



Universidad de Granada  
Departamento de Bioquímica y Biología molecular 3  
e Inmunología

# Mecanismo molecular del acoplamiento de la transcripción y el *splicing* alternativo de los pre-mRNAs por TCERG1

Marta Montes Resano  
IPBLN, CSIC  
Granada, 2012



*ipbln*

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Marta Montes Resano  
D.L.: GR 3122-2012  
ISBN: 978-84-9028-246-5

CARLES M<sup>a</sup> SUÑÉ NEGRE, Doctor en Farmacia, Científico Titular del CSIC en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC, Granada),

CERTIFICA:

Que Marta Montes Resano, licenciada en Biología y Bioquímica por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “MECANISMO MOLECULAR DEL ACOPLAMIENTO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y EL SPLICING ALTERNATIVO DE LOS PRE-mRNAs por TCERG1”, que presenta como Memoria de Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad de Granada. Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Granada a 15 de Mayo de 2012.

Fdo. Dr. Carles M<sup>a</sup> Suñé Negre

Fdo. Marta Montes Resano

## *INTRODUCCIÓN*

## **1. EXPRESIÓN GÉNICA, TRANSCRIPCIÓN Y RNAPII**

La expresión génica es el proceso por el cual la información contenida en el genoma es utilizada para generar las proteínas necesarias según el requerimiento de cada organismo en un momento dado. Una de las etapas clave de la expresión génica es la transcripción, donde a partir del DNA se va a sintetizar el RNA mensajero (mRNA) que tras ser procesado para formar el mRNA maduro es exportado hacia el citoplasma donde será traducido a proteína por la maquinaria de la traducción.

En organismos procariotas una única RNA polimerasa dependiente de DNA (RNAP) es la encargada de transcribir todos los genes. Sin embargo, en organismos eucariotas son tres las polimerasas que llevan a cabo este papel. La RNA polimerasa I tiene como función transcribir únicamente genes que codifican para el RNA ribosómico (rRNA) 18S y 28S. El RNA que codifica para proteínas, así como gran parte del RNA no codificante, es transcrito por la RNA polimerasa II (RNAPII). Por último, la RNA polimerasa III transcribe varios genes cortos como el que da lugar al RNA transferente (tRNA) y al rRNA 5S. Las tres polimerasas comparten extensa homología en la subunidad catalítica (Allison et al., 1985; Cramer, 2002). El extremo carboxi-terminal (CTD, *carboxyl-terminal domain*) de la subunidad mayor (*Rpb1*) es lo que diferencia a la RNAPII de los otros tipos de RNAP (Corden et al., 1985).

### **1.1 El CTD**

El CTD de la RNAPII está compuesto por un número variable de repeticiones del heptapéptido Tyr<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>-Pro<sub>3</sub>-Thr<sub>4</sub>-Ser<sub>5</sub>-Pro<sub>6</sub>-Ser<sub>7</sub> más un decapeptido carboxi-terminal de secuencia ISPDDSDEEN que confiere estabilidad al enzima (Bartolomei et al., 1988). El número de repeticiones del heptapéptido es mayor conforme aumenta la complejidad funcional de un organismo; así, el CTD de la RNAPII de levaduras está compuesto por 26 repeticiones, el de *Drosophila melanogaster* por 44 y el de humano por 52 (Corden, 1990). El CTD es indispensable para la viabilidad de los organismos así como para el correcto procesamiento y maduración del precursor del RNA mensajero (pre-mRNA) aunque es prescindible para la iniciación de la transcripción *in vitro* (Nonet et al., 1987; Zehring et al., 1988; McCracken et al., 1997b; Fong et al., 2003; Bird et al., 2004). Cada uno de los residuos del CTD puede ser modificado post-transcripcionalmente de forma dinámica afectando al proceso de la transcripción. La

## ***Introducción***

fosforilación de las serinas 2 (Ser2) y 5 (Ser5) juega un papel esencial en la transcripción y ha sido extensamente estudiada (ver más adelante). Recientemente se ha descrito que la fosforilación de la serina 7 (Ser7) está implicada en la transcripción de los RNA pequeños nucleolares (snRNAs, *small nucleolar RNAs*) así como de otros genes codificantes (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007; Akhtar et al., 2009). También se ha descrito la fosforilación de la treonina 4, aunque su implicación funcional no está del todo clara (Hsin et al.). Otros residuos de treoninas y tirosinas del heptapéptido pueden ser también fosforilados (Zhang and Corden, 1991; Baskaran et al., 1993) y otras modificaciones, como metilación, glicosilación o isomerización de prolinas, han sido también descritas (Kelly et al., 1993; Sims et al., 2011). De forma análoga a otros sistemas de señalización celular, las fosfatasas juegan un papel fundamental durante el ciclo de la transcripción ya que su especificidad les confiere la capacidad de discernir entre Ser2 y Ser5 como sustratos contribuyendo, por tanto, al crítico balance Ser2/Ser5 en las diferentes etapas de la transcripción (Lin et al., 2002; Mandal et al., 2002).

### ***1.2. ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN***

La transcripción consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Cada una de ellas está altamente regulada por numerosos factores así como por la secuencia de DNA y la estructura de la cromatina. Los patrones de fosforilación/desfosforilación del CTD permiten el intercambio de proteínas que regulan cada una de las etapas de la transcripción (Figura I1) (Cadena and Dahmus, 1987; Egloff and Murphy, 2008; Buratowski, 2009).

#### ***1.2.1 Iniciación***

La iniciación de la transcripción comprende el reclutamiento del complejo de preiniciación (PIC, *pre-initiation complex*) a la secuencia promotora para el comienzo de la síntesis del RNA. Para que tenga lugar este ensamblaje, la cromatina debe estar en un adecuado estado de apertura (Panning and Taatjes, 2008). El PIC está formado por la RNAPII y factores generales de transcripción (GTFs) entre los que se encuentran TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH. La RNAPII que es reclutada al promotor tiene el CTD hipofosforilado (Phatnani and Greenleaf, 2006), lo que favorece interacciones del CTD con componentes del PIC y con el complejo Mediador (Myers et

al., 1998) que facilitan e incrementan la afinidad de la RNAPII por el promotor. Además, el reclutamiento de los PICs está muy influenciado por factores de transcripción que se unen al DNA así como por factores implicados en la remodelación de nucleosomas y en la modificación de histonas (Roeder, 2005; Li et al., 2007; Conaway and Conaway, 2011).

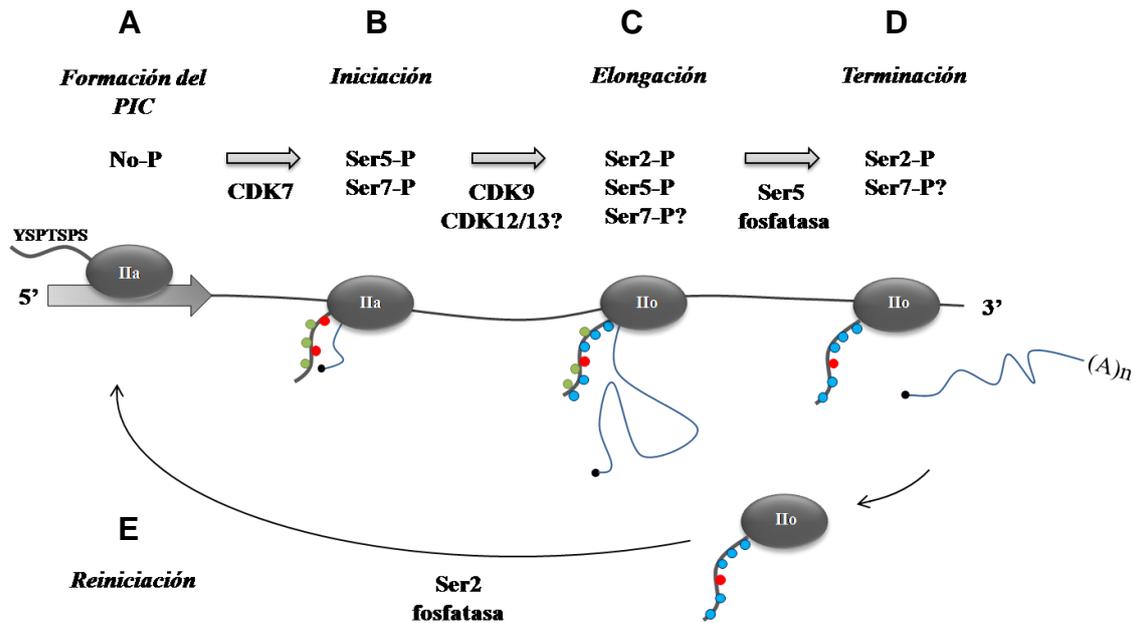
### 1.2.2 Elongación

Durante la etapa de la elongación, la RNAPII se disocia de los factores de iniciación para entrar en una etapa activa de transcripción. La elongación se divide a su vez en una elongación temprana y una elongación tardía o procesiva diferenciadas principalmente por el residuo de serina fosforilado del CTD de la RNAPII. Justo después de la iniciación, la Ser5 del CTD es fosforilada por la kinasa CDK7 (*cyclin-dependent kinase 7*) que forma parte de TFIIH (Lu et al., 1992), lo que parece desestabilizar las interacciones de la RNAPII con los demás componentes del PIC facilitando el escape de la RNAPII del promotor. La subsecuente fosforilación de la Ser2 por CDK9, la kinasa del factor positivo de elongación P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor-b*), es la responsable de la conversión de la RNAPII en la forma productiva (Marshall and Price, 1995; Marshall et al., 1996; Peterlin and Price, 2006). Recientemente se han descrito a las kinasas CDK12 de *D. melanogaster* y las humanas CDK12 y CDK13 como las responsables de la fosforilación de la forma elongante del CTD, poniendo en entredicho la clásica visión de CDK9 como única kinasa responsable de la fosforilación en Ser2 (Bartkowiak et al., 2010). Los factores implicados en cada etapa y su regulación son discutidos más extensamente en posteriores secciones.

### 1.2.3 Terminación

La terminación supone el reconocimiento del extremo 3' y la disociación del RNA sintetizado de la hebra molde de DNA. La mayoría de los transcritos completos terminan con el corte y la poliadenilación utilizando secuencias canónicas presentes en el DNA, de tal forma que la terminación de la transcripción está altamente relacionada con el procesamiento del extremo 3' (Yonaha and Proudfoot, 2000; Calvo and Manley, 2001; Nagaike et al., 2011). La RNAPII también se disocia completamente del DNA y es reciclada para sucesivos ciclos de transcripción facilitando así subsecuentes rondas productivas de elongación (Yao et al., 2007).

## Introducción



**Figura I1. Fosforilación/desfosforilación del CTD y las etapas de la transcripción.** A. La RNAPII hipofosforilada (IIa) es reclutada al PIC en el promotor. B. La transcripción se inicia por la fosforilación de la serina en posición 5 (Ser5-P, verde) y en posición 7 (Ser7-P, rojo) de los heptapéptidos que forman el CTD por CDK7, la quinasa del factor TFIIF. C. Durante la etapa activa de la transcripción, el CTD es fosforilado en la serina 2 (Ser2-P, azul) por CDK9 y/o CDK12/13 produciendo la forma hiperfosforilada de la RNAPII (IIo). D. Durante el transcurso de la transcripción hacia el extremo 3' del gen, la fosforilación de la Ser5 disminuye por la acción de fosfatasas específicas. Tras la terminación, el mRNA se libera del molde de DNA. E. La polimerasa se disocia del molde de DNA y fosfatasas específicas de la fosforilación de la Ser2 eliminan esta modificación antes del reciclaje del enzima y de la reiniciación de la transcripción.

### 1.3 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Durante mucho tiempo el reclutamiento de la maquinaria de transcripción al promotor se consideró como la etapa limitante en la regulación de la transcripción. Sin embargo, a lo largo de los últimos años numerosos estudios han señalado a la elongación como etapa determinante en la regulación de la transcripción en eucariotas (Price, 2008).

### 1.3.1 Parada próxima al promotor

Numerosas evidencias experimentales demuestran que la RNAPII tiende a acumularse en regiones próximas al promotor, a ~30-50 nucleótidos aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción (Core and Lis, 2008; Gilmour, 2009). Los factores negativos de elongación NELF (*Negative Elongation Factor*) y DSIF (*5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) Sensitivity Inducing Factor*) interactúan con la RNAPII en este proceso que se ha denominado “parada próxima al promotor” (*promoter proximal pausing*), inhibiendo la elongación al facilitar e incrementar la afinidad de la RNAPII por el promotor a través de múltiples interacciones (Missra and Gilmour; Gilchrist et al., 2008; Lee et al., 2008). Además de estos factores, dos secuencias de DNA, el elemento aguas abajo del promotor llamado DPE (*Downstream Promoter Element*) situado a 28 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción, y el elemento llamado PB (*Pause Button*), parecen contribuir a la parada de la RNAPII (Hendrix et al., 2008). Estos elementos son secuencias ricas en G+C que podrían estar estableciendo enlaces de alta energía en la hebra molde impidiendo su apertura, actuando como obstáculos que dificultan el movimiento de la RNAPII y facilitan la unión de NELF y DSIF. La eliminación de este bloqueo para la entrada en una elongación procesiva requiere el reclutamiento del complejo P-TEFb, el cual fosforila la Ser2 del CTD de la RNAPII y hace que NELF se libere del complejo de elongación estimulando la reanudación de la transcripción (Peterlin and Price, 2006; Bres et al., 2008). Esta pausa se describió por primera vez en genes de choque térmico de *D. melanogaster* (Rougvie and Lis, 1988; O'Brien and Lis, 1991) que requieren de una rápida activación tras la inducción de un estímulo concreto. El gen *c-myc* y el del HIV-1 (*Human immunodeficiency virus type 1*) también son aparentemente regulados por este mecanismo (Bentley and Groudine, 1986; Laspia et al., 1989; Krumm et al., 1992) (Montanuy et al., 2008). Actualmente y gracias al desarrollo de técnicas a escala genómica, la parada que sufre la RNAPII en regiones cercanas al promotor se está evidenciando como un fenómeno general y el escape de esta parada como un mecanismo principal de regulación de la expresión génica durante el desarrollo (Core et al., 2008; Levine, 2010; Nechaev et al., 2010).

### ***1.3.2. Modificaciones de cromatina y factores remodeladores***

El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina y está compuesto por un octámero de cuatro histonas (H2A, H2B, H3 y H4) rodeadas por 147 pares de bases de DNA (Izban and Luse, 1991). Las primeras evidencias de que las histonas podían ser modificadas y de que esto podía influenciar la síntesis del RNA vienen de los años 60 (Allfrey et al., 1964). Hoy en día se conocen numerosas modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación o sumoilación, así como las enzimas responsables de ellas (Kouzarides, 2007). Igualmente se conocen las proteínas implicadas en la eliminación de esas modificaciones (Bannister et al., 2002; Goto et al., 2002; Yang and Seto, 2007), generando todo ello unos procesos muy dinámicos y creando lo que se ha denominado “código de histonas” que va a influir no sólo en cada etapa de la transcripción, sino también en la replicación, recombinación o reparación del DNA. Asimismo, complejos remodeladores de cromatina como SWI/SNF o FACT están implicados en la regulación de la elongación transcripcional al encargarse de mantener el desempaquetamiento de la cromatina para permitir el paso de la RNAPII al transcribir la hebra del DNA (Li et al., 2007; Roberts et al., 2008).

## **2. PROCESAMIENTO DEL PRE-mRNA: *SPLICING*.**

Los transcritos primarios producidos por la RNAPII son generalmente procesados antes de dar lugar al mRNA que será exportado al núcleo para seguir el proceso de la síntesis de proteínas. Existen varios eventos de procesamiento, siendo tres los principales: *capping* o adición de residuo de metilguanosa en el extremo 5' del RNA, poliadenilación y corte del extremo 3' y *splicing* o eliminación de las secuencias no codificantes, denominadas intrones. Estos intrones, de gran longitud en eucariotas, se encuentran rodeando a los exones, secuencias de menor longitud que los intrones que llevan la información codificante.

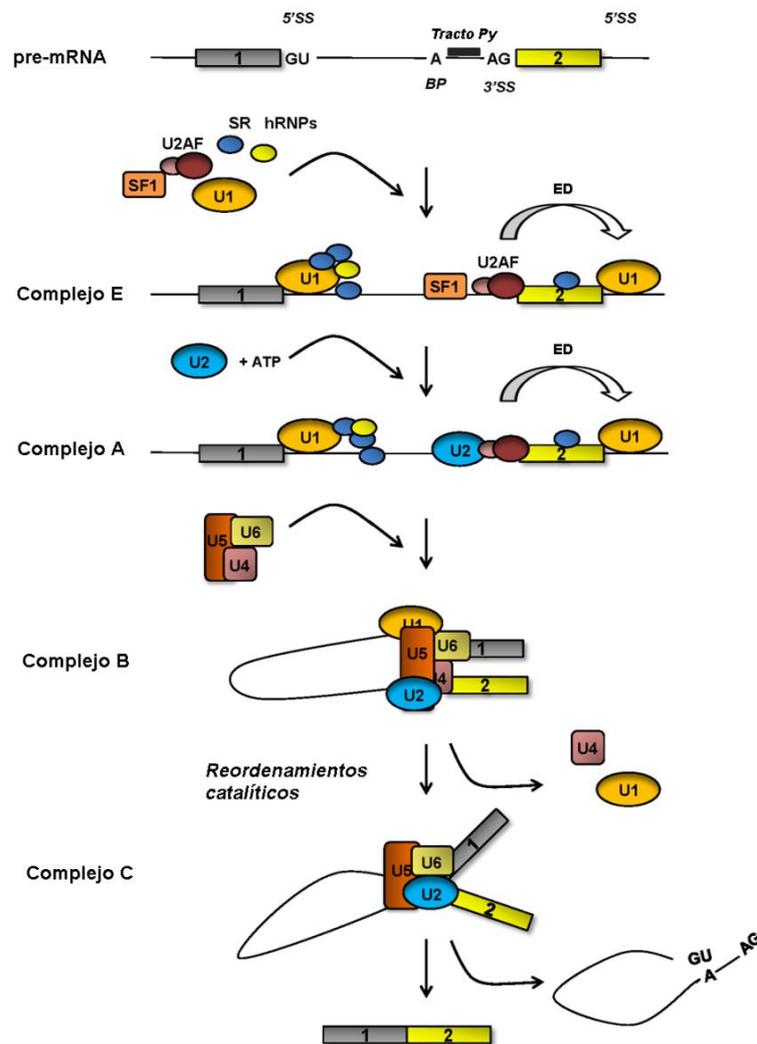
### **2.1 *SPLICEOSOMA***

Durante el proceso de *splicing*, la eliminación de los intrones y la ligación de los exones es llevada a cabo por un complejo denominado *spliceosoma*, que consta de cinco

partículas ribonucleoproteicas (U1, U2, U4, U6 y U5 snRNPs, de *Uridin-rich small nuclear ribonucleoprotein*) y más de 200 proteínas auxiliares (Kramer, 1996; Wahl et al., 2009). Existen secuencias consenso que marcan las uniones exón-intrón que son reconocidas por los componentes del *spliceosoma*. Numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* avalan la idea de un ensamblaje secuencial y ordenado de los distintos factores que forman el *spliceosoma* (Will and Luhrmann, 2001; Matlin and Moore, 2007; Hoskins et al., 2011). El ensamblaje comienza con la unión por complementariedad de *U1snRNP* al extremo 5' del intrón (5'ss, *splice site*). Al mismo tiempo, el factor de *splicing* SF1 se une a la secuencia *branch point* (BPS, *Branch point sequence*) y el complejo U2AF al tracto de polipirimidinas (Py) y al sitio de *splicing* 3' (3'ss, *splice site*) (Berglund et al., 1997; Berglund et al., 1998). En este proceso, que es independiente de ATP, se forma el complejo E o complejo comprometido al *splicing* (*commitment complex*). En un siguiente paso que requiere ATP, la partícula U2snRNP se une a BPS formando el complejo A o *pre-spliceosoma* (MacMillan et al., 1994). La posterior incorporación de U4-U5-U6 tri-snRNP da lugar al complejo B, que sufre una serie de remodelaciones conformacionales y libera a U1 y U4snRNP para formar el complejo C o complejo catalítico por ser el responsable de llevar a cabo la reacción catalítica propia del *splicing* (Figura I2).

Debido a la corta longitud de los exones en comparación a la longitud de los intrones, los sitios de *splicing* en el pre-mRNA de eucariotas son reconocidos a través de interacciones a lo largo del exón en el proceso que se denomina definición del exón (*exon definition*). Este proceso fue inicialmente propuesto para explicar que la presencia de un 5'ss en un exón interno suponía la eliminación del intrón situado aguas arriba (Robberson et al., 1990). A nivel molecular, la unión de U1snRNP al 5'ss promueve el reclutamiento de U2AF al sitio 3'ss (Hoffman and Grabowski, 1992). Evidencias adicionales de la existencia de estos complejos formados en el exón provienen de la purificación de estos complejos en exones eliminados *in vitro* (House and Lynch, 2006; Sharma et al., 2008). Sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia de U4, U5 y U6 en los complejos de definición del exón sugiriendo una ruta alternativa al ensamblaje del *spliceosoma* donde el complejo temprano puede dar lugar al complejo B sin pasar por el complejo A (Schneider et al., 2010).

## Introducción



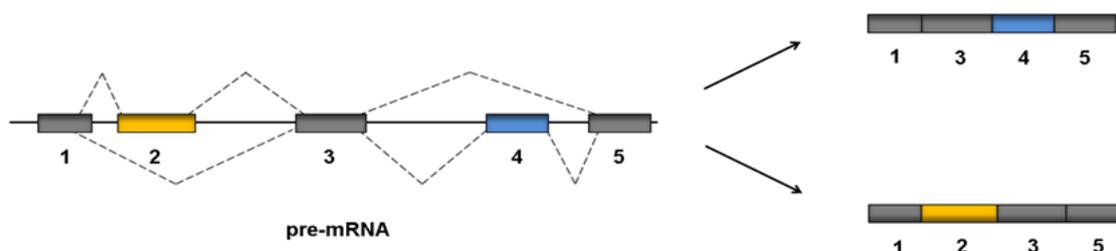
**Figura I2. Esquema del ensamblaje del *spliceosoma*.** Formación de los distintos complejos durante el ensamblaje del *spliceosoma* (ver texto). U1, U2, U4, U5 y U6: UsnRNPs (Uridin-rich small ribonucleoprotein particles), A: *Branch point*, 5'ss/3'ss: sitios donante y aceptor de *splicing*, Py: tracto de polipirimidinas, ED: definición del exón.

## 2.2. SPLICING ALTERNATIVO

Los exones de los transcritos primarios pueden ser procesados de manera constitutiva, dando lugar a una única molécula de mRNA, o alternativa donde diferentes mRNAs son originados a partir de un solo pre-mRNA. Estos mRNAs procesados alternativamente contienen información que codifica para diferentes proteínas con

funciones que incluso pueden ser opuestas, dependiendo del tejido o del tipo celular, proporcionando al organismo un complejo mecanismo para incrementar la diversidad proteica (Figura I3).

Datos generados por técnicas de secuenciación masiva estiman que más del 90% de los genes humanos son regulados por *splicing* alternativo (Pan et al., 2008; Wang et al., 2008). Además, alrededor del 15% de las mutaciones descritas asociadas a enfermedades hereditarias han sido relacionadas con fallos en la regulación del *splicing*, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Caceres and Kornblihtt, 2002; Garcia-Blanco et al., 2004; Licatalosi and Darnell, 2006; Wang and Cooper, 2007). Por ello, se requiere una estrecha y compleja regulación para asegurar el correcto procesamiento del pre-mRNA.



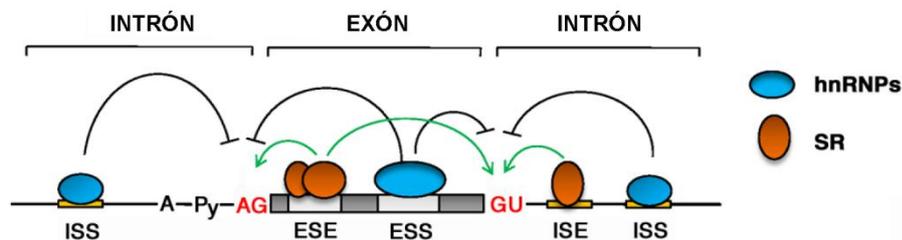
**Figura I3. Splicing alternativo.** A partir de un mismo pre-mRNA se puede dar la exclusión/inclusión de exones alternativos dando lugar a diferentes proteínas que pueden expresarse en tejidos distintos.

### **2.3 REGULACIÓN DEL SPLICING ALTERNATIVO**

En mamíferos, las secuencias consenso de *splicing* (*BPS*, *Py*, *3'ss*, *5'ss*) están muy poco conservadas, por lo que no aportan toda la información necesaria para la precisión y especificidad de este proceso. De hecho, la presencia de sitios de *splicing* subóptimos se ha propuesto como una característica esencial para permitir la regulación del *splicing* alternativo (Soares et al., 2006). Existen otros elementos reguladores (*SRE*, *splicing regulatory element*) que se localizan tanto en exones como en intrones y pueden favorecer o inhibir un evento de *splicing* determinado. En función del efecto funcional que ejercen y su localización se denominan como ESE/ESS-ISE/ISS (*exonic*

## Introducción

*splicing enhancers/silencers-intronic splicing enhancers/silencers*) (Figura I4). Proteínas de unión a RNA se asocian a estos elementos, destacando las hnRNPs (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins*) y las proteínas SR (*Serine/Arginine-rich proteins*) (Wu and Maniatis, 1993). La disponibilidad de estos factores de *splicing* que depende de su grado de expresión, de su localización o de sus modificaciones post-traduccionales, supone a su vez una escala adicional de regulación (Lin and Fu, 2007). Son varios los trabajos recientes que ayudan a ir estableciendo la compleja red de regulación que combina tanto los elementos en *cis* como las proteínas que son reclutadas a ellos (Wang and Burge, 2008; Barash et al., 2010; Witten and Ule, 2011).



**Figura I4. Regulación del *splicing* alternativo por elementos en *cis* y factores en *trans*.** A: secuencia *branch point*; Py: tracto de polipirimidinas; GU-AG (en color rojo): sitio 5' (5'ss) y 3' (3'ss) de *splicing*; ESE/ESS/ISE/ISS: secuencias adicionales silenciadoras o potenciadores en exones e intrones (ESE/ESS, *exonic splicing enhancers/silencers*, ISE/ISS: *intronic splicing enhancers/silencers*); SR: proteínas ricas en serina/arginina (*serine-arginine rich proteins*); hnRNPs: partículas ribonucleoproteicas (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles*). En general, las proteínas SR se unen a potenciadores facilitando el reconocimiento del exón (flechas verdes) y las hnRNPs inhiben este proceso (flechas negras).

Durante muchos años, el *splicing* ha sido considerado como un mecanismo de control de la expresión génica independiente y esta visión estática ha sido muy útil para dilucidar la regulación del *splicing* constitutivo. Sin embargo y durante las dos últimas décadas, se ha hecho evidente que muchos eventos de *splicing* ocurren de manera co-transcripcional y, por tanto, para entender completamente la regulación del *splicing* alternativo es necesario integrar sus elementos reguladores con la transcripción.

**2.4. ACOPLAMIENTO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y EL SPLICING**

En estudios iniciales de la transcripción en embriones de *D. melanogaster* utilizando microscopía electrónica, se observó que los transcritos nacientes ya estaban siendo procesados mediante el *splicing* (Beyer and Osheim, 1988). Trabajos con sondas fluorescentes que hibridaban en regiones solapantes entre el intrón y el exón demostraron que la eliminación de los intrones del pre-mRNA estaba teniendo lugar en los dominios de la transcripción (Xing et al., 1993). Asimismo, en el gen BR1 (*Balbani ring 1*) de *Chironomus tentans* se observó que el *splicing* estaba ocurriendo antes de que la transcripción del gen fuera completada (Bauren and Wieslander, 1994). Otros elementos propios de la transcripción como la estructura del promotor, factores de elongación transcripcional y co-activadores específicos también afectan al *splicing* (Cramer et al., 1997; Cramer et al., 1999; Nogues et al., 2002; Auboeuf et al., 2004). Sin embargo, se ha comprobado que el *splicing* puede ocurrir también de manera independiente de la transcripción (Wetterberg et al., 1996), es decir de forma post-transcripcional. Recientemente, un elegante estudio donde se observa la eliminación de intrones usando sondas que identifican una única molécula de RNA en célula viva, ha revelado que aunque el *splicing* constitutivo es mayoritariamente co-transcripcional, existen determinados casos donde ocurre una vez la transcripción se ha completado; especialmente en genes que requieren un alto grado de regulación como, por ejemplo, genes implicados en programas de desarrollo (Vargas et al., 2011). Por lo tanto, mientras que la amplia mayoría de intrones de genes de mamíferos son procesados y eliminados en el transcrito naciente antes de que el proceso de la transcripción termine, (Neugebauer, 2002; Kornblihtt et al., 2004), este proceso también puede ocurrir de manera post-transcripcional.

El *splicing* co-transcripcional facilita el rápido reclutamiento de factores de *splicing* al complejo de la RNAPII mientras está transcribiendo, de manera que el pre-mRNA pueda ser procesado inmediatamente después de haber sido transcrito (Listerman et al., 2006) optimizando así la eficiencia de *splicing* (Natalizio and Garcia-Blanco, 2005; Das et al., 2006; Pandya-Jones and Black, 2009; Singh and Padgett, 2009). Asimismo, el procesamiento co-transcripcional del pre-mRNA podría estar disminuyendo la hibridación del RNA con la hebra molde de DNA evitando la inestabilidad genómica (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008). Otra de las

## Introducción

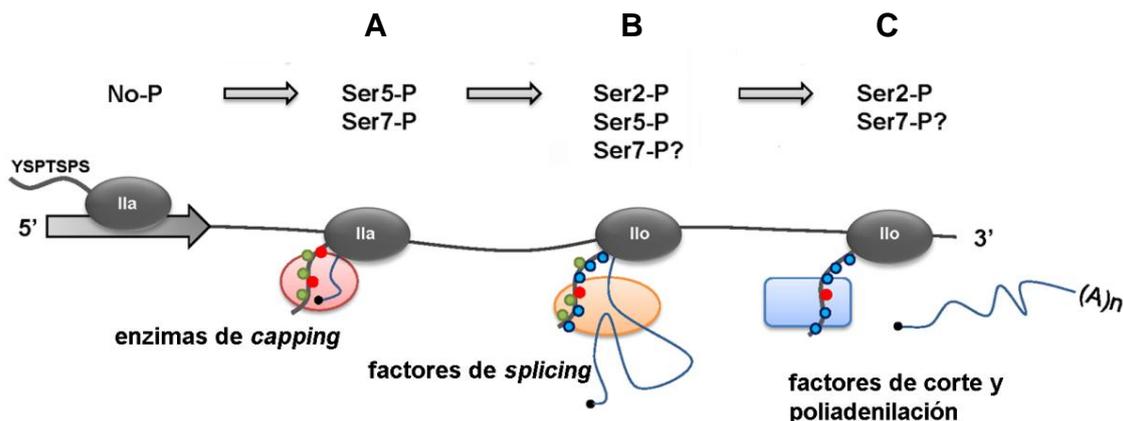
implicaciones del *splicing* co-transcripcional es favorecer una regulación recíproca de ambos procesos.

### 2.4.1 Acoplamiento físico

El hecho de que el *splicing* tenga lugar de manera co-transcripcional facilita la interacción directa entre los componentes de ambas maquinarias. El CTD de la RNAPII juega un papel fundamental en este escenario sirviendo como plataforma de reclutamiento de factores de procesamiento para situarlos en las inmediaciones del transcrito nascente al mismo tiempo que la RNAPII está elongando. Los cambios en los patrones de fosforilación del CTD contribuyen al reclutamiento y liberación de los factores de procesamiento de forma específica en cada etapa de transcripción (Komarnitsky et al., 2000; Egloff and Murphy, 2008; Buratowski, 2009) (Figura I5).

Existen numerosas evidencias de la implicación del CTD en el procesamiento del pre-mRNA. La estructura de la RNAPII sitúa al CTD próximo al canal de salida del RNA, que es consistente con el acoplamiento de la transcripción con el procesamiento del pre-mRNA mediante factores que se unen directamente al CTD. El requerimiento del CTD para un eficiente *capping* es, probablemente, el proceso mejor caracterizado. Así, el CTD fosforilado en Ser5 se une directamente a enzimas guanyltransferasas que son las encargadas de la adición del residuo de metilguanosa al extremo 5' del pre-mRNA (McCracken et al., 1997a; Schroeder et al., 2000). Los factores de corte y poliadenilación también interactúan directamente con el CTD de la RNAPII, relacionando el procesamiento del extremo 3' del RNA con la transcripción (Hirose and Manley, 1998; Licatalosi et al., 2002; Ahn et al., 2004; Meinhart and Cramer, 2004). Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han confirmado el papel que juega el CTD en el *splicing*. Entre ellos: 1) la eliminación del CTD en la RNAPII reduce la eficiencia del *splicing in vivo* (McCracken et al., 1997b; Fong et al., 2003; Rosonina and Blencowe, 2004); 2) la activación transcripcional de la RNAPII induce la asociación de factores de *splicing* al sitio de transcripción, pero únicamente cuando la RNAPII contiene el CTD intacto (Du and Warren, 1997; Misteli and Spector, 1999); 3) la RNAPII hiperfosforilada es capaz de activar el *splicing* del pre-mRNA *in vitro*, mientras que la forma hipofosforilada lo inhibe (Hirose et al., 1999); y 4) el CTD recombinante es capaz de estimular el *splicing in vitro*, pero solamente en el contexto de definición del exón, es decir, cuando el exón está sintetizado por completo con los dos extremos 3' y 5' accesibles (Zeng and Berget, 2000). Es relevante comentar que el CTD actúa como

acoplador de la transcripción y el *splicing* en el contexto específico de la RNAPII ya que el CTD en otro contexto, como fusionado a la RNAP del bacteriófago T7 o a la RNAPIII no confiere efecto en el *splicing* co-transcripcional (Natalizio et al., 2009). En cualquier caso, el requerimiento del CTD en el *splicing* co-transcripcional apoya el papel del CTD fosforilado en el acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* (Bird et al., 2004).



**Figura I5. Interacción del CTD con factores de procesamiento del pre-mRNA.** A. La fosforilación de la Ser5 (Ser5-P, verde) favorece el reclutamiento de la maquinaria encargada del proceso de *capping* (óvalo rosa) al extremo 5' del transcrito. B. La RNAPII hiperfosforilada (Ilo) se encarga del reclutamiento de factores de *splicing* (óvalo naranja). C. En el extremo 3' del gen, factores de poliadenilación y corte (cuadrado azul) se unen al CTD permitiendo la terminación y la liberación del mRNA maduro.

### **Acopladores de la transcripción y el *splicing***

Existen diversos factores que por su participación en ambos procesos son considerados potenciales acopladores de la transcripción y el *splicing*. Estos factores podrían estar mediando interacciones físicas y funcionales entre ambas maquinarias.

Las proteínas SR han sido extensamente descritas como proteínas de unión al RNA y reguladoras del *splicing* alternativo. Se ha visto que interactúan con el CTD de la RNAPII (Yuryev et al., 1996; Bourquin et al., 1997) y que esta interacción facilita el reclutamiento de las proteínas SR desde los *speckles* (regiones nucleares consideradas sitios de almacenaje de factores de *splicing*) a los sitios de transcripción activa (Misteli and Spector, 1999). Además, en sistemas de *splicing* co-transcripcional *in vitro*, parecen

## Introducción

ayudar al reclutamiento de otros factores de *splicing* al pre-mRNA naciente facilitando el ensamblaje del *spliceosoma* (Das et al., 2006; Das et al., 2007). SRp20 y SRSF1, proteínas pertenecientes a esta familia, requieren del CTD de la RNAPII para ejercer su efecto en el *splicing* de minigenes reporteros (de la Mata and Kornblihtt, 2006; Barboric et al., 2009). Otros factores de *splicing* también han sido considerados como proteínas acopladores de la transcripción y el *splicing*. Así, U2snRNP interacciona con el factor de elongación Tat-SF1 estimulando la unión del complejo PTEF-b e incrementando la elongación (Fong and Zhou, 2001; Maniatis and Reed, 2002). El factor de *splicing* SKIP interacciona con PTEF-b influyendo en la activación de la elongación mediada por la proteína viral Tat de los genes del HIV-1 (Bres et al., 2005). El factor SC35, miembro de la familia de las proteínas SR, aumenta la elongación transcripcional al facilitar el reclutamiento de PTEF-b al pre-mRNA (Lin et al., 2008).

La proteína de levaduras Prp40 es un factor de *splicing* cuya interacción con el CTD de la RNAPII fue la primera que se caracterizó (Morris and Greenleaf, 2000). Es un componente del complejo U1snRNP y participa en procesos tempranos del ensamblaje del *spliceosoma* (Kao and Siliciano, 1996) (Abovich and Rosbash, 1997). La proteína Prp40 tiene una estructura característica compuesta por dominios WW, llamados así por la presencia de residuos de triptófano conservados, y dominios ricos en fenilalaninas denominados FF. Se ha descrito la unión de Prp40 a SF1 a través de los dominios WW (Abovich and Rosbash, 1997) y su interacción con el CTD de la RNAPII por medio de su dominio FF1 (Morris and Greenleaf, 2000). En humanos existen dos proteínas homólogas, HYPC y FBP11, que comparten estos dominios WW y FF. FBP11 interacciona a través de los dominios WW con BBP, el homólogo en levadura del factor de *splicing* SF1 (Lin et al., 2004), y con el CTD de la RNAPII a través de los dominios FF (Allen et al., 2002). A diferencia de Prp40, no es un factor esencial del complejo U1snRNP. El factor HYPC está menos caracterizado y su papel en *splicing* se desconoce hasta el momento. Una proteína que comparte esta estructura de dominios WW y FF es TCERG1 (previamente denominada CA150). Su papel en transcripción y en *splicing* la convierten en un posible acoplador de ambos procesos y es objeto de estudio en esta tesis.

Las proteínas PSF y p54nrb contienen dominios de reconocimiento de RNA (RRM: *RNA recognition motif*) y se han visto implicadas en la transcripción y el *splicing* (Shav-Tal and Zipori, 2002). Ambos factores interaccionan con el dominio CTD de la RNAPII hipofosforilado o hiperfosforilado (Emili et al., 2002) y han sido co-

purificados en complejos de gran tamaño junto con U1, U2snRNP y la RNAPII (Kameoka et al., 2004; Rosonina et al., 2005). Recientemente se ha descrito la interacción del componente Med23 del complejo Mediador con el factor de *splicing* hnRNPL aportando, de nuevo, evidencias de interacciones físicas entre las maquinarias del *splicing* y la transcripción (Huang et al., 2012). PGC-1 $\alpha$ , un co-activador transcripcional, también se ha visto asociado a componentes del *spliceosoma* (Monsalve et al., 2000).

### 2.4.2 Acoplamiento cinético

Los diferentes sitios de *splicing* de un transcrito se sintetizan y son co-transcripcionalmente expuestos a la maquinaria de *splicing*, por lo que cabe pensar que la tasa de elongación de la RNAPII, la cual no es un proceso uniforme y constante si no que varía a lo largo del gen, puede estar modulando el *splicing* alternativo. Numerosas evidencias demuestran que U1snRNP se une al 5' ss al mismo tiempo que está siendo transcrito. Consistente con esto, la posterior asociación de los demás componentes del *spliceosoma* y la propia reacción catalítica no puede ocurrir hasta que la síntesis del resto del intrón y del sitio de *splicing* se completa. El modelo cinético de la regulación del *splicing* se basa en la elongación transcripcional como determinante del patrón de *splicing* generado co-transcripcionalmente. Así, la tasa de elongación de la RNAPII determina el tiempo del que disponen los componentes del *spliceosoma* para ensamblarse en un sitio de *splicing* antes de competir con el sitio de *splicing* que se generará aguas abajo, en lo que se ha llamado “la ventana de oportunidad” (“*window of opportunity*”)(Perales and Bentley, 2009).

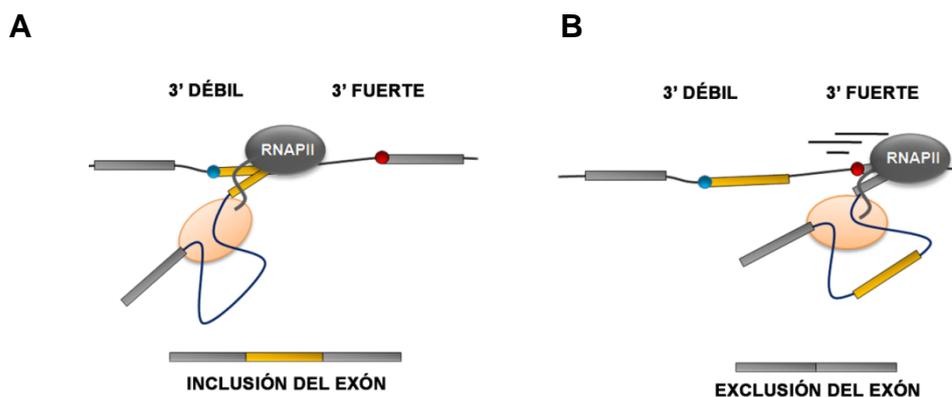
La primera evidencia del acoplamiento cinético viene de estudios de Eperon y colaboradores, donde vieron que la tasa de síntesis del RNA afecta su estructura secundaria y en consecuencia, su *splicing* alternativo (Eperon et al., 1988). Un mecanismo similar se sugiere de experimentos en los que retrasando la síntesis de un sitio inhibitor insertando un sitio de parada de la polimerasa aguas abajo de sitios de *splicing* alternativos débiles induce la inclusión del exon 3 del gen de la  $\alpha$ -tropomiosina (Roberts et al., 1998) Uno de los modelos más estudiados y que más se ajusta a este modelo cinético es el del exon alternativo ED-I del gen de la fibronectina. Este exón está precedido por un 3' ss débil o degenerado que es reconocido mejor cuando la tasa de elongación es menor y la maquinaria de *splicing* tiene tiempo suficiente para su correcto reconocimiento (Nogues et al., 2003). En condiciones de mayor procesividad

## Introducción

del enzima por la presencia de elementos co-activadores, estados de apertura de la cromatina o por promotores fuertes, la presentación simultánea de este sitio débil junto con un sitio 3' más fuerte aguas abajo, hace que se favorezca la exclusión del sitio débil (Figura I6) (Cramer et al., 1999; Kadener et al., 2001; Kadener et al., 2002; Nogues et al., 2002). Bentley y colaboradores llegaron a una conclusión similar al demostrar que la RNAPII se detiene a ambos extremos de los genes permitiendo así la unión de factores de procesamiento (Glover-Cutter et al., 2008). Evidencias más directas apoyando el modelo cinético se obtuvieron mediante vectores de expresión exógenos que codifican para una RNAPII con propiedades intrínsecas de baja procesividad. En estos experimentos, la transcripción dependiente de la RNAPII es llevada a cabo por versiones mutadas de polimerasas resistentes al inhibidor de la transcripción  $\alpha$ -amanitina. La polimerasa menos procesiva produce un aumento en la inclusión del exón EDI (de la Mata et al., 2003). Esta RNAPII "lenta", denominada C4, contiene una mutación puntual que está presente en condiciones fisiológicas en *D. melanogaster*. Es interesante señalar que esta mutación provoca cambios en los patrones de *splicing* alternativo del gen *Ultrabithorax (Ubx)* (de la Mata et al., 2003).

Las observaciones anteriores pueden reflejar un mecanismo más general del pensado con anterioridad. Trabajos recientes aportan evidencias adicionales del modelo de regulación cinético demostrando la acumulación de RNAPII en determinadas regiones a lo largo de los genes. Gracias al análisis global del RNA naciente en levaduras se observan picos de acumulación de la RNAPII en exones terminales, alrededor de 250 nucleótidos aguas arriba del sitio de poliadenilación (Alexander, Innocente et al. 2010). De manera similar, otro sitio de parada de la polimerasa cercano al extremo 3' en genes que contienen intrones ha sido caracterizado y relacionado con la unión de factores de *splicing* (Carrillo Oesterreich, Preibisch et al. 2010). Apoyando lo anterior, la inhibición de la elongación produce cambios globales en el *splicing* alternativo afectando a varios factores de procesamiento y a proteínas de unión al RNA (Ip et al., 2011).

La relevancia fisiológica de la regulación cinética del *splicing* alternativo ha sido demostrada en un trabajo de reciente publicación. En este trabajo, el daño celular inducido a las células por radiación ultravioleta provoca alteraciones en el *splicing* alternativo a través de cambios en la tasa de elongación de la RNAPII (Munoz et al., 2009).



