

Tesis Doctoral

Nuevo rol de la proteína Argonauta 1 en la regulación de la transcripción y el splicing alternativo por estrógenos

Gómez Acuña, Luciana I.

2017-12-10

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:

Gómez Acuña, Luciana I. (2017-12-10). Nuevo rol de la proteína Argonauta 1 en la regulación de la transcripción y el splicing alternativo por estrógenos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gómez Acuña, Luciana I. "Nuevo rol de la proteína Argonauta 1 en la regulación de la transcripción y el splicing alternativo por estrógenos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-12-10.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Nuevo rol de la proteína Argonauta 1 en la regulación de la transcripción y el *splicing* alternativo por estrógenos

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Luciana I. Gómez Acuña

Director de Tesis: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Consejero de estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET), Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN-UBA.

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 10 de diciembre de 2017

Nuevo rol de la proteína argonauta 1 en la regulación de la transcripción y el *splicing* alternativo

Resumen

En mamíferos las proteínas argonauta están bien caracterizadas como las efectoras del silenciamiento post-transcripcional mediado por RNAs pequeños. Durante este proceso fundamentalmente citoplasmático, dichas proteínas unen RNAs pequeños de 21 nucleótidos los cuales por complementariedad de bases, se unen a los mRNA blanco inhibiendo su traducción o promoviendo su degradación. Si bien sabemos que las proteínas argonauta se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma, es poco lo que conocemos acerca de su relevancia en procesos nucleares. En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos analizado la unión a la cromatina de argonauta 1 (AGO1) a nivel del genoma completo de la línea celular mamaria MCF7 y demostramos que AGO1 se une a elementos regulatorios de la transcripción (*enhancers*), preferentemente cuando éstos se encuentran activos.

En este trabajo, continuamos con el análisis de la distribución genómica de AGO1 en las células mamarias MCF7 y hallamos que esta proteína se encuentra mayormente asociada a *enhancers* cuya activación depende de la unión del receptor de estrógenos alfa (ER α), es decir, que se activan ante la presencia de la hormona estradiol (E2). Observamos que, al igual que lo que ocurre con ER α , la asociación de AGO1 a estos *enhancers* depende del tratamiento con E2. En base a esto, estudiamos la relevancia de AGO1 en la activación transcripcional disparada por E2 en células MCF7. Encontramos que dicha activación depende de AGO1: ante el silenciamiento de la expresión de esta proteína observamos que el efecto del E2 en la activación transcripcional de los *enhancers* y de los genes blanco se reduce. Este efecto es acompañado, además, por una disminución del reclutamiento de ER α así como también por una reducción en la frecuencia de interacción entre un *enhancer* y el promotor de uno de sus genes blanco. Estos hallazgos proponen un rol fundamental para AGO1 en la activación transcripcional dependiente de estradiol. AGO1 interacciona con ER α de forma E2 dependiente, reforzando la idea de que AGO1 actúa directamente en la activación transcripcional disparada por estrógenos.

Por otro lado, estudiamos la relevancia de un *enhancer* intragénico dependiente de E2 en la modulación del patrón de *splicing* alternativo de un evento que se encuentra río arriba de dicho elemento regulatorio. Utilizamos como modelo de estudio el exón *cassette* alternativo 107 del gen *SYNE2*. Vimos que la inclusión de dicho exón en el mRNA disminuye con el tratamiento de células con E2 de manera dependiente de AGO1. Más allá del estudio de un

caso puntual en el que AGO1 regula el *splicing* alternativo, estos resultados permiten postular un modelo en el que el proceso de *splicing* alternativo es modulado por eventos asociados a la activación de un *enhancer* intragénico cercano.

Palabras clave: ARGONAUTA 1 – TRANSCRIPCIÓN – ENHANCERS TRANSCRIPCIONALES – RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA - SPLICING ALTERNATIVO.

Novel role of argonaute 1 in estrogen triggered transcription and alternative *splicing* regulation

Abstract

In mammals, argonaute proteins are best known as the effectors of siRNA-mediated post-transcriptional gene silencing. In this cytoplasmic process, argonautes bind 21 nt long siRNAs which associate with their target mRNAs through base pairing, inducing their degradation or inhibiting their translation. Although argonaute proteins can be found both in the cytoplasm and in the nucleus of mammalian cells, little is known about their roles in nuclear functions. In a previous work from our laboratory, we analyzed the genomic distribution of argonaute 1 (AGO1) in the mammary cell line MCF7 and demonstrated that it binds active transcriptional *enhancers*. Further analysis presented here revealed that AGO1 preferentially associates with estrogen receptor alpha (ER α)-dependent *enhancers* which are activated upon treatment with estradiol (E2). Moreover, we uncover that AGO1 binding to these *enhancers* is dependent on E2 treatment, as it is observed for ER α . We therefore sought to determine whether AGO1 is relevant for ER α -triggered transcriptional activation in MCF7 cells. We demonstrate here that AGO1 is necessary for this activation: AGO1 silencing impairs *enhancer* activation as well as expression of ER α -target genes. Reduced recruitment of ER α to the *enhancers* and reduced interaction frequency between an *enhancer* and the promoter of one of its target genes are also observed upon AGO1 silencing. Altogether these findings indicate that AGO1 plays a key role in E2-triggered transcriptional activation. We found that AGO1 interacts with ER α in an E2 dependent manner, further supporting the idea that AGO1 is directly involved in estrogen dependent transcriptional activation.

Additionally, we studied the relevance of an intragenic E2-dependent *enhancer* in the regulation of an alternative *splicing* event located upstream of this regulatory element. To tackle this, we used the alternative *cassette* exon 107 of the *SYNE2* gene as a model. Results shown here revealed that the inclusion of exon 107 in *SYNE2* mRNA decreases upon E2 treatment, in an AGO1-dependent manner. These findings not only revealed a role for AGO1 in alternative *splicing* regulation, but also allow us to postulate a model in which alternative *splicing* outcomes depend on regulatory events associated to a nearby intragenic *enhancer*.

Key words: ARGONAUTE 1 – TRANSCRIPTION – TRANSCRIPCIONAL *ENHANCERS* – ESTRGEN RECEPTOR ALPHA – ALTERNATIVE *SPLICING*

Agradecimientos

La tesis opta por el Doctorado en Paciencia, Perseverancia y Superación de las Frustraciones (más que superación es acostumbramiento a vivir con ellas). Así se siente...remar en dulce de leche. Imposible sin el apoyo, acompañamiento, palmaditas en la espalda de todos los que compartieron conmigo este arduo camino y que lo hicieron mucho más hermoso. A todos les agradezco, y a cada uno.

A ARK, Doctor Kornflict, por ser el mejor director del mundo. Por darme libertad para hacerme las preguntas que quería y por marcarme el camino en los momentos en los que me sentí perdida. Por enseñarme a hacer todos los controles y por cagarme a pedos todas las veces que no los hice bien. Por enseñarme que esta es la parte más importante. Por enseñarme lo que es ser un científico integral. Por enseñarme que ante todo la pregunta. Por siempre tener algo para enseñar, con interminable pasión. Por abrirme las puertas al mundo.

A Val, por bancar. Porque sin vos estaríamos todos perdidos. Por ser esa mano invisible que nos sostiene para que no colapsemos. Por cagarnos a pedos como si fuéramos tus hijos, porque siempre tenés razón. Por abrirnos las puertas de tu casa y de tu familia. Por tu ayuda y tus charlas.

A Marion, por enseñarme mucho más de lo que pensás. Por obligarme a pensar en los momentos de atasco. Por preguntarme siempre qué me pasaba. Por tus miradas cómplices. Por brindarme tu amistad (y por los mates (...)).

A Petry por hacerme reír siempre, pero siempre. Por ser un gran científico, zar-pa-do, y sólo con RT-PCRs. Por introducirme al arte ancestral del vintageformatics, una vez que logré dejar de reírme...ah....claro.... Por ser el frontón de mis catarsis. Al universo, por haberme dado la suerte de ser contemporánea al gran Petry.

A Anabell, por mostrarme que se puede ser mujer, madre, científica. Todas Bellas con muchísima pasión, dedicación y compromiso. Por aconsejarme y ayudarme siempre que te lo pedí. Por estar siempre en el día a día.

A Bertax, Bertoluci, por ser tan Berta, sin filtro. Por compartir, sin filtro, tus angustias y felicidades. Por mostrarme que así la cosa se sobrelleva mejor. Por tu gran honestidad intelectual y brutal.

A Pablit, por ser taaan lindo y taaaaan careta. Por no ser sólo una cara bonita, por tu inmensa generosidad. Por hacer que laburar por nuestros lados sea un placer. Por siempre tener ganas de ver un western (blot) conmigo.

A Nolo, por tus valiosos consejos a cerca de casi todo. Por ser docente todo el tiempo. Porque con tus explicaciones histriónicas de las cosas más simples siempre termino aprendiendo.

A Mica, por tu inmenso optimismo y alegría con las que encarás todo, pero todo. Por compartir conmigo todas las instancias clave de este camino.

A Anita, por tanta seguridad y determinación para encarar la carrera científica. Por mostrarme que la perseverancia y el trabajo al final rinden sus frutos. Por ser mi terapeuta de mails de post-doc.

A Guille, por la alegría que te llevaste. Por tu inmensa curiosidad contagiosa. Por ser El terapeuta molecular. Por hacernos mutantes con tu fernet. Por tener ganas de hablar de ciencia siempre. Por ser una fuente inagotable de anécdotas. Porque sin vos la vida en el lab hubiera sido tanto menos copada.

A Nach, por ser un científico tan grozen. Por abrimme las puertas de tu casa, a mí y a mi familia. Por estar siempre dispuesto a acotar lo justo y necesario para enriquecer el trabajo. Porque una vez que sobrepaso las malas contestaciones descubro que sos una gran persona. Por la música y los coros. Por bufferear a Petry cada tanto.

A AnitaQ, por compartir tantos momentos, por las charlas post 5 de la tarde.

A Manu, por la ayuda de ahora. Por ser un mito entre los mortales, y por estar a la altura de ese mito.

A Lucho, por tanto misterio. Por ser parte de este trabajo. Te deseo toda la suerte.

A Guilli, corazón, corazón y más corazón. Por eso.

A LuGiono, por las pequeñas cosas y obsesiones que nos ayudan a todos. Por las charlas de las pequeñas cosas.

A Adri Bot-iT, por mostrarme que siempre se puede ser más obsesivo. Por ser un digno discípulo de tu maestro.

A Nico, por ser tan quejosa (dios los cría y el UV los amontona) y por cagarnos a pedos. Por ser una señora. Por hacerme reír.

A Laurito, por tener tan buen humor. Porque siempre estás con una sonrisa. Por tu inmensa predisposición para ayudar, aunque son un cuelgue digno del grupo AS.

A Celi, por ser tan Celi, Gran Valor del laboratorio. Porque aprendí mucho de tu forma de pensar tan distinta, siempre que pude seguirte. Por nuestras intensas charlas.

A Gwendal, por el *Lu just have to dance* de todas las mañanas, durante meses. Porque a pesar de ser un francés irritado, más de una vez lograste hacerme reír. Por tus consejos en momentos en los que los experimentos no salían.

A Fede, por tu voto de confianza. Por mi apodo.

A Dai, por acompañarme en esta última etapa. Por los mates en el Sur. Por ser tan accesible.

A Martín (GS), por desearme tanta suerte. Por tratar de sacarle una sonrisa al equipo de uno con uno en los malos momentos. Por tanta magia.

A Santi, por salvarme las papas a último momento.

A Mati, por combatir en nombre de todos nosotros.

A Pepe, por los mates de las 8 AM de hace tanto. Por tu fuerza y tus ganas de resolver problemas.

A Orlando, por alimentarnos tan rico. Qué asados....

A Dani, por ser tan divina e incisiva a la vez. Por hacerme sentir no tan sola en las mañanas del LFBM.

Al IFIBYNE todo, por darle un marco siempre cambiante a esta aventura que es hacer ciencia.

A los Risi, a Grazia, Gaby, Beto, Martu y Valen, por hacerme sentir una más de la familia y bancar taaanto. A Gra, por cuidar y querer incondicionalmente a Pedrito. Por dejarme abrir tu heladera como si fuese la mía.

A Vicky, hermanis, por ser siempre tan honesta conmigo. Por conocer mis virtudes y defectos y no juzgar demasiado. Por ser mi perfecto contrapunto.

A mamá, por luchar tanto, por enseñarme a ir siempre para adelante. Por tu amor incondicional. Por tu ayuda invaluable con todo, aunque sabés que hacer ciencia es 80% tomar mate en el laboratorio. Por bancar los estudios y darme libertad. Por querer taaaanto a Pedrito (más que a mí). Porque esta tesis es un poco tuya.

A Pedro Vicente, rulito, piernita, por ser el mejor hijo del mundo. Porque soy muy feliz compartiendo este camino con vos. Por ser tan bueno, comprensivo y pasional a la vez. Porque la tenés re clara. Por bancarme, por ser tan compañero. Por tu curiosidad. Por tus abrazos suavitos con olorcito rico, tus besos, tus cariños italianos.

A Martín (...no alcanzarán nunca las palabras de agradecimiento...) por luchar por mi libertad. Por impulsarme siempre hacia adelante. Por no dejar nunca que me quede en el mismo lugar por miedo o agotamiento. Por ayudarme a enfrentar los miedos. Por creer y confiar en mí. Por darme mis momentos de tranquilidad y respetarlos. Por obligarme a salir a enfrentar al mundo. Por la aventura que nos espera. Por la cosita hermosa que es Pedrito.

A todos, por todo.

Vamos por más.

Reconocimientos

Acá, los merecidos reconocimientos a los que hicieron aportes al trabajo realizado a esta tesis:

- A **Santiago Rodríguez Seguí** por los análisis bioinformáticos.
- A **Mariano Alló** por dejarme ser parte de su trabajo y continuarlo.
- A **Luciano E. Marasco** por su ayuda en experimentos varios.
- A **Cody He** por su ayuda en la puesta a punto del 3C.

Financiamiento

Para la realización de la presente tesis de doctorado conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El laboratorio del Dr. Alberto R. Kornblihtt, recibió financiamiento de diversas instituciones, nacionales e internacionales, a lo largo de estos años: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, CONICET, UBA y Howard Hughes Medical Institute.

Publicaciones

Trabajo original

Alló, M.*, Agirre, E.*, Bessonov, S.*, Bertucci, P.*, Gómez Acuña, L.*, Buggiano, V., Bellora, N., Singh, B., Petrillo, E., Blaustein, M., et al. (2014). Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15622-15629.

*Co-primeros autores

Trabajos de revisión y comentarios

Gómez Acuña, L.I., Fiszbein, A., Alló, M., Schor, I.E., y Kornblihtt, A.R. (2013). Connections between chromatin signatures and splicing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 77-91.

Gómez Acuña, L.I., Kornblihtt, A.R. (2014). Long range chromatin organization. A new layer in *splicing* regulation? *Transcription* 5, e28726.

Fiszbein A., Godoy Herz M.A., Gomez Acuña L.I., Kornblihtt A.R.: Interplay between chromatin and splicing”, Chapter from the book “Chromatin Regulation and Dynamics, Elsevier Science & Technology, 2016 (in press)

Los resultados mostrados en esta tesis forman parte de un manuscrito que se encuentra actualmente en preparación.

A mi viejo

Por transmitirme tu amor al conocimiento

A matarlos

Glosario

3'ss: sitio aceptor de *splicing*

3C: captura de la conformación de la cromatina

5'ss: sitio dador de *splicing*

AGO: argonauta

CAGE: *cap analysis gene expression*

cDNA: DNA copia (proveniente de retro-transcripción de un RNA)

ChIA-PET: *chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing*

ChIP-qPCR: inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR en tiempo real

ChIP-seq: inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación masiva

CPT: camptotecina

CTD: dominio carboxi-terminal del la ARN pol II

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleósidos tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

dsRNA: RNA doble cadena

E2: 17- β -estradiol

ER: receptor de estrógenos

ERE: elemento de respuesta a estrógenos

eRNA: RNA de *enhancer*

ESE: *enhancer* de *splicing* exónico

ESS: silencer de *splicing* exónico

GR: receptor de glucocorticoides

GRO-seq: *global run on* seguido de secuenciación masiva

GTF: factores generales de la transcripción

HAT: acetil-transferasa de histonas

HDAC: desacetilasa de histonas

HKMT: metiltransferasa de lisinas de histonas

hnRNP: ribonucleoproteína nuclear heterogénea

ISE: *enhancer* de *splicing* intrónico

ISS: silencer de *splicing* intrónico.

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensajero

NR: receptor nuclear

nt: nucleótidos

NTPs: ribonucleósidos tri-fosfato (ATP, CTP, GTP, UTP)

pb: pares de bases

PBS: buffer salino de fosfato

PcG: complejo *polycomb group*

PIC: complejo de preiniciación de la transcripción

PR: receptor de progesterona

pre-mRNA: RNA precursor del mensajero

PTGS: silenciamiento post-transcriptional

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RdRP: RNA polimerasa RNA dependiente
RNA: ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
RNAP: RNA polimerasa
rPCR: reacción en cadena de la polimerasa radiactiva semicuantitativa
RT: retro-transcripción
SDS-PAGE: electroforesis en gel de agarosa desnaturizante (con SDS)
SHR: receptor de hormona esteroidea
siRNA: RNA pequeño de interferencia
snRNP: ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
SR: proteína rica en serinas y argininas
SYNE2-E107: exón 107 de SYNE2
TAD: dominio topológico (*topological associated domain*)
TF: factor de transcripción
TFBS: sitio de unión de factor de transcripción
TGS: Silenciamiento transcripcional (*transcriptional gene-silencing*)
TSA: tricostatina A
TSS: sitio de inicio de la transcripción
WB: Western blot

Nomenclatura

La nomenclatura común para las modificaciones de las histonas es:

- El nombre de la histona (H1, H2A, H2B, H3, H4, y variantes)
- Abreviatura del aminoácido modificado siguiendo el código IUPAC de una letra.
- La posición que ocupa el aminoácido modificado desde el extremo N-terminal.
- El tipo de modificación (me: metil, ac: acetil.).
- En el caso de las metilaciones, representa el número de grupos metilo añadidos (1: monometilación, 2: dimetilación, 3: trimetilación).

Por ejemplo:

H3_(a)K_(b)9_(c)me_(d)2_(e)

denota una dimetilación de la lisina nueve de la histona H3.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	21
1. 1. La transcripción y su regulación	21
1.1.1 Aspectos generales de la transcripción	21
1.1.2 La transcripción por RNAPII	22
1.1.3 La estructura de la cromatina y la transcripción	24
1.1.4 Elementos regulatorios proximales y distales.....	30
1.1.5 La comunicación entre <i>splicings</i> y promotores.....	32
1.1.6 Características de los <i>splicings</i> que permiten su mapeo.....	33
1.1.7 La transcripción de los <i>splicings</i>	34
1.1.8 Regulación transcripcional por los receptores de hormonas esteroideas: el caso del receptor de estrógenos.....	37
1. 2. El splicing alternativo y su regulación	42
1.2.1 El <i>splicing</i> alternativo	42
1.2.2 La co-transcripcionalidad en la regulación del <i>splicing</i> alternativo	45
1.2.3 La estructura de la cromatina en la regulación del <i>splicing</i> alternativo	47
1. 3. Las proteínas argonauta en la regulación de la transcripción y el splicing alternativo	49
1.3.1 Las proteínas argonauta	50
1.3.2 Biogénesis de los RNAs pequeños de interferencia	51
1.3.3 Las proteínas argonauta y sus funciones nucleares en distintas especies eucariotas.....	52
1.3.4 Las proteínas argonauta y sus funciones nucleares en humanos	56
1.3.5 Las proteínas argonauta y el <i>splicing</i> alternativo	58
1.5.5.....	60
1.5.6.....	60
1.5.7.....	60
1.5.8.....	60
1.5.9.....	60
1.3.6 Antecedentes de nuestro grupo en el estudio de las funciones nucleares de AGO1	60
2. OBJETIVOS	61
2.1 Objetivo general.....	61
2.2 Objetivos específicos.....	61
3. RESULTADOS.....	63

3.1	Rol de AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos en células mamarias	63
3.1.1	AGO1 se une a regiones enriquecidas en motivos de unión al DNA de ER α ..	63
3.1.2	AGO1 se asocia a los sitios de unión al genoma de ER α específicamente	65
3.1.2	67
3.1.3	AGO1 se asocia a los <i>splicings</i> dependientes de ER α que más se activan con estradiol (E2).....	67
3.1.4	Validación del ChIP-seq de AGO1	71
3.1.5	AGO1 se une a los <i>splicings</i> de ER α de manera dependiente de E2	74
3.1.6	La localización subcelular de AGO1 no depende de E2	77
3.1.7	La activación transcripcional mediada por RE α depende de AGO1.....	78
3.1.8	La generación de los RNAs de los <i>splicings</i> de ER α depende de AGO1.....	81
3.1.9	El silenciamiento de AGO1 afecta el reclutamiento de ER α y no el de RNAPII a los <i>splicings</i>	81
3.1.10	El silenciamiento de AGO1 reduce la interacción de largo alcance entre un <i>splicing</i> dependiente de ER α y el promotor de su gen controlado.....	84
3.1.11	AGO1 interacciona físicamente con ER α de forma dependiente de E2.....	85
3.2.	AGO1 y la regulación del <i>splicing</i> alternativo	90
3.2.1	El exón alternativo 107 de SYNE2 como modelo de estudio de la regulación del <i>splicing</i> alternativo por AGO1.....	90
3.2.2	La estructura de la cromatina y la tasa de elongación de la RNAPII afectan los niveles de inclusión de E107 de SYNE2.....	93
3.2.3	La inclusión del E107 de SYNE2 disminuye ante el tratamiento con E2.....	97
3.2.4	El efecto del E2 sobre el <i>splicing</i> alternativo de E107 de SYNE2 depende de AGO1.....	98
3.2.5	Los niveles de mRNA de <i>ESR2</i> aumentan con E2 de forma dependiente de la región intrónica río abajo de E107-SYNE2	99
3.2.6	Los siRNAs dirigidos contra el intrón río abajo de E107 afectan su patrón de <i>splicing</i> alternativo.....	101
4.	DISCUSIÓN	105
4.1	AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos	105
4.1.1	¿AGO1 sólo en <i>splicings</i> de ER α ?	108
4.1.2	¿AGO1 y RNAs pequeños en la activación transcripcional?.....	110
4.1.3	¿Otras AGOs?	111
4.1.4	¿TGS en humanos?	112
4.2	AGO1 en la regulación del <i>splicing</i> alternativo	113
4.2.1	¿Regulación del <i>splicing</i> por <i>splicings</i> transcripcionales intragénicos?.....	116
5.	CONCLUSIONES	117
5.1	AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógeno	117

5.2	AGO1 en la regulación del splicing alterenativo	117
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	119
6.1	Análisis bioinformáticos	119
6.1.1	Análisis de los datos de ChIP-seq	119
6.1.2	Definición de <i>splicings</i>	120
6.1.3	Análisis de correlación entre muestras de ChIP-seq	120
6.1.4	Gráficos de perfiles de ChIP-promedio	120
6.1.5	Análisis de motivos de DNA	120
6.2	Vectores plasmídicos utilizados	121
6.2.1	Minigén reportero de <i>splicing</i> alternativo	121
6.2.2	Vectores de expresión de RNA polimerasa II salvaje y mutante	122
6.2.3	Preparación de plásmidos	122
6.3	Cultivo, transfección y tratamiento de células humanas	124
6.3.1	Cultivo de células humanas	124
6.3.2	Transfección de células humanas en cultivo	125
6.3.3	Tratamientos de células	126
6.4	Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	129
6.5	Fraccionamiento subcelular	133
9.6	SDS-PAGE y Western blot	134
6.7	Análisis de RNA	134
6.7.1	Extracción de RNA total de células humanas en cultivo	134
6.7.2	Control de calidad y cuantificación de RNA	135
6.7.3	Cuantificación relativa de mRNAs, pre-mRNAs y eRNAs	135
6.7.4	Evaluación de los patrones de <i>splicing</i> alternativo	137
6.8	Ensayo de captura de la conformación de la cromatina (3C)	139
6.9	Ensayo de co-inmunoprecipitación de proteínas	144
6.10	Anticuerpos utilizados	145
6.10.1	ChIP/IP	145
6.10.2	Western blot	145
6.11	Oligonucleótidos utilizados	146
6.11.1	Oligonucleótidos iniciadores para PCR (<i>primers</i>)	146
6.11.2	siRNAs (<i>Block-IT</i> de Invitrogen)	148
7.	BIBLIOGRAFÍA	149

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. *La transcripción y su regulación*

1.1.1 Aspectos generales de la transcripción

La capacidad de organismos unicelulares y multicelulares de desarrollar las diferentes funciones celulares y de respuesta a estímulos externos es el resultado de la interpretación de la información codificada en su genoma, interpretación que depende de su historia y de la interacción con el ambiente. El flujo de la información genética desde el material que la contiene hacia la expresión de los programas regulatorios de cada célula de un organismo se encuentra conservado en los tres dominios en los que se clasifica a vida. Según el esquema general en el que este flujo se desarrolla, la información contenida en la molécula de DNA, que es la que se replica y se hereda, es copiada a una molécula de RNA en un proceso que se denomina **transcripción**; las moléculas de RNA, son a su vez leídas por la maquinaria de síntesis de proteínas en un proceso que se denomina **traducción**. Las proteínas son las moléculas responsables de llevar a cabo las reacciones bioquímicas de las células funcionando como catalizadores biológicos y también son parte fundamental de la estructura celular. Muchos RNAs también cumplen funciones celulares *per se* como catalizadores biológicos y como parte estructural de complejos proteicos, cumpliendo roles importantes en su funcionamiento y regulación de su actividad.

La transcripción es el primer paso de la expresión génica y está altamente regulado. Es un proceso complejo que involucra muchos pasos cada uno de los cuales es susceptible a regulación. En eucariotas, la reacción enzimática de transcripción de genes nucleares es llevada a cabo por tres tipos de RNA polimerasas (RNAP) distintas: la RNAPI transcribe los RNA ribosomales 28S, 18S y 5.8S (Zylber y Penman, 1971), la RNAPII transcribe todos los RNA mensajeros y distintas clases de RNA pequeños, mientras que la RNAPIII transcribe RNA de transferencia y ribosomales 5S (Weinmann y Roeder, 1974). La RNAPII es responsable de la expresión de los genes que están sujetos a una alta regulación transcripcional. Entender esta regulación es nuestro principal interés, de modo que nos detendremos específicamente en la transcripción por la RNAPII.

La transcripción por la RNAPII de los genes codificantes da lugar a transcritos que deben ser procesados antes de ser exportados al citoplasma donde serán traducidos. Así, el

transcripto sin procesar, denominado precursor de mensajero maduro RNA o **pre-mRNA** da lugar al RNA maduro o **mRNA**. El procesamiento incluye tres pasos principales:

- **Capping**: la adición de un nucleótido de GTP modificado, denominado capuchón o *cap*, en el extremo 5'.
- **Splicing**: la escisión de segmentos internos llamados intrones por reacciones de corte y empalme. Los segmentos del mRNA empalmados son llamados exones. Pueden existir variantes en los segmentos que se escinden, dando lugar al proceso de *splicing* alternativo, generando distintos tipos de mRNAs a partir de un único gen.
- **Corte y poliadenilación**: es el corte del transcripto en el extremo 3', en sitios específicos, y la adición de varios nucleótidos de adenina. El corte también puede ocurrir en distintos sitios, dando lugar al proceso de corte y poliadenilación alternativo.

Los eventos de procesamiento de los pre-mRNAs son co-transcripcionales, característica que permite una fuerte interacción funcional entre el proceso de transcripción y los involucrados en los distintos pasos de procesamiento.

1.1.2 La transcripción por RNAPII

La capacidad de iniciar la transcripción en sitios muy precisos del genoma es una característica de la maquinaria transcripcional de vital importancia a la hora de analizar la regulación de la expresión génica (Roy y Singer, 2015). La RNAPII es reclutada a sitios específicos del genoma que promueven la transcripción. Estas regiones son denominadas **promotores mínimos** y se definen como las 50-100 pares de bases dentro de las cuales la transcripción inicia (Roy y Singer, 2015). La RNAPII es reclutada a estas regiones junto con factores proteicos denominados **factores generales de la transcripción (GTFs)** que se unen a los promotores mínimos de forma secuencial y dirigen a la RNAPII a los **sitios de inicio de la transcripción (TSSs)** por sus iniciales en inglés, *transcription start sites*) (Vernimmen y Bickmore, 2015). Los GTFs incluyen a TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. Junto con la RNAPII los GTFs conforman el **complejo de preiniciación de la transcripción (PIC)** (Vernimmen y Bickmore, 2015).

El ensamblado del PIC en el promotor es condición necesaria pero no suficiente para alcanzar los niveles de transcripción en general observados. Según observaciones realizadas en ensayos *in vitro* (Sainsbury *et al.*, 2015), el ensamblado del PIC sólo es suficiente para dirigir niveles bajos de transcripción, referidos como **transcripción basal**

(Vernimmen y Bickmore, 2015). Esta observación puede explicarse por el hecho de que el ensamblado del PIC en los promotores mínimos es el primero de una serie de pasos necesarios para que la transcripción ocurra de forma efectiva (Sainsbury *et al.*, 2015). Una vez iniciada la transcripción, la RNAPII se pausa dentro de los 30 y 60 nucleótidos (nt) río abajo del TSS a la espera de señales adicionales para comprometerse en la elongación productiva. Nos referimos a este fenómeno como **pausado proximal de la RNAPII (Figura I1)**. El pasaje de la iniciación de la transcripción hacia la elongación efectiva es un paso que puede estar sujeto a la regulación (Jonkers y Lis, 2015; Shandilya y Roberts, 2012).

El pausado de la RNAPII en regiones proximales río abajo del TSS puede entenderse por el hecho de que esta se encuentra fuertemente ligada al promotor. El factor negativo de la elongación (NELF) y el factor sensible a DRB (DSIF), por ejemplo, estabilizan el pausado de la RNAPII (Jonkers y Lis, 2015; Vernimmen y Bickmore, 2015). En el modelo prevalente, el nivel de pausado depende del balance entre factores que promueven el pausado y factores que activan la elongación (Jonkers y Lis, 2015).

En la salida del pausado proximal es fundamental el **dominio carboxi-terminal (CTD)** de la subunidad mayor de la RNAPII, la RPB1, que se encuentra por fuera del dominio globular de la enzima, cerca del canal de salida del RNA recién sintetizado (Buratowski, 2009). Se ha propuesto que el CTD de la RNAPII actúa como una plataforma sobre la que se reclutan factores involucrados en la transcripción y en el procesamiento del pre-mRNA (Buratowski, 2009; Muñoz *et al.*, 2010). En mamíferos, el CTD incluye 52 repeticiones en tándem de heptapéptidos de secuencia $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$, siendo el ajuste a este consenso variable entre las héptadas (Buratowski, 2009). El CTD está sujeto a modificaciones post-traduccionales, siendo las más caracterizadas las fosforilaciones en S2 y S5. Más recientemente se han descrito las fosforilaciones en Y1, T4 y S7 (Nojima *et al.*, 2015). Distintos patrones de fosforilación del CTD se asocian a la unión de distintos factores y, por lo tanto, a distintos procesos (Buratowski, 2009; Nojima *et al.*, 2015).

La fosforilación en Ser2 es de particular importancia en el escape de la RNAPII del pausado proximal (Jonkers y Lis, 2015). En esta interviene el complejo de elongación de la transcripción P-TEFb (CDK9 y la ciclina T) que a su vez forma parte del complejo de súper elongación (SEC). P-TEFb es reclutado a los promotores a través de interacciones directas. P-TEFb también es responsable de la fosforilación de NELF, que entonces se libera del promotor, y de DSIF que así se convierte en un factor positivo de la traducción (Jonkers y Lis, 2015) (**Figura I1**).

En este punto debemos distinguir entre tasa de elongación y procesividad de la RNAPII. La **tasa de elongación** se refiere a la velocidad de síntesis del RNA y se mide en nt por unidad de tiempo. Se ha descrito que esta se encuentre entre 0,5-5 kilobases (kb) por minuto, siendo variable dentro de un mismo gen y entre genes (Veloso *et al.*, 2014). La elongación no es eficiente al comienzo de la transcripción productiva, pero se ha observado que esta aumenta durante las primeras 15 kb. Esto puede deberse a una maduración gradual de la maquinaria transcripcional dada por el reclutamiento y modificación acumulativos de sus componentes durante la transcripción de las primeras kb de los genes (Jonkers y Lis, 2015). La **procesividad** de la RNAPII, en cambio, se define como la distancia que un dado complejo puede transcribir sin desprenderse del DNA.

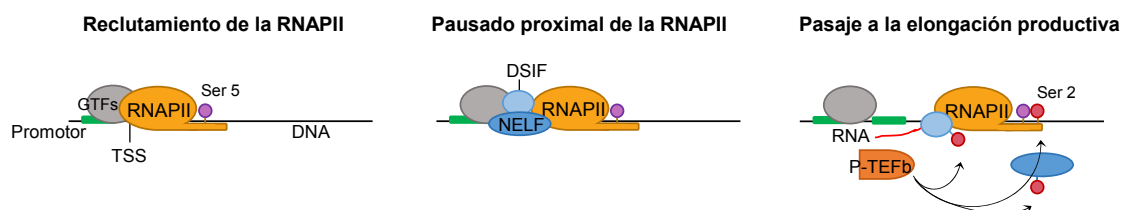


Figura 11. El inicio de la transcripción. El reclutamiento de la RNAPII a los promotores por los GTFs resulta en la formación del PIC. Luego del inicio rápido de la transcripción ocurre el pausado de la RNAPII que sigue asociada al promotor por NELF y DSIF. P-TEF-b media el pasaje a la elongación productiva al fosforilar a NELF, DSIF y el CTD de la RNAPII. DSIF se convierte en un factor positivo de la elongación. Adaptado de Jonkers y Lis (2015).

Según el modelo más aceptado, la transcripción ocurre de manera cíclica, es decir que varias rondas de transcripción se suceden mientras que el ensamblado completo del PIC ocurre una única vez. Luego de que la RNAPII escapa del promotor y se compromete a la elongación productiva, varios factores de PIC permanecen unidos al promotor basal. La reiniciación sólo requiere del reclutamiento *de novo* de la RNAPII junto con algunos de los subcomplejos (Shandilya y Roberts, 2012).

1.1.3 La estructura de la cromatina y la transcripción

Para entender la regulación de la transcripción en relación a los diferentes factores necesarios para que ocurra debemos primero tener en cuenta que el DNA nuclear de todas las células eucariotas se encuentra empaquetado junto a proteínas en una estructura que llamamos **cromatina**. Esta determina un nivel de complejidad que la maquinaria transcripcional debe atravesar para acceder a las regiones promotoras primero y para

desplazarse de forma efectiva y procesiva a través de las unidades transcripcionales después (Cramer, 2014).

La unidad fundamental y repetitiva de la cromatina es el **nucleosoma**. Este se conforma por un octámero de proteínas, denominadas **histonas**, por sobre el que la doble hélice del DNA se enrolla dando dos vueltas, las cuales abarcan 147 pb. Cada octámero canónico (existen variantes en determinadas regiones del genoma) está constituido por dos histonas H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4 (Schalch *et al.*, 2005) (**Figura I2**). Una histona adicional, H1, se une al DNA internucleosomal (DNA *linker*). Ensayos de microscopía electrónica revelaron que los arreglos de nucleosomas aparecen como fibras de 30 nm de diámetro, lo cual indica que los nucleosomas se organizan, a su vez, en estructuras de orden superior (Song *et al.*, 2014). Se ha podido caracterizar, por cristalografía de rayos X, que estas estructuras se conforman por tetranucleosomas en los cuales los nucleosomas se apilan de a pares y entre los que el DNA se ubica haciendo un zigzag (Schalch, 2005). Estos tetranucleosomas se organizan en las fibras de 30 nm por interacción del DNA *linker* con la histona H1. Para la formación de las fibras de cromatina también son esenciales los **extremos amino terminales (N-terminales) de las histonas** que conforman los nucleosomas. Estos extremos son desorganizados y se proyectan por fuera del *core* del nucleosoma, quedando disponibles para interactuar con otros nucleosomas y proteínas (Song *et al.*, 2014).

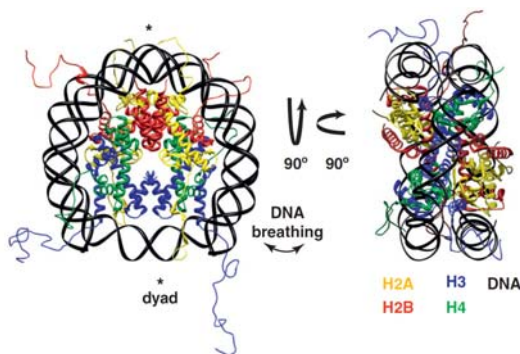


Figura I2. Estructura de un nucleosoma. Este consiste en 147 pb de DNA enrollado alrededor de un octámero de histonas conformado por dos dímeros de H2A y H2B asociados con un tetrámulo de H3 y H4. Los contactos DNA-histona más fuertes se muestran con asteriscos. La flecha indica la dirección en la que DNA rompe los contactos con las histonas de forma espontánea. Tomado de Petesch y Lis (2012).

La fibra de 30 nm resuelta por microscopía electrónica y cristalografía de rayos x demuestra cuán empaquetado puede estar el DNA dentro de núcleo. Esta estructura es, sin embargo, muy dinámica, pudiendo presentar distintos grados de compactación. El grado de compactación que puede adquirir la cromatina repercute sobre los distintos procesos nucleares que ocurren asociados a ella. La estructura de la cromatina determina, en primer

lugar, la **accesibilidad al DNA** subyacente. Un alto grado de compactación delimita regiones del genoma que quedan restringidas para el acceso de la maquinaria transcripcional. Los nucleosomas son, por otro lado, una **barrera para la elongación** de la RNAPII. Ensayos *in vitro* demuestran que la presencia de nucleosomas aumenta el pausado de la RNAPII y baja su tasa de elongación promedio. Fluctuaciones en los arreglos de dinucleosomas afectan, además, la dinámica de la transcripción (Fitz *et al.*, 2016; Hodges *et al.*, 2009).

La activación transcripcional requiere, en primer lugar, que la cromatina que incluye a la región promotora se abra y el DNA quede accesible a la maquinaria transcripcional (Cramer, 2014). Factores proteicos son los responsables de la reorganización de los arreglos nucleosomales presentes en las regiones específicas a las que estos se unen (Voss y Hager, 2014). Los mecanismos moleculares por los que estos reconocen elementos que se encuentran en una estructura de cromatina cerrada son en gran parte desconocidos. Varios mecanismos se han propuesto, aunque la evidencia no permite aún corroborar alguno de ellos (Voss y Hager, 2014; Zaret y Carroll, 2011). Según el modelo más aceptado, dos o más factores se unen a elementos regulatorios de forma combinatoria compensando las uniones histona-DNA que estabilizan la estructura de nucleosomas. Según otro modelo, una clase especial de factores, considerados como **factores pioneros de la transcripción**, tienen la capacidad de unirse a determinadas secuencias de DNA en una configuración de cromatina cerrada, creando el acceso por otros factores que promueven la apertura de la cromatina (Voss y Hager, 2014; Zaret y Carroll, 2011). Se postula que los factores de tipo *forkhead box protein A* (FOXA) son de este tipo de factores pioneros. Tienen una estructura similar a la histona H1 cosa que les permitiría asociarse al DNA desplazando a las histonas (Voss y Hager, 2014); ensayos *in vitro* muestran de hecho que FOXA1 tiene la capacidad de inducir regiones de cromatina abierta. De ahora en más, nos referiremos como factores pioneros de la transcripción a aquellos que se unen a regiones específicas del genoma antes de su activación y de la unión de otros factores, confiriéndoles cierta competencia para la posterior activación. Los factores pioneros de la transcripción tienen la capacidad, además, de unirse sus regiones blanco cuando éstas se encuentran en una estructura de cromatina cerrada (Zaret y Carroll, 2011).

La unión de los factores pioneros de la transcripción a regiones específicas del genoma en configuración de cromatina cerrada desencadena el reclutamiento de otros factores que continúan promoviendo una mayor apertura local de la cromatina. Se han descrito diversos mecanismos moleculares por los que estos factores abren la cromatina. Estos involucran, en general, el reclutamiento de **complejos remodeladores de la cromatina dependientes de**

ATP que reorganizan los arreglos de nucleosomas promoviendo su deslizamiento, desplazamiento, desensamblado parcial o sustitución por variantes de histonas (Voss y Hager, 2014). Como resultado de estos mecanismos se observa que tanto promotores de genes activos como regiones regulatorias activas del genoma se encuentran libres de nucleosomas y accesibles para la maquinaria transcripcional (Voss y Hager, 2014) (**Figura I3**).

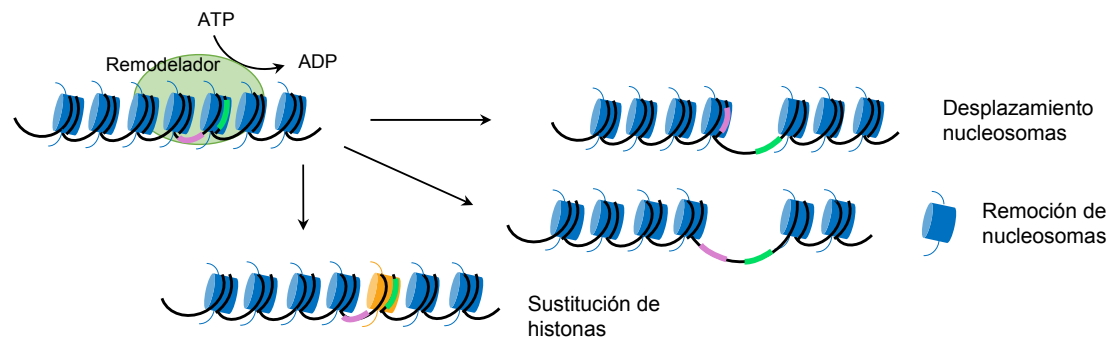


Figura I3. Modelos de apertura de la cromatina por actores remodeladores ATP dependientes. Se muestran cambios en la posición o composición de nucleosomas en relación a segmentos DNA. Los posibles resultados de la acción de los remodeladores son: el desplazamiento de nucleosomas que expone un segmento de DNA previamente obstruido; la remoción total de histonas y el intercambio de histonas por variantes que relajan las uniones DNA histonas. Adaptado de Petesch y Lis (2012).

Como dijimos, los arreglos de nucleosomas a lo largo de los genes también repercuten sobre la elongación de la RNAPII. Los nucleosomas actúan como barreras para la RNAPII que se encuentra transcribiendo. Para que la elongación sea productiva, la RNAPII debe romper con estas barreras (Petesch y Lis, 2012a). Para esto también intervienen los complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes (Petesch y Lis, 2012a). La familia de remodeladores de la cromatina SWI/SNF, mejor descrita por su rol en la remoción de nucleosomas en los promotores, también se halla en el cuerpo de los genes y en muchos casos, se asocia a la RNAPII durante la elongación (Petesch y Lis, 2012a).

Las **modificaciones post-transcripcionales de las histonas** contribuyen significativamente a la estructura de la cromatina. Como dijimos, los extremos N-terminales de las histonas son desorganizados y se proyectan hacia afuera de los nucleosomas pudiendo interactuar con otros nucleosomas y complejos proteicos (Song *et al.*, 2014). Estos extremos son susceptibles a una extensa cantidad de modificaciones post traduccionales de las que se han descrito más de 100 (Zentner y Henikoff, 2013). Estas

son normalmente referidas como marcas de histonas e incluyen a la metilación y la acetilación de lisinas y la fosforilación de serinas y treoninas (Zentner y Henikoff, 2013). Las marcas de histonas pueden alterar la estructura de la cromatina de dos formas distintas: pueden hacerlo de forma directa o indirecta, favoreciendo el reclutamiento de complejos proteicos efectores que son capaces de alterar dicha estructura.

El caso más estudiado de marcas de histonas que afectan directamente la estructura de la cromatina es el de la **acetilación de lisinas**. Se ha postulado que los grupos acetilo neutralizan la carga positiva de las histonas neutralizando la interacción iónica con el DNA. Ensayos *in vitro* demuestran que la acetilación de los extremos N-terminales de las histonas H2A y H2B debilitan la unión del DNA con los nucleosomas. La acetilación de H3 y H4, por otro lado, reduce la formación de estructuras de mayor orden. Se postula que el extremo N-terminal de H4 media los contactos entre nucleosomas y que su acetilación afecta dichos contactos (Shogren-Knaak, 2006). El dominio globular de las histonas también es susceptible a la acetilación afectando también la estabilidad de los nucleosomas y la formación de estructuras nucleosomales de orden superior (Tessarz y Kouzarides, 2014). La H3K22ac es, de hecho, la única marca de histonas que estimula la transcripción *in vitro* (Pradeepa *et al.*, 2016; Tessarz y Kouzarides, 2014).

En el caso de la **metilación de lisinas**, no puede decirse que esta introduzca cambios estructurales *per se* en los arreglos nucleosomales (Bannister y Kouzarides, 2011). Para explicar los casos en los que se ha descrito que la metilación de determinados residuos afecta determinados procesos, hay que recurrir a otros mecanismos. Las marcas de histonas también pueden actuar como plataformas dinámicas para el reclutamiento de complejos efectores específicos. Muchos de los factores que se encuentran asociados a la cromatina interactúan con ella a través de dominios que reconocen marcas de histonas específicas (Bannister y Kouzarides, 2011). El complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, por ejemplo, contiene bromodominios que se unen a colas acetiladas de H3 (Petesch y Lis, 2012a). Chd1, otro de estos complejos, contiene un cromodominio que reconoce H3K4me3, una marca de histona enriquecida en los promotores de genes activos (Petesch y Lis, 2012a). Las marcas de histonas también pueden actuar de forma combinatoria, aumentando la especificidad de los eventos que puedan ocurrir río abajo de su deposición. Tal es el caso del complejo remodelador de la cromatina ISWI que se une tanto a H3K4me3 como a H4K16ac pero que se une más fuertemente a nucleosomas que contienen ambas marcas (Petesch y Lis, 2012a).

El caso más estudiado acerca de cómo una marca de histona desencadena cambios estructurales en la cromatina de forma indirecta lo constituye la H3K9me3 que participa en la formación de estructuras de cromatina cerrada, es decir, de **heterocromatina**. La proteína HP1 se une específicamente a esta marca a través de un cromodominio y esta unión facilita la dimerización con otras proteínas HP1 y la consecuente compactación de la cromatina (Bannister y Kouzarides, 2011).

El perfil de enriquecimiento de una dada marca de histona depende del equilibrio entre su deposición y remoción, procesos en los que están involucrados distintos complejos enzimáticos. La acetilación de histonas, por ejemplo, ocurre por acetil-transferasas de histonas (HATs) que son en su mayoría grandes complejos proteicos. La composición de estos complejos determina tanto la especificidad en su reclutamiento a la cromatina así como qué residuo de las histonas acetilan. Las enzimas deacetilasas de histonas (HDACs), en cambio, se caracterizan por una baja especificidad de sustrato. El panorama se hace más complejo si se considera que varias HDACs pueden estar presentes en un mismo complejo proteico (Bannister y Kouzarides, 2011). Al igual que las HATs, las metil-transferasas de lisinas de histonas (HKMTs) son muy específicas, no sólo en cuanto al residuo que metilan sino también al grado de metilación en el que lo hacen (mono-, di- y/o tri-metilación) (Bannister y Kouzarides, 2011). El hallazgo de que la metilación de histonas es un proceso reversible es relativamente reciente; se pensaba anteriormente que esta era una marca muy estable. LSD1 es la primera demetilasa de histonas descrita. Su especificidad está determinada por las proteínas con las que se acompleja, pudiendo actuar como represor de la transcripción demetilando a H3K4me1/2 o como activador de la transcripción demetilando a H3K9me (Bannister y Kouzarides, 2011).

Actualmente, gracias a ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos específicos seguidos de secuenciación masiva (**ChIP-seq**) realizados en múltiples sistemas, sabemos en mucho detalle qué marcas se asocian a qué regiones del genoma (regiones regulatorias activas, pausadas, promotores de genes activos, regiones silenciadas, etc). Estos análisis son en su mayoría correlativos. Si bien muchos avances se han realizado en este campo, aún desconocemos cómo ocurre la deposición de muchas de las marcas de histonas en regiones muy específicas del genoma y cuál es su función (Zentner y Henikoff, 2013).

En los siguientes apartados mencionaremos con más detalle aquellos factores remodeladores de la cromatina, marcas de histonas, y enzimas responsables de ellas, en relación a los procesos analizados.

1.1.4 Elementos regulatorios proximales y distales

Hasta aquí hemos analizado cómo se inicia la transcripción de genes a partir de los promotores mínimos. Los elementos presentes en estas regiones, sin embargo, no pueden dar cuenta de los niveles transcripcionales observados y de la alta regulación espacio-temporal de la transcripción.

