



Universidad de Granada

Departamento de Bioquímica y Biología molecular I

**“Análisis del silenciamiento génico de TCERG1
mediante *Exon Arrays*”**

Tesis doctoral

Juan Pablo Muñoz-Cobo Belart

IPBLN, CSIC

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Juan Pablo Muñoz-Cobo Belart
ISBN: 978-84-9163-509-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48128>

El doctorando Juan Pablo Muñoz-Cobo Belart y el director de la tesis Carles M^a Suñé Negre

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y 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.

Lugar y fecha:

Granada, 6 de Marzo de 2017

Director de la tesis

Doctorando

Firma

Firma

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) y en el *Instituto de Biología Molecular de Barcelona* (IBMB, CSIC).

A mis padres,

por todo su apoyo e inspiración.

A Noemí,

por todo lo demás.

Resumen



TCERG1 es una proteína humana muy conservada entre especies, que interacciona con factores de transcripción y *splicing* y que está asociada con varias enfermedades neurodegenerativas. Esta tesis doctoral ha tenido como objetivo general el estudio de la función de TCERG1 en la célula mediante el análisis del transcriptoma de células en las que silenciamos la expresión de TCERG1.

En esta tesis mostramos que la merma de TCERG1 produce cambios en los niveles de transcripción de numerosos genes y que también afecta a otros genes alterando su *splicing* alternativo (AS, *alternative splicing*). Observamos que una cantidad significativa de los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1 se encuentran preferentemente en el sistema nervioso y han sido descritos como genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto. De acuerdo con estos datos, la merma de TCERG1 en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y en cultivos primarios derivados de hipocampo de ratón produce una reducción significativa de la longitud total de las neuritas, así como del número de ramificaciones y de la complejidad de estas. La reexpresión de TCERG1 en las células SH-SY5Y con TCERG1 silenciado rescató el fenotipo silvestre, indicando que TCERG1 afecta a la expresión de uno o varios genes cruciales para el desarrollo de las neuritas.

Existen pruebas bioquímicas, neuropatológicas y genéticas de que TCERG1 tiene un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Huntington (HD, *Huntington's disease*). Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares que están detrás de la regulación neuronal por TCERG1 y sus implicaciones en enfermedad. Esta tesis aporta por primera vez conocimientos básicos del papel funcional de TCERG1 en el sistema nervioso, los cuales podrían dar una explicación molecular a las conexiones descritas entre TCERG1 y la HD.

Índice



ÍNDICE

AREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Transcripción y <i>splicing</i>	6
1.1. Transcripción	7
1.1.1. Iniciación	9
1.1.2. Elongación	9
1.1.3. Terminación	10
1.2. Modificaciones pos-transcripcionales del ARNm. Maduración de los transcritos.	11
1.2.1. Adición de una caperuza al extremo 5' (<i>capping</i>)	11
1.2.2. <i>Splicing</i>	12
1.2.3. <i>Splicing</i> alternativo	15
1.2.3.1. Exones casete:	17
1.2.3.2. Exones mutuamente excluyentes:	18
1.2.3.3. Sitios aceptores y donadores alternativos de <i>splicing</i> :	18
1.2.3.4. Retención de intrones:	19
1.2.3.5. Otros eventos que generan diversidad en los transcritos de ARNm.	19
1.2.3.5.1. Primeros exones alternativos: ¡Error! Marcador no definido.	
1.2.3.5.2. Sitios alternativos de poliadenilación:	19
1.2.4. Poliadenilación del extremo 3'	21
1.3. <i>Splicing</i> y enfermedad	22
2. El citoesqueleto celular	23
2.1. Los microtúbulos	24
2.2. Los filamentos intermedios	26
2.3. Los microfilamentos	27
2.4. El citoesqueleto en las neuronas.	30
2.4.1. Morfogénesis neuronal	30
2.4.1.1. Neuritogénesis	32
3. El factor regulador de la elongación de la transcripción 1, TCERG1	36
3.1. Estructura de la proteína:	37
3.2. Función de TCERG1:	41
3.2.1. TCERG1 en transcripción	41
3.2.2. TCERG1 en <i>splicing</i>	42
3.2.3. Efecto global de TCERG1	43
3.2.4. TCERG1 y enfermedad	43
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Cultivos celulares, transfección y transducción	51
1.1. Cultivos celulares y tratamientos	51
1.2. Cultivos primarios	52
1.3. Transfección con siRNAs y plásmidos. Transducción	52

2. Técnicas de biología molecular	53
2.1. Análisis por Western-blot. Anticuerpos	53
2.2. Preparación de las muestras de ARN y procesamiento del <i>Exon Array</i>	54
2.3. Plásmidos	54
2.4. Validación experimental mediante RT-qPCR	55
2.5. Inmunofluorescencia	56
3. Técnicas <i>in silico</i>	57
3.1. Análisis bioinformático	57
3.2. Análisis estadísticos	58
3.3. Mediciones morfométricas de las células SH-SY5Y y de los cultivos primarios	59
4. Oligonucleótidos	60
RESULTADOS	63
1. El silenciamiento de TCERG1 produce cambios significativos a nivel de transcripción y a nivel de <i>splicing</i> .	65
2. El silenciamiento de TCERG1 produce alteraciones en el crecimiento de las neuritas	77
CONCLUSIONES	86
DICUSIÓN	90
1. El silenciamiento de TCERG1 produce cambios significativos en la transcripción y el <i>splicing</i> alternativo de genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto	92
2. El silenciamiento de TCERG1 afecta a la transcripción y/o al AS de genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto	95
3. El silenciamiento de TCERG1 afecta negativamente al crecimiento de las neuritas	97
BIBLIOGRAFÍA	100
ANEXO I; MATERIAL SUPLEMENTARIO	120
ANEXO II; PUBLICACIONES	141

AREVIATURAS

3'ss: Sitio 3' de *splicing*

5'ss: Sitio 5' de *splicing*

A

A: Adenina

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADP: Adenosín difosfato

ADP-Pi: Adenosín difosfato unido a fosfato inorgánico

ARNm: ARN mensajero

AS: *Splicing* alternativo

ATP: Adenosín trifosfato

B

BP: Punto de ramificación

Pb: Pares de bases

C

C: Citosina

CDS: Región codificante del gen

CTD: Dominio carboxi terminal

D

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DIV: Día *in vitro*

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DTT: Ditiotreitól

E

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESE: Elementos potenciadores del *splicing* exónicos