**Figura I6. Modelo cinético de regulación del *splicing* alternativo.** (A) Una tasa de elongación baja permite la unión de factores de *splicing* y el reconocimiento de sitios débiles de *splicing* (círculo azul) favoreciendo la inclusión del exón. (B) Tasas de elongación elevadas generan la aparición simultánea del sitio débil y fuerte (círculo rojo) de *splicing*, favoreciendo el uso del sitio fuerte y promoviendo la exclusión del exón.

### 2.4.3. Influencia de la cromatina en el *splicing* alternativo

Un importante mecanismo de regulación de la transcripción son las modificaciones reversibles de histonas y la posición de los nucleosomas a lo largo de la cromatina molde (Orphanides and Reinberg, 2000). El estudio de la influencia de la estructura de la cromatina en el *splicing* constituye una rama de investigación en la regulación del *splicing* alternativo que está siendo investigada extensivamente en los últimos años.

Una de las primeras observaciones de la relación entre la cromatina y el *splicing* fue sugerida por Adami y Babiss quienes vieron que diferentes moldes de DNA podían generar diferentes productos de RNA, sugiriendo que cambios en el ambiente de la cromatina podrían estar afectando a los patrones de *splicing* (Adami and Babiss, 1991). Asimismo, Beckmann and Trifonov observaron que la distancia entre los sitios de *splicing* 5' y 3' seguía un patrón más o menos periódico que recordaba a la fase de los nucleosomas, sugiriendo que éstos se posicionan de alguna manera en las uniones exon-intrón y reflejando de nuevo la conexión entre la cromatina y el *splicing* (Beckmann and Trifonov, 1991). Estudios con el exon EDI de la fibronectina usando plásmidos reporteros revelaron que su replicación alteraba el *splicing* alternativo al favorecer una

## ***Introducción***

cromatina compacta y, por tanto, disminuyendo la tasa de elongación de la RNAPII (Kadener et al., 2001). Por el contrario, la inhibición de las deacetilasas de histonas por la acción de la tricostatina A da lugar a un estado abierto de la cromatina, aumentando las tasas de elongación y favoreciendo la exclusión del exón EDI (Nogues et al., 2002).

Evidencias directas de las conexiones entre la cromatina y el *splicing* en un contexto endógeno fueron observadas en el gen CD44, donde la sobre-expresión del factor remodelador de cromatina SW1/SNF provoca la inclusión de un grupo de exones del gen (Batsche et al., 2006). Además, la existencia de interacciones entre enzimas que modifican a las histonas y componentes de la maquinaria de *splicing* apoyan el papel de la cromatina en el reclutamiento del *spliceosoma* al pre-mRNA (Martinez et al., 2001; Ohkura et al., 2005; Gunderson and Johnson, 2009). En los últimos años, el desarrollo de técnicas genómicas para el estudio de la expresión génica ha permitido estudiar de forma global el papel que tanto la posición de los nucleosomas como las modificaciones de histonas tienen en la regulación del *splicing* alternativo.

### **A. Nucleosomas**

La composición de nucleosomas de la cromatina influye en la dinámica transcripcional de la RNAPII (Hodges et al., 2009) (Figura 7). Estudios genómicos recientes han revelado un patrón específico de ocupación de nucleosomas en las regiones intrónicas-exónicas. De esta forma, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación a escala genómica han demostrado un enriquecimiento de nucleosomas en los exones (Andersson et al., 2009; Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009). Esta acumulación parece ser independiente de la transcripción ya que también se ha observado en genes inactivos (Tilgner et al., 2009).

En células de mamífero, los exones tienen un contenido más elevado de G y C en comparación con los intrones y los nucleosomas parecen tener preferencia por las secuencias ricas en G y C (Peckham et al., 2007). Por ello, varios estudios han propuesto una correlación entre el contenido de G y C y la ocupación de nucleosomas (Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009). Aunque la riqueza en G y C no parece ser el único factor que determina el patrón de nucleosomas (Tilgner et al., 2009), los datos obtenidos de estos estudios bioinformáticos apoyan una conexión entre la ocupación de nucleosomas y el *splicing*. De forma notable, la longitud media del DNA enrollado alrededor del octámero de histonas es de 147 nt, que coincide aproximadamente con la

longitud media de los exones en mamíferos, sugiriendo un papel conservado de los nucleosomas en el proceso de definición del exón (Schwartz et al., 2009; Tilgner et al., 2009). Además, la densidad de nucleosomas en los exones parece correlacionarse con la fortaleza de los sitios de *splicing* y con la proximidad a los intrones vecinos, siendo mayor la ocupación en exones débiles y en exones rodeados de intrones largos (Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009). Sin embargo, los exones alternativamente procesados son más ricos en nucleosomas que los constitutivos (Schwartz et al., 2009) y los exones largos tienen un mayor contenido en G y C que los exones cortos (Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009), lo que en cierto modo complica el modelo simple de que la posición de los nucleosomas en los exones pueda estar actuando como marcas para el reconocimiento por el *spliceosoma*. A pesar de las diferencias existentes, todos estos trabajos coinciden en señalar que los nucleosomas juegan un papel importante en el *splicing*. A falta de estudios experimentales en modelos concretos, se sugieren dos hipótesis no excluyentes entre sí. En la primera, los nucleosomas pueden estar actuando como barreras que dificultan la transcripción de la RNAPII en lugares determinados influyendo en el *splicing* alternativo a través del modelo cinético discutido previamente (Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009). Alternativamente, los nucleosomas pueden interactuar con factores de *splicing* durante la transcripción o pueden facilitar interacciones entre esos factores a lo largo del exón, facilitando el proceso de definición del exón (Tilgner et al., 2009).

### **B. Modificaciones de histonas y metilación del DNA**

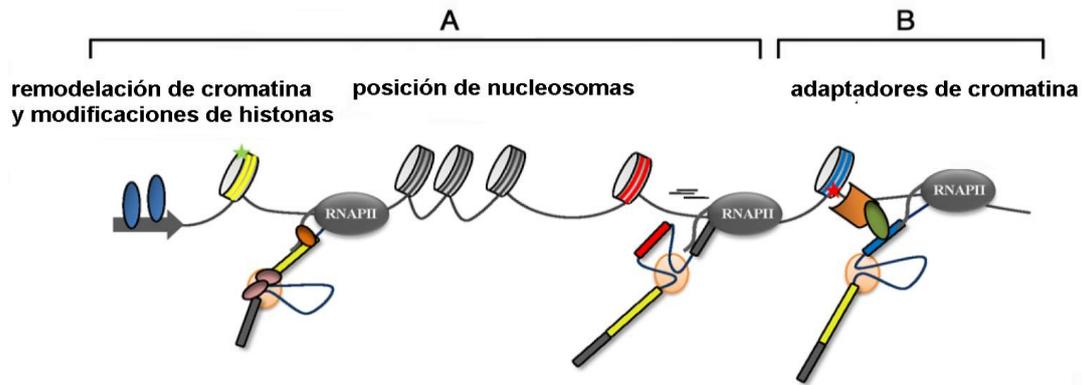
Las histonas sufren modificaciones post-transcripcionales, especialmente en su extremo amino-terminal, como acetilación, metilación, fosforilación o sumoilación entre otras (Kouzarides, 2007). La mayoría de estas modificaciones son reversibles y las enzimas encargadas de su eliminación han sido caracterizadas (Bannister et al., 2002; Goto et al., 2002; Sugiyama et al., 2002; Yang and Seto, 2007). La metilación, acetilación y fosforilación son las modificaciones mejor estudiadas en la regulación del *splicing* alternativo (Figura I7). Así, la inhibición de deacetilasas de histonas tiene un efecto claro en el *splicing* de minigenes reporteros y en varios genes endógenos (Nogues et al., 2002; Hnilicova et al., 2011), y la fosforilación de la histona H3 recluta proteínas SR durante el ciclo celular, aunque su papel en el *splicing* alternativo no está claro (Loomis et al., 2009).

## ***Introducción***

Existen numerosos trabajos recientes en los que por análisis genómico a gran escala se han establecido los patrones de modificaciones de histonas en exones e intrones (Dhami et al.; Andersson et al., 2009; Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009; Tilgner et al., 2009; Huff et al., 2010; Luco et al., 2010). El trabajo inicial de Kolasinska-Zwierz y colaboradores, mostró que la trimetilación en la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) estaba enriquecida globalmente en exones (Kolasinska-Zwierz et al., 2009). Estudios realizados en paralelo han identificado marcas adicionales características de exones e intrones. De estos estudios derivan discrepancias sobre la existencia (Schwartz et al., 2009; Tilgner et al., 2009) o no de una correlación entre las modificaciones de histonas y la ocupación de nucleosomas (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Spies et al., 2009). El contenido de algunas de las modificaciones en los exones depende de su posición en el gen; la metilación en la lisina 20 de la histona H4 y en la lisina 5 de la histona H2B (H4K20me1 y H2BK5me1, respectivamente) se ha encontrado preferencialmente en exones del extremo 5' de los genes, mientras que la H3K36me3 muestra mayor presencia hacia el extremo 3' de los genes (Hon et al., 2009). Otras marcas parecen depender del nivel de expresión, como la trimetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) que se encuentra preferencialmente en los exones de genes de bajo nivel de expresión y en los intrones de genes altamente expresados (Dhami et al.). Todos estos datos sugieren que las modificaciones post-transcripcionales de las histonas tienen un impacto en la regulación del *splicing* alternativo. De hecho, la H3K36me3 se ha visto enriquecida en exones constitutivos comparado con exones alternativos, tanto en gusano como en ratón (Kolasinska-Zwierz et al., 2009), mientras que en humano no se ha podido confirmar (Spies et al., 2009). Una evidencia directa de la implicación de las marcas de histonas en el *splicing* fue observada en el gen del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2). Este gen sufre un proceso de *splicing* alternativo que resulta en dos formas mutuamente exclusivas de los exones IIIb y IIIc. Luco y colaboradores observaron que las modificaciones H3K36me3 y la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1) son abundantes en el exón IIIc cuando éste se incluye mientras que H3K27me3 y la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) se acumulan preferencialmente cuando el exón IIIb está presente (Luco et al., 2010).

Las modificaciones de histonas tienen un papel importante en convertir una cromatina cerrada en un estado abierto de cromatina y, por tanto activa, mediante la

coordinación del reclutamiento de factores de transcripción a la RNAPII elongante (Li et al., 2007; Lee et al., 2010). Por ello, el mecanismo por el cual las marcas de cromatina afectan al *splicing* alternativo se ha relacionado con cambios en la procesividad de la RNAPII. Apoyando este modelo, la hiperacetilación de la cromatina al inducir despolarización neuronal lleva a un aumento de la tasa de elongación favoreciendo la exclusión del exón del pre-mRNA del gen *NCAM* (*Neural cell adhesion molecule*) (Schor et al., 2009); mientras que modificaciones relacionadas con un estado cerrado de la cromatina y, por tanto, con la represión de la transcripción inducen la inclusión del exón alternativo (Saint-Andre et al., 2011). Otros factores reguladores del *splicing* como la proteína Hu, por medio de su interacción con la deacetilasa de histonas HDAC2, promueven la hiperacetilación de histonas resultando en un aumento local de la tasa de elongación y afectando al *splicing* alternativo (Zhou et al., 2011). Además, RNAs de interferencia (siRNAs, *small interfering RNAs*) dirigidos a secuencias intrónicas provocan un estado de cromatina cerrada, resultando en un bloqueo para la elongación de la RNAPII y afectando de nuevo al patrón de *splicing* generado (Allo et al., 2009). Otro mecanismo alternativo al anterior, es que las modificaciones de las histonas influyen en el *splicing* a través del reclutamiento de factores del *spliceosoma* de una manera co-transcripcional sin afectar a la tasa de elongación (Gunderson and Johnson, 2009). La observación de interacciones directas entre la cromatina y componentes de la maquinaria de *splicing* sugiere un mecanismo que incluye un complejo adaptador, donde proteínas que se unen a la cromatina sirven como plataforma de anclaje para factores de *splicing* (Figura I7B) (Sims et al., 2007; Piacentini et al., 2009; Luco et al., 2010). La evidencia de este mecanismo se ha observado en el pre-mRNA con sitios débiles de unión al factor que reconoce el tracto de polipirimidinas (PTB, *polypyrimidine tract binding protein*), donde H3K36me3 se acumula en las regiones alternativamente procesadas. El efecto de PTB está mediado por MRG15, una proteína adaptadora que se une específicamente a la modificación H3K36me3 (Luco et al., 2010).



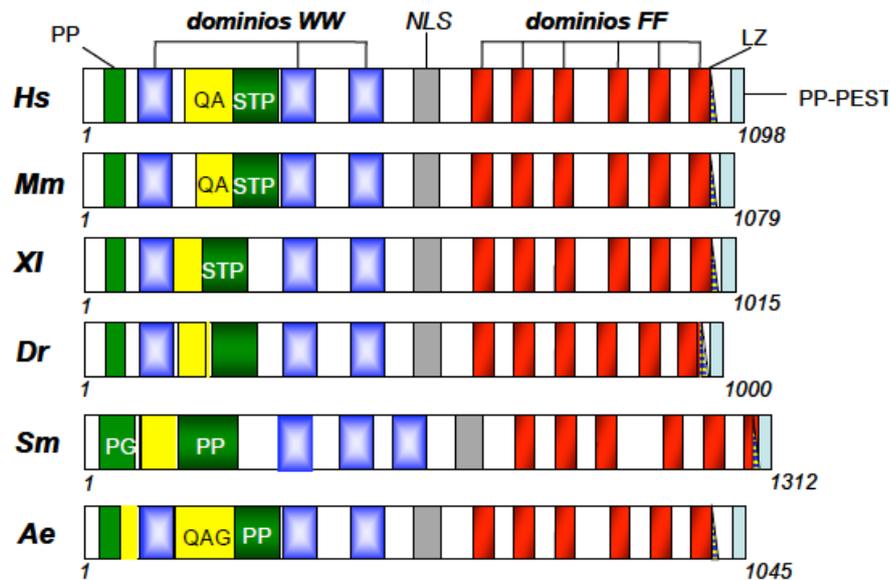
**Figura I7. Influencia de la cromatina en el *splicing* alternativo.** A. Cambios en la organización de la cromatina debido a factores remodeladores de la cromatina (azul), modificaciones de histonas (estrellas) o el posicionamiento de nucleosomas pueden afectar la tasa de elongación de la RNAPII y en consecuencia el *splicing* alternativo. Un nivel bajo de elongación permite el reconocimiento de sitios débiles de *splicing* resultando en la inclusión del exón (amarillo) mientras que un nivel elevado de elongación favorece la exclusión del exón (rojo). B. Las modificaciones de histonas pueden influir en las decisiones de *splicing* independientemente de la tasa de elongación mediante el reclutamiento de factores de *splicing* a través de interacciones con adaptadores de cromatina.

Las regiones exónicas se han visto enriquecidas en metilación del DNA, aunque el efecto de esta modificación sobre el *splicing* no está del todo definido. Un trabajo reciente proporciona la primera evidencia clara de que una proteína de unión al DNA, CTCF (*CCCTC-binding factor*), modula el *splicing* alternativo del gen *CD45* de una forma dependiente a la metilación del DNA (Shukla et al., 2011). En el gen *CD45*, la metilación del DNA inhibe la inclusión del exon 5 y este patrón de metilación es inverso a la unión de CTCF. Datos obtenidos a partir de análisis a gran escala revelan que la unión de CTCF aguas abajo de exones alternativos se correlaciona con la acumulación local de la RNAPII, aportando evidencias adicionales de la influencia de la estructura de la cromatina en el *splicing* alternativo modulando la tasa de elongación de la RNAPII. Una idea interesante sugerida en este trabajo es el hecho de que los patrones de metilación que fluctúan durante el desarrollo podrían modular eventos de *splicing* alternativo específicos de tejidos a través del reclutamiento diferencial de CTCF. Se requieren estudios adicionales para determinar si otras proteínas de unión de DNA afectan al *splicing* a través de mecanismos moleculares similares (Shukla et al., 2011).

Así como la cromatina influye en las decisiones de *splicing*, datos recientes sugieren que el *splicing* puede estar modulando a su vez las modificaciones de histonas. Por ejemplo, la activación del *splicing* favorece el reclutamiento de la metil-transferasa Set2 y por ello la H3K36me3 (de Almeida et al., 2011), y la inhibición del *splicing* causada por la *spliceostatin A* (SSA) o por mutaciones de los sitios de *splicing* produce una redistribución de H3K36me3 hacia el extremo 3' del gen (Kim et al., 2011). Ambos trabajos sugieren una comunicación bidireccional entre las marcas epigenéticas y la regulación del *splicing*.

### **3. TCERG1: Factor regulador de la elongación transcripcional (*transcriptional elongation regulator 1*)**

TCERG1, conocido previamente como CA150, es una proteína nuclear de 150 kD que contiene 1098 aminoácidos. Su secuencia se compone de múltiples dominios de interacción proteína-proteína (Figura I8). En su región amino-terminal destacan tres dominios WW y en su región carboxi-terminal seis dominios FF (Sune et al., 1997). TCERG1 se aisló a partir de fracciones nucleares de células HeLa purificadas por columnas de afinidad a la proteína Tat del HIV-1, identificándose como un co-factor de la trans-activación mediada por Tat (Sune et al., 1997). Igual que otros miembros de la familia de proteínas con dominios WW y FF, TCERG1 ha sido implicada en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Holbert, 2001; Arango et al., 2006; Andresen et al., 2007).



**Figura 8. Estructura de TCERG1.** Representación de la estructura de TCERG1 y su conservación evolutiva en distintas especies. *Hs*, *Homo sapiens*; *Mm*: *Mus musculus*; *Xl*: *Xenopus laevis*; *Dr*: *Danio rerio*; *Sm*: *Schistosoma mansonii*; *Ae*: *Aedes aegyptii*. PP, dominio de poliprolinas. WW, dominios con residuos conservados de triptófano. QA, región rica en glutaminas y alaninas. STP, región rica en serinas, treoninas y prolinas. NLS, señal de localización nuclear. FF, dominios FF compuestos por residuos de fenilalaninas. LZ: cremallera de leucinas (*leucine zipper*). PP-PEST, secuencia peptídica rica en residuos de prolina.

### 3.1. TCERG1 Y TRANSCRIPCIÓN

Estudios de sobre-expresión transitoria de TCERG1 en líneas celulares apoyan un papel regulador de la proteína sobre la eficiencia de elongación de la RNAPII a partir de promotores específicos (Sune and Garcia-Blanco, 1999). A través de sus dominios FF interacciona con la RNAPII en estado hiperfosforilado (Sune et al., 1997; Carty et al., 2000; Goldstrohm et al., 2001a) y además se ha visto que inmunoprecipita con factores de la elongación de la transcripción como PTEF-b, TFIIF y TAT-SF1, sugiriendo su participación en complejos reguladores de la elongación (Sanchez-Alvarez et al., 2006; Jablonski et al., 2010). TCERG1 está presente en los PICs del HIV-1 (datos del laboratorio sin publicar) y aunque probablemente sea reclutado a través del promotor (McFie et al., 2006; Montanuy et al., 2008; Jablonski et al., 2010), también parece estar

comprometido en los complejos elongantes ya que se localiza a lo largo de la región codificante de los genes (Jablonski et al., 2010)(datos del laboratorio sin publicar). TCERG1 puede actuar como activador o represor de la transcripción dependiendo del contexto (Sun et al., 2004; McFie et al., 2006; Pearson et al., 2008; Sanchez-Alvarez et al., 2010; Zhou et al., 2010), y la modificación post-traducciona por adición del grupo SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) inhibe la activación transcripcional mediada por TCERG1 de plásmidos reporteros (Sanchez-Alvarez et al., 2010). Recientemente, datos basados en estudios realizados con *Caenorhabditis elegans* sugieren un papel de TCERG1 en las rutas de envejecimiento, activando la expresión de genes regulados por el factor de DAF-16/FOXO (Ghazi et al., 2009).

### 3.2. TCERG1 Y SPLICING

Además de su efecto en elongación, otros datos experimentales sugieren un papel regulador de TCERG1 en el *splicing* del pre-mRNA. Así, TCERG1 interacciona a través de sus dominios WW y FF con factores de *splicing* como SF1 o U2AF, entre otros (Goldstrohm et al., 2001a; Lin, 2004; Smith et al., 2004; Sanchez-Alvarez et al., 2006). Además, TCERG1 ha sido co-purificado en complejos del *spliceosoma* (Neubauer et al., 1998; Makarov et al., 2002; Rappsilber et al., 2002; Deckert et al., 2006). Consistente con los anteriores datos, su patrón de localización subnuclear recuerda al de otros factores implicados en el metabolismo del RNA, con una mayor acumulación en la zona periférica de los *speckles* o dominios SC35, compartimentos nucleares enriquecidos en factores de *splicing* del pre-mRNA. Los dominios FF, en concreto los dominios FF4 y FF5, son cruciales para esta localización subnuclear (Sanchez-Alvarez et al., 2006; Sanchez-Hernandez et al., 2012). Numerosos estudios basados en modelos de minigenes demuestran que TCERG1 tiene un papel funcional en la regulación del *splicing*. Así, se ha visto que TCERG1 modula el *splicing* de minigenes reporteros de la  $\beta$ -globina, de la  $\beta$ -tropomiosina, CD44 y del gen de la fibronectina *in vivo* (Lin, 2004; Cheng et al., 2007; Pearson et al., 2008; Sanchez-Alvarez et al., 2010). En este último modelo experimental, el *splicing* depende del reconocimiento del sitio de *splicing* 3', sugiriendo que TCERG1 podría estar actuando durante el ensamblaje del *spliceosoma* temprano. Asimismo, la identificación de

## ***Introducción***

posibles genes diana mediante microarrays revelan que genes implicados en el procesamiento del pre-mRNA se ven afectados al silenciar TCERG1 (Pearson et al., 2008)(datos del laboratorio sin publicar).

Por todos estos datos que implican a TCERG1 en procesos de transcripción y de *splicing*, se ha propuesto a esta proteína como un factor acoplador de la transcripción y el *splicing* alternativo (Goldstrohm et al., 2001b). Las bases moleculares del acoplamiento funcional mediado por TCERG1 eran desconocidas hasta la realización de esta tesis.

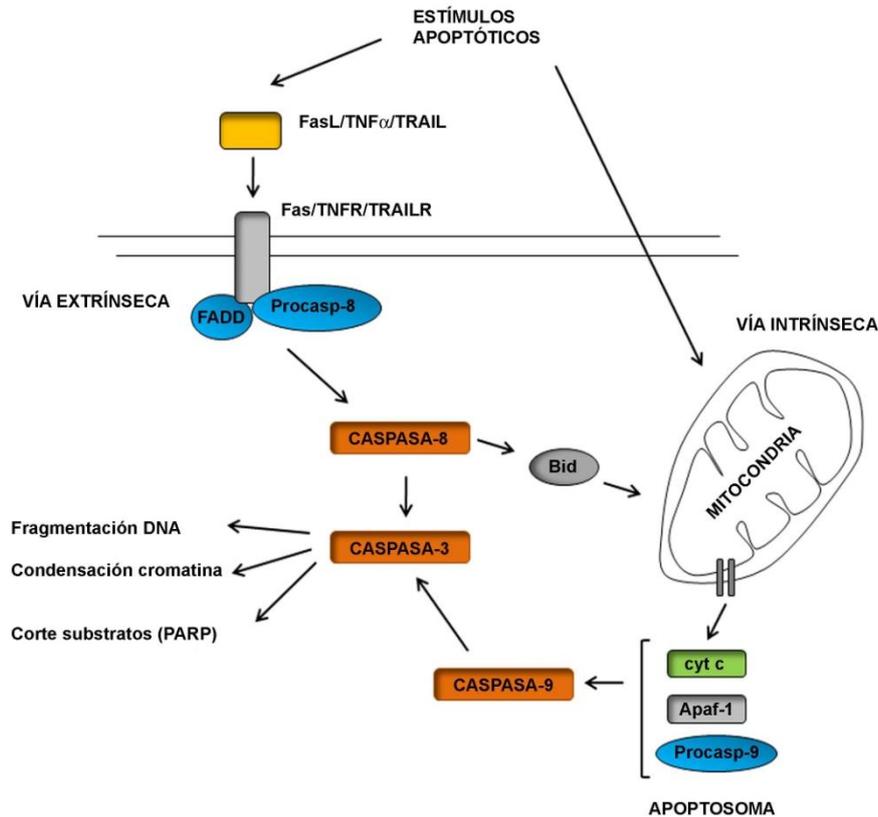
## **4. APOPTOSIS**

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada de organismos multicelulares que conlleva alteraciones a nivel morfológico y bioquímico, como la aparición de burbujas, cambios en la membrana celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Kerr et al., 1972; Saraste and Pulkki, 2000). Los primeros conocimientos moleculares del proceso de apoptosis vienen dados por estudios tempranos en *C. elegans* donde se encontraron genes que parecían estar implicados en la regulación de la muerte celular (Ellis and Horvitz, 1986) y posteriormente, por la identificación de sus homólogos en mamíferos (Yuan et al., 1993; Hengartner and Horvitz, 1994). A diferencia de la necrosis, la otra forma de muerte celular, las células en apoptosis se encuentran en los llamados cuerpos apoptóticos que son eliminados por los fagocitos sin que su contenido se libere al citoplasma (Majno and Joris, 1995). Este proceso de muerte programada ocurre de manera fisiológica para alcanzar un equilibrio entre proliferación y muerte y es sumamente importante para la apropiada reposición de células, para el desarrollo biológico o para respuestas citotóxicas del sistema inmunológico (Cotter et al., 1990). Cualquier desequilibrio en este proceso puede llevar a alteraciones en el organismo, como enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes o cáncer (Dowling et al., 1996; Singh and Dikshit, 2007; Ferreira et al., 2010; Fuchs and Steller, 2011).

### ***4.1 Vía extrínseca y vía intrínseca***

Existen dos rutas principales de apoptosis: la ruta extrínseca o ruta de los receptores de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, TNF-R, y la ruta intrínseca o mitocondrial. La ruta extrínseca se activa por estímulos extracelulares y es mediada por los receptores que se encuentran en la superficie celular: Fas/APO-1/CD95, TNFR-1 y TRAIL-R. La unión de sus respectivos ligandos supone la activación de los receptores que hace que se oligomericen a través de sus dominios citoplasmáticos, llamados dominios de muerte, formando el complejo de señalización inducido por muerte: DISC (*death-inducing signaling complex*) (Kischkel et al., 1995). Estos dominios reclutan a las proteínas adaptadoras FADD (*Fas-associated death domain*) y TRADD (*TNFR-1-associated death domain*,) (Peter and Krammer, 2003) y a la pro-caspasa 8, activándola e iniciando la cascada de activación de las caspasas, las moléculas efectoras responsables de la morfología apoptótica de la célula (Li and Yuan, 2008) (Figura 9). La vía intrínseca o mitocondrial se induce por una serie de estímulos intracelulares o por daño celular que en último término provoca la liberación de proteínas solubles de la mitocondria al citosol, como el citocromo c (Vaux, 2011). El citocromo c junto con la proteína Apaf-1 y la pro-caspasa 9 forman el complejo proteico apoptosoma que activa a la caspasa 9 iniciando la cascada proteolítica (Li et al., 1997; Rodriguez and Lazebnik, 1999) (Figura I9).

## Introducción



**Figura I9. Esquema simplificado de las rutas que desencadenan apoptosis.** La ruta extrínseca es activada por estímulos extracelulares y es mediada por los receptores de muerte (Fas, TNFR y TRAILR) y sus ligandos (FasL, TNF $\alpha$  y TRAIL) que desencadenan la cascada de activación de caspasas. La ruta intrínseca se estimula por señales intracelulares que conllevan a cambios en la membrana mitocondrial y a la salida de citocromo c de la mitocondria al citosol con la consiguiente activación de la cascada de activación de caspasas. Ambas rutas convergen en la activación de caspasas efectoras que desencadenan los procesos bioquímicos y morfológicos propios de la apoptosis (ver texto).

### 4.2. Caspasas

Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteína proteasas que cortan secuencias específicas que contienen residuos de ácido aspártico (*Cistein-aspartic-proteases*). Se encuentran en forma de pro-enzimas o zimógenos inactivos (pro-caspasas) que son activadas tras reacciones proteolíticas secuenciales (Enari et al., 1996; Hasegawa et al., 1996). Las subunidades originadas tras el corte se unen para formar los heterodímeros o tetrámeros activos que desencadenan una serie de

eventos proteolíticos que dan lugar a la morfología característica del proceso de apoptosis (Shi, 2002). Según su función se pueden clasificar en dos grupos: caspasas iniciadoras y caspasas efectoras.

### ***Caspasas iniciadoras***

Entre las caspasas iniciadoras se encuentran las caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12. Se caracterizan por tener un pro-dominio largo que sirve de plataforma para la interacción proteína-proteína. Por ejemplo, la caspasa 10 o la caspasa 8 se activan por autocatálisis al interactuar con los dominios intracelulares de los receptores de muerte. La caspasa 9 se activa en presencia de ATP y de citocromo c en el complejo apoptosoma. La activación de estas caspasas supone el inicio de la ruta proteolítica que resultará en la activación de las caspasas efectoras (Li and Yuan, 2008).

### ***Caspasas efectoras***

En la etapa en la que intervienen las caspasas efectoras convergen las dos rutas apoptóticas. Las caspasas 3, 6 y 7 forman parte de las caspasas efectoras. Estas caspasas tienen varios sustratos intracelulares, entre ellos elementos estructurales del citoesqueleto, factores reguladores de apoptosis, así como proteínas implicadas en el daño y reparación del DNA. El corte de estas moléculas por las caspasas efectoras inhibe la supervivencia celular y los mecanismos de reparación (Fischer et al., 2003). La caspasa 3 se activa al dimerizar los fragmentos generados de la proteólisis de su precursor pro-caspasa 3 por acción de otras caspasas como la 9 o la 8. Esta activación supone la degradación de proteínas necesarias para la viabilidad e integridad celular. Uno de sus sustratos es la enzima PARP (*Poly (ADP-ribose) polymerase*) encargada de la reparación del daño en el DNA. El corte de PARP por la caspasa 3 impide su función reparadora (Tewari et al., 1995). Además, la caspasa 3 junto con otras caspasas efectoras, activa la enzima CAD (*caspase activated DNase*) que es la encargada de la fragmentación del DNA (Enari et al., 1998). Otra caspasa efectora es la caspasa 6 que tras su activación favorece la degradación de laminaA, proteína estructural de la membrana nuclear, lo que conlleva a la condensación de la cromatina y a la fragmentación nuclear (Ruchaud et al., 2002). Las funciones de la caspasa 7 se consideran redundantes a las de la caspasa 3, aunque se han descrito funciones

## ***Introducción***

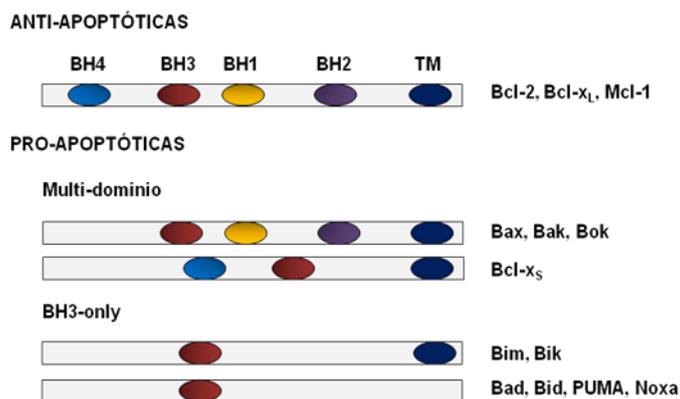
independientes de apoptosis no-redundantes como su implicación en procesos de inflamación (Lamkanfi and Kanneganti, 2010).

### ***IAPs, Inhibidores de caspasas.***

Las caspasas se mantienen inactivas mediante la acción de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis IAPs, (*Inhibitors of Apoptosis*), que son factores anti-apoptóticos que se asocian a las caspasas en respuesta a diversos estímulos. Los inhibidores más descritos son cIAP-1, cIAP-2 (*Cellular Inhibitor of Apoptosis*) y XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*), que se unen a las caspasas 3, 7 y 9 inhibiendo su activación e impidiendo la apoptosis (Huang et al., 2001; Salvesen and Duckett, 2002). Cuando las células reciben el estímulo apoptótico, las IAPs sufren un proceso catalítico mediado por caspasas, se auto-ubiquitinan y se degradan. También pueden ser secuestradas por proteínas que han sido liberadas de la mitocondria como Smac/DIABLO (Srinivasula et al., 2001; Salvesen and Duckett, 2002).

### ***4.3. Proteínas de la familia Bcl-2***

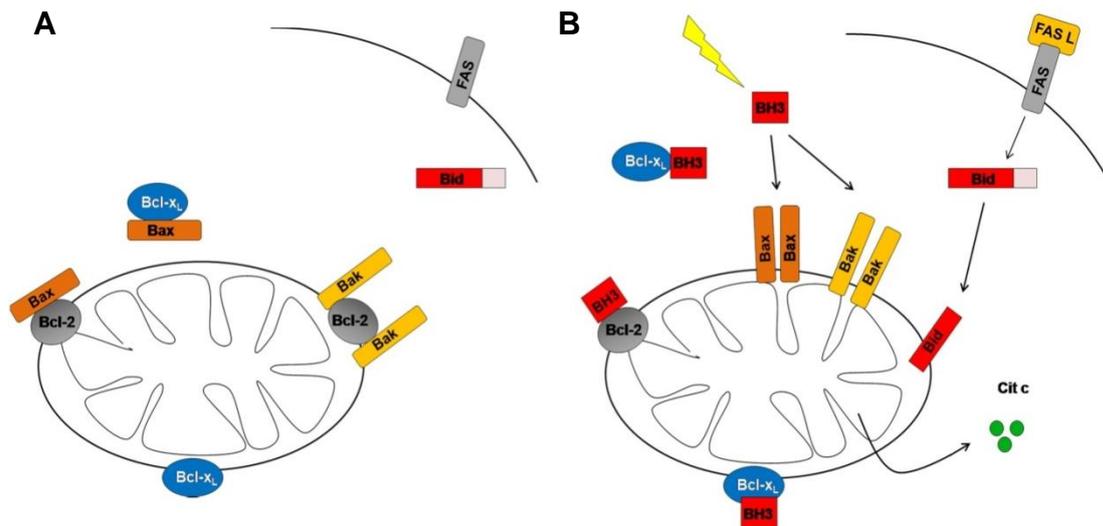
La localización y el control de las proteínas de la familia Bcl-2 es determinante para la vía intrínseca de apoptosis. El proceso clave durante esta ruta de apoptosis es la liberación de proteínas solubles de la mitocondria, que se produce al quedar comprometida la integridad de la membrana mitocondrial externa (*MOM, mitochondrial outer membrane*) en un proceso que ocurre durante la apoptosis llamado permeabilización de la membrana mitocondrial externa (*MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization*). Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel fundamental en el control de este proceso. Pueden ser anti-apoptóticas o pro-apoptóticas y se clasifican según sus dominios de homología a Bcl-2, llamados dominios BH (*Bcl-2 homology domains*) (Tsujimoto, 1998; Youle and Strasser, 2008) (Figura I10). Las proteínas anti-apoptóticas poseen 4 de estos dominios (BH1 a BH4: como Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Mcl-1). Las proteínas pro-apoptóticas se dividen en dos subgrupos: proteínas con multidominios BH (entre ellas, Bax, Bak, Bok) y con un solo dominio BH3 (*BH3-only*: entre ellas, Bid, Bim, Bad, Bik, Puma y Noxa), con la excepción de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> que posee los dominios BH3 y 4 (Lindsay et al., 2011).



**Figura I10. Estructura y clasificación de las proteínas de la familia de Bcl-2 según su función y sus dominios de homología (BH).** Proteínas anti-apoptóticas que contienen 4 dominios BH además de un dominio transmembrana TM. Las proteínas pro-apoptóticas pueden tener múltiples dominios BH o solamente un dominio BH3 (*BH3-only*).

Las proteínas pro-apoptóticas de múltiples dominios son las responsables del MOMP al oligomerizar en la membrana mitocondrial externa (Mikhailov et al., 2003). Bak se localiza en la membrana mitocondrial externa mientras que Bax se encuentra en su mayor parte en el citoplasma. Tras la inducción de apoptosis se producen cambios conformacionales que hacen que Bax se transloque a la membrana mitocondrial donde oligomeriza favoreciendo la formación de un poro lipoproteico que permite la liberación de proteínas solubles al citosol (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997). En condiciones normales, la acción anti-apoptótica de proteínas de esta familia es la encargada de prevenir la oligomerización mediante su interacción con proteínas pro-apoptóticas (Cheng et al., 2001). Bcl-2 se encuentra íntegramente en la membrana mitocondrial mientras que Bcl-x<sub>L</sub> se ancla a la membrana en situación de citotoxicidad para proteger a la célula. Tras estímulos apoptóticos las proteínas con un solo dominio BH3 (*BH3-only*) son activadas, bien a nivel transcripcional o por modificaciones post-traduccionales y se encargan de regular la oligomerización de Bax y Bak en la membrana mitocondrial externa bien mediante activación directa o indirecta actuando como desrepresores al inhibir las interacciones entre las proteínas anti-apoptóticas y Bax y Bak (Letai et al., 2002; Kuwana et al., 2005) (Figura I11).

## Introducción



**Figura I11. Papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la mitocondria.** A. En una situación homeostática normal, las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x<sub>S</sub> interaccionan con las pro-apoptóticas Bax y Bak inhibiendo apoptosis. B. Ante estímulos internos, como daño en el DNA, las proteínas BH3-only se activan ejerciendo su acción directa, activando Bax y Bak, o indirecta, interaccionando con las anti- que dejan libre Bax y Bak para que oligomericen en la membrana mitocondrial y den lugar a la formación del poro y a la salida de proteínas solubles como citocromo c. Estímulos externos que activan la ruta extrínseca de receptores de muerte (FAS y FASL) activan Bid que se transloca a la membrana favoreciendo el proceso apoptótico.

La familia de Bcl-2 no es exclusiva de la vía intrínseca, ya que la proteína t-Bid, que se genera tras el corte del precursor Bid por la caspasa 8 como parte de la ruta extrínseca, también pertenece a esta familia (Luo et al., 1998) (Figura 11). Tras el corte de su extremo carboxilo se transloca del citosol a la mitocondria donde ejerce un papel directo al promover la oligomerización de Bax y Bak en la membrana mitocondrial y la formación del poro que dará lugar a la liberación de citocromo c (Wei et al., 2000).

### 4.4. Apoptosis independiente de caspasas

El proceso de apoptosis puede ocurrir de manera independiente de caspasas mediante los factores inductores de apoptosis (AIFs, *Apoptosis Inducing Factors*) que son liberados de la mitocondria y se translocan al núcleo. Entre estos factores se encuentran las proteínas nucleares AIF, la endonucleasa G o incluso miembros de la

familia de proteínas de respuesta a choque térmico *HSP*, (*Heat Shock Proteins*) (Cande et al., 2002; Parcellier et al., 2003; Comelli et al., 2009). Estas proteínas dan lugar a eventos apoptóticos como la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA sin la implicación de las caspasas. Sin embargo, la morfología de las alteraciones nucleares producidas es diferente a la que ocurre en apoptosis dependiente de caspasas, donde el núcleo queda fragmentado en pequeñas partes esféricas (Norberg et al., 2010).

## 5. APOPTOSIS Y *SPLICING* ALTERNATIVO

Numerosas proteínas que participan en las rutas apoptóticas son reguladas a través del *splicing* alternativo. Así, son varios los genes de apoptosis que pueden codificar para proteínas distintas con funciones antagonistas, como el caso mencionado de *Bcl-x*, mientras que otros pueden dar lugar a alteraciones de su potencial apoptótico o de su localización celular. En ocasiones, las isoformas alternativas se detectan simplemente a nivel de mRNA sin que genere proteína y que puede servir como mecanismo de control de la expresión (Schwerk and Schulze-Osthoff, 2005). A continuación se detallan algunos eventos de *splicing* alternativo que tienen lugar en distintos genes apoptóticos.

### 5.1. Ruta de receptores de muerte

El gen *Fas/CD95* codifica para un receptor trans-membrana pro-apoptótico (Strasser et al., 2009). Su procesamiento alternativo genera una isoforma soluble en la que el exón 6 queda excluido de su mRNA y cuya función es la de inhibir la apoptosis al competir con el receptor trans-membrana (Cheng et al., 1994; Hughes and Crispe, 1995; Cascino et al., 1996). Cambios en los patrones de *splicing* alternativo de *Fas* tienen lugar tras la activación del receptor de células T durante la maduración de los linfocitos (Liu et al., 1995). Además, alteraciones en los niveles de las isoformas de *Fas* se han asociado al síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS, *autoimmune lymphoproliferative syndrome*) (Roesler et al., 2005). También se ha visto que altos niveles de *Fas* soluble se correlacionan con enfermedades autoinmunes como lupus

## ***Introducción***

eritromatoso sistémico o esclerosis sistémica aunque se desconoce el mecanismo (Wetzig et al., 1998; Al-Maini et al., 2000). Existen numerosos estudios acerca de la regulación del *splicing* alternativo de *Fas*. Así, la proteína apoptótica TIA-1 se une a una región intrónica favoreciendo el reclutamiento de U1snRNP al 5' ss del exón 6; su fosforilación por la kinasa FAST K aumenta el reclutamiento de U1snRNP (Izquierdo and Valcarcel, 2007). El factor de *splicing* PTB se une a una región exónica, inhibiendo la posterior unión de U2AF al 3' ss e impidiendo el reconocimiento del exón 6 (Forch et al., 2000; Izquierdo et al., 2005). RBM5, un factor de *splicing* implicado en apoptosis (Rintala-Maki et al., 2004; Rintala-Maki and Sutherland, 2004), también participa en la regulación del *splicing* alternativo de *Fas* promoviendo la exclusión del exón 6 al inhibir la unión de U4/U5/U6 tri-snRNP a los complejos pre-*spliceosomas* e impidiendo la formación de *spliceosomas* maduros en los sitios de *splicing* a ambos lados del exón 6 (Bonnal et al., 2008).

### ***5.2 Caspasas y proteínas relacionadas***

Varios miembros de la familia de las caspasas son regulados por *splicing* alternativo. Por ejemplo la caspasa 2 puede generar isoformas diferentes con funciones antagonistas. La isoforma larga de la caspasa 2 favorece la muerte celular mientras que la isoforma corta inhibe la apoptosis (Wang et al., 1994; Jiang et al., 1998). Igualmente, por *splicing* alternativo se genera una isoforma corta de caspasa 9 que, al contrario que la larga, inhibe la apoptosis posiblemente al impedir la formación de un apoptosoma funcional formado por APAF-1 y la pro-caspasa 9 (Seol and Billiar, 1999). c-FLIP es una proteína de cierta homología a la caspasa 8 de la que se han identificado tres isoformas: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> y c-FLIP<sub>R</sub>. Aunque su función en apoptosis no está todavía clara, C-FLIP<sub>L</sub> puede actuar tanto como proteína pro-apoptótica como inhibidora de la apoptosis mediada por la ruta extrínseca (Irmeler et al., 1997; Fricker et al., 2010), mientras que c-FLIP<sub>S</sub> y c-FLIP<sub>R</sub> se han descrito como inhibidoras de la activación de la apoptosis mediada por *Fas* (Krueger et al., 2001; Golks et al., 2005).