Cerca de los promotores mínimos existen regiones que reclutan **factores de transcripción (TFs)** adicionales y que son responsables de la transcripción por encima de los niveles basales. Estas regiones constituyen los **elementos regulatorios proximales** que actúan en *cis*, es decir que su función depende de su cercanía a los promotores. Existen otro tipo elementos regulatorios caracterizados por estar a más de 1 kb de los TSS de los genes que regulan. Estos son **elementos regulatorios distales** e incluyen tanto a elementos que actúan de forma positiva (**enhancers**) como negativa (**silencers**) sobre la transcripción (Maston *et al.*, 2006). A modo de aclarar la nomenclatura, **el promotor basal de un dado gen junto y los elementos regulatorios proximales que lo regulan forman, en conjunto, el promotor de dicho gen. Nos referiremos a los elementos distales que promueven la activación transcripcional como enhancers (Figura 14).**

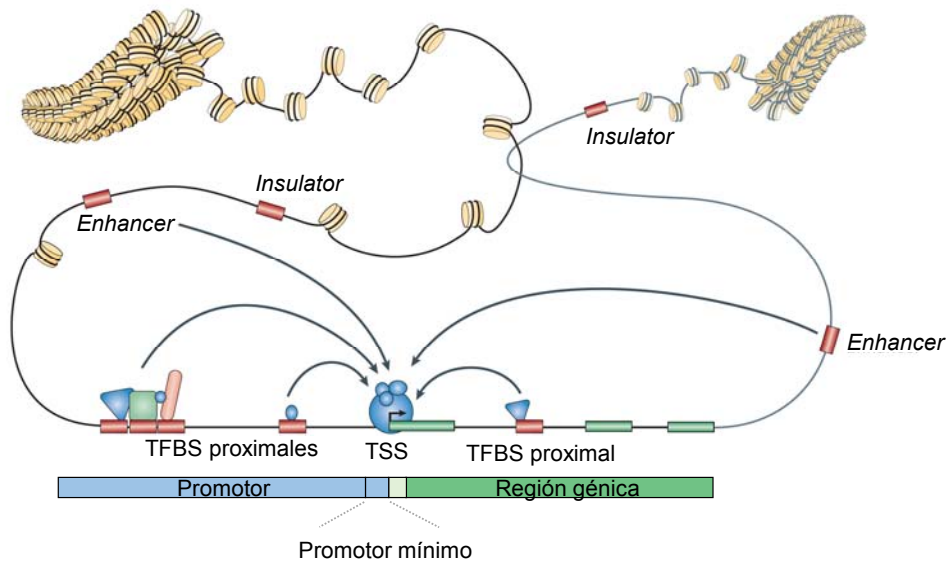


Figura 14. El promotor mínimo de un gen integra múltiples señales que determinan la regulación de su transcripción. La estructura de la cromatina puede estar cerrada o accesible a proteínas. Los límites entre estos estados están marcados por *insulators*. La región alrededor del TSS suele contener elementos regulatorios proximales que, junto con el promotor mínimo constituyen el promotor del gen. TFs se unen a estos elementos regulatorios que llamamos TFBS (TF *binding sites*). Los elementos que unen TFs también pueden ser distales. Llamamos a estos *enhancers*. Tomado de Lenhard *et al.* (2012).

Los elementos regulatorios proximales y *enhancers* unen complejos proteicos que contribuyen a la transcripción efectiva ayudando en alguno sus pasos, i.e. la unión de la RNAPII al promotor basal, el escape del promotor basal o la elongación efectiva a lo largo de la unidad transcripcional (Vernimmen y Bickmore, 2015). Estos complejos son una clase de TFs denominada **activadores**. En general, los activadores se unen al DNA de forma específica de secuencia. La unión de los activadores a los elementos de secuencia específica es condición necesaria pero no suficiente para la activación transcripcional: estos reclutan, a su vez, **co-activadores** que alteran la estructura de la cromatina e interaccionan con la maquinaria basal de la transcripción. Entre los co-activadores puede incluirse al complejo Mediador, que funciona como un puente entre los activadores transcripcionales y el PIC. Mediador integra la señal proveniente de los TFs unidos a elementos regulatorios proximales y distales hacia la maquinaria basal de transcripción (Allen y Taatjes, 2015). Cohesina es otro complejo multiproteico que colabora con Mediador en el establecimiento de la comunicación entre *enhancers* y promotores (Kagey *et al.*, 2010).

El complejo p300/CBP es otro co-activador reclutado por TFs a elementos regulatorios proximales y distales. Se trata de una HAT que acetila histonas tanto en promotores como en *enhancers* favoreciendo la apertura de la estructura cromatínica (Vernimmen y Bickmore, 2015). Es responsable de la acetilación tanto del dominio globular de H3, en el residuo K122 (Tropberger *et al.*, 2013), como en su extremo N-terminal, en el residuo K27 (Tie *et al.*, 2009) entre otros. Ambas marcas de histonas son típicas de *enhancers* activos (Creyghton *et al.*, 2010; Pradeepa *et al.*, 2016). Los *enhancers*, a través del reclutamiento de activadores y co-activadores, también están involucrados en la remoción de marcas represivas de la transcripción, como H3K27me3, tanto en promotores y cuerpo de los genes que regulan (Taberlay *et al.*, 2011; Vernimmen *et al.*, 2011). Esto sugiere que pueden promover el reclutamiento de una multiplicidad de enzimas que regulan la deposición y remoción de marcas de histonas (Vernimmen y Bickmore, 2015).

La asociación de factores a los *enhancers* ocurre de forma secuencial. En primer lugar, y como mencionamos anteriormente, ocurre la unión de factores pioneros de la transcripción capaces de unirse a la cromatina en una configuración cerrada y de promover su apertura. Se establecen, de esta forma, regiones libres de nucleosomas preparadas, marcadas, para la posterior activación transcripcional (Zaret y Carroll, 2011). Durante la activación de los *enhancers* ocurre el reemplazo de los factores pioneros o el reclutamiento de TFs adicionales, de activadores, co-activadores, GTFs. Al igual que lo que se observa en los promotores, el reclutamiento de los diferentes TFs ocurre de forma secuencial (Vernimmen y Bickmore, 2015). El orden en el reclutamiento de los TFs, con o sin actividad de factor

pionero, y de co-activadores, puede diferir entre sistemas de *enhancers*. Se observa, de cualquier manera, que, en general, la generación de sitios de libres de nucleosomas y ocupación de los *enhancers* preceden a los eventos que ocurren sobre los promotores que estos regulan (Soufi *et al.*, 2012).

Dentro de los eventos que ocurren durante la activación transcripcional debe incluirse el reclutamiento de componentes del PIC a los *enhancers*. Este reclutamiento puede ocurrir temprano, durante la etapa de marcación de *enhancers*, o más tarde durante su activación (Vernimmen *et al.*, 2007; Vernimmen y Bickmore, 2015). El reclutamiento de GTF y del PIC a los *enhancers* parece ser independiente de lo que ocurre en el promotor, según lo revelan ensayos de remoción de promotores (Kim *et al.*, 2010; Vernimmen *et al.*, 2007). Esta relación no es recíproca: el reclutamiento de la maquinaria basal de la transcripción a los promotores depende de su reclutamiento previo a los *enhancers* (Spicuglia *et al.*, 2002; Vernimmen *et al.*, 2007).

Los TFs que se unen a sus elementos regulatorios distales y proximales median, en forma conjunta y muy específica, la integración tanto de las señales intrínsecas de las células así como las señales tejido-específicas y ambientales que modulan la transcripción de un dado gen. Todos estos eventos de señalización son necesariamente integrados en el promotor basal para así conseguir los niveles apropiados de transcripción con una alta especificidad espacio-temporal.

1.1.5 La comunicación entre *enhancers* y promotores

Los *enhancers* pueden ubicarse de 1000 hasta 100000 pb de distancia con respecto a los promotores de los genes blanco. Resulta evidente en este punto que estos deben de alguna forma comunicarse con los promotores de los genes que estos regulan. Se postulan dos modelos que permitirían explicar cómo la información se transmite desde *enhancers* a promotores (Vernimmen y Bickmore, 2015). Según el modelo de seguimiento o *tracking*, algunos factores unidos a los *enhancers* se mueven progresivamente hacia los promotores a algunos casos si abandonar los *enhancers*, cosa que resulta en la formación de loops progresivos cuyo tamaño aumenta hasta que llega al promotor y forma una estructura estable (Wang *et al.*, 2005) (**Figura I5.A**). Según este modelo la acetilación de histonas y los TFs son detectados de forma transitoria en segmentos entre *enhancers* y promotores. Según el modelo alternativo, existe una interacción física entre *enhancers* y promotores dejando fuera al DNA intermedio que forma un loop (**Figura I5.B**). Varias proteínas fueron implicadas en la formación de estas estructuras: Mediador, CTCF y cohesinas entre otras

(Hou *et al.*, 2010; Kagey *et al.*, 2010). Que ocurra uno u otro modelo probablemente dependa de la distancia entre el promotor y el *enhancer*. El modelo de *tracking* parece ser sólo posible en casos en los que las distancias entre *enhancers* y promotores son cortas (Vernimmen y Bickmore, 2015).

La organización tridimensional de la cromatina parece cumplir un rol más allá de la de conectar a *enhancers* y promotores. Análisis de interacciones a nivel de genoma completo revelaron que la cromatina se organiza en dominios asociados a topologías (TADs) que correlacionan con regiones del genoma que contienen la propagación de la cromatina. Los TADs son estables a través de tipos celulares y están altamente conservados a lo largo de varias especies de mamífero (Dixon *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Esto quiere decir que las interacciones de largo alcance que se generan de forma dinámica ante estímulos que conllevan cambios transcripcionales deben enmarcarse en una arquitectura nuclear mayor que las delimita.

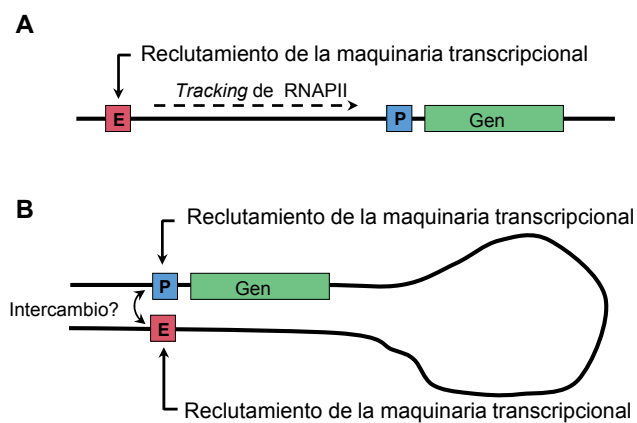


Figura 15. Modelos que explican la comunicación entre *enhancers* y promotores. **A.** En el modelo de *tracking*, la RNAPII junto con factores asociados es reclutada a un *enhancer* y recorre el segmento de DNA entre este y el promotor. **B.** En el modelo de *looping*, la RNAPII y factores asociados son reclutados al *enhancer* y llegan al promotor por interacción física entre ambos elementos. Adaptado de Li *et al.*, (2016).

1.1.6 Características de los *enhancers* que permiten su mapeo

Hasta aquí podemos establecer ciertas características que son propias de los *enhancers* transcripcionales y que permiten su mapeo a lo largo de distintos tipos celulares y ante distintos estímulos (Lam *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016b). La anotación de los *enhancers* involucra el análisis de la estructura de la cromatina y de la deposición de marcas de histonas a lo largo del genoma. Las regiones regulatorias se caracterizan en primer lugar por carecer de nucleosomas y, por lo tanto, por ser susceptibles a nucleasas de DNA. El mapeo de regiones de **hipersensibilidad a la DNasa I** es un primer acercamiento para hallar

regiones libres de nucleosomas (Calo y Wysocka, 2013). La presencia de la variante de histonas **H2A.Z** es otro elemento que permite la identificación de regiones regulatorias. En cuanto al análisis de los niveles de enriquecimiento de marcas de histonas, la relación entre los niveles de **H3K4me1/2** y **H3K4me3** es uno de los parámetros que primero suele analizarse al tratar de identificar *enhancers*: estos se caracterizan por una alta relación H3K4me1/H3K4me3 mientras que los promotores de genes activos se caracterizan por la relación inversa (Heintzman *et al.*, 2007, 2009). H3K4me1, sin embargo, no permite distinguir entre *enhancers* activos y pausados (Creyghton *et al.*, 2010). Se piensa que, de hecho, H3K4me1 participa del marcado de los *enhancers* antes de su activación y persiste aún luego de su pico de activación (Calo y Wysocka, 2013). Los niveles de **H3K27ac**, en cambio, sí permite discriminar entre *enhancers* pausados y activos: se ha visto que en *enhancers* pausados que se activan durante el desarrollo, H3K27ac es un buen marcador de su activación (Creyghton *et al.*, 2010). Hallazgos posteriores indican que esta marca puede ser usada como marcador de la actividad de un *enhancers* en muchos sistemas celulares y de señalización distintos (Zentner *et al.*, 2011) (**Figura I6**). De cualquier manera, H3K4me1 siempre parece preceder a la acetilación de las histonas de *enhancers*, sea cual sea el residuo que se acetila (Calo y Wysocka, 2013). A pesar de lo extendida que se encuentra la marca H3K4me1 en los *enhancers* transcripcionales se desconocen las funciones moleculares río abajo de su deposición (Calo y Wysocka, 2013). La evidencia sugiere que es responsable del reclutamiento de complejos involucrados en la apertura de la cromatina y en el intercambio de la histona H2A por la variante H2A.Z (Jeong *et al.*, 2011).

La anotación de *enhancers* basada en perfiles de marcas de histonas se complementa con el análisis de la unión de **co-activadores** y HATs, como p300 y mediador, y de **múltiples TFs** sobre una única región (Li *et al.*, 2016b).

1.1.7 La transcripción de los *enhancers*

Existe otro aspecto que debemos considerar a la hora de caracterizar a los *enhancers* y a los eventos que ocurren durante la activación transcripcional. Los *enhancers* activos se transcriben dando lugar a RNAs no codificantes que pueden tener características variables en cuanto a su procesamiento y estabilidad (Li *et al.*, 2016b). Llamamos a estos **RNAs de *enhancers*, eRNAs**. Si bien los eRNAs fueron descriptos en estudios de *loci* individuales hace muchos años (Ashe *et al.*, 1997; Maggi Allan *et al.*, 1983), el reconocimiento de su abundancia y extensión a lo largo de numerosos modelos de activación transcripcional vino de análisis de la transcripción a nivel del genoma completo y no sesgada a regiones génicas (Cheng, 2005; Kim *et al.*, 2010; de Santa *et al.*, 2010). Ensayos de *run on* seguidos de

secuenciación masiva (GRO-seq) revelaron con mayor sensibilidad y robustez la generación de eRNAs en modelos de activación transcripcional disparada por receptores hormonales nucleares y en el modelo de activación de macrófagos (Hah *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2014; Kaikkonen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011). Análisis de expresión de transcritos a partir del *cap* (CAGE) de muchos tejidos tipos celulares humanos reveló la existencia de entre 40000 y 65000 *enhancers* que generan eRNAs (Andersson *et al.*, 2014a).

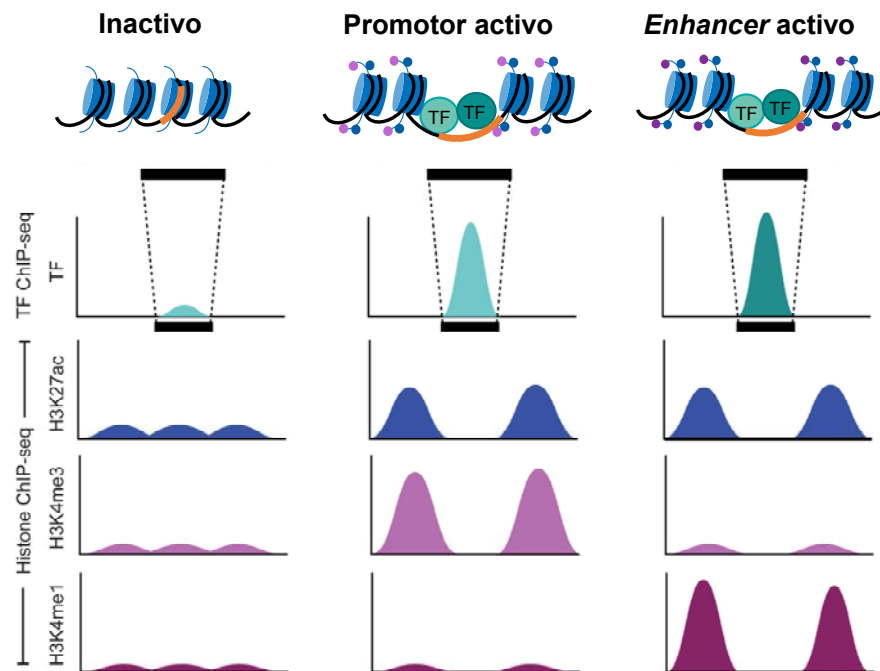


Figura I6. Perfiles de ChIP-seq característicos de *enhancers* y promotores activos. Los *enhancers* y promotores activos son regiones libres de nucleosomas que se caracterizan por estar enriquecidos en TFs en cuyos perfiles de ChIP-seq aparecen como *clusters* centrados en el *enhancer*. Tanto *enhancers* como promotores presentan altos niveles de H3K27ac. Los promotores activos se caracterizan por altos niveles de H3K4me3 y bajos niveles de H3K4me1. Los *enhancers* activos se caracterizan por bajos niveles de H3K4me3 y altos niveles de H3K4me1. Tomado de Pundhir *et al.* (2015)

La generación de eRNAs correlaciona positivamente con la actividad de los *enhancers*. Estos se transcriben de regiones genómicas enriquecidas en H3K4me1 (y no en H3K4me3), en TFs y co-activadores como Mediador y p300. Se asocian, además, con regiones enriquecidas en H3K27ac y que carecen de H3K27me3. La activación de genes dependiente de señales extracelulares (como la activación de macrófagos o la activación

hormonal de receptores nucleares) correlaciona positivamente con la generación de eRNAs. Por último, los eRNAs se asocian a regiones regulatorias involucradas en interacciones de largo alcance entre *enhancers* y promotores, hecho que a su vez correlaciona con la actividad de los *enhancers* (Lam *et al.*, 2014). Esta fuerte correlación entre los niveles de eRNAs y los parámetros que caracterizan a *enhancers* activos permite suponer que la generación de eRNAs es un marcador potente e independiente de la actividad de los *enhancers* (Hah *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2014; Kaikkonen *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013).

Los eRNAs se generan, en la mayoría de los casos, por transcripción divergente desde el centro de los *enhancers*, aunque también pueden generarse por transcripción en un único sentido (Lam *et al.*, 2014). Se caracterizan por estar CAPEados en su extremo 5', pero en general no se encuentran poliadenilados en su extremo 3' ni sufren *splicing*. Aquellos que se poliadenilan son, en general, los que se generan por transcripción en único sentido desde el centro de los *enhancers* (Lam *et al.*, 2014). En comparación con los mRNAs, los eRNAs poseen una vida media menor, aunque su frecuencia de iniciación parece ser similar (Andersson *et al.*, 2014b; Core *et al.*, 2014).

Hasta aquí, resulta evidente que los *enhancers* se asemejan mucho a los promotores (Core *et al.*, 2014). En este punto surge el problema de determinar qué hace que la transcripción productiva pueda ocurrir a partir de los promotores y no de los *enhancers*. En principio el CTD de la RNAPII enriquecida en los *enhancers* se caracteriza por no estar fosforilado en Ser2 (Lam *et al.*, 2014), una modificación del CTD típica de la elongación productiva. Estudios de secuencias de *enhancers* y promotores sugieren que la principal diferencia radica en la densidad relativa de sitios de corte y poliadenilación en relación a motivos de unión a complejos del spliceosoma río abajo de los TSSs: el proceso de *splicing* se asociaría a la estabilidad de los transcritos y a la elongación productiva (Almada *et al.*, 2013). El proceso de *splicing* el primer intrón de los pre-mRNAs se asocia con la deposición de las marcas de histonas típicas de promotores activos, H3K4me3 y H3K9ac (Bieberstein *et al.*, 2012), evidencia que apoya la hipótesis de que el *splicing* contribuiría a la elongación productiva y precesiva a lo largo de los genes. El hecho de que muchos *enhancers* intragénicos que regulan la actividad de genes distantes dan lugar a promotores alternativos del gen que los aloja (Kowalczyk *et al.*, 2012) parece estar de acuerdo con esta hipótesis.

Otra pregunta que surge a la hora de considerar a los eRNAs, es si estos cumplen una función *per se* en la activación transcripcional de los genes blanco o si la transcripción es necesaria para el mantenimiento de la cromatina abierta en las regiones regulatorias siendo

los eRNAs subproductos de este mecanismo. Una tercera posibilidad es que ni la transcripción ni los eRNAs cumplan funciones río abajo, que sean producto de la unión pervasiva de la RNAPII a las regiones de cromatina abierta (Lam *et al.*, 2014). Varios trabajos se han planteado esta pregunta (Li *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2013; Schaukowitch *et al.*, 2014). Experimentos en los que se separa al eRNA del proceso de transcripción mediante el bloqueo de los eRNAs con oligonucleótidos modificados y en los que se recluta eRNAs de forma artificial a elementos regulatorios, sugieren que los eRNAs *per se* son necesarios para la activación de los genes blanco, independientemente de su proceso de transcripción (Li *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2013). Estos sugieren, además, que estos son necesarios para la generación de los loops entre *enhancers* y promotores.

1.1.8 Regulación transcripcional por los receptores de hormonas esteroideas: el caso del receptor de estrógenos

Los receptores de hormonas esteroideas (SHRs) pertenecen a la familia de los receptores nucleares (NRs). Estos son TFs que se regulan por la unión a hormonas esteroideas. En vertebrados la familia de los SHRs está formada por seis miembros: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor de andrógenos (AR), el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR) (Moore *et al.*, 2006).

Dados los hallazgos que detallaremos más adelante, nuestra atención se centra en el ER. Dada la similitud de los mecanismos de funcionamiento de los distintos SHRs, también nos referiremos a ellos en este apartado.

La regulación transcripcional por receptores nucleares dependientes de ligando en general, y por aquellos activados por estrógenos en particular, sirve como modelo para el estudio de los mecanismo moleculares a través de los cuales los factores de transcripción específicos de linaje ejercen su función. La importancia de su estudio radica, además, en el hecho de que los estrógenos juegan un papel fundamental en el desarrollo de cáncer de mama, de ovario y de útero estimulando la proliferación celular no regulada (Leclercq, 2004). Los estrógenos son una clase de hormonas involucradas en una multiplicidad de aspectos de la fisiología humana, tanto femenina como masculina. Estos abarcan al desarrollo sexual, la reproducción y el metabolismo en hígado, tejido graso y hueso. Uno de los estrógenos predominantes es el 17 β -estradiol (E2), una hormona lipofílica que difunde libremente al interior de las células donde inicia eventos de señalización citoplasmáticos y nucleares que en última instancia desenacadenan cambios en la expresión génica (Hah y Kraus, 2014). En

humanos existen dos genes que codifican ERs, dando lugar a ER α y ER β (Hah y Kraus, 2014). Los sitios de unión al genoma de ambos receptores se superponen considerablemente, cosa explicada en parte por el 96% de identidad entre sus dominios de unión al DNA que reconocen a los mismos motivos o elementos de respuesta a estrógenos (EREs) (Klinge, 2001). ER α y ER β , sin embargo, presentan distintos patrones de expresión a lo largo de los diferentes tejidos y diferencias en la estructura de sus otros dominios de modo que sus funciones biológicas observables son distintas. Nos centramos en este trabajo en las funciones de ER α .

Actualmente se utiliza una multiplicidad de líneas celulares como modelo de estudio de tumores mamarios en general y para el estudio de la activación transcripcional mediada por ER en particular. Entre estas se hallan a MCF7 y a T47D. En la mayoría de los trabajos en los que se indagan mecanismos moleculares de la activación transcripcional mediada por ER α se utiliza a la línea celular tumoral de mama MCF7 como sistema modelo. Esta línea también expresa a PR y GR y no expresa ER β (Leclercq, 2004).

Varios modelos explican los mecanismos de acción de ER α en el citoplasma y en el núcleo de células humanas. Según estos, la señalización citoplasmática disparada por estrógenos es mediada por moléculas de ER α asociadas a la membrana citoplasmática que estimulan cascadas de señalización dependientes de kinasas que a su vez llevan a cambios en la localización y actividad de factores de transcripción (Hammes y Levin, 2011). La señalización nuclear mediada por estrógenos depende de un pool de ER α normalmente asociado a Hsp90 en el citoplasma aunque puede estar parcialmente asociado a estructuras nucleares. Cuando ER α se une a su ligando sufre cambios conformacionales que provocan su disociación de Hsp90 y dimerización. En este estado, puede translocar al núcleo y asociarse a regiones específicas del genoma (Renoir, 2012). Según el modelo directo clásico ER α se une en forma directa a regiones del genoma que contienen EREs (Klinge, 2001). Según el modelo indirecto, ER α se une al genoma a través de la unión de otros factores de transcripción como AP-1, Sp1 y NF- κ B (Carroll *et al.*, 2006; Heldring *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2011). De cualquiera de las dos formas, la unión de ER α a los *enhancers* promueve el reclutamiento de co-reguladores de la transcripción, de enzimas que promueven a deposición de marcas de histonas, remodeladores de la cromatina y factores involucrados en la formación de las interacciones de largo alcance.

El establecimiento del programa transcripcional disparado por E2 es muy rápido y transitorio (Hah *et al.*, 2011). Sorpresivamente, cerca del 25% del transcriptoma de MCF7 es alternado ante el estímulo hormonal. Luego de tan solo 10 minutos, 10% del transcriptoma sufre

cambios en niveles de expresión. Algunos transcritos son regulados positivamente mientras que otros lo son negativamente, casi en igual proporción. Se observó que la activación de la mayoría de los genes cuya transcripción es estimulada es muy transitoria. A las 4 h los niveles de transcripción bajan casi a los niveles basales. Al medir niveles de mRNAs en estado estacionario, en cambio, los picos de activación se observan desde las 4 h y hasta las 24 h, dependiendo del gen (Hah *et al.*, 2011).

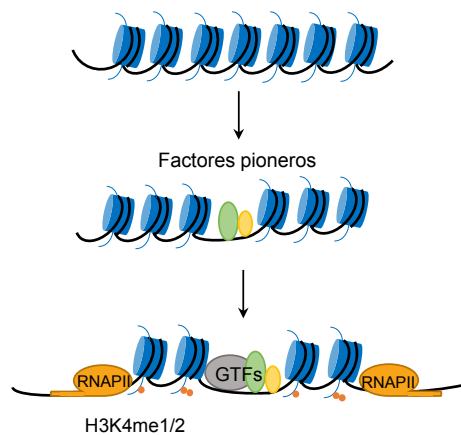
Según la sensibilidad de las técnicas utilizadas, se han detectado hasta 30000 eventos de unión de ER α al genoma de células mamarias tumorales (Li *et al.*, 2013). Existen sin embargo, cerca de un millón de EREs predichos, de los cuales más de 200000 son motivos de unión al DNA óptimos. Esto sugiere fuertemente que, de acuerdo con lo que venimos discutiendo, niveles adicionales de regulación determinan el conjunto de *enhancers* que en última instancia intervienen en el reprogramación transcripcional mediada por ER α (Zaret y Carroll, 2011).

Análisis de los sitios de unión de ER α al genoma de varias líneas celulares de origen tumoral mamario, y ante la presencia de E2, revelaron que este se une mayoritariamente a *enhancers* distales y que raramente se une a regiones proximales a promotores (Carroll *et al.*, 2005, 2006; Lin *et al.*, 2007; Welboren *et al.*, 2009). Estos y otros análisis revelaron, además, que la mayoría de los eventos de unión al genoma de ER α ocurre en sitios previamente marcados por factores pioneros de la transcripción (Hurtado *et al.*, 2011). Esto mismo se ha observado en el caso de otros SHR como GR: el 95% de sus sitios de unión al genoma ocurre en regiones previamente identificadas como accesibles del genoma y la información de la unión de GR tipo celular específica ya está contenida en estas regiones, antes del estímulo hormonal (John *et al.*, 2011) (**Figura I7.A**).

Se ha identificado a FOXA1 como uno de los factores pioneros de la transcripción responsable del marcado de los *enhancers* cuya activación es disparada por la unión de ER α (Carroll *et al.*, 2005; Hurtado *et al.*, 2011). FOXA1 se une a estos *enhancers* de forma independiente de ER α y es responsable del manteniendo estructuras de cromatina abierta aún antes del estímulo hormonal (Hurtado *et al.*, 2011). Su sobreexpresión junto con la de ER α en células ER negativas es suficiente para reproducir, al menos parcialmente, el patrón de unión de ER α al genoma observado en células ER positivas (Hurtado *et al.*, 2011). Este factor sería en parte responsable, además, de la unión tipo célula específica de ER α . Los perfiles de unión al genoma de FOXA1 en distintas líneas celulares mamarias son parcialmente distintos y reflejan la posterior unión de ER α tipo celular específico (Hurtado *et al.*, 2011). Los niveles de H3K4me1 sobre estos *enhancers* son altos antes del tratamiento

con E2, después del cual estos permanecen invariables. Los de H3K27ac, en cambio, sufren un aumento luego del estímulo con E2, en concordancia con el aumento del reclutamiento de p300 (Hah *et al.*, 2013). El reclutamiento de la RNAPII a los *enhancers* antes de su activación con la hormona parece depender del *enhancer* en cuestión (Hah *et al.*, 2013; Welboren *et al.*, 2009). En muchos casos no se observan cambios en los niveles de RNAPII en los *enhancers* mientras que en otros se observa un pequeño cambio que es revertido al corto tiempo luego del estímulo con E2, aunque los niveles de unión de ER α continúen siendo altos (Hah *et al.*, 2013). De cualquier manera, los niveles de RNAPII en los *enhancers* no parece ser un buen marcador de su actividad.

A Marcado de los *enhancers*



B Activación de *enhancers* dependientes de ER α

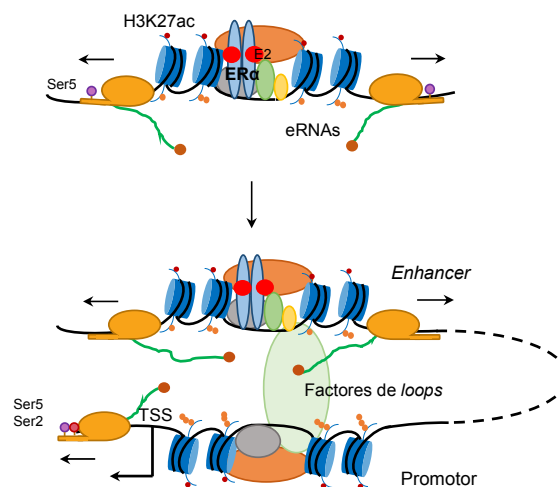


Figura I7. Modelo de marcado y activación de *enhancers* dependientes de ER α . **A.** La unión de factores pioneros de la transcripción lleva al remodelado de la cromatina, al aumento de la accesibilidad del DNA, a la mono y di-metilación de H3K4 y al ensamblado de la maquinaria basal de transcripción. **B.** Ante el estímulo hormonal, ER α se une los *enhancers* y recluta co-activadores. Esto resulta en un aumento en la acetilación de histonas y en la activación transcripcional de los *enhancers*. La interacción entre los promotores y los *enhancers* se estabiliza y se activa la transcripción. Adaptado de Lam *et al.* (2014).

El hecho de que ER α se una preferentemente a regiones regulatorias distales, sugiere la importancia de la generación de interacciones de largo alcance entre éstas y promotores en la regulación de la transcripción disparada por E2. Análisis de las interacciones en las que interviene ER α , reveladas por *Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing*

(ChIA-PET, una técnica que se desprende de la de Captura de la Conformación de la Cromatina (3C) utilizada para *loci* únicos), muestra que, efectivamente, los sitios de unión de ER α que están involucrados en interacciones complejas con otros sitios y con promotores, presentan mayores niveles de enriquecimiento de RNAPII y de FOXA1 (Fullwood *et al.*, 2009). Se han identificado al complejo de cohesina y al complejo Mediador como partes responsables de la interacción entre *enhancers* dependientes SHRs y promotores (Faure *et al.*, 2012; Kagey *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2012). Cohesina es un componente estructural fundamental en la formación de los loops mientras que Mediador es un co-activador que funciona como puente entre los TFs que ocupan *enhancers* y la maquinaria transcripcional unida a los promotores (Allen y Taatjes, 2015; Kagey *et al.*, 2010) **(Figura I7.B)**..

Sorprendentemente, y a pesar de que la respuesta transcripcional es muy rápida, la interacción entre promotores y *enhancers* dependientes de ER α aumenta ante el estímulo hormonal (Fullwood *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Análisis de interacciones a nivel de genoma completo, que permiten ver su organización en TADs, en células tratadas con un progestágeno (ligando de PR) muestran que mientras que los límites entre TADs son relativamente estáticos, dentro de algunos TADs cierta reorganización de las interacciones es observable. Dicha reorganización correlaciona con cambios en la actividad transcripcional de genes dentro de los TADs, que parecen comportarse como una unidad en cuanto a la respuesta transcripcional frente al estímulo (Pohl *et al.*, 2014).

La generación de eRNAs de forma E2-dependiente parece ser un potente marcador para el mapeo de los *enhancers* activos (Hah *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Estos correlacionan positivamente con la unión de ER α , de RNAPII, de FOXA1, de otros TFs que colaboran con ER, con los niveles de H3K4me1 y con la formación de loops entre *enhancers* y promotores (Hah *et al.*, 2013). Interesantemente, la evidencia sugiere que los eRNAs estarían involucrados en la estabilización de estos loops actuando como andamiaje para el complejo de cohesina (Li *et al.*, 2013) (Figura I7B).

Vale aclarar en este punto que los estudios en los que se mapean *enhancers* de ER α utilizan datos de unión ER α , de deposición de marcas de histonas, de TFs, de co-activadores, de RNAPII, etc., generados en su mayoría a tiempos relativamente cortos de estímulo hormonal (1 h en general). Los *enhancers* que así se han identificado se caracterizan por haber sido marcados antes del estímulo hormonal, es decir que no se generan *de novo*. En este contexto no se ha analizado la existencia, relevancia,

mecanismos y marcadores moleculares de *enhancers* dependientes de ER α generados *de novo*.

1. 2. El *splicing* alternativo y su regulación

1.2.1 El *splicing* alternativo

En el proceso de *splicing* alternativo moléculas de pre-mRNA son procesados de diferentes maneras generando múltiples isoformas de mRNA a partir de un único gen. Su importancia radica en que en parte explica la expansión del transcriptoma y del proteoma y la complejidad fenotípica observado en eucariotas superiores (Keren *et al.*, 2010; Nilsen y Graveley, 2010). Se estima que más del 90% de los genes humanos sufren algún evento de *splicing* alternativo (Pan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), siendo cerca del 60% de los eventos de *splicing* alternativo regulados entre tejidos (Wang *et al.*, 2008).

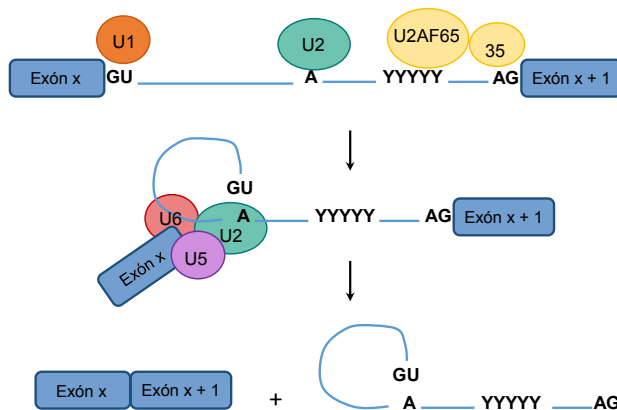


Figura 18. La reacción de *splicing*. El esquema muestra dos exones (cajas azules) flanqueando a un intrón en el que se detallan las secuencias consenso de los sitios 3' y 5' de *splicing* y el sitio de ramificación. Se muestra el ensamblado secuencial de spliceosoma con los distintos factores que participan en el reconocimiento de las secuencias consenso. Los productos de la reacción son los exones empalmados y el intrón que forma una estructura de lazo

El spliceosoma es el complejo ribonucleoproteico responsable de la catálisis del *splicing*. Este se ensambla de forma secuencial sobre cada intrón de los pre-mRNAs. El sitio 5' dador de *splicing* (5'ss), el sitio 3' aceptor de *splicing* (3'ss), y el sitio de ramificación (BPS), presentes en todos los intrones, constituyen los sitios basales de *splicing* (Wahl *et al.*, 2009; Wang y Burge, 2008) (**Figura 18**). Los consensos de estos elementos, sin embargo, presentan un nivel de conservación que no puede explicar del todo el reconocimiento de todos los intrones de un dado organismo. Su reconocimiento depende de factores de *splicing* adicionales que se unen a elementos regulatorios del *splicing* presentes en el pre-

mRNA. Estos factores pueden intervenir tanto en el *splicing* constitutivo como en el alternativo y pueden actuar de forma positiva como negativa (Wahl *et al.*, 2009; Wang y Burge, 2008). La regulación del *splicing* dependerá entonces tanto de elementos regulatorios presentes en el pre-mRNA como de los factores de *splicing* que se expresen en un dado contexto. Un desafío adicional surge al tratar de entender el reconocimiento de los límites intrón-exón en eucariotas superiores: los exones tienen un promedio de 150 nt mientras que los intrones pueden ser muy largos y no parecen tener ninguna restricción en cuanto a su longitud (Beckmann y Trifonov, 1991). En concordancia con esto, se ha observado que en estos organismos se favorece el mecanismo de definición exónica en la que la formación inicial del spliceosoma ocurre a través de los exones (Berget, 1995; Fox-Walsh *et al.*, 2005) (**Figura I10**).

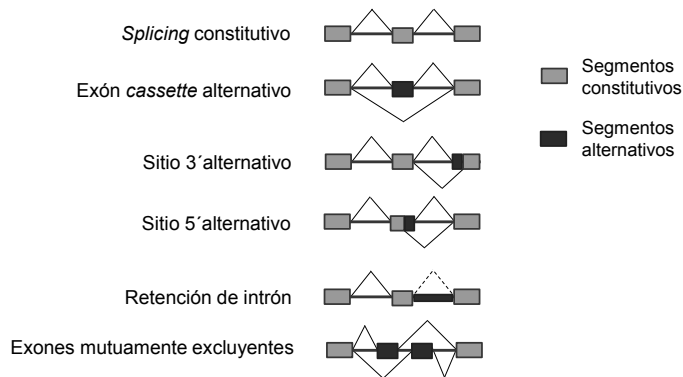


Figura I9. Distintos tipos de eventos de *splicing* alternativo. Se muestran los distintos tipos, indicando en todos los casos un esquema del pre-mRNA. Tomado de Srebrow y Kornblihtt (2006).

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

o dadores alternativos, exones mutuamente excluyentes o intrones retenidos (Srebrow y Kornblihtt, 2006) (**Figura I9**).

Al considerar al *splicing* alternativo, el uso de sitios débiles de *splicing* dependerá del balance de la acción de factores negativos y positivos. De acuerdo a su acción y a su localización en el pre-mRNA, los elementos regulatorios del *splicing* pueden clasificarse en *enhancers* exónicos del *splicing* (ESEs), inhibidores exónicos del *splicing* (ESSs), *enhancers* intrónicos del *splicing* (ISEs) e inhibidores intrónicos del *splicing* (ISSs) (Wang y Burge, 2008). La mayoría de los ESEs reclutan proteínas ricas en serina y arginina (SRs) que estabilizan al complejo de definición intrónica mientras que la mayoría de los ISEs unen hnRNPs que actúan negativamente sobre el reconocimiento de exones (Wang y Burge, 2008) (**Figura I10**). Un análisis exhaustivo de motivos de unión de factores de *splicing* y motivos estructurales (largo de exones, intrones, formación de estructura secundaria, etc) en combinación con su posición relativa con respecto a eventos de *splicing* alternativo reveló que estas combinaciones pueden dar cuenta de una gran proporción de la regulación del *splicing* alternativo tejido-específica, al menos del sentido del cambio de eventos de *splicing* al comparar tejidos de a pares (Barash *et al.*, 2010).

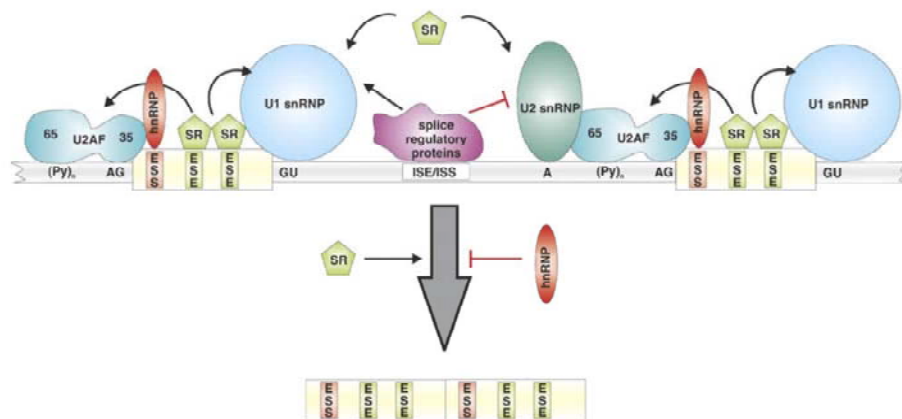


Figura I10. Definición exónica, intrónica y factores involucrados. En la definición exónica el reconocimiento del exón ocurre por la interacción de proteínas y ribonucleoproteínas en los sitios 5' de *splicing* y 3' de *splicing* a ambos lados del exón. En contraposición, la definición intrónica se da por el reconocimiento de los sitios de *splicing* en un intrón. El reclutamiento de factores es influenciado por proteínas activadoras (proteínas SRs) o inhibitoras (proteínas hnRNPs) las cuales se unen a secuencias presentes en el pre-mRNA como ESEs y ESSs así como a ISEs y ISSs. Tomado de Schwerk y Schulze-Osthoff (2005).

Para tener un mayor entendimiento a cerca de la regulación del *splicing* alternativo hay que considerar que el *splicing* es un proceso co-transcripcional. En este contexto, hay que

entender la regulación del *splicing* alternativo en función de su interacción con el proceso de la transcripción.

1.2.2 La co-transcripcionalidad en la regulación del *splicing* alternativo

Hace más de 20 años la visualización de transcritos nacientes de embriones de *Drosophila* por microscopía electrónica reveló que el *splicing* es co-transcripcional (Beyer y Osheim, 1988). Desde entonces, varios abordajes experimentales reforzaron esta idea. El análisis del RNA naciente, asociado a la cromatina muestra que los intrones son escindidos eficientemente mientras el RNA está aún asociado a la cromatina (Pandya-Jones y Black, 2009; Tilgner *et al.*, 2012). Según un trabajo más reciente, tomando a la levadura como sistema modelo, el *splicing* comienza apenas la RNAPII termina la transcripción del intrón, cuando la RNAPII se encuentra 30 nt río abajo (**Figura I11**). Los procesos ocurren coordinadamente y sus cinéticas son comparables. Cuando la transcripción es llevada a cabo por una RNAPII constitutivamente más rápida el *splicing* es, de hecho, el paso limitante en la generación de mRNAs (Carrillo Oesterreich *et al.*, 2016).

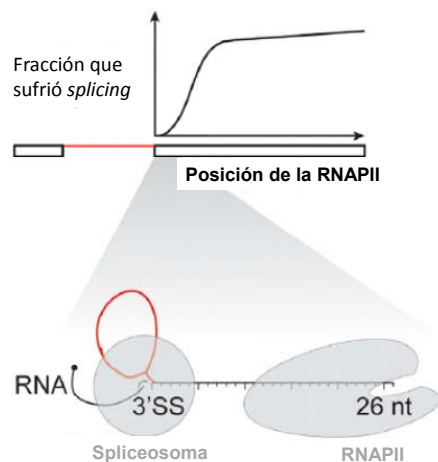


Figura I11. Modelo espacio-temporal del *splicing* co-transcripcional. Esquema que muestra que 15 nt del RNA naciente es protegido por la RNAPII. La reacción de *splicing* comienza 26-27 nt río abajo del extremo 3' del RNA naciente. En rojo se muestra el intrón y en negro los exones. Tomado de Carrillo Oesterreich *et al.* (2016).

Dos etapas dentro del proceso de *splicing* deben distinguirse en este punto: el reclutamiento de los complejos spliceosomales al pre-mRNA y la catálisis del *splicing* en sí mismo. Mientras la catálisis puede ser tanto co- como post-transcripcional, siendo la prevalencia dependiente del organismo (Beyer and Osheim, 1988; Tardiff *et al.*, 2006), el reclutamiento de los complejos spliceosomales es casi siempre co-transcripcional en todos los organismos estudiados (Görnemann *et al.*, 2005; Listerman *et al.*, 2006). Decimos que el reclutamiento de los complejos spliceosomales al pre-mRNA implica el compromiso al *splicing*.

La co-transcripcionalidad del *splicing* permite el acoplamiento funcional entre el *splicing* y la transcripción, es decir, que características de uno, como el reclutamiento de factores y la cinética, influencia las del otro de una forma bidireccional (Kornblihtt *et al.*, 2004; Moore y Proudfoot, 2009; Perales y Bentley, 2009)

Dos modelos no excluyentes explican el acoplamiento funcional entre la transcripción y la regulación del *splicing* alternativo (Kornblihtt *et al.*, 2013):

- **El modelo de reclutamiento:** la maquinaria transcripcional podría reclutar factores de *splicing* o co-activadores transcripcionales con funciones regulatorias del *splicing* al mRNA naciente. Este reclutamiento podría darse en forma diferencial en distintos contextos celulares, dando así lugar a diferentes resultados de los eventos de *splicing*. El CTD de la RNAPII cumpliría un rol fundamental en este modelo, ya que se ha descrito que éste puede reclutar factores de *splicing* a los sitios de transcripción en una forma dependiente del patrón de fosforilación de sus residuos (de la Mata and Kornblihtt, 2006; Muñoz *et al.*, 2010). La regulación del *splicing* alternativo también puede depender del reclutamiento de factores de *splicing* y de transcripción a los promotores (Auboeuf *et al.*, 2002, 2004, Cramer *et al.*, 1997, 1999; Huang *et al.*, 2012). El co-activador transcripcional Mediador, por ejemplo, interactúa con el factor de *splicing* hnRNPL, y por lo tanto su reclutamiento a promotores regula eventos de *splicing* dependientes de hnRNPL (Huang *et al.*, 2012). Para nuestro particular interés, el patrón de *splicing* alternativo de construcciones bajo el control de promotores dependientes de receptores nucleares (PR y ER en particular) depende de la inducción hormonal (Auboeuf *et al.*, 2002, 2004).

- **El modelo cinético:** la velocidad de elongación de la polimerasa afectaría el momento en el cual los sitios constitutivos y regulatorios del *splicing* son presentados, favoreciendo o desfavoreciendo su reconocimiento por los factores que las unen. Secuencias que inducen el pausado de la RNAPII, tratamiento con drogas que inhiben su elongación por diferentes mecanismos, co-activadores que inducen una mayor elongación favorecen la inclusión de varios exones *cassette* alternativos (Ip *et al.*, 2011; Kadener *et al.*, 2001). La evidencia directa del rol de la tasa de elongación de la RNAPII en la regulación del *splicing* alternativo viene de experimentos que muestran que cuando la transcripción es llevada a cabo por una RNAPII mutante constitutivamente lenta, la inclusión de algunos exones *cassette* alternativos aumenta (Ip *et al.*, 2011; de la Mata *et al.*, 2003). En un contexto más fisiológico, el daño al DNA causado por luz UV resulta en cambios en patrones de *splicing* alternativo por inhibición de la elongación de la RNAPII causada por la fosforilación del CTD (Muñoz *et al.*, 2009). El modelo cinético postula que la tasa de elongación de la RNAPII crea ventanas

de oportunidad en las que puede generarse o no la competencia entre sitios débiles y fuertes de *splicing*. Si se considera que la transcripción y el *splicing* son procesos muy coordinados en el que los intrones son escindidos apenas se transcriben (Carrillo Oesterreich *et al.*, 2016), estas ventanas de oportunidad podrían crearse de forma dependiente de la elongación de la RNAPII. El modelo cinético puede resumirse de la siguiente manera: una baja tasa de elongación de la RNAPII favorece el reclutamiento de factores de *splicing* a sitios débiles antes de que los sitios fuertes río abajo sean transcriptos (Kornbliht *et al.*, 2013). Una baja tasa de elongación también puede favorecer una disminución en la inclusión de exones alternativos que son regulados por la unión de factores negativos a intrones río arriba (Dujardin *et al.*, 2014).