ESS: Elementos inhibidores del *splicing* exónicos

F

FBS: Suero bovino fetal

FTDP-17: Demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17

G

G: Guanina

GDP: Guanosín difosfato

GTEEx: Expresión de Genotipo-Tejido

GTP: Guanosín trifosfato

γ -TuRC: Complejo del anillo de tubulina γ

H

HBSS: Solución salina balanceada de Hank

HD: *Huntington disease*, enfermedad de Huntington

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfónico

hnRNPs: Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares

I

IF: Filamentos intermedios

IFP: Proteínas que forman los filamentos intermedios

ISE: Elementos potenciadores del *splicing* intrónicos

ISS: Elementos inhibidores del *splicing* intrónicos

M

MF: Microfilamentos

MT: Microtúbulos

N

NMD: Degradación mediada por mutaciones terminadoras

P

PAS: Sitio de poliadenilación

PBS: Tampón fosfato salino

PIC: Complejo de pre-iniciación

PMSF: Fenilmetil-sulfonil-fluoruro

poly-A: Poliadeninas

pre-ARNm: Precursor del ARNm

PT: Tracto de polipirimidina

S

S: Serina [Ser]

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

siRNA : Pequeños ARNs de interferencia

snRNPs: Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares

T

T: Treonina [Thr]

TRITC: Isotiocianato de tetrametilrodamina B

U

U: Uracilo

UTR: Secuencia no traducida

V

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

Y

Y: Tirosina [Tyr]

Introducción



La regulación de la expresión génica es un proceso crucial en el desarrollo de los organismos y en el mantenimiento de sus funciones básicas (homeostasis) (Rué & Martínez Arias 2015). La formación y funcionamiento de un organismo multicelular complejo requiere que se cumpla un preciso programa de expresión génica. En éste es importante que determinadas proteínas se expresen en el momento concreto y en las proporciones precisas. La expresión génica implica diversos procesos como las acetilaciones, metilaciones y otras modificaciones de las histonas que relajan o compactan la cromatina; la síntesis y regulación de la transcripción, que da lugar al ARN mensajero (ARNm); las diversas modificaciones del ARNm, conocidas de forma general como maduración del ARNm y que veremos más adelante en mayor profundidad; y por último, el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma y su traducción a proteína. Cuando se produce algún defecto en cualquiera de los procesos implicados en la expresión génica se puede alterar el desarrollo de los organismos o su funcionamiento normal, dando lugar a enfermedad.

Introducción

1. Transcripción y *splicing*

El dogma central de la biología molecular establecido por Francis Crick en 1958 y revisado en 1970 (Crick 1970) describe el flujo de información entre las principales moléculas necesarias para la fabricación de los seres vivos. En primer lugar hay que tener en cuenta los conceptos de información contenida en la secuencia y los alfabetos en los que se almacena. Si tenemos en cuenta que las proteínas son las principales moléculas efectoras de la mayoría de las funciones de los seres vivos, y que las proteínas llevan a cabo su función según su estructura tridimensional, nos encontramos ante un problema muy complejo. Pero si pensamos que la secuencia de una proteína determina en gran medida cómo se organiza ésta tridimensionalmente el problema se simplifica. También hay que recordar que la información contenida en las proteínas está “escrita” en un alfabeto de 20 caracteres (los 20 aminoácidos [aa] proteínogénicos) y la información contenida en los ácidos nucleicos está “escrita” en un alfabeto de 4 caracteres, ya que la timina y el uracilo aportan la misma información en el ADN que en el ARN respectivamente. De entre todas las transferencias de información posibles hay que descartar aquellas de las que no se tiene (ni se espera) noticia, como el flujo de información de proteína a proteína, de proteína a ARN, o de proteína a ADN. También hay que diferenciar entre las transferencias de información generales y las especiales (Figura I-1).

Esta tesis doctoral trata sobre determinados aspectos de una de estas transferencias de información biológica, la transcripción del ADN a ARN.

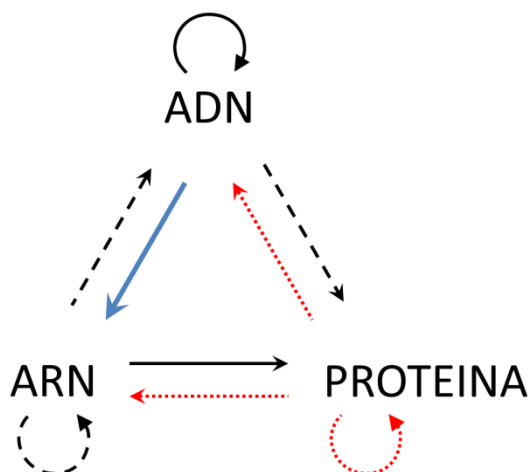


Figura I-1. Dogma central de la biología molecular. Adaptado de Crick F, 1970. El esquema representa los flujos de información que ocurren entre los distintos polímeros con alfabetos definidos. Las líneas sólidas representan transferencias generales; las líneas interrumpidas, transferencias especiales; líneas punteadas rojas, las transferencias improbables. En azul el proceso de transcripción, fundamental en este trabajo.

1.1. Transcripción

El proceso de transcripción consiste en la síntesis de una molécula de ARN que contiene la información almacenada en una determinada secuencia de ADN. La transcripción génica se puede dividir para su estudio en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. En cada una de estas etapas hay numerosos factores reguladores, como la secuencia del ADN, la estructura de la cromatina, o las proteínas reguladoras (generalmente conocidas como factores de transcripción), que modulan estos procesos en función de las necesidades del organismo.

La transcripción del ARN que codifica para proteínas y de gran parte del ARN no codificante (micro ARN y ARN largo no codificante) está mediada por el complejo de la ARN polimerasa II (RNAPII), que es una polimerasa dirigida por ADN. La RNAPII está formada por 12 subunidades, la mayor de las cuales es de 220 kDa, y tiene un peso molecular total de 550 kDa. La RNAPII cataliza la reacción nucleósido trifosfato + ARN(n) = difosfato + ARN(n+1) (Recomendaciones de la Unión internacional de bioquímica y biología molecular, EC 2.7.7.6). También es necesaria la participación de otras proteínas para la síntesis del ARNm, como los factores remodeladores de la cromatina, los factores generales de transcripción, factores de iniciación, elongación y terminación, y otros factores (Sainsbury et al. 2015).