### 5.3 Genes de la familia *Bcl-2*

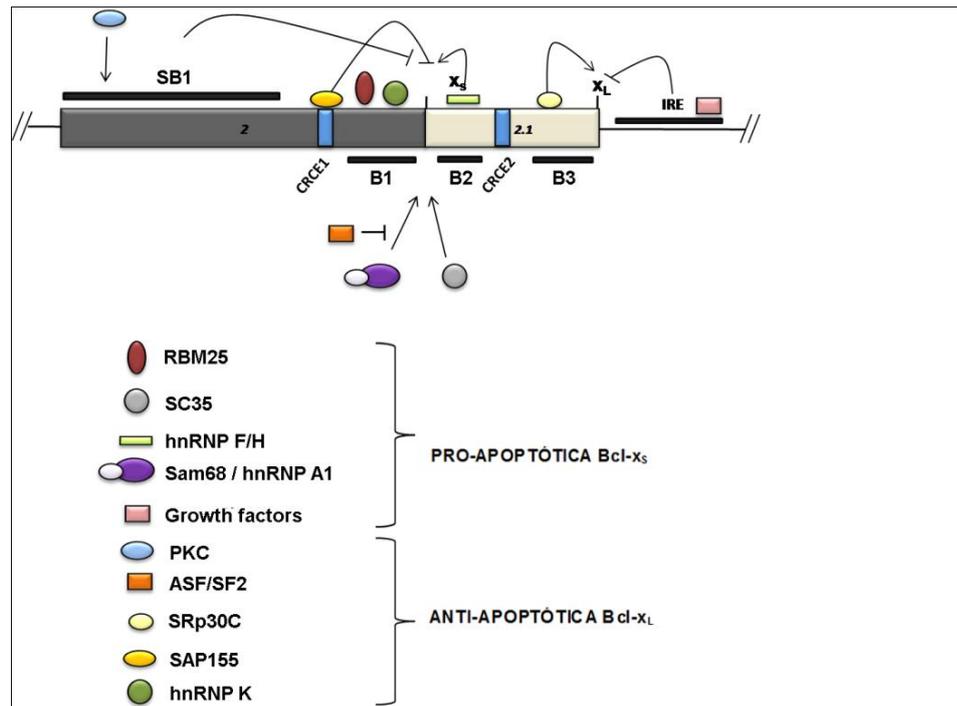
Varios genes de esta familia pueden ser regulados por *splicing* alternativo generando proteínas con funciones antagónicas. El correcto balance entre sus isoformas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas es crucial para las decisiones de muerte o supervivencia celular. El desequilibrio puede llevar a múltiples enfermedades como cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Akgul et al., 2004). Por ejemplo la proteína Bak, perteneciente al grupo de las proteínas *BH3-only* genera por *splicing* alternativo una isoforma corta específica de células neuronales. La sobre-expresión de esta isoforma inhibe la apoptosis en neuronas (Sun et al., 2001). También se han identificado isoformas alternativas de Bid con diferente patrón de expresión y localización celular y con diferencias en su función apoptótica (Renshaw et al., 2004). Por último, existen cuatro isoformas de Bim que difieren en su función y en su grado como inductor apoptótico (Marani et al., 2002; Mouhamad et al., 2004).

De particular interés para esta tesis es la regulación del *splicing* alternativo del gen *Bcl-x*. Mediante *splicing* alternativo se generan una isoforma larga, *Bcl-x<sub>L</sub>*, y una forma corta, *Bcl-x<sub>S</sub>*. *Bcl-x<sub>L</sub>* es una proteína anti-apoptótica, como ya se ha descrito en el capítulo anterior, mientras que *Bcl-x<sub>S</sub>* antagoniza la acción inhibitoria de *Bcl-x<sub>L</sub>* y *Bcl-2* (Boise et al., 1993). *Bcl-x<sub>L</sub>* se expresa en casi todo tipo de tejido y además se encuentra en elevados niveles en tejidos cancerígenos. Su sobre-expresión confiere resistencia a los estímulos apoptóticos y favorece la metástasis (Boise and Thompson, 1997; Olopade et al., 1997). *Bcl-x<sub>S</sub>* se encuentra mayoritariamente en nódulos linfoides, timo, ovario, próstata y otros tejidos en los que se requiere una alta tasa de recambio celular (Krajewski et al., 1994). *Bcl-x<sub>S</sub>* puede inducir apoptosis en distintos tipos celulares o sensibilizar la célula ante agentes apoptóticos, aunque existe controversia sobre si el papel de *Bcl-x<sub>S</sub>* en apoptosis es directo o indirecto (Clarke et al., 1995; Sumantran et al., 1995; Lindenboim et al., 2000; Leu et al., 2012). En células de cáncer de colon tiene efectos citocinéticos sin producir un aumento claro en apoptosis (Fridman et al., 1998).

Las dos isoformas de *Bcl-x* se generan mediante el uso alternativo de dos sitios 5' de *splicing* presentes en el exón 2 del gen. Existen varias secuencias en el RNA de *Bcl-x* que determinan la producción de una isoforma o la otra. A estos elementos en cis se unen proteínas de unión al RNA para modular su *splicing* alternativo. El exón 2 contiene 2 elementos que responden a estímulos con ceramida (CRCE, *Ceramide*

## ***Introducción***

*Response Elements*) (Chalfant et al., 2002). SAP155 es un factor de *splicing* que se une a una de estas regiones e inhibe la producción de la isoforma pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub>; la ceramida induce la defosforilación por lo que impide su función inductora de apoptosis (Massiello et al., 2004; Massiello et al., 2006). El factor hnRNPA1 coopera con Sam68 para favorecer la producción de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>; la fosforilación de este factor por la kinasa Fyn disminuye este efecto (Paronetto et al., 2007). También en el exón 2 se han descrito otros cuatro elementos reguladores: B1, situado aguas arriba del sitio de *splicing* x<sub>S</sub> está compuesto por regiones adyacentes con secuencias superpuestas tanto potenciadoras como inhibitoras del sitio x<sub>S</sub>, donde se unen factores como hnRNP K que inhibe el sitio de *splicing* x<sub>S</sub>, o RBM25 que lo favorece (Revil et al., 2009). El elemento B2 está aguas abajo del sitio x<sub>S</sub> e interacciona con hnRNP F/H favoreciendo su utilización (Garneau et al., 2005). El elemento B favorece la isoforma Bcl-x<sub>L</sub> a través del factor SRp30C (Cloutier et al., 2008). Por último, un cuarto elemento llamado SB1 situado al inicio del exón 2 se ha descrito como región inhibitora de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>. Aunque los factores que se unen a SB1 se desconocen, esta región media el efecto de la proteína kinasa C (PKC) en la apoptosis (Revil et al., 2007). Recientemente se ha sugerido la convergencia de rutas de señalización a través del control de la expresión y la estabilidad de un potencial represor del sitio de *splicing* x<sub>S</sub> que se une al elemento regulador SB1 (Shkreta et al., 2010). Existe también una región reguladora en el intrón 2 llamada IRE (*Intronic Regulatory Element*) y que se requiere para la regulación del *splicing* alternativo de *Bcl-x* en respuesta a factores de crecimiento e IL-6 (Li et al., 2004) (Figura I12). Por último se ha caracterizado recientemente la presencia de elementos reguladores en el exón 3 que favorecen la inducción de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> al formar estructuras en forma de tallo-lazo (Lee et al., 2012).



**Figura I12. Elementos reguladores en cis en la secuencia del pre-mRNA del gen *Bcl-x* y las proteínas de unión a RNA que se unen a ellos.** Regiones reguladoras exónicas SB1, B1, B2 y B3 e intrónicas IRE. En diferentes colores, proteínas de unión a RNA que se unen a estas secuencias para ejercer su efecto en el *splicing* alternativo del pre-mRNA favoreciendo bien el uso del 5' ss x<sub>L</sub> o x<sub>S</sub>.

## ***OBJETIVOS***

***El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio del mecanismo de acción de TCERG1 sobre el splicing alternativo co-transcripcional del pre-mRNA. Para ello se diseñaron y elaboraron a lo largo de la tesis los siguientes objetivos concretos:***

1. Estudio del efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de genes implicados en apoptosis.
  - 1.1 Estudio del splicing co-transcripcional del gen *Bcl-x*.
    - 1.1.a. Caracterizar los elementos en el pre-mRNA de *Bcl-x* necesarios para la acción de TCERG1.
    - 1.1.b. Determinar la influencia de la elongación transcripcional en el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.
2. Investigar las consecuencias funcionales de la regulación del *splicing* alternativo de genes de apoptosis por TCERG1.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## ***Materiales y Métodos***

Los vectores de expresión de las RNAPII mutadas resistentes a  $\alpha$ -amanitina fueron cedidos por el Dr. Alberto Kornblihtt de la Universidad de Buenos Aires (Argentina) y descritos previamente (de la Mata et al., 2003).

### **Reporteros de splicing alternativo**

Los minigenes reporteros de splicing CMV-X2, HIV2-X2 y HIV-X2.13., así como HIV2- $\Delta$ 9,  $\Delta$ 11,  $\Delta$ 12,  $\Delta$ 13,  $\Delta$ 16,  $\Delta$ 17 y  $\Delta$ 23 fueron generados en el laboratorio del Dr. Benoit Chabot, Universidad de Sherbrooke (Canadá).

El minigen reportero de splicing de Fas fue cedido por el Dr. Juan Valcárcel, CRG (Barcelona).

### **Transfecciones**

Se utilizaron células HEK 293T y HeLa para el estudio del acoplamiento transcripción-*splicing*. Aproximadamente  $2 \times 10^5$  células se sembraron en pocillos de 35mm (BD Falcon) 20 horas antes de la transfección. Cuando alcanzaron un 70-80 % de confluencia se transfectaron con las concentraciones de plásmidos correspondientes utilizando el método de precipitación de  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  para transfección de DNA plasmídico y *Lipofectamine 2000*, (Invitrogen) para transfección de siRNAs siguiendo las indicaciones del fabricante. 48 horas después se recogieron las células y fueron procesadas para su análisis. En estas condiciones se consiguió aproximadamente un 80% de transfección.

Para ensayos de apoptosis se utilizaron células Jurkat. Aproximadamente  $20 \times 10^6$  células se transfectaron con 1 $\mu$ g del plásmido indicado por cada millón de células mediante electroporación en medio RPMI sin completar. La electroporación se llevo a cabo a un voltaje de 280 V y 1500mF en cubetas de 4mm de grosor (Equibio). En cada transfección se incluyó el vector pCDNA3-GFP para medir porcentaje de transfección mediante citometría. Se obtuvo un porcentaje consistente de entre 60-75%. 48 horas después de la transfección, se añadió el tratamiento correspondiente y tras el tiempo indicado en cada ensayo se procesó la muestra para su análisis.

### **Extracción de RNA y análisis por RT-PCR**

El RNA total fue extraído mediante Trizol (Invitrogen) según las indicaciones de la casa comercial y digerido con 10 U de *DNase* (Roche) durante 30 minutos a 37°. La DNasa fue inactivada mediante fenol/cloroformo. 1 $\mu$ g de RNA endógeno o 400 ng de

### **Cultivos celulares y tratamientos**

Células HEK 293T y células HeLa se cultivaron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco), penicilina/estreptomicina (100 U y 0.1 mg/ml respectivamente) y L-glutamina 4 mM. Las células establemente silenciadas HEK-TREx 293 fueron cedidas por el Dr. Mariano García-Blanco, Universidad de Duke, (Carolina del Norte). Se usó higromicina 200 µg/ml (Invitrogen) como antibiótico de selección, tetraciclina 5 µg/ml (Sigma) para la inducción de los shRNAs y blasticina 15 µg/ml (Invitrogen) para la inhibición de la inducción por tetraciclina

Células Jurkat se cultivaron en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (GIBCO), penicilina/estreptomicina (100 U y 0.1 mg/ml respectivamente). Las células Jurkat establemente silenciadas fueron cedidas por el laboratorio del Dr. José Alcamí, Centro Nacional de Microbiología, (Madrid). Para la línea silenciada establemente además se utilizo puromicina a 50ng/µl (Invitrogen) como antibiótico de selección.

Para la inducción de apoptosis por vía intrínseca se utilizó estaurosporina (Sigma). Para la inducción de apoptosis por vía extrínseca se utilizó anti-CD95 (MBL). Las condiciones que se siguieron se indican en cada experimento dependiendo del tipo celular y del análisis llevado a cabo en cada situación. La  $\alpha$ -amanitina (SIGMA) se utilizó a 10 µg/ml durante 18 horas y el MG132 (Calbiochem) a 5 y 10 µg/ml durante tres horas previas a la transfección.

### **Plásmidos**

Los vectores de expresión eucariota basados en TCERG1 han sido desarrollados y descritos en anteriores trabajos (Goldstrohm et al., 2001; Sanchez-Alvarez et al., 2006; Sanchez-Alvarez et al., 2010; Sune and Garcia-Blanco, 1999): pEFBOST7, pEFBOST7CA150wt; las versiones truncadas pEFBOST7 (591-1098), (1-662); las versiones pEFHisB, pEFHisBCA150wt y sus versiones truncadas pEFHisB (1-1027), (1-1004), (1-951), (1- 870), (1-787), (1-715), (1-662).

El vector de expresión de pcDNA3-FLAG-Bcl-x<sub>S</sub> se generó ligando la secuencia codificante de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> amplificada desde RNA total mediante RT-PCR con los oligonucleótidos BclEcoRI-F y BclXbaI-R al vector pcDNA3-FLAG.

RNA derivado del minigen se retrotranscribieron con *M-MLU retrotranscriptase* (Invitrogen) durante 1h a 37° utilizando *oligo (dT)<sub>15</sub>* para RNA endógeno, *random hexamers* para pre-mRNA y oligonucleótidos específicos RT-Sveda y RT3 para los minigenes HIV2-X2 y CMV-X2 respectivamente. 1/10 de la reacción se amplificó mediante PCR convencional usando oligonucleótidos X2-X3 y FendF y FendR para la amplificación de las dos isoformas de Bcl-x y Fas endógenos, respectivamente y X34-XAgeI para los minigenes de Bcl-x. Tras 30 ciclos de PCR los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%. La intensidad de bandas fue cuantificada usando el software Quantity One (Biorad). En el caso de la PCR de Bcl-x endógeno (Figura R-1), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Perkin Elmer Life Sciences) fue añadido a la mezcla de PCR y el resultado fue separado en un gel nativo de poliacrilamida al 4%. El gel fue expuesto en pantallas en el Storm PhosphorImager 860 (GE Healthcare). La intensidad de bandas fue cuantificada usando el software ImageQuant. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado. El análisis estadístico se realizó con el programa *Prism 5.0 software* (GraphPad). Se utilizó el test *Two-tailed Student* para comparar medias entre muestras. Los valores *P* se representan en las gráficas mediante asteriscos (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Para la cuantificación mediante PCR a tiempo real se usó *Perfecta SYBR green supermix para iQ* (Quanta Biosciences) en la estación *iCycler thermanl cycler station* (Biorad) o bien utilizando *LightCycler Faststart DNA master<sup>plus</sup> SYBR Green I* (Roche) en la *LightCycler* (Roche) con los oligonucleótidos D-Fwd y D-rev para las regiones distales de Bcl-x, SB1-fwd y SB1- rev para la región dentro del elemento SB1y FE6 y FE7 para la amplificación de la isoforma pro-apoptótica de Fas. Los experimentos de RT-PCR se realizaron por triplicado. Los niveles de GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*) se utilizaron como control interno. Los valores son representados como  $(E \text{ Bcl-x})^{\Delta CT(\text{FAS})} / (E \text{ GAPDH})^{\Delta CT(\text{GAPDH})}$ , donde *E*= eficiencia de la PCR y  $\Delta CT = CT \text{ del control} - CT \text{ del silenciamiento}$ . El análisis estadístico se realizó con el programa *Prism 5.0 software* (GraphPad). Se utilizó el test *Two-tailed Student* para comparar medias entre muestras. Los valores *P* se representan en las gráficas mediante asteriscos (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

### Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Células HEK 293T fueron sembradas en placas de 100mm de diámetro hasta una confluencia de 60-70% y transfectadas con 6  $\mu\text{g}$  del minigen reportero HIV2-X2 o CM-

## ***Materiales y Métodos***

X2 utilizando el método de precipitación de Ca<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Tras 48 horas se fijaron las células con 1% de formaldehído para el crosslinking de la cromatina e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la inmunoprecipitación de TCERG1 endógeno, el crosslinking se prolongó a 20 minutos (Figura 9). Para detener el crosslinking se añadió 0.125 M de glicina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron peleteadas, lavadas 3 veces con PBS y lisadas con buffer de lisis SDS (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, una mezcla de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche) y 1 mM de PMSF) durante 10 minutos en hielo. Los lisados fueron sonicados 10 veces durante 15 segundos en hielo y centrifugados a máxima velocidad. Al sobrenadante recuperado se le añadieron 10 volúmenes del buffer ChIP (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl, inhibidores de proteasas *Complete* (Roche) y 1 mM PMSF) y fue incubado con una mezcla de DNA de esperma de salmón/*protein A-agarose fast-flow* (Milipore) durante 2 horas. Las bolitas se eliminaron mediante centrifugación. Una fracción de 5% del sobrenadante se guardó como pre-inmunoprecipitado (input). El resto se incubó durante toda la noche con 10 µg anti-RNAPII (N20, Santa Cruz Biotechnology), anti-TCERG1 (Sanchez-Alvarez et al., 2006) o IgG no específico de conejo. Los complejos cromatina-anticuerpo se recogieron mediante incubación con DNA de esperma de salmón/*protein A-agarose fast-flow* y centrifugación. Las bolitas se lavaron en buffer de bajo y alto contenido en sal (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, and 150 mM NaCl) con 20 mM y 500 mM NaCl, respectivamente) y con buffer LiCl (0.25M LiCl, 1% NP-40, 1% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl pH 8.0) seguido de tres lavados con Tris-EDTA. La elución de los complejos se llevó a cabo con el buffer de elución 0.1% SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>). Se añadió NaCl a una concentración final de 0.2 M y se incubó a 65° de 4 a 6 horas para revertir el crosslinking. Las muestras fueron tratadas con RNase A y proteinase K y el DNA purificado mediante fenol-cloroformo. El input fue purificado de igual manera. El DNA se cuantificó mediante PCR cuantitativa usando *Perfecta SYBR green supermix para iQ* (Quanta Biosciences) en la estación *iCycler thermal cycler station* (Biorad) o bien utilizando *LightCycler Faststart DNA master<sup>plus</sup> SYBR Green I* (Roche) en la estación *LightCycler* (Roche). Se usaron los siguientes oligonucleótidos: LTR-fwd y LTR-rev para el LTR (*Long terminal repeat*) del VIH-2, CMV-fwd y CMV-rev para el promotor del CMV. Para el gen Bcl-x endógeno, P-fwd, P-rev, E2-fwd, E2-rev, D-fwd, and D-rev, I1-fwd, E2-rev, E2-fwd, I2-rev.

### **Transcripción *in vitro***

Los moldes para la transcripción de RNA fueron generados a partir de los plásmidos pS2 y pS2.13 cedidos por el laboratorio del Dr. Benoit Chabot, Universidad de Sherbrooke (Canadá) mediante corte con la enzima XbaI y purificados a partir del gel (Qiagen). La transcripción de aproximadamente 1 µg del molde se llevó a cabo con la enzima *T3 RNA Polymerase* (Promega) en presencia de un análogo de *cap* y  $\alpha$ -<sup>32</sup>UTP (Perkin Elmer Life Sciences) a 37°C durante 1 hora. El producto se purificó a partir de un gel de poliacrilamida al 4.5% en condiciones desnaturalizantes con una solución de acetato sódico 0.3M- SDS 0.1% y posterior extracción fenol-cloroformo. Los transcritos se resuspendieron a una concentración de 2 femtomoles/µl.

### **Inmunoprecipitación de RNA *in vitro***

Bolitas de *Sepharose-protein A* (CL4B; GE Healthcare) fueron incubadas en buffer NET2 durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas con 1 ul de anti-hnRNP K (cedido por el DR. Gideon Dreyfuss, Universidad de Pensilvania, USA), 4 µl de anti-TCERG1o 4 µl de de anti-IgG por cada 50 µl de 50% slurry e incubados durante 1 hora a 4°C. Tras tres lavados con buffer NET2 frío, los transcritos generados *in vitro* se incubaron el mezclas de splicing sin ATP por 30 minutos a 4°C de la manera descrita previamente (Nasim et al., 2002). Se cuantificó la radiactividad total como input y se volvió a medir tras cinco lavados con buffer NET2 frío.

### **Inmunoprecipitación de RNA *in vivo***

Células HEK 293T se utilizaron para investigar la asociación de TCERG1 con el RNA de Bcl-x. Las células fueron lavadas con PBS frío y fijadas con formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. El crooslinking se detuvo añadiendo 0.125 M de glicina durante 5 minutos. Las células se peletearon, se lavaron con PBS frío y se lisaron con 2 ml de RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% NP-40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.05% SDS, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl e inhibidores de proteasas [Complete; Roche]). Se sonicaron 3 veces durante 20 segundos en hielo y fueron centrifugadas a velocidad máxima durante 20 minutos. Los sobrenadantes se incubaron con protein A-agarose fast flow slurry (Millipore) y 100 µg/ml tRNA en rotación durante 2 horas a 4°C. Las bolitas se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se incubó con anti-TCERG1 e IgG no específico a 4° C en rotación toda la noche. Una

## ***Materiales y Métodos***

fracción del sobrenadante se conservó para extracción de RNA como input. Los complejos RNA-anticuerpo fueron recolectados mediante incubación con protein A-agarose fast flow slurry (Millipore) durante 2 horas a 4°C. Las bolitas habían sido previamente incubadas con RNase OUT (Invitrogen) 10 minutos a temperatura ambiente. Las bolitas se recogieron por centrifugación y fueron lavadas seis veces con buffer RIPA astringente (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 1 M urea, and 0.2 mM PMSF) rotando durante 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente. Las bolitas se resuspendieron en 100 µl de buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 5 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, and 1% SDS) e incubadas a 70°C durante 45 minutos y tratadas con proteinasa K (Ambion) 30 minutos a 45°C. El RNA se extrajo mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitado con etanol. El RNA se resuspendió en 12 µl de agua y fue tratado con DNaseI (Roche) a 37°C durante 30 minutos. Se retroranscribió usando random hexaoligonucleótidos. La PCR cuantitativa se llevó a cabo con los oligonucleótidos D-fwd, and D-rev.

### **Ensayos de procesividad de la RNAPII**

La tasa de elongación de la transcripción se midió según el protocolo descrito previamente (Singh and Padgett, 2009). Células HEK 293T a aproximadamente un 70-80 % de confluencia fueron transfectadas con 60 nM de siRNAs indicados. 48 horas después las células se trataron con DRB 100 µM en el medio durante 3 horas, tras lo que se lavaron con PBS1X para eliminar el DRB y se incubaron con medio fresco por los periodos de tiempo indicados en la figura 14. Como control se usaron células tratadas en las mismas condiciones con DMSO. Después de la incubación las células fueron lisadas y el RNA total se extrajo con Trizol según las indicaciones del fabricante. El cDNA se amplificó usando *Perfecta SYBR green supermix para iQ* (Quanta Biosciences) en la estación *iCycler thermal cycler station* (Biorad) con los oligonucleótidos D-fwd y D-rev. GAPDH que se usó como gen control para la normalización. Los Ct fueron calculados de la siguiente forma: como  $(E^{Bcl-x})^{\Delta CT(VIH-1)} / (E^{GAPDH})^{\Delta CT(GAPDH)}$ , donde  $E$  = eficiencia de la PCR y  $\Delta CT$  = CT del tratamiento con DMSO-CT del tratamiento con DRB. El resultado muestra la media de dos experimentos independientes.

### **Preparación de extractos celulares totales.**

Las células se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS frío. El pellet se lisó con tampón T7 frío (20 mM HEPES, pH 7.9, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM ditiotretitol, and 1 mM PMSF) en hielo durante 30 minutos. Se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante se utilizó como extracto total. La concentración de proteína total se midió por ensayo de Bradford (Biorad) a 595nm.

### **Análisis por Western Blot**

Las proteínas de los extractos fueron separadas en geles al 10% SDS-PAGE transferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) e incubadas con los anticuerpos específicos contra TCERG1 a dilución 1:2000 (Sanchez-Alvarez et al., 2006), CDK9 (Santa Cruz Biotechnology) a dilución 1:500 y anti-T7 (Bethyl) a 1:20000. Anticuerpos secundarios de conejo o ratón conjugado con peroxidasa (PerkinElmer Life Science) fueron utilizados a 1:5000 y su unión se detectó mediante quimiolumiscencia (PerkinElmer Life Science).

Para los *western blot* de los ensayos de apoptosis las proteínas se separaron mediante geles 12.5% SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE, Amersham). Se incubaron con anticuerpos específicos contra Caspasa-3 y Parp-1 (Santa Cruz Biotechnology) a dilución 1/500, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology) a dilución 1:250, TCERG1 a dilución 1:2000, β-actina (Sigma) a dilución 1/5000, CDK9 (Santa Cruz Biotechnology) a dilución 1:500. Anticuerpos secundarios de conejo o ratón conjugado con peroxidasa (PerkinElmer Life Science) fueron utilizados a 1:5000 y su unión se detectó mediante quimiolumiscencia (PerkinElmer Life Science).

### **Ciclo Celular**

Las células se recogieron en tubos de poliestireno para citómetro y se lavaron 2 veces con PBS 1x centrifugando a 1600 rpm. Se fijaron con etanol al 70% a 4° durante al menos 15 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron en PBS1x con RNasa a una concentración de 100 µg/ml y yoduro de propidio a 40 µg/ml. Tras una incubación a 37° durante 20 minutos se analizaron las muestras en el citómetro de flujo (FACScalibur). El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante el software FlowJo v.7.6.5.

### **Anexina V**

Para la tinción con Anexina V se utilizó un kit comercial de detección de apoptosis (Immunostep). Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se recogieron en tubos de poliestireno para citómetro, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm y se lavaron con PBS 1x. El pellet se resuspendió a  $1 \times 10^6$  cels/ml en buffer de unión. 100  $\mu$ l se incubaron con 5  $\mu$ l de anexina V en oscuridad a T<sup>a</sup> ambiente durante 15 minutos. Se añadieron otros 400  $\mu$ l de buffer de unión y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo (FACScalibur).

### **Medición de caspasas activas**

Para la medición de la caspasa 3 activa se utilizó el kit *Caspase-Glo 3/7 Assay* (Promega) y para la caspasa 8 el kit *Caspase-Glo 8 Assay* (Promega). 20  $\mu$ l de cultivo celular se mezclaron con 20  $\mu$ l del reactivo en placas de 96 pocillos blancas de fondo plano y tras incubar 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente en oscuridad se midió la quimioluminiscencia en el luminómetro (TECAN).

### **Viabilidad celular**

La viabilidad celular se midió utilizando el kit comercial *CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay* (Promega). 10  $\mu$ l de cultivo se mezclaron con 40  $\mu$ l del reactivo 1x. Tras incubar 10 min a T<sup>a</sup> ambiente en oscuridad, se midió la viabilidad celular por luminometría. Las medidas se normalizaron según la concentración total de proteína medida en 10  $\mu$ l de cultivo celular en un ensayo de Bradford.

### **Disipación del gradiente de potencial electroquímico de la mitocondria.**

Se midió el potencial electroquímico mediante el kit de tinción de mitocondria de SIGMA (Mitochondria Staining Kit) según las indicaciones de la casa de comercial. Brevemente,  $1.5 \times 10^6$  células Jurkat se incubaron con el colorante JC-1 (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*) durante 20 min a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> (5%). Después de lavar se resuspendieron en solución de tinción y se analizaron las muestras por citometría de flujo (FACScalibur).

### **Marcaje de citocromo C.**

Para el marcaje de citocromo C se utilizó el kit de *InnoCyte Flow Cytometric Cytochrome c Release Kit* (CALBIOCHEM) según las indicaciones de la casa comercial. Aproximadamente  $3 \times 10^6$  células Jurkat se permeabilizaron con 300  $\mu$ l de buffer de permeabilización 10 min en hielo y se fijaron a continuación con paraformaldehído al 4%. Tras 1h de bloqueo, se incubaron las células con anti-citocromo C y posteriormente con el anti-IgG FITC (*fluoresceine isothiocyanate*) para su detección por citometría de flujo.

### **Oligonucleótidos**

ChIP de las regiones promotoras de los minigenes reporteros:

Para HIV2-X2:

LTR-fwd, 5'-CTGCAGGTCGGAGTACTGTC-3'

LTR-rev, 5'-GGAACACCCAGGCTCTACCT-3'

Para CMV-X2:

CMV-fwd, 5'-CACCAAATCAACGGGACTT-3'

CMV-rev, 5'-TTCTGAAGCTCGAGACTGACC-3'

ChIP de la RNAPII y TCERG1 a lo largo de Bcl-x:

Región promotora:

P-fwd, 5'-GGACGGATGAAATAGGCTGA-3'

P-rev, 5'-GAAGAGACAGGGGAACCTTGC-3'

Exón 2, region SB1:

E2-fwd, 5'-CCCAGAAAGGATACAGCTGG-3';

E2-rev, 5'-GCGATCCGACTCACCAATAC-3';

Unión intrón1- exón2

I1-fwd, 5'-CACTGGTGCTTTCGATTTGA-3'

E2-rev, 5'-CCAAAACACCTGCTCACTCA-3'

Unión exón 2-intrón2'

E2-fwd, 5'-CAGCTTGGATGGCCACTTAC-3'

I2-rev, 5'-TCTCCAACAATCACCCAACA-3'

Región distal, intrón2-exón3.

D-fwd, 5'-TGGAGGGTCAAGAAAGAGGA-3';

D-rev, 5'-TGCTGCATTGTTCCCATAGA-3';

## ***Materiales y Métodos***

### Retro-transcripción del RNA:

#### HIV2-CMV

RT-Sveda, 5'-GGGAAGCTAGAGTAAGTAG-3';

#### CMV-X2

RT3, 5'-GAAGGCACAGTCGAGGCTG-3';

### PCR convencional:

#### Bcl-x endógeno

X3, 5'-ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG-3';

X2, 5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGA-3';

#### Fas endógeno

FendF, 5'-GCACCAAATGTGAACATGG-3'

FendR, 5'-CCATTCTTTTCGAACAAAGCC-3'

#### HIV-X2:

X34, 5'-AGGGAGGCAGGCGACGGCGACGAGTTT-3';

XAgeIR, 5'-GTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTTCGAT-3';

### PCR cuantitativa:

#### Región SB1 por delante de la región 23

SB1-fwd, 5'-GCTGGTGGTTGACTTTCTCTC-3';

SB1-rev, 5'-GGTCTCCATCTCCGATTCAG-3'

#### Fas endógeno, isoforma 5-6-7

FE6, 5'-TAACTTGGGGTGGCTTTGTC-3'

FE7, 5'-TCCTTTCTGTGCTTTCTGCAT-3'

#### Normalización:

GAPDHfwd, 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3';

GAPDH rev, 5'-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3'

#### Control de transfección:

hGH-fwd, 5'-CAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCT-3';

hGH-rev, 5'-TCTTCCAGCCTCCCATCAGCGTTTGG-3';

### Clonaje del cDNA de Bcl-x<sub>s</sub>

BclEcoRI-F, 5'-GGGGAATTCTCATTTCGACTGAAG-3'

BclXbaI-R, 5'-GGGTCTAGAATGTCTCAGAGCAAC-3'

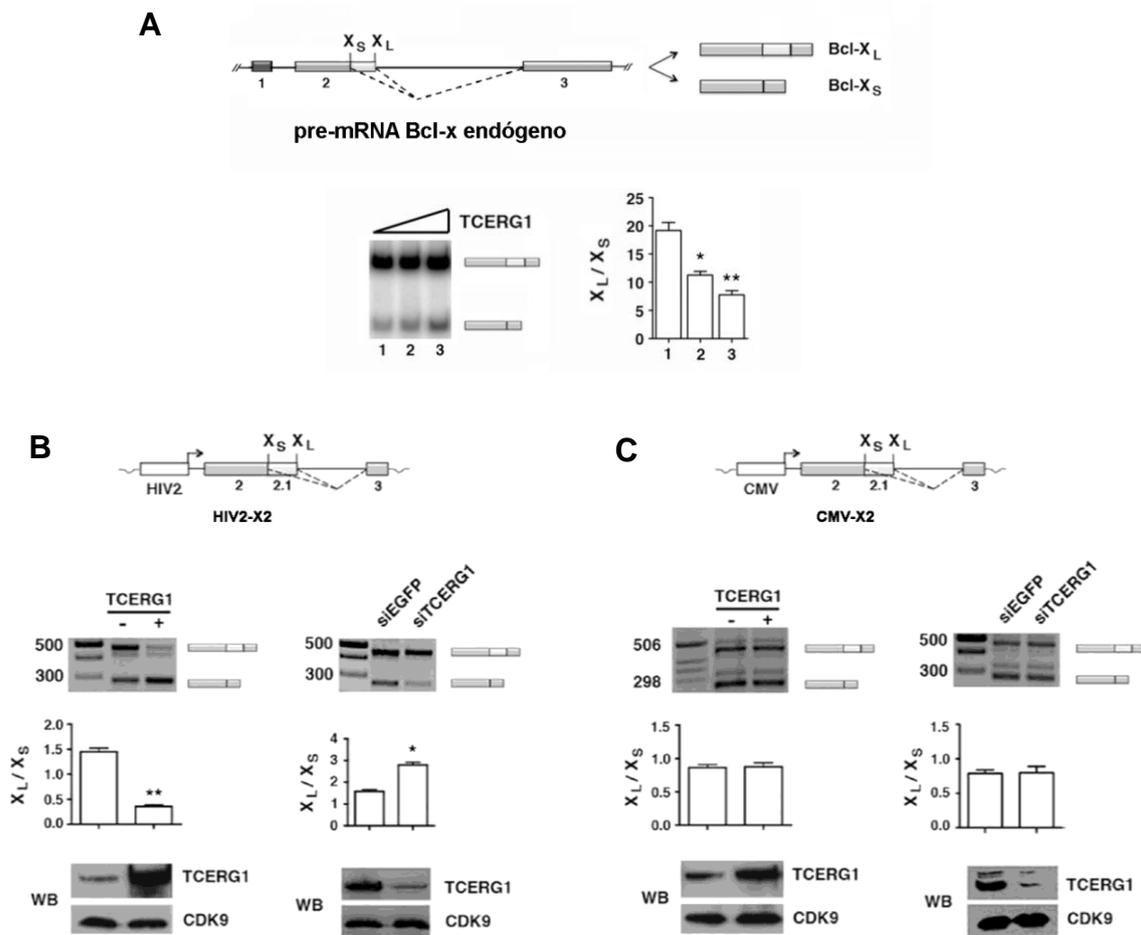
## ***RESULTADOS***

## 1-EFECTO DE TCERG1 SOBRE EL *SPLICING* ALTERNATIVO DEL GEN APOPTÓTICO *BCL-X*.

### 1.1 TCERG1 promueve el *splicing* de la isoforma corta de *Bcl-x* de manera dependiente del promotor.

TCERG1 ha sido implicado previamente en el proceso de apoptosis (Wang et al., 2000; Smith et al., 2004). Por esa razón analizamos el efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo *in vivo* de varios genes apoptóticos. Entre ellos, analizamos el papel de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x*. Como se ha descrito anteriormente (Introducción, apartado 5) el pre-mRNA del gen *Bcl-x* puede utilizar dos 5'ss alternativos. El uso del 5'ss situado corriente abajo genera una isoforma larga anti-apoptótica (*Bcl-x<sub>L</sub>*) mientras que el uso del 5'ss situado corriente arriba da lugar a una forma corta pro-apoptótica (*Bcl-x<sub>S</sub>*) (Figura R1A, panel superior) (Boise et al., 1993). En células HEK293T, la expresión endógena del gen *Bcl-x* produce predominantemente la isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>* (Figura R1A, panel inferior) (Garneau et al., 2005). La sobre-expresión de TCERG1 mediante transfección transitoria de un plásmido de expresión de TCERG1 favoreció el aumento de la isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* (Figura R1A, panel inferior). Debido a los elevados niveles de isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>* en situación control, el silenciamiento de TCERG1 mediante RNAs de interferencia no alteró notablemente los patrones de *splicing* (datos no mostrados). Para analizar más en detalle el mecanismo molecular que regula el efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* utilizamos minigenes reporteros. Ante la posibilidad de que TCERG1 esté regulando el *splicing* modificando la elongación transcripcional empleamos dos minigenes reporteros que contenían diferentes promotores, el del HIV-2 (HIV2-X2) y el del citomegalovirus (CMV-X2). Ambos reporteros, aunque no mimetizan exactamente el patrón de *splicing* endógeno del *Bcl-x*, han sido muy útiles para caracterizar su regulación (Garneau et al., 2005). Se extrajo el RNA total de células transfectadas con el minigen reportero HIV2-X2 o CMV-X2 junto con un vector vacío o un vector de expresión de TCERG1 y mediante RT-PCR analizamos el patrón de *splicing* generado en cada una de las condiciones. En el caso del HIV2-X2, la sobre-expresión de TCERG1 favoreció el uso del 5'ss para favorecer la producción de la isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* (Figura R1B), mientras que no se observó ningún efecto sobre el CMV-X2 (Figura R1C). El silenciamiento de TCERG1 mediante siRNAs produjo el efecto contrario a la sobre-expresión en el caso del HIV-X2 disminuyendo la isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>*, mientras que no tuvo efecto sobre el minigen con el promotor CMV (Figuras 1B y C).

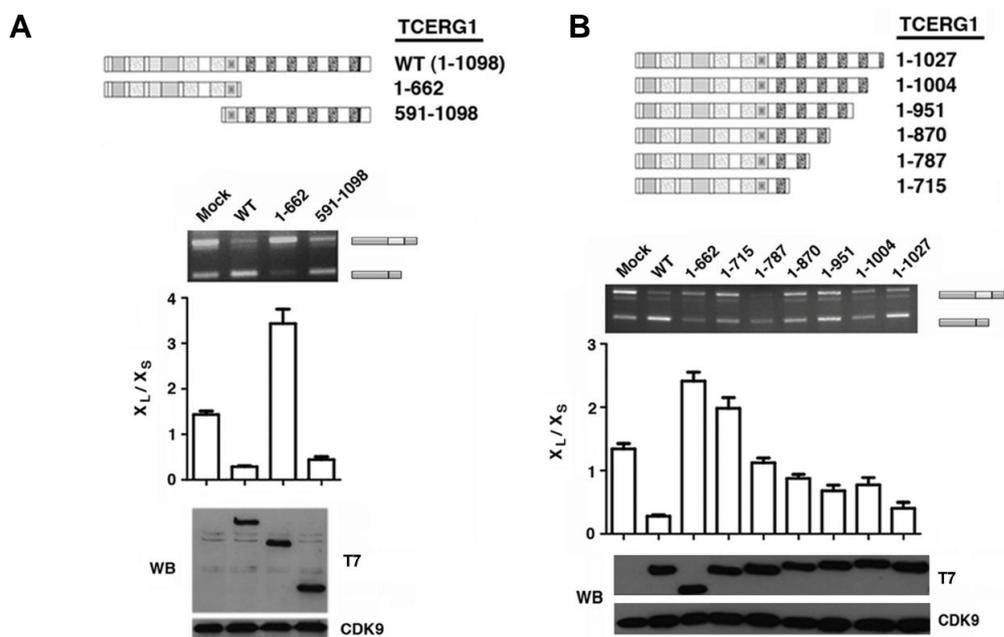
## Resultados



**Figura R1. TCERG1 favorece la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> del gen apoptótico Bcl-x de manera dependiente del promotor.** A. Panel superior, esquema del gen *Bcl-x* con exones (cajas) e intrones (líneas). Se indican los 5' ss alternativos X<sub>L</sub> y X<sub>S</sub> y las dos isoformas que se generan Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub> mediante los dos eventos de *splicing* alternativo (línea punteada). Panel inferior, gel de poliacrilamida al 4% que muestra los productos de *splicing* generados mediante RT-PCR radioactiva a partir de células HEK293T transfectadas con un vector vacío (carril 1) o con concentraciones crecientes de un vector de expresión de TCERG1 (carriles 2 y 3). La gráfica representa el ratio de las isoformas X<sub>L</sub>/X<sub>S</sub> medido por densitometría de tres experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . B y C. Efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de TCERG1 sobre el *splicing* de los minigenes de Bcl-x con el promotor HIV-2 (B) y CMV (C). Se muestran los esquemas de las construcciones en la parte superior. Los paneles corresponden a gels de agarosa al 2% donde se resuelven los productos de *splicing* generados mediante RT-PCR de células HEK293T transfectadas con el minigen correspondiente (HIV2-X2/CMV) junto con un vector vacío (-) o con un vector de expresión de TCERG1 (+); o bien con siRNAs control (siEGFP) o específico (siTCERG1). Las gráficas representan los análisis de densitometría como el ratio X<sub>L</sub>/X<sub>S</sub> de cuatro experimentos diferentes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . Una fracción de los lisados celulares se analizó por *western blot* para la detección de TCERG1 y CDK9.

## 1.2 La región carboxi-terminal de TCERG1 es necesaria para promover la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>.

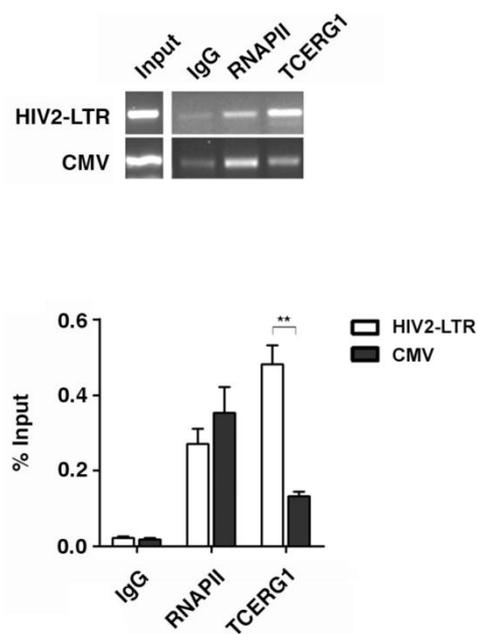
TCERG1 tiene 3 dominios WW en su mitad amino-terminal y 6 dominios FF en su región carboxi-terminal. Esos dominios son necesarios para la asociación de TCERG1 con múltiples componentes de las maquinarias de transcripción y splicing (Introducción, apartado 3). Para determinar la importancia de esos dominios en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* de Bcl-x utilizamos una construcción que abarca la parte amino-terminal y contiene los dominios WW (aminoácidos 1 al 662) y otra que abarca la porción carboxi-terminal con los dominios FF (aminoácido 591 al 1098). Ambas construcciones mantienen la señal de localización nuclear (Figura R2A). Mediante transfecciones transitorias del minigen reportero de *splicing* HIV2-X2 junto con cada uno de los mutantes deletionados y por análisis de RT-PCR, observamos que es la parte carboxi-terminal la que confiere el efecto de la proteína de promover la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>, mientras que el extremo amino-terminal no es capaz de inducir esta isoforma, e incluso la disminuye (Figura R2A). Un análisis más exhaustivo de la región carboxi-terminal, utilizando una serie de mutantes con deletiones seriadas de los dominios FF, demostraron que todos los dominios son necesarios para el efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo de Bcl-x (Figura R2B).



**Figura R2 (página anterior). La región carboxi-terminal de TCERG1 es la necesaria para el efecto sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.** A. Esquema de las construcciones utilizadas en el ensayo. Panel del análisis mediante RT-PCR resuelto en gel de agarosa al 2% de las isoformas de *splicing* del gen *Bcl-x* obtenidas tras la transfección transitoria del minigen reportero HIV2-X2 y las construcciones de TCERG1 indicadas. La gráfica representa el ratio  $X_L/X_S$  medido por densitometría de tres experimentos independientes. B. Esquema de las construcciones con las deleciones consecutivas utilizadas. Panel del resultado obtenido mediante RT-PCR y analizado en gel de agarosa. La gráfica representa el ratio  $X_L/X_S$  medido por densitometría de tres experimentos independientes. Una fracción del lisado celular se analizó mediante *western blot* para la detección de TCERG1, usando anticuerpos específicos para el epítipo T7, y CDK9 (panel inferior en A y B).

### 1.3 TCERG1 se une con mayor afinidad al promotor del HIV-2.

Las diferencias observadas en los diferentes promotores nos llevaron a analizar la unión de TCERG1 en la región promotora de cada minigen mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con extractos totales de células HEK293T transfectadas con el minigen HIV2-X2 o CMV-X2. Estos experimentos demostraron que TCERG1 se une preferentemente al promotor del HIV-2 (Figura R3) sugiriendo que se forman complejos diferentes en cada uno de los promotores para regular el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.



### Figura R3. TCERG1 se une preferencialmente al promotor del HIV-2.

Análisis por ChIP de la unión de TCERG1 a los promotores del HIV-2 y CMV en células HEK293T transfectadas con el minigen HIV2-X2 o CMV-X2. El panel superior muestra el gel de agarosa al 2% de los productos generados por PCR usando oligonucleótidos que amplifican la región promotora (ver Materiales y Métodos) del DNA inmunoprecipitado con anticuerpos específicos para IgG (control), RNAPII y TCERG1. El carril del *input* muestra la señal de la cromatina antes de la inmunoprecipitación. La gráfica representa el porcentaje del *input* inmunoprecipitado con cada anticuerpo en cada una de las muestras.