La transcripción también puede ser influenciada por el *splicing* (Bieberstein *et al.*, 2012; Fong y Zhou, 2001; Lin *et al.*, 2008). Como dijimos arriba, el *splicing* (constitutivo) del primer intrón puede afectar la ocupación de los promotores y la deposición de marcas de histonas características de promotores activos (Bieberstein *et al.*, 2012). En levaduras, en las que los genes que tienen intrones tienen un único intrón, la RNAPII se pausa en el exón terminal de forma dependiente del *splicing* (Alexander *et al.*, 2010; Carrillo Oesterreich *et al.*, 2010). El reclutamiento al RNA naciente de la proteína SR SRSF2 (SC35), por otro lado, afecta la tasa elongación de la RNAPII (Lin *et al.*, 2008).

1.2.3 La estructura de la cromatina en la regulación del *splicing* alternativo

La estructura de la cromatina impacta fuertemente sobre la transcripción y, por lo tanto, sobre el *splicing* y la regulación del *splicing* alternativo.

Análisis correlativos de enriquecimiento de nucleosomas en función de la arquitectura de genes reveló que el posicionamiento de nucleosomas es mayor en exones en comparación con intrones tanto en humanos como en *C. elegans* y en *D. melanogaster* (Andersson *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 2009; Spies *et al.*, 2009; Tilgner *et al.*, 2009). Comparaciones entre el nivel de posicionamiento entre exones y pseudoexones sugiere, además, una correlación positiva entre la presencia de nucleosomas y el reconocimiento de exones. Dado que en eucariotas superiores la longitud promedio de los exones es de 140-150 pb rodeados de intrones largos de longitud variable (Beckmann y Trifonov, 1991; Hawkins, 1988) y dado que la longitud de los segmentos de DNA que rodean a los nucleosomas es de 147 pb puede especularse a cerca de restricciones evolutivas sobre la longitud de los exones para favorecer su reconocimiento (Kornbliht *et al.*, 2009). Los nucleosomas imponen un límite a la tasa de elongación de la RNAPII (Hodges *et al.*, 2009; Petesch y Lis, 2012b), de modo

que se puede hipotetizar que los nucleosomas sobre exones favorecen un retraso en la tasa de elongación de la RNAPII y, por lo tanto, una mayor coordinación espacio-temporal entre las maquinarias de *splicing* y de la transcripción. El posicionamiento de nucleosomas también podría reforzar el reconocimiento de sitios débiles de *splicing* (Andersson *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 2009; Spies *et al.*, 2009; Tilgner *et al.*, 2009).

La estructura de la cromatina puede afectar la tasa de elongación de la RNAPII a lo largo de los genes y, por lo tanto, los patrones de *splicing* alternativo resultantes. La primera evidencia de esto surgió en nuestro laboratorio hace 15 años. Este trabajo reveló que cuando plásmidos conteniendo minigenes reporteros de *splicing* adquieren una estructura cromatínica que se asemeja más a la endógena (al permitir su replicación), se favorece la inclusión de los exones alternativos (Kadener *et al.*, 2001). Este efecto es revertido, además, por el tratamiento con Tricostatina A (TSA), un inhibidor de deacetilasas de histonas que favorece la relajación de la estructura de la cromatina (Nogués *et al.*, 2002; Kadener *et al.*, 2001).

En un contexto más fisiológico, se demostró en células neuronales murinas que cambios inducidos por la despolarización en los niveles de acetilación de histonas en regiones intragénicas del gen de *NCAM* favorecen la exclusión del exón *cassette* alternativo 18 (Schor *et al.*, 2009). Este efecto se explica por un aumento en la tasa de elongación de la RNAPII en las regiones intergénicas alrededor del exón 18, dado por el aumento en los niveles de H3K9ac (Schor *et al.*, 2009) (**Figura I12**). Ante la diferenciación desde precursores neuronales a neuronas murinas, los niveles de inclusión del exón alternativo 18 de *NCAM* también son alterados por cambios en la estructura de la cromatina en las regiones intragénicas: durante el proceso de diferenciación aumentan los niveles de H3K9me2 intragénicos, baja la tasa de elongación de la RNAPII y aumentan los niveles de inclusión del exón 18 (Schor *et al.*, 2013) (**Figura I12**).

La cromatina es una gran plataforma para el reclutamiento de proteínas a través de las histonas y sus modificaciones. La naturaleza de la co-transcripcionalidad del *splicing* permite que esto también sea válido para el reclutamiento de componentes del spliceosoma y de factores de transcripción. Varios ejemplos ilustran esto: el remodelador de cromatina ATP dependiente SWI/SNF interacciona con snRNPs y con la hnRNP Sam68 cuando se encuentra unido a la cromatina favoreciendo la inclusión de los exones variables de CD44 (Batsché *et al.*, 2006); el factor de unión a H3K4me3 CHD1 interactúa con la subunidad SF3A1 del U2 snRNPs contribuyendo a una alta eficiencia del *splicing* co-transcripcional (Sims *et al.*, 2007); el regulador negativo del *splicing* PTB se asocia a H3K36me3 a través

de la proteína adaptadora MRG15 y los niveles de esta marca explican parcialmente las diferencias en la exclusión de exones dependiente de PTB observadas entre tipos celulares (Luco *et al.*, 2010).

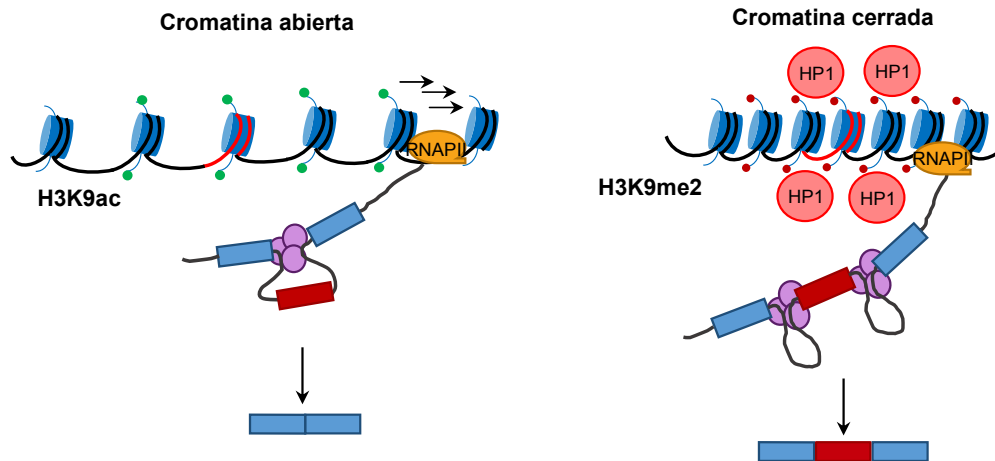


Figura I12. Modelos de regulación del *splicing* alternativo por la estructura de la cromatina y la tasa de elongación de la RNAPII. En el primer panel se muestra que la acetilación de histonas intragénica induce la relajación de la cromatina favoreciendo una alta tasa de elongación de la RNAPII que favorece a su vez la exclusión del exón alternativo. En el segundo panel se muestra que un aumento en H3K9me2 a nivel intragénico induce la compactación de la cromatina por reclutamiento de HP1, favoreciendo una reducción en la tasa de elongación de la RNAPII que favorece a su vez la inclusión del exón alternativo.

La evidencia acumulada en los últimos años sugiere fuertemente que para entender la regulación del *splicing* alternativo específico de tipo celular además de la información contenida en el pre-mRNA, en la forma de elementos de unión a factores de *splicing*, y de expresión de los factores de *splicing*, hay que incluir la información contenida en la cromatina.

1. 3. Las proteínas argonauta en la regulación de la transcripción y el *splicing* alternativo

Las proteínas argonauta (AGOs) están bien caracterizadas por ser las efectoras del **silenciamiento post-transcripcional (PTGS)** por *post transcriptional gene silencing* mediado por **RNAs pequeños de interferencia (RNAi)**. Este es un proceso que se encuentra conservado y extendido en los eucariotas (Cenik y Zamore, 2011; Joshua-Tor y Hannon, 2011; Swarts *et al.*, 2014). Brevemente, AGOs unidos a RNAs pequeños de 21-25 nt, (**siRNAs** por *small interfering RNAs*) conforman al complejo de silenciamiento post-

transcripcional RISC (por *RNA-induced silencing complex*) que por interacciones RNA-RNA se une a los mRNAs blanco de forma muy específica (Meister, 2013). Esta unión desencadena la inhibición de la traducción de los mRNAs blanco por tres mecanismos distintos: AGO puede cortar al mRNA blanco en el sitio en el que se produce la unión con el RNAi (Meister *et al.*, 2004); AGO puede inhibir reversible o irreversiblemente la traducción del mRNA blanco por interacción con represores traduccionales, lo que a la larga puede llevar a la degradación del mRNA; AGO puede inducir la degradación del mRNA transportándolos a *P-bodies*, donde ocurre el reciclado de mRNAs (Jonas y Izaurralde, 2015; Meister *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005). Se ha especulado acerca de si el grado de complementariedad de bases entre el RNAi y el mRNA es responsable de que se desencadene un mecanismo u otro: se ha observado que si la complementariedad es perfecta se induce el corte del mRNA mientras que si la unión se da con algunas bases desapareadas se dispara el mecanismo de degradación alternativo o inhibición de la traducción (Ipsaro y Joshua-Tor, 2015; Martinez *et al.*, 2002). En el caso de mamíferos lo cierto es que no todas las proteínas AGO tienen actividad endonucleasa capaz de cortar mRNAs (Meister *et al.*, 2004) y la unión de los RNAs pequeños con sus blancos se da en general con bases desapareadas (Ipsaro y Joshua-Tor, 2015). Esto quiere decir que en estos organismos lo que ocurre generalmente es la inhibición de la traducción e inducción de la degradación de los mRNA (Jonas y Izaurralde, 2015).

El hallazgo de este mecanismo de silenciamiento génico permitió el desarrollo de una técnica hoy ampliamente difundida en biología molecular que permite silenciar genes, al menos de forma parcial, de manera muy específica, transitoria y que no requiere de manipulación genética (Elbashir *et al.*, 2001). De alguna manera, y dependiendo del sistema experimental, se introducen en el interior de células siRNAs doble cadena de 21-25 nt de secuencia perfectamente complementaria a alguna región del mRNA que se quiere silenciar sintetizados *in vitro*. La hebra guía se carga en el complejo de silenciamiento RISC e induce el clivaje del mRNA del gen que se quiere silenciar.

1.3.1 Las proteínas argonauta

Las proteínas argonauta son las proteínas clave en todos los mecanismos de silenciamiento génico guiados por RNAs pequeños identificados hasta ahora (Meister, 2013). Estas unen directamente a los RNAs pequeños.

La familia de proteínas argonauta se encuentra en todos los organismos eucariotas así como en algunas bacterias y arqueas (Meister, 2013). En eucariotas, ésta puede separarse

en tres clados según el grado de identidad de secuencia entre las proteínas de distintas especies: el clado AGO abarca a las proteínas similares a AGO1 de *A. thaliana*; el clado PIWI abarca aquellas similares a Piwi de *D. melanogaster*; el tercer clado, conocido como WAGO, evolucionó en *C. elegans* exclusivamente y es igualmente distante con las AGOs que con las PIWI (Meister, 2013; Cenik and Zamore, 2011; Joshua-Tor and Hannon, 2011; Swarts *et al.*, 2014)

El número de proteínas de cada clado es muy variable, variabilidad que se mantiene en animales. En la levadura de fisión *Schyzosaccaromyces pombe*, por ejemplo, existe una única proteína AGO; en *A. thaliana* se han identificado 10 AGOs; en *D. melanogaster* se han identificado 5 miembros en la familia, 2 AGOs y 3 PIWI; en *C. elegans* se han identificado 27 genes que codifican proteínas que incluyen a miembros de los tres clados; en humanos, las proteínas argonauta son una familia de 8 miembros que se dividen en 4 AGOs (AGO1-4) y 4 PIWIs (PIWI1-4). En animales, las PIWI se expresan únicamente en la línea germinal y son responsables del silenciamiento de transposones. Las AGOs, en cambio, son de expresión ubicua y, como veremos, son responsables de una multiplicidad de mecanismos de silenciamiento génico (Ender y Meister, 2010).

Las proteínas de la familia argonauta se caracterizan por tener dos dominios característicos: PAZ (por piwi-argonauta-zwille) y PIWI. El dominio PAZ, común a DICER, forma el bolsillo de unión al extremo 3' del siRNA. El dominio PIWI se asemeja estructuralmente a la RNasa H bacteriana y es, de hecho, el dominio con actividad endonucleasa. En el caso de mamíferos, solo AGO2 presenta esta actividad, aunque todas presentan este dominio (Ender y Meister, 2010).

1.3.2 Biogénesis de los RNAs pequeños de interferencia

Los RNAs pequeños cargados en las proteínas argonauta pueden tener distintos orígenes, pero en todos los casos vienen del procesamiento de **RNAs de doble cadena (dsRNA)**. Estos pueden tener su origen en RNA viral, en la transcripción de transposones, en la transcripción sentido y antisentido y en la transcripción de genes no codificantes que dan lugar a horquillas de RNA que son procesados por endonucleasas específicas dando lugar a los dsRNA (Ender y Meister, 2010). Estos últimos son la forma predominante de generación de dsRNA en mamíferos y su procesamiento da lugar a los conocidos **micro RNAs (miRNAs)** (Peters y Meister, 2007). Los miRNAs son transcritos como precursores que son primeramente procesados por la RNasa III llamada Drosha en el núcleo dando lugar al pre-miRNAs con estructura de horquilla. Estos son exportados al citoplasma donde son

procesados por otra RNasa III conocida como Dicer. Tanto en el caso de la actividad de por Drosha como de la de Dicer, los determinantes del correcto procesamiento son estructurales, están dados por la estructura secundaria de los RNAs. Dicer genera dsRNA de 21-25 nt cuyas hebras son separadas en guía y pasajera. La hebra guía, se une a una AGO mientras que la pasajera es degradada (Peters y Meister, 2007). Los siRNAs son producto del procesamiento por Dicer de dsRNAs largos en los de 21-25 nt (Ender y Meister, 2010).

1.3.3 Las proteínas argonauta y sus funciones nucleares en distintas especies eucariotas

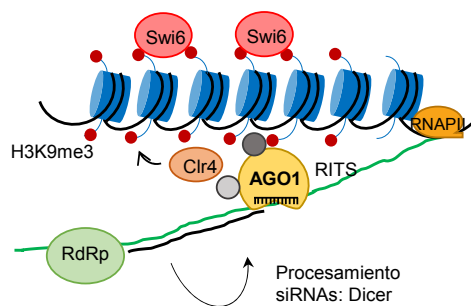
Como dijimos, las proteínas argonauta se encuentran evolutivamente muy conservadas (Joshua-Tor y Hannon, 2011). Sus funciones, sin embargo, son muy variables a lo largo de los organismos eucariotas estudiados. Si bien los mecanismos de PTGS son los mejor caracterizados, estos no son los únicos que estas proteínas llevan a cabo en las distintas especies estudiadas. Esto quedará más claro al analizar las funciones de las proteínas argonauta en las especies modelo *S. pombe*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y humanos. Dado que en esta tesis nos interesamos en los roles nucleares de las proteínas argonauta, nos detendremos particularmente en éstos.

En la levadura *S. pombe* existe una única AGO que lleva a cabo funciones bastante distintivas con respecto a las que se observan en animales. En esta especie, de hecho, no se ha descrito un mecanismo como el de PTGS (Martienssen y Moazed, 2015). En *S. pombe* siRNAs se asocian a la única AGO para formar el complejo RITS (por *RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*) responsable del **silenciamiento transcripcional (TGS por transcriptional gene silencing)** de las regiones pericentroméricas (Verdel *et al.*, 2004). Este complejo guía a metiltransferasas a las regiones pericentroméricas donde ocurre la metilación de H3K9 favoreciendo el establecimiento de regiones de heterocromatina que permanecen silenciadas (Bühler *et al.*, 2006). Este efecto depende de las interacciones RNA-RNA entre los siRNAs y los transcritos nacientes de las regiones pericentroméricas (Holoch y Moazed, 2015a). Los siRNAs son generados a partir los transcritos de las regiones pericentroméricas que son copiados por una RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRp) dando lugar a los dsRNAs que luego son procesados por Dicer (Holoch y Moazed, 2015b) (**Figura I13.A**).

En *A. thaliana* la familia de proteínas argonauta se encuentra muy diversificada, identificándose AGOs específicas de plantas (Joshua-Tor y Hannon, 2011). Esta diversidad

se refleja en el desarrollo de mecanismos de silenciamiento distintivos que también se apoyan en la duplicación de genes que codifican para proteínas tipo Dicer y en la existencia de RdRps que generan dsRNAs a partir de RNA simple cadena (Borges y Martienssen, 2015). Las funciones de AGOs de plantas incluyen al PTGS, cuyos efectores son AGOs unidos a miRNAs que actúan por inhibición de la traducción o por clivaje de los mRNAs. El corte de los mRNAs dispara la producción de siRNAs secundarios por RdRPs reforzando el silenciamiento. La mayoría de los RNA pequeños de plantas, sin embargo, están involucrados en TGS y en la metilación del DNA dependiente de RNA (RdDM por sus siglas en inglés). En este proceso, transcritos de RNAPII o RNAPIV son procesados por RdRP y Dicer en siRNAs de 24 nt que son incorporados, en el citoplasma, a un complejo que incluye AGOs específicas. Este es importado al núcleo donde por interacciones RNA-RNA con el RNA naciente del mismo locus del cual se originó el siRNA recluta DNA metiltransferasas estableciendo metilación de DNA *de novo* (Borges y Martienssen, 2015).

A *S. pombe*



B *C. elegans*

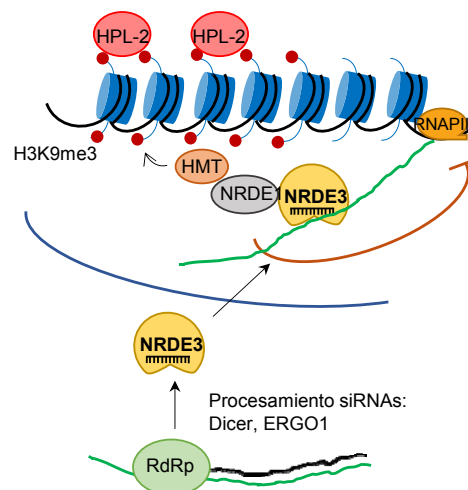


Figura 113. TGS en eucariotas. A. Formación de heterocromatina RNAi-dependiente en regiones pericentroméricas de *S. pombe*. AGO1 es reclutado a estas regiones por interacción entre el RNA naciente y el siRNA. Allí recluta a Ctr4 que trimetila a H3K9 induciendo el reclutamiento de Swi6 y la formación de heterocromatina. Los siRNAs vienen del procesamiento de dsRNAs generados a partir del RNA naciente por RdRPs. Adaptado de Allshire y Ekwall (2015). **B.** Formación de heterocromatina a en loci específicos en *C. elegans*. El mecanismo es muy similar al anterior. Se diferencia en que los la proteína argonauta NRDE3 se carga con los siRNAs en el citoplasma, donde estos son procesados, y luego se transloca al núcleo. Adaptado de Guérin *et al.* (2014).

En el nematode *C. elegans* fue donde primero se caracterizó el mecanismo de PTGS (Fire *et al.*, 1998), un descubrimiento que les valió el Premio Nobel a Andrew Fire y a Craig Mello. En esta especie también se expresan RdRPs, responsables de la biogénesis de siRNAs secundarios a partir de los mRNAs blanco de miRNAs cargados en las proteínas argonauta RDE-1. Los siRNAs secundarios son cargados en otras proteínas argonauta, reforzando el silenciamiento de los mRNAs que los originaron (Tsai *et al.*, 2015). En *C. elegans*, al igual que lo observado en la levadura *S. pombe*, ocurre TGS mediado por RNAi. Este proceso depende de la generación de siRNAs secundarios por la RdPp. Estos se unen a otra proteína argonauta, NRDE-3, que entonces se transloca al núcleo. Curiosamente, y a diferencia de otras, NRDE-3 contiene una señal de localización nuclear (NLS). En el núcleo, el complejo NRDE-3/siRNAs se une a transcritos nacientes complementarios y promueve la deposición de H3K9me3 por reclutamiento de metil transferasa de histonas (HMTs) (Gu *et al.*, 2012; Guang *et al.*, 2010) (**Figura 113.B**). Se destaca del mecanismo de TGS de *C. elegans* el hecho de que es heredable transgeneracionalmente. En experimentos en los que se administró siRNAs exógenos a gusanos se observó que la metilación de H3K9 inducida por la maquinaria nuclear de RNAi se mantiene en sucesivas generaciones (Guérin *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2012).

En *D. melanogaster* se expresan dos proteínas AGO que cargan a los RNAs pequeños de acuerdo al grado de complementariedad entre las cadenas: AGO1 se une a los miRNA, mientras que AGO2 se une a los siRNAs que provienen del procesamiento de dsRNA perfectamente apareados (Tomari *et al.*, 2007). Si bien ha quedado demostrado que en la línea germinal las tres PIWI de *D. melanogaster* están involucradas en el silenciamiento de transposones a nivel transcripcional por la inducción de la formación de heterocromatina en los *loci* específicos (Sienski *et al.*, 2012), no es del todo clara la contribución de la maquinaria de RNAi en un mecanismo similar en células somáticas (Moshkovich y Lei, 2010). Al buscar evidencia de la posible función nuclear de las AGOs en el control de la expresión génica por mecanismos análogos al TGS descrito en otras especies, investigadores hallaron que AGO2 de *D. melanogaster* está involucrada en la regulación transcripcional por otros mecanismos (Cernilogar *et al.*, 2011; Moshkovich *et al.*, 2011; Taliaferro *et al.*, 2013). Estos trabajos constituyen un importante antecedente para este trabajo de tesis.

Cernilogar *et al.* (2011) describieron que el complejo Dicer 2- AGO2 de *D. melanogaster* se une a regiones eucromatínicas, asociadas a la transcripción activa. AGO2 se une, en particular, a los promotores de respuesta al choque térmico (*heat shock*) en respuesta a este estímulo. El silenciamiento de AGO2 resulta en una disminución de los niveles de RNAPII

pausada río abajo del TSS, observación que se extiende a otros genes. Estos cambios resultan tanto en el aumento como en la disminución de la expresión de los genes que unen a Dicer 2 y AGO2 en sus promotores. La expresión de mutantes de la actividad enzimática de estas proteínas no rescata su silenciamiento, indicando que el metabolismo de RNAs pequeños es necesario para esta regulación. Análisis de los RNAs pequeños unidos a AGO2, revelaron que, ante el choque térmico, aumenta la asociación de aquellos enriquecidos en los promotores de respuesta al choque. Se observa además, que tanto Dicer 2 como AGO2 interactúa con la RNAPII y con el factor de transcripción NELF-E (implicado en la estabilización del pausado proximal de la RNAPII) (Cernilogar *et al.*, 2011).

En un segundo trabajo, Moshkovich *et al.* (2011) refuerzan la observación de que AGO2 de *D. melanogaster* se asocia preferencialmente a *loci* de transcripción activa, esta vez en células embrionarias. Se observó en este trabajo, que AGO2 se localiza extensivamente en regiones enriquecidas en CTCF/CP190, y, junto con estas, en promotores activos. La depleción de AGO2 conlleva la reducción de la formación de interacciones cromosómicas de largo alcance, al igual que lo observado con la depleción de CTCF y CP190. Llamativamente, la función acá descrita no depende de la actividad catalítica de AGO2 o de Dicer 2. Según esta evidencia, se propone un modelo en el que AGO2, de forma independiente al metabolismo de siRNAs, promueve o estabiliza la formación de interacciones de largo alcance que definen dominios transcripcionales a lo largo del genoma de *D. melanogaster* (Moshkovich *et al.*, 2011) (**Figura I14**). Curiosamente, se mostró que componentes de la maquinaria de RNAi de *D. melanogaster* están involucrados en el proceso de silenciamiento génico mediado por el complejo *Polycomb group* (PcG). Ese complejo se une a elementos represivos y, mediante la formación de interacciones cromatínicas de largo alcance, silencia genes blanco por inducción de la formación de heterocromatina. Se ha mostrado que AGO1, Dicer 2 y PIWI contribuyen a la estabilización de estas interacciones de largo alcance durante el desarrollo (Grimaud *et al.*, 2006). Esto refuerza la idea de que en *D. melanogaster* la maquinaria de RNAi contribuiría a la regulación de la expresión génica a partir de la regulación de la organización nuclear.

Toda la evidencia considerada indica que los mecanismos en los que las proteínas AGO intervienen en la regulación de la expresión génica a nivel de la transcripción en *D. melanogaster* distan de los observados en otras especies como *S. pombe*, *A. thaliana* y *C. elegans*. A diferencia de estas, *D. melanogaster* carece de enzimas RdRp que parecen ser necesarias para la amplificación de siRNAs y el refuerzo de la señal que induce cambios a nivel de la cromatina.

D. melanogaster

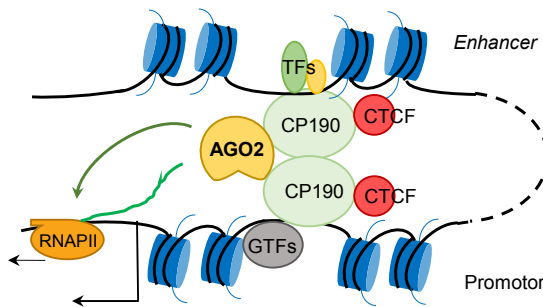


Figura I14. AGO2 en la regulación de la transcripción en *D. melanogaster*. AGO2 es reclutado a regiones reguladoras de forma CTCF/CP190 dependiente y promueve o estabiliza la formación de loops con promotores, favoreciendo su transcripción. Adaptado de Moshkovich *et al.* (2011).

1.3.4 Las proteínas argonauta y sus funciones nucleares en humanos

En humanos existen una única proteína Dicer y 4 proteínas del clado AGO (AGO1-4). De éstas, sólo AGO2 tiene la actividad endonucleasa (Meister, 2013). Las 4 AGOs tienen la capacidad de unir miRNAs, con ciertas preferencias entre las subpoblaciones (Burroughs *et al.*, 2011). Se especula con el hecho de que las AGOs no catalíticas son parcialmente redundantes. Dentro de estas, AGO1 y AGO3 son de expresión ubicua, mientras que AGO4 se expresa en pocos tejidos (Meister, 2013), cosa que parecería indicar que no son del todo redundantes. Si bien AGO2 tiene actividad endonucleasa, también une miRNAs que son parcialmente complementarios con sus blancos y desencadena mecanismos de silenciamiento post-transcripcionales de forma similar a las otras AGOs (Meister, 2013).

En los últimos años se ha publicado una multiplicidad de trabajos cuya motivación es dilucidar el o los posibles roles de las proteínas argonauta en las funciones nucleares de mamíferos.

Se encuentra ampliamente demostrado que tanto AGO1 como AGO2 se encuentran en el núcleo de células humanas (Ahlenstiel *et al.*, 2012; Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012; Gagnon *et al.*, 2013) donde AGO2 se asocia a componentes de la maquinaria de RNAi, Dicer, TRBP y TRNC6A/GW182 y a miRNAs (Gagnon *et al.*, 2013). Las AGOs de humanos carecen de señal de localización nuclear, es decir, que necesitan de la asociación con otras proteínas para entrar el núcleo. TRNC6A, una proteína de la familia GW182 que se asocia a las AGOs en los complejos de silenciamiento de la traducción, es capaz de entrar al núcleo por su señal de localización nuclear y es parcialmente responsable de la entrada al núcleo de las AGOs de humano (Nishi *et al.*, 2013).

Al analizar trabajos cuya motivación es dilucidar si en humanos las AGOs están involucradas en la regulación transcripcional por mecanismos similares al TGS descrito en *S. pombe*, *C. elegans* y *A. thaliana*, surgen más dudas que certezas.

En un trabajo pionero, Morris *et al.* (Morris *et al.*, 2004) demostraron que la transfección de siRNAs doble cadena sintetizados *in vitro* y de secuencia complementaria al promotor de un gen inhibe su transcripción por un mecanismo dependiente de la metilación del DNA. Varios trabajos que muestran este efecto pero en otros genes y modelos celulares se publicaron posteriormente (Chu *et al.*, 2010; Riggs *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2006, 2007). En éstos se muestra que el efecto de los siRNAs involucra la metilación de H3K9 y de H3K27, ambas marcas propias de la heterocromatina (Riggs *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008). En otros trabajos se demostró que el efecto de los siRNAs sobre la transcripción depende de los transcriptos antisentido que se generan del promotor blanco. Estos transcriptos generarían la plataforma de reclutamiento de la maquinaria de silenciamiento por interacciones RNA-RNA con el siRNA (Han *et al.*, 2007). Esta observación concuerda con el hecho de que para que el silenciamiento ocurra se requiere una alta actividad del promotor del gen blanco (Janowski *et al.*, 2006). Se demostró, además, que el efecto de la transfección de siRNAs intrónicos sobre la transcripción depende tanto de AGO1 como de AGO2 (Gonzalez *et al.*, 2008; Janowski *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008) (**Figura I15**).

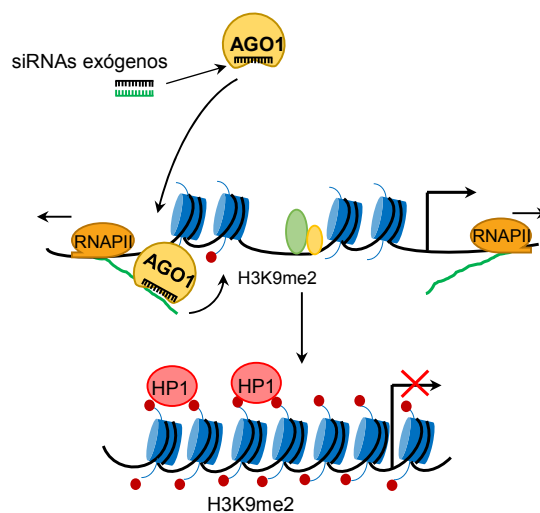


Figura I15. Modelo de TGS disparado por siRNAs exógenos en humanos. Según este modelo, siRNAs exógenos y complementarios a promotores activos inducen la formación de heterocromatina facultativa en estas regiones inhibiendo la transcripción. El efecto depende de AGO1 y de la interacción RNA-RNA entre el siRNA y el RNA naciente de los promotores.

Luego de los primeros trabajos en los que se reportó que siRNAs exógenos inducen silenciamiento a nivel transcripcional suponemos que una intensa búsqueda de RNAs

pequeños endógenos que regulan la transcripción de este modo, se inició. Pocos trabajos, sin embargo, lo demuestran (Kim *et al.*, 2008). Uno de estos muestra que miRNAs son capaces de silenciar su propio locus, silenciando genes que se localizan en las inmediaciones (Kim *et al.*, 2008).

Lo cierto es que también se ha observado en otros trabajos realizados en distintos laboratorios, que la transfección de siRNAs complementarios a promotores puede desencadenar el efecto opuesto, es decir, aumentar los niveles de transcripción del gen blanco (Chu *et al.*, 2010; Janowski *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016a, 2006). Se ha mostrado en particular, que la transfección de la línea celular de tejido mamario MCF7 con siRNAs complementarios a la región promotora del gen del receptor de progesterona puede disparar tanto el silenciamiento como la inducción de la transcripción, dependiendo de la región que los siRNAs reconozcan (Janowski *et al.*, 2007). Poco se conoce a cerca de los mecanismos que operan en este efecto. Se ha observado que sólo AGO2 es necesaria para la inducción de la transcripción (Chu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006).

En un trabajo más reciente, y contemporáneo a este trabajo de tesis, se mostró que a nivel de genoma completo AGO1 se localiza en promotores de genes activos y que su silenciamiento provoca una disminución en los niveles de transcripto de algunos genes que muestran picos de AGO1 en sus promotores (Huang *et al.*, 2013). En contraposición, no se encontró asociación entre AGO2 y la cromatina. Se demuestra además, que AGO1, y no AGO2, co-inmunoprecipita junto con RNAPII de forma DNA-dependiente y RNA-independiente (Huang *et al.*, 2013), lo que sugiere que la interacción de AGO1 con el complejo transcripcional ocurre cuando ambos se encuentran unidos al genoma. Este trabajo concuerda con lo observado en *D. melanogaster*, en donde AGO2 aparece asociado a regiones del genoma de transcripción activa (Cernilogar *et al.*, 2011; Moshkovich *et al.*, 2011).

1.3.5 Las proteínas argonauta y el *splicing* alternativo

Estudiando en nuestro laboratorio la regulación del *splicing* alternativo por mecanismos que modulan la estructura de la cromatina, el Dr. Mariano Alló se propuso investigar si siRNAs exógenos y de secuencia complementaria a regiones intrónicas y río abajo de un exón *cassette* alternativo alteran su patrón de *splicing* alternativo por un mecanismo análogo al observado por Morris *et al.* (Morris *et al.*, 2004) en promotores. En concordancia, en el trabajo publicado por Alló *et al.* (2009) se demuestra que la transfección siRNAs de secuencia complementaria el exón *cassette* alternativo EDI del gen de *fibronectina* humana

induce un aumento de H3K9me2 de manera local e intragénica. Se induce, entonces, un cambio en la estructura local de la cromatina que altera la tasa de elongación de la RNAPII y por tanto, aumenta la inclusión del exón alternativo (**Figura I16**). Este trabajo abre la posibilidad de que un mecanismo disparado por RNAs pequeños endógenos regule el *splicing* alternativo. Vale agregar que este trabajo fue uno de los pioneros en estudiar la regulación del *splicing* alternativo por cambios en la estructura de la cromatina.

En este sentido y en un trabajo posterior de otro grupo de investigación (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012), se demostró que tanto AGO1 como AGO2 intervienen en la regulación del *splicing* alternativo de los exones variables del gen de CD44. Se encontró que ambas proteínas se encuentran asociadas a la cromatina que abarca la región de los exones variables y que estas también se asocian al pre-mRNA. Su silenciamiento resulta en la disminución de la inclusión de los exones variables así como de los niveles de H3K9me3 que se observan a nivel intragénico. Curiosamente, el enriquecimiento de AGO1, AGO2 y H3K9me3 que se observa en regiones intragénicas de *CD44* coincide con un transcripto aniséntido (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012). Este trabajo apoya la idea planteada por Alló *et al.* (2009) que propone un mecanismo por el que RNAs pequeños son capaces de regular el *splicing* alternativo al modular la estructura de la cromatina en un mecanismo que involucra a las proteínas argonauta.

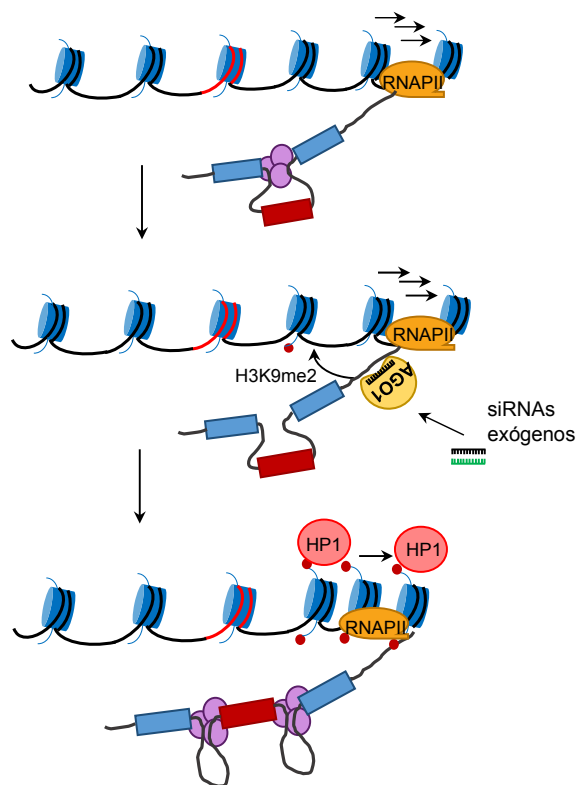


Figura I16. Modelo de la regulación del *splicing* alternativo por TGS. En ausencia de siRNAs, la estructura relajada de la cromatina favorece la exclusión del exón alternativo (rojo). La transfección de siRNAs de secuencia complementaria al intrón río abajo del exón alternativo promueve la deposición de H3K9me2 y el reclutamiento de HP1 que induce la formación de heterocromatina facultativa de forma local. Como consecuencia, la disminución en la tasa de elongación de la polimerasa promueve la inclusión del exón alternativo. Adaptado de (Alló *et al.*, 2009)

1.3.6 Antecedentes de nuestro grupo en el estudio de las funciones nucleares de AGO1

El trabajo del Dr. Mariano Alló desarrollado en el laboratorio resultó el puntapié inicial para el estudio de mecanismos por los que proteínas argonauta junto con RNAs pequeños de interferencia endógenos podrían regular el *splicing* alternativo. Al momento de plantear esta pregunta, sin embargo, las funciones de las proteínas argonauta en el núcleo de células humanas eran desconocidas. Se propuso entonces hacer un estudio exploratorio analizando en primer lugar los sitios del genoma a los que AGO1 se asocia, si es que se encuentra unido a la cromatina. Se realizaron ensayos de ChIP-seq de AGO1 en la línea celular MCF7, de origen tumoral mamario humano. Participé de este trabajo pero no como parte de esta tesis. Sorpresivamente, hallamos que AGO1 se asocia a *enhancers* transcripcionales preferentemente cuando estos están activos. En este trabajo también se demostró que el silenciamiento de AGO1 se asocia a cambios en la eficiencia del *splicing* constitutivo así como en patrones de *splicing* alternativo de algunos eventos.

2.OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

Estudiar el rol de la proteína argonauta 1 (AGO1) en la regulación de la transcripción y el *splicing* alternativo en células humanas.

De este objetivo general se desprenden una serie de objetivos específicos que detallo a continuación:

2.2 *Objetivos específicos*

- Analizar si AGO1 se asocia a grupos de *enhancers* particulares en células mamarias.
- Evaluar si AGO1 es necesario para la activación transcripcional de los genes blanco de dichos *enhancers*.
- Evaluar si AGO1 es necesario para la activación de los *enhancers*.
- Analizar el paso durante la activación de los *enhancers* en el que AGO1 sería necesario.
- Analizar posibles interacciones con los factores de transcripción involucrados en la actividad de los *enhancers*.
- Estudiar si a través de su rol en la activación de *enhancers* intragénicos AGO1 es capaz de regular el *splicing* alternativo de eventos cercanos.



3. RESULTADOS

3.1 Rol de AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos en células mamarias

3.1.1 AGO1 se une a regiones enriquecidas en motivos de unión al DNA de ER α

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio analizamos la distribución genómica de AGO1 en la línea celular tumoral mamaria MCF7. Para esto se realizó un experimento de ChIP-seq utilizando un anticuerpo que reconoce a AGO1 de forma específica. Cruzando la información de la distribución genómica de AGO1 con la de la localización de una colección de *enhancers* previamente identificados en un conjunto de 9 líneas celulares (The ENCODE Consortium Project, Dunham *et al.*, 2012) y con perfiles de las marcas de histonas asociadas con *enhancers* activos, H3K1me1 y H3K27ac, de MCF7, demostramos que esta proteína se une *enhancers* transcripcionales preferentemente cuando estos se encuentran activos (Allo *et al.*, 2014). Con el fin último de determinar el rol de AGO1 en la activación transcripcional, decidimos analizar con una mayor profundidad su distribución genómica. En este sentido, orientamos un nuevo análisis bioinformático de los datos de ChIP-seq de AGO1 con el fin de determinar si este se encuentra asociado a un grupo de *enhancers* en particular.

En primera instancia definimos a las regiones enriquecidas en AGO1 (*clusters* de AGO1) de forma más rigurosa que la utilizada previamente. Continuamos los análisis entonces, con un set de *clusters* de AGO1 extraídos con una mayor confianza que los utilizados en los análisis previos ya publicados (Alló *et al.*, 2014). Normalizando la señal del ChIP-seq de AGO1 con la del DNA *input* y estableciendo el p-valor umbral en 10^{-5} determinamos un total de 2871 *clusters* de AGO1 con los que continuamos el análisis.

En un primer estudio exploratorio, analizamos si las regiones genómicas a las que AGO1 se asocia se encuentran enriquecidos en algún motivo de DNA en particular. Para esto realizamos un análisis de secuencias *de novo*, utilizando un algoritmo que busca secuencias de DNA enriquecidas en determinadas regiones sin ninguna especificación previa. Este análisis reveló que los *clusters* de AGO1 se encuentran enriquecidos de forma específica en numerosas secuencias que se asemejan a los motivos de unión al DNA de algunos TFs (**Figura R1.A**). Entre estas se destaca, por arrojar un p-valor mucho menor que el resto de

las secuencias obtenidas en el análisis, la que se asemeja al motivo de unión al DNA de ER α . En esta lista aparecen, además, secuencias similares a las de los motivos de unión al DNA de TFs tipo FOX y de tipo *zinc finger* (ZNF).

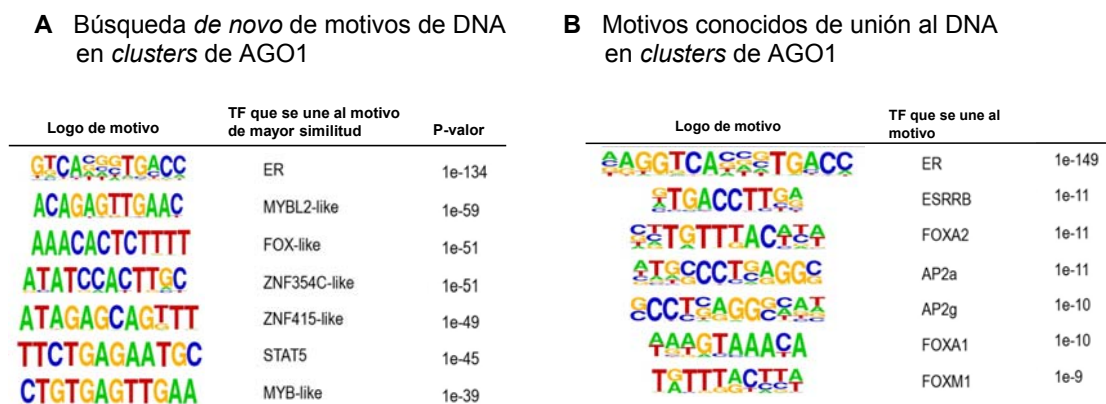


Figura R1. Los *clusters* de AGO1 se encuentran enriquecidos en el motivo de unión al DNA de ER α . **A.** Análisis *de novo* de motivos de DNA enriquecidos en las 2871 *clusters* de AGO1 de MCF7. Se muestran los 7 motivos con los menores p-valores asociados. Cada motivo se asocia, además, con un motivo de unión conocido para un TF. En los casos en los que el *score* es mayor a 0,75, el TF asociado al motivo es nombrado como tal. En los casos en los que el *score* es menor, se nombra el TF conocido más cercano, seguido de *-like*. **B.** Análisis del enriquecimiento de motivos de unión de TF al DNA en los *clusters* de AGO1. Se muestran los 7 motivos con los menores p-valores asociados.

A continuación analizamos si motivos unión al DNA conocidos para varios TFs. se encuentran enriquecidos en las regiones donde se ubican los *clusters* de AGO1 (**figura R1.B**). Sorpresivamente, de este análisis se desprende que el motivo de unión al DNA de ER α se encuentra significativamente enriquecido en los clusters de AGO1. Según los p-valores obtenidos, observamos que dicho enriquecimiento es mucho mayor (en el orden de cientos de órdenes de magnitud) que el de los otros TFs analizados que podemos considerar despreciables. Cerca del 12,5% de los *clusters* de AGO1 se asocian a regiones genómicas que contienen al motivo de unión de ER α . Concluimos entonces, que AGO1 se une, en las células mamarias MCF7, a regiones genómicas enriquecidos en el motivo de unión al DNA de ER α .

3.1.2 AGO1 se asocia a los sitios de unión al genoma de ER α específicamente

En el siguiente análisis exploratorio determinamos si los *clusters* de AGO1 se superponen con los de varios TFs que se expresan en las células MCF7. Para eso tomamos de la bibliografía los datos de ensayos de ChIP-seq de varios TFs obtenidos en esta línea celular. Entre estos factores se incluyen a ER α en presencia de E2 (Li *et al.*, 2013), al receptor de progesterona (PR, en presencia de un progestágeno, (Mohammed *et al.*, 2015)), y a FOXA1 (Hurtado *et al.*, 2011) entre otros. PR es otro TF de la familia de receptores nucleares cuya actividad depende de la unión a progestágenos. Sus sitios de unión al genoma se solapan parcialmente con los de ER α (Mohammed *et al.*, 2015). FOXA1 es un factor pionero de la transcripción asociado a la vía de activación transcripcional mediada por ER α (Hurtado *et al.*, 2011). En todos los casos se definieron clusters con un p-valor de 10^{-5} . Este análisis reveló que los *clusters* de varios de los TFs estudiados solapan con los de AGO1 (**Figura R2**). De estos, ER α es el que muestra un mayor solapamiento. Como control negativo del análisis tomamos *clusters* de TFs que no se expresan en células MCF7 y cuyos datos de ChIP-seq fueron obtenidos en otras líneas celulares: PU1 de monocitos (Pham *et al.*, 2012) y NANOG de *stem cells* embrionarias (Lister *et al.*, 2009). No se observa solapamiento entre las regiones enriquecidas en estos factores con los *clusters* de AGO1. Si los *clusters* de los TFs analizados son divididos según solapan o no con los de ER α , observamos que sólo aquellos clusters que solapan con ER α solapan a su vez con los de AGO1. Esto nos permite concluir que AGO1 se asocia específicamente con los sitios de unión al genoma de ER α y que su asociación con otros TFs se explica por esta asociación.

A partir de estos hallazgos, continuamos los análisis a nivel del genoma completo centrándonos en los *enhancers* cuya activación depende de la unión del ER α (*enhancers* ER α).

Para visualizar el nivel de solapamiento entre los *clusters* de AGO1 y los de ER α (+E2) analizamos la señal de ChIP-seq promedio de este TF centrando la observación en los sitios de unión al genoma de AGO1. Incluimos en este análisis a FOXA1 y, al igual que en el análisis anterior, incluimos como controles negativos a Cts. que no se expresan en MCF7 y cuyos datos fueron obtenidos de otros tipos celulares: PU1 de monocitos y SOX2 de *stem cells* embrionarias (Lister *et al.*, 2009). Observamos que tanto la señal promedio de ChIP-seq de ER α como la de FOXA1 son agudas y simétricas cuando la observación se centra en los *clusters* de AGO1 (**figura R3.A**) mientras que los controles negativos no muestran enriquecimiento. Esto nos permite concluir que los sitios de unión de AGO1 se encuentran enriquecidos en ambos factores de transcripción. Si este análisis se restringe a los clusters

de AGO1 más intensos (cuartil superior) este enriquecimiento es aún mayor, siendo los perfiles de señal promedio de ChIP seq de ER α y FOXA1 más agudos (**figura R3.B**).

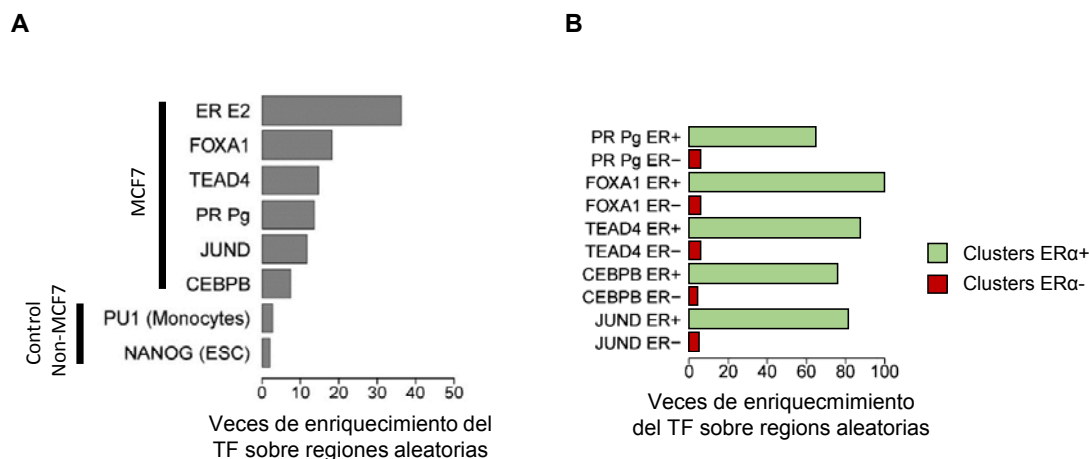


Figura R2. Los clusters de AGO1 solapan con los de ER α . **A.** Análisis del solapamiento entre los clusters de AGO1 y los de varios TF expresados en MCF7. Estos últimos vienen del análisis de experimentos de ChIP-seq realizados en MCF7 y cuyos datos fueron tomados de la bibliografía. Los *clusters* de ER α vienen de análisis de 2 réplicas realizadas en presencia de E2 (Li *et al.*, 2013). Los del receptor de progesterona (PR) vienen de 2 réplicas tomadas en presencia de progesterona (Pg) (Mohammed *et al.*, 2015). Los de FOXA1 vienen de 2 réplicas tomadas en condiciones de suero normal (Hurtado *et al.*, 2011). Los clusters de TEAD4, JUND y CEBPB vienen de una única réplica tomada en condiciones de suero normal (Dunham *et al.*, 2012). Como control negativo del análisis se incluyeron datos TF que no se expresan en MCF7: PU1, tomado de Monocitos (Pham *et al.*, 2012) y Nanog, tomado de células *stem* embrionarias (ESC) (Lister *et al.*, 2009). Se grafican las veces de enriquecimiento de cada uno de los TF en las regiones donde se identificaron los *clusters* de AGO1. **B.** Análisis del solapamiento de los clusters de AGO1 y los TF según si estos solapan o no con ER α . Los *clusters* de cada uno de los TF de (A) fueron clasificados en ER α + o ER α - según su solapamiento con clusters de ER α y el solapamiento de cada uno de los grupos con AGO1 fue analizado de nuevo.

