, K. M., Lockshon, D., Boric, L., and Neugebauer, K. M. (2003). Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. Mol Cell Biol *23*, 5768-5779.

Kravchenko, J. E., Rogozin, I. B., Koonin, E. V., and Chumakov, P. M. (2005). Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin. Nature *436*, 735-739.

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T. W*., et al.* (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. Genes Dev *22*, 908-917.

Kurdistani, S. K., Tavazoie, S., and Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. Cell *117*, 721-733.

Labrador, M., and Corces, V. G. (2002). Setting the Boundaries of Chromatin Domains and Nuclear Organization. Cell *111*, 151-154.

Lacadie, S. A., and Rosbash, M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast. Mol Cell *19*, 65-75.

Lachner, M., J., R., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. Journal of Cell Science *116*, 2117-2124.

Lai, M. C., Teh, B. H., and Tarn, W. Y. (1999). A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. J Biol Chem *274*, 11832-11841.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science *294*, 858-862.

Lee, J. H., Schutte, D., Wulf, G., Fuzesi, L., Radzun, H. J., Schweyer, S., Engel, W., and Nayernia, K. (2006). Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. Hum Mol Genet *15*, 201-211.

Lee, J. S., Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The language of histone crosstalk. Cell *142*, 682-685.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J *21*, 4663-4670.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J *23*, 4051-4060.

Legube, G., and Trouche, D. (2004). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. EMBO Reports *4*, 944-947.

Lenasi, T., Peterlin, B. M., and Dovc, P. (2006). Distal regulation of alternative splicing by splicing enhancer in equine beta-casein intron 1. RNA *12*, 498-507.

Li, L. C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R. F., Urakami, S., Enokida, H., and Dahiya, R. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 17337-17342.

Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., and Fu, X. D. (2008). The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. Nat Struct Mol Biol *15*, 819-826.

Listerman, I., Sapra, A. K., and Neugebauer, K. M. (2006). Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. Nat Struct Mol Biol *13*, 815-822.

Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science *305*, 1437-1441.

Lorincz, M. C., Dickerson, D. R., Schmitt, M., and Groudine, M. (2004). Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. Nat Struct Mol Biol *11*, 1068-1075.

Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. Science *327*, 996-1000.

Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., and Masutomi, K. (2009). An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. Nature *461*, 230-235.

Maile, T., Kwoczynski, S., Katzenberger, R. J., Wassarman, D. A., and Sauer, F. (2004). TAF1 Activates Transcription by Phosphorylation of Serine 33 in Histone H2B. Science *304*, 1010-1014.

Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. Mol Cell *27*, 435-448.

Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., and Flores, O. (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. Genes Dev *11*, 2633-2644.

Marais, G., Nouvellet, P., Keightley, P. D., and Charlesworth, B. (2005). Intron size and exon evolution in Drosophila. Genetics *170*, 481-485.

Martienssen, R. A. (2003). Maintenance of heterochromatin by RNA interference of tandem repeats. Nat Genet *35*, 213-214.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. Cell *110*, 563-574.

Martinez, J., and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. Genes Dev *18*, 975-980.

Mason, P. B., and Struhl, K. (2005). Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. Mol Cell *17*, 831-840.

Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S.*, et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science *317*, 1764-1767.

Mayr, C., and Bartel, D. P. (2009). Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. Cell *138*, 673-684.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol Cell *15*, 185-197.

Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., and Matzke, A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. EMBO J *19*, 5194-5201.

Michlewski, G., and Caceres, J. F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. Nat Struct Mol Biol *17*, 1011-1018.

Michlewski, G., Guil, S., Semple, C. A., and Caceres, J. F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. Mol Cell *32*, 383-393.

Misteli, T., and Spector, D. L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. Mol Cell *3*, 697-705.

Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., and Spiegelman, B. M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. Mol Cell *6*, 307-316.

Morillon, A., Karabetsou, N., O'Sullivan, J., Kent, N., Proudfoot, N., and Mellor, J. (2003a). Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. Cell *115*, 425-435.