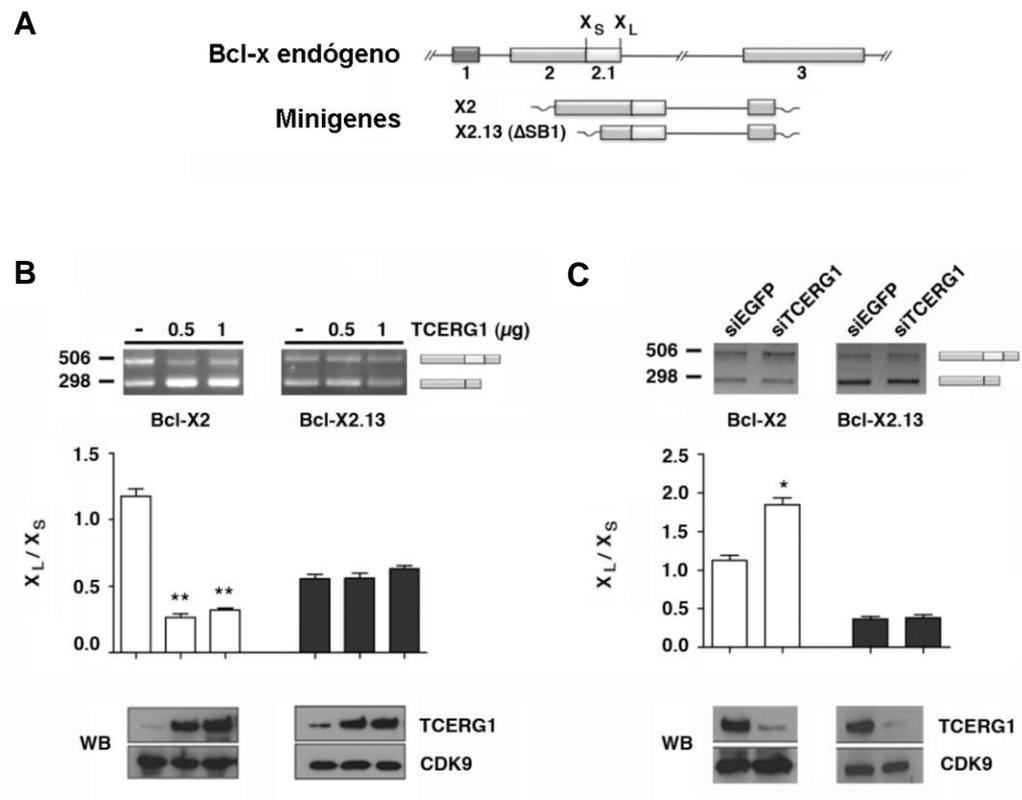
## **2- MECANISMO MOLECULAR POR EL CUAL TCERG1 REGULA EL *SPLICING* ALTERNATIVO DE *BCL-X*.**

### **2.1. Análisis de secuencias necesarias para el efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.**

#### **TCERG1 favorece el uso del 5'ss a través del elemento regulador SB1 del exón 2.**

Para analizar el mecanismo molecular por el que TCERG1 regula el *splicing* alternativo de *Bcl-x* comenzamos por determinar qué región en el RNA era necesaria para mediar su efecto. SB1 es una región de 361 nucleótidos localizada en el exón 2 que se ha descrito previamente como un importante elemento regulador en *cis* (Revil et al., 2007). Por ello, quisimos investigar la importancia del elemento SB1 en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x*. Para ello empleamos el minigen reportero HIV2-X2 al que se le había delecionado los 361 nucleótidos correspondientes a la región SB1 (HIV-X2.13,  $\Delta$ SB1) (Figura R4A). Se compararon los ratios de las diferentes isoformas generadas por *splicing* ( $x_L/x_S$ ) de los minigenes HIV2-X2 Y HIV2-X2.13 a partir de células HEK293T transfectadas con cada uno de los minigenes junto con un vector vacío o cantidades crecientes de un vector para la sobre-expresión de TCERG1. De acuerdo con lo publicado en otros trabajos, los transcritos generados desde el reportero X2 favorecen la isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>* de manera más eficiente que los generados a partir de X2.13 (Figura R4B y C), consistente con los datos que indican que el elemento SB1 es necesario para la inhibición del uso del sitio de *splicing*  $X_S$  (Revil et al., 2007). Reproduciendo nuestros resultados obtenidos previamente, la sobre-expresión de TCERG1 produjo un aumento de la isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* en transcritos derivados del minigen X2, mientras que no se observó ninguna alteración en el patrón de *splicing* generado a partir del X2.13 (Figura R4B). Tras el silenciamiento de TCERG1 con siRNAs específicos, el ratio se alteró hacia la mayor producción de la isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>* en transcritos generados de X2 mientras que no se observó ningún efecto en el ratio de las isoformas generadas desde X2.13 (Figura R4C). Estos resultados sugieren que TCERG1 favorece el uso del sitio de *splicing*  $X_S$  de manera dependiente del elemento regulador SB1.

## Resultados

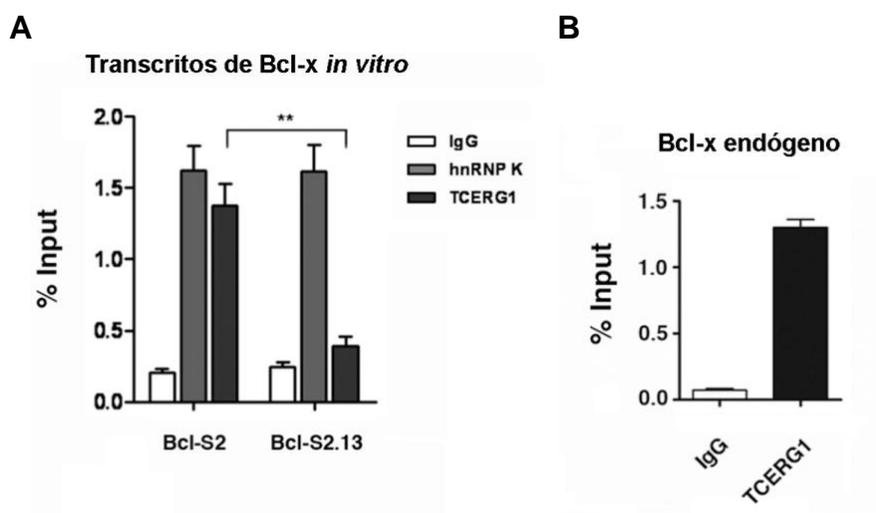


**Figura R4. El efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de Bcl-x depende del elemento regulador SB1.** A. Esquema de la estructura de los minigenes utilizados en el ensayo X2 y X2.13 ( $\Delta$ SB1). B y C. Efecto de la sobre-expresión (B) y silenciamiento (C) de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de los minigenes de Bcl-x. El resultado de ensayos de RT-PCR de células HEK293T transfectadas con el minigen X2 o X2.13 junto con un vector vacío (-), con cantidades crecientes de un vector de expresión de TCERG1 (B), o bien con siRNAs control (siEGFP) o específicos (siTCERG1) (C) se visualiza en geles de agarosa al 2%. Las gráficas representan el ratio  $X_L/X_S$  medido por densitometría de tres experimentos diferentes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . Una fracción de los lisados celulares se analizó por *western blot* para la detección de TCERG1 y CDK9 y se muestra en la parte inferior de los paneles.

### TCERG1 se asocia al RNA de Bcl-x a través del elemento regulador SB1.

Para analizar la interacción de TCERG1 con el RNA llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de RNA usando los plásmidos S2 y S2.13 como moldes para la transcripción *in vitro*. El plásmido S2 genera un transcrito con la secuencia del RNA de Bcl-x mientras que el S2.13 genera un transcrito que carece de la región reguladora SB1 (ver Materiales y Métodos). Los transcritos marcados radiactivamente fueron incubados con extractos nucleares de células HeLa en condiciones de *splicing in vitro*. La

inmunoprecipitación se llevo a cabo con anticuerpos específicos para TCERG1, IgG como control negativo y hnRNP K como control positivo. La unión de hnRNP K a los transcritos S2 y S2.13 transcrito ha sido previamente descrita (Revil et al., 2009). Tras lavar el exceso de transcrito marcado se midió la radiactividad remanente unida a cada anticuerpo y se observó que TCERG1 se asocia al transcrito S2 pero no al transcrito S2.13 (Figura R5A), que es consistente con los datos de TCERG1 sobre el *splicing* de Bcl-x *in vivo*. Para apoyar más nuestros resultados llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación del RNA del gen *Bcl-x* endógeno incubando extractos celulares fijados previamente con formaldehído con anticuerpos específicos para IgG (control) y TCERG1. Mediante RT-PCR cuantitativa comprobamos que TCERG1 se asocia específicamente con los transcritos endógenos de *Bcl-x* (Figura R5B).



**Figura R5. TCERG1 se asocia al pre-mRNA de Bcl-x de manera dependiente del elemento regulador SB1.** Análisis por inmunoprecipitación de RNA de la unión de TCERG1 al RNA de Bcl-x. A. Extractos nucleares de células HeLa se incubaron con transcritos generados *in vitro* a partir de los plásmidos Bcl-S2, con la región SB1 intacta, o Bcl-S2.13, con la región SB1 delecionada, y se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos para IgG, TCERG1 y hnRNP K. Tras los lavados se cuantificó la cantidad de RNA unido a cada una de las proteínas mediante un contador de centelleo y se representó como porcentaje de RNA unido respecto a la cantidad de transcrito antes de la inmunoprecipitación (*input*). \*\*,  $p < 0.01$ . B. Inmunoprecipitación del pre-mRNA endógeno del gen *Bcl-x* a partir de extractos de células HEK293T usando anticuerpos específicos para IgG y TCERG1. Los transcritos unidos se detectaron tras revertir la unión, precipitar el RNA y amplificarlo mediante RT-PCR cuantitativa. Se representa como porcentaje de RNA unido respecto al input.

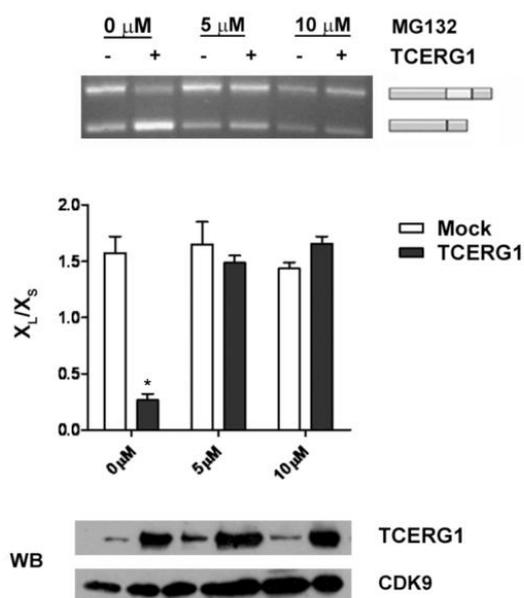
### **El efecto de TCERG1 depende de la región 23 dentro del elemento regulador SB1.**

Para analizar más en detalle el elemento regulador SB1, utilizamos una serie de construcciones de *Bcl-x* que contenían deleciones de 10 nucleótidos a lo largo de la secuencia de SB1 (Figura R6A). Mediante RT-PCR de RNA extraído de células HEK293T transfectadas con estas construcciones junto con un plásmido vacío o de expresión de TCERG1 analizamos los productos de *splicing* generados en cada una de las condiciones. El mayor cambio se observó al deleccionar la región 23 de SB1 ( $\Delta 23$ ), donde se obtuvo predominantemente la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> (Figura R6B). Este resultado indica que esta región es importante para generar la isoforma Bcl-x<sub>L</sub> o para inhibir el uso del sitio de *splicing* X<sub>S</sub> que genera la isoforma corta. Dado que la isoforma casi exclusiva fue Bcl-x<sub>S</sub>, la sobre-expresión de TCERG1 no tuvo efecto sobre esta construcción (Figura R6B), mientras que alteró el patrón del *splicing* alternativo de los demás minigenes de deleción, exceptuando el que portaba una deleción completa del elemento SB1 (X2.13) (Figura R6B). Al analizar el efecto del silenciamiento de TCERG1 mediante siRNAs observamos que se revierte el patrón de *splicing* con el minigen X2 así como el deleccionado de la región 17 ( $\Delta 17$ ), mientras que el efecto es débil sobre el minigen que carece de la región 23 ( $\Delta 23$ ) indicando, de nuevo, que las secuencias eliminadas en este mutante son necesarias para el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x* (Figura R6C). Experimentos de inmunoprecipitación de los transcritos sintetizado *in vitro*, revelaron que la unión de TCERG1 a transcritos que carecen de la región 23 es significativamente menor que la unión de TCERG1 a transcritos con una deleción diferente en otra región del elemento SB1 (Figura R6D). En conjunto, estos resultados sugieren que TCERG1 afecta el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* a través de la región 23 del elemento regulador SB1.



## Resultados

Como se ha mencionado anteriormente (Introducción, apartado 5.3), se ha sugerido la presencia de un represor que se une al elemento regulador SB1. En el modelo propuesto por Shkreta *et al.* un balance entre la síntesis proteica y la degradación mediada por el proteosoma controla los niveles de este represor (Shkreta et al., 2010). Bloqueando la degradación de proteínas mediante inhibidores del proteosoma como MG132 o bortezomib, que por sí solos no alteran el *splicing* alternativo de *Bcl-x*, favorece la acumulación del represor e inhibe la producción de *Bcl-x<sub>S</sub>* (Shkreta et al., 2010). Con el fin de analizar el posible papel de dicho represor en el mecanismo de acción de TCERG1 se realizaron experimentos con inhibidores del proteosoma. El tratamiento con MG132 (Figura R7) o con bortezomib (datos no mostrados) inhibió el aumento de la isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* inducida por la sobre-expresión de TCERG1. Este efecto no fue consecuencia de una expresión inadecuada de TCERG1 ya que la cantidad de proteína analizada por *western blot* era equivalente con o sin el tratamiento (Figura R7). Estos resultados están de acuerdo con la existencia de un represor que se une al elemento SB1 para inhibir el sitio de *splicing* *X<sub>S</sub>*.



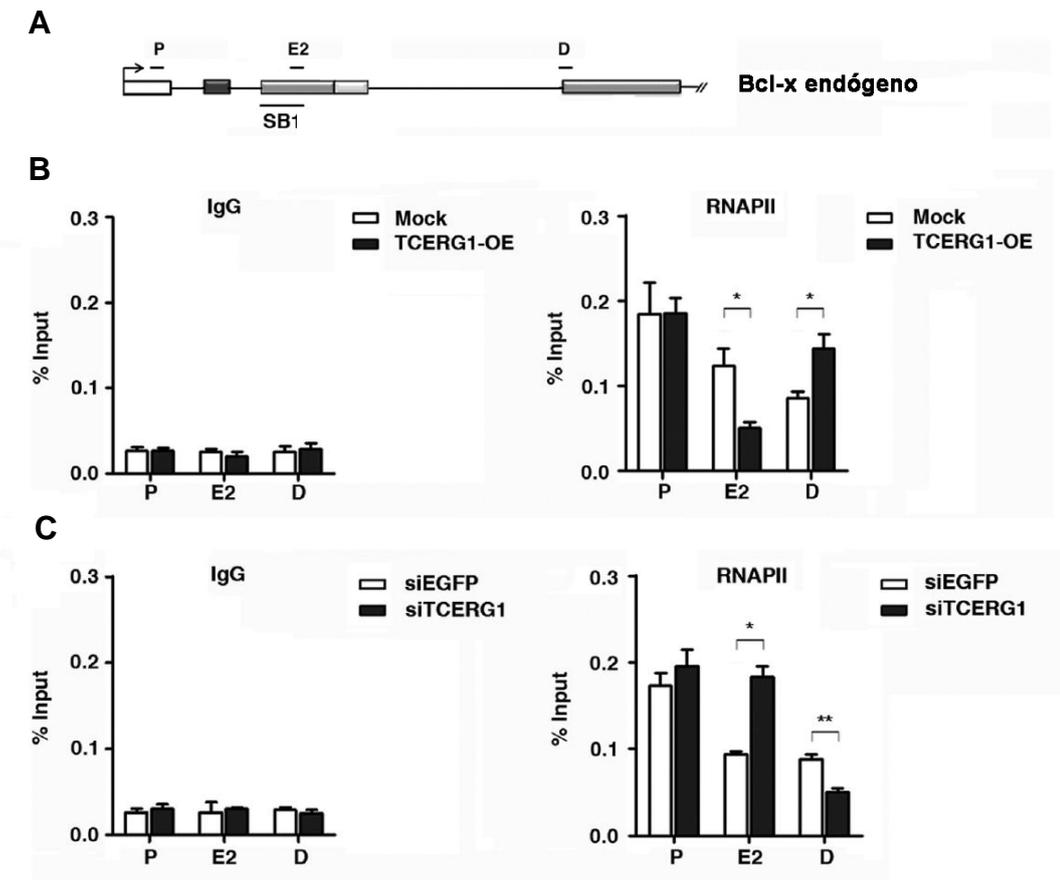
**Figura R7. La inhibición del proteosoma neutraliza el efecto de la sobre-expresión de TCERG1 en el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.** Resultado del análisis por RT-CR del *splicing* alternativo de *Bcl-x* obtenido a partir de células tratadas con 5 μM o 10 μM de MG132 durante 3h y transfectadas posteriormente con el minigen HIV2-X2 junto con un vector vacío (-) o un vector de sobre-expresión de TCERG1(+). La gráfica muestra el ratio de isoformas *X<sub>L</sub>*/*X<sub>S</sub>* medido por densitometría de tres experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$ . Una fracción del lisado se analizó por *western blot* para la detección de TCERG1 y CDK9 (panel inferior).

### **2.2. Estudio de la influencia de la elongación transcripcional en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.**

#### **TCERG1 modula la distribución de la RNAPII en el exón 2 de *Bcl-x*.**

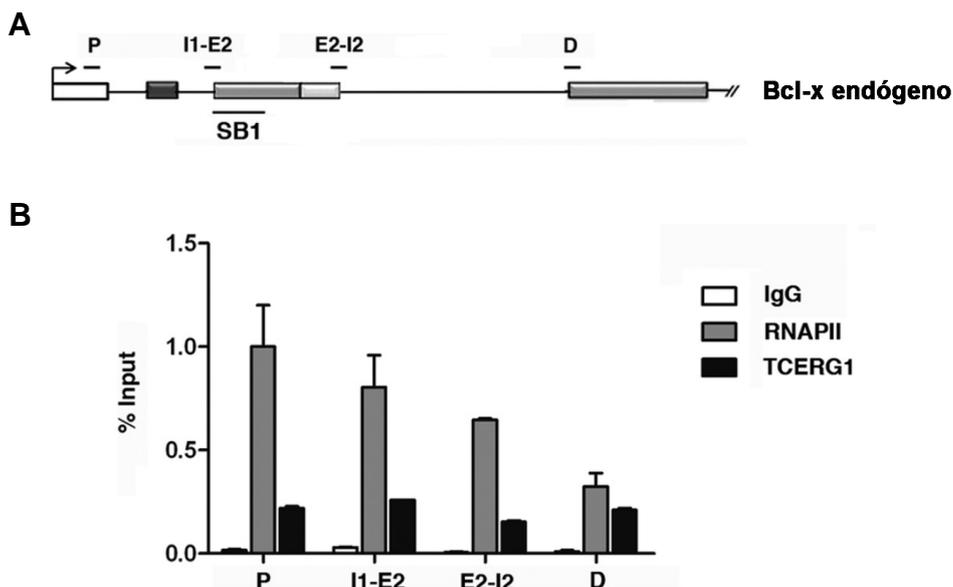
La secuencia del elemento regulador SB1 reveló un alto contenido en GC en la región 23 (Figura R6). Las secuencias ricas en GC pueden potencialmente formar estructuras de tallo-lazo o estabilizar nucleosomas que atenúen la elongación transcripcional de la RNAPII (Resnekov et al., 1989; Hendrix et al., 2008). Por tanto, un alto contenido en GC dificultaría la transcripción de la RNAPII *in vivo* (Chavez et al., 2001; Tous et al., 2011). Quisimos analizar la densidad de la RNAPII en la región del exón 2 de *Bcl-x* que interviene en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo del gen. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina de células HEK293T transfectadas con un vector vacío o con un vector de expresión de TCERG1 con anticuerpos específicos para la RNAPII. Observamos una alta densidad del enzima en la región promotora (P), así como en la región del exón 2 (E2) correspondiente al elemento SB1 (Figura R8B). Mientras la sobre-expresión de TCERG1 no altera la distribución de la RNAPII en la región promotora, previene su acumulación en la zona del exón 2 analizada. Se observó además una mayor densidad de moléculas de RNAPII en las regiones distales (D) (Figura R8B). De acuerdo a estos resultados, observamos una mayor acumulación de moléculas de RNAPII en la región del exón 2 analizada y una menor densidad del enzima en zonas distales cuando la expresión de TCERG1 se inhibió mediante siRNAs específicos (Figura R8C).

## Resultados



**Figura R8. TCERG1 modula la distribución de la RNAPII en el gen *Bcl-x*.** A. Esquema del gen *Bcl-x* endógeno. Se indica la posición de los cebadores utilizados en el ensayo. P, región promotora; E2, exón 2, dentro del elemento SB1; D, región distal, unión intrón 2/exón3. B. La distribución de la RNAPII en las diferentes posiciones del gen se detectó mediante ChIP seguido por PCR cuantitativa de células transfectadas con un vector vacío (mock) o un vector de expresión de TCERG1 (TCERG1-OE). C. El mismo experimento descrito en B se llevó a cabo en células silenciadas con un siRNA control (siEGFP) o específico (siTCERG1). Las gráficas representan el porcentaje de la unión de la RNAPII respecto al *input* de cuatro experimentos independientes. IgG se utilizó como control negativo. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Con el fin de conocer la distribución de TCERG1 a lo largo del gen *Bcl-x*, realizamos experimentos de ChIP y PCR cuantitativa utilizando cebadores localizados en la región promotora (P), en las uniones intrón-exón (I2-E2 y E2-I2) y en la región distal (D). El análisis de esos experimentos permitió conocer que TCERG1 se une a cada una de estas regiones de manera similar (Figura R9).

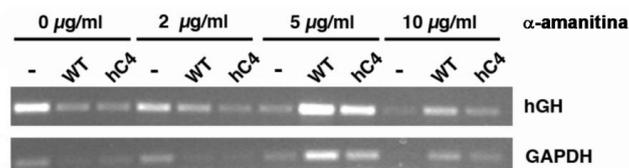


**Figura R9. Distribución de TCERG1 en el gen *Bcl-x*.** A. Esquema del gen *Bcl-x* endógeno. Se indican la posición de los cebadores utilizados en el ensayo. P, región promotora; I1-E2, unión intrón1-exón 2; E2-I2, unión exón 2–intrón 1; D, región distal, unión intrón 2-exón 3. B. Distribución de TCERG1 y de la RNAPII en las diferentes posiciones del gen detectada mediante ChIP y PCR cuantitativa. En la gráfica se representa el porcentaje de la unión de la RNAPII y de TCERG1 respecto al *input* de dos experimentos independientes.

### TCERG1 modifica el efecto de una polimerasa lenta en el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.

Estudios previos han demostrado que la tasa de elongación de la RNAPII afecta el *splicing* alternativo (de la Mata et al., 2003). En esos estudios se utilizó por vez primera una forma mutada de la RNAPII (hC4, que tiene una sustitución G-A que cambia el residuo conservado de arginina en posición 741 a histidina en la subunidad mayor del enzima) que tiene una tasa intrínseca de elongación menor (Coulter and Greenleaf, 1985; Chen et al., 1996). Para investigar el efecto de la elongación en el *splicing* alternativo de *Bcl-x* llevamos a cabo ensayos de *splicing* en células HEK293T transfectadas transitoriamente con el minigen reportero de *Bcl-x* (HIV2-X2 o CMV-X2) junto con vectores de expresión de una versión *wild type* (WT) y el mutante hC4 de la RNAPII con resistencia a  $\alpha$ -amanitina. Tras el tratamiento con  $\alpha$ -amanitina, la mayor parte de la RNAPII endógena queda inhibida y los transcritos son sintetizados por las polimerasas exógenas (Gerber et al., 1995) (Figura R10).

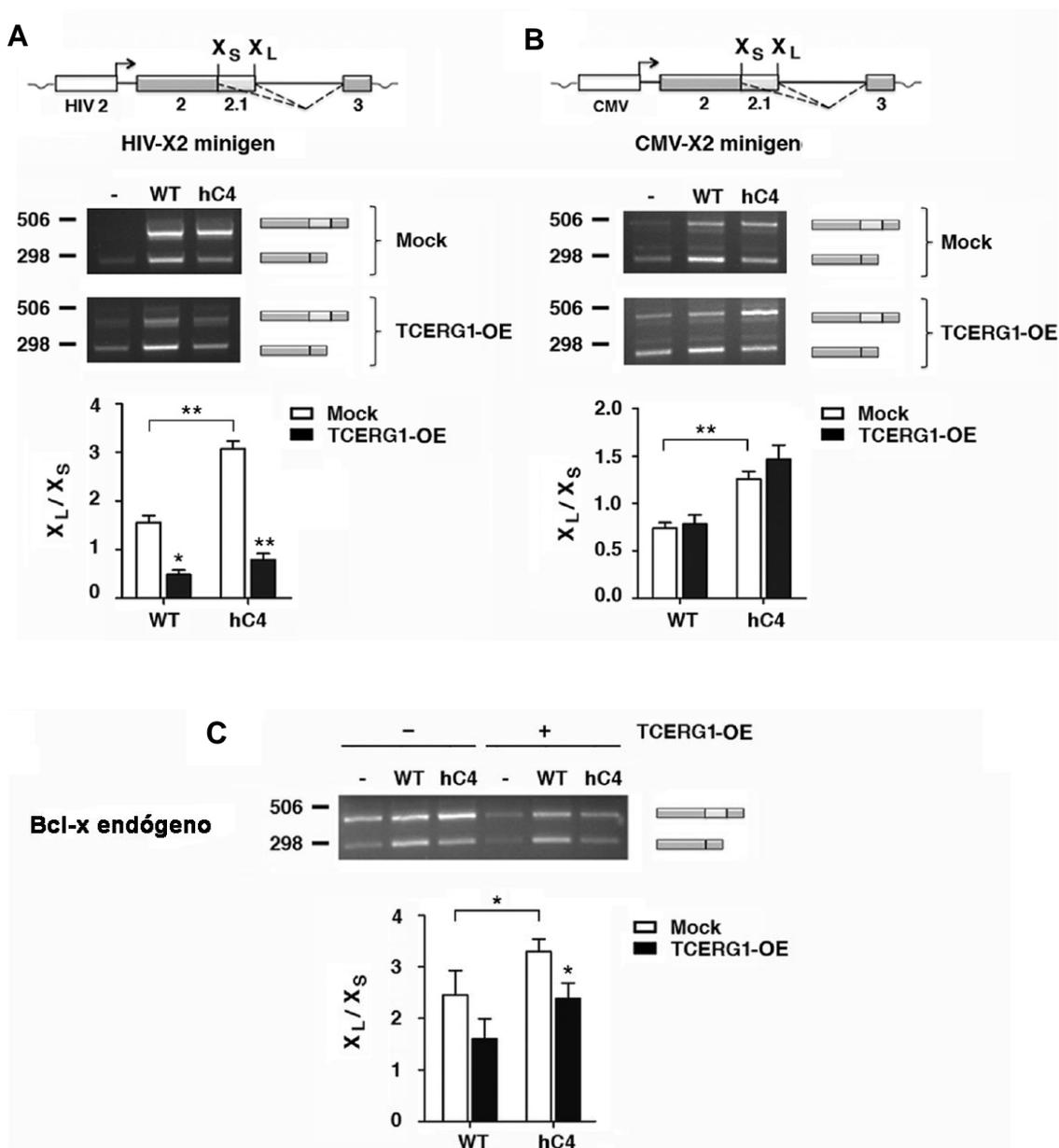
## Resultados



**Figura R10 (página anterior). Síntesis de RNA en presencia de  $\alpha$ -amanitina.**

Resultado de la RT-PCR llevada a cabo tras la extracción del RNA de células HEK293T transfectadas con un plásmido de expresión de la hormona de crecimiento humana hGH junto con un vector vacío (-) o vectores que codifican por polimerasas resistentes a  $\alpha$ -amanitina (WT y hC4). Se detectó la expresión de hGH transfectado y de GAPDH endógeno tras el tratamiento durante 18 horas con las concentraciones indicadas de  $\alpha$ -amanitina.

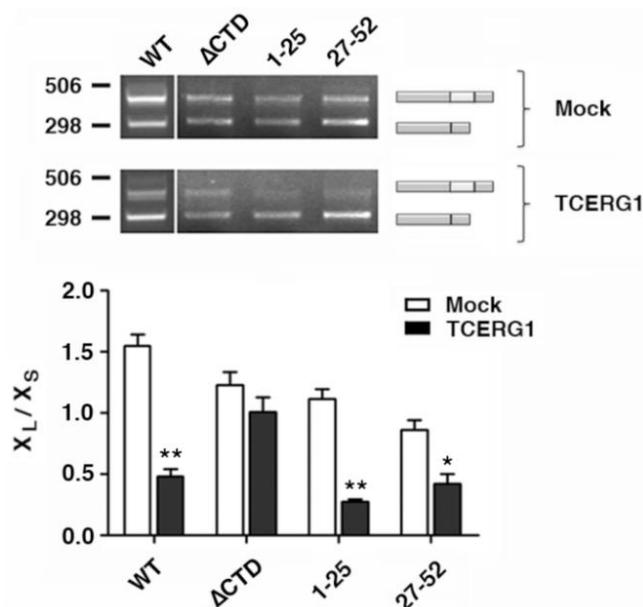
Observamos que la polimerasa lenta hC4 favorecía la aparición de la isoforma Bcl-x<sub>L</sub> en transcritos derivados de ambos minigenes, incrementando por tanto el uso del 5'ss situado corriente abajo (Figura R11). Notablemente, la sobre-expresión de TCERG1 resultó en un cambio hacia la producción de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> cuando la transcripción dependía del promotor del HIV-2 (Figura R11A) pero no cuando dependía del promotor del CMV (Figura R11B). Los efectos de estas polimerasas mutantes y de la sobre-expresión de TCERG1 se reprodujeron para el gen endógeno (Figura R11C). Estos resultados apoyan el papel de TCERG1 en la regulación transcripcional del *splicing* alternativo de *Bcl-x*.



**Figura R11.** Una polimerasa lenta favorece el uso del sitio de *splicing*  $X_L$  y la sobre-expresión de TCERG1 promueve la activación del sitio de *splicing*  $X_S$ . A. Análisis del patrón de *splicing* alternativo generado mediante RT-PCR de células transfectadas transitoriamente con el minigen HIV2-X2 (esquema en la parte superior) junto con un vector vacío (-) o plásmidos de expresión de las polimerasas resistentes a  $\alpha$ -amanitina *wild type* (WT) o lenta (hC4). Además también se transfectó un vector vacío (mock) o de expresión de TCERG1 (TCERG1-OE). 24 horas tras la transfección las células fueron tratadas con  $\alpha$ -amanitina durante 16 horas. Los datos se representan como ratio de isoformas  $X_L/X_S$  de tres experimentos independientes. B. El mismo experimento que el descrito en A se llevó a cabo con el minigen CMV-X2 (esquema en la parte superior). Se representan los datos de tres experimentos independientes. C. El mismo experimento descrito en A y B se llevó a cabo en ausencia de minigenes reporteros con el fin de analizar los transcritos del gen endógeno. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

### **El efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo de Bcl-x depende del CTD pero no de su composición peptídica.**

El CTD de la subunidad mayor de la RNAPII tiene un papel importante en el acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* (McCracken et al., 1997). Por ejemplo, se ha descrito que la proteína SRp20 requiere el CTD para inhibir la inclusión del exón EDI del gen de la fibronectina (de la Mata and Kornblihtt, 2006). Dado que TCERG1 interacciona con el CTD hiperfosforilado (Carty et al., 2000) y nuestros resultados previos apuntan a una relación entre la regulación de la transcripción y el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x*, decidimos investigar el papel del CTD de la RNAPII en la regulación del *splicing* alternativo de *Bcl-x* mediada por TCERG1. El CTD es necesario para la transcripción de genes endógenos (Meininghaus et al., 2000); sin embargo, construcciones reporteras han sido útiles para el estudio de la implicación del CTD en el acoplamiento de la transcripción y el *splicing* (de la Mata and Kornblihtt, 2006). Un ensamblaje inapropiado de la cromatina en genes reporteros parece ser la causa de que estos puedan ser transcritos por una RNAPII que carece de CTD. Células HEK293T fueron transfectadas con plásmidos que expresan polimerasas resistentes a  $\alpha$ -amanitina que contenían el CTD intacto, delecionado ( $\Delta$ CTD) o con deleciones de su región amino-terminal o carboxi-terminal (de los aminoácidos 1 al 25 o del 27 al 52, respectivamente). Todas las construcciones contienen un motivo carboxi-terminal de 10 residuos (Cter) que confiere estabilidad a la RNAPII (Chapman et al., 2004). El *splicing* alternativo del minigen de *Bcl-x* en presencia de una polimerasa sin CTD ocurre de manera similar al de una polimerasa WT resistente a  $\alpha$ -amanitina (Figura R12). La sobre-expresión de TCERG1 reveló que las dos mitades del CTD eran efectivas en mediar el efecto de TCERG1 en el *splicing* de *Bcl-x* (Figura R12), mientras que la deleción completa del CTD impedía el aumento de isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* producido por la sobre-expresión de TCERG1. Aunque no podemos excluir que los mRNAs presentes en estas condiciones sean mRNAs estables transcritos por la polimerasa endógena durante las 24 horas previas al tratamiento, estos resultados sugieren que el efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo de *Bcl-x* es independiente de la longitud del CTD y sugieren el control de la elongación en el mecanismo de actuación de TCERG1 sobre la regulación del *splicing* de *Bcl-x*.



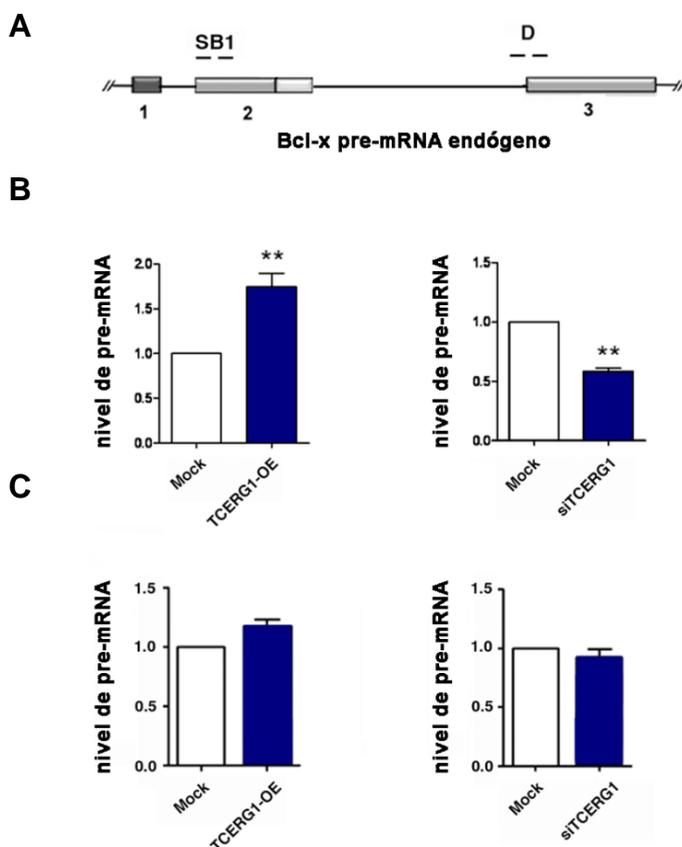
**Figura R12. El efecto de TCERG1 depende del CTD pero no de su longitud.** Resultado del análisis por RT-CR del *splicing* alternativo de *Bcl-x* obtenido de células transfectadas con el minigen HIV2-X2 y plásmidos de expresión de las polimerasas resistentes a  $\alpha$ -amanitina *wild type* (WT) o con deleciones en el CTD; bien deleción total ( $\Delta$ CTD) o con deleciones de los aminoácidos 1 al 25 (1-25) o del 27 al 52 (27-52). Se transfectó también un vector vacío (mock) o de expresión de TCERG1 (TCERG1-OE). Las células fueron luego tratadas con  $\alpha$ -amanitina durante 18 horas después de la transfección. Los datos se representan como ratio de isoformas  $X_L/X_S$  de tres experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

### TCERG1 aumenta la tasa de elongación de la RNAPII.

Los resultados previos indican que la elongación está regulando el *splicing* alternativo de *Bcl-x*. Una explicación posible para el efecto de TCERG1 es que esté influenciando directamente la tasa de elongación de la RNAPII. Para probar esta hipótesis, cuantificamos el pre-mRNA generado en regiones distales del gen *Bcl-x* con respecto al sitio del inicio de la transcripción en condiciones de sobre-expresión o silenciamiento de TCERG1. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó utilizando hexámeros aleatorios seguido de PCR cuantitativa con cebadores específicos que hibridaban en la unión intrón2/exón3 (Figura R13A). Observamos que el nivel de pre-mRNA distal aumentaba al sobre-expresar TCERG1 en comparación con el control, mientras que disminuía al silenciar TCERG1 (Figura R13B). Si TCERG1 aumenta la elongación, deberíamos observar un efecto más notable en el incremento de la tasa de elongación después de la región donde TCERG1 presumiblemente evita la parada de la

## Resultados

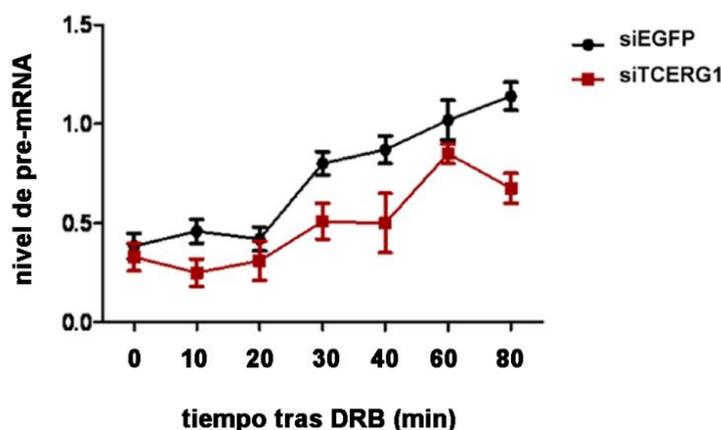
RNAPII (SB1) y un menor efecto en regiones anteriores a aquella. Para comprobarlo, medimos los transcritos generados antes de la región 23 del elemento regulador SB1 y observamos que ni la sobre-expresión ni el silenciamiento de TCERG1 afectan a los niveles de transcripción en este punto (Figura R13C).



**Figura R13. Análisis cuantitativo de la cantidad de transcritos nacientes de Bcl-x en presencia o ausencia de TCERG1.** A. Esquema del pre-mRNA del gen *Bcl-x*. Se indica la posición de los cebadores utilizados: SB1, amplifica una región del elemento SB1 corriente arriba de la región 23; D, amplifica la unión intrón 2- exón 3 de la región distal. B. Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de pre-mRNA en la región D de células transfectadas con un vector vacío (mock) o de expresión de TCERG1 (TCERG1-OE) (izquierda) o silenciadas con un siRNA control (EGFP, mock) o específico (siTCERG1) (derecha). C. El mismo experimento descrito en B se llevó a cabo para analizar la cantidad de transcrito de la región SB1 en condiciones de sobre-expresión (izquierda) o silenciamiento (derecha) de TCERG1. Las gráficas muestran las medias de cuatro experimentos independientes por triplicado. \*\*,  $p < 0.01$ .

Para medir directamente el efecto de TCERG1 en la tasa de elongación de la RNAPII llevamos a cabo un protocolo descrito previamente (Singh and Padgett, 2009). Según este método, células silenciadas mediante siRNA control (siEGFP) o siRNA

específico para TCERG1 (siTCERG1) fueron tratadas con DRB disuelto en DMSO, que bloquea la transcripción de manera reversible al inhibir CDK9. Tras la eliminación del DRB reemplazándolo por medio nuevo las células se incubaron a 37°C y se recogieron muestras para analizar los niveles de pre-mRNA mediante PCR cuantitativa usando cebadores que abarcan la unión intrón2/exón3 a los tiempos indicados (Figura R14). La expresión de pre-mRNA en cada punto se refirió a la cantidad de transcrito en células tratadas con DMSO. Las células con el siRNA control fueron capaces de recuperar la transcripción, tras retirar el tratamiento con DRB, entre los 30 y los 60 minutos lo que es consistente con el retraso transcripcional debido a la distancia genómica desde el sitio de inicio de la transcripción (Singh and Padgett, 2009). La recuperación de la transcripción fue claramente más lenta en células silenciadas para TCERG1. Estos resultados demuestran un papel activo de TCERG1 en la elongación de la RNAPII *in vivo*.



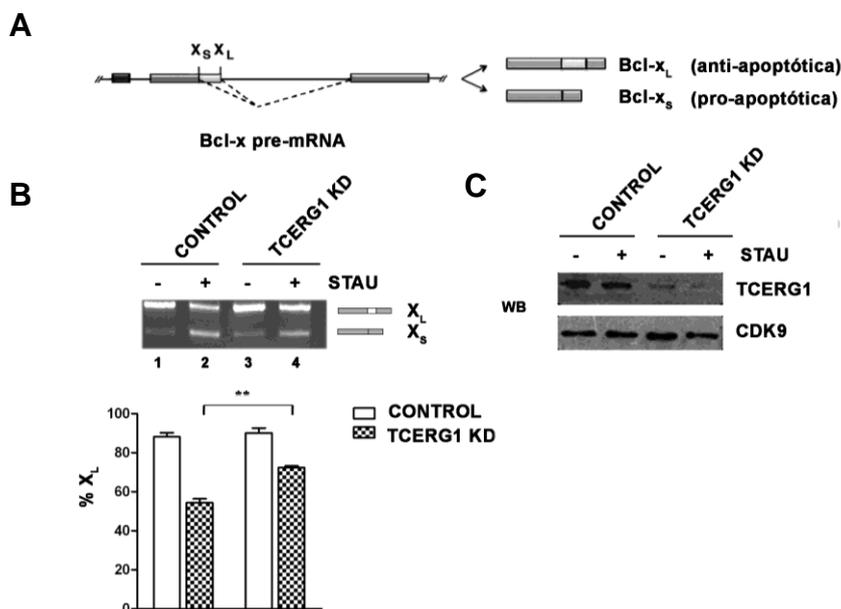
**Figura R14. TCERG1 aumenta la tasa de elongación de la RNAPII *in vivo*.** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles del pre-mRNA sintetizados tras la eliminación del DRB del medio con cebadores que hibridan en la región distal (D, Figura 13A) de células tratadas con siRNA control (siEGFP, en negro) o específico (siTCERG1, en rojo). La gráfica muestra la expresión del pre-mRNA tras la eliminación del DRB a los tiempos indicados relativo al pre-mRNA en células tratadas con DMSO. Se muestran las medias de dos experimentos independientes.

### 3-EFECTO DE TCERG1 EN APOPTOSIS

#### 3.1. Análisis del efecto de TCERG1 sobre la vía intrínseca o mitocondrial.

**El silenciamiento de TCERG1 contrarresta la disminución de isoforma anti-apoptótica producida por la estaurosporina a nivel de mRNA.**

Los datos anteriores muestran que la sobre-expresión de TCERG1 favorece la isoforma pro-apoptótica tanto de minigenes reporteros como del gen Bcl-x endógeno. Estos resultados apuntan a un papel de TCERG1 en el proceso de muerte celular por lo que quisimos investigar la relevancia fisiológica y funcional del efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo en apoptosis. En una primera fase, decidimos analizar los patrones de *splicing* alternativo tras la inducción de apoptosis en células establemente silenciadas para TCERG1. Estas células se generaron a partir de células HEK T-Rex-293 mediante la inducción de shRNAs contra la proteína exógena GFP para las células control y contra TCERG1 para las células TCERG1 KD (ver Materiales y Métodos). Como inductor de apoptosis utilizamos estaurosporina, un inhibidor de las protein-kinasas que activa principalmente la ruta mitocondrial o intrínseca de apoptosis (Falcieri et al., 1993). Tras incubar las células con 1  $\mu$ M de estaurosporina durante 12 h analizamos las isoformas del gen Bcl-x mediante RT-PCR. Observamos que el tratamiento producía un aumento de la isoforma pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub> (Figura R15B , carriles 1 y 2) y que el silenciamiento de TCERG1 revertía parcialmente el efecto aumentando la isoforma anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub>, disminuyendo la isoforma pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub> (Figura R15B, carriles 3 y 4).