En un análisis complementario al último, analizamos el nivel de correlación global de los ChIP-seq de AGO1, ER α (+E2) y FOXA1. Para esto calculamos el coeficiente de correlación de Pearson entre cada par de datos y los agrupamos de forma jerárquica (*hierarchical clustering*) en función de este coeficiente (**figura R4**). Utilizamos los mismos controles negativos que utilizamos en el análisis anterior. Observamos que AGO1, ER α y FOXA1 se agrupan entre sí diferenciándose de los controles negativos. Más en detalle vemos que la

distribución genómica de ER α correlaciona más con la de AGO1 que con la de FOXA1. Sin embargo, dado que estos datos fueron tomados de la bibliografía y los ensayos de ChIP-seq no fueron realizados de forma conjunta consideramos que no debemos ahondar demasiado en la interpretación de estos resultados.

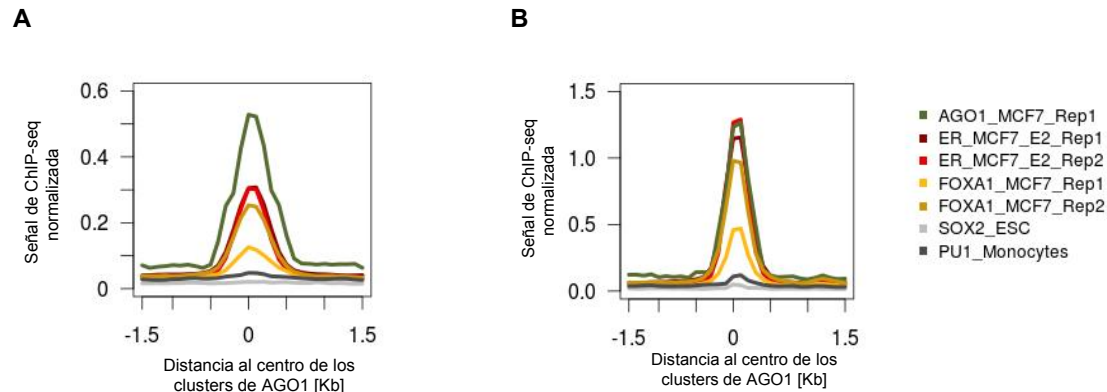


Figura R3. La intensidad de los *clusters* de ER α correlaciona con la de los *clusters* de AGO1. A. Se muestra la señal promedio de ChIP-seq de AGO1, de las réplicas de ER α tomadas con E2 (Li *et al.*, 2013) y de las de FOXA1 (Hurtado *et al.*, 2011) en ventanas de 3 kb centradas en las 2871 regiones genómicas enriquecidas en AGO1. Como control negativo del análisis se incluyeron los datos de ChIP-seq de SOX2, tomados de ESC (Lister *et al.*, 2009), y de PU1, tomados de monocitos (Pham *et al.*, 2012). **B.** Ídem A, pero considerando sólo los *clusters* más fuertes de AGO1 (el cuartil superior).

Concluimos, entonces, que **AGO1 se asocia a los *enhancers* de ER α en células MCF7.**

3.1.3 AGO1 se asocia a los *enhancers* dependientes de ER α que más se activan con estradiol (E2)

La **figura R5** muestra en forma de diagramas de Venn el número de *clusters* de AGO1 y de ER α (+E2) y cuántos de estos se superponen (**figura R5.A**). Cuando consideramos sólo los *clusters* hallados en *enhancers* activos, definidos en función de los niveles de H3K27ac (+E2) y de H3K4me1 el nivel de solapamiento es mucho mayor: del 22,2 % de *clusters* totales de AGO1 que se superponen con los de ER α pasamos a que el 69,2% de los *clusters* de AGO1 en *enhancers* activos solapan con los de ER α (**figura R5.B**). Esto sugiere que **una gran proporción de los *clusters* de AGO1 asociados a *enhancers* activos están implicados en la vía de activación transcripcional dependiente de estrógenos en células MCF7.**

Clustering jerárquico de los coeficientes de correlación de Pearson entre datos CHIP-seq

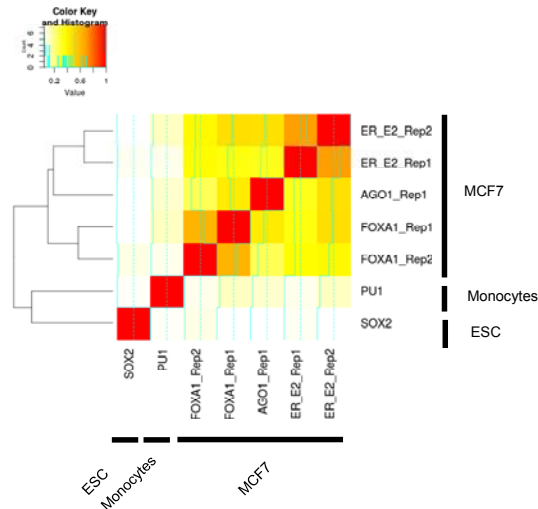


Figura R4. El perfil de unión al genoma de AGO1 correlaciona positivamente con el de ER α . Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados entre cada par de datos de CHIP-seq: el de AGO1, las 2 réplicas de ER α y las 2 réplicas de FOXA1. Como control negativo del análisis se incluyeron los datos de CHIP-seq de SOX2, tomados de ESC, y de PU1, tomados de monocitos. Según estos coeficientes los sets de datos fueron luego agrupados de forma jerárquica. El gradiente de colores representa el intervalo entre 0 y 1 que puede tomar el coeficiente de correlación de Pearson.

En este punto cabe destacar que la fracción de *clusters* de ER α que se unen a la cromatina junto con AGO1 es relativamente baja (sólo el 7% de los *clusters* de RE α se asocian a AGO1). Esto es consistente con el hecho de que la cantidad de *clusters* de AGO1 definidos a partir de nuestros CHIP seq es menor que la cantidad de *clusters* de RE α (**figura R5**).

Dado que una gran proporción de *clusters* de AGO1 en *enhancers* activos se sitúan en *enhancers* de ER α , cabe especular que esto puede deberse a una menor sensibilidad del CHIP-seq de AGO1. Debemos tener en cuenta, además, que durante el experimento de CHIP-seq de AGO1 las células MCF7 fueron mantenidas en medio con suero normal. Los experimentos de CHIP-seq de ER α tomados de la bibliografía, por el contrario, fueron realizados manteniendo a las células primero con medio suplementado con suero disminuido en hormonas esteroideas para luego ser tratadas con E2 por un tiempo muy breve (ver más adelante). Los análisis bioinformáticos aquí detallados nos permitieron, sin embargo, continuar con el estudio del posible rol de AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos. Mostramos como referencia un análisis igual al anterior que muestra la proporción de solapamiento entre *clusters* de ER α y los de FOXA1, un TF identificado como fundamental en la activación transcripcional mediada por estrógenos (**figura R5.C y D**).

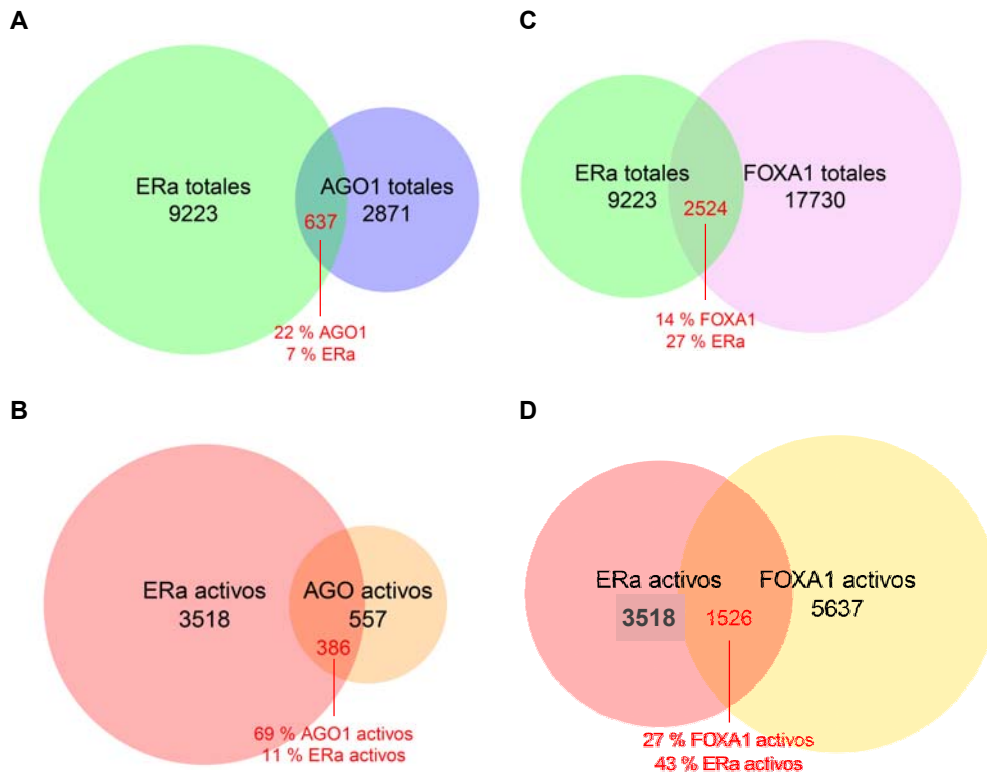


Figura R5. Análisis del solapamiento entre *clusters* de AGO1 y ER α , totales y sobre *enhancers* activos con E2. **A.** Diagrama de Venn que muestra la cantidad de *clusters* totales de AGO1 y ER α (+E2) y el porcentaje de solapamiento entre ellos. **B.** Ídem A pero considerando sólo los *clusters* que se ubican en *enhancers* activos caracterizados por altos niveles de H3K27ac (+E2) y H3K4me1, sin incluir a regiones anotadas como promotores. **C y D.** Mismos análisis que A y B pero entre los *clusters* de ER α (+E2) y los de FOXA1.

A continuación decidimos evaluar si existe alguna relación entre la asociación de AGO1 a los *enhancers* de ER α y su nivel de activación ante el estímulo hormonal. Para esto tomamos las regiones enriquecidas en ER α y las dividimos según solapan o no con AGO1. Evaluamos entonces, la señal promedio de ChIP-seq de H3K27ac (+E2) centrada en los sitios de unión de ER α correspondientes a estos dos grupos (**figura R6**). Observamos en este análisis que los niveles promedio de esta marca de histona, asociada con la activación transcripcional de los *enhancers* dependientes de receptores nucleares, son mayores cuando los *enhancers* de ER α están enriquecidos en AGO1. Este análisis sugiere que el nivel de activación de los *enhancers* es mayor cuando estos se asocian a AGO1 (de forma al menos detectable por nosotros).

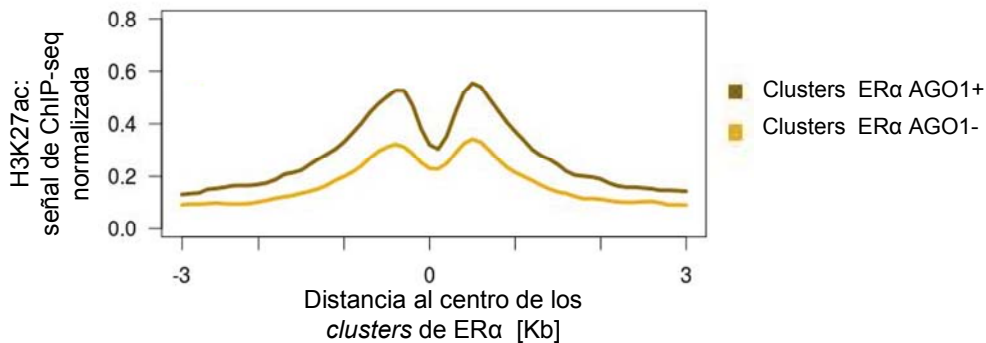
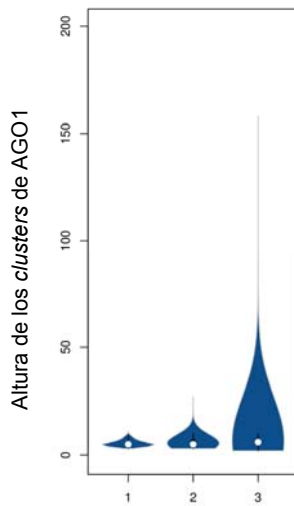


Figura R6. AGO1 se asocia a *enhancers* de ER α que tienen una mayor señal promedio de H3K27ac. Los *clusters* de ER α (+E2) fueron divididos según solapan o no con los de AGO1. Dada la gran diferencia entre el número de *clusters* de ER α que solapan con los de AGO1 (641) y los que no lo hacen (8592), en el último caso sólo fueron considerados los 641 *clusters* de ER α más fuertes. Se grafica la señal promedio de ChIP-seq de H3K27ac en ventanas de 6 kb centradas cada uno de los grupos de *clusters* de ER α .

Decidimos evaluar, por otro lado, si existe una correlación entre el enriquecimiento de AGO1 y los niveles de transcripción de los *enhancers*, es decir de eRNAs, cuando las células con tratadas con E2. Los niveles de eRNAs fueron medidos en experimentos de Global Run On seguidos de secuenciación masiva (GRO-seq) cuyos resultados fueron tomados de la bibliografía (Li *et al.*, 2013). Mediante esta técnica se pueden medir los niveles de RNA naciente únicamente y de forma muy sensible. Ésta permite, además, evaluar la activación transcripcional de los *enhancers* a tiempos muy cortos de tratamiento con la hormona (en el orden de los 10 minutos). Analizamos, entonces, la intensidad de los *clusters* de AGO1 en función de los niveles de eRNAs de los *enhancers* de ER α (**figura R7**). Para esto dividimos los *enhancers* de ER α en las siguientes categorías en función de los niveles de eRNAs: sin eRNAs detectados, bajos niveles de eRNAs (cuartil inferior) y altos niveles de eRNAs (cuartil superior).

Como resultado de este análisis observamos que la intensidad de los picos de AGO1 es significativamente mayor cuando estos se unen a *enhancers* con altos niveles de eRNAs. Este resultado, al igual que el anterior, sugiere que los niveles de AGO1 en los *enhancers* de ER α correlacionan de forma positiva con su nivel de activación ante el estímulo hormonal.



1. Sin eRNA con E2
2. Bajos niveles de eRNAs con E2
3. Altos niveles de eRNAs con E2

Figura R7. *Violin plot* que muestra la distribución de la altura de los picos de AGO1 en *enhancers* de ER α clasificados según sus niveles de eRNAs generados con E2: niveles nulos, niveles bajos (cuartil inferior) y niveles altos (cuartil superior)

3.1.4 Validación del ChIP-seq de AGO1

La correlación entre la distribución genómica de AGO1 y ER α resulta, cuanto menos, llamativa. Esta correlación resulta evidente al evaluar casos puntuales de *enhancers* de ER α a los que AGO1 se asocia. En la **figura 8** mostramos 4 *loci* seleccionados que incluyen a *enhancers* de ER α y sus genes blanco, cuya transcripción aumenta ante el tratamiento de células MCF7 con E2. Junto con el perfil de ChIP-seq de AGO1 mostramos los de ER α (+ E2) y los de GRO-seq (- E2 y + E2). El ensayo de GRO-seq muestra la co-regulación transcripcional de los *enhancers* y de sus respectivos genes blanco ante el estímulo hormonal. Mostramos para cada *locus*, además, los sitios que están involucrados en interacciones de largo alcance mediadas por ER α . El mapeo de estas interacciones fue obtenido por experimentos de *Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing* (ChIA-PET) cuyos resultados fueron tomados de la bibliografía (Fullwood *et al.*, 2009). Brevemente, esta técnica es una mezcla entre Captura de la Conformación de la Cromatina (3C) y ChIP seguida de secuenciación masiva: luego de la digestión de la cromatina con una enzima de restricción y antes de la ligación de los extremos de DNA se realiza la inmunoprecipitación de la proteína de interés (en este caso, ER α). La interacción física entre los *enhancers* y los promotores de sus genes blanco es la evidencia directa que permite mapear las regiones *enhancer* dependientes de ER α . En los cuatro ejemplos aquí mostrados, se destaca la correlación entre los clusters de AGO1 y los de ER α .

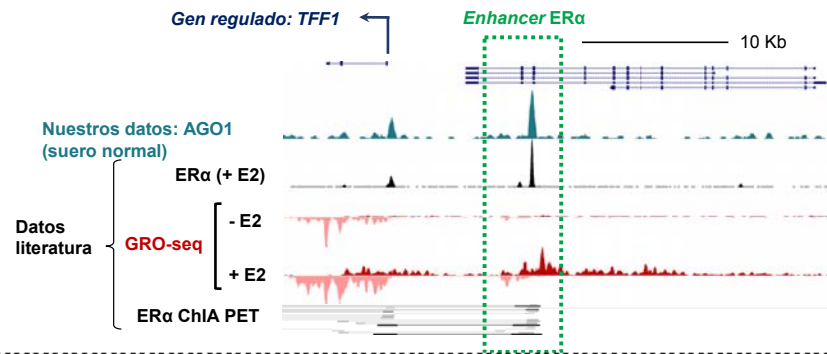
Para descartar que los *clusters* de AGO1 obtenidos en el experimento de ChIP-seq se deban a un artefacto experimental, decidimos validar algunos de ellos mediante ensayos de ChIP seguidos de PCR cuantitativa (ChIP-qPCR).

Uno de los artefactos comunes que ocurren durante ensayos de ChIP-seq es el de la inmunoprecipitación de regiones “calientes” del genoma (*hot spots*) caracterizadas por estar enriquecidas en muchas proteínas, siendo esta inmunoprecipitación independiente de la presencia de la proteína cuya distribución genómica específica se quiere estudiar (Teytelman *et al.*, 2013).

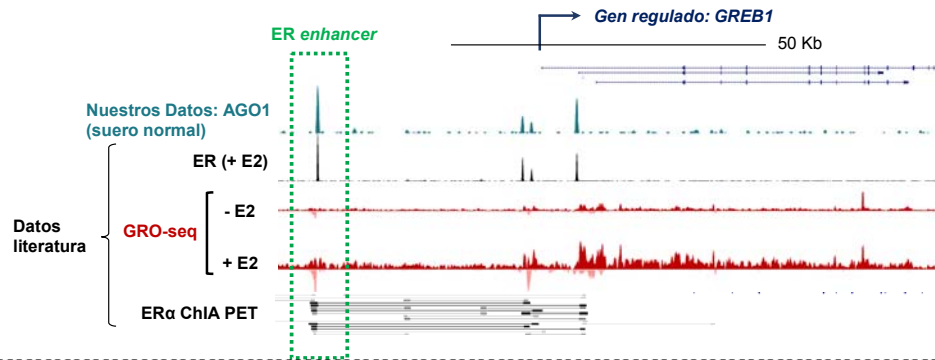
(En la página siguiente)

Figura R8. Ejemplos de *clusters* de AGO1 en *enhancers* de ER α . A, B, C y D. Se muestran 4 *loci* cada uno de los cuales incluye a un *enhancer* de ER α y a uno de sus genes blanco: TFF1 (A), GREB1 (B), NRIP1 (C), FOXC1 (D). En cada panel se muestran los transcritos anotados en la base de datos de RefSeq presentes en cada *locus* y los perfiles de ChIP-seq de AGO1 y de ER α (+E2) de MCF7. Se muestran además los perfiles de GRO-seq (-E2 y +E2) y los resultados del ensayo de ChIA-PET de ER α (+E2) obtenidos de MCF7. En este último, las regiones de las terminales de cada línea son las detectadas como interactuantes.

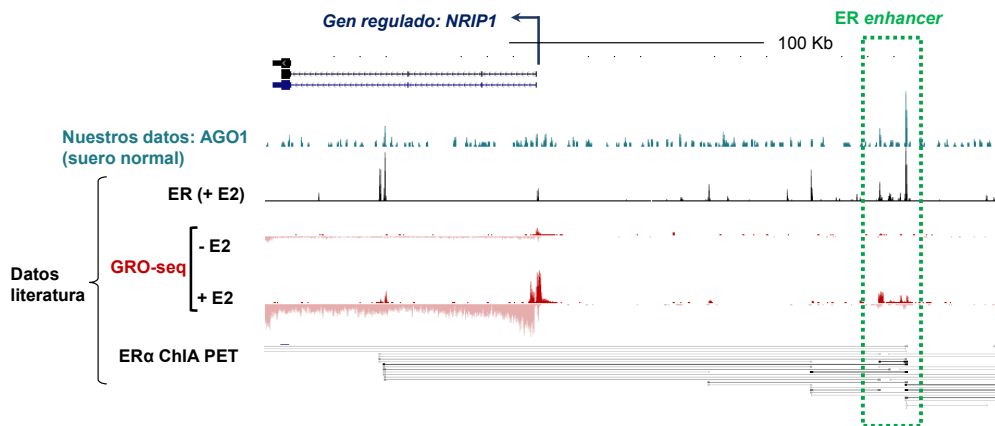
A



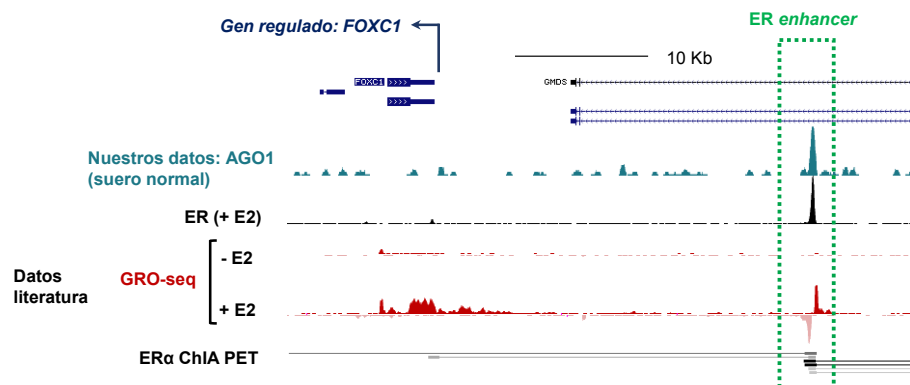
B



C



D



Si bien los análisis bioinformáticos (**figura 2** puntualmente) que indican que AGO1 se asocia a *enhancers* de ER α específicamente y no a regiones asociadas a otros factores de transcripción, sugieren que los *clusters* de AGO1 no son artefactuales, debemos descartar esta posibilidad de una forma directa. Este tipo de artefacto depende de la inmunoprecipitación y no de la secuenciación profunda. Ensayos de ChIP-qPCR en las mismas condiciones en las que se realizó el ChIP-seq no permitirían detectarlo. Es por esto que decidimos realizar experimentos de ChIP-qPCR de AGO1 silenciando a esta proteína específicamente mediante siRNAs.

Evaluamos el enriquecimiento de AGO1, entonces, en las 4 regiones *enhancer* mostradas en la **figura R8** silenciando o no a AGO1 por un RNA pequeño de interferencia (siAGO1) (**figura R9.A**). Observamos enriquecimiento de AGO1 en estas regiones. Este enriquecimiento disminuye, además, cuando se silencia a AGO1 específicamente. Si bien el nivel del silenciamiento de AGO1 (evaluado a nivel de la proteína) conseguido mediante esta estrategia no es total, es considerable alcanzando a reducción en los niveles de AGO1 del 75% (**figura R9.B**).

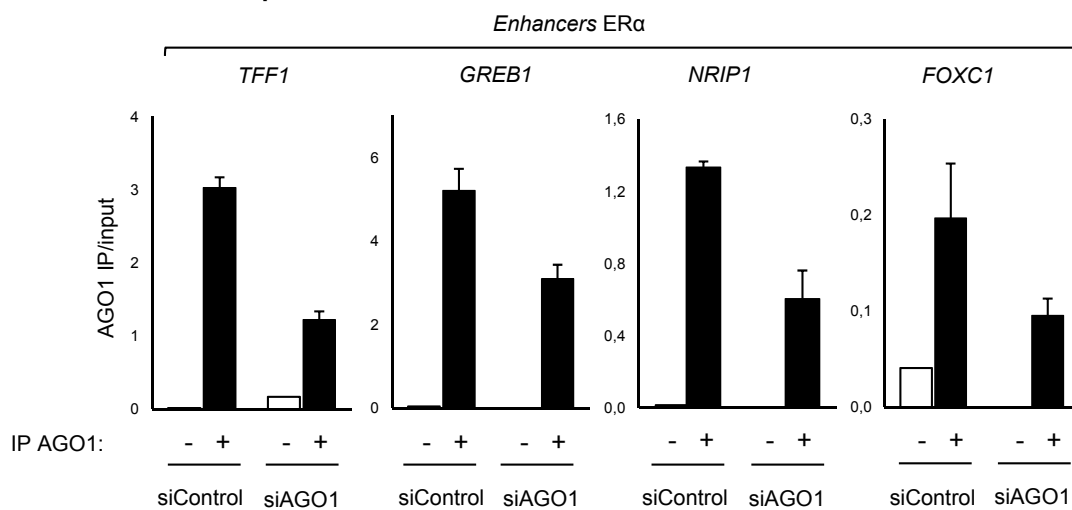
Concluimos que los *clusters* de AGO1 obtenidos a partir del ChIP-seq de AGO1 son específicos para esta proteína. Esta conclusión se sustenta en el hecho de que la probabilidad de que el siRNAs de secuencia complementaria a la del mRNA de AGO1 silencie otra proteína también reconocida por el anticuerpo específico contra AGO1 es muy baja.

3.1.5 AGO1 se une a los *enhancers* de ER α de manera dependiente de E2

Como dijimos anteriormente, el ChIP-seq de AGO1 fue realizado con las células MCF7 mantenidas en medio con suero fetal bovino normal. A partir de este experimento no podemos determinar si AGO1 se une a los *enhancers* de ER α de manera dependiente o independiente de E2, es decir, si se encuentra unido a los *enhancers* antes del tratamiento de las células con la hormona o si lo hace después. Para diferenciar entre estos dos estados, sin y con E2 (- E2 y + E2), primero hay que privar a las células de toda hormona esteroidea de uno a varios días antes del estímulo (el protocolo que utilizamos se muestra en la **figura R10.A**). Nos referimos a este proceso como hambre. De esta manera, la activación transcripcional dependiente de hormonas baja a sus niveles basales y se permite la degradación de los mRNAs acumulados previamente. La activación transcripcional cuando se agrega E2 puede ser detectada, entonces, tanto a nivel de unión de ER α a sus *enhancers* (que es observable en el orden de los minutos luego de la estimulación

hormonal) como a nivel de los mRNAs (que pueden detectarse en el orden de horas luego de la estimulación).

A MCF7: ChIP-qPCR AGO1



B MCF7: WB

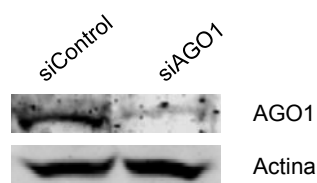


Figura R9. Validación del ChIP-seq de AGO1. A. Células MCF7 fueron transfectadas con siControl o siAGO1 durante 96 h. Ensayos de ChIP-qPCR de AGO1 fueron realizados luego, analizando regiones correspondientes a *enhancers* de ER α . Las barras corresponden al promedio de dos réplicas por tratamiento. Las barras de error corresponden al DE. Se muestra un experimento representativo de 2. B. SDS-PAGE seguido de WB que muestra la eficiencia de silenciamiento de AGO1, 96 h luego de la transfección de las células MCF7 con siControl o siAGO1. Los niveles de actina sirven como control de carga.

Experimentos de ChIP-qPCR de ER α en células MCF7 sin tratar o tratadas con E2 durante una hora, muestran el comportamiento esperado: su enriquecimiento en los *enhancers* antes descritos (**figura R8**) aumenta ante el tratamiento con E2 de forma significativa (**figura R10.B**). Sorpresivamente AGO1 muestra el mismo comportamiento, es decir, que su enriquecimiento en los *enhancers* de ER α aumenta ante el tratamiento con de E2 (**figura R11.A**).

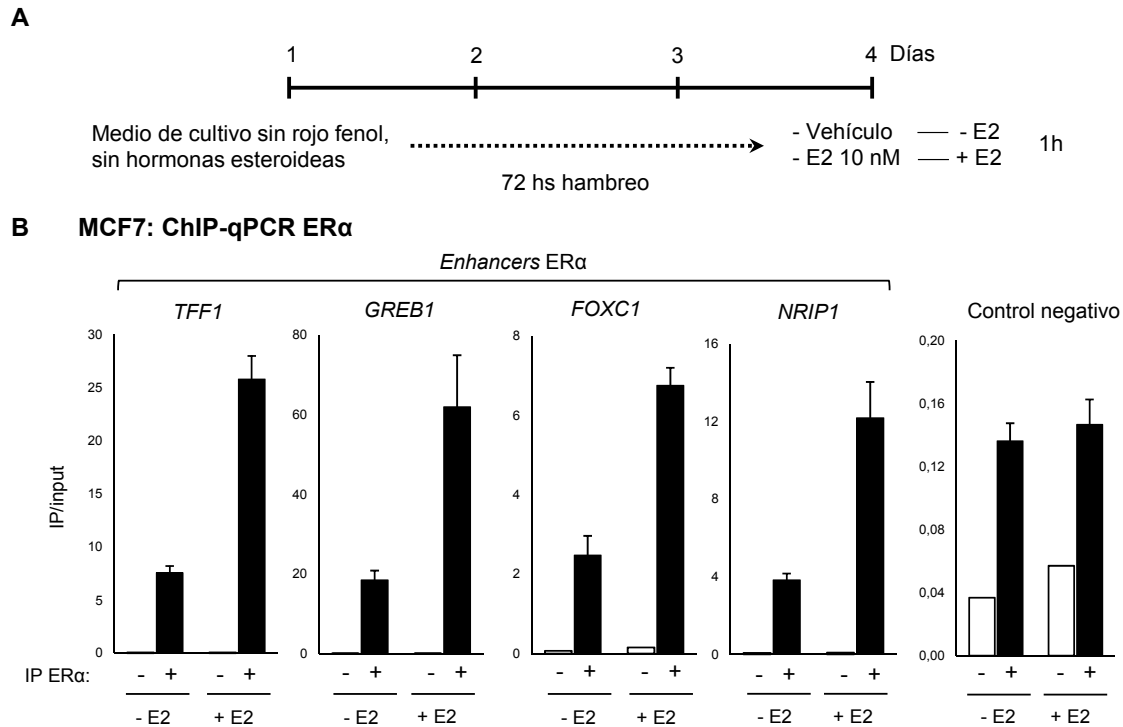


Figura R10. Tratamiento con E2 y su efecto sobre el reclutamiento de ER α a los *enhancers*. **A.** Protocolo utilizado para el hambreo de las células MCF7 y posterior tratamiento con E2. **B.** Células MCF7 fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con E2 10 nM por 1 h. Ensayos de ChIP-qPCR de ER α fueron realizados luego, analizando regiones correspondientes a *enhancers* de ER α y una región intergénica considerada como control negativo. Las barras corresponden al promedio \pm DE entre dos réplicas por tratamiento. Se muestra un experimento representativo de 3.

El aumento en el reclutamiento de AGO1 a los *enhancers* de ER α ante el tratamiento con E2 no puede explicarse por un aumento en los niveles de AGO1. Sus niveles totales, medidos por SDS-PAGE seguido de *western blot*, no cambian con E2 (**figura R11.B**). Esto es algo esperado dado el corto tiempo del tratamiento con la hormona.

Tanto en el caso de ER α como en el de AGO1, detectamos cierto enriquecimiento en ausencia de E2, enriquecimiento que no se observa en una región intergénica elegida como control negativo del experimento. Esto sugiere que, a pesar del hambreo de hormonas esteroideas, las células conservan cierta actividad transcripcional basal dependiente de ER α (ver más adelante). Aun así, logramos ver un mayor reclutamiento de ER α ante el tratamiento de las células con E2.

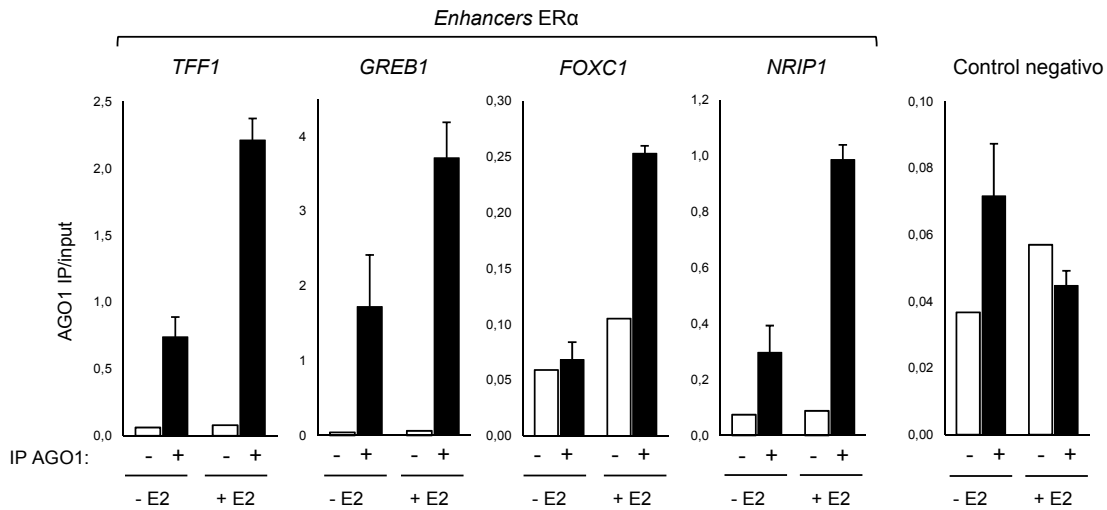
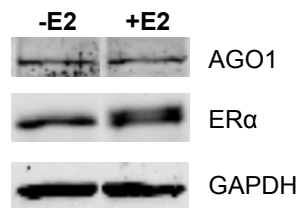
A MCF7: ChIP-qPCR AGO1**B MCF7: WB**

Figura R11. AGO1 es reclutado a los *enhancers* de ER α de forma E2 dependiente. **A.** Células MCF7 fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 1 h. Ensayos de ChIP-qPCR de ER α fueron realizados analizando regiones *enhancer* de ER α y una región intergénica considerada como control negativo. Las barras corresponden al promedio \pm DE dos réplicas por tratamiento. Se muestra un experimento representativo de 3. **B.** SDS-PAGE seguido de WB que muestra los niveles de AGO1 y ER α luego del tratamiento de células MCF7 con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 1 h. Los niveles de GAPDH sirven como control de carga.

3.1.6 La localización subcelular de AGO1 no depende de E2

Como discutimos antes (ver Introducción), ER α se localiza en el citoplasma celular en ausencia de E2. Ante el tratamiento con E2, la hormona se une al receptor y, cambios estructurales y modificaciones post-traduccionales mediante, éste se transloca al núcleo donde se une a la cromatina en las regiones regulatorias previamente demarcadas. Dado que determinamos que AGO1 se une a la cromatina de forma E2-dependiente, decidimos estudiar luego si este comportamiento depende de su translocación a núcleo de forma también E2-dependiente. En un primer abordaje, fraccionamos células MCF7 en núcleo y

citoplasma realizando una lisis suave y evaluamos mediante SDS-PAGE y *western blot* las cantidades relativas de AGO1 en cada una de las fracciones. Como marcadores de la fracción citoplasmática y nuclear utilizamos GAPDH y H3 respectivamente. Analizamos también los niveles de ER α y, de acuerdo a lo esperado, observamos que en ausencia de E2, su localización es mayormente citoplasmática mientras que en presencia de E2 esta es mayormente nuclear (**figura R12**).

En concordancia con lo observado en el caso de analizar la unión a la cromatina de ER α en presencia y ausencia de E2 (**figura R10.B**), aun en ausencia de la hormona se observa que bajos niveles de la proteína se encuentra en la fracción nuclear. En el caso de AGO1 observamos un comportamiento diferente: tanto en ausencia como en presencia de E2, su localización es mayormente nuclear (**figura R12**). Concluimos entonces, que la unión E2 dependiente de AGO1 a los *enhancers* de ER α no involucra cambios en su localización subcelular.

MCF7: WB

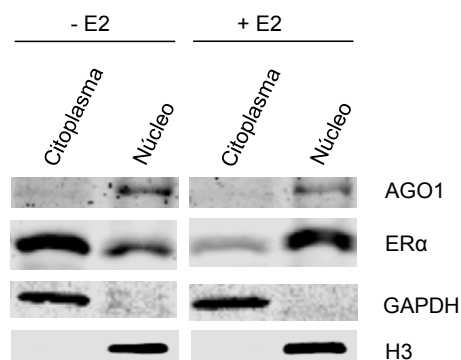


Figura R12. El tratamiento con E2 no altera la localización nuclear de AGO1. Células MCF7 fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 1 h. La células fueron luego cosechadas y separadas en fracciones citoplasmática y nuclear. Los niveles de AGO1 y ER α fueron analizados por SDS-PAGE seguido de WB en cada fracción. El análisis de los niveles de GAPDH (marcador citoplasmático) y H3 (marcador nuclear) evidencian el correcto fraccionamiento celular en núcleo y citoplasma. Se muestra un experimento representativo de 3.

3.1.7 La activación transcripcional mediada por RE α depende de AGO1

Una vez establecido que AGO1 se una *enhancers* de ER α de forma E2-dependiente, decidimos estudiar si ésta es necesaria para la activación transcripcional disparada por estrógenos. En una primera aproximación, silenciamos a AGO1 mediante la transfección con siRNAs y analizamos los niveles de mRNAs de genes cuya transcripción se activa ante el tratamiento de células MCF7 con E2. Elegimos aquellos genes cuyos *enhancers* se

muestran en la **figura R8**: *TFF1*, *GREB1* y *NRIP1*. Evaluamos los niveles de dichos mRNAs luego de 8 h de tratadas las células con E2. Según lo esperado, los niveles de estos mRNAs, medidos por RT-qPCR, aumentan ante el tratamiento con E2 (**figura R13**). Notablemente, **éste aumento es menor o incluso nulo cuando se silencia a AGO1**.

MCF7: RT-qPCR

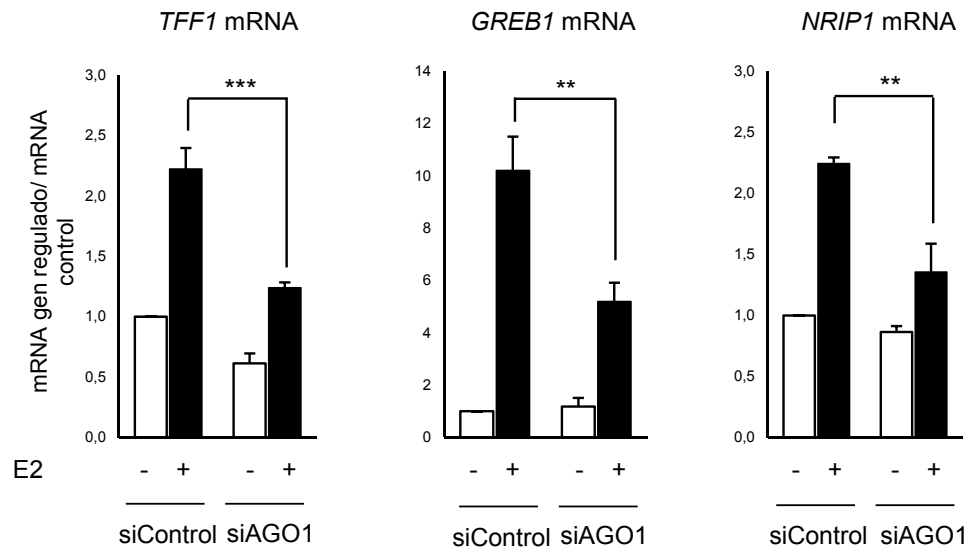


Figura R13. El silenciamiento de la expresión de AGO1 afecta los niveles E2-dependientes de los mRNAs. Células MCF7 fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 8 h. El RNA fue luego extraído y los niveles de los mRNAs indicados fueron analizados mediante reacciones de RT seguidas de qPCR. En todos los casos, los valores se relativizaron a un mRNA control (*PUM1*) y al tratamiento control (siControl, -E2). Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes. Tests estadísticos de ANOVA de dos factores seguido del test de Tukey *post hoc* fueron realizados. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

Dado que las proteínas argonautas son ampliamente conocidas como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica, debemos descartar que el efecto del silenciamiento de AGO1 sobre los niveles de los mRNAs se deba a una función post-transcripcional de AGO1. Para descartar esta posibilidad, decidimos medir los niveles de los pre-mRNAs de *TFF1*, *GREB1* y *NRIP1* utilizando *primers* que amplifican las regiones que abarcan la juntura entre el primer exón y el primer intrón. Para poder medir los niveles de los pre-mRNAs extrajimos el RNA de los núcleos de las células MCF7 tratadas. De esta forma enriquecemos la muestra en pre-mRNAs y podemos medir cambios en sus niveles a menor

tiempo de tratamiento con E2. Sus niveles medidos por RT-qPCR aumentan significativamente ante el tratamiento con E2 durante 1 h (**figura R14.A**). El efecto del silenciamiento de AGO1 se asemeja al observado al analizar los niveles de mRNAs: el aumento disparado por E2 es inhibido o anulado cuando se silencia a AGO1.

Para descartar que este efecto sea un artefacto experimental, analizamos otros pre-mRNAs cuyos niveles no dependen de la activación de ER α . En la **figura 14.B** mostramos un ejemplo de estos. En estos casos no observamos cambios significativos ante el tratamiento con E2 y el silenciamiento de AGO1.

A MCF7: RT-qPCR

B MCF7: RT-qPCR

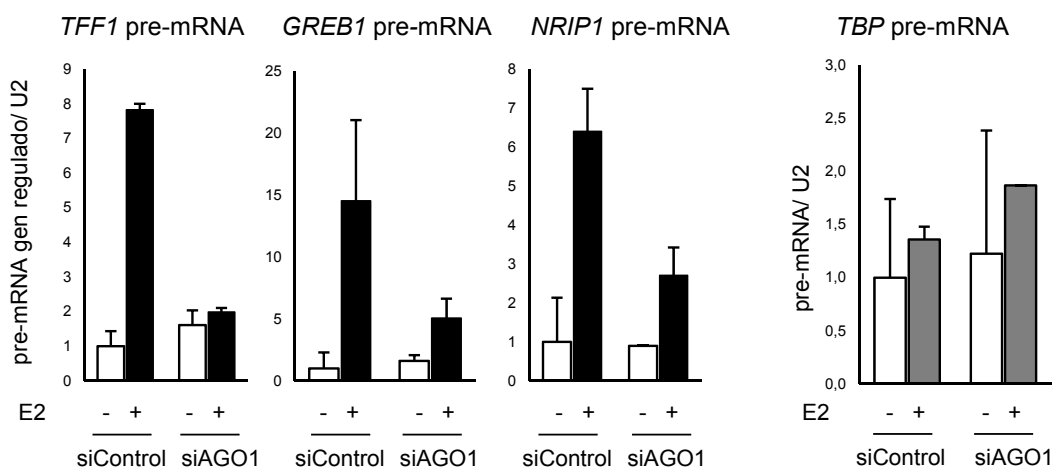


Figura R14. El silenciamiento de la expresión de AGO1 afecta los niveles E2-dependientes de los pre-mRNAs. **A.** Células MCF7 fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 1 h. Las células fueron luego cosechadas y separadas en fracciones citoplasmática y nuclear. El RNA fue extraído de la fracción nuclear y los niveles de los pre-mRNAs indicados fueron analizados mediante reacciones de RT seguidas de qPCR. En todos los casos, los valores se relativizaron a un RNA nuclear control (*U2*) y al tratamiento control (siControl, -E2). Las barras corresponden al promedio \pm DE de tres réplicas correspondientes a un experimento. Se muestra un experimento representativo de dos. **B.** Igual que A. Se muestran los niveles de pre-mRNA de un gen cuya activación transcripcional no depende de E2.

A partir de estos resultados concluimos que AGO1 cumple un rol esencial en la activación transcripcional disparada por la activación del ER α .

3.1.8 La generación de los RNAs de los *enhancers* de ER α depende de AGO1

Una vez establecido que AGO1 es necesario para la activación transcripcional disparada por E2 en las células MCF7, decidimos analizar en mayor detalle cuáles de los procesos que ocurren durante dicha activación se ven afectados por el silenciamiento de AGO1.

Evaluamos, en primer lugar si los niveles de los eRNAs de los *enhancers* de ER α son afectados por el silenciamiento de AGO1. Dado que se ha estimado que el mejor marcador de la actividad de los *enhancers* dependientes de receptores nucleares, decidimos analizar la propia transcripción de los *enhancers* midiendo los niveles de eRNAs por RT-qPCR. Elegimos para esto los *enhancers* de *TFF1* y *GREB1*. Diseñamos los *primers* utilizados en la reacción de qPCR según los datos de GRO-seq (**figura R15.A**). Al igual que al medir los pre-mRNAs, en este caso también partimos de RNA nuclear de células tratadas o no con E2 por 1h. Ante el tratamiento con E2 observamos el aumento esperado de los niveles de eRNAs y comprobamos que el silenciamiento de AGO1 lo anula (**figura R15.B**).

A partir de este resultado concluimos que **AGO1 es necesario para la transcripción de los eRNA de los *enhancers* de ER α , cosa que sugiere que AGO1 tiene un rol fundamental para que ejerzan su papel activador de los genes blanco**, en total consistencia con los resultados de las figuras R13 y R14.

3.1.9 El silenciamiento de AGO1 afecta el reclutamiento de ER α y no el de RNAPII a los *enhancers*

El reclutamiento de ER α es el primer paso de la activación de los *enhancers* que ya se encuentran marcados por el reclutamiento de factores pioneros de la transcripción, factores generales de la transcripción y la maquinaria basal de la transcripción. Este reclutamiento desencadena una serie de eventos que terminan en la activación transcripcional de los genes blanco. Decidimos estudiar, entonces, si el reclutamiento de ER α a los *enhancers* depende de AGO1.