El extremo carboxi-terminal de la subunidad mayor del complejo de la RNAPII de vertebrados está compuesto por 52 repeticiones imperfectas del heptapéptido $Y^1S^2P^3T^4S^5P^6S^7$, que forman el llamado CTD (*carboxy terminal domain*) (Hsin & Manley 2012). Estas repeticiones están presentes en el CTD de casi todos eucariotas (*T. brucei* no la tiene), pero el número de ellas se incrementa con la complejidad del organismo; así en *S. cerevisiae* (levadura de gemación) el CTD contiene 26 heptapéptidos, en *S. pombe* (levadura de fisión) el CTD contiene 29 repeticiones, 42 repeticiones en *C.elegans*, y *D. melanogaster* tiene 45 repeticiones (Corden 1990). El CTD de la RNAPII es susceptible de sufrir diversas modificaciones post-traduccionales como fosforilación, glicosilación, metilación, acetilación y ubiquitinación (Napolitano et al. 2014; Heidemann et al. 2013). La más estudiada de estas modificaciones, por su extensión e importancia, es la fosforilación. Cinco de los residuos del heptapéptido (las tres serinas [Ser], la treonina [Thr] y la tirosina [Tyr]) pueden sufrir esta modificación transitoria. Las combinaciones de las distintas modificaciones de los residuos que

Introducción

conforman el CTD sugieren la existencia de un “código del CTD” (Buratowski 2003; Heidemann et al. 2013). Los cambios en los patrones de fosforilación están dirigidos por varias kinasas y fosfatasa, y coordinan la unión al CTD de diversas proteínas. En las etapas iniciales de la transcripción, cuando la RNAPII está unida al promotor del gen y durante la etapa de iniciación de la transcripción, el CTD de la RNAPII está hipofosforilado. Durante la fase de elongación de la transcripción, el CTD está hiperfosforilado. Así, cuando la polimerasa se encuentra en regiones cercanas al promotor génico, las serinas 5 y 7 del CTD alcanzan su pico de fosforilación, mientras los otros residuos apenas están fosforilados. Este patrón se mantiene hasta que la RNAPII entra en la fase de elongación productiva, durante la cual se produce un aumento en la fosforilación de la Ser2, la Tyr1 y en menor medida de la Thr4. Durante la fase productiva de la elongación se produce una desfosforilación de las Ser5 y Ser7, siendo más acusada en el caso de la Ser5. En la fase de terminación de la transcripción se produce la desfosforilación de la Tyr1, y la Ser2 y la Thr4 alcanzan su pico de fosforilación (Figura I-2).

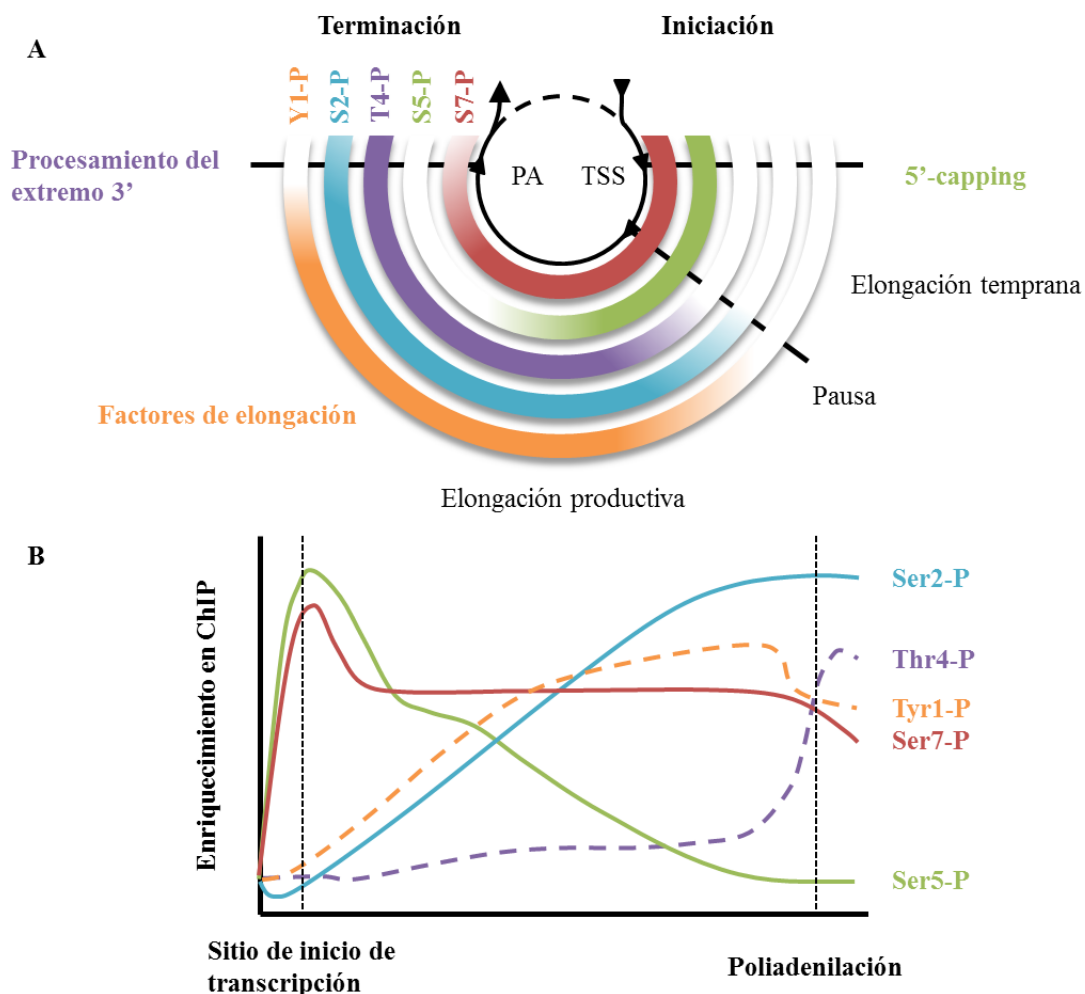


Figura I-2 (página anterior). El “código del CTD extendido”. Adaptado de Heidemann et al. 2013. **A.** Cambios en los niveles de fosforilación de las Tyr 1, Ser2-5-7 y Thr4 durante la transcripción. **B.** Perfil medio de las marcas de fosforilación según experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina.

Como se ha comentado, el proceso de la transcripción se puede dividir en tres etapas:

1.1.1. Iniciación

Para que se inicie la transcripción es necesaria la apertura de la cromatina en la región promotora del gen, de este modo pueden acceder al ADN las diversas proteínas implicadas en este proceso.

Según el modelo clásico, primero se produce la unión del complejo TFIIB-TBP al promotor, provocando que la hebra de ADN de la región promotora del gen se doble con un ángulo de 90°. A este complejo se une otro complejo compuesto por RNAPII-TFIIF, lo que da lugar a la formación del núcleo del complejo de iniciación. A su vez, al núcleo del complejo de iniciación se unen los factores TFIIE y TFIIH para terminar de formar el complejo de pre-iniciación (PIC). Hasta este momento el ADN permanece cerrado, y es necesaria la presencia de nucleósidos trifosforilados (ATP) para que se abra y se forme la “burbuja de transcripción”, y así pueda comenzar la síntesis del ARNm. Por último, cuando se produce la disociación de los factores de iniciación de la RNAPII se permite la unión de factores de elongación, y la formación del complejo de elongación (Sainsbury et al. 2015). Aunque tradicionalmente se ha aceptado el papel de TFIIB como factor general de transcripción, este punto se ha puesto en duda recientemente al comprobar que su silenciamiento sólo afecta a la transcripción de un número limitado de genes (Gelev et al. 2014).