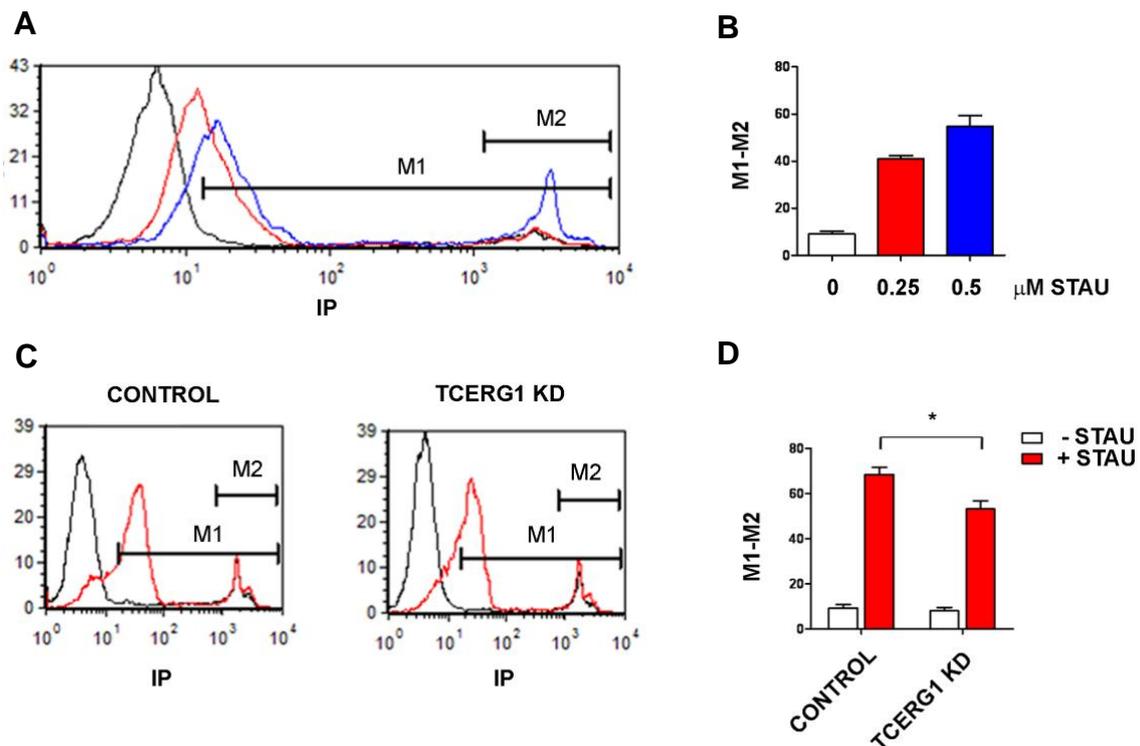


**Figura R15 (Página anterior). El silenciamiento de TCERG1 revierte la disminución de isoforma anti-apoptótica producida por la estaurosporina.** A. Esquema del gen endógeno Bcl-x y del *splicing* alternativo (línea punteada) que genera una forma anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> y otra pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub>. B. Análisis por RT-PCR de las isoformas de *splicing* generadas en células HEK293T-Rex silenciadas establemete con shEGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD) en ausencia (-) o presencia (+) de estaurosporina a 1μM (STAU). En la gráfica se representa el porcentaje de isoforma anti-apoptótica (% X<sub>L</sub>) respecto a la suma de las dos isoformas medido por densitometría de tres experimentos independientes del (\*\*,  $p < 0.01$ ). C. Una fracción del lisado celular se analizó mediante *western blot* para detectar TCERG1 y CDK9.

### **El silenciamiento de TCERG1 disminuye el porcentaje de apoptosis inducido por la estaurosporina.**

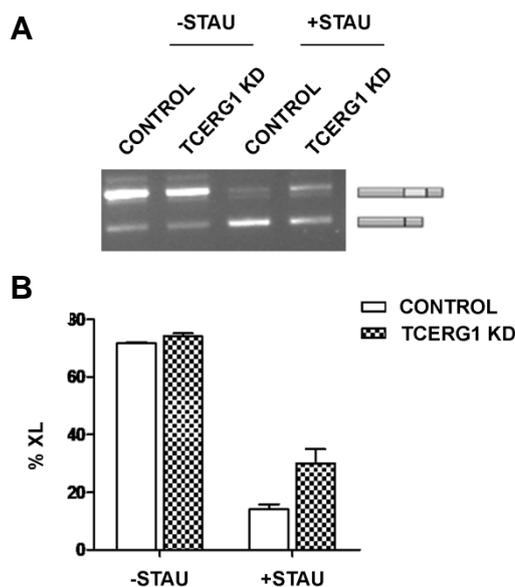
Intentamos llevar a cabo ensayos de apoptosis en células HEK293T, pero la variación de la respuesta al estímulo en cada experimento por parte de estas células nos llevó a buscar un modelo más adecuado para el estudio de muerte celular. Decidimos utilizar células de la línea linfocitoide Jurkat, que resultaron ser altamente sensibles al tratamiento con estaurosporina (Figura R16A). Utilizamos células Jurkat silenciadas establemente mediante shRNAs contra GFP o contra TCERG1 (ver Materiales y Métodos). Mediante la incorporación de yoduro de propidio analizamos el porcentaje de muerte en las células Jurkat tras el tratamiento de estaurosporina a las concentraciones indicadas en la leyenda de la Figura R16 durante 2 h. Esta técnica detecta muerte total, tanto muerte temprana como necrosis. Para obtener una cuantificación aproximada de la cantidad de células en apoptosis, del porcentaje de células muertas totales (marcador M1) descartamos las que contenían mayor contenido de yoduro de propidio que consideramos células necróticas (marcador M2). Observamos que la muerte de estas células era dependiente de la dosis de estaurosporina empleada (Figura R16A y B). Tras la inducción con 0.5 μM de estaurosporina durante 2 h, el porcentaje de células apoptóticas fue significativamente menor en células silenciadas para TCERG1 que en células control (Figura R16C y D). Ya que no queríamos obtener un porcentaje de muerte demasiado elevado que fuera totalmente irreversible y tras diversas pruebas previas decidimos utilizar 0.5 μM de estaurosporina durante 1 h para los experimentos siguientes.

## Resultados



**Figura R16. El silenciamiento de TCERG1 disminuye el porcentaje de muerte.** A. Histograma de la citometría de flujo de células Jurkat marcadas con yoduro de propidio (IP) en situación control (negro) y tras la inducción con 0.25 μM (rojo) y 0.5 μM (azul) de estaurosporina durante 2 h. M1, marcador que muestra las células muertas. M2, marcador que indica la población considerada necrótica. B. Representación gráfica del número de células muertas totales (M1) menos las necróticas (M2). C. Histogramas de la población celular de células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) (panel izquierdo) y silenciada para TCERG1 (panel derecho) marcada con yoduro de propidio en situación control (negro) y tras la inducción con 0.5 μM de estaurosporina (rojo) durante 2 h. D. Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas M1-M2 de tres experimentos independientes (\*,  $p < 0,05$ ).

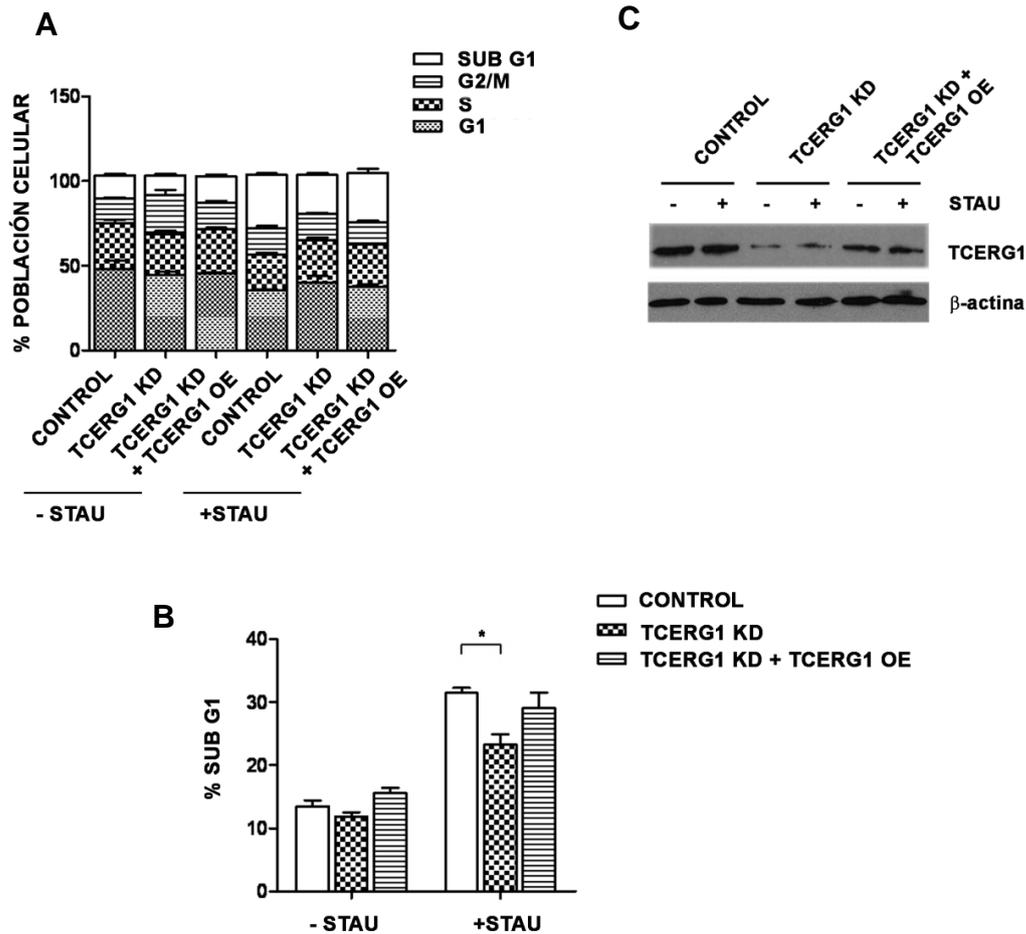
En las condiciones seleccionadas analizamos por RT-PCR el *splicing* alternativo del gen Bcl-x tras el tratamiento con estaurosporina en células Jurkat. Observamos que la inducción de apoptosis por este compuesto favorecía un descenso de la isoforma anti-apoptótica y además, este efecto se veía parcialmente contrarrestado al silenciar TCERG1 (Figura R17).



**Figura R17. TCERG1 reduce el aumento de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> producido por la estaurosporina en células Jurkat.** A. Análisis por RT-PCR de las isoformas de *splicing* generadas en células Jurkat silenciadas con shEGFP (CONTROL) o con shTCERG1 (TCERG1 KD), en ausencia (-STAU) o presencia (+STAU) de estaurosporina a 0.5  $\mu$ M. En la gráfica se representa el porcentaje de isoforma anti-apoptótica respecto a la suma de las dos isoformas medida por densitometría de dos experimentos independientes.

Con el fin de determinar si se observaban diferencias en la fase SubG1, que representa las células apoptóticas, decidimos analizar el ciclo celular de células control y células silenciadas para TCERG1 en presencia y ausencia de estaurosporina. En ausencia de estaurosporina no se observó diferencias en la distribución de la población celular en cada una de las fases del ciclo entre las células control y las células silenciadas para TCERG1 (Figura R18A, parte izquierda). Sin embargo, tras 1 h de tratamiento con 0.5  $\mu$ M de estaurosporina, observamos un menor porcentaje de población en fase sub G1 en células silenciadas para TCERG1, sin que la distribución celular en las demás fases del ciclo fuera afectada (Figura R18A y B). La sobre-expresión de TCERG1 en células silenciadas mediante transfección transitoria de un vector de expresión de TCERG1 recuperó el porcentaje de células apoptóticas del control casi por completo (Figura R18A y B), indicando que la inhibición del porcentaje de células apoptóticas se debía mayoritariamente a un efecto directo del silenciamiento de TCERG1.

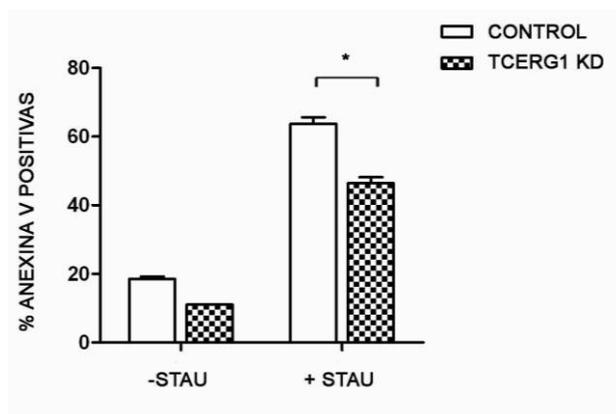
## Resultados



**Figura R18. El silenciamiento de TCERG1 reduce el número de células en fase Sub G1 tras la inducción de apoptosis sin alterar las demás fases del ciclo celular.** A. Análisis del ciclo celular en células Jurkat establemente silenciadas con shGFP (CONTROL) y con shTCERG1 (TCERG1 KD). Las células fueron transfectadas con un vector vacío (CONTROL y TCERG KD) o con un plásmido de expresión de TCERG1 (TCERG1 KD + TCERG1). La gráfica muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en ausencia (-STAU) o presencia (+STAU) de estaurosporina a 0.5  $\mu$ M. B. Gráfica del porcentaje de población celular en fase sub G1 en las condiciones descritas en A de tres experimentos independientes. (\*,  $p < 0,05$ ). C. Una fracción de las células se analizó mediante *western blot* para la detección de TCERG1 y  $\beta$ -actina.

Para corroborar que lo que estábamos midiendo era apoptosis, realizamos ensayos de unión con anexina-V. Este ensayo se basa en la capacidad de la anexina-V de unirse de manera específica y con alta afinidad al fosfolípido fosfatidilserina. La

translocación de esta molécula desde la cara interna de la membrana plasmática a la superficie celular es un evento temprano tras la inducción de apoptosis. Por lo tanto, las células anexina-V positivas corresponderán a células en fase apoptótica. Tras el tratamiento de las células con 0.5  $\mu$ M de estaurosporina durante 1h, incubamos las células con anexina-V para analizarlas por citometría de flujo. Observamos que en las células silenciadas para TCERG1 se redujo el porcentaje de células positivas para el marcaje con anexina-V (Figura R19).



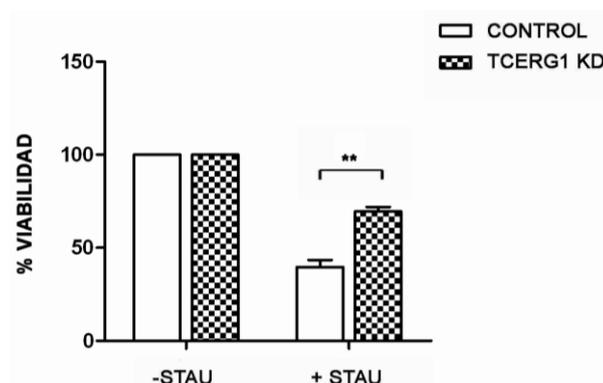
**Figura R19. El silenciamiento de TCERG1 reduce el porcentaje de células anexina V positivas inducido por estaurosporina.** Representación del número de células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD) marcadas con anexina-V medidas por citometría de flujo en ausencia (-STAU) o presencia (+STAU) de estaurosporina 0.5  $\mu$ M en células de tres experimentos independientes. (\*,  $p < 0,05$ ).

### **El silenciamiento de TCERG1 recupera parte de la viabilidad celular perdida tras el estímulo apoptótico.**

Quisimos analizar la viabilidad celular tras la inducción de apoptosis en células control y silenciadas de TCERG1 para ver si se correspondía con los ensayos de muerte. Para ello usamos un kit comercial donde se mide el número de células vivas por una reacción de luminiscencia tras la adición de un sustrato luminiscente que emite señal en presencia de ATP. La cantidad de ATP es un indicativo de células metabólicamente activas y por tanto las unidades de luminiscencia obtenidas son un parámetro de la viabilidad celular. Tratamos tanto células control como silenciadas para TCERG1 con 0.5  $\mu$ M de estaurosporina durante 1 h. Las unidades de luciferasa emitidas fueron normalizadas respecto a la concentración total de proteína obtenida mediante lisis celular y medida por ensayo de Bradford en cada una de las condiciones. Observamos

## Resultados

que el silenciamiento de TCERG1 recuperaba parcialmente la disminución de viabilidad celular producida por la estaurosporina (Figura R20).



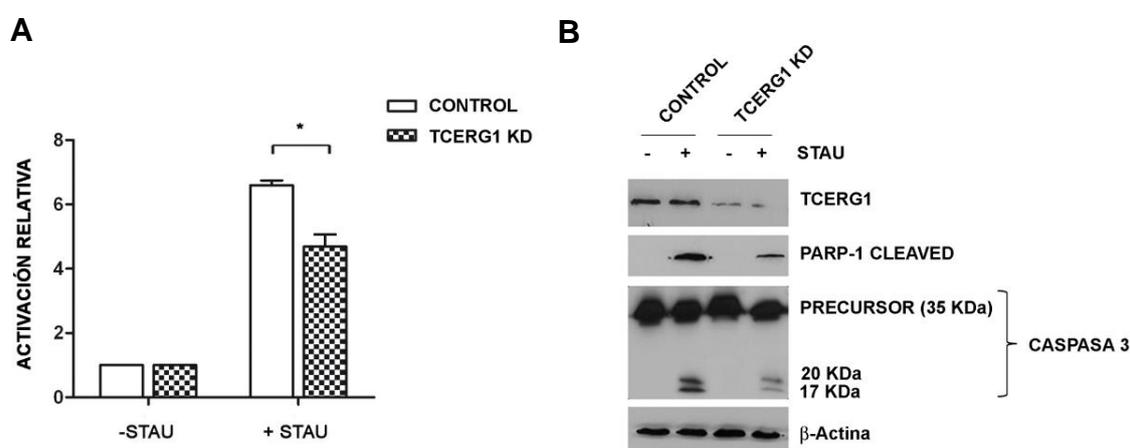
**Figura R20. El silenciamiento de TCERG1 revierte parcialmente la disminución de la viabilidad celular producida por la inducción de apoptosis.** La gráfica muestra el porcentaje de células vivas en células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD) tras la inducción con estaurosporina a 0.5  $\mu$ M (+STAU) respecto a la ausencia de estaurosporina (-STAU), considerado como 100%. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado\*\*,  $p < 0,01$ .

### **La disminución de apoptosis viene dada por la menor presencia de caspasa 3 activa en células silenciadas para TCERG1.**

Otro parámetro indicativo de apoptosis es la cantidad de caspasa-3 activa presente en la célula. Para medir la cantidad de enzima utilizamos un kit comercial que se basa en la adición de un sustrato de luciferasa con una secuencia de corte VEDG, que en presencia de caspasa-3 activa se corta emitiendo señal luminiscente. La cantidad de luciferasa obtenida es directamente proporcional a la cantidad de caspasa-3 presente. Los resultados se corrigieron respecto a la cantidad de proteína total tras la lisis celular medida por ensayo de Bradford en cada una de las condiciones. El tratamiento con estaurosporina indujo hasta seis veces la cantidad de caspasa-3 activa en células control mientras que este incremento se vio significativamente disminuido en células silenciadas para TCERG1 KD, en concordancia con los resultados obtenidos previamente (Figura R21A).

Para corroborar estos datos decidimos analizar a nivel bioquímico mediante *western blot* la activación de apoptosis y el efecto del silenciamiento de TCERG1. La

caspasa 3 activa se origina mediante una cascada proteolítica a partir del precursor pro-caspasa 3 (35KDa) que genera un péptido de 11 KDa y otro de 20 KDa, que a su vez generará la forma madura de 17 KDa. La forma activa es un heterodímero compuesto por dos péptidos de 17 KDa y dos de 11 KDa. Tras el estímulo apoptótico, la caspasa 3 activa corta PARP-1 en un fragmento de 89 KDa. Mediante anticuerpos específicos para la caspasa 3 y PARP-1 procesado, observamos que tanto la señal de caspasa 3 como la de PARP-1 cortado disminuían en las células silenciadas respecto a las células control (Figura R21B).



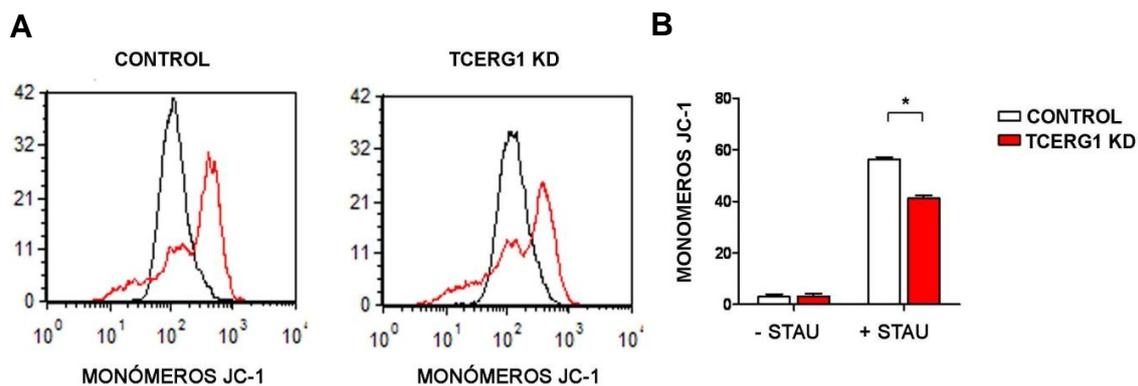
**Figura R21. El silenciamiento de TCERG1 disminuye la cantidad de caspasa 3 activa tras el tratamiento con estaurosporina.** A. Gráfica de la cantidad de caspasa 3 activa en células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD). Los resultados se representan como veces de activación tras la inducción con 0.5  $\mu$ M de estaurosporina (+STAU) respecto a las células sin tratamiento (-STAU). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. \*,  $p < 0,05$ . B. Western blot de extractos celulares totales para la detección de TCERG1, PARP-1 procesado, Caspasa 3 y  $\beta$ -actina en células control y silenciadas para TCERG1 en presencia o ausencia de 0.5  $\mu$ M de estaurosporina.

### El efecto de TCERG1 en apoptosis por la vía intrínseca afecta a la membrana mitocondrial por la alteración del equilibrio de las proteínas Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub>.

Durante el proceso de apoptosis eventos clave tienen lugar en la mitocondria, incluyendo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).  $\Delta\Psi_m$  es un parámetro de la función mitocondrial y por tanto un buen indicador de muerte celular. En situación de apoptosis se produce una disipación del gradiente de potencial

## Resultados

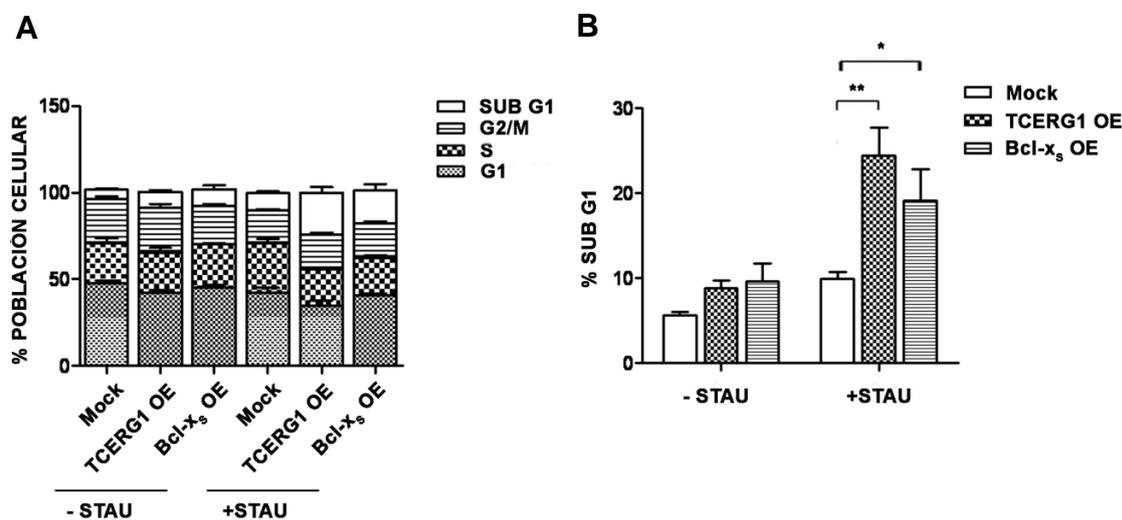
electroquímico que puede ser medido fácilmente mediante diferentes técnicas. Para investigar el papel de TCERG1 en este evento durante la apoptosis, utilizamos un kit de tinción de mitocondria que se basa en la incorporación mitocondrial del colorante fluorimétrico lipofílico catiónico JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide). En células viables con gradiente de potencial elevado, el colorante penetra en la mitocondria y forma de manera espontánea agregados de fluorescencia roja. Por el contrario, en células apoptóticas, la disipación de potencial provoca que el colorante quede disperso por la célula formando monómeros que darán fluorescencia verde. Mediante citometría de flujo medimos el número de células con monómeros JC-1 de fluorescencia verde, es decir, células apoptóticas y observamos que en las células control el porcentaje de células apoptóticas era significativamente mayor que en células silenciadas tras la inducción con estaurosporina (Figuras R22 A y B).



**Figura R22. El silenciamiento de TCERG1 disminuye la disipación del potencial de membrana mitocondrial producido por la estaurosporina.** A. Histograma del análisis por citometría de flujo en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 0.5 μM de estaurosporina en células Jurkat silenciadas con shGFP (CONTROL, panel izquierdo) y células silenciadas para TCERG1 (TCERG1 KD, panel derecho). B. Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas (monómeros JC-1) en cada una de las condiciones descritas para A. Se realizaron 2 experimentos por duplicado. \*,  $p < 0,05$ .

Como se ha mencionado anteriormente, Bcl-x pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 que son las encargadas de mantener el potencial de membrana mitocondrial externo (Introducción, apartado 5.3) (Vaux, 2011). Debido al efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x*, las diferencias en la disipación del potencial de membrana podrían estar causadas por alteraciones a nivel de las proteínas generadas

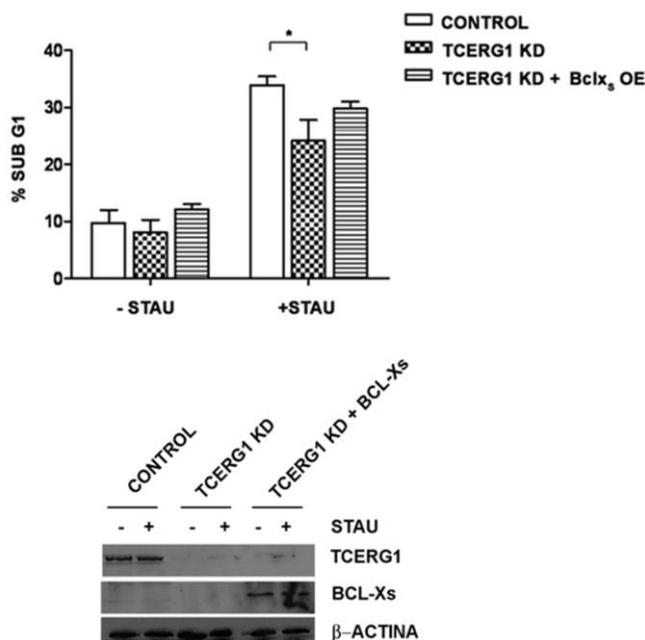
mediante el *splicing* alternativo de este gen. El papel de Bcl-x<sub>S</sub> en apoptosis no está claro. Hay trabajos que dicen que Bcl-x<sub>S</sub> es suficiente para antagonizar el efecto anti-apoptótico de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> (Boise et al., 1993). Sin embargo otros resultados apuntan a un papel secundario como sensibilizador ante estímulos pro-apoptóticos (Clarke et al., 1995; Sumantran et al., 1995). Para ver si Bcl-x<sub>S</sub> favorecía la apoptosis en las células utilizadas, decidimos sobreexpresar esta isoforma mediante transfecciones transitorias de un vector de expresión de Bcl-x<sub>S</sub>. Para ello clonamos el cDNA de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> en el vector de expresión pCDNA-3 y le añadimos un epítipo FLAG para su detección mediante *western blot*. Transfectamos transitoriamente células Jurkat con el plásmido pCDNA3-FLAG vacío o de expresión de Bcl-x<sub>S</sub>. 48 horas después de la transfección tratamos con estaurosporina a 0.5 μM y analizamos el ciclo celular mediante citometría de flujo. Observamos un incremento leve de la población apoptótica tras la sobre-expresión de Bcl-x<sub>S</sub> en ausencia de estaurosporina que era mucho más notable tras el tratamiento (Figura R-23A, B). La sobre-expresión de TCERG1 producía un efecto similar al observado con la sobre-expresión de Bcl-x<sub>S</sub>. El resto de las fases del ciclo no se veían alteradas en ninguno de los casos (Figura R23 A). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el aumento de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> producido por TCERG1 favorece la respuesta apoptótica al estímulo con estaurosporina.



**Figura R23. La sobreexpresión de TCERG1 y de Bcl-x<sub>S</sub> aumentan el porcentaje de células apoptóticas tras la inducción con estaurosporina.** A. Análisis del ciclo celular en células Jurkat transfectadas transitoriamente con un vector vacío (Mock) o con vectores de expresión de TCERG1 (TCERG1 OE) o de Bcl-x<sub>S</sub> (Bcl-x<sub>S</sub> OE). La gráfica muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en ausencia (-STAU) o presencia (+STAU) de estaurosporina a 0.5 μM. B. Gráfica del porcentaje de población celular en fase sub G1 en las condiciones anteriores de tres experimentos independientes. (\*,  $p < 0,05$ ).

## Resultados

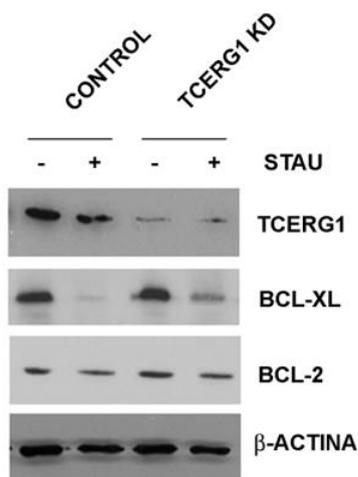
Asimismo, la sobre-expresión de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> en células silenciadas para TCERG1, contrarrestó parcialmente la disminución de apoptosis (medida en porcentaje de células en fase sub G1) observada en ausencia de TCERG1 (Figura R24), sugiriendo que parte del efecto del silenciamiento se debe a la reducción de esta isoforma.



**Figura R24. La sobreexpresión de Bcl-x<sub>S</sub> revierte parcialmente la inhibición de apoptosis producida por el silenciamiento de TCERG1.** A. La gráfica muestra el porcentaje de células en fase sub G1 de Jurkat silenciadas control (CONTROL) o para TCERG1 (TCERG1 KD) transfectadas con un vector vacío o células TCERG1 KD transfectadas con un plásmido de sobreexpresión de Bcl-x<sub>S</sub> (TCERG1 KD + Bcl-x<sub>S</sub> OE) en ausencia (-STAU) o presencia (+STAU) de estaurosporina a 0.5 μM. Se muestran las medias de tres experimentos independientes. (\*,  $p < 0,05$ ). B. Una fracción del cultivo celular se lisó para la detección por western blot de TCERG1 y Bcl-x<sub>S</sub>.

Asimismo, de forma paralela, decidimos analizar los niveles de expresión de la isoforma anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub>. Según los resultados obtenidos a nivel de mRNA (figura R17) esperaríamos una recuperación en proteína anti-apoptótica en células silenciadas tras el tratamiento con estaurosporina. Para corroborar esto analizamos en los extractos celulares la cantidad de proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> en cada una de las condiciones mediante técnicas de *western blot*. Como esperábamos, el tratamiento con estaurosporina disminuyó la cantidad de proteína Bcl-x<sub>L</sub> en células control y se recuperó

parcialmente en células establemente silenciadas (Figura R25), lo que concuerda tanto con los datos obtenidos del análisis de *splicing* alternativo como del análisis de apoptosis por los diferentes ensayos previos. Sin embargo, no se vieron diferencias en la cantidad de Bcl-2, otra proteína anti-apoptótica de la misma familia. Estos resultados y los anteriores sugieren que el silenciamiento de TCERG1 contrarresta la inducción de apoptosis por estaurosporina favoreciendo la isoforma anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> y disminuyendo la pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub>.



**Figura R25. El silenciamiento de TCERG1 revierte parcialmente la pérdida de proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub>.** Se analizaron extractos celulares de células Jurkat establemente silenciadas con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD) en ausencia (-STAU) o en presencia (+STAU) de estaurosporina a 0.5 μM mediante *western blot* con anticuerpos específicos para la detección de TCERG1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> y β-actina.

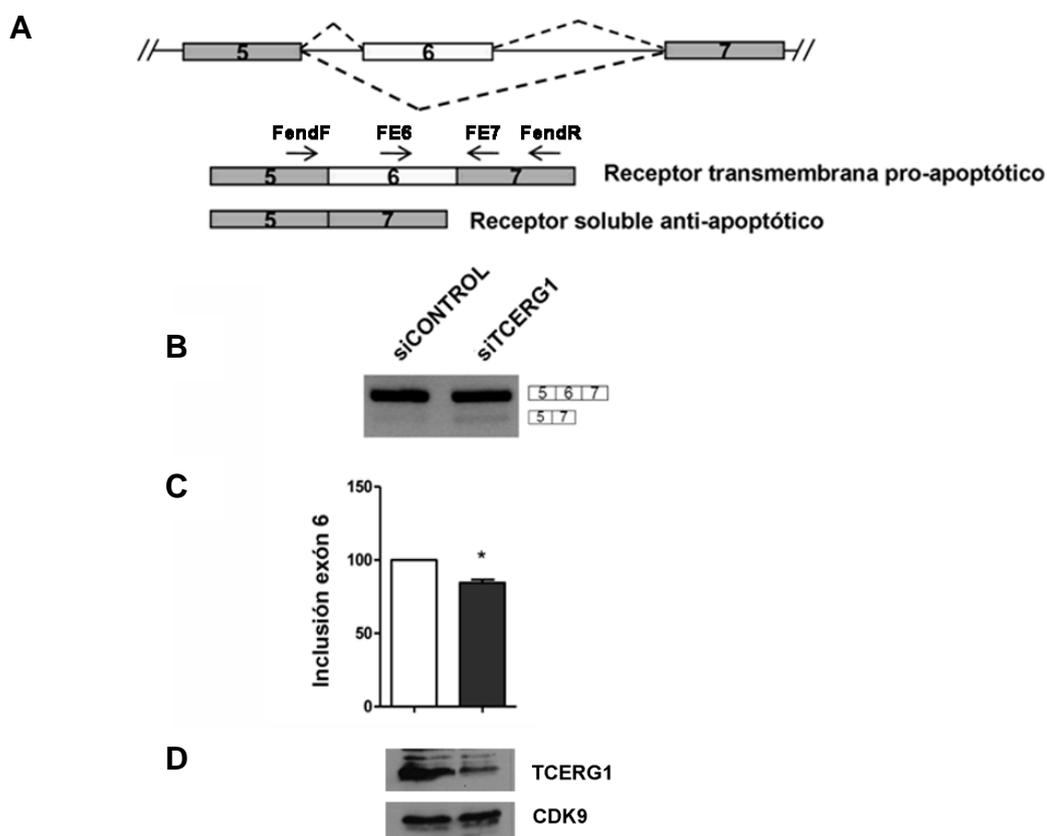
### **3.2. Análisis del efecto de TCERG1 sobre la vía extrínseca o de receptores de muerte.**

**El silenciamiento de TCERG1 favorece la isoforma anti-apoptótica de Fas inhibiendo parcialmente la ruta extrínseca de apoptosis.**

Quisimos investigar si TCERG1 tiene algún efecto en la ruta extrínseca de apoptosis. El receptor trans-membrana Fas puede ser regulado por *splicing* alternativo generando una isoforma soluble que previene la apoptosis (Figura R26A) (Cheng et al., 1994). Lo primero que hicimos fue estudiar el papel del silenciamiento de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de este gen. Para ello silenciamos células Hela de manera transitoria mediante siRNAs contra TCERG1. Como control utilizamos siRNAs dirigidos contra la proteína exógena GFP. 48 horas después de la transfección, se extrajo el RNA total de las células y se determinó el patrón de *splicing* alternativo mediante RT-PCR con cebadores que amplifican ambas isoformas. Los productos generados fueron resueltos en un gel de agarosa. Observamos que el silenciamiento de

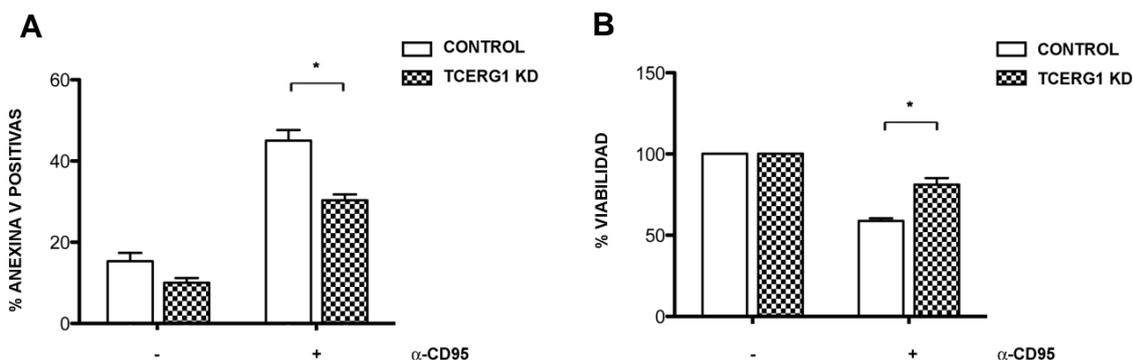
## Resultados

TCERG1 favorece la isoforma anti-apoptótica donde el exón 6 queda excluido (Figura R-26B). Este resultado lo corroboramos mediante PCR cuantitativa con cebadores específicos que detectan únicamente la isoforma trans-membrana pro-apoptótica. Observamos que el silenciamiento de TCERG1 produce una disminución significativa de aproximadamente el 15-20% de la isoforma pro-apoptótica (Figura R26C).



**Figura R-26. El silenciamiento de TCERG1 favorece la isoforma anti-apoptótica del gen *Fas* endógeno.** A. Esquema de la región del gen *Fas* desde el exón 5 hasta el 7 y del *splicing* alternativo (línea punteada) que genera una forma trans-membrana pro-apoptótica (5-6-7) y otra soluble anti-apoptótica (5-7). Se indican los primers utilizados para amplificar ambas isoformas (FendF y FendR) o solamente la isoforma pro-apoptótica (FE6 y FE7). B. Análisis por RT-PCR de las isoformas de *splicing* generadas en células HeLa transfectadas con siRNAs dirigidos hacia la proteína exógena GFP (siCONTROL) o hacia TCERG1 (siTCERG1) amplificadas con FendF y FendR. C. Gráfica del análisis por PCR cuantitativa de la isoforma 5-6-7 amplificada con FE6 y FE7 en células siCONTROL y siTCERG1 (\*,  $p < 0.05$ ). D. Una fracción del lisado se analizó mediante western blot para la detección de TCERG1 y CDK9.

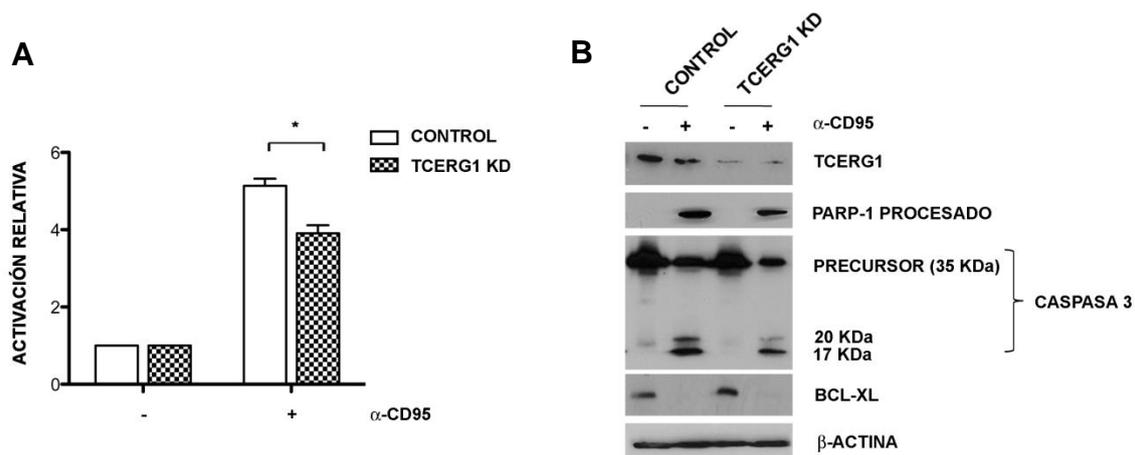
Los ensayos de unión a anexina-V revelaron que tras la inducción con anti-CD95 durante 4 horas, las células control experimentaban un aumento notable de apoptosis que era disminuido en ausencia de TCERG1 (Figura R27A). Igualmente, la pérdida de viabilidad producida por el estímulo se recuperó parcialmente en células silenciadas para TCERG1 (Figura R27B).



**Figura R27. El silenciamiento de TCERG1 reduce la apoptosis y aumenta la viabilidad tras la inducción de la ruta extrínseca de apoptosis.** A. Representación gráfica del número de células anexina-V positivas medidas por citometría de flujo en ausencia (-) o presencia (+) de  $\alpha$ -CD95 en células Jurkat establemente silenciadas con shGFP (CONTROL) o con shTCERG1 (TCERG1 KD) de tres experimentos independientes (\*,  $p < 0,05$ ). B. La gráfica muestra el porcentaje de células vivas en células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD) tras la inducción con 50 ng/ml de  $\alpha$ -CD95 (+) respecto a la ausencia de tratamiento (-) que se consideró el 100%. \*,  $p < 0,05$

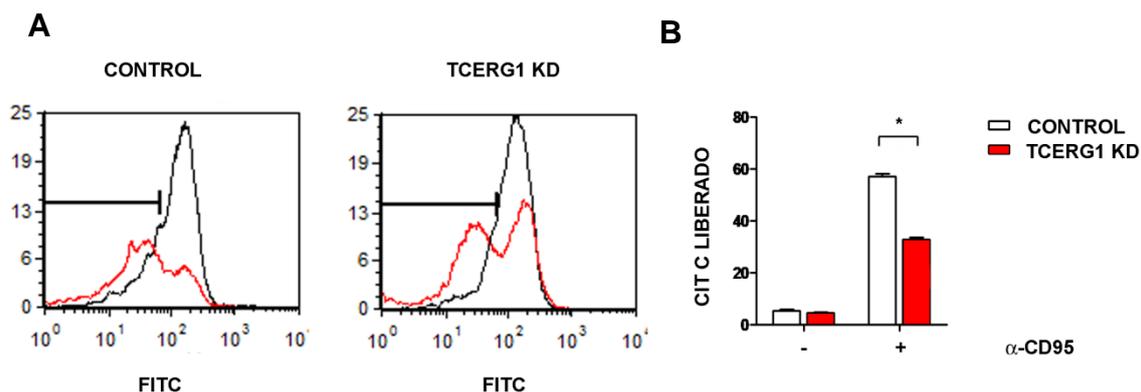
Asimismo, medimos la cantidad de caspasa 3 activa y observamos que tras el estímulo con anti-CD95 la cantidad de caspasa 3 activa se reducía de manera significativa al silenciar TCERG1 (Figura R28A). El análisis de la presencia de caspasa 3 y de su sustrato PARP-1 procesado por *western blot* confirma que la expresión de ambas proteínas se ve reducida en células silenciadas para TCERG1 tras el tratamiento respecto a las células control (Figura R28 B).

## Resultados



**Figura R28. El silenciamiento de TCERG1 disminuye la cantidad de caspasa 3 activa tras el tratamiento con  $\alpha$ -CD95.** A. Gráfica de la cantidad de caspasa 3 activa en células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD). Los resultados se representan como veces de activación tras la inducción con 50 ng/ $\mu$ l de  $\alpha$ -CD95 (+) respecto a las células sin estímulo apoptótico (-). \*,  $p < 0,05$ . B. *Western blot* de extractos celulares totales para la detección de TCERG1, PARP-1 procesado, Caspasa 3, Bcl-x<sub>L</sub> y  $\beta$ -actina.