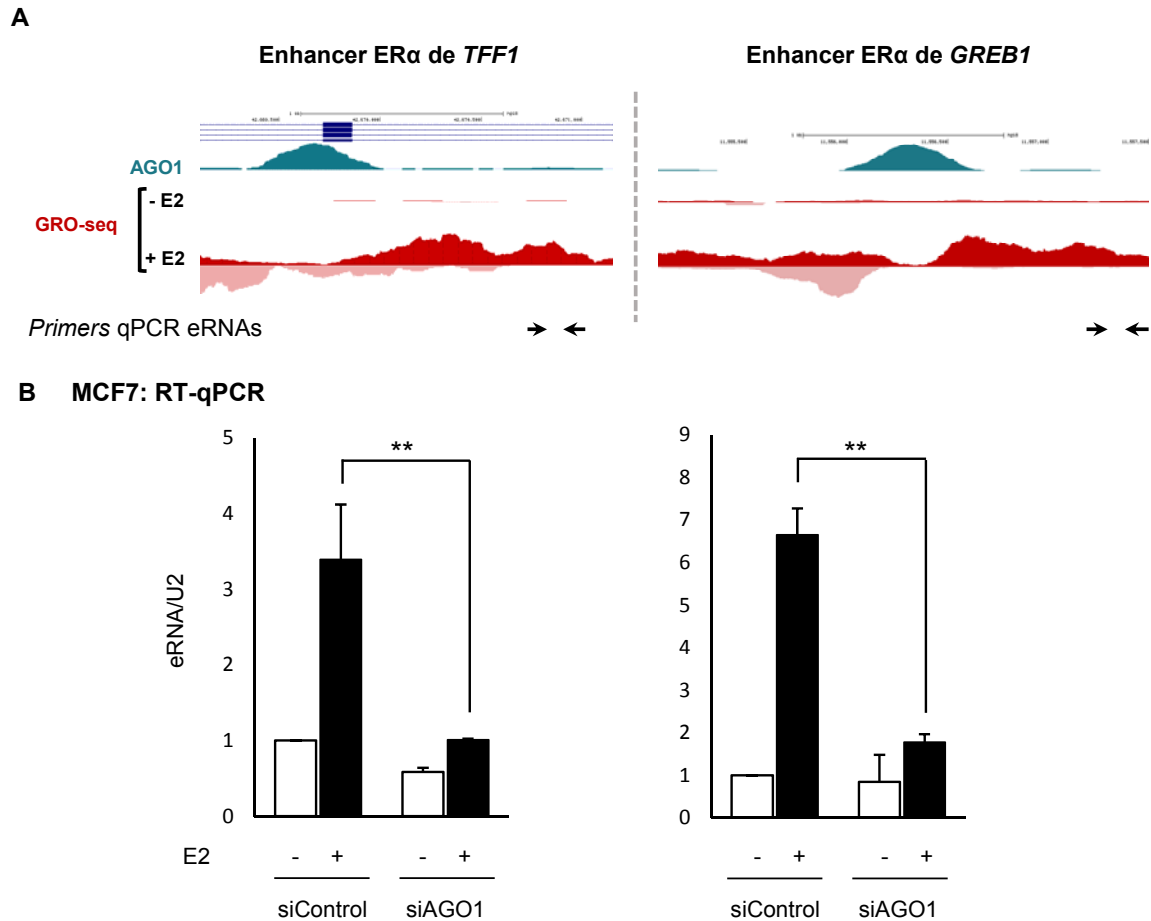
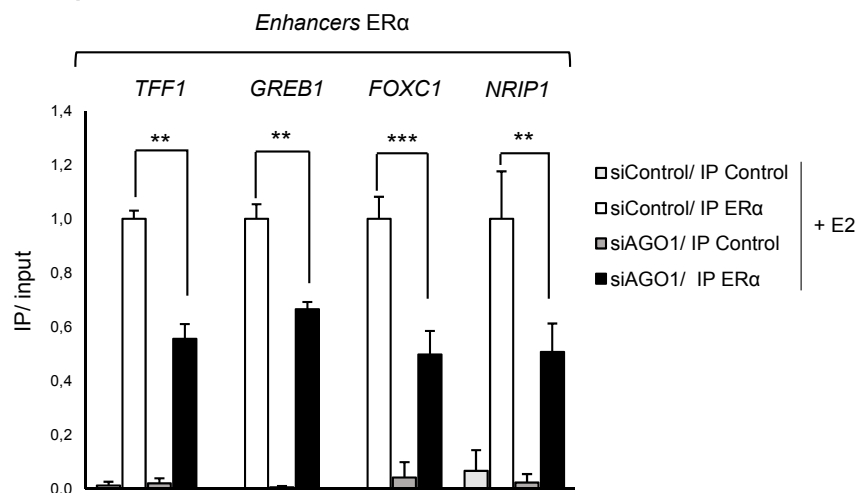


Figura R15. El silenciamiento de la expresión de AGO1 afecta la transcripción E2-dependiente de los *enhancers* de ER α . **A.** Esquema que muestra los sitios de unión de los *primers* (flechas negras) utilizados para amplificar y cuantificar por qPCR los eRNAs de los *enhancers* de ER α indicados. Se muestra el perfil de ChIP-seq de AGO1 y de GRO-seq realizado sin y con E2 **B.** Células MCF7 fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 1 h. Las células fueron luego cosechadas y separadas en fracciones citoplasmática y nuclear. El RNA fue extraído de la fracción nuclear y los niveles de los eRNAs indicados fueron analizados mediante reacciones de RT seguidas de qPCR. En todos los casos, los valores se relativizaron a un RNA nuclear control (*U2*) y al tratamiento control (siControl, -E2). Las barras corresponden al promedio \pm EE de dos experimentos independientes. Tests estadísticos de ANOVA de dos factores seguidos del test de Tukey *post hoc* fueron realizados. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Ensayos de ChIP-qPCR de ER α muestran que su reclutamiento dependiente de E2 disminuye significativamente ante el silenciamiento de AGO1 (**figura R16.A**). Esta

disminución no puede explicarse por una disminución en los niveles totales de ER α ya que estos permanecen invariables luego del silenciamiento de AGO1 (**figura R16.B**). La disminución del enriquecimiento de ER α se explica entonces, por una disminución en el reclutamiento de la proteína a los *enhancers*. También puede explicarse una disminución en la estabilidad de la unión de ER α a las regiones regulatorias. Esto sugiere que AGO1 es necesario para la unión efectiva de ER α a los *enhancers*. Dado que la unión de AGO1 a estos mismos *enhancers* depende a su vez del tratamiento con E2, la unión de AGO1 y la de ER α a los *enhancers* parecen ser interdependientes.

A MCF7: ChIP-qPCR ER α



B MCF7: WB

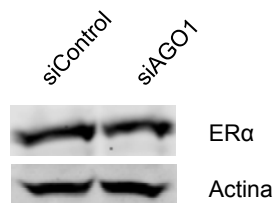


Figura R16. El silenciamiento de AGO1 provoca la disminución del reclutamiento E2 dependiente de ER α a los *enhancers*. **A.** Células MCF7 fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con E2 10 nM (+E2) por 1 h. Ensayos de ChIP-qPCR de ER α fueron realizados luego analizando regiones correspondientes a *enhancers* de ER α . En todos los casos los valores de IP/input fueron relativizados al tratamiento control (siControl). Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes. Test estadísticos t-student fueron realizados. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. **B.** SDS-PAGE seguido de WB que muestra los niveles de ER α , 96 h luego de la transfección de las células MCF7 con siControl o siAGO1. Los niveles de actina sirven como control.

Al medir el enriquecimiento de la RNAPII en los *enhancers* de ER α y en las mismas condiciones observamos, en cambio, que este no cambia ante el silenciamiento de AGO1 (**figura R17**). Como dijimos anteriormente, el “marcado” de los *enhancers* de ER α incluye al reclutamiento de la maquinaria basal de la transcripción que permanece allí de forma inactiva a la espera de la unión de ER α . Esta observación es consistente con el hecho de que AGO1 se une a los *enhancers* de ER α al momento de la activación hormonal no afectando el marcado de los mismos y, por lo tanto, la unión de RNAPII.

MCF7: ChIP-qPCR RNAPII

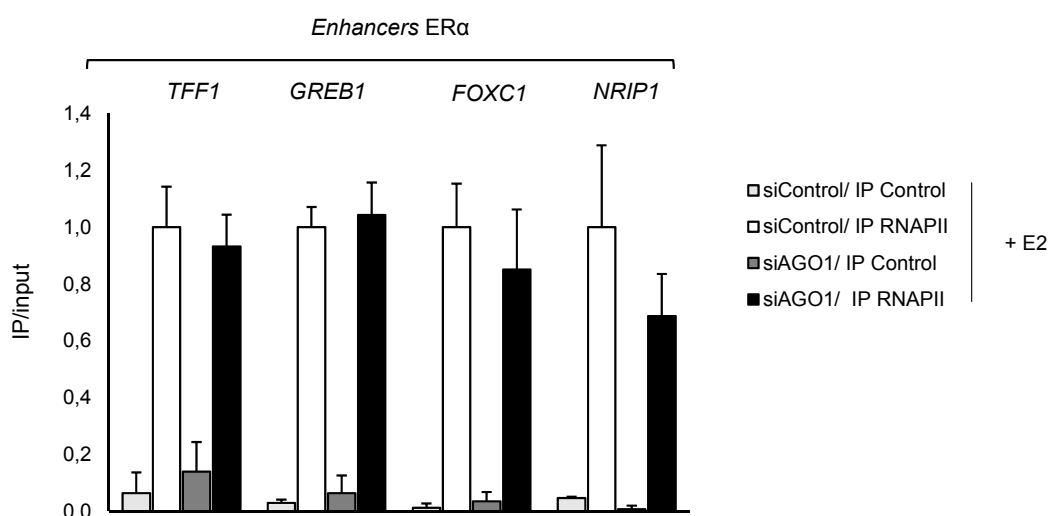


Figura R17. El silenciamiento de AGO1 no afecta al reclutamiento de RNAPII a los *enhancers* de ER α . Células MCF7 fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con E2 10 nM (+E2) por 1 h. Ensayos de ChIP-qPCR de ER α fueron realizados luego, analizando regiones correspondientes a *enhancers* de ER α . En todos los casos los valores de IP/input fueron relativizados al tratamiento control (siControl). Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes.

3.1.10 El silenciamiento de AGO1 reduce la interacción de largo alcance entre un *splicing* dependiente de ER α y el promotor de su gen controlado.

Ante el hallazgo de que AGO1 afecta la activación de los *enhancers* de ER α disparada por E2 decidimos analizar si otro evento que ocurre río abajo de dicha activación es afectado por el silenciamiento de AGO1. Estudiamos la interacción física entre un *enhancer* de ER α y

el promotor de un gen blanco. Según se ha reportado, esta interacción aumenta ante la activación de los *enhancers* dependientes de receptores nucleares (Fullwood *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Elegimos para esto al *locus* del gen de *GREB1*. El *enhancer* que regula su expresión dependiente de E2 se encuentra a 50 kb de su promotor. Para analizar la frecuencia de ocurrencia de esta interacción utilizamos la técnica de Captura de la Conformación de la Cromatina (3C). Brevemente, esta técnica se basa en la ligación de fragmentos de restricción distantes, ligación que se da por cercanía física entre los fragmentos distantes que forman *loops* de cromatina. Sus pasos principales son el entrecruzamiento de la cromatina con las proteínas unidas a ella, fijando de esta manera los *loops* de cromatina, la digestión de la cromatina con una enzima de restricción, ligación en condiciones en las que la muestra se encuentra muy diluida para favorecer la ligación de fragmentos de restricción involucrados en un mismo *loop* y qPCR para cuantificar regiones de DNA producto de la ligación de fragmentos distantes en el genoma. Debimos poner a punto esta técnica en el laboratorio, en la sección de Materiales y Métodos (6.8) detallamos sus pasos. En nuestro ensayo de 3C la región ancla es la región correspondiente al *enhancer* del gen de *GREB1*. Basamos la elección de la enzima de restricción y de las regiones a interrogar en las reacciones de qPCR en las interacciones previamente reportadas mediante la técnica de ChIA-PET de ER α (Fullwood *et al.*, (2009); **figura R18**).

En un resultado coherente con nuestros hallazgos anteriores, observamos que la interacción dependiente de E2 entre el promotor de *GREB1* y del *enhancer* de ER α que regula su expresión disminuye cuando se silencia a AGO1 (**figura R18**).

3.1.11 AGO1 interacciona físicamente con ER α de forma dependiente de E2

Dada la gran asociación funcional que observamos entre ER α y AGO1, decidimos evaluar si estas proteínas son capaces de interactuar directa o indirectamente como parte del mismo complejo proteico. Realizamos para esto ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) utilizando distintos sistemas celulares y estrategias.

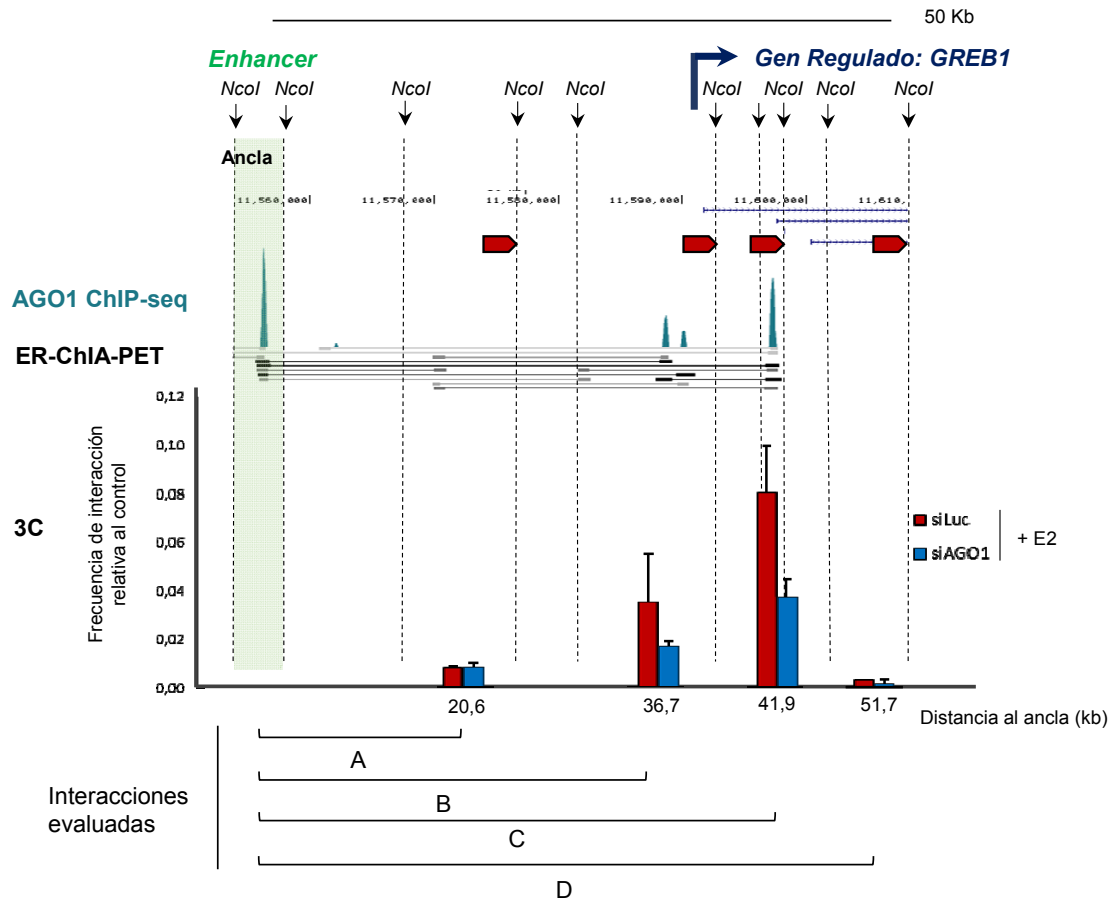
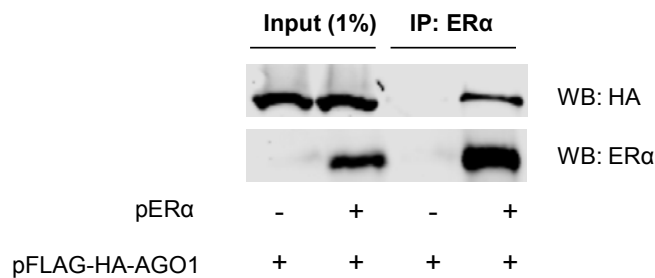
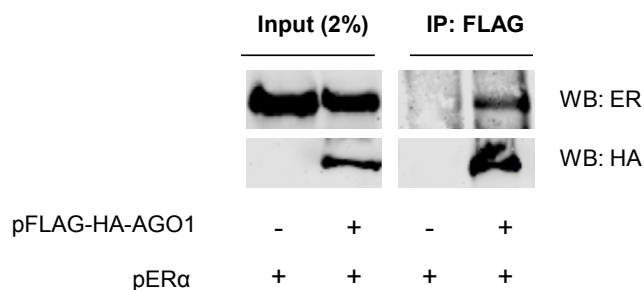


Figura R18. El silenciamiento de AGO1 provoca una disminución en la interacciones de largo alcance entre en *splicing* dependiente de ER α y el promotor de un gen blanco. Células MCF7 fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con E2 10 nM (+E2) por 1 h. Un ensayo de 3C fue realizado luego. En el panel de arriba se muestra al locus analizado, incluyendo al *enhancer* de ER α y al promotor del gen *GREB1*. Con líneas punteadas se indican los sitios de restricción de la enzima *NcoI*. En verde se muestra el fragmento de restricción *ancla* del ensayo. Las flechas rojas indican los fragmentos de restricción cuya interacción con el fragmento ancla se evaluó por qPCR. En el panel del medio se muestran el perfil de ChIP-seq de AGO1 y las interacciones de largo alcance previamente reportadas mediante ChIA-PET. En el panel inferior se muestra el resultado del ensayo de 3C. Se muestra el resultado de un experimento representativo.

En un primer abordaje, evaluamos la posible interacción sobreexpresando tanto a AGO1 fusionada en su extremo N-terminal a los *tags* FLAG y HA (FLAG-HA-AGO1) como a ER α (sin *tags*) en células HEK293. Estas se caracterizan por no expresar al ER α endógeno (**figura R19.A**). Inmunoprecipitamos, en primer lugar, al ER α sobreexpresado utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente a ER α . Dado que las células HEK293 no

expresan a ER α , de esta forma sólo inmunoprecipitamos a la proteína sobreexpresada. FLAG-HA-AGO1 inmunoprecipita junto con ER α . Esto se observa al analizar el inmunoprecipitado por SDS-PAGE y *western blot* revelado un anticuerpo que reconoce específicamente al *tag* HA (**figura R19.A**). Esto no se observa, por el contrario, cuando no se sobreexpresa a ER α , lo cual descarta un artefacto experimental. De forma análoga y complementaria a ésta, inmunoprecipitamos a FLAG-HA-AGO1 utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente al *tag* FLAG. En este caso recuperamos en el inmunoprecipitado a ER α sólo cuando se sobreexpresan ambas proteínas solamente (**figura R19.B**). A partir de esto concluimos que **AGO1 y ER α son capaces de interactuar directa o indirectamente**. Cabe destacar que en estos ensayos de Co-IPs las células HEK293 fueron mantenidas en medio de cultivo con suero fetal bovino normal.

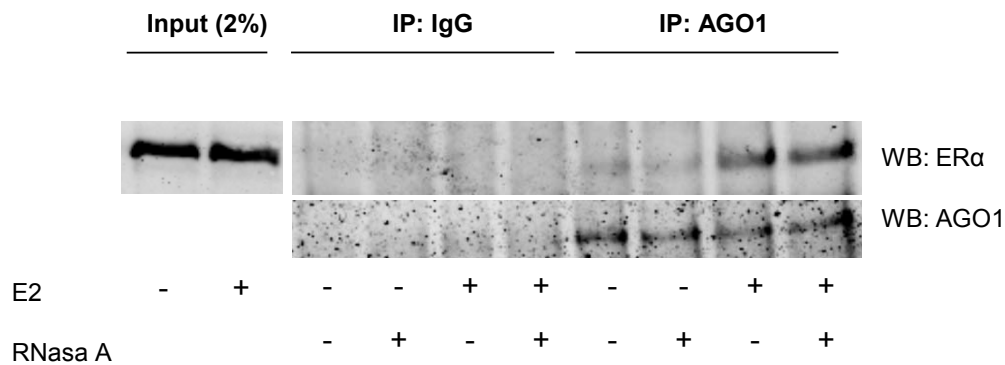
A IP + WB**B IP + WB****Figura R19. AGO1 interacciona con ER α en células HEK293. A.**

Células HEK293 fueron transfectadas con los vectores de expresión de FLAG-HA-AGO1 y ER α según se indica en cada calle. Luego de 48 hs las células fueron lisadas. Una alícuota del lisado fue tomado como material de partida o *input*. Se realizó la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico contra ER α . Se analizaron los niveles de ER α y de FLAG-HA-AGO1 en los *inputs* y en el inmunoprecipitado por SDS-PAGE y *western blot*. **B.** Idem A, pero se realizó la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente al *tag* FLAG.

En un siguiente paso, decidimos estudiar en más detalle esta interacción en relación a la presencia de E2. Dado que las células HEK293 no expresan al ER α de forma endógena, desconocemos su respuesta al E2 aun cuando éstas son transfectadas con un vector de expresión de ER α . Es por esto que decidimos estudiar la interacción entre ER α y AGO1 en las células MCF7 sin sobreexpresar a ninguna de las dos proteínas. Inmunoprecipitamos

AGO1 endógeno partiendo de lisado de células no tratadas o tratadas con E2 y evaluamos por *SDS-PAGE* y *western blot* la presencia de ER α en el inmunoprecipitado. **Verificamos en este experimento que AGO1 y ER α interactúan en el lisado proveniente de células MCF7 (figura R20.A, calles 5 y 7 vs calles 1 y 3) y que esta interacción es mayor ante el tratamiento con E2 (figura R20.A calle 5 vs calle 7).**

A IP + WB



B

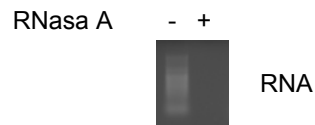


Figura R20. AGO1 interactúa con ER α de forma E2 dependiente y RNA independiente. A. Células MCF7 fueron hambreadas por 72 h y tratadas con vehículo (- E2) o con E2 10 nM (+ E2) durante 1 h. Las células fueron lisadas y una alícuota fue tomada como material de partida o *input*. El lisado fue luego tratado o no con RNasa A 20 ng/ μ l e incubado con 2 μ g de anticuerpo inespecífico o específico contra AGO1. Los niveles de AGO1 y ER α de los inputs e inmunoprecipitados fueron analizados por *SDS-PAGE* y *western blot*. Se muestra un experimento representativo de 2 **B**. Una alícuota fue tomada de los lisados luego del tratamiento con RNasa A. El RNA fue purificado y analizado en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

Dado que la inmunoprecipitación fue realizada partiendo de lisados totales, no podemos explicar la diferencia observada entre tratamientos por diferencias en la localización subcelular de ambas proteínas (que estén en diferentes compartimentos en ausencia de E2 y el mismo en presencia de E2). Esta puede deberse a cambios post-transcripcionales o la conformación de diferentes complejos proteicos. Dado que ER α es sujeto de diversas

modificaciones post-traduccionales ante el tratamiento con E2 (Le Romancer *et al.*, 2011), hipotetizamos que la interacción, directa o indirecta, entre esta y AGO1 depende de las modificaciones post-traduccionales de ER α .

AGO1 es una proteína caracterizada por unirse a RNA a través de la interacción el RNA pequeño cargado. Sorpresivamente, la interacción entre AGO1 y ER α no depende de la presencia de RNA en el lisado. Esto se demuestra porque la interacción continúa siendo observable, y en los mismos niveles, cuando se trata al lisado con RNasa A antes de la inmunoprecipitación (**figura R20.A**, calle 7 vs calle 8). Verificamos la actividad de la RNasa A purificando RNA de una alícuota del lisado (**figura R20.B**).

3.2. AGO1 y la regulación del *splicing* alternativo

Al iniciar el estudio de los posibles roles de AGO1 en la regulación de fenómenos nucleares de células humanas, nos planteamos el objetivo de estudiar si esta proteína está involucrada en la regulación del *splicing* alternativo. Como fue explicado en la introducción, el análisis de los datos del ChIP-seq de AGO1 junto con los del RNA-seq de células transfectadas con siRNAs contra AGO1, ambos experimentos realizados en células MCF7, reveló que, a nivel global, AGO1 está involucrada en la regulación del *splicing* constitutivo y alternativo. Nos planteamos como siguiente objetivo el estudio de los mecanismos específicos por los que AGO1 regula el *splicing* alternativo.

En el capítulo anterior mostramos que AGO1 se une a *enhancers* transcripcionales dependientes de ER α en la línea celular MCF7. Mostramos que AGO1 cumple un rol esencial en la activación transcripcional mediada por estos *enhancers*. Es por esto que para abordar el estudio de la regulación del *splicing* alternativo por AGO1 nos planteamos hacerlo desde el punto de vista de la presencia y activación de *enhancers* de ER α intragénicos y próximos a eventos de *splicing* alternativo. Hipotetizamos de esta manera que la activación de estos *enhancers*, hecho en primera instancia dependiente de AGO1, impacta sobre el patrón de *splicing* alternativo del evento vecino. Decidimos evaluar esta hipótesis en un caso puntual.

3.2.1 El exón alternativo 107 de SYNE2 como modelo de estudio de la regulación del *splicing* alternativo por AGO1

Con el fin de estudiar un posible mecanismo de regulación del *splicing* alternativo por AGO1, nos centramos en el estudio de un evento en particular, el del exón *cassette* alternativo 107 del gen de SYNE2 (E107-SYNE2). Elegimos este evento por varias razones. En primer lugar, en un trabajo publicado previamente por nuestro laboratorio en el que se analizó el patrón de *splicing* de un panel de eventos asociados a procesos tumorales se mostró que el silenciamiento de AGO1 induce cambios en la inclusión de E107-SYNE2 en células de hepatoma humano Hep3B (Alló *et al.*, 2009). En segundo lugar, el primer análisis del ChIP-seq de AGO1 ya publicado (Alló *et al.*, 2014) reveló la existencia de *cluster* de AGO1 en el intrón río abajo de E107-SYNE2. Si bien en el nuevo análisis de estos datos en el que se tomó un umbral más estricto para el filtrado de los *clusters* significativos de AGO1 no se detecta al *cluster* del intrón 107 de SYNE2 como significativo, decidimos continuar con el análisis de este evento de *splicing*. Esto se debe, en particular, a que en esta misma región

también puede identificarse un *cluster* de ER α que se encuentra involucrado en una interacción de largo alcance con una región intragénica (18 Kb río abajo) y con el promotor del gen *ESR2*, situado más de 50 Kb río abajo. También puede detectarse enriquecimiento de H3K27ac en la región intrónica (**figura R21**). Esta evidencia sugiere fuertemente la existencia de un elemento regulatorio de la transcripción en el intrón río abajo de SYNE2-E107. En los experimentos planteados a continuación nos propusimos, según nuestra hipótesis inicial, estudiar si el estado de activación del *enhancer* putativo localizado en el intrón 107 repercute sobre el patrón de *splicing* del exón 107 de SYNE2. Analizamos en particular, si los cambios sobre el *splicing* alternativo pueden explicarse por cambios locales en la tasa de la elongación de la RNAPII.

El gen de SYNE2 codifica a la proteína Nesprin 2 (o NUANCE) de 796 kDa, capaz de interactuar con actina a través de su dominio N-terminal y con la envoltura nuclear a través de su dominio C-terminal. Entre estos extremos, Nesprin-2 se compone de una multiplicidad de dominios de espectrina. Esto le permite actuar como ancla entre el núcleo y el citoplasma celular. El gen de SYNE2 se caracteriza por poseer una multiplicidad de inicios alternativos de la transcripción y de eventos de *splicing* alternativo que dan lugar a proteínas más cortas que pueden carecer del dominio de unión a la actina y de dominios de espectrina. El exón alternativo 107 se encuentra en la cola del gen. Su inclusión no genera cambios en la estructura de dominios de la proteína. En la **figura R21.B** mostramos que alrededor de E107 existen dos promotores alternativos de la transcripción. A partir de la bibliografía sabemos que la exclusión de dicho exón se asocia a tejidos tumorales de ovario, en comparación con tejidos normales (Klinck *et al.*, 2008). Cabe destacar en este punto que nuestro interés en la elección de este modelo radica en las particularidades moleculares especificadas en el párrafo anterior y no así en la posible función o relevancia fisiológica de la regulación del *splicing* alternativo de este evento.

Para evaluar y cuantificar los patrones de *splicing* de E107 de SYNE2 realizamos reacciones RT-PCR radiactiva semicuantitativa (RT-rPCR), usando *primers* que amplifican simultáneamente y de manera competitiva las isoformas de inclusión y de exclusión (**figura R22.A**). Este es un método ampliamente utilizado en nuestro laboratorio para evaluar patrones de *splicing* de una multiplicidad de eventos.

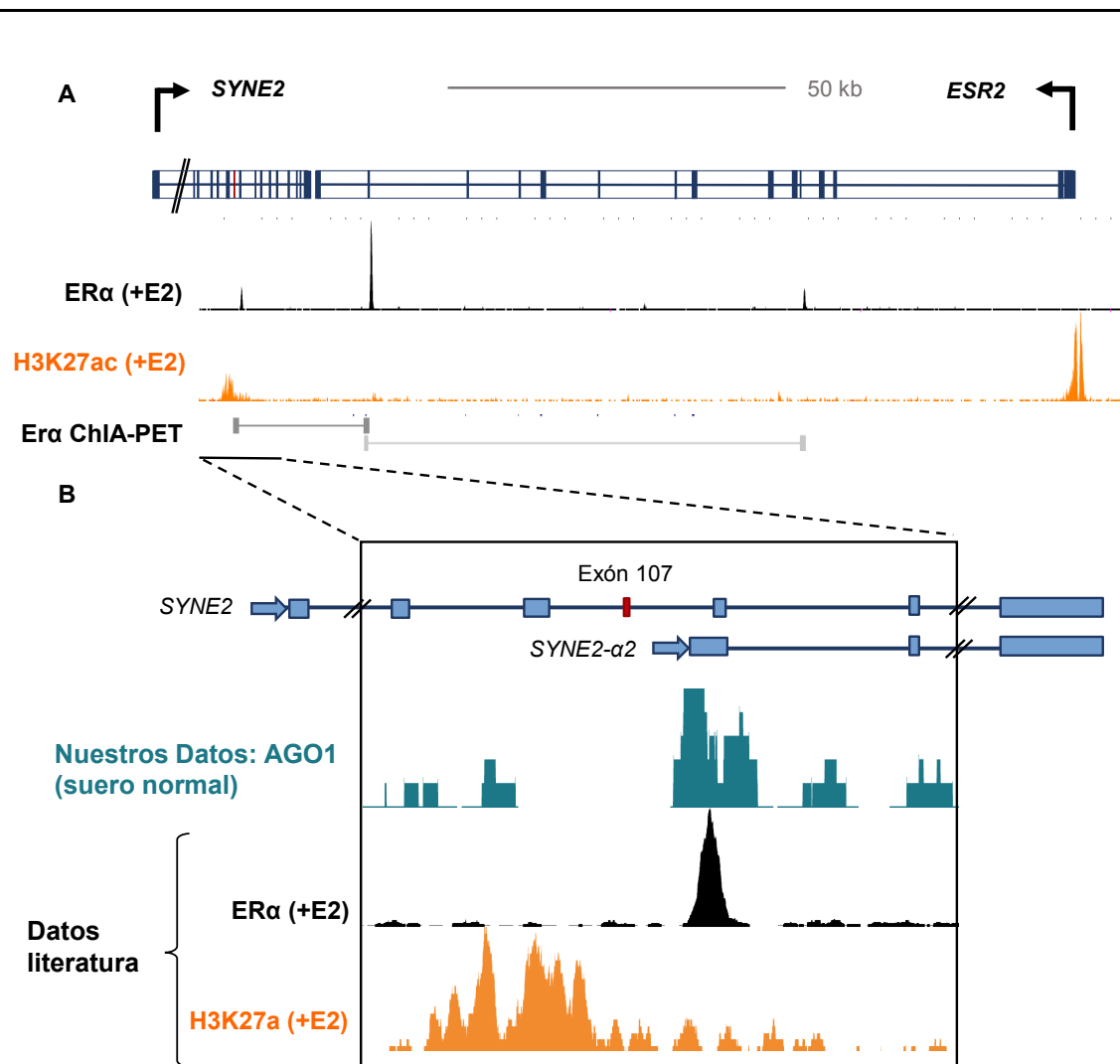


Figura R21. A. Esquema del locus de los genes *SYNE2* y *ESR2*. Los exones se muestran como rectángulos azules y los intrones como rectángulos blancos. Todas las isoformas de cada uno de los genes se presentan colapsados en un único esquema. Abajo se muestran los perfiles de CHIP-seq de ERα (+E2) y de H3K27ac (E2 +) de MCF7 y el resultado de ensayos de ChIA-PET de ERα (+E2) realizados en MCF7. **B.** Ampliación de la región del gen de *SYNE2* que contiene al exón alternativo 107. Se muestran las isoformas correspondientes a TSS alternativos (anotadas en la base de datos RefSeq) halladas en esta región. Se muestra el detalle de los perfiles de CHIP-seq de AGO1 (tomados de células en suero normal) de ERα (+E2) y H3K27ac (+E2).

El nivel de inclusión de E107-SYNE2 de células MCF7 es muy bajo (**figura R22.B**), siendo su cuantificación por este método inviable. Recurrimos entonces, a la línea celular T47D, también de origen tumoral de glándula mamaria humana. Esta se comporta de modo similar a MCF7 en cuanto a la activación transcripcional mediada por ERα. Se ha informado que los

sitios de unión de ER α al genoma son similares en estas dos líneas celulares (Carroll *et al.*, 2006). La activación transcripcional disparada por E2, además, se comporta igual que lo aquí informado para MCF7 en relación al silenciamiento de AGO1 (resultados no mostrados). Para nuestro interés particular, el nivel de inclusión de E107-SYNE2 observable en la línea celular T47D por RT-PCR radiactiva semicuantitativa es mucho mayor y fácilmente cuantificable (**figura R22.B**).

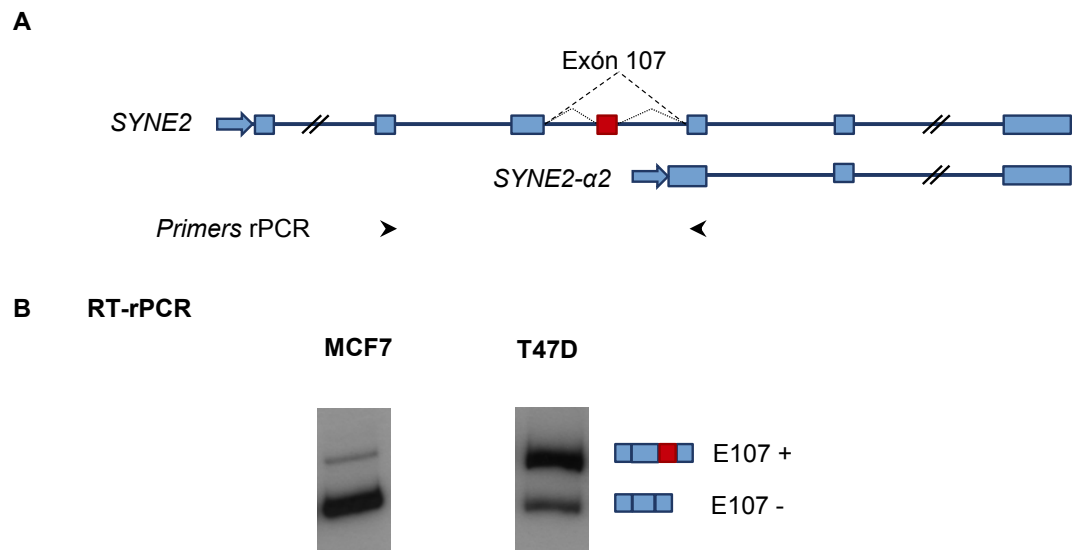


Figura R22. A. Esquema que muestra la región del gen del SYNE2 que incluye al exón alternativo 107 y a los TSS alternativos. Las flechas negras representan los *primers* utilizados para las reacciones de PCR radiactiva (rPCR) que permiten amplificar tanto la isoforma de inclusión como de exclusión del exón 107. **B.** Determinación de los patrones de *splicing* alternativo del exón 107 de SYNE2 en las líneas celulares MCF7 y T47D por RT-rPCR. Se muestran geles de poliácridamida revelados por autorradiografía representativos.

3.2.2 La estructura de la cromatina y la tasa de elongación de la RNAPII afectan los niveles de inclusión de E107 de SYNE2

Evaluamos en primer lugar, el comportamiento de E107-SYNE2 en relación a la tasa de elongación de la RNAPII. Como primera aproximación para determinar si la inclusión de E107 es sensible a la tasa de elongación de la RNAPII evaluamos el efecto tricostatina A (TSA), un inhibidor de deacetilasas de histonas que aumenta la acetilación global de las histonas. Como discutimos en la introducción, el aumento de la acetilación de las histonas provoca que la asociación del DNA a éstas sea más laxa, facilitando el paso de la RNAPII

por los nucleosomas y favoreciendo una mayor tasa de elongación. El tratamiento de células T47D con TSA provoca un aumento en los niveles de inclusión del E107 de SYNE2 (**figura R23**). Esta es la primera evidencia que sugiere que una mayor tasa de elongación de la RNAPII favorece la inclusión de E107.

T47D: RT-rPCR

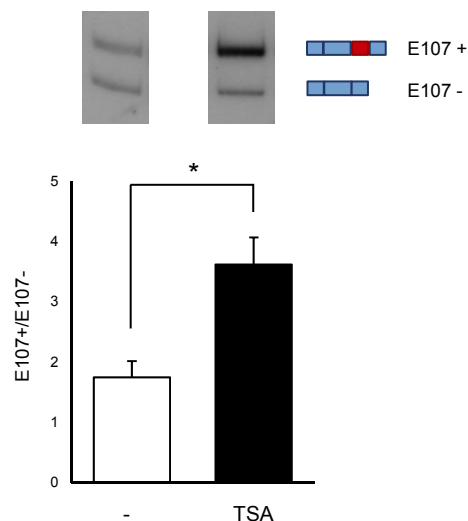


Figura R23. Células T47D fueron tratadas con vehículo (-) o TSA durante 24 h. El RNA fue luego extraído y los patrones de *splicing* fueron determinados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm ES de dos experimentos independientes. Un test estadístico T-Student fue realizado. (*) $p < 0,05$.

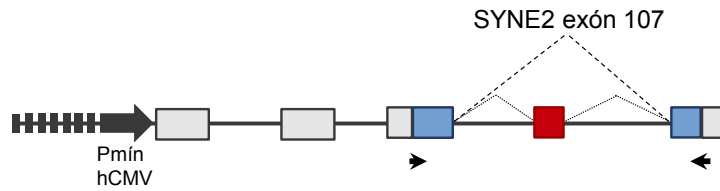
Evaluamos asimismo el efecto de la camptotecina (CPT) sobre el *splicing* de E107. La CPT es un inhibidor de la topoisomerasa II, enzima responsable de desenrollar el DNA a medida que la doble cadena se abre durante la transcripción. La inhibición de esta enzima produce impedimentos a la transcripción que resultan en una disminución global de la tasa de elongación de la RNAPII. Dado que esta droga es tóxica para las células, su tiempo de tratamiento debe ser relativamente corto. Observar cambios en patrones de *splicing* alternativo a pocas horas de tratamiento depende de la vida media de los mRNAs, de modo que estos pueden no ser observables si la vida media es mayor que el tiempo de tratamiento. Para deshacernos de esta variable, decidimos utilizar un minigén reportero del *splicing* alternativo de E107 de SYNE2 de expresión inducible. Este minigén cuenta con el exón alternativo 107, los intrones flanqueantes y parte de los exones constitutivos flanqueantes insertados en el exón 3 del gen de α -globina, todo bajo el control de un promotor inducible en ausencia de tetraciclina y activable por el transactivador Vp16 (**figura R24.A**). Para evaluar el patrón de *splicing* del minigén por RT-rPCR utilizamos *primers* que se unen a la juntura entre los exones de α -globina y de SYNE2 (**figura R24.A**). Decidimos utilizar células HCT116 por su alta eficiencia de transfección con lipofectamina. Esta

estrategia nos permitió agregar la droga al momento de disparar la transcripción del minigén y evaluar su efecto sobre el *splicing* luego de pocas horas de tratamiento. En concordancia con un papel para la elongación, el tratamiento con CPT tiene el efecto opuesto al de la TSA, es decir, disminuye la inclusión del exón alternativo 107 (**figura R24.B**).

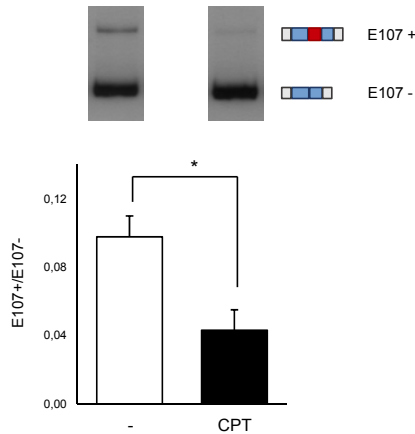
Como evidencia directa de la respuesta de E107-SYNE2 a cambios en la tasa de elongación, evaluamos el efecto de la mutante C4 “lenta” de la RNAPII, cuyo efecto sobre el *splicing* alternativo fue estudiado en nuestro laboratorio (de la Mata *et al.*, 2003) y cuya menor tasa de elongación fue previamente corroborada (Boireau *et al.*, 2007). El experimento se desarrolla de la siguiente manera: co-transfectamos el minigén reportero de *splicing* de E107-SYNE2 y el vector de expresión del transactivador Vp16 junto con los vectores de expresión de las variantes de la RNAPII salvaje (wtR) o mutante (C4) resistentes a la droga α -amanitina. Al momento de la transfección se agrega tetraciclina al medio de cultivo para inhibir la transcripción del minigén. Dejando pasar cierto tiempo luego de la transfección para permitir la expresión de las polimerasas exógenas, se agrega al medio de cultivo la α -amanitina que inhibirá e inducirá la degradación de la RNAPII endógena. De esta manera, se garantiza que la mayor parte de la transcripción que ocurra a partir de este momento sea llevada a cabo por las polimerasas resistentes a α -amanitina. Luego de cierto tiempo, se retira del medio de cultivo la tetraciclina, mientras se mantiene α -amanitina, para permitir la transcripción del minigén reportero de *splicing* alternativo. En este caso también decidimos utilizar las células HCT116 por su alta tasa de co-transfección. La inclusión de E107 disminuye cuando la transcripción es llevada a cabo por la RNAPII C4, resultado que es evidencia directa de que la tasa de elongación de la RNAPII correlaciona inversamente con la inclusión de E107 (**figura R24.C**). Este resultado concuerda plenamente con lo observado ante el tratamiento con TSA y CPT. Concluimos que una mayor tasa de elongación de la RNAPII (TSA) favorece inclusión del exón alternativo mientras que una menor tasa de elongación (CPT y RNAPII C4) favorece su exclusión. Ante esta observación concluimos que el patrón de *splicing* alternativo de E107-SYNE2 puede entenderse, al menos es parte, en el marco del modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo.

Los siguientes experimentos fueron diseñados con el fin de corroborar nuestra hipótesis según la cual en el intrón río abajo del exón alternativo 107 de SYNE2 existe un *enhancer* dependiente de ER α cuya activación repercute sobre su patrón de *splicing*.

A pUHC-SYNE2-E107



B HCT-116: RT-rPCR



C HCT-116: RT-rPCR

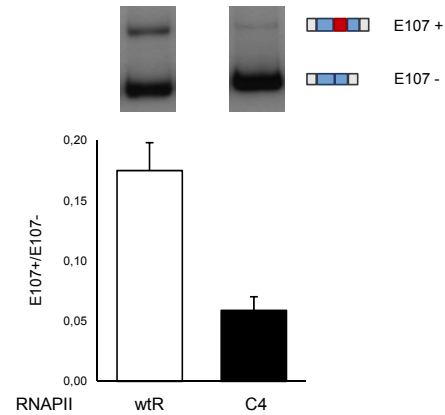


Figura R24. A. Esquema del minigén reportero del *splicing* alternativo de E107-SYNE2 de expresión inducible. En negro se muestra la región promotora que incluye siete copias del operador de respuesta a tetraciclina. En gris claro se muestra al gen de α -globina en cuyo exón 3 fue insertado el exón 107 (gris oscuro) junto con los intrones y exones flanqueantes (gris medio). Las flechas negras representan los *primers* utilizados para las reacciones de rPCR. **B.** Células HCT-116 fueron transfectadas con el minigén pUHC-SYNE2-E107 junto con el transactivador Vp16 Tet-off. Las células fueron mantenidas durante 24 h con tetraciclina. Luego fueron tratadas con vehículo (-) o CPT durante 4 h. El RNA fue extraído y los patrones de *splicing* correspondientes al minigén fueron determinados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm ES de dos experimentos independientes. Un test estadístico T-Student fue realizado. (*) $p < 0,05$. **C.** Células HCT-116 fueron transfectadas con el minigén pUHC-SYNE2-E107 junto con el transactivador Vp16 Tet-off. Las células fueron mantenidas durante 24 h con tetraciclina. Luego de 24 h α -amanitina fue agregada al medio de cultivo, manteniendo la tetraciclina. Luego de 24 h la tetraciclina fue lavada manteniendo la α -amanitina. El RNA fue luego extraído y los patrones de *splicing* correspondientes al minigén fueron determinados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm ES de tres réplicas de un experimento representativo de dos.

3.2.3 La inclusión del E107 de SYNE2 disminuye ante el tratamiento con E2

Ante el tratamiento de las células T47D con E2 durante 20 h induce una disminución significativa en la inclusión de exón *cassette* alternativo E107 en el mRNA de SYNE2 (**figura R25.A**). Al tratar a las células MCF7 con E2, cierta disminución en la inclusión de E107-SYNE2 también es observable. Sin embargo, y como dijimos en el apartado anterior, los niveles de inclusión basales son muy bajos imposibilitado su cuantificación por RT-rPCR (**figura R25.B**).

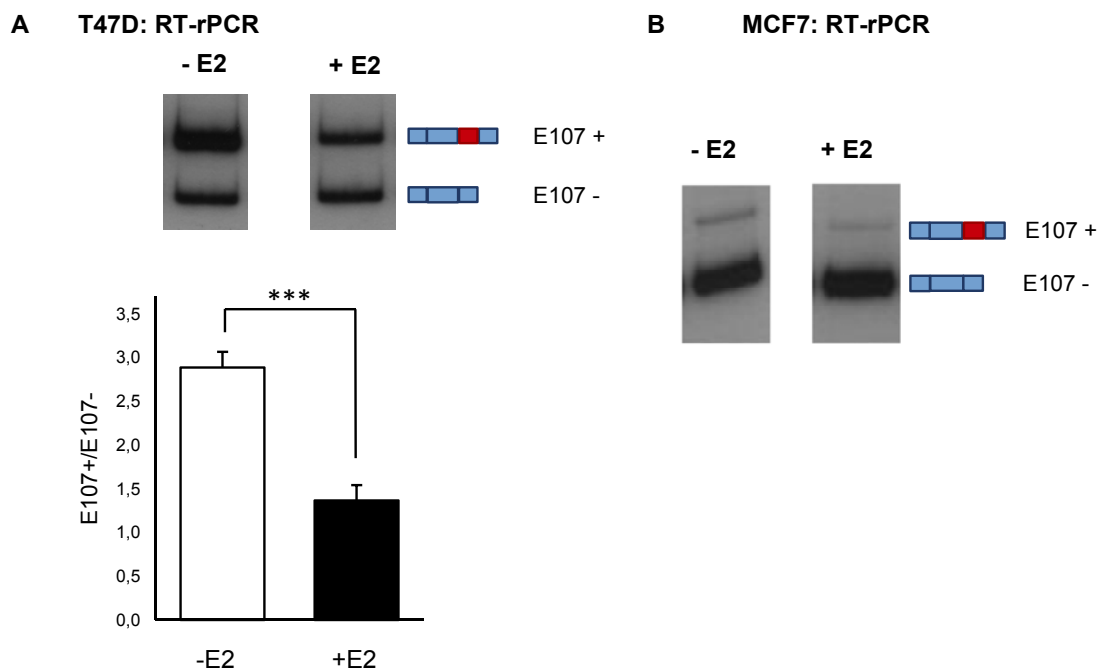


Figura R25. A. Células T47D fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+ E2) por 20 h. El RNA fue extraído y los niveles de inclusión de E107-SYNE2 determinados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm EE de seis experimentos independientes. Un test estadístico T-Student fue realizado. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. **B.** Ídem A, pero utilizando células MCF7. En este caso los niveles de inclusión son muy bajos, estos no son cuantificables por RT-rPCR.

Si bien no podemos descartar efectos indirectos, este resultado nos permite hipotetizar a cerca de un efecto directo del reclutamiento de ER α a la cromatina río abajo del E107 en la promoción de su exclusión el mRNA. Ante el hecho de que una baja tasa de elongación

también favorece la exclusión de E107-SYNE2 (**figura R23 y R24**) postulamos que el reclutamiento de ER α induciría a su vez el reclutamiento de factores de transcripción adicionales involucrados en la activación transcripcional y la formación de interacciones de largo alcance entre esta región y otras, provocando un bloqueo a la RNAPII que viene transcribiendo el gen de SYNE2 y por lo tanto bajando su tasa de elongación de forma local.

3.2.4 El efecto del E2 sobre el *splicing* alternativo de E107 de SYNE2 depende de AGO1

A la luz de los resultados del capítulo anterior que muestran que la activación transcripcional disparada por E2 depende del reclutamiento de AGO1 a los *enhancers* de ER α , decidimos analizar la dependencia del efecto del E2 sobre el patrón de *splicing* alternativo del E107 de SYNE2 con respecto a AGO1. Observamos, en efecto, que la disminución en la inclusión de E107-SYNE2 ante el tratamiento de células T47D con E2 es revertida cuando se silencia a AGO1 (**figura R26**).