1.1.2. Elongación

El proceso de elongación de la transcripción mediante la RNAPII está muy regulado, tanto en su fase inicial, cuando la RNAPII está pausada, como en su fase productiva donde alcanza su máxima tasa de síntesis de ARNm. En la transición entre las fases de iniciación y elongación se desestabilizan las uniones entre la RNAPII y los factores unidos al promotor, lo que facilita que la polimerasa entre en el gen. Rápidamente se pasa a una fase de pausa mediada por el factor negativo de la elongación (NELF, *negative elongation factor*) y el factor sensible a DRB (DSIF, *DRB sensitivity-inducing*

Introducción

factor), y facilitada por el nucleosoma +1 y por secuencias del promotor. Esta fase de pausa de la polimerasa ocurre de forma general en la transcripción de los genes de metazoos, y se cree que es clave en la regulación de la expresión génica (Adelman & Lis 2012). La salida de la fase de pausa está mediada por el factor positivo de la elongación de la transcripción (P-TEFb, *positive elongation transcription factor b*), que fosforila a NELF, DSIF, y a la Ser2 del CTD de la RNAPII. El factor DSIF fosforilado se convierte en un factor positivo de la elongación.

La fase de elongación productiva es variable entre genes, con diferencias de hasta tres veces en la tasa de elongación. Además no es homogénea, en las primeras kilobases la tasa de elongación es de unas 0,5 kb por minuto, mientras que tras unas 15 kb alcanza la tasa máxima de 2-5 kb por minuto (Jonkers & Lis 2015). Esta aceleración gradual en la tasa de elongación podría facilitar el reclutamiento de factores importantes para procesos cotranscripcionales como el *splicing*. Los exones ralentizan la tasa de elongación de la RNAPII en unos 20-30 segundos por exón. Puede ser que esto se deba a su mayor contenido en G+C, y/o a la mayor presencia de nucleosomas (Schwartz et al. 2009). Las regiones exónicas del ADN también están enriquecidas en marcas específicas en las histonas, que están asociadas con una menor tasa de elongación. Esta reducción en la tasa de elongación en los exones podría facilitar el reconocimiento de los sitios de *splicing* (Jonkers & Lis 2015); aunque también podría ser el propio proceso de *splicing* el que ralentice la elongación (Jonkers & Lis 2015).

1.1.3. Terminación

La terminación de la transcripción es necesaria para la separación de la información genética codificada en el ADN, y define los límites de las unidades de transcripción. De forma general, en la terminación de los genes sintetizados por la RNAPII primero se produce un corte del ARNm naciente y posteriormente se sintetiza una cola de poliadeninas (poly-A) en su extremo 3'.

La terminación está controlada por elementos en cis localizados en torno al sitio de poliadenilación (PAS), cuya secuencia consenso es A[A/U]UAAA. También se encuentran motivos ricos en uracilo, y elementos UGUA aguas arriba del PAS. Aguas abajo se encuentran elementos ricos en uracilo, y ricos en GU. Normalmente se encuentra el dinucleótido CA justo antes del sitio de corte. Parece que la fuerza de la PAS está definida por estas secuencias de manera combinatoria (Cheng et al. 2006).

Para que comience la terminación es necesario el reclutamiento de diversos complejos y proteínas individuales sobre varias secuencias que se encuentran en torno al sitio de corte en la secuencia de ARNm. Los factores necesarios son el factor específico de corte y poliadenilación (CPSF, *cleavage and polyadenylation specificity factor*), el factor estimulador del corte (CSTF, *cleavage stimulatory factor*), y los factores de corte I y II (CFI y CFII, *cleavage factors I and II*). También es necesaria la presencia de las proteínas simplequina (SYMPK), poly(A) polimerasa y RBBP6 (*RB Binding Protein 6, Ubiquitin Ligase*) (Tian & Manley 2016).

Un modelo alternativo de terminación de la transcripción, descrito en levaduras y en unos 80 genes humanos, es el modelo torpedo. Este modelo propone que el corte del extremo 3' del ARNm por el complejo CPF-CF proporciona un sitio de entrada para una exonucleasa 5'-3' (Rat1 en levaduras y XRN2 en humanos), que degrada el ARNm naciente hasta la RNAPII que está transcribiendo, produciendo así la disociación del complejo (Porrua & Libri 2015).

Más adelante se profundiza sobre la poliadenilación de los transcritos (apartado 1.2.4).

1.2. Modificaciones pos-transcripcionales del ARNm. Maduración de los transcritos.

Las moléculas de ARNm recién sintetizadas por la RNAPII deben sufrir una serie de modificaciones durante e inmediatamente después de su síntesis para que sean totalmente funcionales. Estas modificaciones son:

1.2.1. Adición de una caperuza al extremo 5' (*capping*)

La primera modificación que sufre el ARNm es la metilación de su extremo 5'. Mientras el ARNm está siendo sintetizado se añade una guanina al extremo 5' del ARNm mediante un enlace 5'-5'. Esta guanina es inmediatamente metilada en la posición 7, dando lugar a una 7metil-guanosina.

Este proceso tiene cuatro funciones principales: Regula la exportación del ARNm al citoplasma; previene la degradación del mensajero; facilita la traducción, y facilita el *splicing* de los primeros intrones (Burkard & Butler 2000; Visa et al. 1996; Gao et al. 2000; Konarska et al. 1984; Evdokimova et al. 2001; Lewis & Izaurflde 1997).

Introducción

1.2.2. Splicing

El proceso de *splicing* (ajuste o corte y empalme) consiste en la eliminación de los intrones, que son las secuencias génicas que no codifican para proteína, y en la unión de los exones, que son las secuencias que forman la región codificante del gen (CDS, *coding DNA sequence*). El *splicing* es un proceso principalmente cotranscripcional (Merkhofer 2014), es decir, que a medida que se va sintetizando la hebra de ARNm se van eliminando intrones y se van uniendo exones. Las ventajas de organizar los genomas en exones e intrones son la capacidad de amortiguar mutaciones, un incremento en capacidad de regular la expresión génica, y un aumento en la capacidad codificante de los genomas (Sharp 1994).

El *splicing* del ARNm es un proceso bioquímico de dos pasos (Figura I-3) (Unión internacional de bioquímica y biología molecular, EC 2.7.1.160). En primer lugar se produce el ataque nucleofílico de la adenosina del punto de ramificación (BP, *branch point*) al sitio 5' de *splicing* (5'ss) previo. El resultado de esta reacción es un producto intermediario con el intrón en forma de lazo, y que se cierra con una unión 2'-5' fosfodiéster. A continuación se produce el ataque nucleofílico sobre el sitio 3' de *splicing* (3'ss), mediada por el 5'ss, que conlleva la eliminación del lazo del intrón, y la formación del producto de ARNm procesado.