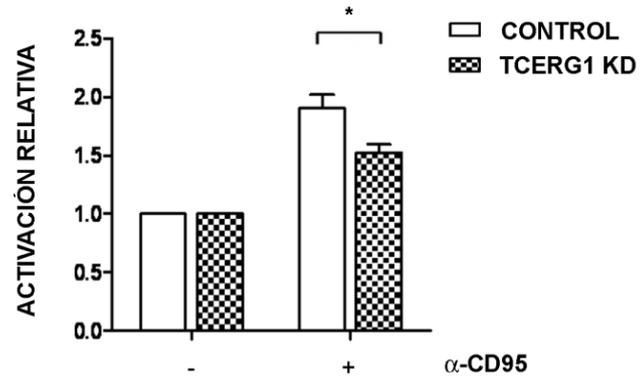
La liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma es otro de los eventos apoptóticos relacionados con la permeabilización de la membrana mitocondrial. Quisimos investigar si el silenciamiento de TCERG1 alteraba la salida de citocromo c. Para ello marcamos tanto células Jurkat control como silenciadas para TCERG1 con anticuerpos específicos dirigidos contra el citocromo c conjugado con ficoeritrina (FITC) para su detección por citometría. Las células viables presentaban un alto contenido en citocromo c en el interior de la mitocondria mientras que en células apoptóticas se encontraba difuso por la célula perdiendo la fluorescencia. La salida de citocromo c de la mitocondria al citosol provocado por el estímulo con anti-CD95 se vio parcialmente revertido en ausencia de TCERG1 (Figura R29). Sin embargo, no se observan diferencias en los niveles de Bcl-x<sub>L</sub> entre células control y células silenciadas tras la inducción con anti-CD95 (Figura R28B), descartando que el efecto de TCERG1 de inhibir la inducción de apoptosis por vía extrínseca sea a través de la regulación de Bcl-x. Estos datos sugieren que el mecanismo por el que el silenciamiento de TCERG1 inhibe la apoptosis mediada por vía extrínseca es diferente al observado por vía mitocondrial



**Figura R29. El silenciamiento de TCERG1 disminuye la liberación de citocromo c liberado en situación de apoptosis inducida por  $\alpha$ -CD95.** A. Histograma del análisis por citometría de flujo en ausencia (negro) y en presencia de 0.5  $\mu$ M de estaurosporina (rojo) en células Jurkat silenciadas con shGFP (CONTROL, panel izquierdo) y células silenciadas para TCERG1 (TCERG1 KD, panel derecho). B. Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas (cit c liberado) en cada una de las condiciones descritas en el panel A. Se realizaron dos experimentos independientes por duplicado. \*,  $p < 0,05$ .

Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción de TCERG1, quisimos estudiar si eventos tempranos durante la ruta apoptótica extrínseca estaban alterados en las células deplecionadas de TCERG1. Analizamos los niveles de caspasa 8, la primera caspasa de la ruta activada por la formación del complejo de señalización DISC al unirse Fas con su ligando (Kischkel et al., 1995). Detectamos un aumento de caspasa 8 activa tras la inducción con  $\alpha$ -CD95 que disminuía levemente aunque de forma consistente en células silenciadas. Esto podría indicar que el efecto del silenciamiento en revertir la apoptosis tiene lugar, al menos en parte, durante las primeras etapas tras la activación de la ruta apoptótica extrínseca (Figura R30).

## Resultados



**Figura R30. El silenciamiento de TCERG1 disminuye la cantidad de caspasa 8 activa tras el tratamiento con  $\alpha$ -CD95.** Gráfica que representa la cantidad de caspasa 8 activa en células Jurkat silenciadas establemente con shGFP (CONTROL) o shTCERG1 (TCERG1 KD). Los resultados se representan como veces de activación tras la inducción con 50 ng/ $\mu$ l de  $\alpha$ -CD95 (+) respecto a las células sin estímulo apoptótico (-). \*,  $p < 0,05$ .

## ***DISCUSIÓN***

Aunque la transcripción y el *splicing* pueden ocurrir de manera independiente, ambos procesos están físicamente y funcionalmente interconectados y son numerosas las evidencias que sugieren un modelo de *splicing* co-transcripcional para la mayoría de los genes de una célula (ver Introducción). Sin embargo, poco se sabe de los factores implicados en este acoplamiento. Los resultados presentados en esta tesis confirman el papel de TCERG1 como un factor acoplador de ambos procesos y apoyan un mecanismo cinético en el control transcripcional del *splicing* alternativo. TCERG1 modula el *splicing* alternativo de *Bcl-x* a través de la regulación de la elongación de la RNAPII. Además regula el *splicing* de otro gen apoptótico, *Fas/CD95*. El silenciamiento de TCERG1 favorece las isoformas anti-apoptóticas en ambos genes inhibiendo parcialmente la apoptosis, proceso al que TCERG1 había sido vinculado anteriormente (Smith et al., 2004) (Wang et al., 2000). Los resultados descritos en esta tesis sugieren que TCERG1 tiene un papel en la muerte celular mediada por apoptosis a través de la regulación transcripcional del *splicing* alternativo.

### ***1. TCERG1 regula el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* modulando la procesividad de la RNAPII.***

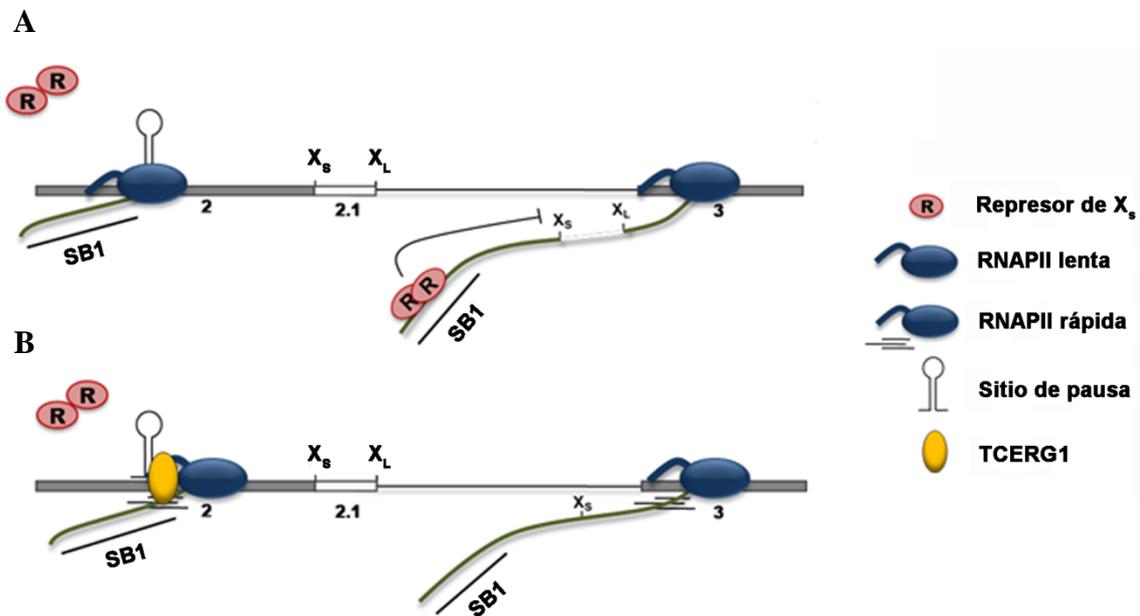
TCERG1 regula el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* favoreciendo el uso del sitio alternativo de *splicing* X<sub>S</sub>, promoviendo un incremento de la isoforma proapoptótica Bcl-x<sub>S</sub>. Mediante el uso de minigenes reporteros que recapitulan el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* endógeno hemos observado que el efecto de TCERG1 es dependiente del promotor. El impacto de TCERG1 sobre estos minigenes reporteros depende de su reclutamiento diferencial a cada uno de los promotores utilizados, sugiriendo que el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de Bcl-x se produce a través de la formación de un complejo específico en el promotor del gen que influenciará la tasa de elongación de la RNAPII. El gen *Bcl-x* contiene una región 5'UTR muy compleja con varios promotores situados en exones no codificantes. Aunque el papel de estos promotores y los exones asociados a ellos en la expresión de las proteínas generadas de ese gen no está claro, la región 5'UTR se ha propuesto como reguladora de la expresión del gen *Bcl-x* modulando la eficacia de la traducción, así como mecanismo que permite coordinar e integrar respuestas a diferentes rutas de señalización (MacCarthy-Morrogh et al., 2000; Sevilla et al., 2001; Viegas et al., 2004). En ratón se ha visto que el uso de los diferentes promotores sigue un patrón específico de tejido y que la selección del promotor puede determinar la isoforma de *splicing*

## Discusión

generada (Pecci et al., 2001). Además, en el gen *Bcl-x* humano se han caracterizado promotores con distinta actividad transcripcional (Grillot et al., 1997). De estos datos se plantea la posibilidad de que TCERG1 se esté uniendo a complejos transcripcionales formados en promotores específicos para favorecer la transcripción y regular el *splicing* alternativo, quizás en respuesta a rutas de señalización determinadas. Sería interesante analizar el patrón de isoformas de *Bcl-x* humano que se genera en diferentes tejidos y determinar si existe alguna relación con el uso de un determinado promotor y con el reclutamiento de TCERG1.

El acoplamiento de la transcripción y el *splicing* como mecanismo de regulación del gen *Bcl-x* fue sugerido previamente en un estudio pionero donde se encontró que una alta proporción de factores regulaban el *splicing* alternativo de *Bcl-x* y a su vez tenían funciones transcripcionales (Moore et al., 2010). En esta tesis y mediante el uso de minigenes reporteros hemos caracterizado una región en el exón 2, que llamamos región 23, como la necesaria para mediar el efecto de TCERG1. Esta región está dentro del elemento SB1 previamente caracterizado como regulador del *splicing* alternativo de *Bcl-x* (Revil et al., 2007). Los transcritos derivados de minigenes que carecen de esta región 23 son exclusivamente sintetizados como isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* indicando la presencia en esas secuencias de un elemento necesario para la producción de la isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>*. Shkreta y colaboradores han descrito recientemente la existencia de un factor represor que se encuentra en cantidades limitantes y se une al elemento regulador SB1 inhibiendo la producción de la isoforma *Bcl-x<sub>S</sub>* (Shkreta et al., 2010). Debido a la elevada densidad de moléculas de RNAPII observada en la región 23 (Figura R8), nuestra hipótesis consiste en la existencia de una señal de parada de la RNAPII alrededor de esta región que permite al represor unirse al pre-mRNA mientras está siendo sintetizado. La delección de la región 23 evita la pausa de la RNAPII e impide la unión del represor, favoreciendo el uso del sitio de *splicing* *X<sub>S</sub>*. Variantes mutadas de la RNAPII, resistentes al inhibidor de la transcripción  $\alpha$ -amanitina, muestran que una polimerasa “lenta” favorece la isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>* implicando directamente a la elongación transcripcional como mecanismo regulador del *splicing* alternativo del gen *Bcl-x*. De acuerdo con nuestra hipótesis, esta polimerasa al ser menos procesiva permitiría la unión del represor al pre-mRNA favoreciendo la elección del sitio de *splicing* *X<sub>L</sub>* para generar la isoforma *Bcl-x<sub>L</sub>*. Al aumentar la procesividad de la RNAPII, TCERG1 modularía su distribución a lo largo del gen evitando que se detenga en la región 23 sin

permitir la unión de represor favoreciendo la elección del sitio de *splicing*  $X_S$  y la mayor síntesis de la isoforma Bcl- $x_S$  (Un modelo de trabajo se presenta en la Figura D1).



**Figura D1. Modelo de regulación del *splicing* alternativo del gen Bcl-x por TCERG1.** A. La presencia de un hipotético punto de control transcripcional en el elemento SB1 supone la parada de la RNAPII de manera transitoria. Esta pausa permite la unión de un represor al elemento SB1 para favorecer la producción de la isoforma Bcl- $x_L$ . B. TCERG1 estimula la elongación transcripcional del gen *Bcl-x* evitando la parada de la RNAPII e impidiendo la unión del represor a la región SB1, favoreciendo la producción de la isoforma Bcl- $x_S$ . El dibujo del tallo-lazo en la región SB1 es solo gráfico para ilustrar la señal de parada de la RNAPII.

La naturaleza de la posible pausa de la RNAPII en la región 21 del elemento SB1 es desconocida. El alto contenido en GC de esta región podría proporcionar mayor estabilidad termodinámica y favorecer la parada de la RNAPII en este punto (Kraeva et al., 2007; Yonaha and Proudfoot, 1999). El control de la elongación transcripcional en la regulación de la expresión génica en eucariotas es cada vez más importante (Shukla and Oberdoerffer, 2012). La existencia de señales de parada de la RNAPII próximas al promotor del gen que necesitan superarse para establecer una elongación activa, eran propiedad de genes que requieren una rápida inducción ante diversos estímulos, como los genes de respuesta a choque térmico. Actualmente, se considera un mecanismo de

## Discusión

regulación extendido a gran parte de los genes y especies eucariotas (Core et al., 2008; Nechaev et al., 2010). Asimismo, la parada de la RNAPII se ha relacionado con eventos de procesamiento del pre-mRNA como el *capping* o el corte y poliadenilación. La parada en regiones próximas al promotor coincide con un aumento de la fosforilación en la Ser5 del CTD. Esta modificación es necesaria para el reclutamiento de enzimas encargadas del proceso de *capping*. De hecho, estudios en genes de choque térmico han demostrado que transcritos de aproximadamente 50 nucleótidos sintetizados antes de la parada ya han sido procesados por *capping* (Listerman et al., 2006; Rasmussen and Lis, 1993). De manera similar, estudios tanto *in vitro* (Yonaha and Proudfoot, 1999) como *in vivo* (Boireau et al., 2007) han demostrado que la poliadenilación requiere una parada de la RNAPII alrededor del sitio *poly-A*. Recientemente, utilizando análisis de alta resolución, se ha publicado la influencia en el *splicing* alternativo de la parada de la RNAPII a lo largo de los genes (Alexander et al., 2010; Carrillo Oesterreich et al., 2010). Mediante análisis de *microarrays* del RNA naciente purificado asociado a cromatina en levadura, Oesterreich y colaboradores han observado que los exones terminales muestran un elevado grado de *splicing* co-transcripcional. Los autores de ese trabajo sugieren que una parada de la RNAPII antes de estos exones terminales retrasa la síntesis del 3' ss permitiendo su *splicing* co-transcripcional (Carrillo Oesterreich et al., 2010). En otro estudio paralelo se ha observado que tras la inducción de la transcripción se producen acumulaciones de moléculas de RNAPII alrededor de los 3' ss de intrones favoreciendo el *splicing* co-transcripcional y el uso de un 3' ss determinado. Esta acumulación de polimerasas coincide con un aumento de fosforilación del CTD en la Ser5 y la Ser2, lo que es compatible con la regulación transcripcional a nivel de parada próxima al promotor. La pausa en los 3' ss actuaría como punto de control transcripcional que se correspondería con la fosforilación en Ser5, mientras que la fosforilación de la Ser2 en este punto promovería el escape del sitio de control (Alexander et al., 2010). Si el punto de control que hemos descrito en el elemento SB1 del gen *Bcl-x* está asociado con la fosforilación de la Ser5 o si TCERG1 favorece la fosforilación de la Ser2 impidiendo la parada transitoria de la RNAPII son posibilidades interesantes que quedan por investigar.

Debido a que TCERG1 influye en la procesividad de la RNAPII en el gen *Bcl-x* sería interesante analizar este efecto en otros eventos del procesamiento del pre-mRNA. Datos obtenidos del uso de *microarrays* específicos de *splicing* (*Exon Array*) revelan que aproximadamente el 25% de los eventos de *splicing* afectados al silenciar TCERG1

corresponden a exones terminales alternativos. De estos, el 76% supone la inclusión de dichos exones y la utilización de sitios de poliadenilación alternativos (J.P. Muñoz-Cobo y C. Suñé, sin publicar). Estos datos sugieren que TCERG1 podría estar favoreciendo una parada de la RNAPII cerca de exones terminales favoreciendo la inclusión y la utilización de sitios alternativos de poliadenilación.

En un estudio reciente usando la técnica de microscopía FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*), Muñoz y colaboradores han mostrado que la irradiación con luz ultravioleta inhibe la elongación de la transcripción *in vivo* (Munoz et al., 2009). En ese estudio, la radiación UV favorece la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>, un resultado que nosotros hemos reproducido a nivel de *Bcl-x* endógeno (datos no mostrados). Esta discrepancia con nuestros resultados en los que vemos que una polimerasa lenta favorece la isoforma Bcl-x<sub>L</sub>, puede deberse a los efectos de la luz UV. Aunque no se observan alteraciones en la localización subcelular de factores de *splicing* como SRp20, SF2/ASF o SC35 tras el tratamiento con UV, otros factores importantes para el *splicing* de *Bcl-x* como hnRNP A1 no fueron analizados, y se sabe que hnRNP A1 se acumula en los gránulos de estrés del citoplasma con consecuencias en el *splicing* alternativo tras la irradiación con luz UVC (van der Houven van Oordt et al., 2000). Además, la forma de los speckles nucleares tras la irradiación se ve claramente afectada, indicando que la luz UV modifica la estabilidad o la distribución nuclear de factores de *splicing* y que el resultado del aumento de isoforma Bcl-x<sub>S</sub> no sea consecuencia directa de la disminución en la elongación sino de alteraciones en factores de *splicing* o en la unión con sus RNAs diana. Por ejemplo, la unión al RNA de la proteína EWS, que regula el *splicing* alternativo de genes implicados en reparación y daño del DNA, disminuye tras el tratamiento con UV (Paronetto et al., 2011). Además, aunque la irradiación con luz UV esté regulando el *splicing* del gen *Bcl-x* al inhibir la elongación, la contribución de otras rutas que regulen el *splicing* asociadas al daño celular pueden estar favoreciendo el aumento de Bcl-x<sub>S</sub> (Shkreta et al., 2010).

Avances en el estudio de la regulación del *splicing* alternativo revelan que este proceso es más complejo de lo que se pensaba. Los elementos existentes en la secuencia del RNA y las proteínas que se unen a ellos no son suficientes para explicar la precisión de su regulación. Además de la tasa de elongación de la RNAPII, la implicación de la estructura de la cromatina y las modificaciones de histonas son importantes en la regulación del *splicing* alternativo (Luco et al., 2011). Sería interesante investigar si TCERG1 regula la transcripción de la RNAPII alterando el patrón de modificación de

## Discusión

alternativo de *Fas* ocurre mediante un mecanismo transcripcional. Sin embargo, en otro laboratorio se ha descrito que la tasa de elongación influye en las decisiones de *splicing* de este gen (Zhou et al., 2011) permitiendo la posibilidad de que TCERG1, al igual que ocurre en el gen *Bcl-x*, esté influyendo en el *splicing* alternativo de *Fas* mediante la regulación de la elongación de la RNAPII. Esto, junto con los resultados obtenidos sobre el *splicing* del HIV-1 (Figura S9 y S10)), nos lleva a pensar que el efecto de TCERG1 sobre la elongación de la RNAPII en la regulación del *splicing* alternativo pueda generalizarse a otros genes.

El *splicing* alternativo de varios genes se ve alterado en respuesta a determinadas rutas de señalización (Shin and Manley, 2004). Por ejemplo, el *splicing* del gen *Bcl-x* está regulado en respuesta a una señalización apoptótica que incluye la síntesis de ceramida y la fosfatasa PP1 (Chalfant et al., 2002). Inhibidores de PKC son capaces de alterar el *splicing* alternativo de *Bcl-x* en células sanas, mientras que no tienen efecto en líneas de cáncer (Revil et al., 2007). Recientemente se ha identificado una ruta específica a través de PI3K que es la responsable del aumento de la isoforma Bcl-x<sub>L</sub> en células de cáncer de pulmón al afectar la expresión de la proteína SAP155 y su efecto en el *splicing* de *Bcl-x* (Shultz et al., 2012). Estos datos sugieren que existen rutas de señalización específicas para la regulación del *splicing* del gen *Bcl-x* en células sanas y células malignas y que factores de *splicing* que ven alterada su expresión ante el estímulo son los que integran la ruta de señalización con la regulación del *splicing*.

Recientemente se ha descrito que TCER-1, el homólogo de TCERG1 en *C.elegans* responde de manera selectiva a señales reproductivas regulando la transcripción de genes implicados en la ruta de longevidad DAF-16/FOXO (Ghazi et al., 2009). Una posibilidad muy atractiva es que distintas señalizaciones estén regulando la expresión de TCERG1 que a su vez regula la transcripción y el *splicing* alternativo de sus genes diana según las necesidades celulares en cada punto del desarrollo. De hecho, el efecto en el proceso de muerte celular por TCERG1 tiene un efecto más notable tras la inducción de apoptosis. Aunque no hemos determinado en detalle si la expresión de TCERG1 está alterada, análisis por *western blot* no revelan un cambio notable a nivel de expresión tras los tratamientos apoptóticos. Una posibilidad sería que cambios en las modificaciones post-traduccionales en respuesta a los distintos estímulos regulen la función de TCERG1. TCERG1 es un sustrato de sumoilación *in vivo* y aunque mutaciones en los sitios de sumoilación no afectan al *splicing* alternativo de minigenes reporteros como Bcl-x ni a la localización subcelular de TCERG1 (Sanchez-

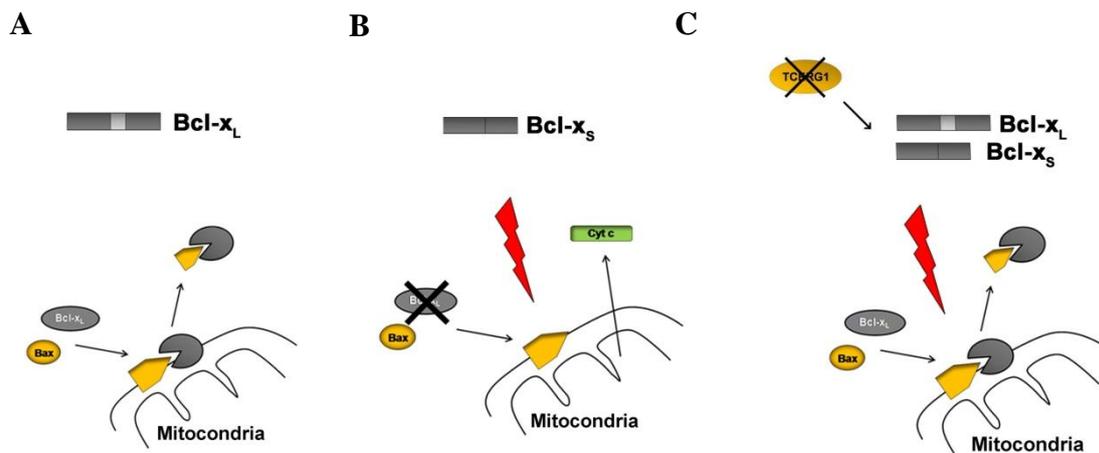
histonas y si esto afecta de alguna manera al *splicing* alternativo de *Bcl-x*. Recientemente se ha demostrado que siRNAs exógenos dirigidos hacia regiones génicas próximas a exones alternativos alteran la elongación de la RNAPII al favorecer la condensación de la cromatina (Allo et al., 2009). Datos procedentes de análisis por *microarrays* (Pearson et al., 2008) (J.P Muñoz-Cobo y C. Suñé, sin publicar) revelan que cambios en los niveles de TCERG1 afectan a genes que también son regulados mediante microRNAs (miRNAs). Una posibilidad muy atractiva es que TCERG1 esté regulando el *splicing* alternativo a través de un mecanismo que involucre también a los miRNAs.

## **2. La regulación del *splicing* alternativo de genes de apoptosis por TCERG1 afecta al proceso de muerte celular.**

TCERG1 está regulando el *splicing* alternativo de dos genes clave para el proceso de apoptosis, *Bcl-x* y *CD95*, favoreciendo en ambos casos la forma pro-apoptótica. Hemos visto que estos datos se correlacionan con un papel de TCERG1 en el proceso de apoptosis tanto de la ruta intrínseca como extrínseca. El efecto de TCERG1 sobre ambas rutas es más prominente en respuesta a la inducción de los estímulos que desencadenan la muerte celular indicando un papel en esa respuesta. En ausencia de TCERG1 el porcentaje de apoptosis es significativamente menor tras el establecimiento de apoptosis. Esto se ha comprobado a diferentes niveles durante la cascada apoptótica. La disminución de apoptosis se corresponde con un aumento de viabilidad así como con una disminución de caspasa 3 activa, una de las caspasas efectoras. Asimismo, PARP-1, sustrato de las caspasa 3 se encuentra menos procesado en ausencia de TCERG1 (Figura R-21). Estos resultados apuntan a un papel de TCERG1 en la regulación de la apoptosis por ambas rutas. Sin embargo, el punto durante la cascada apoptótica afectado por el silenciamiento de TCERG1 es diferente en las dos rutas. La estaurosporina, que activa principalmente la ruta intrínseca, no es un inductor específico de apoptosis sino que inhibe de manera general las proteínas quinasas. Diversas rutas de señalización podrían estar implicadas en el establecimiento de muerte celular. Sin embargo, la disminución de apoptosis en ausencia de TCERG1 se recupera casi con totalidad al sobre-expresar de manera transitoria TCERG1 indicando que, aunque la estaurosporina pueda estar teniendo efectos inespecíficos, las consecuencias de la ausencia de TCERG1 son causadas por la falta de esta proteína en concreto. La estaurosporina provoca la disipación del gradiente de potencial electroquímico de la membrana mitocondrial. La

## *Discusión*

perturbación del equilibrio entre proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas es la causa de la alteración de la membrana mitocondrial durante la apoptosis. Esto concuerda con la disminución drástica de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-2 que observamos tras la inducción con estaurosporina. El silenciamiento de TCERG1 reduce la disipación del gradiente favorecido por el tratamiento apoptótico recuperando parcialmente los niveles de proteína Bcl-x<sub>L</sub>, mientras que no parece haber variación en la expresión de la otra proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figura R25). Esto nos sugiere que el efecto puede ser específico de Bcl-x. El aumento de Bcl-x<sub>L</sub> es débil y no explicaría totalmente la recuperación de apoptosis. La sobre-expresión de Bcl-x<sub>S</sub> mediante vectores de expresión tiene la misma tendencia que la sobre-expresión de TCERG1 ya que no parece aumentar de manera muy notable la apoptosis, sin embargo parece sensibilizar a la célula a la estaurosporina, ya que tras el tratamiento se produce un incremento significativo de células en fase apoptótica (Figura R24). Esto concuerda con trabajos previos donde se observó que Bcl-x<sub>S</sub> sensibiliza a la célula a la apoptosis inducida por quimioterapia (Sumantran et al., 1995). Además, la sobre-expresión transitoria de Bcl-x<sub>S</sub> en células silenciadas revierte parcialmente la inhibición de la apoptosis favorecida por el silenciamiento de TCERG1 (Figura R24). La recuperación total probablemente requiera la disminución de isoforma Bcl-x<sub>L</sub> que se está favoreciendo en ausencia de TCERG1. Serían necesarios experimentos con siRNAs específicos para esa isoforma para comprobarlo. En relación a esto, es de interés señalar que en situación de homeostasis celular la proteína pro-apoptótica Bax está continuamente translocándose del citoplasma a la membrana mitocondrial. Recientemente se ha propuesto a Bcl-x<sub>L</sub> como un factor que ayuda a la retro-translocación de Bax de la mitocondria al citoplasma impidiendo que Bax quede anclado a la membrana mitocondrial provocando la muerte celular (Edlich et al., 2012). La inducción con estaurosporina inhibe casi por completo la expresión de Bcl-x<sub>L</sub>, permitiendo que Bax se quede anclada en la membrana mitocondrial favoreciendo la apoptosis. Un posible modelo de trabajo sería que la disminución de la isoforma pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub> junto con el aumento de la isoforma anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> provocado por el silenciamiento de TCERG1, favorezca la recuperación de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> que volvería a estar disponible para transportar Bax de vuelta al citoplasma contrarrestando la inducción de apoptosis (Un modelo de trabajo se presenta en la Figura D2). Si la localización de Bax se ve alterada en ausencia de TCERG1 tras el tratamiento con estaurosporina es una cuestión que queda por determinar.

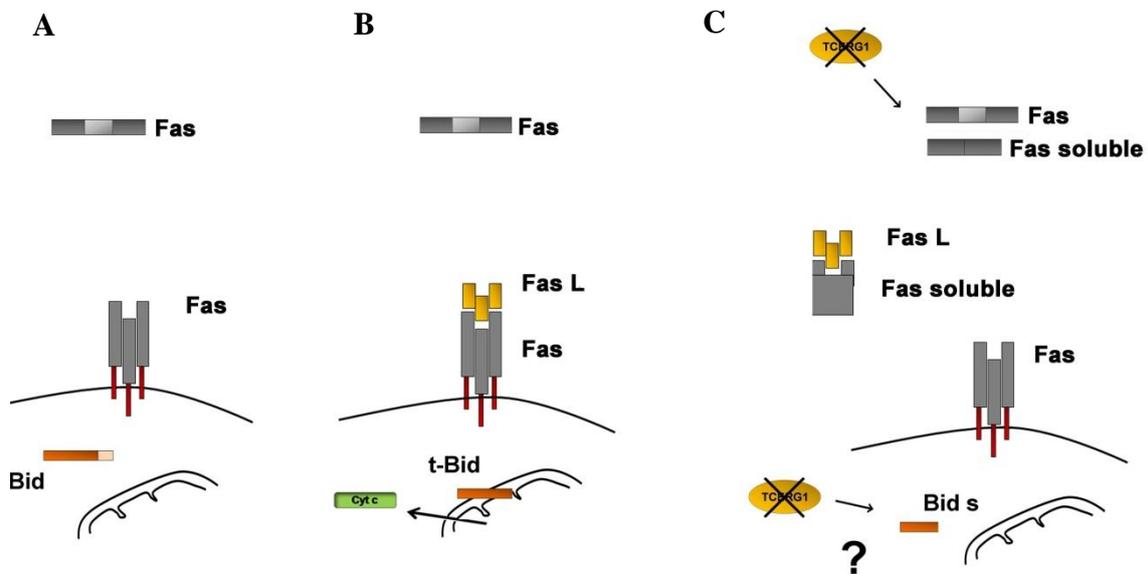


**Figura D2. Hipótesis del mecanismo de actuación de TCERG1 en apoptosis por la ruta mitocondrial.** A. En una situación de homeostasis Bax está constantemente translocándose del citoplasma a la membrana mitocondrial. Bcl-x<sub>L</sub>, que es la forma predominante de *splicing* del Bcl-x, interacciona con ella ayudando en su retro-translocación al citoplasma desde la membrana mitocondrial. B. Tras el estímulo apoptótico, la disminución de Bcl-x<sub>L</sub> debido a la producción de isoforma Bcl-x<sub>S</sub>, hace que Bax quede anclado en la membrana mitocondrial facilitando la formación del poro dando lugar a apoptosis. C. Tras el estímulo apoptótico y en ausencia de TCERG1, los niveles de Bcl-x<sub>L</sub> se recuperan parcialmente previniendo la apoptosis.

En cuanto a la activación de la vía extrínseca o de receptores de muerte, el efecto de TCERG1 es en la misma dirección; el silenciamiento de TCERG1 inhibe la apoptosis. Hemos visto que este efecto tiene lugar en eventos iniciales tras la desencadenamiento de la ruta de apoptosis, ya que hay menos caspasa 8 activa (la primera pro-caspasa que se activa tras la unión receptor-ligando) en ausencia de TCERG1 (Figura R30). El efecto es moderado y se corresponde con un aumento leve de la isoforma anti-apoptótica a nivel de RNA (Figura R26). Sin embargo, esto no parece suficiente para explicar la inhibición de apoptosis observada en células silenciadas para TCERG1, indicando que eventos más posteriores también podrían estar siendo regulados por este factor. La inducción con anti-CD95 provoca alteraciones en la membrana mitocondrial que desencadenan la salida de citocromo c al citoplasma que se ve disminuida en ausencia de TCERG1. Esta recuperación del potencial de membrana no parece tener lugar a través de los niveles de Bcl-x<sub>L</sub>, ya que no se produce recuperación de los niveles de proteína en ausencia de TCERG1 (Figura R28). La

## Discusión

proteína Bid, es la proteína de la familia Bcl-2 que es activada por la ruta extrínseca. Su procesamiento por la caspasa 8 hace que se transloque a la membrana mitocondrial facilitando la formación del poro por parte de Bax y Bak (Luo et al., 1998). Además, se ha visto que Bid es regulada por *splicing* alternativo. Una de las isoformas descritas, Bid<sub>s</sub>, es capaz de contrarrestar el efecto pro-apoptótico de Bid e inhibir la apoptosis mediada por Fas (Renshaw et al., 2004). Sería interesante analizar si esta isoforma se encuentra sobre-expresada en ausencia de TCERG1. En general estos datos sugieren un efecto del silenciamiento de TCERG1 a partir del *splicing* alternativo. Por una parte al favorecer la isoforma soluble, estaría inhibiendo parcialmente el efecto de anti-Fas o FasL con quienes competiría por su unión al receptor y, por otra parte, alterando el potencial pro-apoptótico de Bid (Un modelo de trabajo se presenta en la Figura D3).



**Figura D3. Hipótesis del mecanismo de acción de TCERG1 en apoptosis por la ruta extrínseca.**

A. En situación normal de homeostasis el receptor Fas se expresa como proteína trans-membrana. B. El ligando de Fas (Fas L) se une al receptor desencadenando la apoptosis extrínseca. Además, la caspasa 8 puede activar Bid mediante procesamiento, lo que en último término facilitara la salida de citocromo c potenciando la respuesta apoptótica. C. En ausencia de TCERG1, parte del receptor Fas se expresa como Fas soluble que compite con el ligando inhibiendo la unión de éste al receptor impidiendo la apoptosis. Bid también se regula mediante *splicing* alternativo y es una posibilidad sin analizar que el silenciamiento de TCERG1 favorece formas anti-apoptóticas que disminuyan su potencial pro-apoptótico.

El *splicing* alternativo del gen *Fas* es muy complejo y no da lugar a dos isoformas únicamente (Lajmanovich et al., 2009). No podemos descartar que TCERG1 esté afectando la expresión de estas otras isoformas y se requiere un análisis más exhaustivo del *splicing* del gen para poder eliminar esta posibilidad. Asimismo, TCERG1 es un factor de transcripción que puede activar o inhibir la expresión de gran número de genes además de regular el *splicing* alternativo de otros genes diana. No podemos descartar tampoco que TCERG1 esté actuando sobre otras proteínas de la ruta o sobre otros genes que tengan como diana genes apoptóticos. Un experimento interesante para poder vincular directamente el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo y su papel en apoptosis sería inhibir el *splicing* y comprobar que TCERG1 ya no tiene efecto tras la inducción de apoptosis. Datos preliminares obtenidos en el laboratorio muestran que el tratamiento con *spliceostatin A*, que inhibe el ensamblaje del spliceosoma impidiendo la reacción de *splicing* (Kaida et al., 2007; Lo et al., 2007), tiene graves consecuencias para la viabilidad celular probablemente debido al importante papel que tiene el *splicing* alternativo tanto en apoptosis como en otros procesos celulares. Debido al elevado número de genes implicados en apoptosis que son regulados a través del *splicing* alternativo (Schwerk and Schulze-Osthoff, 2005), sería interesante analizar el efecto de TCERG1 en cada uno de ellos y determinar su patrón de procesamiento en ambas rutas de apoptosis.

### **3. TCERG1 como factor de control**

El acoplamiento de la transcripción y el *splicing* podría estar permitiendo el establecimiento de puntos de control que aseguren la correcta síntesis del pre-mRNA y su procesamiento. Trabajos recientes sugieren que la parada de la RNAPII a lo largo de los genes podría actuar como mecanismo de control para asegurar su correcto funcionamiento durante el desarrollo (Levine, 2010). Además, la parada de la RNAPII en genes inducibles o en genes altamente regulados podría suponer la manera de unificar las respuestas a diferentes rutas de señalización o distintos estímulos. Factores que regulen esta parada podrían estar actuando como “sensores” ante diferentes estímulos acoplando los procesos de transcripción y el *splicing* para, por ejemplo, provocar cambios globales en el *splicing* alternativo de genes implicados en procesos celulares como apoptosis, respuesta al daño de DNA o desarrollo. Con la metodología empleada para *Bcl-x* no hemos sido capaces de determinar si la regulación del *splicing*

## Discusión

Alvarez et al., 2010), el patrón de sumoilación se modifica tras un tratamiento de choque térmico (M. Sánchez-Álvarez y C. Suñé, sin publicar). Quizás esta modificación no sea importante en situación basal pero sí lo sea en respuesta a estrés. Sería interesante analizar el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo global en respuesta al choque térmico, así como determinar el patrón de sumoilación en respuesta a los diferentes estímulos apoptóticos. De hecho, numerosos factores de *splicing* ejercen su función reguladora mediante modificaciones post-traduccionales en respuesta a diferentes estímulos: 1) La inducción de apoptosis mediante la ruta del gen *Fas* induce la desfosforilación de proteínas SR a través de la activación de la fosfatasa PP1 (Chalfant, JBC, 2001). 2) La proteína Sam68 regula el *splicing* alternativo de *Bcl-x* a través de la fosforilación (Paronetto et al., 2007). En células sanas, Sam68 se encuentra desfosforilada y su localización es principalmente nuclear donde participa en la regulación del procesamiento del pre-mRNA. En células de cáncer, Sam68 está fosforilada y se encuentra difusa por el citoplasma disminuyendo su actividad en el *splicing* alternativo (Cote et al., 2003; Lukong et al., 2005; Matter et al., 2002). 3) La metilación del factor de *splicing* SRSF1 es importante para su actividad y su inhibición hace que se acumule en el citoplasma alterando sus funciones en el *splicing* alternativo (Sinha et al., 2010). 4) La fosforilación de hnRNPK1 en situación de estrés impide su interacción con la transportina, favoreciendo su acumulación en el citoplasma que provoca alteraciones en el *splicing* (Allemand et al., 2005; van der Houven van Oordt et al., 2000). Y 5) la metilación de TCERG1 por la metiltransferasa CARM1 influye en el *splicing* alternativo del gen CD44 (Cheng et al., 2007). Si TCERG1 sufre alteraciones a nivel de modificaciones post-traduccionales tras el tratamiento con estímulos apoptóticos, alterando por ejemplo su localización celular, es una atractiva posibilidad que queda por investigar.

Otra posibilidad es que los estímulos estén alterando interacciones de determinados factores implicados en la ruta. Se ha visto que el tratamiento con agentes genotóxicos, como cisplatino o camptotecina inhiben interacciones entre el factor de transcripción Erwing Sarcoma (EWS) y el factor de respuesta a estrés YB-1 resultando en alteraciones del *splicing* alternativo a nivel global (Auboeuf et al., 2004). El mecanismo molecular de la interacción de estas proteínas en el *splicing* alternativo no está claro. Además y como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que EWS interacciona de manera co-transcripcional con sus RNAs diana y que la inducción con UV resulta en una redistribución de EWS hacia el nucléolo y una menor interacción con

los RNAs. Análisis proteómicos de TCERG1 han revelado su interacción con numerosas proteínas implicadas en numerosos procesos celulares, como la proteína hsp70 (Lin et al., 2004)(datos del laboratorio sin publicar). No hay que descartar que interacciones entre TCERG1 y estos factores de respuesta a estímulos modulan el *splicing* alternativo de un conjunto de genes necesarios para esa respuesta celular.

En conjunto los resultados de esta tesis sugieren un papel de TCERG1 en procesos apoptóticos a través de la regulación del *splicing* alternativo de genes clave en las rutas de muerte celular, probablemente a través del acoplamiento transcripción-*splicing*. Investigaciones futuras permitirán discernir si este efecto ocurre de manera globalizada en otros genes de las vías de apoptosis y si afecta a otros procesos celulares como desarrollo o cáncer. Hacen falta experimentos globales de tipo genómico a gran escala para determinar si la elongación de la RNAPII se ve afectada en respuesta a variaciones en los niveles de expresión o de activación de TCERG1 y esto conlleva cambios en los patrones de *splicing* alternativo de genes importantes para los diferentes procesos celulares.

## ***CONCLUSIONES***

- 1- TCERG1 regula el *splicing* alternativo de *Bcl-x* de manera dependiente del promotor. El efecto neto de TCERG1 es favorecer la isoforma pro-apoptótica *Bcl-x<sub>S</sub>*.
- 2- TCERG1 promueve la utilización del sitio 5' de *splicing* *x<sub>S</sub>* a través del elemento regulador SB1 situado en el exón 2 de *Bcl-x*. La región 23 dentro de este elemento media el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de *Bcl-x*.
- 3- La distribución de la polimerasa a lo largo del gen se ve afectada por alteraciones en los niveles de TCERG1. El silenciamiento de TCERG1 favorece la acumulación de moléculas de RNAPII alrededor del elemento SB1 mientras que la sobre-expresión la impide favoreciendo la distribución de las polimerasas hacia regiones más distales del gen.
- 4- TCERG1 aumenta la procesividad de la RNAPII en la transcripción del gen *Bcl-x*.
- 5- TCERG1 influye en la regulación del *splicing* alternativo del gen *Fas/CD95*, favoreciendo la isoforma pro-apoptótica del receptor soluble.
- 6- TCERG1 favorece la apoptosis inducida por la estaurosporina. La sobre-expresión de TCERG1 aumenta la sensibilidad al estímulo mientras que el silenciamiento reduce el porcentaje de apoptosis al alterar el *splicing* alternativo de las isoformas del gen *Bcl-x*.
- 7- TCERG1 favorece la apoptosis inducida por anti-*Fas*. El silenciamiento de TCERG1 reduce la apoptosis y este efecto tiene lugar, al menos en parte, a través de la regulación del *splicing* alternativo del receptor *Fas*.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Abovich, N. and Rosbash, M. Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* **89** (1997), pp. 403-12.
- Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9** (2008), pp. 204-17.
- Ahn, S.H., Kim, M. and Buratowski, S. Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* **13** (2004), pp. 67-76.
- Akgul, C., Moulding, D.A. and Edwards, S.W. Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61** (2004), pp. 2189-99.
- Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D. and Ansari, A.Z. TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* **34** (2009), pp. 387-93.
- Al-Maini, M.H., Mountz, J.D., Al-Mohri, H.A., El-Ageb, E.M., Al-Riyami, B.M., Svenson, K.L., Zhou, T. and Richens, E.R. Serum levels of soluble Fas correlate with indices of organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **9** (2000), pp. 132-9.
- Alexander, R.D., Innocente, S.A., Barrass, J.D. and Beggs, J.D. Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Mol Cell* **40** (2010), pp. 582-93.
- Allemand, E., Guil, S., Myers, M., Moscat, J., Caceres, J.F. and Krainer, A.R. Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005), pp. 3605-10.
- Allen, M., Friedler, A., Schon, O. and Bycroft, M. The structure of an FF domain from human HYPB/FBP11. *J Mol Biol* **323** (2002), pp. 411-6.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A.E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51** (1964), pp. 786-94.
- Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M. and Ingles, C.J. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* **42** (1985), pp. 599-610.
- Allo, M., Buggiano, V., Fededa, J.P., Petrillo, E., Schor, I., de la Mata, M., Agirre, E., Plass, M., Eyra, E., Elela, S.A., Klinck, R., Chabot, B. and Kornblihtt, A.R. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16** (2009), pp. 717-24.
- Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C. and Komorowski, J. Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Res* **19** (2009), pp. 1732-41.
- Andresen, J.M., Gayan, J., Cherny, S.S., Brocklebank, D., Alkorta-Aranburu, G., Addis, E.A., Cardon, L.R., Housman, D.E. and Wexler, N.S. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *J Med Genet* **44** (2007), pp. 44-50.
- Arango, M., Holbert, S., Zala, D., Brouillet, E., Pearson, J., Regulier, E., Thakur, A.K., Aebischer, P., Wetzel, R., Deglon, N. and Neri, C. CA150 expression delays striatal cell death in overexpression and knock-in conditions for mutant huntingtin neurotoxicity. *J Neurosci* **26** (2006), pp. 4649-59.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Kang, Y.K., Larkin, K., Lee, J.W., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004), pp. 2270-4.