T47D: RT-rPCR

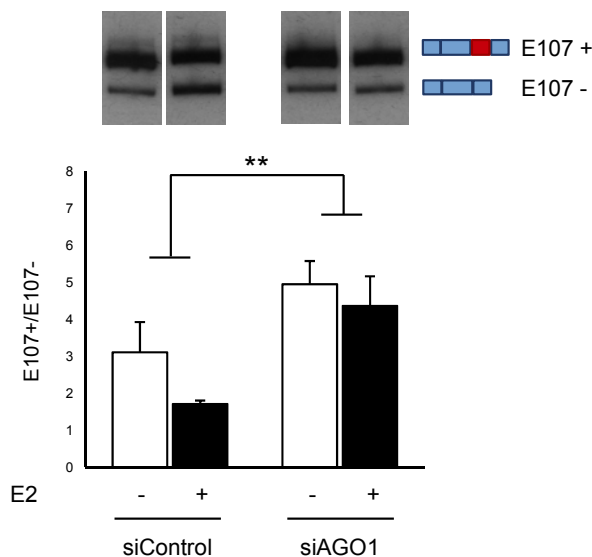


Figura R26. Células T47D fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siAGO1. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 20 h. El RNA fue luego extraído y los patrones de E107-SYNE2 evaluados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes. Un test estadístico de ANOVA seguido de un test de tukey *post hoc* fue realizado. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01, (***) p < 0,001.

3.2.5 Los niveles de mRNA de *ESR2* aumentan con E2 de forma dependiente de la región intrónica río abajo de E107-SYNE2

Nuestra hipótesis de la regulación del *splicing* alternativo de E107-SYNE2 por E2 involucra al hecho de que en el intrón 107 de SYNE2 exista una región *enhancer* de la transcripción dependiente de ER α .

Como primera aproximación para determinar si el intrón 107 de SYNE2 incluye a un *enhancer* de ER α , nos valimos del hecho de que el análisis del ChIA-PET de ER α muestra que el *enhancer* de ER α del intrón 107 interacciona con otra región intragénica 18 Kb río abajo y con el promotor del gen *ESR2* que se encuentra río abajo del de SYNE2 y que se transcribe de forma convergente con éste (**figura R21.A**). Los niveles del mRNA de *ESR2* aumentan significativamente ante el tratamiento con E2 en células T47D y no así los de SYNE2 y de SYNE2- α 2 (**figura R27**). Los niveles de SYNE2- α 1 no son detectables en células T47D (resultado no mostrado).

T47D: RT-qPCR

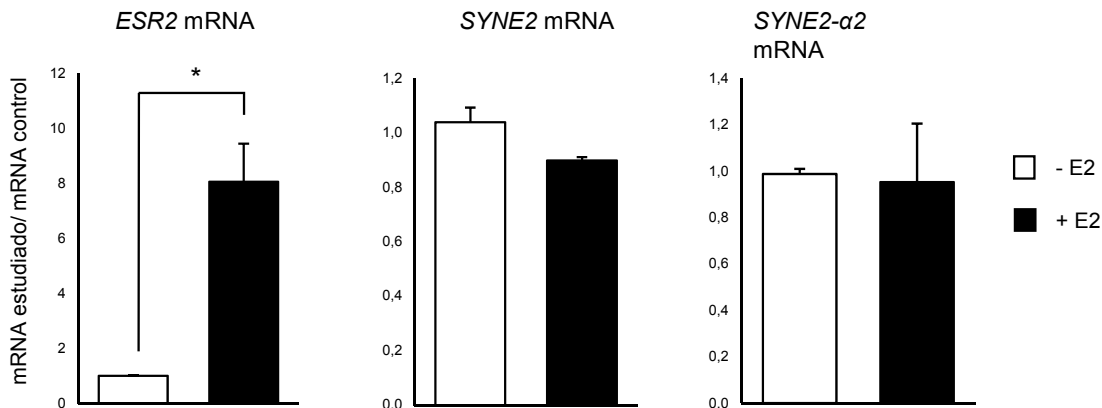
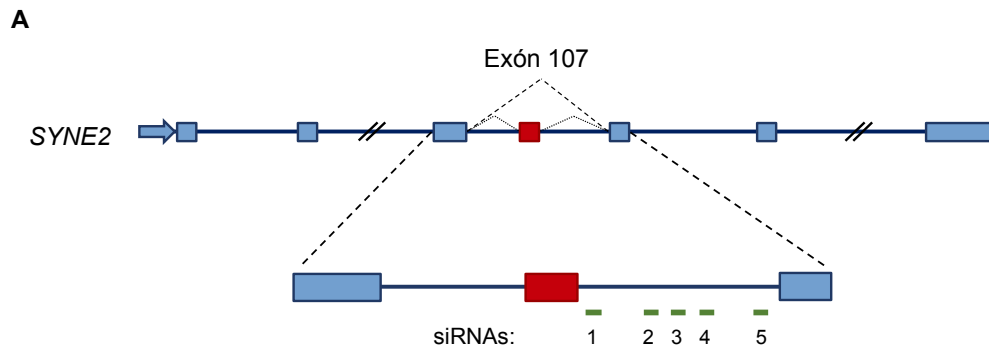


Figura R27. Células T47D fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 8 h. El RNA fue luego extraído y los niveles de los mRNAs indicados fueron analizados mediante reacciones de RT-qPCR. En todos los casos, los valores se relativizaron a un mRNA control (HSPCB) y al tratamiento control (-E2). Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes. Tests estadísticos T-Student fueron realizados. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Para verificar que el sitio de unión de ER α del intrón 107 de SYNE2 es responsable, al menos parcialmente, de la activación transcripcional disparada por E2 del gen de *ESR2*, debemos afectar de alguna manera esta región y observar su efecto en los niveles de

mRNA de ESR2. Basándonos en trabajos previos del laboratorio que muestran que la transfección de siRNAs intrónicos afecta la estructura local de la cromatina favoreciendo la deposición de marcas de histonas represivas de la transcripción (Alló *et al.*, 2009; Schor *et al.*, 2013) transfectamos varios siRNAs de secuencia complementaria sitios a lo largo del intrón 107 (**figura R28.A**).



B T47D: RT-qPCR

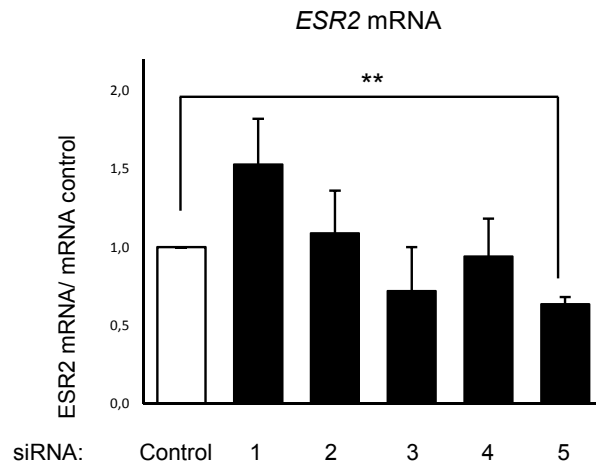


Figura R28. A. Esquema que muestra la región del gen SYNE2 que incluye al exón alternativo 107. Como líneas verdes se esquematizan a los siRNAs de secuencia complementaria a regiones del intrón 107. **B.** Células T47D fueron transfectadas con 25 nM de los siRNAs indicados durante 72 h. El RNA fue luego extraído y los niveles del mRNA de ESR2 fueron evaluados por RT-qPCR. En todos los casos, los valores se relativizaron a un mRNA control (HSPCB) y al tratamiento control (siRNA control). Las barras corresponden al promedio \pm EE de dos experimentos independientes. Tests estadísticos T-Student fueron realizados. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

En un barrido preliminar, realizado en células mantenidas en medio de cultivo con suero normal, observamos que uno de estos, el siRNA número 5, reduce significativamente los

niveles del mRNA de ERS2 (**figura R28.B**). Adicionalmente, la transfección del siRNA 5 reduce significativamente sus niveles dependientes de E2 (**figura R29**). Esta última observación sugiere que la región intrónica de SYNE2 es un *enhancer* de ER α cuyo gen blanco es *ESR2*.

T47D: RT-qPCR

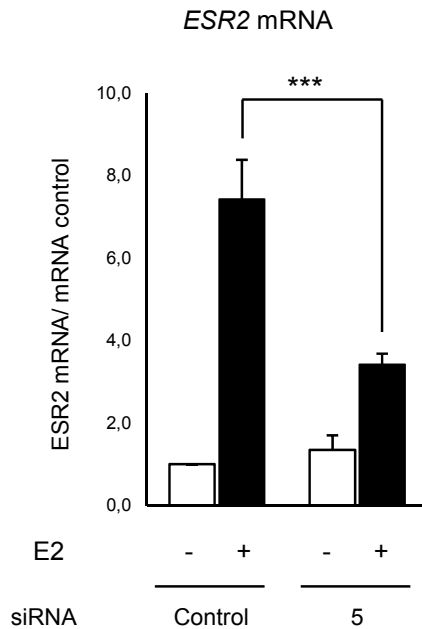


Figura R29. Células T47D fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siRNA 5. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 8 h. El RNA fue luego extraído y los niveles del mRNA de ESR2 fueron evaluados por RT-qPCR. Los valores se relativizaron a un mRNA control (HSPCB) y al tratamiento control (-E2, siRNA control). Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes. Un test estadístico de ANOVA seguido de un test de tukey *post hoc* fue realizado. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

3.2.6 Los siRNAs dirigidos contra el intrón río abajo de E107 afectan su patrón de *splicing* alternativo

Los siRNAs dirigidos contra la región intrónica río abajo de E107 también inducen cambios en el patrón de *splicing* alternativo de dicho exón. En la transfección de los 5 siRNAs que barren todo el intrón, realizada en células mantenidas con medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino normal, se observa que 3 de estos inducen una disminución en la inclusión del exón alternativo (**figura R30**). Este resultado es consistente con la observación anterior acerca de la respuesta de E107-SYNE2 con respecto a la tasa de elongación de la RNAPII. De acuerdo a trabajos publicados por nuestro laboratorio, los siRNAs inducirían la deposición de marcas asociadas a cromatina cerrada, provocando una disminución en la tasa de elongación de la RNAPII y favoreciendo la exclusión de E107-SYNE2.

T47D: RT-rPCR

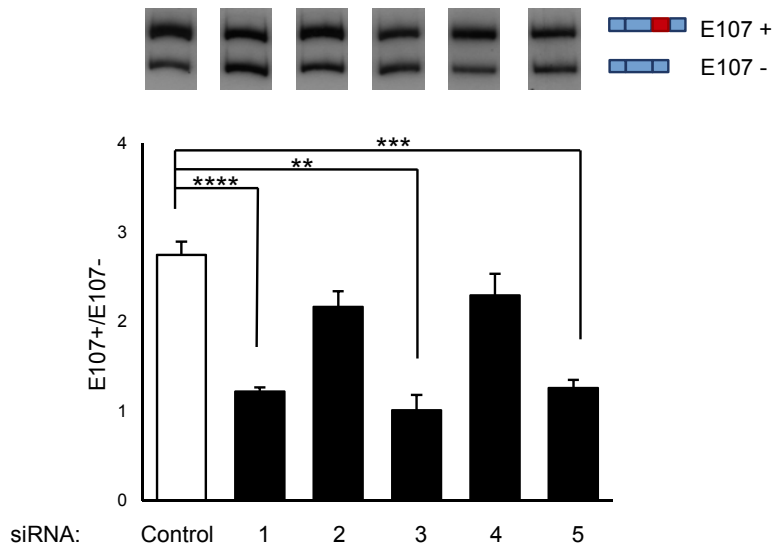


Figura R30. Células T47D fueron transfectadas con 25 nM de los siRNAs indicados durante 72 h. El RNA fue luego extraído y los patrones de *splicing* fueron determinados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm EE de cuatro experimentos independientes. Tests estadísticos de T-Student fueron realizados. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Al evaluar el efecto del siRNA 5 en ausencia y presencia de E2, observamos que esta disminución en la inclusión de E107 es observable en ausencia de E2 y que esta se refuerza en presencia de E2 (**figura R31**).

Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo observado al evaluar los niveles de *ESR2*, el efecto de los siRNAs sobre el *splicing* alternativo de E107 es independiente del efecto del tratamiento con E2. En ausencia de E2 los siRNAs inducen una disminución en la inclusión de E107, disminución que se refuerza ante el tratamiento con E2. La independencia entre los siRNAs y el E2 también se hace evidente si se considera que siRNAs a lo largo de todo el intrón inducen cambios en la inclusión de E107, cosa que no se observa al evaluar la expresión de *ESR2*. Los siRNAs dirigidos contra el intrón 107 inducen cambios que, *per se* afectan la inclusión de la E107. Los cambios que no repercuten sobre el supuesto *enhancer* intrónico de ER α no afectan la expresión dependiente de E2 de *ESR2*.

Si bien no evaluamos cambios a nivel de la tasa de elongación alrededor del exón alternativo 107 de SYNE2 ante el tratamiento con E2, la evidencia hasta aquí acumulada respecto a su regulación apoya nuestra hipótesis de trabajo inicial según la cual la activación

del *enhancer* de ER α intrónico, junto con todos los eventos asociados a esta activación (reclutamiento de co-factores, de maquinaria de la transcripción, de grandes complejos proteicos que intervienen en la formación de *loops* con otras regiones del genoma, etc) representa un obstáculo a la RNAPII que viene transcribiendo el gen de *SYNE2*. En este contexto, la reducción en la tasa de elongación favorecería la exclusión del exón alternativo 107.

T47D: RT-rPCR

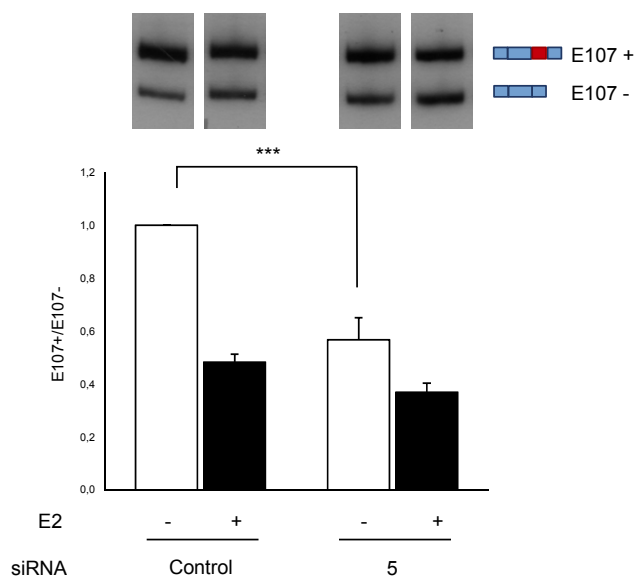


Figura R31. Células T47D fueron transfectadas con 25 nM de siControl o siRNA 5. A las 24 h estas fueron hambreadas durante 72 h y luego tratadas con vehículo (-E2) o E2 10 nM (+E2) por 20 h. El RNA fue luego extraído y los patrones de *splicing* fueron determinados por RT-rPCR. Arriba se muestran geles de poliacrilamida revelados por autorradiografía representativos de cada tratamiento. En cada caso se calcula la relación entre las cuentas de la banda de inclusión y las de la banda de exclusión. Las barras corresponden al promedio \pm EE de tres experimentos independientes. Un test estadístico de ANOVA seguido de un test de *tukey post hoc* fue realizado. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.



4. DISCUSIÓN

4.1 AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos

La evidencia acumulada en torno a los roles nucleares de las proteínas argonauta en mamíferos, y en humanos en particular, dista de ser esclarecedora. Esto puede deberse en parte al hecho de que en humanos las AGOs fueron principalmente estudiadas en su rol como efectores del silenciamiento post-transcripcional mediado por RNAs pequeños de interferencia, fenómeno que ocurre en el citoplasma. Además, muchos estudios tendientes a dilucidar las funciones de AGOs a nivel de la transcripción se han sesgado hacia el análisis de posibles mecanismos de silenciamiento transcripcional análogos a los descritos en otras especies eucariotas. Los primeros trabajos que mostraron esta posibilidad se centraron en la transfección de siRNAs que inducen la formación de heterocromatina facultativa en las regiones blanco de forma AGO1 dependiente y de forma análoga al TGS ampliamente caracterizado en la levadura *S. pombe* (Chu *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2004; Riggs *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2006, 2007). A partir de entonces una intensa búsqueda de siRNAs endógenos, capaces de inducir esta respuesta transcripcional, se inició sin muchos frutos. Durante esta búsqueda algunos trabajos que utilizaron a células humanas y a la mosca *D. melanogaster* como sistemas experimentales demostraron que ciertas proteínas argonautas estarían involucradas en la regulación de la transcripción por otros mecanismos (Cernilogar *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Moshkovich *et al.*, 2010). En las células humanas se demostró que AGO1 se asocia a promotores de la transcripción preferentemente activos y que interacciona con la maquinaria transcripcional (Huang *et al.*, 2013). En *D. melanogaster* se demostró que AGO2 (que no es homóloga a AGO2 de humanos) también se asocia a regiones genómicas de transcripción activa y que es necesaria para la activación transcripcional de algunos genes (Cernilogar *et al.*, 2011; Moshkovich *et al.*, 2011).

En este marco desarrollamos en el laboratorio un trabajo (previo a esta tesis) en el que indagamos acerca del rol nuclear de AGO1 analizando su asociación a la cromatina a nivel del genoma completo en células tumorales humanas de origen mamario, evitando de esta forma sesgos hacia el estudio del silenciamiento transcripcional. Este análisis reveló que AGO1 se une a *enhancers* transcripcionales, preferentemente cuando estos se encuentran activos (Allo *et al.*, 2014). Esto concuerda con los trabajos surgidos en paralelo que

muestran a AGOs asociados a la activación transcripcional tanto en humanos como en *D. melanogaster* (Cernilogar *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Moshkovich *et al.*, 2011). A la luz de este hallazgo decidimos indagar si AGO1 está involucrada en la regulación de la actividad de estos *enhancers* y por qué mecanismos.

En función de estos objetivos, en este trabajo de tesis demostramos que AGO1 se asocia a *enhancers* dependientes de ER α , que es necesario para la activación transcripcional de los genes blanco disparada por E2 y que interacciona físicamente con ER α .

Dado que los hallazgos acá reportados son relativamente novedosos y se contraponen en gran medida a lo que sabemos acerca de esta familia de proteínas en los variados organismos en los que ésta fue estudiada, gran parte de los esfuerzos descritos en esta tesis fueron realizados con el fin de demostrar de múltiples maneras, algunas más directas que otras, que AGO1 es un factor que interviene en la activación transcripcional disparada por estrógenos. Así, los resultados de numerosas estrategias experimentales tomados en conjunto apoyan la idea de que AGO1 está directamente involucrada en esta activación transcripcional. Si bien los resultados que muestran cambios en la actividad transcripcional de los *enhancers* (**Figura R15**) y de sus genes blanco (**Figuras R13 y R14**) y en el reclutamiento de ER α a los *enhancers* ante el silenciamiento de AGO1 (**Figura R16**) pueden explicarse por acción indirecta, el hecho de que AGO1 se asocie a los *enhancers* de forma E2-dependiente (**Figura R11**) y que este interaccione con ER α en el mismo complejo proteico (**Figuras R19 y R20**) sugieren fuertemente que AGO1 interviene directamente en esta regulación transcripcional.

Resulta muy llamativa la fuerte correlación entre los perfiles de ChIP-seq de AGO1 y ER α (**Figuras R2, R3, R4 y R8**), correlación que se asemeja a la observada entre ER α y otros factores de transcripción. Ante la posibilidad de que el ChIP-seq de AGO1 sea en realidad el resultado de un artefacto experimental, validamos algunos de los *clusters* silenciando a AGO1 con siRNAs (**Figura R9**). Ante la observación de que el silenciamiento específico reduce el enriquecimiento de AGO1 en estos *clusters*, concluimos que estos corresponden al enriquecimiento *bona fide* de AGO1. Si bien la especificidad del anticuerpo que reconoce a AGO1 ya había sido verificada en el trabajo ya publicado (Alló *et al.*, 2014), muchos artefactos que se observan en los ensayos ChIP-seq son intrínsecos a la técnica y a su análisis e independientes del anticuerpo que se utilice (Teytelman *et al.*, 2013). Verificar que los *clusters* asociados a *enhancers* de ER α correspondan a enriquecimiento real de AGO1 resulta de vital importancia dado el rol novedoso que le estamos asignando a AGO1 con este trabajo.

En los casos en los que analizamos el efecto del silenciamiento de AGO1 sobre los niveles de los mRNAs en condiciones sin y con la hormona esteroidea no observamos que este anule totalmente el efecto del E2 (**Figura R13**). Al analizar los niveles de los pre-mRNAs y a menor tiempo de tratamiento con la hormona, sin embargo, sí observamos que el silenciamiento de AGO1 anula casi totalmente el efecto del E2 (**Figura R14**). Lo mismo se observa al analizar los niveles de los eRNAs (**Figura R15**). Si bien la primera observación podría explicarse por el hecho de que el silenciamiento de AGO1 no es total, esta última observación sugiere que esta puede explicarse por la vida media de los mRNAs. En esta línea de observación, sí resulta llamativo que ante el silenciamiento de AGO1 la reducción de los niveles de ER α reclutados a los *enhancers* de forma E2 dependiente no es total, sobre todo si se considera que, en las mismas condiciones experimentales, el efecto sobre la generación de los eRNAs es total. Esto es consistente, sin embargo, con el hecho de que en condiciones basales, esto es sin E2, observamos cierto enriquecimiento de ER α .

Según nuestros resultados experimentales, los niveles de RNAPII totales en los *enhancers* de ER α no son afectados por el silenciamiento de AGO1 (**Figura R17**). Esto lo explicamos por el hecho de que el reclutamiento de la maquinaria transcripcional es uno de los fenómenos observados durante el marcado de los *enhancers*, es decir, que ésta preexiste a la activación por el estímulo hormonal. Si bien los análisis a nivel de genoma completo muestran que en promedio los niveles de RNAPII sobre los *enhancers* aumentan ante el estímulo hormonal, el análisis a nivel de *loci* únicos muestra que en muchos casos este aumento no ocurre o si lo hace, este es de baja magnitud y es sólo observable a tiempos muy cortos de estímulo. Siendo que AGO1 se une a los *enhancers* junto con ER α al momento de la activación hormonal (**Figura R11**), el hecho de que fenómenos que ocurren antes de esta activación no se vean afectados por su silenciamiento es consistente con la ausencia de cambio en el reclutamiento de RNAPII. En la misma línea de razonamiento, pudimos comprobar la existencia de una interacción entre un *enhancer* de ER α y el promotor de su gen blanco, un fenómeno que ocurre luego del estímulo hormonal y que se reduce ante el silenciamiento de AGO1 (**Figura R18**).

Como dijimos al principio de la Discusión, los efectos del silenciamiento de AGO1 pueden explicarse por acción indirecta de AGO1. El hecho de que AGO1 y ER α interactúen en el mismo complejo proteico es consistente, sin embargo, con un rol directo de AGO1 en la activación transcripcional. A esta evidencia hay que sumar el hecho de que AGO1 sobreexpresado en una línea celular ER- conserva la capacidad de interactuar con ER α , también sobreexpresado (**Figura R19**). En este punto nos resulta interesante el hecho de que la interacción detectada entre las proteínas endógenas en MCF7 es dependiente de E2

(Figura R20). Dado que la co-inmunoprecipitación fue analizada a partir de lisados totales, no podemos decir que esta observación se deba a diferencias en la localización subcelular de las proteínas entre los tratamientos. Dado que sabemos que ER α sufre muchas modificaciones post-transcripcionales ante el estímulo hormonal (Le Romancer *et al.*, 2011) podemos hipotetizar que estas modificaciones afectan la interacción con AGO1 de forma dependiente del estímulo hormonal.

En este punto vale la pena detenernos en el análisis de la localización subcelular de AGO1: en células MCF7 esta es mayoritariamente nuclear e independiente del estímulo con E2 **(Figura R12)**. Análisis de la localización subcelular realizados por otros (Ahlenstiel *et al.*, 2012; Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012; Gagnon *et al.*, 2013) y por nosotros en otras líneas celulares (que no expresan a receptores de hormonas esteroideas) revelan que, en general, esta suele ser citoplasmática y nuclear en proporciones similares. Nuestro resultado sugiere que características propias de las células MCF7 provocan esta distribución distintiva.

A partir de la evidencia aquí presentada y considerada en su conjunto, concluimos que AGO1 es un factor involucrado en la activación transcripcional disparada por estrógenos. En la **figura D1** mostramos el modelo de marcado y activación de los *enhancers* dependientes de ER α ampliado según este hallazgo.

Dadas la naturaleza de las proteínas argonautas y las otras funciones con las que estas fueron caracterizadas a lo largo de múltiples sistemas experimentales, surgen varios interrogantes que discutiremos en las siguientes secciones.

4.1.1 ¿AGO1 sólo en *enhancers* de ER α ?

Aun cuando se observa una fuerte correlación entre los perfiles de CHIP-seq de AGO1 y de ER α **(Figuras R2, R3, R4 y R8)**, la proporción de *clusters* de ER α que solapan con los de AGO1 es relativamente baja **(Figura R5)**. Esto puede deberse a que AGO1 interviene en un subconjunto de *enhancers* de ER α muy específico, con características ya sea de secuencia o de asociación de TFs muy específicas, o también puede explicarse por la sensibilidad del anticuerpo que reconoce a AGO1 en comparación con la del anticuerpo que reconoce a ER α . En este trabajo no indagamos a cerca de la primera posibilidad. Un análisis bioinformático que revele si existe alguna asociación preferencial de AGO1 con otro TF en los sitios de unión de ER α podría ponerla a prueba. No hay que perder de vista, sin embargo, que el CHIP-seq de AGO1 fue realizado en células mantenidas con suero normal. Este sirvió para plantear correlaciones generales pero no es comparable con el de ER α que fue realizado en células tratadas con E2. Profundizar en un análisis comparativo no sería

del todo correcto. El hecho de que el ChIP-seq de AGO1 haya sido realizado en condiciones de suero normal tal vez explique la baja proporción de *clusters* de ER α que solapan con esta proteína.

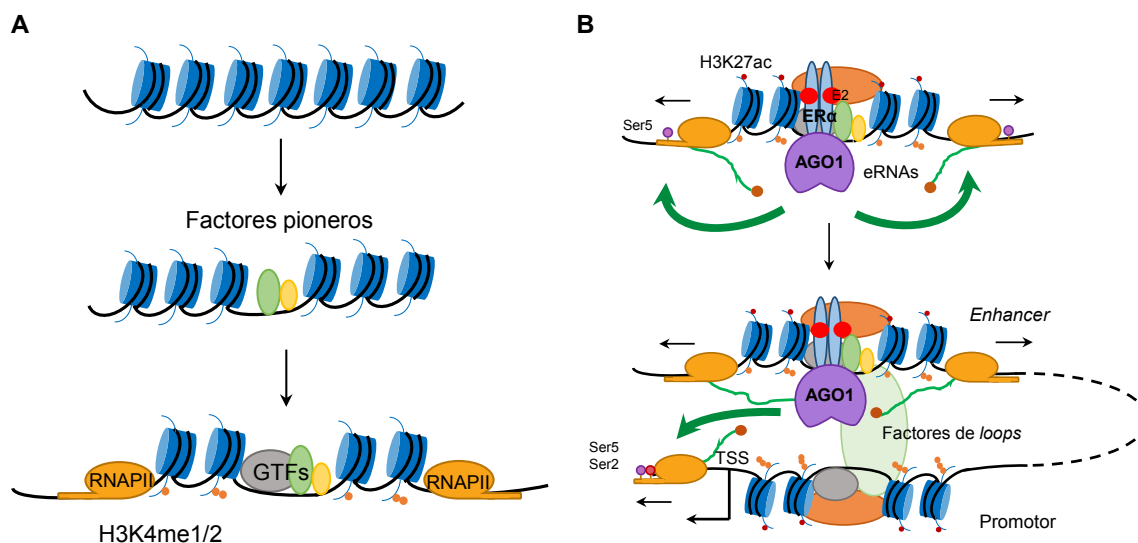


Figura D1. AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos.

A. Esquema que representa el marcado de los *enhancers*, en el que no interviene AGO1, según nuestros resultados. **B.** Esquema que muestra la activación transcripcional de los *enhancers* de ER α y de sus genes blanco ante el estímulo hormonal. Según nuestros resultados, AGO1 interacciona con ER α y se une a los *enhancers* de forma dependiente de E2 donde contribuye a su activación hormonal. También contribuye a la formación de los loops entre *enhancers* y los promotores de sus genes blanco y, en consecuencia, a su activación transcripcional.

El análisis inverso, es decir de la proporción de *clusters* de AGO1 que solapan con los de ER α , parece indicar que, al menos en las condiciones ensayadas, AGO1 se asocia casi exclusivamente a los *enhancers* dependientes de ER α (**Figura R5**). De los *clusters* de AGO1 que se asocian a regiones enriquecidas en H3K4me1 y H3K27ac, el 69 % solapa con *clusters* de ER α . Cabe preguntarnos, sin embargo, si AGO1 se asocia a la activación de otros sistemas de *enhancers*. Podemos preguntarnos, en principio, si se asocia a *enhancers* asociados a otros receptores de hormonas esteroideas. Si bien los *enhancers* de PR solapan parcialmente con los de ER en células MCF7 (Mohammed *et al.*, 2015), los análisis bioinformáticos mostrados en este trabajo muestran claramente que, al menos en las condiciones ensayadas, la asociación de AGO1 con sitios de unión de PR (con

progestágenos) depende de que estos también funcionen como sitios de unión de ER (con estrógenos) (**Figura R2**). Resulta evidente, sin embargo, que para poder establecer si AGO1 se asocia a *enhancers* dependientes de otros receptores nucleares habrá que analizar su unión a la cromatina ante el estímulo hormonal correspondiente. El hecho de que AGO1 se asocie a sitios de unión de ER exclusivamente puede deberse a que las células en suero fetal bovino normal se asemejen más a células tratadas con estrógenos que con progestágenos.

Cabe mencionar que uno de los trabajos anteriores que muestra que AGO1 se asocia a promotores de genes activos en células humanas fue realizado utilizando células PC3 derivadas de un tumor de próstata y que expresan al AR y que, por lo tanto, responden a andrógenos (Huang *et al.*, 2013). Si bien en este trabajo no se analiza la transcripción asociada a grupos de TFs en particular, cabe preguntarse si AGO1 se asocia en este sistema a *enhancers* que responden a AR en particular. El hecho de que las células PC3 no expresan a ERs sugiere fuertemente que la asociación de AGO1 con la transcripción disparada por estrógenos no es exclusiva del caso estudiado en esta tesis.

Por otro lado, en paralelo al ChIP-seq de AGO1 realizado en MCF7, también fue realizado un ChIP-seq de AGO1 en células MCF10a (datos no publicados). Estas son células derivadas de tejido normal mamario inmortalizadas en cultivo y no expresan ERs ni PR mientras que sí expresan a GR. Llamativamente, en esta línea celular no se encontró asociación alguna de AGO1 a la cromatina (resultados no publicados). Esto favorece la idea que AGO1 se asocia a *enhancers* de ER casi exclusivamente. Vale insistir con la idea, de todos modos, de que para abordar la pregunta acerca de si AGO1 se asocia a otros sistemas de *enhancers* habrá que encarar el análisis con los estímulos adecuados.

4.1.2 ¿AGO1 y RNAs pequeños en la activación transcripcional?

Las proteínas argonauta son las únicas caracterizadas como capaces de unir a RNAs pequeños, unión que determina sus blancos de acción tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional. ¿El rol de AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógenos aquí descrita por primera vez depende de su unión a RNAs pequeños o está mediado por interacciones proteína-proteína?

En este trabajo no evaluamos de forma directa la implicancia de RNAs pequeños en el rol de AGO1 en la activación transcripcional. La evidencia de que la interacción de AGO1 con ER α no depende de RNA (**Figura R20**) sugiere que, al menos en lo que a la participación conjunta en complejos proteicos se refiere, AGO1 no estaría mediando interacciones

proteína-RNA. De esta forma no estamos evaluando, sin embargo, que para la activación transcripcional sí se requiera de la asociación de AGO1 con RNA. Responder a este interrogante de forma directa requiere analizar si mutantes de AGO1, incapaces de unir a RNAs pequeños, conservan la capacidad de interactuar con ER α , de unirse a los *enhancers* y de contribuir a la activación transcripcional disparada por E2.

Se ha informado que la asociación de AGOs con RNAs pequeños es muy estable. Las AGOs suelen co-purificar con RNAs y es muy difícil (sino imposible) romper esta asociación (Elkayam *et al.*, 2012). Si esto es así *in vivo* y en nuestro sistema de estudio, cabe suponer que AGO1 asociado a los *enhancers* se encuentra unido a RNAs pequeños, cosa que no significa que estos sean relevantes para la función de AGO1 en la activación transcripcional. Otra estrategia experimental que serviría para el abordaje de esta pregunta es, entonces, el análisis de los RNAs pequeños asociados a AGO1 y si estos cambian ante el estímulo hormonal. Este abordaje es complementario con el anterior.

En ninguno de los trabajos publicados por otros laboratorios que muestran que AGOs están implicados en la activación transcripcional, tanto en *D. melanogaster* como en humanos, se encara la pregunta acerca de los RNAs pequeños de forma directa (Cernilogar *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Moshkovich *et al.*, 2011). En uno de los trabajos realizado en *D. melanogaster* detectan un aumento de la co-inmunoprecipitación de AGO2 con RNAs asociados a promotores ante la activación transcripcional, pero en este análisis no se analiza específicamente los RNAs pequeños cargados en AGO2 (Cernilogar *et al.*, 2011). En otro trabajo muestran que AGO2 de *D. melanogaster* no se asocia a regiones genómicas en las que se producen siRNAs endógenos (Moshkovich *et al.*, 2011).

A diferencia de lo que ocurre en *D. melanogaster*, en mamíferos no se ha detectado la generación endógena de siRNAs. Cabe hipotetizar, entonces, que en la activación transcripcional disparada por estrógenos no intervienen RNAs pequeños asociados a AGO1 mediando interacciones proteína-RNA.

4.1.3 ¿Otras AGOs?

En este trabajo nos planteamos el objetivo específico de estudiar las posibles funciones nucleares de AGO1 y no de las otras AGOs (AGO2-4) que se expresan en humanos. Cabe preguntarnos, sin embargo, si alguna de estas está involucrada, al igual que AGO1 en la activación transcripcional. De las cuatro AGOs que se expresan en humanos, sólo AGO2 presenta actividad endonucleolítica (Meister, 2013), característica que la separa funcionalmente del resto. Se ha especulado que AGO1, AGO3 y AGO4 son parcialmente

redundantes, pero la evidencia que apoya esta idea es escasa, en parte porque AGO3 y AGO4 fueron poco estudiadas y caracterizadas. Análisis comparativos de RNAs pequeños asociados a AGO1, AGO2 y AGO3 revelaron que, en general, estos se asocian indistintamente a una u otra proteína (Dueck *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2007), hecho consistente con la idea de que las AGOs serían redundantes. Ratones *knock out* (KO) de AGO2 son letales en estadíos tempranos del desarrollo mientras que los KO individuales de AGO1, 3 o 4 no lo son (Morita *et al.*, 2007), cosa que sugiere que la capacidad endonucleolítica de AGO2 le confiere funciones particulares y el resto de las AGOs serían redundantes.

En este punto se destaca el hecho de que no se ha hallado asociación al genoma de AGO2 en células humanas. AGO2 tendría en mamíferos funciones muy especializadas al nivel post-transcripcional de la regulación de la expresión génica. Si AGO3 y AGO4 desempeñan funciones nucleares similares a las de AGO1 aquí descritas es una pregunta que queda abierta.

4.1.4 ¿TGS en humanos?

Si bien el trabajo de esta tesis no estuvo orientado a determinar si AGO1 está involucrado en el silenciamiento transcripcional por mecanismos análogos los caracterizados en *S.pombe* y *C.elegans*, entre otros, podemos discutir la existencia de TGS en humanos en el marco de la evidencia aquí mostrada.

El TGS de otras especies es desencadenado por siRNAs generados del procesamiento de dsRNAs que vienen de la transcripción de los mismo *loci* a los que luego AGOs son reclutados por apareamiento perfecto entre el RNA pequeño y el RNA naciente. En la generación de los dsRNAs interviene una RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRp). En humanos no se ha detectado la producción de siRNAs, al menos de forma abundante, cosa que parece necesaria para desencadenar TGS de forma persistente. Esto puede explicarse por dos hechos. En primer lugar, mamíferos no expresan RdRp. En *D. melanogaster* tampoco se expresan enzimas RdRp, consistentemente con el hecho de que en esta especie tampoco se observa el mecanismo clásico de TGS. En segundo lugar, la generación de dsRNAs en células humanas, ante una infección viral por ejemplo, genera una respuesta distinta a la de RNAi: la producción de dsRNA desencadena la respuesta innata mediada por interferón (Reynolds *et al.*, 2006). La inactivación de la vía de interferón tipo I demuestra que el mecanismo RNAi mediado por dsRNA existe en células de mamífero y que se encuentra enmascarado por ser los dsRNAs sustrato de otra vía antiviral (Maillard *et al.*,

2016). En un razonamiento análogo a este, podemos pensar que la transfección de siRNAs evita la respuesta de interferón y puede desencadenar mecanismos de TGS. El hecho de que también se ha reportado que la transfección de células humanas con siRNAs de secuencia complementaria a promotores puede desencadenar la activación de la transcripción (Chu *et al.*, 2010; Janowski *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016, 2006) nos permite hipotetizar que ambos mecanismos pueden coexistir (TGS y activación de la transcripción) y que el que se desencadene uno u otro va a depender de las regiones a las que se dirija a AGOs mediante los siRNAs exógenos.

4.2 *AGO1 en la regulación del splicing alternativo*

Nuestro laboratorio se interesa por estudiar mecanismos de regulación del *splicing* alternativo. Una de las motivaciones principales a la hora de encarar el estudio de los roles de AGO1 en el núcleo de células humanas fue tratar de dilucidar posibles mecanismos de regulación del *splicing* alternativo por cambios en la estructura de la cromatina a nivel intragénico.

Si bien nuestro análisis no estuvo sesgado a determinar si AGO1 está involucrado en mecanismos de TGS en células humanas es evidente que, a partir del trabajo publicado por Alló *et al.*, (2009), que demuestra que siRNAs exógenos afectan patrones de *splicing* alternativo al inducir la formación de heterocromatina a nivel intragénico, esto era lo que esperábamos encontrar. Esperábamos reproducir el mismo modelo de regulación pero esta vez desencadenado por siRNAs endógenos.

Dado nuestro interés, decidimos estudiar si AGO1 está también involucrado en la regulación del *splicing* alternativo al regular la actividad de *enhancers* intragénicos.

En este punto nos remitiremos a los orígenes de este trabajo. Comenzamos con el estudio de AGO1 en la regulación del *splicing* alternativo del exón *cassette* alternativo 107 del gen de SYNE2 (E107-SYNE2) a partir de los primeros análisis exploratorios del ChIP-seq de AGO1 que revelaron que este se encuentra enriquecido en el intrón 107 y que su silenciamiento favorece la exclusión del exón alternativo (Allo *et al.*, 2014). Más tarde, cuando los análisis bioinformáticos tomaron forma, hallamos que la región intrónica también se encuentra enriquecida en ER α (**Figura R21**). Decidimos estudiar la regulación del *splicing* alternativo de E107-SYNE2 tanto en función de AGO1 como del estímulo hormonal.

En los análisis posteriores del CHIP-seq en los que se aplicaron umbrales más estrictos en la determinación de regiones enriquecidas en AGO1, el *cluster* del intrón 107 del gen de SYNE2 no resultó ser significativo. Como dijimos al comienzo de la discusión, creemos que esto puede deberse a una baja sensibilidad del CHIP-seq de AGO1, en comparación con el de ER α . A pesar de esto decidimos continuar con el análisis puntual de este evento de *splicing* alternativo.

Planteamos la hipótesis según la cual en el intrón río abajo del exón alternativo 107 de SYNE2 existe un *enhancer* transcripcional dependiente de ER α que regula la actividad de otro gen y que la activación dependiente de AGO1 de dicho *enhancer* ante el estímulo hormonal repercute sobre el patrón de *splicing* de E107. Los experimentos planteados en esta tesis fueron diseñados tendientes a corroborar o a refutar esta hipótesis.

De forma consistente con nuestra hipótesis, hallamos que el tratamiento con E2 favorece la exclusión del exón alternativo (**Figura R25**) y que el silenciamiento de AGO1 revierte este efecto (**Figura R26**).

Si bien análisis de interacciones de largo alcance mediadas por ER α reportan que la región intrónica interactúa con el gen ESR2, situado río abajo del de SYNE2, debemos determinar si efectivamente esta región intrónica, que caracterizamos como *enhancer*, está involucrada en la regulación de su expresión de forma E2 dependiente. Determinamos, en primer lugar, que los niveles de mRNA del gen de ESR2 aumentan ante el tratamiento con E2 (**Figura R27**). Para determinar la relevancia de la región intrónica de SYNE2 en esta regulación debemos de alguna manera afectarla de forma específica. Decidimos utilizar la estrategia de transfectar siRNAs de secuencia complementaria a regiones a lo largo del intrón 107 de SYNE2 y evaluar los niveles del mRNA de ESR2 (**Figuras R28 y R29**). Si bien no analizamos en este caso en particular el efecto de los siRNAs en relación, por ejemplo, a la deposición de marcas de histonas, suponemos que de alguna manera estamos afectando eventos que ocurren sobre el intrón. En concordancia con esto observamos que algunos de los siRNAs afectan el patrón de *splicing* de E107-SYNE2 y que uno en particular, el centrado en el *cluster* de ER α , también afecta la activación transcripcional disparada por E2 de ESR2. Los siRNAs afectan el patrón de *splicing* de E107-SYNE2 en el mismo sentido que el tratamiento con E2 y ambos tratamientos parecen actuar de forma aditiva (**Figuras R30 y R31**). Sin embargo, dado que desconocemos el mecanismo de acción de los siRNAs en este caso específico no podemos extraer demasiadas conclusiones de esta observación. E2 dependiente de E2.

Si bien en estos experimentos no estamos evaluando cambios directos (deposición de marcas de histonas, reclutamiento de factores, etc.) sobre el intrón río abajo de E107-SYNE2, los resultados obtenidos son consistentes con la hipótesis planteada.

De nuestra hipótesis de trabajo se desprenden dos modelos alternativos pero no excluyentes que permitirían explicar la regulación del *splicing* de E107-SYNE2 por estrógenos y AGO1 (**Figura D2**). En el primer modelo planteado, los eventos que ocurren en el *enhancer* intrónico durante la activación transcripcional disparada por E2 y dependiente de AGO1 alteran de forma local la tasa de elongación de la RNAPII que viene transcribiendo desde el TSS de SYNE2. Experimentos realizados con el fin de determinar por diferentes estrategias si la inclusión de E107-SYNE2 responde a cambios en la tasa de elongación de la RNAPII revelaron que efectivamente, una disminución en la tasa de elongación favorece la inclusión de exón alternativo (Figuras R23 y R24). Si bien en este punto sólo estamos planteando una correlación, este hallazgo es consistente con el hecho de que la activación del *enhancer* intrónico provoca una disminución en la tasa de elongación de la RNAPII que viene transcribiendo que a su vez provoca una disminución en la inclusión del exón alternativo (**Figura D2.A**). Vale aclarar que se han descrito mecanismos por los que la tasa de elongación de la RNAPII puede favorecer tanto la inclusión como la exclusión de exones alternativos (Dujardin *et al.*, 2014). No nos sorprende que en este caso una baja tasa de elongación favorezca una disminución en la inclusión de exón alternativo.

En un modelo alternativo, la activación del *enhancer* intrónico favorecería el reclutamiento, por parte de la maquinaria transcripcional y de TFs, de factores adicionales de *splicing* que favorezcan la exclusión de E107-SYNE2. Como dijimos en la introducción, la composición de la maquinaria transcripcional a nivel del promotor de un gen puede repercutir sobre las decisiones de *splicing* alternativo río abajo. No debemos ir muy lejos para encontrar ejemplos de esto: minigenes reporteros de *splicing* alternativo bajo el control de promotores que responden a ER α sufren cambios en sus patrones de *splicing* de forma hormono-dependiente. Numerosos co-reguladores asociados a receptores nucleares además presentan actividad como reguladores del *splicing* (Dowhan *et al.*, 2005). Podemos especular acerca de un intercambio de factores entre la maquinaria transcripcional reclutada al *enhancer* intrónico y regiones regulatorias del *splicing* de E107-SYNE2 (**Figura D2.B**).

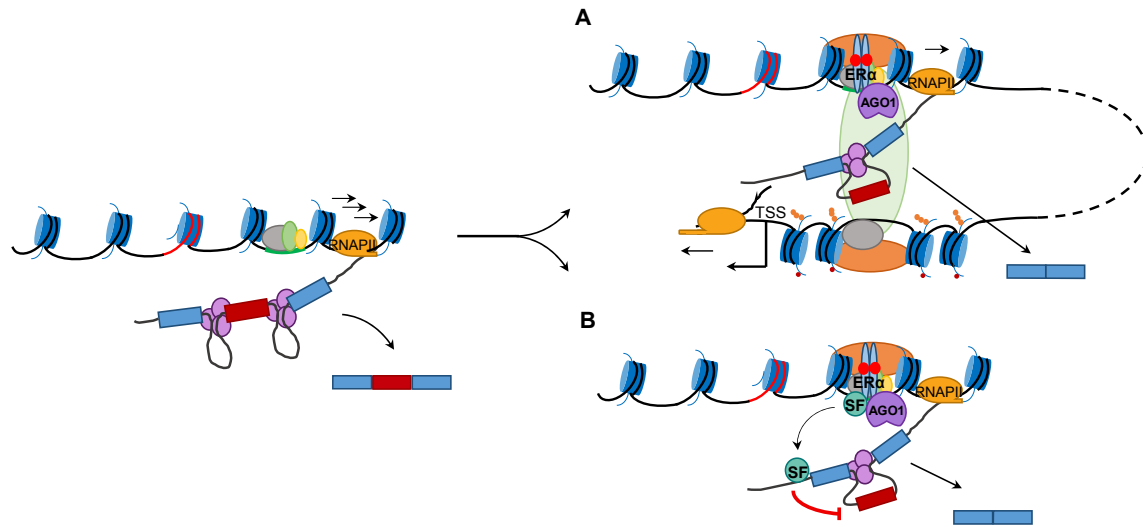


Figura D2. Modelos propuestos para explicar la regulación del *splicing* alternativo de E107-SYNE2 por estrógenos y AGO1. A. Los eventos que ocurren durante la activación ante el estímulo hormonal de un *enhancer* de ERα (línea verde) situado en el intrón río abajo del exón 107 (línea roja) desencadena cambios en la tasa de elongación local de la RNAPII que viene transcribiendo el gen de SYNE2. Proponemos, en particular, que la activación del *enhancer* provoca la disminución en su tasa de elongación y de esta forma favorece la exclusión del exón alternativo. **B.** En un modelo alternativo, la activación del *enhancer* favorece el reclutamiento de un factor de *splicing* (SF) que favorece la exclusión del exón alternativo.

4.2.1 ¿Regulación del *splicing* por *enhancers* transcripcionales intragénicos?

Independientemente de la función de AGO1 en la activación transcripcional y en la regulación del *splicing* alternativo, creemos que la hipótesis según la cual la activación de *enhancers* intragénicos repercute sobre las decisiones de *splicing* de eventos cercanos merece, de por sí, especial atención. En este trabajo planteamos esta hipótesis a partir del análisis de un evento puntual pero resulta interesante en principio la posibilidad de extenderlo a otros eventos de *splicing* (de mayor relevancia fisiológica) y a otros sistemas de *enhancers*.

5. CONCLUSIONES

5.1 *AGO1 en la activación transcripcional disparada por estrógeno*

- Los sitios de unión de AGO1 a la cromatina de las células mamarias humanas MCF7 se encuentran enriquecidos en motivos de unión al DNA del receptor de estrógenos.
- Una gran proporción de los sitios de unión de AGO1 a la cromatina de las células MCF7 solapan con los de ER α , existiendo una alta correlación entre los perfiles de unión de ambas proteínas.
- Existe una correlación positiva entre la unión de AGO1 a los *enhancers* de ER α y su nivel de activación ante el estímulo con estradiol.
- La unión de AGO1 a los *enhancers* de ER α depende del estímulo con estradiol.
- AGO1 es necesario para la activación transcripcional dependiente de estradiol de los genes blanco de los *enhancers* de ER α .
- AGO1 es necesario para la transcripción de los RNAs de los *enhancers* (eRNAs) de ER α de forma dependiente de estradiol.
- El reclutamiento de ER α a los *enhancers* ante el estímulo con estradiol depende de AGO1.
- La frecuencia de interacción de largo alcance entre un *enhancer* de ER α y el promotor del gen blanco depende de AGO1.
- AGO1 y ER α interaccionan físicamente entre sí de forma dependiente de estradiol e independiente de RNA.