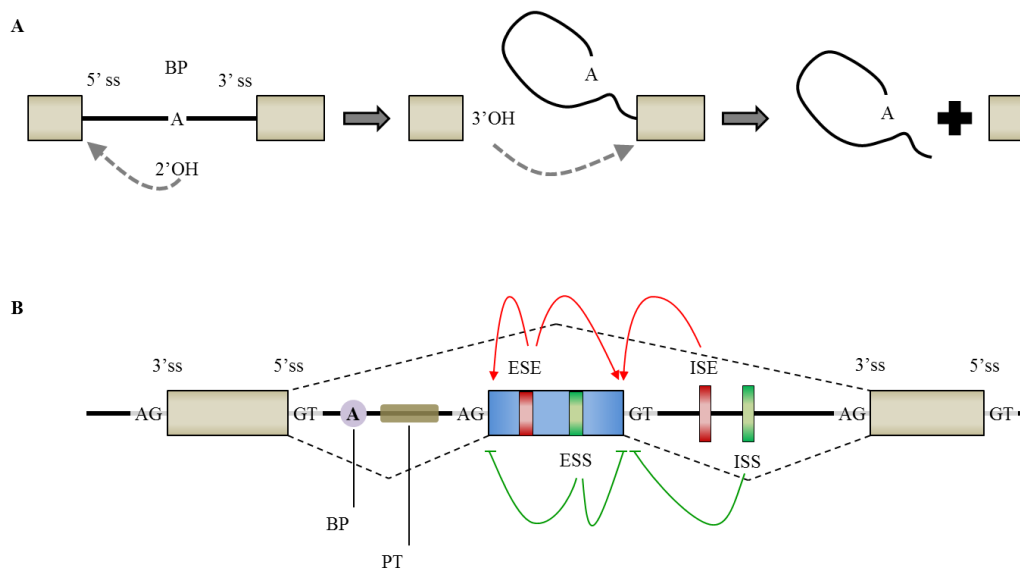


Figura I-3. Splicing del ARNm. A Dos reacciones secuenciales de transesterificación dan lugar a la eliminación del intrón (línea continua) y a la unión de los exones (cajas grises). Adaptado de Scotti &

(continuación pie Figura I-3) Swanson 2015. **B** Elementos en cis reguladores del *splicing*. Las cajas rojas representan a los elementos potenciadores del *splicing* exónicos (ESE, *exonic splicing enhancer*) e intrónicos (ISE, *intronic splicing enhancer*). Las cajas verdes representan a los elementos inhibidores del *splicing* exónicos (ESS, *exonic splicing silencer*) e intrónicos (ISE, *intronic splicing silencer*).

Las maquinarias encargadas de identificar los sitios de *splicing* y de regular el proceso del *splicing* son el espliceosoma mayor (dependiente de U2, ver a continuación) y el espliceosoma menor (dependiente de U12, ver a continuación). Cada uno de estos complejos contiene cinco ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs, *small nuclear ribonucleoproteins*): los snRNAs U1, U2, U4, U5 y U6 en el espliceosoma mayor (que procesa aproximadamente el 95,5% de los intrones); y los snRNAs U11, U12, U4atac, U5 y U6atac en el espliceosoma menor. Además de los snRNAs hay más de 200 proteínas que forman parte del espliceosoma de forma dinámica (no todas están presentes a la vez) (Wahl et al. 2009).

A pesar de que el proceso de *splicing* consiste en unas reacciones relativamente simples, la tarea de encontrar auténticos sitios de *splicing* es bastante problemática por varios motivos. En primer lugar, los sitios 5'ss y 3'ss se deben identificar cuidadosamente ya que un error de un solo nucleótido resulta en un cambio en la pauta de lectura y la consiguiente degradación mediada por mutaciones terminadoras (o codón sin sentido) (NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*) del transcrito. En segundo lugar, la arquitectura de los genes de mamífero complica la selección de esos sitios debido al AS (ver más adelante) y también porque los sitios de AS se pueden utilizar preferentemente durante determinadas etapas del desarrollo como mecanismo de control de la expresión génica. En tercer lugar, el tamaño de los exones en mamíferos es casi diez órdenes de magnitud menor que el de los intrones. Y en cuarto lugar, el *splicing* es un proceso principalmente cotranscripcional que está modulado por la tasa de elongación de la RNAPII, de modo que los factores de las maquinarias que regulan esta etapa de la expresión génica se tienen que coordinar adecuadamente para que se produzca una selección apropiada del sitio de *splicing*.

El reconocimiento por parte del espliceosoma de los 5'ss, 3'ss y del BP está facilitado por los ESEs, e ISEs, que son reconocidos principalmente por proteínas SR (proteínas ricas en Serina y Arginina). Por otra parte la función de los ESSs e ISSs es el reclutamiento en las proximidades de los 5'ss, 3'ss y del BP de factores, principalmente

Introducción

ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs, *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), que dificultan el reconocimiento de estos sitios por parte del espliceosoma (Scotti & Swanson 2015).

El ensamblaje de los distintos componentes de la maquinaria de *splicing* sobre el precursor del ARNm (pre-ARNm) se produce de manera secuencial y ordenada. En mamíferos predomina el mecanismo de *splicing* llamado “definición del exón”. Este mecanismo ocurre en genes con exones pequeños (50-250 nt) flanqueados por intrones grandes (miles de nucleótidos). En primer lugar se unen el snRNA U1 al 5’ss y el factor de *splicing* 1 (SF1) al BP aguas arriba, formando así el complejo E’ (Figura I-4 A); estas uniones son independientes de ATP. Posteriormente se une el factor de *splicing* U2AF (formado por U2AF65 y U2AF35) al tracto de polipirimidina (PT) y al 3’ss, formando el complejo E (Figura I-4 B). Cuando se produce el cambio de SF1 por el snRNP U2 en el BP, ocurre la transición del complejo E (independiente de ATP) al complejo A (dependiente de ATP) (Figura I-4 C), más tarde U2AF se disocia del complejo (Wahl et al. 2009)

Posteriormente, el reclutamiento del U4/U6–U5 tri-snRNP marca la formación del complejo B, que ya contiene todas las subunidades del espliceosoma que llevan a cabo la reacción de *splicing* (Figura I-4 D). Por último, se producen diversos cambios conformacionales y una remodelación del espliceosoma, que incluye la pérdida de los snRNPs U1 y U4, y que termina con la formación del complejo C (Figura I-4 E), que es el espliceosoma catalíticamente activo (Chen & Manley 2009).