## ***Bibliografia***

- Bannister, A.J., Schneider, R. and Kouzarides, T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* **109** (2002), pp. 801-6.
- Barash, Y., Calarco, J.A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B.J. and Frey, B.J. Deciphering the splicing code. *Nature* **465** (2010), pp. 53-9.
- Barboric, M., Lenasi, T., Chen, H., Johansen, E.B., Guo, S. and Peterlin, B.M. 7SK snRNP/P-TEFb couples transcription elongation with alternative splicing and is essential for vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (2009), pp. 7798-803.
- Bartkowiak, B., Liu, P., Phatnani, H.P., Fuda, N.J., Cooper, J.J., Price, D.H., Adelman, K., Lis, J.T. and Greenleaf, A.L. CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev* **24** (2010), pp. 2303-16.
- Bartolomei, M.S., Halden, N.F., Cullen, C.R. and Corden, J.L. Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **8** (1988), pp. 330-9.
- Baskaran, R., Dahmus, M.E. and Wang, J.Y. Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993), pp. 11167-71.
- Batsche, E., Yaniv, M. and Muchardt, C. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* **13** (2006), pp. 22-9.
- Bauren, G. and Wieslander, L. Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* **76** (1994), pp. 183-92.
- Bentley, D.L. and Groudine, M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* **321** (1986), pp. 702-6.
- Berglund, J.A., Abovich, N. and Rosbash, M. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev* **12** (1998), pp. 858-67.
- Berglund, J.A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R. and Rosbash, M. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89** (1997), pp. 781-7.
- Beyer, A.L. and Osheim, Y.N. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev* **2** (1988), pp. 754-65.
- Bird, G., Zorio, D.A. and Bentley, D.L. RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation. *Mol Cell Biol* **24** (2004), pp. 8963-9.
- Boireau, S., Maiuri, P., Basyuk, E., de la Mata, M., Knezevich, A., Pradet-Balade, B., Backer, V., Kornblihtt, A., Marcello, A. and Bertrand, E. The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. *J Cell Biol* **179** (2007), pp. 291-304.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C.B. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74** (1993), pp. 597-608.
- Boise, L.H. and Thompson, C.B. Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (1997), pp. 3759-64.
- Bonnal, S., Martinez, C., Forch, P., Bachi, A., Wilm, M. and Valcarcel, J. RBM5/Luca-15/H37 regulates Fas alternative splice site pairing after exon definition. *Molecular cell* **32** (2008), pp. 81-95.

- Bourquin, J.P., Stagljar, I., Meier, P., Moosmann, P., Silke, J., Baechli, T., Georgiev, O. and Schaffner, W. A serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* **25** (1997), pp. 2055-61.
- Bres, V., Gomes, N., Pickle, L. and Jones, K.A. A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev* **19** (2005), pp. 1211-26.
- Bres, V., Yoh, S.M. and Jones, K.A. The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol* **20** (2008), pp. 334-40.
- Buratowski, S. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* **36** (2009), pp. 541-6.
- Caceres, J.F. and Kornblihtt, A.R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* **18** (2002), pp. 186-93.
- Cadena, D.L. and Dahmus, M.E. Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **262** (1987), pp. 12468-74.
- Calvo, O. and Manley, J.L. Evolutionarily conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Mol Cell* **7** (2001), pp. 1013-23.
- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P. and Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of cell science* **115** (2002), pp. 4727-34.
- Carrillo Oesterreich, F., Preibisch, S. and Neugebauer, K.M. Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Mol Cell* **40** (2010), pp. 571-81.
- Carty, S.M., Goldstrohm, A.C., Sune, C., Garcia-Blanco, M.A. and Greenleaf, A.L. Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000), pp. 9015-20.
- Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R. and Ruberti, G. Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *Journal of immunology* **156** (1996), pp. 13-7.
- Clarke, M.F., Apel, I.J., Benedict, M.A., Eipers, P.G., Sumantran, V., Gonzalez-Garcia, M., Doedens, M., Fukunaga, N., Davidson, B., Dick, J.E., Minn, A.J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Wicha, M. and Nunez, G. A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (1995), pp. 11024-8.
- Cloutier, P., Toutant, J., Shkreta, L., Goekjian, S., Revil, T. and Chabot, B. Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x. *J Biol Chem* **283** (2008), pp. 21315-24.
- Comelli, M., Genero, N. and Mavelli, I. Caspase-independent apoptosis in Friend's erythroleukemia cells: role of mitochondrial ATP synthesis impairment in relocation of apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **41** (2009), pp. 49-59.
- Conaway, R.C. and Conaway, J.W. Function and regulation of the Mediator complex. *Curr Opin Genet Dev* **21** (2011), pp. 225-30.
- Corden, J.L. Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15** (1990), pp. 383-7.

## ***Bibliografía***

- Corden, J.L., Cadena, D.L., Ahearn, J.M., Jr. and Dahmus, M.E. A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (1985), pp. 7934-8.
- Core, L.J. and Lis, J.T. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* **319** (2008), pp. 1791-2.
- Core, L.J., Waterfall, J.J. and Lis, J.T. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* **322** (2008), pp. 1845-8.
- Cote, J., Boisvert, F.M., Boulanger, M.C., Bedford, M.T. and Richard, S. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Molecular biology of the cell* **14** (2003), pp. 274-87.
- Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.G. and Martin, S.J. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res* **10** (1990), pp. 1153-9.
- Coulter, D.E. and Greenleaf, A.L. A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro. *J Biol Chem* **260** (1985), pp. 13190-8.
- Cramer, P. Common structural features of nucleic acid polymerases. *Bioessays* **24** (2002), pp. 724-9.
- Cramer, P., Caceres, J.F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A.F., Baralle, F.E. and Kornblihtt, A.R. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* **4** (1999), pp. 251-8.
- Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E. and Kornblihtt, A.R. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (1997), pp. 11456-60.
- Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B. and Hannun, Y.A. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* **277** (2002a), pp. 12587-95.
- Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B. and Hannun, Y.A. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* **277** (2002b), pp. 12587-95.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E. and Eick, D. Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* **318** (2007), pp. 1780-2.
- Chapman, R.D., Palancade, B., Lang, A., Bensaude, O. and Eick, D. The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* **32** (2004), pp. 35-44.
- Chavez, S., Garcia-Rubio, M., Prado, F. and Aguilera, A. Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21** (2001), pp. 7054-64.
- Chen, Y., Chafin, D., Price, D.H. and Greenleaf, A.L. *Drosophila* RNA polymerase II mutants that affect transcription elongation. *J Biol Chem* **271** (1996), pp. 5993-9.
- Cheng, D., Cote, J., Shaaban, S. and Bedford, M.T. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol Cell* **25** (2007), pp. 71-83.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. and Korsmeyer, S.J. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules

- preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8** (2001), pp. 705-11.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J. and Mountz, J.D. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263** (1994), pp. 1759-62.
- Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M. and Reed, R. Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. *Genes Dev* **20** (2006), pp. 1100-9.
- Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M.P., Krainer, A.R., Gygi, S.P. and Reed, R. SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **26** (2007), pp. 867-81.
- de Almeida, S.F., Grosso, A.R., Koch, F., Fenouil, R., Carvalho, S., Andrade, J., Levezinho, H., Gut, M., Eick, D., Gut, I., Andrau, J.C., Ferrier, P. and Carmo-Fonseca, M. Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36. *Nat Struct Mol Biol* **18** (2011), pp. 977-83.
- de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D. and Kornblihtt, A.R. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell* **12** (2003), pp. 525-32.
- de la Mata, M. and Kornblihtt, A.R. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat Struct Mol Biol* **13** (2006), pp. 973-80.
- Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C.L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H. and Luhrmann, R. Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol Cell Biol* **26** (2006), pp. 5528-43.
- Dhami, P., Saffrey, P., Bruce, A.W., Dillon, S.C., Chiang, K., Bonhoure, N., Koch, C.M., Bye, J., James, K., Foad, N.S., Ellis, P., Watkins, N.A., Ouwehand, W.H., Langford, C., Andrews, R.M., Dunham, I. and Vetrie, D. Complex exon-intron marking by histone modifications is not determined solely by nucleosome distribution. *PLoS One* **5**, p. e12339.
- Dowling, P., Shang, G., Raval, S., Menonna, J., Cook, S. and Husar, W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* **184** (1996), pp. 1513-8.
- Du, L. and Warren, S.L. A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* **136** (1997), pp. 5-18.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N. and Youle, R.J. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* **145** (2012), pp. 104-16.
- Egloff, S. and Murphy, S. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* **24** (2008), pp. 280-8.
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D. and Murphy, S. Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318** (2007), pp. 1777-9.
- Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44** (1986), pp. 817-29.
- Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P.W., Kobayashi, R., Blencowe, B.J. and Ingles, C.J. Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA* **8** (2002), pp. 1102-11.

- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391** (1998), pp. 43-50.
- Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W. and Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380** (1996), pp. 723-6.
- Eperon, L.P., Graham, I.R., Griffiths, A.D. and Eperon, I.C. Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? *Cell* **54** (1988), pp. 393-401.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A. and Cocco, L. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochemical and biophysical research communications* **193** (1993), pp. 19-25.
- Ferreira, I.L., Nascimento, M.V., Ribeiro, M., Almeida, S., Cardoso, S.M., Grazina, M., Pratas, J., Santos, M.J., Januario, C., Oliveira, C.R. and Rego, A.C. Mitochondrial-dependent apoptosis in Huntington's disease human cybrids. *Exp Neurol* **222** (2010), pp. 243-55.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation* **10** (2003), pp. 76-100.
- Fong, N., Bird, G., Vigneron, M. and Bentley, D.L. A 10 residue motif at the C-terminus of the RNA pol II CTD is required for transcription, splicing and 3' end processing. *EMBO J* **22** (2003), pp. 4274-82.
- Fong, Y.W. and Zhou, Q. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* **414** (2001), pp. 929-33.
- Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P. and Valcarcel, J. The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell* **6** (2000), pp. 1089-98.
- Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P.H. and Lavrik, I.N. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *The Journal of cell biology* **190** (2010), pp. 377-89.
- Fridman, J.S., Rehemtulla, A., Hofmann, A., Blau, H.M. and Maybaum, J. Expression of Bcl-XS alters cytokinetics and decreases clonogenic survival in K12 rat colon carcinoma cells. *Oncogene* **17** (1998), pp. 2981-91.
- Fuchs, Y. and Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147** (2011), pp. 742-58.
- Garcia-Blanco, M.A., Baraniak, A.P. and Lasda, E.L. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* **22** (2004), pp. 535-46.
- Garneau, D., Revil, T., Fiset, J.F. and Chabot, B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem* **280** (2005), pp. 22641-50.
- Gerber, H.P., Hagmann, M., Seipel, K., Georgiev, O., West, M.A., Litingtung, Y., Schaffner, W. and Corden, J.L. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* **374** (1995), pp. 660-2.
- Ghazi, A., Henis-Korenblit, S. and Kenyon, C. A transcription elongation factor that links signals from the reproductive system to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **5** (2009), p. e1000639.
- Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Lee, C., Ghosh, S.K., Collins, J.B., Li, L., Gilmour, D.S. and Adelman, K. NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression

- by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev* **22** (2008), pp. 1921-33.
- Gilmour, D.S. Promoter proximal pausing on genes in metazoans. *Chromosoma* **118** (2009), pp. 1-10.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J. and Bentley, D.L. RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat Struct Mol Biol* **15** (2008), pp. 71-8.
- Goldstrohm, A.C., Albrecht, T.R., Sune, C., Bedford, M.T. and Garcia-Blanco, M.A. The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1. *Mol Cell Biol* **21** (2001a), pp. 7617-28.
- Goldstrohm, A.C., Greenleaf, A.L. and Garcia-Blanco, M.A. Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene* **277** (2001b), pp. 31-47.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H. and Lavrik, I.N. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **280** (2005), pp. 14507-13.
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A. and Inagaki, M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* **7** (2002), pp. 11-7.
- Grillot, D.A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M.F. and Nunez, G. Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol* **158** (1997), pp. 4750-7.
- Gunderson, F.Q. and Johnson, T.L. Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genet* **5** (2009), p. e1000682.
- Hasegawa, J., Kamada, S., Kamiike, W., Shimizu, S., Imazu, T., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. Involvement of CPP32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer research* **56** (1996), pp. 1713-8.
- Hendrix, D.A., Hong, J.W., Zeitlinger, J., Rokhsar, D.S. and Levine, M.S. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008), pp. 7762-7.
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76** (1994), pp. 665-76.
- Hirose, Y. and Manley, J.L. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* **395** (1998), pp. 93-6.
- Hirose, Y., Tacke, R. and Manley, J.L. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **13** (1999), pp. 1234-9.
- Hnilicova, J., Hozeifi, S., Duskova, E., Icha, J., Tomankova, T. and Stanek, D. Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS One* **6** (2011), p. e16727.
- Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M. and Bustamante, C. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science* **325** (2009), pp. 626-8.
- Hoffman, B.E. and Grabowski, P.J. U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon. *Genes Dev* **6** (1992), pp. 2554-68.
- Holbert, S., I. D Nghien, T. Kiechle, A. Rosenblatt, C. Wellington, M.R. Hayden, R.L. Margolis, C.A. Ross, J. Dausset, R.J. Ferrante, and C. Neri The Gln-Ala repeat

- transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: Neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98** (2001), pp. 1811-1816.
- Hon, G., Wang, W. and Ren, B. Discovery and annotation of functional chromatin signatures in the human genome. *PLoS Comput Biol* **5** (2009), p. e1000566.
- Hoskins, A.A., Friedman, L.J., Gallagher, S.S., Crawford, D.J., Anderson, E.G., Wombacher, R., Ramirez, N., Cornish, V.W., Gelles, J. and Moore, M.J. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes. *Science* **331** (2011), pp. 1289-95.
- House, A.E. and Lynch, K.W. An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nat Struct Mol Biol* **13** (2006), pp. 937-44.
- Hsin, J.P., Sheth, A. and Manley, J.L. RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* **334**, pp. 683-6.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G. and Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (1997), pp. 3668-72.
- Huang, Y., Li, W., Yao, X., Lin, Q.J., Yin, J.W., Liang, Y., Heiner, M., Tian, B., Hui, J. and Wang, G. Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the MED23 Subunit. *Molecular cell* **45** (2012), pp. 459-69.
- Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszka, D.G. and Wu, H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* **104** (2001), pp. 781-90.
- Huff, J.T., Plocik, A.M., Guthrie, C. and Yamamoto, K.R. Reciprocal intronic and exonic histone modification regions in humans. *Nat Struct Mol Biol* **17** (2010), pp. 1495-9.
- Hughes, D.P. and Crispe, I.N. A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *The Journal of experimental medicine* **182** (1995), pp. 1395-401.
- Ip, J.Y., Schmidt, D., Pan, Q., Ramani, A.K., Fraser, A.G., Odom, D.T. and Blencowe, B.J. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome research* **21** (2011), pp. 390-401.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and Tschopp, J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388** (1997), pp. 190-5.
- Izban, M.G. and Luse, D.S. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev* **5** (1991), pp. 683-96.
- Izquierdo, J.M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D. and Valcarcel, J. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Molecular cell* **19** (2005), pp. 475-84.
- Izquierdo, J.M. and Valcarcel, J. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* **282** (2007), pp. 1539-43.
- Jablonski, J.A., Amelio, A.L., Giacca, M. and Caputi, M. The transcriptional transactivator Tat selectively regulates viral splicing. *Nucleic Acids Res* **38** (2010), pp. 1249-60.
- Jiang, Z.H., Zhang, W.J., Rao, Y. and Wu, J.Y. Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America **95** (1998), pp. 9155-60.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogues, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J.P., Werbajh, S.E., Srebrow, A. and Kornblihtt, A.R. Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J* **20** (2001), pp. 5759-68.
- Kadener, S., Fededa, J.P., Rosbash, M. and Kornblihtt, A.R. Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002), pp. 8185-90.
- Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S. and Yoshida, M. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* **3** (2007), pp. 576-83.
- Kameoka, S., Duque, P. and Konarska, M.M. p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *The EMBO journal* **23** (2004), pp. 1782-91.
- Kao, H.Y. and Siliciano, P.G. Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* **16** (1996), pp. 960-7.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E. and Hart, G.W. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* **268** (1993), pp. 10416-24.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26** (1972), pp. 239-57.
- Kim, S., Kim, H., Fong, N., Erickson, B. and Bentley, D.L. Pre-mRNA splicing is a determinant of histone H3K36 methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (2011), pp. 13564-9.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14** (1995), pp. 5579-88.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S. and Ahringer, J. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet* **41** (2009), pp. 376-81.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J. and Buratowski, S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14** (2000), pp. 2452-60.
- Kornblihtt, A.R., de la Mata, M., Fededa, J.P., Munoz, M.J. and Nogues, G. Multiple links between transcription and splicing. *RNA* **10** (2004), pp. 1489-98.
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128** (2007), pp. 693-705.
- Kraeva, R.I., Krastev, D.B., Roguev, A., Ivanova, A., Nedelcheva-Veleva, M.N. and Stoyanov, S.S. Stability of mRNA/DNA and DNA/DNA duplexes affects mRNA transcription. *PLoS One* **2** (2007), p. e290.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H.G., Irie, S., Fong, L. and Reed, J.C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer research* **54** (1994), pp. 5501-7.
- Kramer, A. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* **65** (1996), pp. 367-409.

## ***Bibliografia***

- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology* **21** (2001), pp. 8247-54.
- Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M. and Groudine, M. The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev* **6** (1992), pp. 2201-13.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17** (2005), pp. 525-35.
- Lajmanovich, A., Ribeyron, J.B., Florin, A., Fournier, A., Pasquier, M.A., Duley, S., Chauvet, M., Plumas, J., Bonnefoix, T., Gressin, R., Leroux, D. and Callanan, M.B. Identification, characterisation and regulation by CD40 activation of novel CD95 splice variants in CD95-apoptosis-resistant, human, B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Cell Res* **315** (2009), pp. 3281-93.
- Lamkanfi, M. and Kanneganti, T.D. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **42** (2010), pp. 21-4.
- Laspia, M.F., Rice, A.P. and Mathews, M.B. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59** (1989), pp. 283-92.
- Lee, C., Li, X., Hechmer, A., Eisen, M., Biggin, M.D., Venters, B.J., Jiang, C., Li, J., Pugh, B.F. and Gilmour, D.S. NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in Drosophila. *Mol Cell Biol* **28** (2008), pp. 3290-300.
- Lee, J., Zhou, J., Zheng, X., Cho, S., Moon, H., Loh, T.J., Jo, K. and Shen, H. Identification of a novel cis-element that regulates alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA. *Biochemical and biophysical research communications* (2012).
- Lee, J.S., Smith, E. and Shilatifard, A. The language of histone crosstalk. *Cell* **142** (2010), pp. 682-5.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. and Korsmeyer, S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2** (2002), pp. 183-92.
- Leu, S., Lin, Y.M., Wu, C.H. and Ouyang, P. Loss of Pnn expression results in mouse early embryonic lethality and cellular apoptosis through SRSF1-mediated alternative expression of Bcl-xS and ICA. *Journal of cell science* (2012).
- Levine, M. Paused RNA Polymerase II as a Developmental Checkpoint. *Cell* **145** (2010), pp. 502-11.
- Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128** (2007), pp. 707-19.
- Li, C.Y., Chu, J.Y., Yu, J.K., Huang, X.Q., Liu, X.J., Shi, L., Che, Y.C. and Xie, J.Y. Regulation of alternative splicing of Bcl-x by IL-6, GM-CSF and TPA. *Cell research* **14** (2004), pp. 473-9.
- Li, J. and Yuan, J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27** (2008), pp. 6194-206.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91** (1997), pp. 479-89.
- Licatalosi, D.D. and Darnell, R.B. Splicing regulation in neurologic disease. *Neuron* **52** (2006), pp. 93-101.

- Licatalosi, D.D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J.B. and Bentley, D.L. Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Mol Cell* **9** (2002), pp. 1101-11.
- Lin, K.T., Lu, R.M. and Tarn, W.Y. The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Mol Cell Biol* **24** (2004), pp. 9176-85.
- Lin, K.T., R.M. Lu, and W.Y. Tarn. The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **24** (2004), pp. 9176-9185.
- Lin, P.J., Jin, D.Y., Tie, J.K., Presnell, S.R., Straight, D.L. and Stafford, D.W. The putative vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase internal propeptide appears to be the propeptide binding site. *The Journal of biological chemistry* **277** (2002), pp. 28584-91.
- Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S. and Fu, X.D. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nature structural & molecular biology* **15** (2008), pp. 819-26.
- Lin, S. and Fu, X.D. SR proteins and related factors in alternative splicing. *Adv Exp Med Biol* **623** (2007), pp. 107-22.
- Lindenboim, L., Yuan, J. and Stein, R. Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells. *Oncogene* **19** (2000), pp. 1783-93.
- Lindsay, J., Esposti, M.D. and Gilmore, A.P. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta* **1813** (2011), pp. 532-9.
- Listerman, I., Sapra, A.K. and Neugebauer, K.M. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **13** (2006), pp. 815-22.
- Liu, C., Cheng, J. and Mountz, J.D. Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation. *The Biochemical journal* **310** ( Pt 3) (1995), pp. 957-63.
- Lo, C.W., Kaida, D., Nishimura, S., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Taoka, H., Ishigami, K., Watanabe, H., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S. and Yoshida, M. Inhibition of splicing and nuclear retention of pre-mRNA by spliceostatin A in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **364** (2007), pp. 573-7.
- Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L. and Chakravarti, D. Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Mol Cell* **33** (2009), pp. 450-61.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.M. and Reinberg, D. Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358** (1992), pp. 641-5.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R. and Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144** (2011), pp. 16-26.
- Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M. and Misteli, T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* **327** (2010), pp. 996-1000.
- Lukong, K.E., Larocque, D., Tyner, A.L. and Richard, S. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* **280** (2005), pp. 38639-47.

## ***Bibliografia***

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94** (1998), pp. 481-90.
- MacCarthy-Morrogh, L., Wood, L., Brimmell, M., Johnson, P.W. and Packham, G. Identification of a novel human BCL-X promoter and exon. *Oncogene* **19** (2000), pp. 5534-8.
- MacMillan, A.M., Query, C.C., Allerson, C.R., Chen, S., Verdine, G.L. and Sharp, P.A. Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region. *Genes Dev* **8** (1994), pp. 3008-20.
- Majno, G. and Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146** (1995), pp. 3-15.
- Makaroy, E.M., Makarova, O.V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C.L., Wilm, M. and Luhrmann, R. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298** (2002), pp. 2205-8.
- Mandal, S.S., Cho, H., Kim, S., Cabane, K. and Reinberg, D. FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation. *Molecular and cellular biology* **22** (2002), pp. 7543-52.
- Maniatis, T. and Reed, R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416** (2002), pp. 499-506.
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J. and Lemoine, N.R. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Molecular and cellular biology* **22** (2002), pp. 3577-89.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z. and Price, D.H. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* **271** (1996), pp. 27176-83.
- Marshall, N.F. and Price, D.H. Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* **270** (1995), pp. 12335-8.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lymar, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T. and Roeder, R.G. Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* **21** (2001), pp. 6782-95.
- Massiello, A., Roesser, J.R. and Chalfant, C.E. SAP155 Binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20** (2006), pp. 1680-2.
- Massiello, A., Salas, A., Pinkerman, R.L., Roddy, P., Roesser, J.R. and Chalfant, C.E. Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide. *The Journal of biological chemistry* **279** (2004), pp. 15799-804.
- Matlin, A.J. and Moore, M.J. Spliceosome assembly and composition. *Adv Exp Med Biol* **623** (2007), pp. 14-35.
- Matter, N., Herrlich, P. and Konig, H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420** (2002), pp. 691-5.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S. and Bentley, D.L. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* **11** (1997a), pp. 3306-18.

- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M. and Bentley, D.L. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385** (1997b), pp. 357-61.
- McFie, P.J., Wang, G.L., Timchenko, N.A., Wilson, H.L., Hu, X. and Roesler, W.J. Identification of a co-repressor that inhibits the transcriptional and growth-arrest activities of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* **281** (2006), pp. 18069-80.
- Meinhart, A. and Cramer, P. Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* **430** (2004), pp. 223-6.
- Meininghaus, M., Chapman, R.D., Horndasch, M. and Eick, D. Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription. *J Biol Chem* **275** (2000), pp. 24375-82.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M.A., White, E. and Saikumar, P. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* **278** (2003), pp. 5367-76.
- Missra, A. and Gilmour, D.S. Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, pp. 11301-6.
- Misteli, T. and Spector, D.L. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* **3** (1999), pp. 697-705.
- Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M. and Spiegelman, B.M. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* **6** (2000), pp. 307-16.
- Montanuy, I., Torremocha, R., Hernandez-Munain, C. and Sune, C. Promoter influences transcription elongation: TATA-box element mediates the assembly of processive transcription complexes responsive to cyclin-dependent kinase 9. *J Biol Chem* **283** (2008), pp. 7368-78.
- Moore, M.J., Wang, Q., Kennedy, C.J. and Silver, P.A. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* **142** (2010), pp. 625-36.
- Morris, D.P. and Greenleaf, A.L. The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **275** (2000), pp. 39935-43.
- Mouhamad, S., Besnault, L., Auffredou, M.T., Leprince, C., Bourgeade, M.F., Leca, G. and Vazquez, A. B cell receptor-mediated apoptosis of human lymphocytes is associated with a new regulatory pathway of Bim isoform expression. *Journal of immunology* **172** (2004), pp. 2084-91.
- Munoz, M.J., Perez Santangelo, M.S., Paronetto, M.P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., Bird, G., Bentley, D., Bertrand, E. and Kornblihtt, A.R. DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* **137** (2009), pp. 708-20.
- Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Bushnell, D.A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kornberg, R.D. The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **12** (1998), pp. 45-54.

## ***Bibliografia***

- Nagaike, T., Logan, C., Hotta, I., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M. and Manley, J.L. Transcriptional activators enhance polyadenylation of mRNA precursors. *Mol Cell* **41** (2011), pp. 409-18.
- Natalizio, B.J. and Garcia-Blanco, M.A. In vitro coupled transcription splicing. *Methods* **37** (2005), pp. 314-22.
- Natalizio, B.J., Robson-Dixon, N.D. and Garcia-Blanco, M.A. The Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II Is Not Sufficient to Enhance the Efficiency of Pre-mRNA Capping or Splicing in the Context of a Different Polymerase. *J Biol Chem* **284** (2009), pp. 8692-702.
- Nechaev, S., Fargo, D.C., dos Santos, G., Liu, L., Gao, Y. and Adelman, K. Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* **327** (2010), pp. 335-8.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. and Mann, M. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* **20** (1998), pp. 46-50.
- Neugebauer, K.M. On the importance of being co-transcriptional. *J Cell Sci* **115** (2002), pp. 3865-71.
- Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D. and Kornblihtt, A.R. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J Biol Chem* **277** (2002), pp. 43110-4.
- Nogues, G., Munoz, M.J. and Kornblihtt, A.R. Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength. *J Biol Chem* **278** (2003), pp. 52166-71.
- Nonet, M., Scafe, C., Sexton, J. and Young, R. Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis. *Mol Cell Biol* **7** (1987), pp. 1602-11.
- Norberg, E., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and biophysical research communications* **396** (2010), pp. 95-100.
- O'Brien, T. and Lis, J.T. RNA polymerase II pauses at the 5' end of the transcriptionally induced *Drosophila* hsp70 gene. *Mol Cell Biol* **11** (1991), pp. 5285-90.
- Ohkura, N., Takahashi, M., Yaguchi, H., Nagamura, Y. and Tsukada, T. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1, affects pre-mRNA splicing in an isoform-specific manner. *J Biol Chem* **280** (2005), pp. 28927-35.
- Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B. and Recant, W.M. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *The cancer journal from Scientific American* **3** (1997), pp. 230-7.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* **407** (2000), pp. 471-5.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J. and Blencowe, B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* **40** (2008), pp. 1413-5.
- Pandya-Jones, A. and Black, D.L. Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons. *RNA* **15** (2009), pp. 1896-908.
- Panning, B. and Taatjes, D.J. Transcriptional regulation: it takes a village. *Molecular cell* **31** (2008), pp. 622-9.

- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E. and Garrido, C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications* **304** (2003), pp. 505-12.
- Paronetto, M.P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C.E. and Sette, C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J Cell Biol* **176** (2007), pp. 929-39.
- Paronetto, M.P., Minana, B. and Valcarcel, J. The ewing sarcoma protein regulates DNA damage-induced alternative splicing. *Mol Cell* **43** (2011), pp. 353-68.
- Pearson, J.L., Robinson, T.J., Munoz, M.J., Kornblihtt, A.R. and Garcia-Blanco, M.A. Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing. *J Biol Chem* **283** (2008), pp. 7949-61.
- Pecci, A., Viegas, L.R., Baranao, J.L. and Beato, M. Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene. *J Biol Chem* **276** (2001), pp. 21062-9.
- Peckham, H.E., Thurman, R.E., Fu, Y., Stamatoyannopoulos, J.A., Noble, W.S., Struhl, K. and Weng, Z. Nucleosome positioning signals in genomic DNA. *Genome Res* **17** (2007), pp. 1170-7.
- Perales, R. and Bentley, D. "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol Cell* **36** (2009), pp. 178-91.
- Peter, M.E. and Krammer, P.H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation* **10** (2003), pp. 26-35.
- Peterlin, B.M. and Price, D.H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* **23** (2006), pp. 297-305.
- Phatnani, H.P. and Greenleaf, A.L. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* **20** (2006), pp. 2922-36.
- Piacentini, L., Fanti, L., Negri, R., Del Vescovo, V., Fatica, A., Altieri, F. and Pimpinelli, S. Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in *Drosophila*. *PLoS Genet* **5** (2009), p. e1000670.
- Price, D.H. Poised polymerases: on your mark...get set...go! *Mol Cell* **30** (2008), pp. 7-10.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I. and Mann, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* **12** (2002), pp. 1231-45.
- Rasmussen, E.B. and Lis, J.T. In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993), pp. 7923-7.
- Renshaw, S.A., Dempsey, C.E., Barnes, F.A., Bagstaff, S.M., Dower, S.K., Bingle, C.D. and Whyte, M.K. Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene. *The Journal of biological chemistry* **279** (2004a), pp. 2846-55.
- Renshaw, S.A., Dempsey, C.E., Barnes, F.A., Bagstaff, S.M., Dower, S.K., Bingle, C.D. and Whyte, M.K. Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene. *J Biol Chem* **279** (2004b), pp. 2846-55.
- Resnekov, O., Kessler, M. and Aloni, Y. RNA secondary structure is an integral part of the in vitro mechanism of attenuation in simian virus 40. *J Biol Chem* **264** (1989), pp. 9953-9.
- Revil, T., Pelletier, J., Toutant, J., Cloutier, A. and Chabot, B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *J Biol Chem* **284** (2009), pp. 21458-67.

## ***Bibliografía***

- Revil, T., Toutant, J., Shkreta, L., Garneau, D., Cloutier, P. and Chabot, B. Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Mol Cell Biol* **27** (2007), pp. 8431-41.
- Rintala-Maki, N.D., Abrasonis, V., Burd, M. and Sutherland, L.C. Genetic instability of RBM5/LUCA-15/H37 in MCF-7 breast carcinoma sublines may affect susceptibility to apoptosis. *Cell biochemistry and function* **22** (2004), pp. 307-13.
- Rintala-Maki, N.D. and Sutherland, L.C. LUCA-15/RBM5, a putative tumour suppressor, enhances multiple receptor-initiated death signals. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **9** (2004), pp. 475-84.
- Robberson, B.L., Cote, G.J. and Berget, S.M. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* **10** (1990), pp. 84-94.
- Roberts, G.C., Gooding, C., Mak, H.Y., Proudfoot, N.J. and Smith, C.W. Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res* **26** (1998), pp. 5568-72.
- Roberts, J.W., Shankar, S. and Filter, J.J. RNA polymerase elongation factors. *Annu Rev Microbiol* **62** (2008), pp. 211-33.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13** (1999), pp. 3179-84.
- Roeder, R.G. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* **579** (2005), pp. 909-15.
- Roesler, J., Izquierdo, J.M., Ryser, M., Rosen-Wolff, A., Gahr, M., Valcarcel, J., Lenardo, M.J. and Zheng, L. Haploinsufficiency, rather than the effect of an excessive production of soluble CD95 (CD95{Delta}TM), is the basis for ALPS Ia in a family with duplicated 3' splice site AG in CD95 intron 5 on one allele. *Blood* **106** (2005), pp. 1652-9.
- Rosonina, E. and Blencowe, B.J. Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3'-end cleavage. *RNA* **10** (2004), pp. 581-9.
- Rosonina, E., Ip, J.Y., Calarco, J.A., Bakowski, M.A., Emili, A., McCracken, S., Tucker, P., Ingles, C.J. and Blencowe, B.J. Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo. *Mol Cell Biol* **25** (2005), pp. 6734-46.
- Rougvie, A.E. and Lis, J.T. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* **54** (1988), pp. 795-804.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *The EMBO journal* **21** (2002), pp. 1967-77.
- Saint-Andre, V., Batsche, E., Rachez, C. and Muchardt, C. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma favor inclusion of alternative exons. *Nat Struct Mol Biol* **18** (2011), pp. 337-44.
- Salvesen, G.S. and Duckett, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3** (2002), pp. 401-10.
- Sanchez-Alvarez, M., Goldstrohm, A.C., Garcia-Blanco, M.A. and Sune, C. Human transcription elongation factor CA150 localizes to splicing factor-rich nuclear speckles and assembles transcription and splicing components into complexes through its amino and carboxyl regions. *Mol Cell Biol* **26** (2006), pp. 4998-5014.

- Sanchez-Alvarez, M., Montes, M., Sanchez-Hernandez, N., Hernandez-Munain, C. and Sune, C. Differential effects of sumoylation on transcription and alternative splicing by transcription elongation regulator 1 (TCERG1). *J Biol Chem* **285** (2010), pp. 15220-33.
- Sanchez-Hernandez, N., Ruiz, L., Sanchez-Alvarez, M., Montes, M., Macias, M.J., Hernandez-Munain, C. and Sune, C. The FF4 and FF5 domains of transcription elongation regulator 1 (TCERG1) target proteins to the periphery of speckles. *J Biol Chem* (2012).
- Saraste, A. and Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* **45** (2000), pp. 528-37.
- Schneider, M., Will, C.L., Anokhina, M., Tazi, J., Urlaub, H. and Luhrmann, R. Exon definition complexes contain the tri-snRNP and can be directly converted into B-like pre-catalytic splicing complexes. *Mol Cell* **38** (2010), pp. 223-35.
- Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Allo, M. and Kornblihtt, A.R. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (2009), pp. 4325-30.
- Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S. and Bentley, D. Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* **14** (2000), pp. 2435-40.
- Schwartz, S., Meshorer, E. and Ast, G. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol* **16** (2009), pp. 990-5.
- Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell* **19** (2005a), pp. 1-13.
- Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **19** (2005b), pp. 1-13.
- Seol, D.W. and Billiar, T.R. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **274** (1999), pp. 2072-6.
- Sevilla, L., Zaldumbide, A., Pognonec, P. and Boulukos, K.E. Transcriptional regulation of the bcl-x gene encoding the anti-apoptotic Bcl-xL protein by Ets, Rel/NFkappaB, STAT and AP1 transcription factor families. *Histol Histopathol* **16** (2001), pp. 595-601.
- Sharma, S., Kohlstaedt, L.A., Damianov, A., Rio, D.C. and Black, D.L. Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat Struct Mol Biol* **15** (2008), pp. 183-91.
- Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell* **9** (2002), pp. 459-70.
- Shin, C. and Manley, J.L. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5** (2004), pp. 727-38.
- Shkreta, L., Michelle, L., Toutant, J., Tremblay, M.L. and Chabot, B. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem* **286** (2010), pp. 331-40.
- Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R. and Oberdoerffer, S. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479** (2011), pp. 74-9.
- Shukla, S. and Oberdoerffer, S. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochimica et biophysica acta* (2012).

- Shultz, J.C., Vu, N., Shultz, M.D., Mba, M.U., Shapiro, B.A. and Chalfant, C.E. The Proto-oncogene PKC $\alpha$  Regulates the Alternative Splicing of Bcl-x Pre-mRNA. *Mol Cancer Res* (2012).
- Sims, R.J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L. and Reinberg, D. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **28** (2007), pp. 665-76.
- Sims, R.J., 3rd, Rojas, L.A., Beck, D., Bonasio, R., Schuller, R., Drury, W.J., 3rd, Eick, D. and Reinberg, D. The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* **332** (2011), pp. 99-103.
- Singh, J. and Padgett, R.A. Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat Struct Mol Biol* **16** (2009), pp. 1128-33.
- Singh, S. and Dikshit, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev* **54** (2007), pp. 233-50.
- Sinha, R., Allemand, E., Zhang, Z., Karni, R., Myers, M.P. and Krainer, A.R. Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol* **30** (2010), pp. 2762-74.
- Smith, M.J., Kulkarni, S. and Pawson, T. FF domains of CA150 bind transcription and splicing factors through multiple weak interactions. *Mol Cell Biol* **24** (2004), pp. 9274-85.
- Soares, L.M., Zanier, K., Mackereth, C., Sattler, M. and Valcarcel, J. Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK. *Science* **312** (2006), pp. 1961-5.
- Spies, N., Nielsen, C.B., Padgett, R.A. and Burge, C.B. Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Mol Cell* **36** (2009), pp. 245-54.
- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. and Alnemri, E.S. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410** (2001), pp. 112-6.
- Strasser, A., Jost, P.J. and Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30** (2009), pp. 180-92.
- Sugiyama, K., Sugiura, K., Hara, T., Sugimoto, K., Shima, H., Honda, K., Furukawa, K., Yamashita, S. and Urano, T. Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene* **21** (2002), pp. 3103-11.
- Sumantran, V.N., Ealovega, M.W., Nunez, G., Clarke, M.F. and Wicha, M.S. Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research* **55** (1995), pp. 2507-10.
- Sun, X., Zhao, J., Kylberg, K., Soop, T., Palka, K., Sonnhammer, E., Visa, N., Alzhanova-Ericsson, A.T. and Daneholt, B. Conspicuous accumulation of transcription elongation repressor hrp130/CA150 on the intron-rich Balbiani ring 3 gene. *Chromosoma* **113** (2004), pp. 244-57.
- Sun, Y.F., Yu, L.Y., Saarma, M., Timmusk, T. and Arumae, U. Neuron-specific Bcl-2 homology 3 domain-only splice variant of Bak is anti-apoptotic in neurons, but pro-apoptotic in non-neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* **276** (2001), pp. 16240-7.
- Sune, C. and Garcia-Blanco, M.A. Transcriptional cofactor CA150 regulates RNA polymerase II elongation in a TATA-box-dependent manner. *Molecular and cellular biology* **19** (1999), pp. 4719-28.
- Sune, C., Hayashi, T., Liu, Y., Lane, W.S., Young, R.A. and Garcia-Blanco, M.A. CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is

- involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* **17** (1997), pp. 6029-39.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81** (1995), pp. 801-9.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcarcel, J. and Guigo, R. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol* **16** (2009), pp. 996-1001.
- Tous, C., Rondon, A.G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Aguilera, C., Luna, R. and Aguilera, A. A novel assay identifies transcript elongation roles for the Nup84 complex and RNA processing factors. *EMBO J* **30** (2011), pp. 1953-64.
- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Krainer, A.R., Moscat, J. and Caceres, J.F. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol* **149** (2000), pp. 307-16.
- Vargas, D.Y., Shah, K., Batish, M., Levandoski, M., Sinha, S., Marras, S.A., Schedl, P. and Tyagi, S. Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell* **147** (2011), pp. 1054-65.
- Vaux, D.L. Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1813** (2011), pp. 546-50.
- Viegas, L.R., Vicent, G.P., Baranao, J.L., Beato, M. and Pecci, A. Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. *J Biol Chem* **279** (2004), pp. 9831-9.
- Wahl, M.C., Will, C.L. and Luhrmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136** (2009), pp. 701-18.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P. and Burge, C.B. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456** (2008), pp. 470-6.
- Wang, G.S. and Cooper, T.A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* **8** (2007), pp. 749-61.
- Wang, K.C., Cheng, A.L., Chuang, S.E., Hsu, H.C. and Su, I.J. Retinoic acid-induced apoptotic pathway in T-cell lymphoma: Identification of four groups of genes with differential biological functions. *Exp Hematol* **28** (2000), pp. 1441-50.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. and Yuan, J. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78** (1994), pp. 739-50.
- Wang, Z. and Burge, C.B. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* **14** (2008), pp. 802-13.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14** (2000), pp. 2060-71.
- Wetterberg, I., Bauren, G. and Wieslander, L. The intranuclear site of excision of each intron in Balbiani ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA* **2** (1996), pp. 641-51.
- Wetzig, T., Petri, J.B., Mittag, M. and Hausteiner, U.F. Serum levels of soluble Fas/APO-1 receptor are increased in systemic sclerosis. *Archives of dermatological research* **290** (1998), pp. 187-90.

- Will, C.L. and Luhrmann, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **13** (2001), pp. 290-301.
- Witten, J.T. and Ule, J. Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. *Trends Genet* **27** (2011), pp. 89-97.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. and Youle, R.J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139** (1997), pp. 1281-92.
- Wu, J.Y. and Maniatis, T. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75** (1993), pp. 1061-70.
- Xing, Y., Johnson, C.V., Dobner, P.R. and Lawrence, J.B. Higher level organization of individual gene transcription and RNA splicing. *Science* **259** (1993), pp. 1326-30.
- Yang, X.J. and Seto, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26** (2007), pp. 5310-8.
- Yao, J., Ardehali, M.B., Fecko, C.J., Webb, W.W. and Lis, J.T. Intranuclear distribution and local dynamics of RNA polymerase II during transcription activation. *Mol Cell* **28** (2007), pp. 978-90.
- Yonaha, M. and Proudfoot, N.J. Specific transcriptional pausing activates polyadenylation in a coupled in vitro system. *Mol Cell* **3** (1999), pp. 593-600.
- Yonaha, M. and Proudfoot, N.J. Transcriptional termination and coupled polyadenylation in vitro. *EMBO J* **19** (2000), pp. 3770-7.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75** (1993), pp. 641-52.
- Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R.V., Gentile, C., Gebara, M. and Corden, J.L. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (1996), pp. 6975-80.
- Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S. and Greenleaf, A.L. The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (1988), pp. 3698-702.
- Zeng, C. and Berget, S.M. Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **20** (2000), pp. 8290-301.
- Zhang, J. and Corden, J.L. Identification of phosphorylation sites in the repetitive carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem* **266** (1991), pp. 2290-6.
- Zhou, H.L., Hinman, M.N., Barron, V.A., Geng, C., Zhou, G., Luo, G., Siegel, R.E. and Lou, H. Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (2011), pp. E627-35.
- Zhou, J., Liu, Y., Zhang, W., Popov, V.M., Wang, M., Pattabiraman, N., Sune, C., Cvekl, A., Wu, K., Jiang, J., Wang, C. and Pestell, R.G. Transcription elongation regulator 1 is a co-integrator of the cell fate determination factor Dachshund homolog 1.

***ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO***

## **Anexo I: Material Suplementario**

un kit comercial (*Dual Luciferase Assay*, Promega) según las indicaciones del fabricante.

### **Análisis de productos de *splicing in vivo* de los minigenes reporteros derivados del HIV-1.**

Para determinar el patrón de *splicing* se extrajo el RNA total de células HEK293T transfectadas transitoriamente con 1 µg de los minigenes reporteros (LTR1-leader o SV40-leader), 1 µg de los plásmidos de expresión de polimerasas resistentes a  $\alpha$ -amanitina (WT, wild type o hC4, lenta) y 1 µg de plásmido vacío o de expresión de TCERG1. Mediante RT-PCR se analizaron las isoformas de *splicing* generadas utilizando los oligonucleótidos 1544, 1543 y 1542. Los fragmentos se resolvieron en un gel de poli-acrilamida al 6%, a 200V durante 2 h en TBE 1x. El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio a 0.5 µg/ml durante 20 min. Tras un lavado con TBE 1x durante 10 min, el gel se analizó usando el GelDoc (Biorad) con el software QuantityOne (Biorad).

### **Ensayos de estabilidad del mRNA**

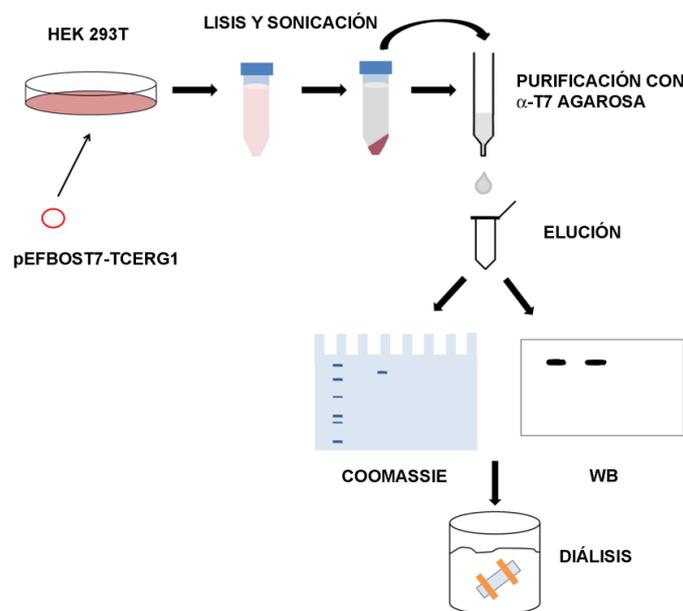
Aproximadamente  $5 \times 10^5$  células HEK293T se sembraron en placas de 60 mm de diámetro (Falcon, BD) el día previo a la transfección. Las células se transfectaron con 1.5 µg de vector vacío (pEFBOST7) o 1.5 µg del vector de expresión de TCERG1 (pEFBOST7-TCERG1). Aproximadamente 36 h después de la transfección, las células se trataron con DRB a una concentración de 50 µM para inhibir la transcripción. Se recogieron muestras a tiempos 0, 2, 4 y 6 h tras el tratamiento. Los oligonucleótidos para la detección específica del gen endógeno Bcl-x fueron: E2-fwd y E2-rev.