5.2 *AGO1 en la regulación del splicing alternativo*

- En el intrón río abajo del exón *cassette* alternativo 107 del gen de SYNE2 se identifica en células mamarias un *enhancer* de ER α .

-
- El patrón de *splicing* del exón 107 de SYNE2 depende de la tasa de elongación de la RNAPII: una baja tasa de elongación favorece la exclusión del exón alternativo.
 - El estímulo con estradiol favorece una mayor exclusión del exón 107 de SYNE2 de forma dependiente de AGO1.
 - El *enhancer* de ER α del intrón 107 de SYNE2 controla la expresión de otro gen cercano: la transfección de siRNAs contra este elemento afecta la expresión estradiol-dependiente de dicho gen así como el patrón de *splicing* del exón 107.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Análisis bioinformáticos*

6.1.1 **Análisis de los datos de ChIP-seq**

Este análisis fue realizado tanto con los datos propios de ChIP-seq de AGO1 como con los tomados de la literatura. Los datos crudos públicos fueron obtenidos del *Sequence Read Archive* (SRA) y procesados de la siguiente manera. Las secuencias de las lecturas fueron alineadas al genoma humano (hg19) usando Bowtie v1.0.0 (Langmead *et al.*, 2009). Solo las secuencias alineadas unívocamente a una única región del genoma, con una base desapareada como máximo de tolerancia, fueron retenidas. El procesamiento posterior de los datos consistió en la extensión *in silico* de las lecturas y en la normalización de la señal según lecturas por millón mapeadas. Las lecturas fueron extendidas hasta un largo igual a la estimación de MACS (Model Based Analysis for ChIP-seq, [Zhang *et al.*, 2008]. Para la normalización de la señal, el número de lecturas mapeadas sobre cada base del genoma fue calculada usando el comando `genomeCoverageBed` de BedTools (Quinlan y Hall, 2010). Los datos procesados fueron visualizado en el *UCSC genome browser* (Kent *et al.*, 2002).

Los sitios enriquecidos en TFs fueron identificados usando MACS v1.4.0beta (Zhang *et al.*, 2008) con los parámetros definidos por defecto y un p-valor de 1×10^{-5} . Para definir el ruido, los datos provenientes de la secuenciación del DNA *input* fueron utilizados. Para la identificación de regiones enriquecidas en H3K27ac y H3K4me1, SICER v1.03 (Zang *et al.*, 2009) fue utilizado con los parámetros definidos por defecto pero cambiando lo siguiente: tamaños de ventana de 100 pb, tamaño de brechas de 800 pb (para islas de H3K4me1) o de 200 pb (para islas de H3K27ac). Los tamaños de los fragmentos fueron estimados usando MACS como se dijo arriba. Las regiones enriquecidas en H3K4me1 y H3K27ac fueron anotadas con una tasa de descubrimiento falso menor a 0,001 (FDR<0,001). En el caso de las muestras en las que duplicados se encuentran disponibles, los *clusters* o islas encontradas en las dos réplicas fueron retenidos. Se consideró que dos *clusters* solapan cuando comparten al menos una base.

6.1.2 Definición de *enhancers*

Los *enhancers* que se activan en células MCF7 ante el tratamiento con E2 fueron definidos como regiones enriquecidas en H3K27ac que solapan con islas de H3K4me1. Se excluyeron las regiones correspondientes a promotores anotados en la base de datos de UCSC (definiendo a promotores como las regiones 2 Kb río arriba y 1 Kb río abajo de TSS anotados).

6.1.3 Análisis de correlación entre muestras de ChIP-seq

Para calcular la correlación entre las señales de ChIP-seq de AGO1 y de diferentes TFs, se procedió de la siguiente manera: el genoma fue dividido en segmentos de 1 Kb y el número de lecturas en cada segmento fue calculado y normalizado usando R (R Development Core Team, 2013). Para reducir el ruido de la correlación los segmentos cuyos valores caen debajo del cuantil del 5 fueron excluidos del análisis.

6.1.4 Gráficos de perfiles de ChIP-promedio

Para computar estos gráficos, las regiones de interés fueron divididas en segmentos de 100 bp. Utilizando los datos de ChIP-seq en formato bedfile, la señal de los diferentes TFs o marcas de histonas fue calculada para cada uno de los segmentos utilizando el comando *coverageBed* de *BedTools* (Quinlan y Hall, 2010). Para la normalización de los resultados obtenidos, segmentos de 100 pb fueron definidos a lo largo de los *clusters* obtenidos en cada muestra de TF y la señal del mismo TF fue calculada en cada uno de estos segmentos. El cuantil del 95 % obtenido de los *clusters* segmentados de cada muestra fue usado para ajustar los valores de cada segmento de cada set de datos.

6.1.5 Análisis de motivos de DNA

La búsqueda *de novo* de motivos enriquecidos en los *clusters* de AGO1 fue realizada con HOMER (Heinz *et al.*, 2010), utilizando ventanas de 200 pb alrededor de los centros de los *clusters* de AGO1 y definiendo el largo de los motivos en 8, 10 y 12 pb. Los resultados obtenidos a partir de considerar motivos de distintos largos fueron curados a mano para eliminar motivos redundantes. Los motivos obtenidos con un mayor *score*, clasificados según el p-value, son mostrados. Motivos de unión al DNA conocidos para otras proteínas fueron asociados a los encontrados *de novo* cuando el *score* de HOMER es 0,7 o mayor.

6.2 Vectores plasmídicos utilizados

Los siguientes vectores utilizados en este trabajo fueron descritos previamente:

- **pIRESneo-FLAG/HA-Ago1** fue provisto por Thomas Tuschl (Addgene # 10820, [Meister *et al.*, 2004]): es un vector de expresión de AGO1 fusionado a los *tags* FLAG y HA en el extremo N-terminal bajo el control del promotor constitutivo CMV.
- el vector **pSG1-HEGO** (Tora *et al.*, 1989): es un vector de expresión de ER α bajo el control del promotor constitutivo de SV40.
- el vector **pGL3-(ERE)x3** fue provisto por Laura Corbo del Centro de Investigación de Cáncer de Lyon (Prévôt *et al.*, 2001): es un reportero de la activación transcripcional dependiente de estrógenos y fue utilizado para poner a punto el tratamiento de las células MCF7 y T47D con E2. Consiste básicamente en el gen de *luciferasa* bajo el control de un promotor mínimo y 3 elementos de respuesta a estrógenos (ERE).

6.2.1 Minigén reportero de *splicing* alternativo

Los minigenes reporteros de *splicing* alternativo y de expresión inducible se utilizan en los casos en los que se desea sobreexpresar una proteína y evaluar sus efectos sobre el patrón de *splicing*. De esta forma, la eficiencia de transfección no es crítica para que los efectos sean observables. También se utilizan en el caso de evaluar el efecto de tratamientos con drogas que no pueden prolongarse en el tiempo por su toxicidad. En este último caso, la utilización de minigenes de expresión inducible nos permite independizarnos de la vida media de los mRNAs.

Los minigenes reprimibles por tetraciclina usados en este trabajo poseen un promotor mínimo de hCMV, silencioso en ausencia de transactivadores, y siete operadores *tetO* clonados río arriba. El plásmido **pUHD 15.1** codifica una proteína de fusión entre el represor *tetR* que se une a los operadores *tetO* en ausencia de tetraciclina, y el transactivador viral VP16 que produce una estimulación directa del promotor mínimo (**Figura M1**) (Gossen y Bujard, 1992).

El minigén reportero del *splicing* alternativo del exón 107 de SYNE2 (**pUHC-E107-SYNE2**) incluye al exón *cassette* alternativo, los intrones flanqueantes y parte de los exones flanqueantes (**Figura R24.A**). Este fragmento del gen de SYNE2 se inserta en el exón del exón 3 del gen de α -globina, todo bajo el control del promotor reprimible por tetraciclina.

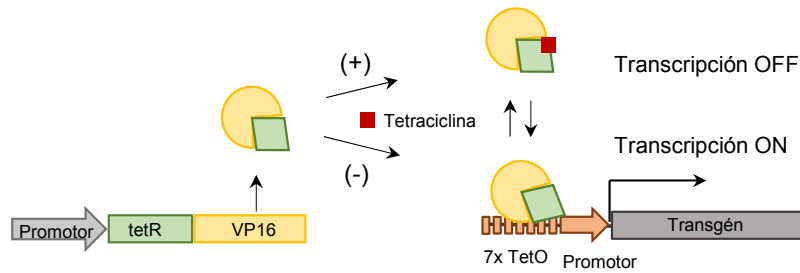


Figura M1. Sistema TET-off. El plásmido pUHD 15.1 codifica la proteína de fusión tTA-VP16 bajo un promotor constitutivo. En presencia de tetraciclina (TET), tTA-VP16 no puede unirse a los operadores tetO en el plásmido derivado de pUHC 13.3, y no se activa el promotor mínimo (arriba). En ausencia de tetraciclina, tTA-VP16 es reclutada a los operadores tetO activando el promotor (abajo).

El minigén pUHC-E107-SYNE2 fue construido a partir del minigén pUHC EDI que ha sido descrito previamente (de la Mata y Kornbliht, 2006). Brevemente, el fragmento reportero de luciferasa del plásmido pUHC 13.3 fue removido con la enzima de restricción *XbaI* y reemplazado por el fragmento *BssHII-PvuII* de 3910pb de pSVEDA Tot (Caputi *et al.*, 1994). Este presenta un fragmento del gen de fibronectina humana que incluye al exón alternativo EDI. El sitio de restricción *BstEII* fue reconstituido río arriba del inserto de fibronectina por mutagénesis dirigida. El fragmento correspondiente al inserto de fibronectina fue removido entonces con la enzima de restricción *BstEII* y reemplazado por el de SYNE2 de 2038 pb. Este último fue amplificado a partir de DNA genómico utilizando oligonucleótidos iniciadores que poseen el sitio de corte de la enzima *BstEII* en sus extremos 3'. Las secuencias de los iniciadores utilizados son: TTTGGTGACCCCGTCATCTCCTCAGTCCCTG (directo) y TTTGGTCACCGTCACCTTCCATTTGCTTGTAG (reverso).

6.2.2 Vectores de expresión de RNA polimerasa II salvaje y mutante

El plásmido **pAT7h1** codifica el cDNA de la subunidad mayor de Pol II humana Rpb1 salvaje o *wild type* sensible a la α -amanitina (WT S); el plásmido **pAT7h1 α Amr** codifica una variante de Rpb1 con la mutación N792D que le confiere resistencia a la α -amanitina (WT R) (Van Nguyen *et al.*, 1996). El plásmido **pAT7h1 α Am r R749H** (de la Mata *et al.*, 2003) codifica una Rpb1 humana mutante que además de la sustitución N792D posee la sustitución R749H, equivalente a la sustitución R741H de la polimerasa mutante C4 de *D. melanogaster*, de baja tasa de elongación (Coulter y Greenleaf, 1985).

6.2.3 Preparación de plásmidos

Transformación de bacterias

La cepa DH5 α de *Escherichia Coli* fue utilizada para generar bacterias competentes según el protocolo descrito por Inoue *et al.* (1990). A partir de este protocolo se obtienen bacterias con una eficiencia de transformación de entre 1×10^6 y 1×10^7 UFC/ μg de DNA plasmídico. Alternativamente, en los casos en los que requerimos una mayor eficiencia de transformación, generamos bacterias electrocompetentes que fueron transformadas por electroporación (según el protocolo provisto por el electroporador *MicroPulser* de Bio-Rad).

Preparación de plásmidos a pequeña escala

Esta técnica se utiliza para producir una cantidad pequeña de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de 3 ml con el objetivo de verificar mediante digestiones por restricción o secuenciación la identidad de los diferentes clones plasmídicos generados. Brevemente, se realiza una lisis alcalina seguida de renaturalización del DNA plasmídico, extracción con fenol (pH 8)- cloroformo y precipitación con etanol. Ésta técnica es conocida y utilizada en cualquier laboratorio de biología molecular, por lo que no se especifican los detalles. Para obtener preparaciones más limpias, sin endotoxinas bacterianas, y aptas para la transfección de células humanas, el *PureLink® Quick Plasmid Miniprep kit* de Invitrogen, que utiliza columnas de intercambio aniónico, fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de plásmidos a mediana y gran escala

Para obtener una mayor concentración y masa de DNA plasmídico los kits *NucleoBond® Xtra Midi* y *NucleoBond® Xtra Maxi*, que permiten recuperar 400 μg y 1000 μg de plásmido respectivamente, fueron utilizados según las instrucciones del fabricante.

Control de calidad y cuantificación de DNA plasmídico

Para verificar la calidad del DNA plasmídico purificado por cualquiera de los métodos anteriores una alícuota fue corrida en una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v. En paralelo, y en la medida de lo posible, se corren otras alícuotas digeridas con enzimas de restricción que generen fragmentos de tamaño conocido.

Para la cuantificación el *Nanodrop 2000* (Termo Scientific) fue utilizado. Este es un espectrofotómetro que mide la absorbancia de la muestra en el rango de emisión de luz de 190-840 nm. A partir de la absorbancia a 260 nm, este calcula la concentración de DNA o RNA. Calcula además el grado de pureza en relación a proteínas (según la relación de las absorbancias a 260/280) y en relación a otros contaminantes como fenol o sales (según la relación de absorbancias a 260/230). La ventaja de este equipo es el hecho de que requiere tan sólo de 1 μl de muestra sin el uso de reactivos adicionales. Para realizar una

cuantificación más precisa del DNA purificado el reactivo *Quant-iT dsDNA BR* (Invitrogen), basado en fluorometría, fue utilizado junto con el lector *Qubit* (Invitrogen). Este reactivo permite cuantificar el DNA específicamente, evitando que el RNA contaminante influya en dicha cuantificación.

Preparación de cromosomas artificiales de bacterias (BACs)

Los BACs fueron adquiridos ya transformados en bacterias *E.Coli*. Utilizamos el *kit PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep* de Invitrogen siguiendo un protocolo adaptado para la extracción de BACs. Como control de calidad de la extracción, los BACs fueron digeridos con una enzima de restricción de corte poco frecuente y corridos en un gel de agarosa 0,8 5 (p/v). Un perfil de bandas discretas debe observarse.

6.3 Cultivo, transfección y tratamiento de células humanas

6.3.1 Cultivo de células humanas

Las células **MCF7** son células epiteliales de adenocarcinoma de glándula mamaria humana (ver <http://www.atcc.org> para más información) que expresan al receptor de estrógenos, al de progesterona y al de glucocorticoides. Son células adherentes y se mantienen cultivándolas en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) sin rojo fenol con alta glucosa y piruvato suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomina).

Las células **T47D** son células epiteliales derivadas de un carcinoma ductal de glándula mamaria humana (ver <http://www.atcc.org> para más información) que también expresan al receptor de estrógenos, al de progesterona y al de glucocorticoides. Son células adherentes que también se mantienen cultivándolas en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) sin rojo fenol y suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos 100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomina).

Las células **HCT116** son células epiteliales de carcinoma colonorectal humano (ver <http://www.atcc.org> para más información). Son adherentes y se mantienen cultivándolas en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo DMEM (Gibco) con alta glucosa y alto piruvato suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomina).

Las células **HEK293** son células epiteliales de riñón embrionario humano (ver <https://www.atcc.org> para más información). Son adherentes y se mantienen cultivándolas

en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo DMEM (Gibco) con alta glucosa y alto piruvato suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomina).

Para el mantenimiento de las líneas celulares seguimos el siguiente protocolo: antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspira el medio de cultivo y se coloca 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a 37°C unos dos o tres minutos, se detiene la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaquea entre 1/2 y 1/8 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 10 ml de volumen final con medio completo. Las células son congeladas en N₂ líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales. Para los experimentos y transfecciones se plaquean, típicamente, 200000 a 400000 células en una placa de 3,5 cm. Este número puede variar entre líneas celulares y entre experimentos.

6.3.2 Transfección de células humanas en cultivo

Transfección con DNA

Las células HEK293, HCT116, T47D y MCF7 fueron transfectadas con *Lipofectamine* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron plaqueadas 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 ajustado a 2 µg para una cantidad de 6 µL de lipofectamina. Brevemente, el protocolo de transfección con lipofectamina que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente:

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

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

Transfección con RNA

Células MCF7 y T47D fueron transfectadas con siRNAs utilizando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) en medio *Optimem* (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para estas células, 6 ul de *Lipofectamine 2000* fue utilizado por cada pocillo de una placa de 6 pocillos (cada uno de 3,5 cm de diámetro aproximadamente) junto con una concentración final de 25 nM de siRNA. El procedimiento es el mismo que el detallado para la transfección con DNA exceptuando el hecho de que el volumen final de medio de transfección es de 2 ml. Al día siguiente de la transfección el medio es cambiado a medio completo o medio de hambreo según el caso, y típicamente se dejan las células entre 72 y 96 h post-transfección antes de cosecharlas.

6.3.3 Tratamientos de células

Tratamiento de las células MCF7 y T47D con β -estradiol

A las 24 h del plaqueo de las células o de su transfección se procede a la remoción del medio de cultivo de toda hormona esteroidea y del indicador de pH rojo fenol que interfiere con la vía de señalización del estradiol. Llamamos a este proceso hambreo de las células. Para esto el medio en el que las células fueron plaqueadas es removido y estas son lavadas con PBS tres veces, agitando suavemente cada vez. Se agrega medio DMEM/F12 (Gibco) sin rojo fenol y suplementado con suero fetal bovino *charcoal-stripped* 2% (v/v). Luego de 72 h, se remueve este medio y se agrega el mismo medio fresco sin suero con E2 10 nM en etanol o el volumen equivalente de etanol. Se deja incubar el tiempo indicado en cada experimento en particular.

Soluciones utilizadas

- PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, H₂O c.s.p. 1 litro
- Suero fetal bovino *charcoal-stripped*: 25 g de carbón activado se incuba con 2,5 g de dextrano en solución TRIS 0,01 M pH 7,4 a 4°C durante la noche con agitación. Al día siguiente 10 ml de esta suspensión es centrifugada durante 10 minutos a 10000 g y el sobrenadante es descartado. 50 ml de suero fetal bovino es agregado sobre el carbón-dextrano e incubado durante 30 minutos a 56°C invirtiendo el tubo cada 5 minutos. La suspensión es centrifugada durante 10 minutos a 10000 g. El sobrenadante es centrifugado dos veces más y es filtrado utilizando un filtro de poros de 0,45 μ m para remover el carbón

dextrano remanente. El suero resultante es esterilizado por filtrado a través de un filtro de poros de 0,22 μm .

- E2 (Sigma E8875): una solución madre de concentración 10^{-2} M en etanol fue preparada. A partir de esta, una dilución de concentración 10^{-5} M fue preparada. Esta solución se encuentra a una concentración 1000x con respecto a la concentración final de 10 nM usada en los experimentos.

Ensayo de luciferasa

El protocolo de hambre y tratamiento con E2 fue puesto a punto transfectando a las células con el vector reportero de la actividad de ER α , pGL3-(ERE)x3. Las células MCF7 o T47D fueron plaqueadas en placas de 12 pocillos (con 2×10^5 células por pocillo). Luego de 24 h fueron transfectadas y hambreadas. Las células fueron cosechadas y la actividad de luciferasa fue medida utilizando el kit *Luciferase Assay System* (Promega). Brevemente, las células fueron lavadas con PBS y luego fueron lisadas en 100 μl del *reporter lysis buffer* (Promega). Luego de una centrifugación de 5 min a 12.000 g, 30 μl del sobrenadante fueron mezclados con 70 μl del *luciferase assay buffer II* (Promega) y la actividad de luciferasa fue medida en un luminómetro (*Glomax Luminometer* Promega). En paralelo, las proteínas totales de los lisados fueron cuantificadas utilizando el *Pierce BCA Assay Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. La **figura M2** muestra un resultado representativo de este ensayo realizado partiendo de células tratadas con concentraciones de E2, 10 y 100 nM.

Actividad de luciferasa

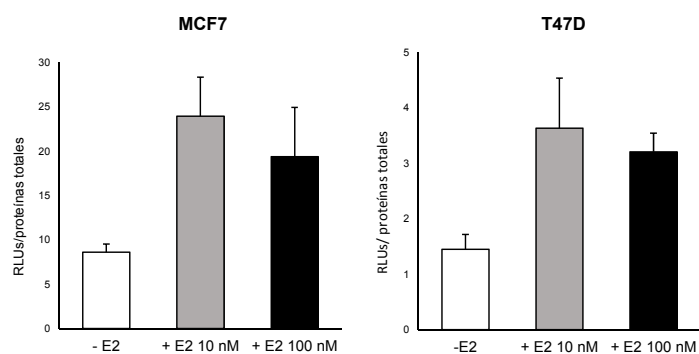


Figura M2. Células MCF7 y T47D fueron transfectadas con el vector pGL3-(ERE)x3, reportero de la activación transcripcional disparada por estradiol. A las 24 h las células fueron hambreadas durante 72 h y tratadas con vehículo (-E2) o estradiol (+E2) en las concentraciones indicadas. Las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa fue analizada. Las proteínas totales de cada muestra fueron cuantificadas para la normalización.

Para determinar el tiempo mínimo de tratamiento con E2 para analizar los niveles de mRNAs cuya transcripción se induce con el tratamiento hormonal, realizamos a su vez, curvas de tiempo de tratamiento con E2 y analizamos los niveles de mRNAs (según la sección 6.7). En la **figura M3** mostramos un resultado representativo de esta puesta a punto. A partir de estos análisis decidimos analizar los niveles de mRNAs a las 8 h de iniciado el tratamiento con E2.

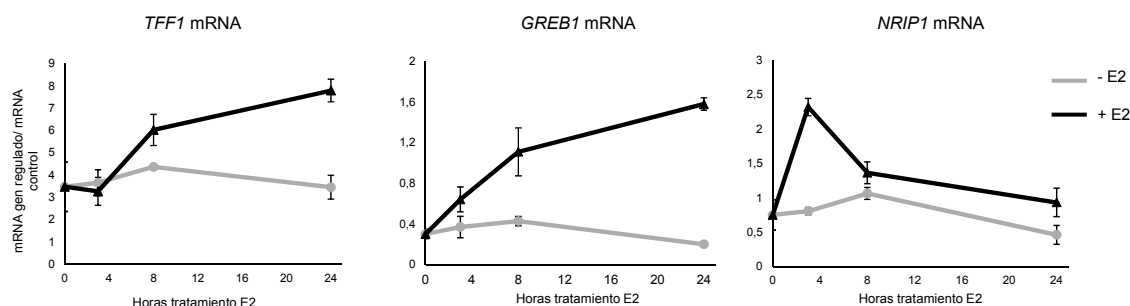


Figura M3. Cuantificación de los mRNAs indicados por RT-qPCR (según se indica en la sección 6.7) a partir de muestras de células MCF7 hambreadas durante 72 h tratadas con vehículo (- E2) o con estradiol 10 nM (+E2) durante los tiempos indicados. Los puntos corresponden al promedio \pm SE de tres réplicas. Se muestra el resultado de un experimento exploratorio.

Tratamientos con inhibidores farmacológicos

- **Tricostatina A** (TSA, Sigma T8552): 24 h luego de que las células T47D fueron plaqueadas, medio fresco con TSA (stock 5 mg/ml en etanol) en una concentración de 200 ng/ml fue agregado durante 24 h. Para el control del tratamiento etanol absoluto fue utilizado.
- **Camptotecina** (CPT, Sigma C9911): células HCT116 fueron transfectadas con pUHC-E107-SYNE y el vector de expresión transactivador correspondiente. Las células fueron mantenidas con tetraciclina durante 24-48 h. Medio fresco con CPT (stock 20 nM en DMSO) en una concentración de 1 μ M fue agregado luego durante 4-6 h.

6.4 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

El ensayo de ChIP fue utilizado para analizar la unión de las proteínas de interés a sitios del genoma de células MCF7. Brevemente, este ensayo consiste en la generación de entrecruzamientos o *crosslinking* entre las proteínas y el DNA mediante la incubación con formaldehído. Según el protocolo aquí utilizado, se realizan dos lisis secuenciales: una suave, que permite el enriquecimiento en núcleos, y una fuerte que rompe estos núcleos. De esta forma se obtiene un extracto enriquecido en material nuclear. Se procede luego a la fragmentación del DNA mediante sonicación, puesta a punto con el fin de obtener fragmentos de entre 200 y 500 pb. Se realiza luego la inmunoprecipitación y el análisis del DNA inmunoprecipitado mediante PCR cuantitativa.

A continuación se presenta el protocolo en detalle:

Entrecruzamiento y lisis

- Se parte de 20 a 10 millones de células MCF7 (4 placas de 10 cm confluentes).
- Se lava cada placa una vez en PBS 1X y se agregan 6 ml de la solución de entrecruzamiento 1x (solución de entrecruzamiento 10 X diluida en PBS 1X). Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregan 400 µl de solución *STOP* de a gotas a cada placa. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente agitando cada tanto.
- Se aspira el medio y se colocan las placas en hielo. De acá en adelante se trabaja en hielo y con soluciones frías.
- Se lava cada placa dos veces con 5 ml de PBS frío y se agrega 1 ml de PBS (con inhibidores de proteasas) en cada placa.
- Se despegan las células con un raspador y se pasa la suspensión a un tubo cónico de 15 ml. Se juntan las 4 placas en un mismo tubo.
- Se centrifuga 5 minutos a 4°C y a 4000 g.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* de células en 5 ml de *buffer* de lisis I. Se resuspende usando una micropipeta p1000 para asegurarse de que no queden grumos. Se incuba 10 minutos en hielo.
- Se centrifuga 5 minutos a 4°C y a 4000 g.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 700 µl de *buffer* de lisis II. Se incuba 10 minutos en hielo.

Fragmentación del DNA, su verificación y cuantificación

- Se utiliza el ultrasonicador Bioruptor que permite sonicar hasta 6 tubos a la vez. Se sonica en tubos cónicos de poliestireno durante 7 minutos, con ciclos de 30" encendido y 30" apagado, a máxima potencia y a 4°C.
- Se transfiere el contenido a tubos *ependorf* de 1,5 ml y se deja la mayor cantidad posible de tiempo en hielo para favorecer la precipitación del SDS.
- Se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad y a 4°C en una microcentrífuga de mesada. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se descarta el *pellet*.
- Se toman 20 μ l por tubo y por duplicado para verificar la correcta fragmentación del DNA y para cuantificarlo. Se llevan estas alícuotas a 400 μ l con el *buffer* de lisis II y se agregan 4 μ l de proteinasa K (20 μ g/ μ l). Se incuban a 65°C durante la noche para revertir el entrecruzamiento. El resto del lisado se guarda en hielo en una heladera a 4°C.
- Al día siguiente se purifica el DNA de las alícuotas utilizando el *QIAquick PCR purification Kit* de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.
- El DNA purificado es cuantificado utilizando el *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific) o el reactivo *Quant-it DNA* (Invitrogen) y el lector Qubit (Invitrogen). Se siembran 500 ng en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio junto con un marcador de peso molecular y se corre poco tiempo a un voltaje intermedio. Debe observarse un patrón como el de la **figura M4**.

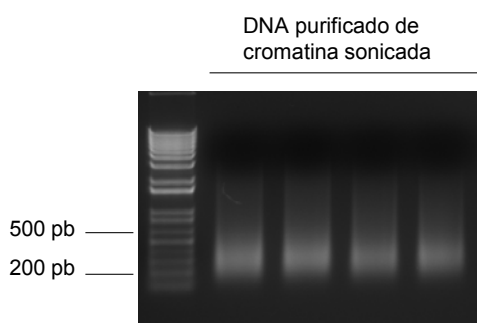


Figura M4. DNA genómico purificado de muestras de cromatina sonicada según se especifica en sección 6. 4. 500 ng de DNA fue corrido en un gel de agarosa 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio junto con un marcador de peso molecular.

Inmunoprecipitación y purificación del DNA

- Se toman 40 μ l de la suspensión de bolitas magnéticas acopladas a proteína G (*Dynabeads® Protein G* de Invitrogen) teniendo la precaución de usar tips con la punta cortada. Se lavan dos veces con el *buffer* de IP (sin inhibidores de proteasas).

En todos los casos en los que el sobrenadante de las bolitas magnéticas debe ser removido, los tubos son centrifugados muy brevemente a velocidad mínima, para remover el líquido de las tapas, y se colocan en una gradilla en cuyos pocillos hay imanes. De esta forma, las bolitas quedan retenidas en el fondo del tubo mientras se remueve el sobrenadante cómodamente.

- Se agregan 200 μ l del *buffer* de IP y el anticuerpo específico a las bolitas. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente en rotación suave. En el caso de la inmunoprecipitación control, no se agrega ningún anticuerpo.

- Se remueve el sobrenadante y se lavan las bolitas 2 veces con el *buffer* de IP (sin inhibidores de proteasas). De esta forma quedan las bolitas listas para el agregado de la cromatina.

- Se agregan a las bolitas el volumen de cromatina equivalente a 20-40 μ g de DNA. Esta se lleva a 1-2 ml final con el *buffer* de IP (con inhibidores de proteasas). Para definir este volumen hay que tener en cuenta que la cromatina tiene que ser diluida al menos 10 veces (ya que se encuentra en un el *buffer* de lisis II que contienen mucho SDS). Para evitar introducir errores en la manipulación de la cromatina, esta se diluye toda junta y luego se distribuye en los tubos que contienen las bolitas magnéticas preincubadas con los anticuerpos. Se toman 50 μ l de la cromatina diluida por duplicado y por tratamiento. Estas alícuotas se guardan a -20°C y constituyen los *inputs* del experimento.

- Se incuba la cromatina junto con las bolitas durante toda la noche a 4°C rotando suavemente.

- Se remueve el sobrenadante y se agrega 1 ml de *buffer* de lavado I. Se incuba 5 minutos rotando a 4°C .

- Se repite el procedimiento con el *buffer* de lavado II y luego con el *buffer* de lavado III. Se realiza un último lavado con *buffer* TE.

- La cromatina es eluída resuspendiendo las bolitas en 280 μ l de *buffer* de elución preparado en el momento. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente rotando. Se transfiere 250 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo. Este contiene el DNA inmunoprecipitado. Se toman los tubos de *inputs*, previamente guardados a -20°C , y se agrega *buffer* de elución hasta completar 250 μ l.

- Para revertir el entrecruzamiento se agregan 10 μ l de NaCl 5 M a cada tubo de eluído y de *input* y se incuba a 65°C durante la noche. A la mañana siguiente se agregan 5 μ l de EDTA

500 mM, 10 µl de *buffer* Tris-HCl 1M pH=6,5 y 1 µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incuba a 45°C durante 1 hora.

- Se purifica el DNA el *QIAquick PCR purification Kit* de *QIAGEN*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis del DNA

El análisis del DNA fue realizado por qPCR a partir de 2 µl del DNA inmunoprecipitado sin diluir y a partir de 2 µl de una dilución 1/20 de las muestras *input*. En el caso del inmunoprecipitado de ER α , las muestras fueron diluidas 1/10. En paralelo, una curva de calibración hecha a partir de diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ de una mezcla de los inputs empezando por la mezcla sin diluir, fue realizada. Se toman 2 µl de cada muestra y se colocan en sendos pocillos de la placa de PCR junto con 8 µl de la siguiente mezcla: 5 µl de Mezcla Real de Biodynamics, 1 µl de *primers* (directo y reverso) 10 µM y agua. Los *primers* utilizados se especifican en la sección 6.11.

Se utilizó el equipo *Eppendorf Mastercycle Realplex* con el siguiente programa: 2 minutos a 95°C y 40 ciclos de 10" a 95°C (desnaturalización), 15" a 60°C y 20" a 72°C (elongación, al final del cual se mide la fluorescencia); la reacción culmina con una curva de temperatura de 60 a 95°C en la que se mide la fluorescencia cada 1°C (curva de *melting* del DNA).

En todos los casos los resultados son informados como DNA en el inmunoprecipitado relativo al DNA del *input*. Los valores del inmunoprecipitado control (sin anticuerpo) se muestran como idea de la eficiencia de la inmunoprecipitación específica. Se estima que un enriquecimiento de como mínimo 5 veces entre la inmunoprecipitación específica y la control, puede considerarse como tal.

Soluciones: - PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂ HPO₄, 2,4 g KH₂ PO₄, H₂O c.s.p. 1 litro.

- Solución de entrecruzamiento 10X: hepes pH=8 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, formaldehído 10 % (v/v)

- Solución STOP: glicina 125 mM.

- Inhibidores de proteasas: *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* de Roche, 25X.

- *Buffer* de lisis I: pipes pH=8 5 mM, KCl 85 mM, NP40 0,5 % (v/v), inhibidores de proteasas 1X.

- *Buffer* de lisis II: Tris-HCl pH=8,1 50 mM, SDS 1 % (p/v), EDTA pH=8 10 mM, inhibidores de proteasas 1X.

- *Buffer* de IP: Tris-HCl pH=8,1 15 mM, Tritón X-100 1 % (v/v), EDTA pH=8 1 mM, NaCl 150 mM, inhibidores de proteasas 1X.
- *Buffer* de Lavado I: Tris-HCl pH=8,1 20 mM, Tritón X-100 1 % (v/v), SDS 0,1 % (p/v), EDTA pH=8 2 mM, NaCl 150 mM.
- *Buffer* de Lavado II: Tris-HCl pH=8,1 20 mM, Tritón X-100 1 % (v/v), SDS 0,1 % (p/v), EDTA pH=8 2 mM, NaCl 500 mM.
- *Buffer* de Lavado III: Tris-HCl pH=8,1 10 mM, NP40 % (v/v), deoxicolato de sodio 1 % (p/v), EDTA pH=8 1 mM, LiCl 250 mM.
- *Buffer* TE: Tris-HCl pH=8 10 mM, EDTA pH=8 1 mM.

6.5 Fraccionamiento subcelular

Utilizamos un protocolo adaptado del explicado en el artículo de Gagnon *et al.* (2013). La separación de los núcleos del citoplasma celular consiste en una lisis hipotónica suave. A continuación se detalla el protocolo.

- Se parte de 5 a 10 millones de células MCF7 aproximadamente (esto corresponde a 1 placa p100 confluyente).
- Se aspira el medio y se colocan las placas en hielo. De acá en adelante se trabaja en hielo y con soluciones frías. Se agrega 1 ml de PBS frío a cada placa.
- Se despegan las células con un raspador y se pasa la suspensión a un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
- Se centrifuga durante 5 min a 2000 g y a 4°C. Se descarta el sobrenadante.
- Se resuspende el *pellet* en 250 µl de la solución HLB fría (Tris-HCl pH=7,5 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, NP40 0,3 % (v/v), glicerol 10 % (v/v), inhibidores de proteasas 1X (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* de Roche) y se incuba 10 min en hielo.
- Se centrifuga la suspensión 8 min a 800 g y a 4°C. El sobrenadante es la fracción citoplasmática y el *pellet* los núcleos.
- Se lavan los núcleos 3 veces 250 µl de buffer HLB (sin incubación). Entre lavados se centrifuga a 300 g y a 4°C.

Las fracciones resultantes fueron analizadas por *western blot*. Alternativamente, el RNA de la fracción nuclear fue analizado.

9.6 SDS-PAGE y *Western blot*

Las muestras proteicas fueron corridas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) junto con marcadores de peso molecular y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas por una hora en una solución 5 % p/v de leche descremada en TBS. Posteriormente fueron incubadas con la dilución apropiada del anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de TBS 0,1 % tween-20 (TTBS) de 10 minutos cada uno, las membranas fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluoróforos de emisión en el infrarrojo cercano (IRDye 680LT o IRDye 800 CW de Li-Cor), disueltos en la misma solución de bloqueo. Las membranas fueron lavadas luego 3 veces con TTBS y una vez con TBS durante 10 min a temperatura ambiente. Una vez secas las membranas, estas fueron analizadas en el equipo Odyssey de Li-Cor. Los anticuerpos utilizados se especifican en la sección 6.10.

6.7 *Análisis de RNA*

6.7.1 Extracción de RNA total de células humanas en cultivo

Para extraer RNA total de células humanas en cultivo se utilizó alternativamente el reactivo Trizol (Invitrogen) o TRI reagent (Molecular Research) siguiendo el protocolo del fabricante. Se tuvo cuidado de que todo el material plástico y las soluciones utilizadas estuvieran libres de RNasas. Se utilizó agua miliQ autoclavada para preparar las soluciones. Se siguieron los siguientes pasos:

- Se remueve el medio de cultivo de las placas y se lava una vez con PBS.
- Se incorpora 250 μl de TRIZOL o TRI reagent por pocillo de placa de 12 pocillos, independientemente del número de células, y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente con agitación.
- Se transfiere el contenido de cada pocillo a tubos *ependorf* de 1,5 ml.
- Se agrega a cada tubo 50 μl de cloroformo y se agita vigorosamente. No se agita en un vórtex para evitar la rotura de RNAs largos.
- Se centrifuga a 12000 g y a 4° C en una microcentrifuga de mesada durante 15 minutos.
- Se transfiere la mayor cantidad de fase acuosa (100 μl aproximadamente) a otro tubo *ependorf* de 1,5 ml.

- Para la precipitación del RNA, se agregan 100 µl de isopropanol y 1 µl de glucógeno 20 mg/ml y se mezcla por inversión. El glucógeno actúa como *carrier*, aumentando la masa del RNA precipitado. Se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga a 12000 g y a 4° C en una microcentrífuga de mesada durante 15 minutos.
- Se elimina el sobrenadante por volcado, el *pellet* es el RNA precipitado.
- Se lava el *pellet* con 1 ml de etanol 75%, agitando el tubo en un vórtex para despegar el *pellet*.
- Se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos, a temperatura ambiente para favorecer la dilución de las sales contaminantes en el etanol 75%.
- Se aspira el sobrenadante con pipeta teniendo cuidado de no remover el *pellet* y de que no queden restos de etanol en el tubo.
- Se deja secar el *pellet* a temperatura ambiente.
- Para resuspender el RNA, se agregan 20 µl de agua, se congela a -20 o -80 °C y se calienta a 55 °C durante 5 minutos. Se agita en un vórtex.

Alternativamente, el RNA fue extraído de núcleos, obtenidos según el protocolo descrito más arriba. En este caso, el *Trizol* o *TRI reagent* fue agregado al *pellet* de núcleos resultante del fraccionamiento subcelular.

6.7.2 Control de calidad y cuantificación de RNA

La calidad del RNA extraído según el protocolo detallado en el apartado anterior puede analizarse corriendo una alícuota en un gel de agarosa 1% p/v con bromuro de etidio a un voltaje alto para disminuir la probabilidad de degradación durante la corrida. Si la preparación fue correcta y el RNA no fue degradado, deben observarse tres bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S, al 18S y a los tRNAs. Para la cuantificación se utilizó el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para realizar una cuantificación más precisa del RNA purificado se utilizó el reactivo Quant-it RNA (Invitrogen), basado en fluorometría, y el lector Qubit (Invitrogen). Este reactivo permite cuantificar el RNA específicamente, evitando que el DNA contaminante influya en dicha cuantificación.

6.7.3 Cuantificación relativa de mRNAs, pre-mRNAs y eRNAs

Reacciones de RT-qPCR fueron realizadas: primero se realiza una reacción de retrotranscripción (RT) en la que el RNA es copiado a DNA copia (cDNA) que a su vez

sirve como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se amplificará el fragmento de interés utilizando *primers* específicos. Los resultados se informan como niveles de los RNAs de interés relativizados a los niveles de uno de expresión constitutiva y no afectada por los tratamientos.

Retrotranscripción (RT)

La RT es, en general, una reacción inespecífica ya que se usan *primers* oligo-dT que permiten la copia de todos los mRNAs desde el extremo 3' (se unen a su cola de poliA). Alternativamente, se utiliza una mezcla de *primers* decámeros de secuencia aleatoria que permiten la copia de todos los RNAs y desde cualquier sitio. Los pre-mRNAs y los eRNAs no poseen cola poliA (se desconoce al menos si se procesan en su extremo 3') de modo que su copia a cDNA debe realizarse con decámeros de secuencia aleatoria. En los casos en los que se analizaron tanto mRNAs como eRNAs, la RT se realizó con estos decámeros. Se tuvo cuidado de que todo el material plástico y las soluciones utilizadas estuvieran libres de RNAsas. Se utilizó agua miliQ autoclavada para preparar las soluciones. La reacción se realiza de la siguiente manera:

- Se toman 2,5 µl del RNA extraído y se agregan 0,5 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 200 ng del *primer* oligo-dT(X18) (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') o del oligo dN10 (5'-NNNNNNNNN-3', siendo N cualquiera de los nucleótidos) y agua hasta completar 5 µl, todo en tubos o placas de pocillos de 0,2 ml.
- Se calienta a 65 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el RNA y se pone inmediatamente en hielo para evitar la re-naturalización.
- Se agrega a cada tubo o pocillo 5 µl del resto de la mezcla de reacción compuesta por: 0,5 µl de MMLV-RT 200 U/ µl (Invitrogen), 0,25 µl de *RNasa-OUT* 40 U/ µl (Invitrogen), 2 µl de *Buffer* RT 5X (Invitrogen, comercializado junto con la MMLV-RT), 1 µl de DTT 100 nM y agua hasta completar el volumen.
- Se incuba 1 hora a 37 °C.
- La reacción se detiene incubando a 75 °C durante 10 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR)

En todas las reacciones de qPCR realizadas se corrió junto con las muestras una curva de calibración con diluciones seriadas de cDNA. En una reacción típica se realizan diluciones seriadas al 1/2, siendo el primer punto una dilución 1/4 de la mezcla de las muestras a medir. Las muestras fueron diluidas 1/30 para que sus valores queden incluidos en el rango

de la curva de calibración. Se toman 2,5 μ l de cada una de las diluciones y se coloca junto con 22,5 μ l de la siguiente mezcla: 2,5 μ l de *buffer* de PCR sin MgCl₂, 1,5 a 2,5 μ l de MgCl₂ 50 mM (3 a 5 mM dependiendo del par de *primers*), 0,5 μ l de *primer* directo 20 μ M, 0,5 μ l de *primer* reverso 20 μ M, 0,5 μ l de dNTPs 10 mM, 0.15 μ l de Taq Polimerasa 5 U/ μ l (Invitrogen), 0,025 μ l de SYBR Green Gel Stain (Roche) diluído 1/30 en DMSO, agua hasta completar el volumen.

Se utilizó el equipo *Eppendorf Mastercycle Realplex* con el siguiente programa: 2 minutos a 95°C y 40 ciclos de 10" a 95°C (desnaturalización), 15" a 60-68°C (apareamiento; la temperatura depende del par de *primers*) y 20" a 72°C (elongación, al final del cual se mide la fluorescencia); la reacción culmina con una curva de temperatura de 60 a 95°C en la que se mide la fluorescencia cada 1°C (curva de *melting* del DNA), que da idea a cerca de la especificidad de la reacción. En paralelo los productos son analizados en un gel de agarosa 1,5 % (p/v) para verificar que exista un único producto de amplificación y del tamaño esperado.

En todos los ensayos realizados se verifica que la eficiencia de la reacción sea óptima y que el rango de trabajo sea lineal. Así se obtienen valores de los niveles relativos de los cDNA de cada muestra. En todos los casos se informa este valor normalizado al de uno de expresión constitutiva, como HSPCB, GAPDH o PUM1. En el caso de analizar mRNAs, los *primers* fueron diseñados de modo que cada uno del par se una a exones diferentes y contiguos. De esta forma, se evita la amplificación de cDNA de RNA precursor o de DNA genómico contaminante. En el caso de analizar los niveles de pre-mRNAs o de eRNAs (en los que los *primers* de la qPCR son capaces de amplificar el DNA contaminante), se analizaron en paralelo muestras con las que no se realizó la reacción de RT. El producto de amplificación de estas muestras debe ser aparece, como mínimo 4 ciclos después que el de las muestras con cDNA.

6.7.4 Evaluación de los patrones de *splicing* alternativo

Los patrones de *splicing* alternativo de eventos endógenos o de minigenes reporteros de *splicing* alternativo se analizan por RT seguida de PCR semicuantitativa o radiactiva (rPCR). Luego del análisis del producto de la rPCR se obtienen valores correspondientes a las cantidades relativas de la isoforma de inclusión y de exclusión del evento de *splicing* alternativo que se analiza. En todos los casos el resultado se informa como la relación inclusión/ exclusión.

La RT es realizada como lo explicado en el apartado anterior.

Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa o radiactiva (rPCR)

En la rPCR se utilizan *primers* que permiten la amplificación tanto de la isoforma de inclusión como de la de exclusión. En el caso de analizar eventos de *splicing* alternativo endógenos los iniciadores se unen a los exones que flanquean al exón alternativo. En el caso de los eventos de minigenes, los iniciadores también se unen a los exones flanqueantes pero deben abarcar específicamente la juntura entre los fragmentos de exones de los distintos genes.

En la reacción de rPCR se colocan 2 μ l de reacción de RT sin diluir y 23 μ l de la siguiente mezcla: 2,5 μ l de *buffer* de PCR sin MgCl₂, 0,75 a 2 μ l de MgCl₂ 50 mM (1,5 a 4 mM concentración final dependiendo del par de *primers*), 0,8 μ l de *primer* directo 20 μ M, 0,8 μ l de *primer* reverso 20 μ M, 0,5 μ l de dNTPs 10 mM, 0,15 μ l de Taq Polimerasa 5 U/ μ l (Invitrogen), 0,75 μ l de DMSO, 1 μ Ci [α -³²P] dCTP (aprox. 0,1 μ l de [α -³²P] dCTP 10 μ Ci/ μ l, act. esp.: 3000 Ci/mmol) y agua hasta completar el volumen.

El programa para evaluar el patrón de *splicing* de SYNE2 Exón 107 endógeno y de minigén es el siguiente: 2 minutos a 95°C y 30 ciclos de 10" a 95°C (desnaturalización), 15" a 60-68°C (apareamiento) y 20" a 72°C (elongación). El programa utilizado para evaluar el patrón de *splicing* del minigén EDI es: 2 minutos a 95°C y 40 ciclos de 10" a 95°C (desnaturalización), 15" a 60-68°C (apareamiento) y 20" a 72°C (elongación). Las secuencias de los *primers* utilizados en cada caso se especifican en la sección 6.11.

Los fragmentos amplificados en la reacción de rPCR incorporan [α -³²P] dCTP. Estos son separados por tamaño en una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% nativo. Luego el gel es secado sobre papel Whatmann y expuesto a una película con orientadores generando una autoradiografía. De esta manera, se pueden observar bandas que corresponden a los productos que incluyen o excluyen al exón alternativo. Para cuantificar estos productos, se orienta la película sobre el gel utilizando los orientadores, se recorta las bandas correspondientes a los productos de interés, y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador beta. Debido a que utilizamos el isótopo ³²P, 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.

Vale aclarar que los valores de la relación inclusión/ exclusión que surgen de este método de análisis de patrones de *splicing* alternativo no reproducen los niveles reales. Durante la PCR pueden introducirse algunos sesgos. La amplificación de la isoforma que incluye al exón alternativo puede, por ejemplo, verse desfavorecida por su longitud. Este método es

útil sin embargo, para comparar los niveles de cambio de los patrones de *splicing* alternativo entre tratamientos, cosa que es nuestro objetivo.

6.8 Ensayo de captura de la conformación de la cromatina (3C)

Utilizamos esta estrategia para analizar la frecuencia de interacción entre un *enhancer* y el promotor de su gen blanco. Los pasos básicos de este ensayo son mostrados en la **figura M5.A**. El protocolo de 3C fue puesto a punto en el laboratorio tomando los trabajos de Louwers *et al.* (2009) y Naumova *et al.* (2012) como referencia.

Antes de comenzar, hay que considerar qué utilizar como templado en las curvas de calibración de las reacciones de qPCR. Idealmente, este sería una colección de todos los productos de ligación posibles de los fragmentos generados por la enzima de restricción seleccionada. Dado que el genoma humano es muy grande, la generación de una colección en el que todos los productos estén igualmente representados es imposible. Debemos recurrir a BACs que contienen la región del genoma que se quiere estudiar (**Figura M5.B**). En el caso de la región que contiene al promotor de GREB1 junto con el *enhancer* de ER α que controla su expresión utilizamos el BAC 884L15 de la biblioteca RP11. Como control del experimento (una interacción reportada que no cambia con E2) utilizamos el promotor de USP22 que interactúa con una región intragénica. En este caso utilizamos el BAC 746M1 de la biblioteca RP11. Brevemente, para la generación de los templados de las curvas de calibración de qPCR, 10 a 20 μ g de BAC fue digerido con 50 U de la enzima de restricción *Nco*I (NEB) en 50 μ l de volumen de reacción. El DNA digerido fue extraído con fenol (pH=8): cloroformo (1:1) y precipitado con NaOAc y EtOH de forma convencional. El DNA fue luego ligado con 15 U de ligasa T4 (Promega) en 60 μ l volumen de reacción. El DNA fue luego purificado realizando dos extracciones con fenol (pH=8): cloroformo (1:1) consecutivas.