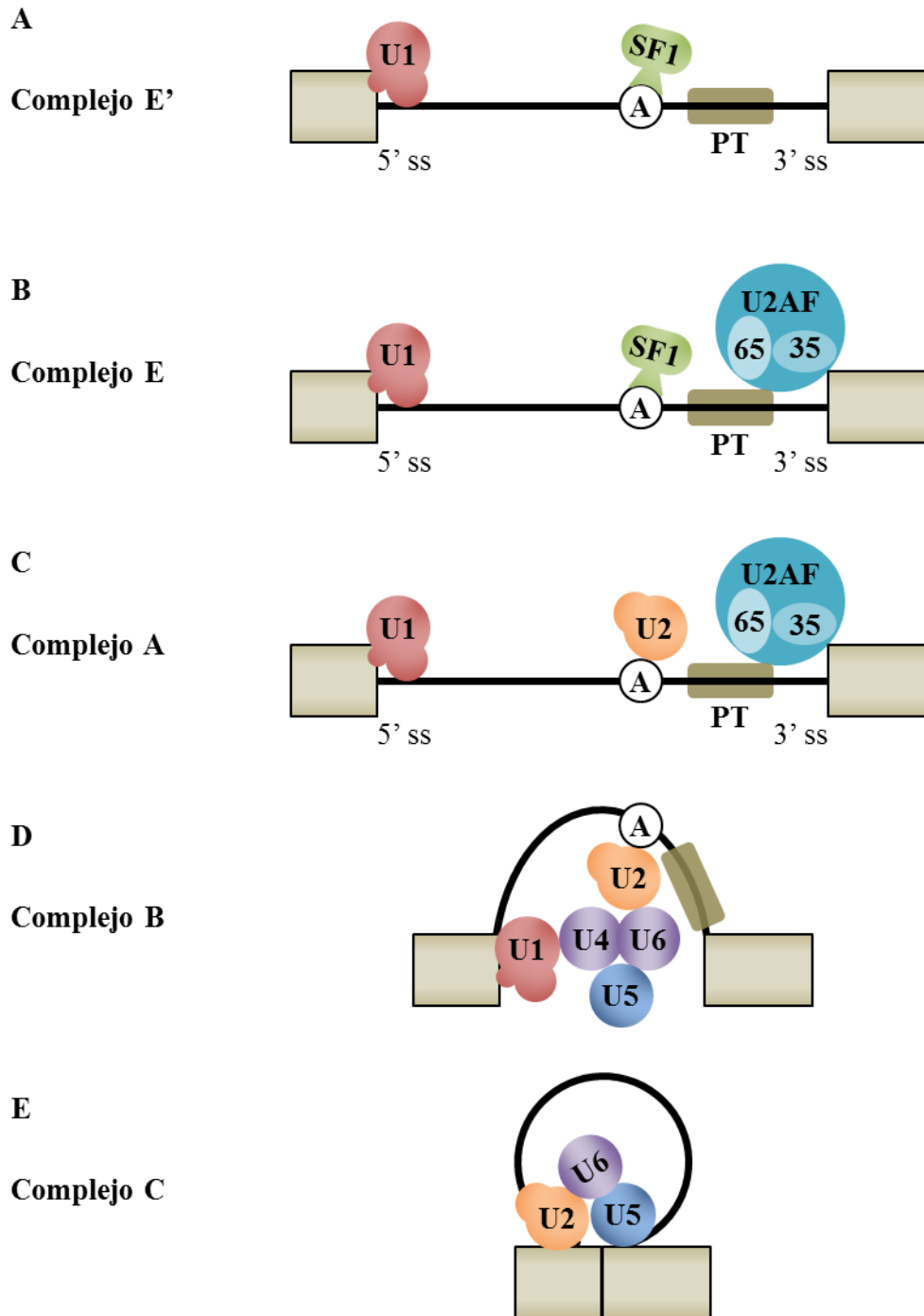


Figura I-4. Ensamblaje del spliceosoma. Formación de los distintos complejos. Adaptado de Chen & Manley 2009. Las cajas grises representan exones y las líneas sólidas, intrones.

1.2.3. *Splicing alternativo*

Los últimos datos genómicos del proyecto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) indican que los humanos tenemos unos 60×10^3 genes, de los cuales alrededor de 20×10^3 son genes que codifican proteínas, unos 16×10^3 ARNs largos no-codificantes, unos

Introducción

10×10^3 ARNs pequeños no-codificantes y unos 14×10^3 pseudogenes (ENCODE Project et al. 2012). En diversos estudios de espectrometría de masas de alta resolución se han identificado péptidos codificados por la mayoría de estos genes descritos, pero el número de isoformas expresado es entre 5 y 10 veces mayor (Kim et al. 2014). La principal causa de esta diversidad es el AS. De hecho los humanos tenemos prácticamente el mismo número de genes que el gusano *C. elegans* (unos 20×10^3) pero la complejidad de nuestro organismo es mucho mayor. La mayoría de los genes humanos pueden producir distintas isoformas y según datos recientes entre el 92 y el 94% de los genes sufren AS (Pan et al. 2008; Sultan et al. 2008; Wang et al. 2008). La posibilidad de producir distintas isoformas (de ARNm y proteínas) a partir de un mismo gen ha tenido un papel importante en la formación de órganos en seres vivos complejos (Zhao et al. 2008). No obstante, es difícil estimar el porcentaje de eventos de AS que tienen una función biológica relevante (Tress et al. 2016). Recientemente se ha descrito la función de microexones de hasta tres nucleótidos de longitud, que pueden afectar a la conformación que adopta la proteína, modulando la capacidad de los dominios adyacentes para interactuar con otras proteínas (Irimia et al. 2014).

Por norma general, la transcripción y el *splicing* ocurren de forma cotranscripcional pero se han descrito numerosos casos de *splicing* post-transcripcional. Una hipótesis interesante sugiere que los exones constitutivos son procesados de forma mayoritariamente cotranscripcional, mientras que algunos exones alternativos pueden ser procesados más tarde en determinadas regiones del núcleo llamadas *speckles* (Dias et al. 2010), e incluso hay quien afirma que se puede producir en el citoplasma de células nucleadas (Han et al. 2011). Esta idea abre una ventana de regulación adicional al AS y es conceptualmente útil para determinados eventos de *splicing*, como los exones mutuamente excluyentes.

La enorme importancia del AS viene dada por las múltiples variantes que puede introducir en el ARNm sobre el que se produce (Figura I-5 A). El AS puede afectar a la secuencia codificante, y por lo tanto a la estructura y/o función de la proteína que codifica, pero también puede afectar a las secuencias no traducidas (UTR, *untranslated region*) en los extremos 5' y 3'. El AS en secuencias UTR afecta exclusivamente a la molécula de ARNm, ya sea a través de su estabilidad o de su destino en la célula (Figura I-5 B).