Morillon, A., Karabetsou, N., O'Sullivan, J., Kent, N., Proudfoot, N., and Mellor, a. J. (2003b). Isw1 Chromatin Remodeling ATPase Coordinates Transcription Elongation and Termination by RNA Polymerase II. Cell *115*, 425-435.

Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E., and Looney, D. J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. Science *305*, 1289-1292.

Munoz, M. J., Perez Santangelo, M. S., Paronetto, M. P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J. J.*, et al.* (2009). DNA

damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. Cell *137*, 708-720.

Muro, A. F., Chauhan, A. K., Gajovic, S., Iaconcig, A., Porro, F., Stanta, G., and Baralle, F. E. (2003). Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. J Cell Biol 162, 149-160.

Nahkuri, S., Taft, R. J., and Mattick, J. S. (2009). Nucleosomes are preferentially positioned at exons in somatic and sperm cells. Cell Cycle *8*, 3420-3424.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell *2*, 279-289.

Narlikar, G. J., Fan, H.-Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. Cell *108*, 475-487.

Neugebauer, K. M. (2002). On the importance of being co-transcriptional. J Cell Sci *115*, 3865-3871.

Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A. R. (2002). Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. J Biol Chem *277*, 43110-43114.

Nogues, G., Munoz, M. J., and Kornblihtt, A. R. (2003). Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength. J Biol Chem *278*, 52166-52171.

Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D., and Grewal, S. I. (2004). RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. Nat Genet *36*, 1174-1180.

Okamoto, I., Otte, A. P., and Heard, E. (2003). Epigenetics dynamics of imprinted X inactivationduring early mouse development. Science *303*, 644-649.

Okamura, K., and Lai, E. C. (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 673-678.

Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. Dev Biol *216*, 671-680.

Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002a). A Unified Theory of Gene Expression. Cell *108*, 439-451.

Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002b). A unified theory of gene expression. Cell *108*, 439-451.

Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S. G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J. A., and Elgin, S. C. (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in Drosophila are dependent on the RNAi machinery. Science *303*, 669-672.

Palancade, B., and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. Eur J Biochem *270*, 3859-3870.

Peng, J., Zhu, Y., Milton, J. T., and Price, D. H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. Genes Dev *12*, 755-762.

Persengiev, S. P., Zhu, X., and Green, M. R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). RNA *10*, 12-18.

Peterson, C. L., and Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. Current Biology *14*, 546-551.

Plasterk, R. H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. Science *296*, 1263-1265.

Plath, K., Fang, J., and Zhang, Y. (2003). Role of Histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. Science *300*, 131-135.

Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol *20*, 2629-2634.

Protacio, R. U., Li, G., Lowary, P. T., and Widom, J. (2000). Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome. Mol Cell Biol *20*, 8866-8878.

Proudfoot, N. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. Trends Biochem Sci *25*, 290-293.

Proudfoot, N. J., Furger, A., and Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. Cell *108*, 501-512.

Qi, Y., He, X., Wang, X. J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G. J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. Nature *443*, 1008-1012.

Reed, R., and Cheng, H. (2005). TREX, SR proteins and export of mRNA. Curr Opin Cell Biol *17*, 269-273.

Richards, E. J., and Elgin, S. C. R. (2002). Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects. Cell *108*, 489-500.

Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Brugmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., and Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation

of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. Cell *129*, 1311-1323.

Robb, G. B., Brown, K. M., Khurana, J., and Rana, T. M. (2005). Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. Nat Struct Mol Biol *12*, 133-137.

Roberts, G. C., Gooding, C., Mak, H. Y., Proudfoot, N. J., and Smith, C. W. (1998). Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. Nucleic Acids Res *26*, 5568-5572.

Robson-Dixon, N. D., and Garcia-Blanco, M. A. (2004). MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb. J Biol Chem *279*, 29075-29084.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res *14*, 1902-1910.