A continuación detallamos el protocolo de 3C puesto a punto en el laboratorio. Los volúmenes fueron ajustados a $2,5 \times 10^7$ de células MCF7 (equivalente a 4 placas confluentes)

Entrecruzamiento

Con el fin de lograr una mayor eficiencia en el entrecruzamiento, este se realiza con células en suspensión de la siguiente manera:

- Se remueve el medio de cultivo y las células son lavadas con PBS. Se agrega 1 ml de tripsina 0,25 % (p/v) y se incuba 5 min a 37°C.

- Se resuspenden las células en 9 ml de medio de cultivo suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino. Se centrifuga la suspensión 5 min a 1000 g.
- Se resuspenden las células en 10 ml de formaldehído 1 % (v/v) en PCB en rotación, por 10 min a temperatura ambiente.
- Se pone el tubo en hielo y se agregan 625 µl de glicina 2 M para bloquear la reacción de entrecruzamiento. Se incuba 15 min y se centrifuga 5 min a 1000 g a 4°C.
- Se lava con PBS frío y se centrifuga 5 min a 1000 g a 4°C.

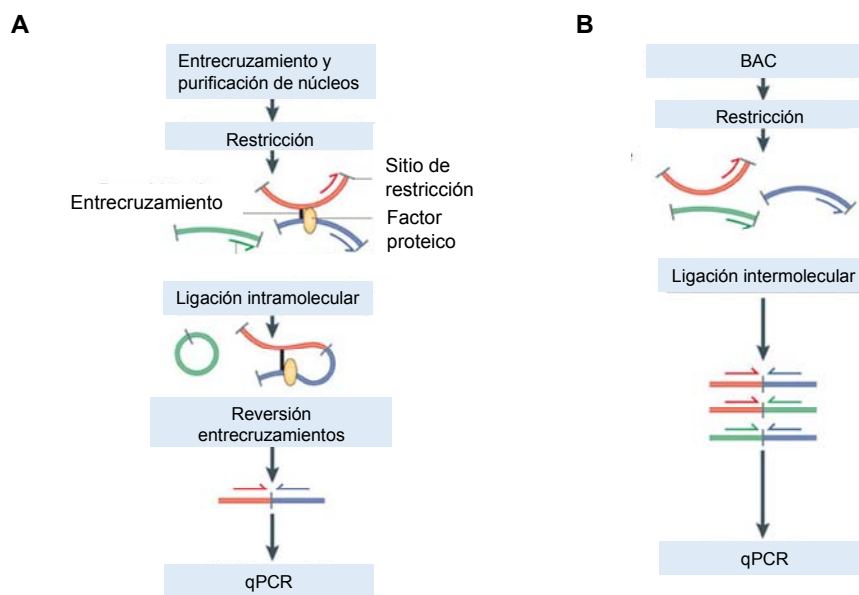


Figura M5. A. Los pasos críticos del ensayo de 3C puesto a punto en el laboratorio y cuyo protocolo se detalla en la sección 6.8. **B.** Los pasos involucrados en la generación de la muestras de referencia en la que todos los productos de ligación de la región bajo estudio deben estar igualmente representados. Tomado de Li *et al.* (2012)

Lisis

Deben obtenerse núcleos enteros para la posterior digestión con la enzima de restricción.

- Las células son resuspendidas en 550 µl de buffer de lisis (Tris-HCl pH=7,5 10 mM, NaCl 10 mM, NP40 0,2 %, inhibidores de proteasas 1X, *cOmpete Protease Inhibitor Cocktail* de Roche). Se incuba 15 min en hielo.

- Las células son lisadas utilizando el homogeneizador Dounce con el pistón A. Se hacen 10 pasadas del pistón, se deja reposar 1 min en hielo y se hacen 10 pasadas más. Se toma una pequeña alícuota para verificar la correcta obtención de núcleos en un microscopio con contraste de fase.

- Se centrifugan 5 min a 4000 g a 4°C.

Digestión con la enzima de restricción

La digestión es realizada sobre núcleos enteros. Para evitar su aglutinamiento, cada tubo *ependorf* debe contener 5×10^6 núcleos como máximo.

- Se lava el pellet de células en 500 μ l del buffer de restricción 1,2 X (el recomendado por el proveedor de la enzima de restricción). Luego de cada lavado se centrifuga 5 min a 4000 g a 4°C.

- Se resuspenden los núcleos en 250 μ l de buffer de restricción 1,2 X y se separan en 5 alícuotas de 50 μ l cada una (equivalente a 5×10^6 núcleos) en tubos *ependorf*.

- Se agrega a cada tubo 362 μ l de buffer de restricción 1,2 X.

- Se agrega 38 μ l de SDS 1 % (p/v) a cada tubo y se mezcla bien con la pipeta sin hacer burbujas.

- Se incuba a 65 °C durante exactamente 10 min y se ponen los tubos en hielo inmediatamente. Con este paso se permeabilizan los núcleos.

- Se agrega 44 μ l de Tritón X-100 10 % (v/v) para aplacar la acción del SDS.

- Se incuba a 37°C durante 1 h.

- Se toman alícuotas de 25 μ l como control de DNA no digerido. Se guarda a -20°C hasta su uso posterior.

- Se agrega a cada tubo 200 U de la enzima de restricción *NcoI* (NEB) y se incuba toda la noche a 37°C con rotación.

- Se agrega a cada tubo 86 μ l de SDS 10 % (p/v) mezclando cuidadosamente para evitar hacer burbujas.

- Se toman alícuotas de 25 μ l como control de DNA digerido para verificar la eficiencia de digestión. Se guarda a -20°C para su posterior utilización.

Verificación de la eficiencia de digestión

El DNA de las alícuotas de cromatina no digerida y digerida es purificado mediante extracciones fenol: cloroformo convencionales. La eficiencia de digestión se analiza mediante reacciones de qPCR utilizando un par de *primers* que amplifica una región que contiene un sitio de restricción *NcoI* (si la digestión en ese sitio ocurre no habrá amplificación). Como control del DNA total de cada muestra se usa un par de *primers* que amplifica una región dentro de un fragmento de restricción (es decir que su amplificación ocurre independientemente de la digestión). En la **figura M6** se muestra le eficiencia de digestión típica de este protocolo. Para seguir adelante, esta debe ser del 75 % como mínimo.

Ligación

La cromatina digerida debe ser diluida 20 veces para favorecer la ligación intramolecular.

- Se prepara el buffer de ligación (Tritón X-100 1%, buffer de ligación 1X, ATP 1 mM, BSA 0,1 mg/ml) y 7,6 ml son distribuidos en tubos cónicos de 15 ml.
- Se transfieren los 400 µl de cromatina digerida al tubo con el *buffer* de lisis frío.
- Se agregan 100 U de T4 ligasa (Promega) a cada tubo. Se incuba a 16°C durante 4 h.

MCF7: qPCR

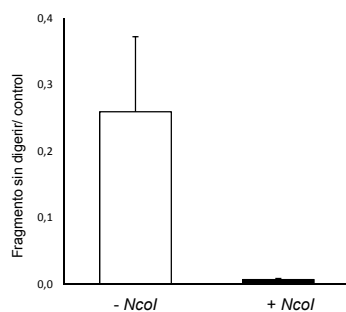


Figura M6. Eficiencia de digestión típica, para ensayos de 3C, observada en células MCF7 utilizando al enzima de restricción *NcoI*.

Reversión de los entrecruzamientos

- Se agrega 50 µl de proteinasa K 10 mg/ml y se incuba a 65°C toda la noche.
- A la mañana siguiente se agrega una nueva alícuota de proteinasa K y se incuba a 65°C por 2 h.
- Se agrega 30 µl de RNasa A 10 mg/ml y se incuba 1 h a temperatura ambiente.

Purificación del DNA

- Se transfiere el contenido del tubo a un tubo cónico de 50 ml. Se agrega 1 volumen (8 ml) de fenol (pH=8) por tubo. Se agita 2 min en un vórtex y se centrifuga a 3000 g por 10 min. Se transfiere la fase acuosa a otro tubo cónico de 50 ml.
- Se agrega 1 volumen de fenol (pH=8): cloroformo (1:1). Se agita 1 min en un vórtex y se centrifuga a 3000 g por 10 min. Se transfieren los sobrenadantes a tubos para centrifugar a alta velocidad (Córax para centrifuga Beckman).
- Se lleva el volumen a 14 ml con buffer TE (Tris-HCl pH=8 10 mM, EDTA 1mM). Con este paso se diluye el DTT del buffer de ligación que inhibe la precipitación del DNA. Se divide el contenido resultante del tubo en dos.
- Se agrega 1/10 del volumen de NaOAc 3M y se mezcla bien. Se agrega 2,5 volúmenes de EtOH 100 % frío. Se mezcla bien por inversión. Se incuba 1 h como mínimo a -80°C.
- Se centrifuga durante 20 min a 4°C y a 10000 g.
- Se disuelve el pellet de DNA en 400 µl de buffer TE y se transfiere a un tubo eppendorf de 1,5 ml.
- Se agrega 1 volumen de fenol (pH=8): cloroformo (1:1). Se agita 30 s en un vórtex y se centrifuga a 13000 rpm en una centrifuga de mesada por 10 min a temperatura ambiente.
- Se lava la fase acuosa con 1 volumen de cloroformo.
- Se agrega 1/10 del volumen de NaOAc 3M y se mezcla bien. Se agrega 2,5 volúmenes de EtOH 100 % frío. Se mezcla bien por inversión. Se incuba 1 h como mínimo a -80°C.
- Se centrifuga durante 20 min a 4°C y a 13000 rpm.
- Se lava el pellet de DNA dos veces con EtOH 70 %. Luego de cada lavado se centrifuga 5 min a 13000 rpm y a 4°C.
- Se deja secar al pellet y se resuspende en 25 µl de Tris-HCl pH=7,5 5mM. Se incuba a temperatura ambiente durante varias horas y a 4°C durante la noche. Se cuantifica el DNA y se lleva a una concentración de 50-200 ng/µl.
- Como control de calidad se corren 2 µl y 6 µl de una dilución 1/10 del DNA purificado en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio 0,8 %. Este debe correr como una banda más o menos definida de mayor tamaño que 10 kb (**Figura M7**). Un chorreado de DNA indica una mala eficiencia de ligación.

MCF7

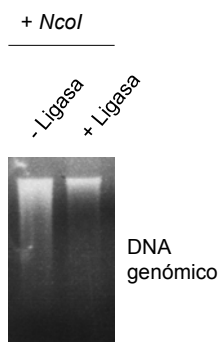


Figura M6. Análisis de la eficiencia de ligación de muestras de 3C eficientemente digeridas con NcoI. El DNA genómico fue purificado y corrido en un gel de agarosa 0,8 % (p/v) teñido con bromuro de etidio.

6.9 Ensayo de co-inmunoprecipitación de proteínas.

Utilizamos este protocolo para estudiar la posible interacción física entre AGO1 y ER α . Analizamos la interacción tanto entre proteínas endógenas en células MCF7 como sobreexpresadas en HEK293. Células MCF7 (5-10X10⁶ equivalente a una placa p100 confluyente) o HEK293 (2-5X10⁶ equivalente a una placa p60 confluyente) fueron cosechadas en PBS frío 1 h luego de ser tratadas con E2 (caso MCF7) o 48 h luego de ser transfectadas (caso HEK293). Seguimos el siguiente protocolo:

- Las células son centrifugadas y resuspendidas en 0,5 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl pH=7,5 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 1% (v/v), Deoxicolato de Sodio 0,5 % (p/v), DTT 0,5 mM, β -glicerofosfato 5 mM, KF 5 mM, inhibidores de proteasas 1X (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* de Roche). Se incuban 30 minutos a 4°C
- El lisado es sonificado tres veces con un sonicador Branson W-450 a una amplitud del 20 % durante 10 s. Luego es centrifugado 20 minutos a 4°C y el sobrenadante es utilizado para los ensayos de co-inmunoprecipitación.
- Se toman 40 μ l de la suspensión de bolitas magnéticas acopladas a proteína G (*Dynabeads® Protein G* de Invitrogen). Se colocan en un tubo *ependorf* de 1,5 y se lavan dos veces con el *buffer* de IP (sin inhibidores de proteasas).
- Se agregan 200 μ l del *buffer* de lisis y el anticuerpo específico a las bolitas. Los anticuerpos específicos se detallan en la sección 6.10. Se incuban 1 hora a temperatura ambiente en rotación suave.
- Se remueve el sobrenadante y se lavan las bolitas 2 veces con el *buffer* de lisis (sin inhibidores de proteasas). De esta forma quedan las bolitas listas para el agregado del lisado celular.

- Se toma el volumen equivalente al 5% del lisado celular como *input* y se le agrega *Laemmli sample buffer* 2X hasta una concentración final de 1X. El resto del lisado se agrega a las bolitas magnéticas con el anticuerpo pre-acoplado. Se incuba toda la noche a 4°C en rotación.
- Las bolitas son lavadas 4 veces con el *buffer* de lavado (Tris-HCl pH=7,5 50 mM, NaCl 125 mM, EDTA 1 mM, NP40 0,1% (v/v)).
- El inmunoprecipitado, aún asociado a las bolitas, se resuspende con *Laemmli sample buffer* 2X.
- El *input* y el inmunoprecipitado se analiza por SDS-PAGE seguido de *western blot*.

6.10 Anticuerpos utilizados

6.10.1 CHIP/IP

FLAG: M2 monoclonal hecho en ratón, Sigma Aldrich (F1804). 1-2 µg por IP.

ERα: HC-20 policlonal hecho en conejo, Santa Cruz Biotechnology (sc-543), 2,5 µg en ChIPs, 1µg por IP.

AGO1: 4B8 monoclonal hecho en rata, Sigma Aldrich (SAB4200084), 5 µg en ChIPs, 2µg por IP.

RNAPII: N-20 policlonal hecho en conejo, Santa Cruz Biotechnology (sc-899), 2,5 µg en ChIPs.

6.10.2 Western blot

AGO1: 4B8 monoclonal hecho en rata, Sigma Aldrich (SAB4200084), dilución utilizada 1: 1000

ERα: HC-20 policlonal hecho en conejo, Santa Cruz Biotechnology (sc-543), dilución utilizada: 1: 1000.

GAPDH: 6C5 monoclonal hecho en conejo, Santa Cruz Biotechnology (sc-32233), dilución utilizada 1: 5000

Actina: (I-19)-R policlonal hecho en conejo, Santa Cruz Biotechnology (sc-1616R), dilución utilizada: 1: 1000

HA: HA.11 monoclonal hecho en ratón, BioLegend (901501), dilución utilizada: 1:1000

H3: policlonal hecho en conejo, Millipore (06-755), dilución utilizada: 1:30000

6.11 Oligonucleótidos utilizados

6.11.1 Oligonucleótidos iniciadores para PCR (*primers*)

Evaluación de los niveles de mRNA por qPCR

TFF1 mRNA	F: CACCATGGAGAACAAGGTGA R: TGACACCAGGAAAACCACAA
GREB1 mRNA	F: GGCAGGACCAGCTTCTGA R: CTGTTCCCACCACCTTGG
NRIP1 mRNA	F: GCCAGAAGATGCACACTTGA R: CAAGCTCTGAGCCTCTGCTT
SYNE2 mRNA	F: GGGCTTGCTTTGAGGAGAC R: CCACATCATTGCTGACTTCG
SYNE2- α 2 mRNA	F: ACTGTCGCTTGCTGTCTTTC R: GCCTTCTTTGCCACCATCC
ESR2 mRNA	F: GGTCGTGTGAAGGATGTAAGG R: TCACCATTCCCACCTTCGTAAC
AGO1 mRNA	F: GCCAGATCCCTGTTCCCTTG R: GTGAAAGCCGAACCAGACCTC
HSPCB mRNA	F: CCAAAAAGCACCTGGAGATCA R: TGTCGGCCTCAGCCTTCT
PUM1 mRNA	F: GGAGCGGTAGGATGAAGATG R: TTGTCGGAGTGAAAGGTAAGG

Evaluación de los niveles de pre-mRNA y eRNA precursor por qPCR

TFF1 pre-mRNA	F: AGCAGAGAGGAGGCAATG R: CACAGAGCAGGAAGAAGC
GREB1 pre-mRNA	F: AGACGACACGCTTTGAAG

	R: CTGGTGCTAACATTAAGTGC
NRIP1 pre-mRNA	F: GTGGGGCAATGAGACAAAAGAC
	R: CAGGAAGTGTTTGGATTGTGAGC
TBP pre-mRNA	F: ACATGTGGTGTATGCAAATCCT
	R: CGTGGTTCGTGGCTCTCTTA
TFF1 <i>enhancer</i>	F: AGGGGATGTGTGTGAGAAGG
	R: GCTTCGAGACAGTGGGAGTC
GREB1 <i>enhancer</i>	F: GCTAACCATGCTGCAAATGA
	R: ACACAGTCAGGGCAAAGGAC
U2 snRNA	F: TTCTCGGCCTTTTGGCTAAG
	R: CTCCTGCTCCAAAATCCA
ChIP-qPCR	
TFF1 <i>enhancer</i>	F: GCTGGCAACGACCTGTCC
	R: GTGTACGGTGGCATCATCTCC
GREB1 <i>enhancer</i>	F: AGGTGATGGGAGTCTGAGTTC
	R: GTCATGCCCGTGCCTACC
NRIP1 <i>enhancer</i>	F: GGCTCGTCATTAGCTTCCAG
	R: CAAAAGGGGTGTTGAAGGA
FOXC1 <i>enhancer</i>	F: CTGAGGAACACAAGACTAGCC
	R: ACTGGACTCATTTTGGGACATC
Control negativo	F: GGAGTTATGTTCTTAGGATTATG
	R: AATAGACTTAGTGCTGTTGC
3C	
Eficiencia digestión	F: GCCAGTGCTACGAGAATG
	R: CTGCTCTTGCCTGAAATTAAC
Control de carga	F: GGGAGAGGGTAAGGAGGTC
	R: GCCACGGATAAGGAGAGC

Ancla-A F: GGTCAGCCGTTTCAGGATG
 R: TGGTGCCTTGGGTTTGTG

Ancla-B F: TTGCCCTGACTGTGTAAG
 R: ATGTTCTCTGCTCTCCTG

Ancla-C F: CTGGTCAGCCGTTTCAGGATG
 R: AGGCAGTGAGGCAGAAAGG

Ancla-D F: CTGGTCAGCCGTTTCAGGATG
 R: TCTACCCGAGTCCTCTAAAG

Evaluación de patrones de *splicing* alternativo por rPCR

E107-SYNE2 F: CGCTACTGCCAGGAGGTG
 R: GGAAGGGCTGTCGGGAAC

pUHC-E107-SYNE2 F: ACTGCCTGCTGGTGACCCCGT
 R: TCACGATCCAGGTCACCGTCA

6.11.2 siRNAs (*Block-IT* de Invitrogen)

siControl (siLuc): CUUACGCUGAGUACUUCGATT

siAGO1: GAGAAGAGGUGCUCAAGAATT

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlenstiel, C.L., Lim, H.G.W., Cooper, D. a., Ishida, T., Kelleher, A.D., y Suzuki, K. (2012). Direct evidence of nuclear Argonaute distribution during transcriptional silencing links the actin cytoskeleton to nuclear RNAi machinery in human cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1579-1595.
- Alexander, R.D., Innocente, S. a, Barrass, J.D., y Beggs, J.D. (2010). Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Mol. Cell* **40**, 582-593.
- Allen, B.L., y Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 155-166.
- Alló, M., Buggiano, V., Fededa, J.P., Petrillo, E., Schor, I., de la Mata, M., Agirre, E., Plass, M., Eyras, E., Elela, S.A., *et al.* (2009). Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 717-724.
- Alló, M., Agirre, E., Bessonov, S., Bertucci, P., Gómez Acuña, L., Buggiano, V., Bellora, N., Singh, B., Petrillo, E., Blaustein, M., *et al.* (2014). Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15622-15629.
- Allshire, R.C., y Ekwall, K. (2015). Epigenetics regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **7**, 1-25.
- Almada, A.E., Wu, X., Kriz, A.J., Burge, C.B., y Sharp, P.A. (2013). Promoter directionality is controlled by U1 snRNP and polyadenylation signals. *Nature* **499**, 360-363.
- Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Andrau, J.-C., *et al.* (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 998-1004.
- Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C., y Komorowski, J. (2009). Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Res.* **19**, 1732-1741.
- Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., *et al.* (2014a). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* **507**, 455-461.
- Andersson, R., Refsing Andersen, P., Valen, E., Core, L.J., Bornholdt, J., Boyd, M., Heick Jensen, T., y Sandelin, A. (2014). Nuclear stability and transcriptional directionality separate functionally distinct RNA species. *Nat. Commun.* **5**, 5336.
- Ashe, H.L., Monks, J., Wijgerde, M., Fraser, P., y Proudfoot, N.J. (1997). Intergenic transcription and transinduction of the human β -globin locus. *Genes Dev.* **11**, 2494-2509.
- Auboeuf, D., Höning, A., Berget, S.M., y O'Malley, B.W. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* **298**, 416-419.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Kang, Y.K., Larkin, K., Lee, J.W., Berget, S.M., y O'Malley, B.W. (2004). Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2270-2274.
- Bannister, A.J., y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381-395.

-
- Barash, Y., Calarco, J. a, Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B.J., y Frey, B.J. (2010). Deciphering the splicing code. *Nature* **465**, 53-59.
- Batsché, E., Yaniv, M., y Muchardt, C. (2006). The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 22-29.
- Beckmann, J.S., y Trifonov, E.N. (1991). Splice junctions follow a 205-base ladder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2380-2383.
- Berget, S.M. (1995). Exon Recognition in Vertebrate Splicing. *J. Biol. Chem.* **270**, 2411-2414.
- Beyer, a L., y Osheim, Y.N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev.* **2**, 754-765.
- Bieberstein, N.I., Carrillo Oesterreich, F., Straube, K., y Neugebauer, K.M. (2012). First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Rep.* **2**, 62-68.
- Boireau, S., Maiuri, P., Basyuk, E., de la Mata, M. De, Knezevich, A., Pradet-balade, B., Bäcker, V., Kornblihtt, A., Marcello, A., y Bertrand, E. (2007). *JCB : ARTICLE.* **179**, 291-304.
- Borges, F., y Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **16**, 1-15 (AOP).
- Bühler, M., Verdel, A., y Moazed, D. (2006). Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin- Dependent Gene Silencing. *Cell* **125**, 873-886.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle. *Mol. Cell* **36**, 541-546.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., y Daub, C.O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol.* **8**, 158-177.
- Calo, E., y Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* **49**, 825-837.
- Caputi, M., Casari, G., Guenzi, S., Tagliabue, R., Sidoli, A., Melo, C.A., y Baralle, F.E. (1994). A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1018-1022.
- Carrillo Oesterreich, F., Preibisch, S., y Neugebauer, K.M. (2010). Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Mol. Cell* **40**, 571-581.
- Carrillo Oesterreich, F., Herzog, L., Straube, K., Hujer, K., Howard, J., y Neugebauer, K.M. (2016). Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell* **165**, 372-381.
- Carroll, J.S., Liu, X.S., Brodsky, A.S., Li, W., Meyer, C.A., Szary, A.J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E. V., Geistlinger, T.R., *et al.* (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* **122**, 33-43.
- Carroll, J.S., Meyer, C. a, Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoute, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F., *et al.* (2006). Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* **38**, 1289-1297.
- Cenik, E.S., y Zamore, P.D. (2011). Argonaute proteins. *Curr. Biol.* **21**, R446-9.
- Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., Sardo, F., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., *et al.* (2011). Chromatin-associated RNAi

components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature* **480**, 391-395.

Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., *et al.* (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* **308**, 1149-1154.

Chu, Y., Yue, X., Younger, S.T., Janowski, B.A., y Corey, D.R. (2010). Involvement of argonaute proteins in gene silencing and activation by RNAs complementary to a non-coding transcript at the progesterone receptor promoter. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7736-7748.

Core, L.J., Martins, A.L., Danko, C.G., Waters, C.T., Siepel, A., y Lis, J.T. (2014). Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers. *Nat. Genet.* **46**, 1311-1320.

Coulter, D.E., y Greenleaf, A.L. (1985). A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro. *J. Biol. Chem.* **260**, 13190-13198.

Cramer, P. (2014). A tale of chromatin and transcription in 100 structures. *Cell* **159**, 985-994.

Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E., y Kornblihtt, A.R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript. *PNAS* **94**, 11456-11460.

Cramer, P., Cáceres, J.F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, a F., Baralle, F.E., y 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.

Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M. a, Frampton, G.M., Sharp, P. a, *et al.* (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21931-21936.

Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., y Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376-380.

Dowhan, D.H., Hong, E.P., Auboeuf, D., Dennis, A.P., Wilson, M.M., Berget, S.M., y O'Malley, B.W. (2005). Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPER α and CAPER β . *Mol. Cell* **17**, 429-439.

Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., y Meister, G. (2012). MicroRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9850-9862.

Dujardin, G., Lafaille, C., de la Mata, M., Marasco, L.E., Muñoz, M.J., Le Jossic-Corcós, C., Corcos, L., y Kornblihtt, A.R. (2014). How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping. *Mol. Cell* **54**, 683-690.

Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S.F., Collins, P.J., Davis, C. a, Doyle, F., Epstein, C.B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., *et al.* (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., y Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21 \pm nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.

Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., y Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* **150**, 100-110.

Ender, C., y Meister, G. (2010). Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 1819-1823.

Faure, A.J., Schmidt, D., Watt, S., Schwalie, P.C., Wilson, M.D., Xu, H., Ramsay, R.G.,

-
- Odom, D.T., y Flicek, P. (2012). Cohesin regulates tissue-specific expression by stabilizing highly occupied cis-regulatory modules. *Genome Res.* 22, 2163-2175.
- Fire, a, Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S. a, Driver, S.E., y Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fitz, V., Shin, J., Ehrlich, C., Farnung, L., Cramer, P., Zaburdaev, V., y Grill, S.W. (2016). Nucleosomal arrangement affects single-molecule transcription dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 201602764.
- Fong, Y.W., y Zhou, Q. (2001). Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* 414, 929-933.
- Fox-Walsh, K.L., Dou, Y., Lam, B.J., Hung, S.-P., Baldi, P.F., y Hertel, K.J. (2005). The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16176-16181.
- Fullwood, M.J., Liu, M.H., Pan, Y.F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y. Bin, Orlov, Y.L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P.H., *et al.* (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 462, 58-64.
- Gagnon, K.T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B. a, y Corey, D.R. (2013). RNAi Factors Are Present and Active in Human Cell Nuclei. *Cell Rep.* 23, 1-11.
- Gonzalez, S., Pisano, D.G., y Serrano, M. (2008). Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle* 7, 2601-2608.
- Görnemann, J., Kotovic, K.M., Hujer, K., y Neugebauer, K.M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol. Cell* 19, 53-63.
- Gossen, M., y Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5547-5551.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U., y Cavalli, G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* 124, 957-971.
- Gu, S.G., Pak, J., Guang, S., Maniar, J.M., Kennedy, S., y Fire, A. (2012). Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat. Genet.* 44, 157-164.
- Guérin, T.M., Palladino, F., y Robert, V.J. (2014). Transgenerational functions of small RNA pathways in controlling gene expression in *C. elegans*. *Epigenetics* 9, 37-44.
- Guang, S., Bochner, A.F., Burkhart, K.B., Burton, N., Pavelec, D.M., y Kennedy, S. (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature* 465, 1097-1101.
- Hah, N., y Kraus, W.L. (2014). Hormone-regulated transcriptomes: Lessons learned from estrogen signaling pathways in breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 652-664.
- Hah, N., Danko, C.G., Core, L., Waterfall, J.J., Siepel, A., Lis, J.T., y Kraus, W.L. (2011). A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell* 145, 622-634.
- Hah, N., Murakami, S., Nagari, A., Danko, C.G., y Lee Kraus, W. (2013). Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. *Genome Res.* 23, 1210-1223.
- Hammes, S.R., y Levin, E.R. (2011). Minireview: Recent advances in extranuclear steroid

- receptor actions. *Endocrinology* 152, 4489-4495.
- Han, J., Kim, D., y 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.
- Hawkins, J.D. (1988). A survey on intron exon lengths. *Nucleic Acids Res.* 16, 9893-9908.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. a, *et al.* (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 311-318.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., *et al.* (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459, 108-112.
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., y Glass, C.K. (2010). Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol. Cell* 38, 576-589.
- Heldring, N., Isaacs, G.D., Diehl, A.G., Sun, M., Cheung, E., Ranish, J. a, y Kraus, W.L. (2011). Multiple sequence-specific DNA-binding proteins mediate estrogen receptor signaling through a tethering pathway. *Mol. Endocrinol.* 25, 564-574.
- Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., y Bustamante, C. (2009). Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science* 325, 626-628.
- Holoch, D., y Moazed, D. (2015a). Small-RNA loading licenses Argonaute for assembly into a transcriptional silencing complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 328-335.
- Holoch, D., y Moazed, D. (2015b). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 16, 71-84.
- Hou, C., Dale, R., y Dean, A. (2010). Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3651-3656.
- Hsieh, C.-L., Fei, T., Chen, Y., Li, T., Gao, Y., Wang, X., Sun, T., Sweeney, C.J., Lee, G.-S.M., Chen, S., *et al.* (2014). Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 7319-7324.
- Huang, V., Zheng, J., Qi, Z., Wang, J., Place, R.F., Yu, J., Li, H., y Li, L.-C. (2013). Ago1 Interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells. *PLoS Genet.* 9, e1003821.
- Huang, Y., Li, W., Yao, X., Lin, Q., Yin, J., Liang, Y., Heiner, M., Tian, B., y Hui, J. (2012). Article Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the MED23 Subunit. *Mol. Cell* 45, 459-469.
- Hurtado, A., Holmes, K. a, Ross-Innes, C.S., Schmidt, D., y Carroll, J.S. (2011). FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat. Genet.* 43, 27-33.
- Iannone, C., Pohl, A., Papasaikas, P., Soronellas, D., Vicent, G.P., Beato, M., y Valcárcel, J. (2015). Relationship between nucleosome positioning and progesterone-induced alternative splicing in breast cancer cells. *RNA* 21, 360-374.
- Inoue, H., Nojima, H., y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Ip, J.Y., Schmidt, D., Pan, Q., Ramani, A.K., Fraser, A.G., Odom, D.T., y Blencowe, B.J.

-
- (2011). Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res.* *21*, 390-401.
- Ipsaro, J.J., y Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 20-28.
- Janowski, B. a, Huffman, K.E., Schwartz, J.C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D.S., Minna, J.D., y 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., y Corey, D.R. (2007). Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 166-173.
- Jeong, K.W., Kim, K., Situ, A.J., Ulmer, T.S., An, W., y Stallcup, M.R. (2011). Recognition of enhancer element-specific histone methylation by TIP60 in transcriptional activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1358-1365.
- John, S., Sabo, P.J., Thurman, R.E., Sung, M.-H., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Hager, G.L., y Stamatoyannopoulos, J.A. (2011). Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.* *43*, 264-268.
- Jonas, S., y Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 421-433.
- Jonkers, I., y Lis, J.T. (2015). Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 167-177.
- Joshua-Tor, L., y Hannon, G.J. (2011). Ancestral roles of small RNAs: An ago-centric perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1-11.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogués, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J.P., Werbach, S.E., Srebrow, A., y Kornblihtt, A.R. (2001). Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J.* *20*, 5759-5768.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. a, van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., *et al.* (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *467*, 430-435.
- Kaikkonen, M.U., Spann, N.J., Heinz, S., Romanoski, C.E., Allison, K. a, Stender, J.D., Chun, H.B., Tough, D.F., Prinjha, R.K., Benner, C., *et al.* (2013). Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Mol. Cell* *51*, 310-325.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., y Haussler, a. D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* *12*, 996-1006.
- Keren, H., Lev-Maor, G., y Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 345-355.
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snøve, O., y Rossi, J.J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16230-16235.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D. a, Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., *et al.* (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* *465*, 182-187.
- Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Gervais-Bird, J., Madden, R., Paquet, É.R., Koh, C., Venables, J.P., Prinos, P., *et al.* (2008). Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. *Cancer Res.* *68*, 657-663.

- Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2905-2919.
- Kornblihtt, A.R., de la Mata, M., Fededa, J.P., Munoz, M.J., y Nogues, G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. *RNA* **10**, 1489-1498.
- Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Allo, M., y Blencowe, B.J. (2009). When chromatin meets splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 902-903.
- Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., y Muñoz, M.J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 153-165.
- Kowalczyk, M.S., Hughes, J.R., Garrick, D., Lynch, M.D., Sharpe, J.A., Sloane-Stanley, J.A., McGowan, S.J., De Gobbi, M., Hosseini, M., Vernimmen, D., *et al.* (2012). Intragenic Enhancers Act as Alternative Promoters. *Mol. Cell* **45**, 447-458.
- de la Mata, M., y Kornblihtt, A.R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 973-980.
- Lam, M.T.Y., Li, W., Rosenfeld, M.G., y Glass, C.K. (2014). Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 170-182.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., y Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25.
- Lacroix, M., y Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update. *Breast Cancer Res. Treat.* **83**, 249-289.
- Lenhard, B., Sandelin, a, y Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* **13**, 233-245.
- Li, L., Matsui, M., y Corey, D.R. (2016a). Activating frataxin expression by repeat-targeted nucleic acids. *Nat. Commun.* **7**, 10606.
- Li, L.-C., Okino, S.T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R.F., Urakami, S., Enokida, H., y Dahiya, R. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17337-17342.
- Li, M., Liu, G.-H., y Belmonte, J.C.I. (2012). Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 524-535.
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A.Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., *et al.* (2013). Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* **498**, 516-520.
- Li, W., Notani, D., y Rosenfeld, M.G. (2016b). Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 207-223.
- Li, Y., Huang, W., Niu, L., Umbach, D.M., Covo, S., y Li, L. (2013b). Characterization of constitutive CTCF/cohesin loci: a possible role in establishing topological domains in mammalian genomes. *BMC Genomics* **14**: 553.
- Lin, C.Y., Vega, V.B., Thomsen, J.S., Zhang, T., Kong, S.L., Xie, M., Chiu, K.P., Lipovich, L., Barnett, D.H., Stossi, F., *et al.* (2007). Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* **3**, e87.
- Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., y Fu, X.-D. (2008). The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 819-826.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show

widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.

Listerman, I., Sapra, A.K., y 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.

Louwers, M., Splinter, E., van Driel, R., de Laat, W., y Stam, M. (2009). Studying physical chromatin interactions in plants using Chromosome Conformation Capture (3C). *Nat. Protoc.* 4, 1216-1229.

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

Maggi Allan, W., Lanyon, G., y Paul, J. (1983). Multiple origins of transcription in the 4.5 Kb upstream of the ϵ {lunate}-globin gene. *Cell* 35, 187-197.

Maillard, P. V, Ven der Veen, A.G., Deddouche-grass, S., y Rogers, N.C. (2016). Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J.* 35, 2505-2518.

Martienssen, R., y Moazed, D. (2015). RNAi and Heterochromatin Assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a019323.

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

Maston, G.A., Evans, S.K., y Green, M.R. (2006). Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 7, 29-59.

de la Mata, M. De, Alonso, C.R., Fededa, J.P., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., y Kornblihtt, A.R. (2003). A Slow Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. *Mol. Cell* 12, 525-532.

Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14, 447-459.

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

Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Tuschl, T., y Lu, R. (2005). Identification of Novel Argonaute-Associated Proteins. *Curr. Biol.* 15, 2149-2155.

Melo, C. a, Drost, J., Wijchers, P.J., van de Werken, H., de Wit, E., Oude Vrielink, J. a F., Elkon, R., Melo, S. a, Léveillé, N., Kalluri, R., *et al.* (2013). eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Mol. Cell* 49, 524-535.

Moazed, D., y Bu, M. (2006). Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin- Dependent Gene Silencing. *Cell* 873-886.

Mohammed, H., Russell, I.A., Stark, R., Rueda, O.M., Hickey, T.E., Tarulli, G.A., Serandour, A.A., Birrell, S.N., Bruna, A., Saadi, A., *et al.* (2015). Progesterone receptor modulates ER[agr] action in breast cancer. *Nature* 523, 313-317.

Moore, M.J., y Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.

Moore, J.T., Collins, J.L., y Pearce, K.H. (2006). The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem* 1, 504-523.

Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T., y Hatada, I. (2007). One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in

DNA methylation. *Genomics* 89, 687-696.

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

Moshkovich, N., y Lei, E.P. (2010). HP1 recruitment in the absence of argonaute proteins in drosophila. *PLoS Genet.* 6, e1000880.

Moshkovich, N., Nisha, P., Boyle, P.J., Thompson, B. a, Dale, R.K., y Lei, E.P. (2011). RNAi-independent role for Argonaute2 in CTCF/CP190 chromatin insulator function. *Genes Dev.* 25, 1686-1701.

Muñoz, M.J., de la Mata, M., y Kornblihtt, A.R. (2010). The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem. Sci.* 35, 497-504.

Muñoz, M. J., Paronetto, M.P., de la Mata, M. De, Pelisch, F., Glover-cutter, K., Ben-dov, C., Lozano, J.J., Bird, G., Bentley, D., Bertrand, E., y Kornblihtt, A.R. (2009). DNA Damage Regulates Alternative Splicing through Inhibition of RNA Polymerase II Elongation. *Cell* 708-720.

Naumova, N., Smith, E.M., Zhan, Y., y Dekker, J. (2012). Analysis of long-range chromatin interactions using Chromosome Conformation Capture. *Methods* 58, 192-203.

Van Nguyen, T., Giannoni, F., Dubois, M.F., Seo, S.J., Vigneron, M., Kédinger, C., y Bensaude, O. (1996). In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by α -amanitin. *Nucleic Acids Res.* 24, 2924-2929.

Nilsen, T.W., y Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457-463.

Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T., y Ui-Tei, K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA* 19, 17-35.

Nogués, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., y Kornblihtt, A.R. (2002). Transcriptional Activators Differ in Their Abilities to Control Alternative Splicing. *J. Biol. Chem.* 277, 43110-43114.

Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A.R.F., Kimura, H., Dye, M.J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., y Proudfoot, N.J. (2015). Mammalian NET-seq reveals genome-wide nascent transcription coupled to RNA processing. *Cell* 161, 526-540.

Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., y Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40, 1413-5

Pandya-Jones, A., y Black, D.L. (2009). Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons. *RNA* 15, 1896-1908.

Perales, R., y Bentley, D. (2009). «Cotranscriptionality»: the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol. Cell* 36, 178-191.

Peters, L., y Meister, G. (2007). Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing. *Mol. Cell* 26, 611-623.

Petes, S.J., y Lis, J.T. (2012). Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation. *Trends Genet.* 28, 285-294.

Pham, T.H., Benner, C., Lichtinger, M., Schwarzfischer, L., Hu, Y., Andreesen, R., Chen, W., y Rehli, M. (2012). Dynamic epigenetic enhancer signatures reveal key transcription factors associated with monocytic differentiation states. *Blood* 119, 161-172.

Pradeepa, M.M., Grimes, G.R., Kumar, Y., Olley, G., Taylor, G.C.A., Schneider, R., y

-
- Bickmore, W.A. (2016). Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers. *Nat. Genet.* **48**, 681-686.
- Prévôt, D., Morel, A.P., Voeltzel, T., Rostan, M.C., Rimokh, R., Magaud, J.P., y Corbo, L. (2001). Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: Involvement in estrogen receptor α signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 9640-9648.
- Pundhir, S., Poirazi, P., y Gorodkin, J. (2015). Emerging applications of read profiles towards the functional annotation of the genome. *Front. Genet.* **6**, 188.
- Quinlan, A.R., y Hall, I.M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-842.
- R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., y Izaurralde, E. (2005). miRNA-mediated gene silencing A crucial role for GW182 and the DCP1: DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **11**, 1640-1647.
- Renoir, J.-M. (2012). Estradiol receptors in breast cancer cells: associated co-factors as targets for new therapeutic approaches. *Steroids* **77**, 1249-1261.
- Reynolds, A., Anderson, E.M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J.O.N., Marshall, W.S., y Khvorova, A. (2006). Induction of the interferon response by siRNA is cell type – and duplex length – dependent. *RNA* **12**, 988-993.
- Weinberg, M.S., Villeneuve, L.M., Ehsani, A.L.I., Amarguoui, M., Aagaard, L., Chen, Z., Riggs, A.D., Rossi, J.J., y 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.
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S.P., Renoir, J.M., y Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* **32**, 597-622.
- Roy, A.L., y Singer, D.S. (2015). Core promoters in transcription: Old problem, new insights. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 165-171.
- Sainsbury, S., Bernecky, C., y Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 129-143.
- de Santa, F., Barozzi, I., Mietton, F., Ghisletti, S., Polletti, S., Tusi, B.K., Muller, H., Ragoussis, J., Wei, C.-L., y Natoli, G. (2010). A Large Fraction of Extragenic RNA Pol II Transcription Sites Overlap Enhancers. *PLoS Biol.* **8**, e1000384.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., y Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**, 138-141.
- Schaukowitch, K., Joo, J.Y., Liu, X., Watts, J.K., Martinez, C., y Kim, T.K. (2014). Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. *Mol. Cell* **56**, 29-42.
- Schmidt, D., Schwalie, P.C., Ross-Innes, C.S., Hurtado, A., Brown, G.D., Carroll, J.S., Flicek, P., y Odom, D.T. (2012). A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res.* **578-588**.
- Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., y 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.

- Schor, I.E., Fiszbein, A., Petrillo, E., y Kornblihtt, A.R. (2013). Intragenic epigenetic changes modulate NCAM alternative splicing in neuronal differentiation. *EMBO J.* 32, 2264-2274.
- Schwartz, S., Meshorer, E., y Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 990-995.
- Schwerk, C., y Schulze-Osthoff, K. (2005). Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 19, 1-13.
- Shandilya, J., y Roberts, S.G.E. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819, 391-400.
- Shogren-Knaak, M. (2006). Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* 311, 844-847.
- Sienski, G., Dönertas, D., y Brennecke, J. (2012). Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* 151, 964-980.
- Sims, R.J., Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B. a, Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., y Reinberg, D. (2007). Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 28, 665-676.
- Song, F., Chen, P., Sun, D., Wang, M., Dong, L., Liang, D., Xu, R.M., Zhu, P., y Li, G. (2014). Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science*. 344, 376-380.
- Soufi, A., Donahue, G., y Zaret, K.S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151, 994-1004.
- Spicuglia, S., Kumar, S., Yeh, J.H., Vachez, E., Chasson, L., Gorbach, S., Cautres, J., y Ferrier, P. (2002). Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol. Cell* 10, 1479-1487.
- Spies, N., Nielsen, C.B., Padgett, R. a, y Burge, C.B. (2009). Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Mol. Cell* 36, 245-254.
- Srebrow, A., y Kornblihtt, A.R. (2006). The connection between splicing and cancer. *J. Cell Sci.* 119, 2635-2641.
- Suzuki, K., Juelich, T., Lim, H., Ishida, T., Watanebe, T., Cooper, D. a, Rao, S., y 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.
- Swarts, D.C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R.F., Koonin, E. V, Patel, D.J., y van der Oost, J. (2014). The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21, 743-753.
- Taberlay, P.C., Kelly, T.K., Liu, C.C., You, J.S., De Carvalho, D.D., Miranda, T.B., Zhou, X.J., Liang, G., y Jones, P.A. (2011). Polycomb-repressed genes have permissive enhancers that initiate reprogramming. *Cell* 147, 1283-1294.
- Taliaferro, J.M., Aspden, J.L., Bradley, T., Marwha, D., Blanchette, M., y Rio, D.C. (2013). Two new and distinct roles for *Drosophila* Argonaute-2 in the nucleus: alternative pre-mRNA splicing and transcriptional repression. *Genes Dev.* 27, 378-389.
- Tan, S.K., Lin, Z.H., Chang, C.W., Varang, V., Chng, K.R., Pan, Y.F., Yong, E.L., Sung, W.K., Sung, W.K., y Cheung, E. (2011). AP-2 γ regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO J.* 30, 2569-2581.

-
- Tardiff, D.F., Lacadie, S.A., y Rosbash, M. (2006). A Genome-Wide Analysis Indicates that Yeast Pre-mRNA Splicing Is Predominantly Posttranscriptional. *Mol. Cell* 24, 917-929.
- Tessarz, P., y Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 703-708.
- Teytelman, L., Thurtle, D.M., Rine, J., y van Oudenaarden, A. (2013). Highly expressed loci are vulnerable to misleading ChIP localization of multiple unrelated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18602-18607.
- Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C. a, Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., y Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development* 136, 3131-3141.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcárcel, J., y Guigó, R. (2009). Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 996-1001.
- Tilgner, H., Knowles, D.G., Johnson, R., Davis, C. a, Chakraborty, S., Djebali, S., Curado, J., Snyder, M., Gingeras, T.R., y Guigó, R. (2012). Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Res.* 22, 1616-1625.
- Tomari, Y., Du, T., y Zamore, P.D. (2007). Sorting of Drosophila small silencing RNAs. *Cell* 130, 299-308.
- Tora, L., Mullick, a, Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I., y Chambon, P. (1989). The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *EMBO J.* 8, 1981-1986.
- Tropberger, P., Pott, S., Keller, C., Kamieniarz-Gdula, K., Caron, M., Richter, F., Li, G., Mittler, G., Liu, E.T., Bühler, M., *et al.* (2013). Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell* 152, 859-872.
- Tsai, H., Chen, C.G., Conte, D., Moresco, J.J., Chaves, D.A., Mitani, S., Yates, J.R., Tsai, M., y Mello, C.C. (2015). A Ribonuclease Coordinates siRNA Amplification and mRNA Cleavage during RNAi. *Cell* 160, 407-419.
- Veloso, A., Kirkconnell, K.S., Magnuson, B., Biewen, B., Paulsen, M.T., Wilson, T.E., y Ljungman, M. (2014). Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res.* 24, 896-905.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I.S., y Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672-676.
- Vernimmen, D., y Bickmore, W. a. (2015). The Hierarchy of Transcriptional Activation: From Enhancer to Promoter. *Trends Genet.* 31, 696-708.
- Vernimmen, D., De Gobbi, M., Sloane-Stanley, J. a, Wood, W.G., y Higgs, D.R. (2007). Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *EMBO J.* 26, 2041-2051.
- Vernimmen, D., Lynch, M.D., de Gobbi, M., Garrick, D., Sharpe, J.A., Sloane-Stanley, J.A., Smith, A.J.H., y Higgs, D.R. (2011). Polycomb eviction as a new distant enhancer function. *Genes Dev.* 25, 1583-1588.
- Voss, T.C., y Hager, G.L. (2014). Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat. Rev. Genet.* 15, 69-81.

- Wahl, M.C., Will, C.L., y Lu, R. (2009). Review The Spliceosome : Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* 701-718.
- Wang, Z., y Burge, C.B. (2008). Splicing regulation : From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 12, 802-813.
- Wang, D., Garcia-Bassets, I., Benner, C., Li, W., Su, X., Zhou, Y., Qiu, J., Liu, W., Kaikkonen, M.U., Ohgi, K. a, *et al.* (2011). Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature* 474, 390-394.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., y Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470-476.
- Wang, Q., Carroll, J.S., y Brown, M. (2005). Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol. Cell* 19, 631-642.
- Weinberg, M.S., Villeneuve, L.M., Ehsani, A.L.I., Amarzguioui, M., Aagaard, L., Chen, Z., Riggs, A.D., Rossi, J.J., y 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.
- Weinberg, M.S., Barichievy, S., Schaffer, L., Han, J., y Morris, K. V (2007). An RNA targeted to the HIV-1 LTR promoter modulates indiscriminate off-target gene activation. *Nucleic Acids Res.* 35, 7303-7312.
- Weinmann, R., y Roeder, R.G. (1974). Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1790-1794.
- Welboren, W.-J., Van Driel, M.A., Janssen-Megens, E.M., Van Heeringen, S.J., Sweep, F.C., Span, P.N., y Stunnenberg, H.G. (2009). ChIP-Seq of ER α ; and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J.* 28, 1418-1428.
- Zang, C., Schones, D.E., Zeng, C., Cui, K., Zhao, K., y Peng, W. (2009). A clustering approach for identification of enriched domains from histone modification ChIP-Seq data. *Bioinformatics* 25, 1952-1958.
- Zaret, K.S., y Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: Establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* 25, 2227-2241.
- Zentner, G.E., y Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 259-266.
- Zentner, G.E., Tesar, P.J., y Scacheri, P.C. (2011). Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome Res.* 21, 1273-1283.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nussbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., *et al.* (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137.
- Zylber, E. a., y Penman, S. (1971). Products of RNA Polymerases in HeLa Cell Nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 2861-2865.