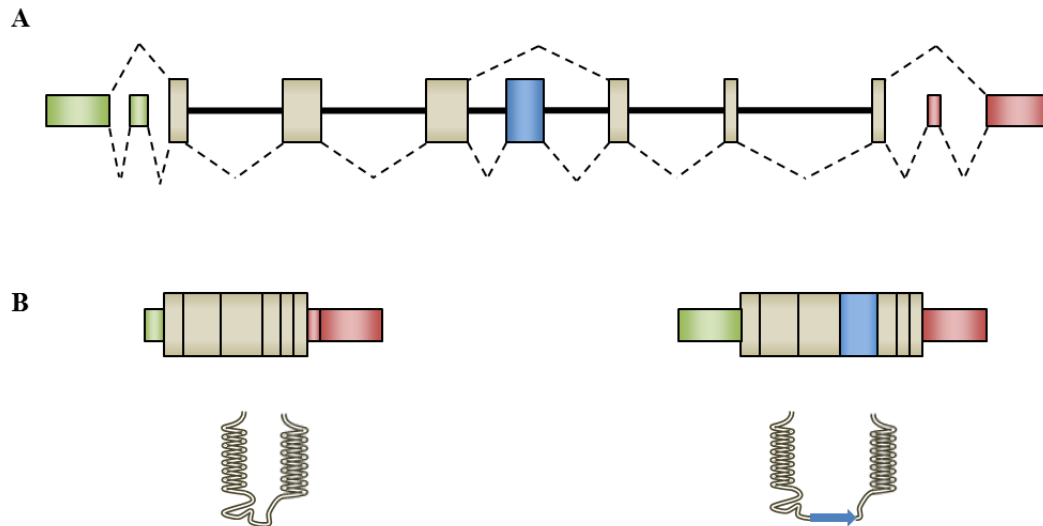


Figura I-5. *Splicing alternativo*. El AS incrementa la capacidad codificante de los genes y supone un nivel adicional de regulación de su expresión. Las cajas anchas representan exones, las cajas estrechas representan UTRs, las líneas continuas representan intrones, y las líneas discontinuas representan las posibles uniones de los exones. **A** Ejemplo de un ARNm con un exón alternativo en su CDS, un exón alternativo en su 5'UTR y otro exón alternativo en su 3'UTR, que puede dar lugar a 18 transcritos distintos, que solo producirían dos proteínas diferentes. **B** Las diferencias en las UTRs solo afectan al ARNm, en las estructuras que representan proteína no aparecen los colores de las UTRs. A nivel de proteína, las isoformas contienen variaciones sobre una estructura común. Estas diferencias hacen que las isoformas tengan distintas funciones y/o propiedades, ya que pueden afectar al plegamiento de un dominio o afectar a una región de unión entre proteínas.

Actualmente no hay un claro consenso sobre la clasificación de los eventos de AS y en los últimos años se han propuesto distintas clasificaciones (Xing et al. 2004; Nagasaki et al. 2006; Sammeth et al. 2008; Kroll et al. 2012; Pohl et al. 2013). Según mi criterio, los principales eventos de AS son (Figura I-6):

1.2.3.1. Exones casete:

Es el evento de AS mayoritario en vertebrados. Mediante el uso de exones casete (Figura I-6 A) se puede incluir o excluir un exón completo del ARNm y por eso también se conoce a este evento como *exon skipping* (“salto/omisión del exón”). La inclusión o exclusión de un exón casete puede afectar a la pauta de lectura del ARNm, puede incluir un codón de terminación prematuro, o puede incluir o excluir una secuencia que codifique para aminoácidos que hagan variar la función de la proteína resultante.

Introducción

Existen al menos tres mecanismos por los que surgen los exones casete; i) el intercambio y reordenamiento de exones (*exon shuffling*), en el que un exón se insertaría en un gen o un exón se duplicaría dentro de un mismo gen; ii) la “exonización” de secuencias intrónicas, por ejemplo en elementos Alu; iii) la generación *de novo* de exones alternativos que derivan de exones constitutivos (Kim et al. 2008).

1.2.3.2. Exones mutuamente excluyentes:

Se trata de un caso especial de exones casete en los que se incluye uno de dos exones (o un grupo de dos grupos de exones) y se excluye el otro (Figura I-6 B) (Pohl et al. 2013). Un ejemplo extremo de este tipo de exones es el gen *Dscam* de *D. melanogaster*, que puede generar 38 016 isoformas eligiendo distintos exones mutuamente excluyentes entre cuatro grupos de exones (Hemani & Soller 2012). Este evento de *splicing* puede conservar la longitud de la proteína siempre y cuando las secuencias intercambiadas sean de la misma longitud. Este evento no introduce codones de parada prematuros. Se han propuesto numerosos mecanismos para el *splicing* de exones mutuamente excluyentes, pero como se trata de un evento de AS poco relevante para el trabajo presentado en esta tesis solo citaré las referencias de algunos de los trabajos más relevantes (Smith 2005; Nilsen & Graveley 2010; Jin et al. 2011; Pervouchine et al. 2012; Hemani & Soller 2012; Pohl et al. 2013).

1.2.3.3. Sitios aceptores y donadores alternativos de *splicing*:

Aparecen como consecuencia del reconocimiento, por parte del espliceosoma, de dos o más sitios de *splicing* en uno de los extremos de un exón. Los exones con sitios 3'ss y 5'ss alternativos (Figura I-6 C, D respectivamente) son, evolutivamente, un estadio intermedio entre exones constitutivos y exones casete. El extremo fijo del exón se asemeja a los exones constitutivos, y el extremo variable a los exones casete (Koren et al. 2007).

Estos eventos pueden afectar a la pauta de lectura del ARNm, introduciendo un codón de parada prematuro y enviando el transcrito a la vía de NMD, pero también pueden afectar a la funcionalidad de la proteína como es el caso de las isoformas del gen similar a *BCL2 1 (BCL2L1)* (Boise et al. 1993).

1.2.3.4. Retención de intrones:

Este evento implica que un intrón se conserve en el ARNm maduro (Figura I-6 E). Este evento de AS es mucho más frecuente en organismos unicelulares que en vertebrados (Kim et al. 2008). Se cree que este evento se debe a un *splicing* por definición del intrón. Se ha asociado la retención de intrones a exones adyacentes con sitios de *splicing* débiles, a genes con intrones más cortos, a elevados niveles de expresión, y a una baja densidad tanto de determinados ESSs (FAS-hex3 de clases 1 y 2) como del ISE GGG (Sakabe & de Souza 2007). La mayoría de los transcritos con intrones retenidos son degradados mediante NMD (Ge & Porse 2014).

1.2.3.5. Otros eventos que generan diversidad en los transcritos de ARNm.

1.2.3.5.1. Primeros exones alternativos:

Muchos genes contienen múltiples promotores, y cada uno de ellos está regulado por distintos factores. Cada promotor da lugar a diversos sitios de inicio de la transcripción y por lo tanto a primeros exones distintos (Figura I-6 F) y a distintas isoformas. Algunas isoformas solo difieren en las 5'UTR, así que mantienen idéntica la región codificante. Otras isoformas pueden empezar en mitad del gen y dan lugar a proteínas truncadas, que pueden ser funcionales o no (Kornblihtt 2005). El uso de promotores alternativos está relacionado con el AS del gen, y se han descrito casos en los que este mecanismo tiene una gran importancia a nivel fisiológico (Meshorer et al. 2004; Viegas et al. 2004).