Romano, M., Marcucci, R., and Baralle, F. E. (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*, 886-894.

Rondon, A. G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Barrera, S., and Aguilera, A. (2003). Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. EMBO J *22*, 612-620.

Ruby, J. G., Jan, C., Player, C., Axtell, M. J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H., and Bartel, D. P. (2006). Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in C. elegans. Cell *127*, 1193-1207.

Sanford, J. R., Gray, N. K., Beckmann, K., and Caceres, J. F. (2004). A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. Genes Dev *18*, 755-768.

Santa Rosa, H., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of Histone H3. Nature *419*.

Schneider, R., Bannister, A. J., A.Myers, F., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. Nature Cell Biology *6*, 73-77.

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

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. Genes & Development *18*, 1251-1262.

Schwartz, J. C., Younger, S. T., Nguyen, N. B., Hardy, D. B., Monia, B. P., Corey, D. R., and Janowski, B. A. (2008). Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. Nat Struct Mol Biol *15*, 842-848.

Schwartz, S., Meshorer, E., and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. Nat Struct Mol Biol *16*, 990-995.

Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell *115*, 199-208.

Schwarzbauer, J. E., Tamkun, J. W., Lemischka, I. R., and Hynes, R. O. (1983). Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. Cell 35, 421-431.

Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E. G. (2002). Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation. Dev Biol *243*, 215-225.

Seila, A. C., Calabrese, J. M., Levine, S. S., Yeo, G. W., Rahl, P. B., Flynn, R. A., Young, R. A., and Sharp, P. A. (2008). Divergent transcription from active promoters. Science *322*, 1849-1851.

Shahbazian, M. D., and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. Annu Rev Biochem *76*, 75-100.

Shilatifard, A., Lane, W. S., Jackson, K. W., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. Science *271*, 1873-1876.

Shin, H., Liu, T., Manrai, A. K., and Liu, X. S. (2009). CEAS: cis-regulatory element annotation system. Bioinformatics *25*, 2605-2606.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., and Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. Science *311*, 844-847.

Shomron, N., and Levy, C. (2009). MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. J Biomed Biotechnol *2009*, 594678.

Silva, J., Peters, A. H., and Brockdorff, N. (2003). Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of eed-enx1 polycomb group complexes. Development Cell *4*, 481-495.

Sims, R. J., 3rd, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. Genes Dev *18*, 2437-2468.

Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science *305*, 1434-1437.

Spies, N., Nielsen, C. B., Padgett, R. A., and Burge, C. B. (2009). Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. Mol Cell *36*, 245-254.

Staley, J. P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. Cell *92*, 315-326.

Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. Nature *403*, 41-45.

Suzuki, K., Juelich, T., Lim, H., Ishida, T., Watanebe, T., Cooper, D. A., Rao, S., and Kelleher, A. D. (2008). Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region. J Biol Chem *283*, 23353-23363.

Taft, R. J., Glazov, E. A., Cloonan, N., Simons, C., Stephen, S., Faulkner, G. J., Lassmann, T., Forrest, A. R., Grimmond, S. M., Schroder, K.*, et al.* (2009). Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. Nat Genet *41*, 572-578.

Taft, R. J., Simons, C., Nahkuri, S., Oey, H., Korbie, D. J., Mercer, T. R., Holst, J., Ritchie, W., Wong, J. J., Rasko, J. E.*, et al.* (2010). Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. Nat Struct Mol Biol *17*, 1030-1034.

Tam, O. H., Aravin, A. A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E. P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R. M., and Hannon, G. J. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. Nature *453*, 534-538.

Taubert, H., Greither, T., Kaushal, D., Wurl, P., Bache, M., Bartel, F., Kehlen, A., Lautenschlager, C., Harris, L., Kraemer, K.*, et al.* (2007). Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. Oncogene *26*, 1098-1100.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. Nature *455*, 1124-1128.

Tennyson, C. N., Klamut, H. J., and Worton, R. G. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. Nat Genet *9*, 184-190.

Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcarcel, J., and Guigo, R. (2009). Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. Nat Struct Mol Biol *16*, 996-1001.

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P. D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. Science *306*, 1377-1380.

Tong, W., Kulaeva, O. I., Clark, D. J., and Lutter, L. C. (2006). Topological analysis of plasmid chromatin from yeast and mammalian cells. J Mol Biol *361*, 813-822.

Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. Science *329*, 689-693.

Tufarelli, C., Stanley, J. A., Garrick, D., Sharpe, J. A., Ayyub, H., Wood, W. G., and Higgs, D. R. (2003). Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. Nat Genet *34*, 157-165.

Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. Bioessays *22*, 836-845.

Umlauf, D., Goto, Y., and Feil, R. (2004). Site-specific analysis of histone methylation and acetylation. Methods Mol Biol *287*, 99-120.

Vasudevan, S., and Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. Cell *128*, 1105-1118.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science *318*, 1931-1934.

Venables, J. P., Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Koh, C., Gervais-Bird, J., Lapointe, E., Froehlich, U., Durand, M.*, et al.* (2008). Identification of alternative splicing markers for breast cancer. Cancer Res *68*, 9525-9531.

Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I., and Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. Science *303*, 672-676.

Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtukova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., and Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature *456*, 470-476.

Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. Cell *138*, 1019-1031.

Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., and Imai, H. (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. Genes Dev *20*, 1732-1743.

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T.*, et al.* (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. Nature *453*, 539-543.

Weinberg, M. S., Villeneuve, L. M., Ehsani, A., Amarzguioui, M., Aagaard, L., Chen, Z. X., Riggs, A. D., Rossi, J. J., and Morris, K. V. (2006). The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. RNA *12*, 256-262.

Welboren, W. J., van Driel, M. A., Janssen-Megens, E. M., van Heeringen, S. J., Sweep, F. C., Span, P. N., and Stunnenberg, H. G. (2009). ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. EMBO J *28*, 1418-1428.

West, A. G., Gaszner, M., and Felsenfeld, a. G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. Genes & Development *16*, 271-288.

West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N. J. (2004). Human 5' --> 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. Nature *432*, 522-525.

Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. Cell *97*, 41-51.

Yang, N., and Kazazian, H. H., Jr. (2006). L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. Nat Struct Mol Biol *13*, 763-771.

Yang, X., Gold, M. O., Tang, D. N., Lewis, D. E., Aguilar-Cordova, E., Rice, A. P., and Herrmann, C. H. (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*, 12331-12336.

Yap, K. L., Li, S., Munoz-Cabello, A. M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M. J., and Zhou, M. M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. Mol Cell *38*, 662-674.

Yu, W., Gius, D., Onyango, P., Muldoon-Jacobs, K., Karp, J., Feinberg, A. P., and Cui, H. (2008). Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. Nature *451*, 202-206.

Yudkovsky, N., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. Nature *408*, 225-229.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell *101*, 25-33.

Zhang, M. X., Zhang, C., Shen, Y. H., Wang, J., Li, X. N., Chen, L., Zhang, Y., Coselli, J. S., and Wang, X. L. (2008a). Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. Mol Biol Cell *19*, 3997-4005.

Zhang, M. X., Zhang, C., Shen, Y. H., Wang, J., Li, X. N., Zhang, Y., Coselli, J., and Wang, X. L. (2008b). Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. J Biol Chem *283*, 14685-14693.

Zhang, Q., Ragnauth, C. D., Skepper, J. N., Worth, N. F., Warren, D. T., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A., and Shanahan, C. M. (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric

protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. J Cell Sci *118*, 673-687.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nussbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., and Liu, X. S. (2008c). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). Genome Biol *9*, R137.

Zhen, Y. Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A., and Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. J Cell Sci *115*, 3207-3222.

Zippo, A., Serafini, R., Rocchigiani, M., Pennacchini, S., Krepelova, A., and Oliviero, S. (2009). Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. Cell *138*, 1122-1136.