### **Purificación de proteína recombinante T7-TCERG1**

Para la purificación de proteína recombinante a partir de células HEK293T se siguió un protocolo previamente descrito (Cazalla et al., 2005) con algunas modificaciones (Figura S1). Seis placas de 100 mm de diámetro (Falcon, BD) se transfectaron con 20 µg del vector de expresión pEFBOST7-TCERG1 por placa utilizando el método de precipitación del  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ . Aproximadamente 48 h después de la transfección las células se lisaron con tampón de lisis frío (4°C) (50mM NaP pH.8, 0.5 M NaCl, 5mM  $\beta$ -glicerofosfato, 5mM KF, 0.1 Tween-20, 1x mezcla de inhibidores de proteasas, Roche) y se sonicaron 3 veces durante 30 segundos (*vibra-cell*, Sonics

materials) Los lisados se centrifugaron durante 20 min a 13.000 g. El sobrenadante se pasó 2 veces por una columna donde previamente se había añadido 1 ml al 50% de bolitas de agarosa unidas a anticuerpo anti-T7. Tras lavar la columna con 10 ml de tampón de lisis la proteína se eluyó en 10 etapas con 0.8 ml de tampón de elución (0.1M ácido cítrico pH.2.2, 5mM  $\beta$ -glicerofosfato, 5mM KF) cada una, recogiendo cada fracción en tubos donde previamente se habían añadido 0.2 ml de solución Tris-HCl pH. 8.8 para neutralizar el pH ácido del eluido. Se tomaron muestras del lisado total, del lisado tras su paso por la columna, después del lavado y de cada fracción del eluido. 10  $\mu$ l de cada muestra se resolvieron mediante electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 10% con un voltaje de 150 V durante 1 h 30 min, tras lo cual se tiñeron durante 25 min con una solución de tinción/fijación (TC: 0.0025% (p/v) Coomassie Blue R250, 45% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético) y se lavaron abundantemente con una solución LC (25% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético). El extracto total y la fracción donde se detectó la presencia de proteína se analizaron mediante *western blot*.

Para dejar las proteínas en condiciones adecuadas para los futuros ensayos, las fracciones del eluido donde se encontraba la proteína se dializaron en una solución de diálisis BC100 (20mM Tris pH 8, 100mM KCl, 0.2mM EDTA pH 8 y 20% glicerol). Tras la diálisis se analizó la proteína de nuevo mediante electroforesis y tinción de Coomassie.



**Figura S1.** Esquema del procedimiento seguido para la purificación de proteínas etiquetadas con el epítipo T7 mediante columnas de agarosa unidas a anticuerpos específicos para T7.

## **Información suplementaria**

### **Materiales y métodos**

#### **Plásmidos**

El vector LTR2-luc se generó mediante PCR utilizando los *primers* LTR2-Mlu y LTR2-Bgl para amplificar el LTR (*Long Terminal Repeat*) del HIV-2 para su posterior ligación en el vector de expresión de luciferasa pGL3 (Promega).

Las versiones de los plásmidos pEFBOST7CA150 con mutaciones puntuales en las dianas de SUMOilación: (K503R), (K608R) y (K503/608) fueron descritas previamente (Sanchez-Alvarez et al., 2010).

El vector de expresión de Tat-1, SV-cTat y el de la proteína de la hormona de crecimiento hGH (pxGH5) así como los minigenes reporteros de *splicing* del HIV-1, (LTR1-leader y SV40-leader) fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Heiner Schaal de la Universidad de Düsseldorf (Alemania). El minigen SV40-leader ha sido descrito en trabajos anteriores (Caputi et al., 2004). El LTR1-leader es el mismo minigen que sustituye el promotor del SV40 por el LTR del HIV-1.

El plásmido pNL4.3-ΔRT fue cedido por el laboratorio del Dr. José Alcamí del Centro Nacional de Microbiología (Madrid).

#### **Ensayos de actividad de luciferasa**

Aproximadamente  $2.5 \times 10^5$  células HEK293T se sembraron en placas de 6 pocillos (Falcon, BD). El día siguiente y con un nivel de confluencia celular del 80% se transfectaron utilizando el método de precipitación en  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  con 0.2  $\mu\text{g}$  de LTR2-luc y concentraciones crecientes del vector de expresión de Tat-1 como se indica en la leyenda de la Figura S2. Las cantidades de DNA se igualaron en todos los puntos usando tRNA (Sigma). Como normalizador de eficiencia de transfección se utilizaron 10 ng del vector de expresión de renilla pRL-TK-REN en todos los puntos. Aproximadamente 40 h después de la transfección, las células se recogieron en PBS frío (4°C) y se lisaron con 200  $\mu\text{l}$  de tampón T7 frío (4°C) (20 mM HEPES, pH 7.9, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM ditiotreitól, and 1 mM PMSF). Tras eliminar los restos celulares mediante centrifugación se midió la actividad luciferasa y renilla en los lisados utilizando un luminómetro (Berthold Detection Systems) mediante

## **Anexo I: Material Suplementario**

### **Preparación de extractos inmunodeplecionados**

Para la inmunodepleción de TCERG1 se utilizaron columnas (Mobitec) de afinidad de proteína A (*protein A sepharose 4FastFlow*, Amersham) donde los anticuerpos presentes en el suero pre-inmune y suero específico para TCERG1 fueron unido covalentemente mediante dimetil-pipelimidato (DMP, Sigma). Tras lavar la columna con solución de lavado D-650 (20 mM HEPES, pH 7.9; 650 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 20% (v/v) glicerol, 0.5 mM PMSF), se pasaron 100  $\mu$ l de extracto nuclear de células HeLa con una concentración final de KCl de 0.65M por la columna para bloquear las posibles uniones inespecíficas. Se incubaron 400  $\mu$ l del extracto a 0.65M KCl con cada una de las columnas en rotación durante 2h a 4°C. Se recuperaron los extractos tras la primera incubación y las columnas fueron regeneradas mediante el paso de 3 ml de PBS conteniendo Tween-20 al 0.025% (v/v) seguido de 10 ml de lavado continuo con una solución de 0.1 M glicina, pH 3. Tras equilibrar las columnas con 3 lavados de PBS 1x se realizó una segunda ronda de depleción de los extractos previos en las mismas condiciones. Se recogieron alícuotas de los extractos resultantes para analizar por *western blot* y el resto se dializaron en tampón de diálisis D-100 (20 mM HEPES pH 7.9, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 20% glicerol, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT). Los extractos se almacenaron en alícuotas a -80°C hasta su uso.

### **Anticuerpos**

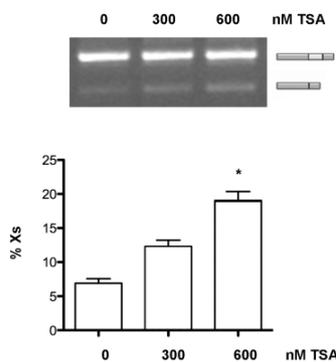
Para la detección de proteínas con epítipo T7 se utilizó anticuerpo anti-T7 (Bethyl) a una dilución de 1:20.000, anti-TCERG1 a una dilución 1:2000, anti-CDK9 (SantaCruz) a una dilución 1:1.000, anti-U2AF65 (cedido por el Dr. Juan Valcárcel, CRG, Barcelona) a una dilución 1:2.000, anti-Y12 (cedido por el Dr. Mariano García-Blanco, Universidad de Duke, Carolina del Norte) a una dilución 1:200. Los anticuerpos secundarios de conejo o ratón conjugado con peroxidasa (PerkinElmer Life Science) fueron utilizados a diluciones 1:5.000 y su unión se detectó mediante quimioluminiscencia (PerkinElmer Life Science).

### **Ensayos de *splicing in vitro***

Los ensayos de *splicing in vitro* se llevaron a cabo según un protocolo publicado anteriormente (Cloutier et al., 2008). 5  $\mu$ l de extracto nuclear de células HeLa fueron incubados con 2 femtomoles de los transcritos sintetizados *in vitro* (ver Materiales y métodos) en condiciones de *splicing* (2 U/ $\mu$ l creatina kinasa (Roche), fosfocreatina 5

### El inhibidor de las deacetilasas de histonas Tricostatina A favorece la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>.

La Tricostatina A (TSA, Sigma) es un inhibidor de las deacetilasas de histonas. Al permitir la hiperacetilación favorece una transcripción activa. Se ha visto que el tratamiento con TSA influye en el *splicing* alternativo de minigenes reporteros al favorecer una tasa de elongación mayor (Nogues et al., 2002). Por ello quisimos analizar el *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* endógeno tras el tratamiento durante 16 h con concentraciones crecientes de TSA. Observamos que la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> aumentaba con el tratamiento con TSA, indicando que la inhibición de la desacetilación de histonas y, por tanto, el favorecimiento de una mayor procesividad de la RNAPII favorece la formación de la isoforma Bcl-x<sub>S</sub> (Figura S5). Estos datos concuerdan con los obtenidos al transfectar los mutantes de la RNAPII resistentes a  $\alpha$ -amanitina, donde veíamos que una RNAPII más lenta favorecía la isoforma Bcl-x<sub>L</sub>, y con los datos de sobre-expresión/silenciamiento de TCERG1 que indicaban que el aumento de la procesividad de la RNAPII favorecía la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>.



**Figura S5. La inhibición de deacetilasas de histonas mediante TSA favorece la isoforma Bcl-x<sub>S</sub>.** RT-PCR análisis del RNA de células HEK293T tratadas durante 16 h a las concentraciones indicadas. Los productos del *splicing* alternativo del gen *Bcl-x* endógeno fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%. En la gráfica se representa el porcentaje de isoforma Bcl-x<sub>S</sub> respecto a la suma de ambas isoformas medido por densitometría de tres experimentos independientes. \*:  $p < 0,05$ .

### Análisis del efecto de TCERG1 en el *splicing* del gen *Bcl-x* *in vitro*

Para determinar si TCERG1 influye en el *splicing in vitro* de *Bcl-x* se analizó el efecto de la proteína TCERG1 recombinante obtenida mediante la sobre-expresión en células HEK293T de la proteína TCERG1 con el epítipo T7 y purificada por columnas de agarosa unidas a anticuerpo anti-T7 (Figura S6).

mM, rATP 12.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 80 mM, DTT 100 mM, 5U *RNase OUT* (Invitrogen), alcohol polivinilo 13%) durante 2 h a 30°C. Cuando fue preciso se añadió 1 µg de la proteína recombinante T7-TCERG1 a la mezcla. La reacción se detuvo añadiendo 450 µl de una solución de 0.3 M acetato sódico y 0.1% SDS. El RNA se extrajo con fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico y se precipitó con etanol en presencia de glicógeno. El pellet se resuspendió en 10 µl de agua. Para monitorizar la reacción de *splicing* 2 µl del RNA final se retro-transcribieron a 37°C durante 1 hora con el kit *Omniscript reverse transcriptase* (Qiagen), el o X2B y *RNase OUT* (Invitrogen). 1 µl de la mezcla fue amplificado por PCR usando 5 U/µl de Taq (Roche) y los oligonucleótidos X2 y X3 con una mezcla de dNTPs a 10 mM y 0.1 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Perkin Elmer Life Sciences). Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas y expuestas durante 2 h en una película para su análisis y cuantificación en el PhosphorImager Storm 860 (GE Healthcare).

### **Oligonucleótidos**

Clonaje LTR2-luc

LTR2-Mlu, 5'-GGGACGCGTTATAAATATACCCG-3'

LTR2-Bgl, 5'-GGGAGATCTGCTTTATTAAGAGG-3'

Retro-transcripción de los productos de *splicing in vitro*:

X2B, 5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3'

PCR cuantitativa del gen *Env* del provirus:

pNL4.3ΔRT-F, 5'-TGGAAAACCTCATTTGCACCA-3'

pNL4.3ΔRT-R, 5'-TTCTCTGTCCCACTCCATCC-3'

PCR convencional de los minigenes LTR1-leader y SV40-leader

1544, 5'-CTTGAAAGCGAAAGTAAAGC-3'

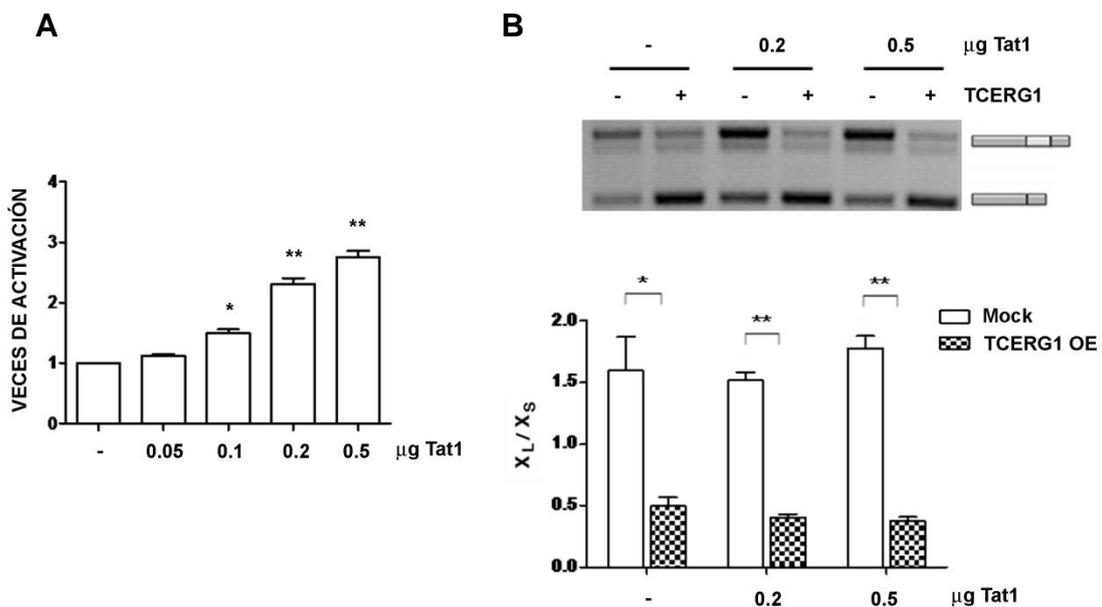
1543, 5'-CCCCATCTCCACAA-3'

1542, 5'-CACCTCTTCTTCTATTCCCT- 3'

**Resultados**

**Tat-1 no afecta al patrón de *splicing* alternativo de Bcl-x generado por la sobre-expresión de TCERG1.**

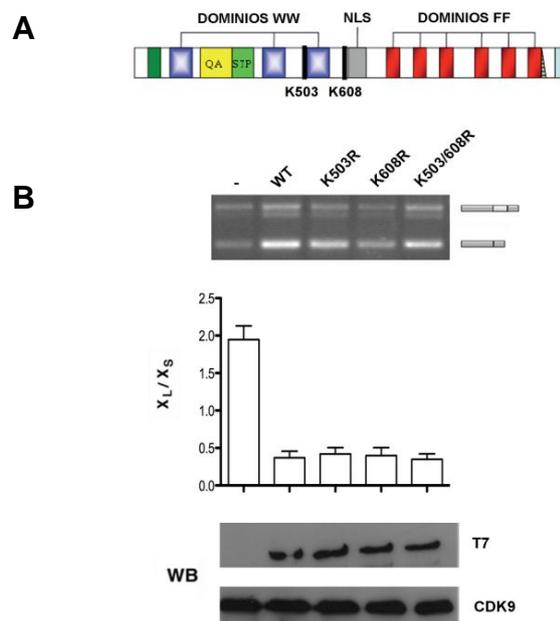
Debido a la capacidad de trans-activación de la proteína Tat-1 del promotor de HIV-1, quisimos comprobar si las secuencias del promotor del HIV-2 utilizado en los ensayos de *splicing* era capaz de ser transactivado por Tat-1. Para ello transfectamos una construcción que contenía el LTR del HIV-2 seguido del gen reportero de luciferasa junto con concentraciones crecientes de un plásmido de sobre-expresión de la proteína Tat-1. Midiendo las unidades de luciferasa observamos que el LTR2 era transactivado débilmente por Tat-1 (Figura S2-A). Dado que TCERG1 ha sido descrito como factor regulador de la transcripción de HIV-1 necesario para la transactivación por Tat (Sune et al., 1997), quisimos ver si el efecto de TCERG1 en el *splicing* del Bcl-x se veía afectado por la presencia de Tat-1. Mediante transfecciones transitorias del minigen reportero de *splicing* HIV2-X2 junto con concentraciones crecientes de Tat-1 y en presencia de un vector vacío o un vector de sobre-expresión de TCERG1, determinamos por RT-PCR las isoformas de *splicing* del minigen obtenidas en cada situación. Observamos que la presencia de Tat-1 no modificaba el efecto de TCERG1 en el *splicing* alternativo del minigen reportero HIV2-X2 (Figura S2-B).



**Figura S2 (Página anterior). La sobre-expresión de Tat-1 no influye en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de Bcl-x.** A. Se midieron las unidades de luciferasa tras la transfección de células HEK293T con el reportero LTR2-luc junto con un vector vacío o concentraciones crecientes de un vector de expresión de Tat como se indica en la figura. Las medidas fueron corregidas con los valores de renilla como indicativo del porcentaje de transfección. La gráfica representa la activación del LTR del HIV-2 por la proteína Tat respecto a los valores de activación basales de tres experimentos independientes. B. Células HEK293T fueron transfectadas con el minigen reportero HIV2-X2, concentraciones crecientes de Tat (0, 0.2  $\mu$ g, 0.5  $\mu$ g) y un vector vacío (-) o un vector de expresión de TCERG1 (+). El patrón de *splicing* generado se detectó mediante RT-PCR y los transcritos fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%. La gráfica representa el ratio de las isoformas  $X_L/X_S$  medidas por densitometría de tres experimentos independientes. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

**La modificación de TCERG1 por SUMOilación no influye en el *splicing* alternativo.**

TCERG1 puede sufrir la modificación post-traducciona por adición de grupo SUMO. Se han descrito dos lisinas principales aceptoras para esta modificación, las lisinas en posición 503 y 608 (Sanchez-Alvarez et al., 2010). Quisimos comprobar si mutaciones en estas lisinas influían en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo del gen Bcl-x. Mediante co-transfecciones transitorias del minigen reportero HIV-X2 y construcciones con mutaciones puntuales en ambas lisinas por separado o mutación doble de ambos residuos y analizando los patrones de *splicing* por RT-PCR, observamos que ninguna de las mutaciones alteraba el patrón de *splicing* producido por la proteína *wild type* (Figura S3).

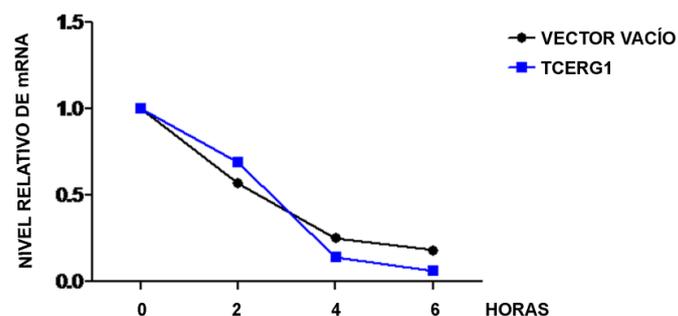


## Anexo I: Material Suplementario

**Figura S3 (Página anterior). La modificación por SUMOilación no modifica el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* alternativo de Bcl-x.** A. Esquema de TCERG1 con sus dominios. Se indican las posiciones de la señal de localización nuclear (NLS) y las lisinasceptoras de SUMO que son mutadas en las construcciones utilizadas (K503 y K608). B. Resultado de los productos obtenidos mediante RT-PCR en gel de agarosa al 2% tras la transfección de células HEK293T con un vector vacío (-) o vectores de expresión de TCERG1: wild type (WT), mutante para la lisina 503 (K503R), para la lisina 608 (K608R) o para ambas (K503/608). La gráfica muestra el ratio  $X_L/X_S$  medido por densitometría de tres experimentos realizados de forma independiente. La expresión de cada una de las proteínas fue controlada mediante WB con anticuerpos que detectan el epítipo T7 presente en el plásmido de expresión de TCERG1.

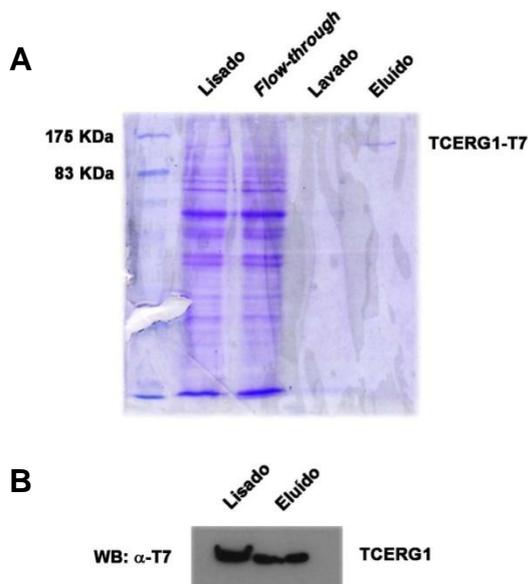
### La sobre-expresión de TCERG1 no afecta a la estabilidad del mRNA de Bcl-x.

Para asegurarnos que el efecto de TCERG1 era sobre la transcripción y no debido a una posible influencia sobre la estabilidad del mRNA, medimos la degradación del mRNA tras la inhibición de la transcripción con DRB a distintos tiempos en células transfectadas con un vector vacío o bien con un vector de sobre-expresión para TCERG1. Observamos que el patrón de degradación del mensajero era muy similar en ambos casos, indicando que la sobre-expresión de TCERG1 no altera la estabilidad del mRNA (Figura S4).



**Figura S4. La sobre-expresión de TCERG1 no altera la estabilidad del mRNA.** La gráfica representa los niveles del pre-mRNA de Bcl-x medidos en células transfectadas con un vector vacío (negro) o con un vector de sobre-expresión de TCERG1 (azul) mediante RT-PCR cuantitativa, a los tiempos indicados, tras el tratamiento con 50  $\mu$ M de DRB.

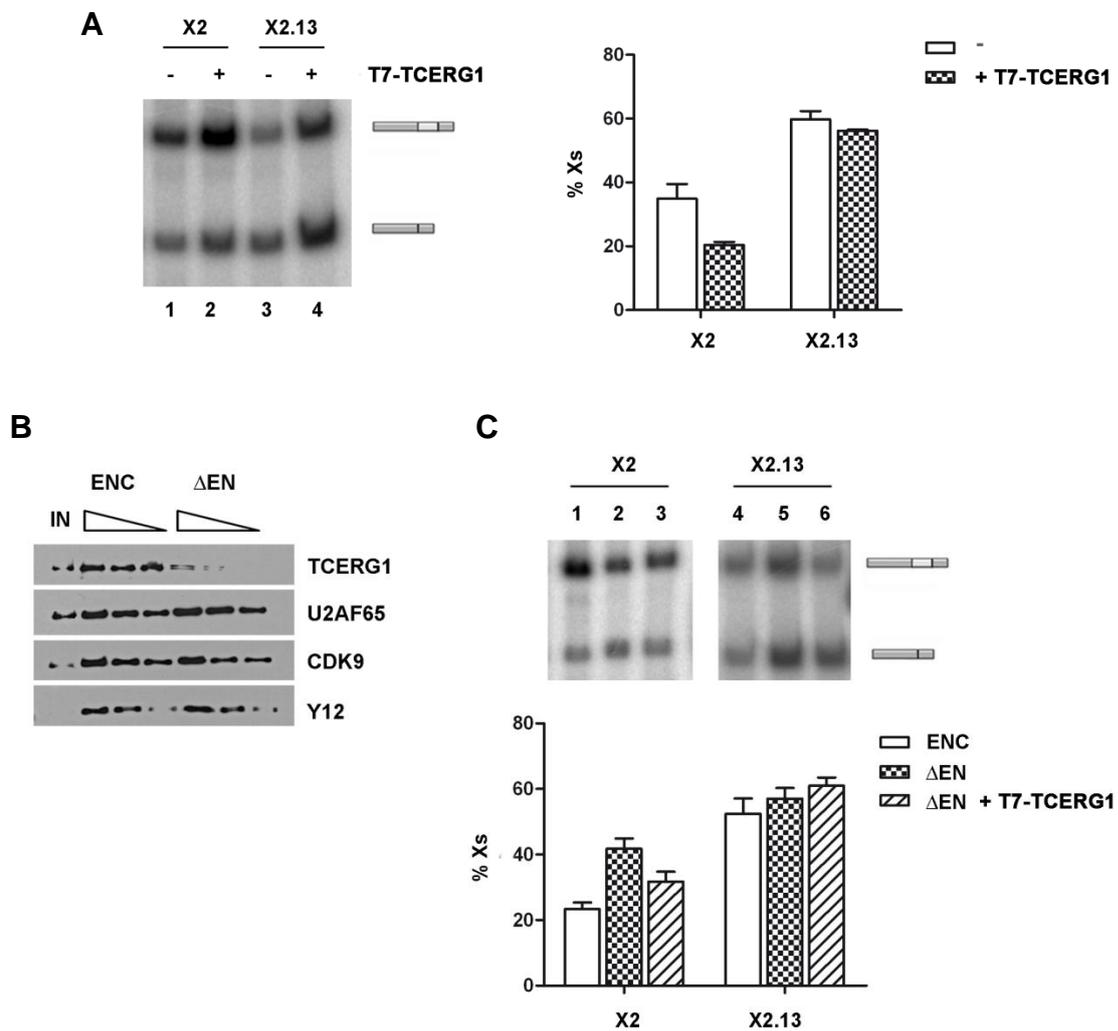
## Anexo I: Material Suplementario



**Figura S6. Purificación de la proteína recombinante T7-TCERG1 de células HEK293T.** A. Separación de las proteínas presentes en los distintos pasos de la purificación (lisado celular total, *flow-through*, lavado y eluido) mediante gel SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Blue. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura. B. Western Blot que muestra la detección de la proteína recombinante en el lisado total y en el eluido mediante anticuerpos específicos para el epítipo T7.

En reacciones de *splicing in vitro*, la adición de proteína recombinante T7-TCERG1 a extractos nucleares de células HeLa junto con transcritos sintetizados *in vitro* (X2) favoreció la producción de la isoforma anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> (Figura S7-A, carriles 1 y 2). En transcritos sintetizados *in vitro* delecionados del elemento regulador SB1 (X2.13), TCERG1 carecía de efecto en estas condiciones (Figura S7-A, carriles 3 y 4). Asimismo quisimos comprobar el efecto de la ausencia de la proteína TCERG1 del extracto nuclear en estas condiciones. Para ello se eliminó TCERG1 de los extractos mediante columnas de afinidad preparadas con anticuerpos específicos para esta proteína. La eficacia de la depleción se comprobó mediante análisis por *western blot* (Figura S7-B). De acuerdo con los resultados obtenidos en la figura S6-A, los extractos nucleares que carecían de TCERG1 presentaban un incremento de la isoforma proapoptótica Bcl-x<sub>S</sub> respecto a extractos control (Figura S7-C, carriles 1 y 2). La adición de la proteína recombinante a los extractos deplecionados de TCERG1 aumentó el nivel de la isoforma Bcl-x<sub>L</sub>, demostrando que el efecto obtenido se debía a la ausencia de TCERG1 (Figura S7-C, carril 3). De forma similar, la ausencia de TCERG1 del extracto no tuvo efecto en transcritos que carecen de la región reguladora SB1 (Figura S7-C, carriles 4 y 5) y la adición de proteína recombinante no alteró este patrón de *splicing* (Figura S7-C carril 6). Estos resultados refuerzan un papel de TCERG1 como factor de *splicing* aunque contradicen los resultados obtenidos *in vivo*. Nuestros resultados apoyan fuertemente un efecto de TCERG1 sobre el *splicing* del Bcl-x dependiente de la elongación transcripcional. En los ensayos de *splicing in vitro* los procesos de la

transcripción y el *splicing* están desacoplados. Esto, junto con la ausencia de otros elementos obviados en un sistema *in vitro*, como el contexto cromatínico, pueden ser la causa de los resultados aparentemente contradictorios obtenido *in vitro*. El uso de un sistema acoplado de transcripción-*splicing* con moldes de DNA cromatinizados podría ser de utilidad para verificar esta hipótesis. Sin embargo, el hecho de que TCERG1 no tenga efecto sobre el transcrito X2.13, resalta la importancia del elemento regulador SB1 en el efecto de TCERG1 sobre el *splicing* del Bcl-x.

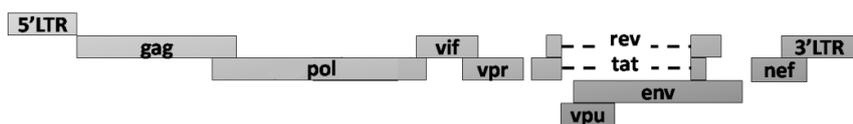


### Figura S7 (página anterior). Análisis del efecto de TCERG1 sobre el splicing de Bcl-x *in vitro*.

A. Gel de acrilamida al 6% de la reacción de splicing generada mediante RT-PCR radiactiva en el transcrito *wild type* (X2) y en el deleciónado de la región reguladora SB1 (X2.13) sin (-) o con (+) la adición de proteína T7-TCERG1 recombinante a extractos nucleares de células Hela. La gráfica a la derecha del panel representa el porcentaje de isoforma Bcl-x<sub>s</sub> respecto al total de las dos isoformas cuantificada mediante el software ImageQuant. B. Análisis por *western blot* del extracto nuclear control (ENC) y depleciónado de TCERG1 ( $\Delta$ EN). Se usaron anticuerpos específicos para las proteínas TCERG1, U2AF65, CDK9 y Y12. C. Gel de acrilamida al 6% de la reacción de splicing generada mediante RT-PCR radiactiva en el transcrito *wild type* (X2) y en el deleciónado de la región reguladora SB1 (X2.13) utilizando extractos nucleares control (carriles 1 y 4), extractos sin TCERG1 (carriles 2 y 5) y extractos nucleares sin TCERG1 suplementados con 1  $\mu$ g de proteína recombinante T7-TCERG1 (carriles 3 y 6). En la parte inferior se muestra la representación gráfica del porcentaje de isoforma Bcl-x<sub>s</sub> cuantificada mediante el programa ImageJ en extractos nucleares control (ENC) y extractos nucleares depleciónados sin ( $\Delta$ EN) y con T7-TCERG1 ( $\Delta$ EN + T7-TCERG1). Estos experimentos se realizaron tres veces de manera independiente.

### La tasa de elongación regula el *splicing* alternativo de un minigen reportero derivado del HIV-1 y la sobre-expresión de TCERG1 altera el efecto.

El genoma del HIV-1 está formado por una hebra única de RNA que dará lugar a las diferentes proteínas estructurales y reguladoras del virus (Figura S8). El transcrito del virus es procesado por una serie de eventos de *splicing* para generar 22 mRNAs diferentes de aproximadamente 4 Kb, que codifican para las proteínas Env, Vpu, Vpr y Vif, y 22 mRNAs de alrededor de 2 Kb que codifican para Tat, Rev, Vpr y Nef. Más del 50% de los pre-mRNAs virales salen del núcleo sin ser procesados. Las proteínas Gag y Pol son sintetizadas a partir de este pre-mRNA (Purcell and Martin, 1993). Además, el RNA viral sin procesar se empaqueta en los nuevos viriones como genoma del virus. En la célula, el pre-mRNA sin procesar o parcialmente procesado es normalmente degradado en el núcleo, pero en el HIV-1 la proteína viral Rev promueve su liberación al citoplasma (Pollard and Malim, 1998). La regulación del *splicing* alternativo viral implica interacciones entre secuencias intrónicas y exónicas del RNA del virus así como factores de *splicing* de la célula hospedadora (Stoltzfus and Madsen, 2006), y requiere de una estrecha regulación ya que desequilibrios entre los productos procesados y sin procesar o alteraciones de la maquinaria de transporte de productos sin procesar puede causar efectos dramáticos en la infectividad del HIV-1 (Purcell and Martin, 1993; Wentz et al., 1997).

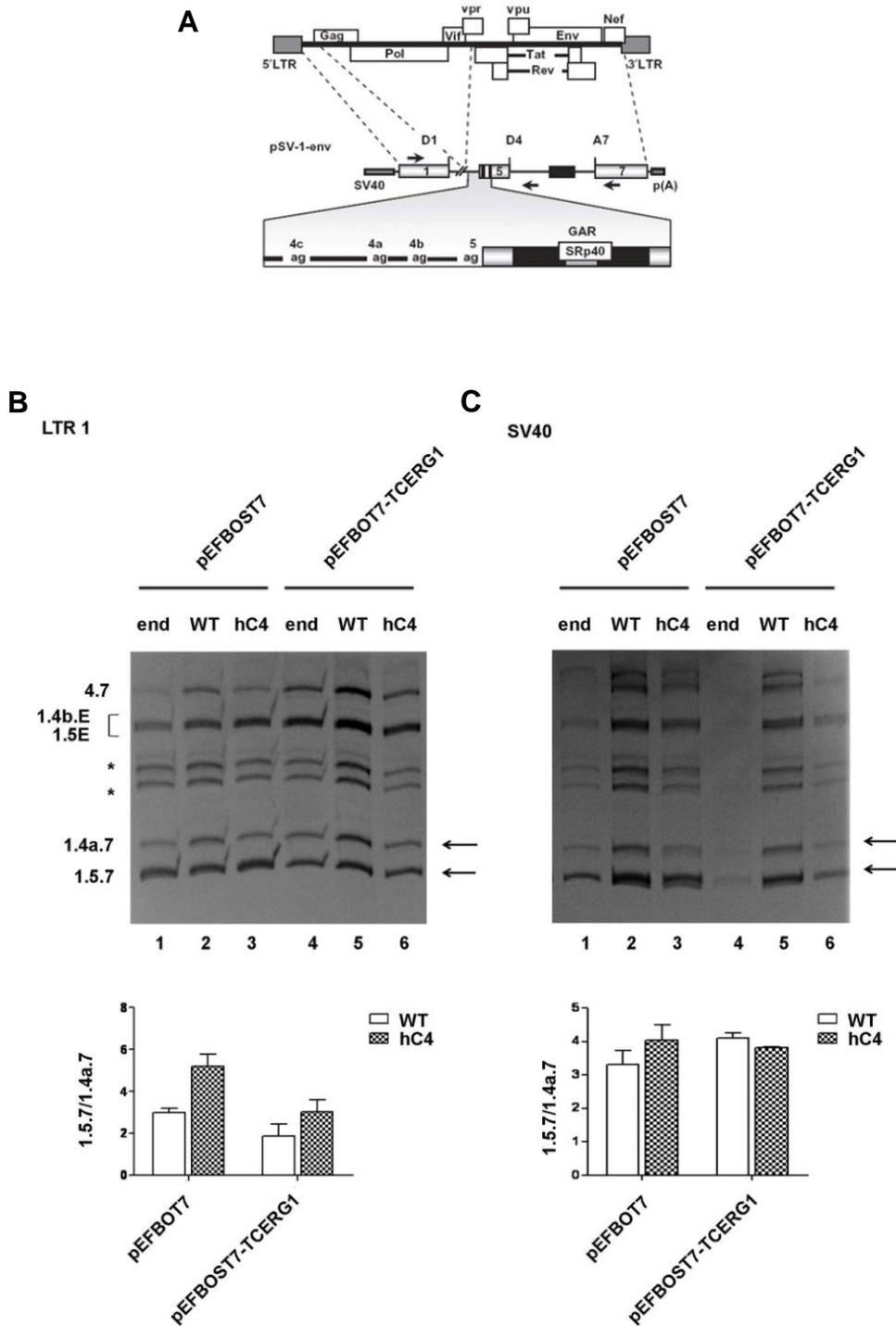


**Figura S8. Esquema del genoma del HIV-1.** El genoma del HIV-1 consta de una única hebra de RNA que dará lugar a las diferentes proteínas virales que se muestran en el diagrama. Las posiciones 5' y 3' del LTR (*Long Terminal Repeat*) es asimismo indicada.

Como se ha mencionado en la introducción, TCERG1 fue descrito por primera vez como un factor de elongación de la transcripción necesario para la trans-activación del HIV-1 por Tat (Sune et al., 1997). Por ello y en base a los resultados obtenidos con el modelo de Bcl-x, quisimos analizar si TCERG1 tenía algún efecto sobre el *splicing* alternativo de HIV-1 de manera dependiente de la elongación. Para ello utilizamos un minigen reportero (LTR1-leader) que contiene los elementos donantes y aceptores de *splicing* del HIV-1 y reproduce el *splicing* alternativo del virus (Figura S9-A). Lo primero que quisimos investigar fue el efecto de la elongación en el *splicing* alternativo del minigen. Transfectamos el LTR1-leader junto con un vector de expresión de Tat y plásmidos de expresión de las polimerasas mutantes wild type y hC4. Tras el tratamiento con  $\alpha$ -amanitina durante 18 h, extrajimos el RNA total para determinar mediante RT-PCR los productos de *splicing* generados. Los productos se resolvieron en geles de acrilamida al 6% y se secuenciaron. Observamos que una RNAPII lenta (hC4) alteraba el patrón de *splicing* aumentando la isoforma 1.5.7 y disminuyendo la isoforma 1.4a.7 respecto a la RNAPII *wild type* (WT) (Figura S9-B, carriles 2 y 3). Sin embargo, transcritos procedentes de la polimerasa endógena pudieron ser todavía detectados probablemente debido a poblaciones residuales sintetizadas antes de la inhibición de la polimerasa endógena (Figura S9-B, carril 1). Al sobre-expresar TCERG1 observamos una disminución de la isoforma 1.5.7 incluso cuando la transcripción depende de una polimerasa *wild type* (Figura S9-A, carriles 4-6). Para ver si el efecto era dependiente de promotor utilizamos un minigen reportero igual al descrito anteriormente pero el LTR1 fue remplazado por el promotor SV40. En estas condiciones observamos un efecto similar, aunque menos pronunciado, de incremento de la isoforma 1.5.7 con una RNAPII lenta (hC4) comparada con una RNAPII *wild type* (WT) (Figura S9-C, carriles 1-3), sin embargo la sobre-expresión de TCERG1 no tuvo efecto sobre el patrón del *splicing* alternativo (Figura S9-C, carriles 4-6). Los datos obtenidos sugieren que

## Anexo I: Material Suplementario

TCERG1 influye en el *splicing* alternativo del HIV-1 a través de la tasa de elongación de la RNAPII. De nuestro análisis se sugiere que TCERG1 podría favorecer el uso de los sitios de *splicing* que en el virus producirían la proteína Nef, mientras que disminuiría el uso de los sitios de *splicing* que generarían a Rev. Las consecuencias que esto puede tener en el *splicing* del virus y su relevancia en cuanto a la infectividad y replicación se están investigando actualmente en el laboratorio.

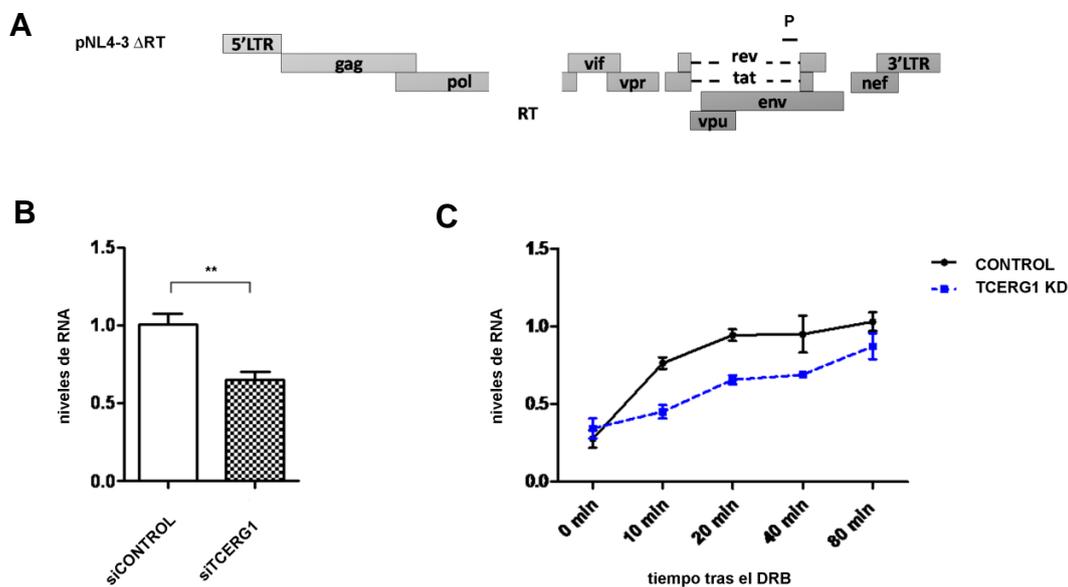


**Figura S9. La elongación transcripcional regula el *splicing* alternativo del HIV-1.** A. Esquema de la construcción utilizada como reportero de *splicing*. En el caso del LTR1-leader, el promotor SV40 fue sustituido por el LTR1. B. Células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con el minigen reportero LTR y el vector vacío (carriles 1, 4), vectores de expresión de la RNAPII *wild type* (WT) (carriles 2 y 5) o el mutante hC4 (carriles 3 y 6) resistentes a  $\alpha$ -amanitina en ausencia (-) (carriles 1, 2 y 3) o presencia (+) (carriles 4, 5 y 6) de un vector de expresión para TCERG1. Las diferentes isoformas fueron amplificadas por RT-PCR y los productos separados en un gel de poliacrilamida al 6%. Las gráficas representan el ratio de los transcritos 1.5.7/1.4a.7 generados a partir de los minigenes por la RNAPII WT y hC4 medidos por densitometría. C. El mismo experimento descrito en el apartado B se llevó a cabo con el minigen reportero SV40. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para comprobar de forma directa que TCERG1 influye en la elongación del HIV-1, medimos los transcritos distales generados a partir de un plásmido que contenía el genoma del pro-virus completo salvo una delección en la retro-transcriptasa (RT) (pNL4-3 $\Delta$ RT) (Figura S10-A) que genera partículas víricas defectivas en la RT por lo que no es infeccioso. Transfectamos células HEK293T con siRNAs contra EGFP (siCONTROL) o contra TCERG1 (siTCERG1) y tras 48 h extrajimos el RNA total y determinamos mediante RT-PCR cuantitativa la cantidad de transcritos distales que se habían generado en cada una de las condiciones. Al mismo tiempo transfectamos un plásmido de expresión de la hormona de crecimiento (hGH) como control de transfección y analizamos sus niveles de RNA de la misma manera que para el pNL4-3 $\Delta$ RT. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a GAPDH. Observamos que al silenciar TCERG1 disminuía significativamente la cantidad de RNA distal en comparación con células control (Figura S10-B). Por último y para medir directamente la tasa de elongación del enzima, llevamos a cabo experimentos de procesividad de la RNAPII *in vivo* tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Células T-Rex 293T establemente silenciadas con shRNAs contra GFP (CONTROL) o contra TCERG1 (TCERG1 KD) fueron transfectadas con el pro-virus. 24 h después de la transfección, la transcripción global fue inhibida de manera reversible con DRB; tras 3 h retiramos el DRB y lo reemplazamos por medio fresco. A los tiempos indicados en la figura S10-C se tomaron muestras para ver la tasa de recuperación de la transcripción del pro-virus mediante RT-PCR cuantitativa con oligonucleótidos distales. La tasa de elongación en células silenciadas de TCERG1 se vio reducida respecto a las células control, sugiriendo

## Anexo I: Material Suplementario

de nuevo que TCERG1 es requerido para una óptima transcripción del genoma del HIV-1 (Figura S10-C).



**Figura S10. TCERG1 aumenta la procesividad de la RNAPII.** A. Esquema del genoma del HIV-1. Se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados para la PCR cuantitativa (P). B. Cuantificación de los niveles del RNA viral mediante RT-PCR cuantitativa de células HEK293T silenciadas transitoriamente con siRNAs específicos para GFP (siCONTROL) o TCERG1 (siTCERG1) y transfectadas con el pNL4-3 $\Delta$ RT. Se representa la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*\*:  $p < 0,01$ . C. Cuantificación de los niveles del RNA mediante RT-PCR cuantitativa medidos a los tiempos indicados tras reemplazar el DRB por medio fresco en células establemente silenciadas con shRNAs específicos para GFP (CONTROL) y TCERG1 (TCERG1 KD) y transfectadas con el pNL4-3 $\Delta$ RT. Se representa la media de tres experimentos independientes.