1.2.3.5.2. Sitios alternativos de poliadenilación:

Se estima que casi el 70% de los genes humanos poseen diversos PAS en sus regiones no traducidas en 3' (Figura I-6 G) (Derti et al. 2012). Gracias a la presencia de sitios alternativos de poliadenilación dos transcritos del mismo gen, con idéntica CDS, pueden contener 3'UTRs diferentes.

La elección del PAS durante la poliadenilación alternativa puede estar influenciada por múltiples factores como el promotor utilizado, el reclutamiento directo de factores de poliadenilación o de proteínas que influyen en la elección del PAS, la densidad de nucleosomas en torno al PAS, la elongación de la transcripción, la función de varias proteínas de unión a ARN asociadas con el transcrito nascente, la presencia de N6-

Introducción

metiladenosina, o la inhibición de la poliadenilación por el factor de *splicing* U1 snRNP (Tian & Manley 2016).

La 3' UTR es muy importante en la regulación post-transcripcional de los genes ya que es capaz de modular la estabilidad del ARNm a través de su unión a micro ARNs, su salida del núcleo, su localización subcelular, su traducción, e incluso la localización de la proteína que codifica. Una característica muy interesante de los sitios de poliadenilación alternativos dentro de la 3'UTR es su capacidad de ser regulados de forma global y simultánea en numerosos transcritos dentro un tipo celular (Tian & Manley 2016). Los patrones de poliadenilación alternativa son, en gran medida, específicos de tejido (Derti et al. 2012; Lianoglou et al. 2013). Algunos tejidos humanos tienden a favorecer ciertos tipos de PAS; por ejemplo, los tejidos neuronales favorecen isoformas que utilizan PAS distales dentro de las 3'UTR mientras que otros tejidos, como las células sanguíneas o los testículos, favorecen el uso de PAS proximales (Zhang et al. 2005; Liu et al. 2007). Durante la activación de células T, que ocurre de manera coordinada con un proceso de proliferación celular, se produce un acortamiento generalizado de las 3'UTR que minimiza el efecto represor de los micro ARNs que se unen y regulan esas secuencias (Sandberg et al. 2008).

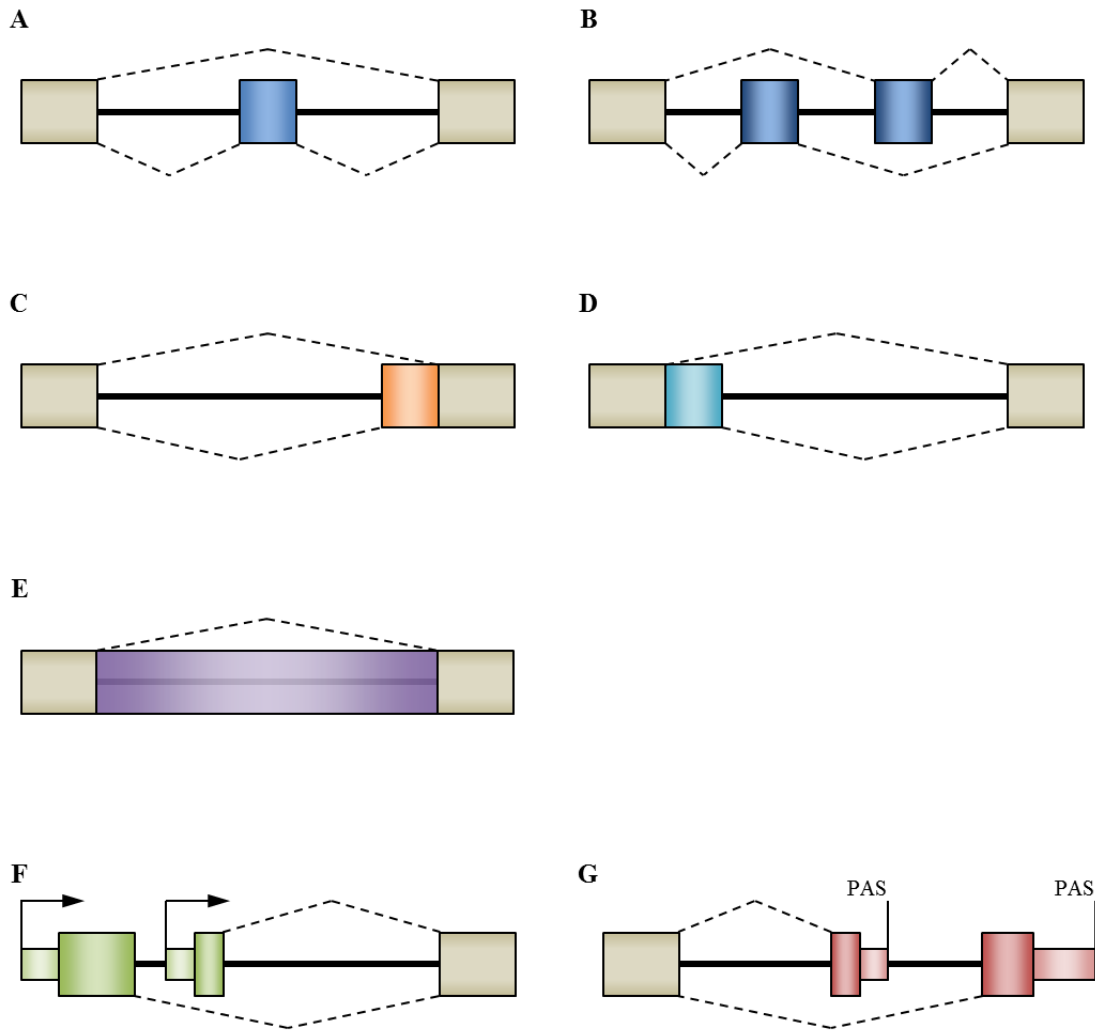


Figura I-6. Principales eventos alternativos de *splicing* y transcripción. Las cajas anchas representan exones, las cajas estrechas representan UTRs, las líneas continuas representan intrones, y las líneas discontinuas representan las posibles uniones de los exones. **A.** Exones casete. **B.** Exones mutuamente excluyentes. **C.** 3'ss alternativo, aceptor de *splicing* alternativo. **D.** 5'ss alternativo, donador de *splicing* alternativo. **E.** Retención de intrón. **F.** Sitios alternativos de inicio de la transcripción. **G.** Sitios de poliadenilación alternativos.

1.2.4. Poliadenilación del extremo 3'

Como comentaba al final del apartado 1.1.3, cuando ocurre la terminación de la transcripción se produce un corte en el ARNm y se añade una cola de poly(A) en su extremo 3'. Tras el corte del ARNm a unos 15-30 nt aguas abajo del PAS se recluta la poly(A)-polimerasa para catalizar la adición de la cola de poly(A) (Colgan & Manley

Introducción

1997). La longitud de la cola de poly(A) varía entre especies, de las 70-80 adeninas de largo en levaduras a las 250-300 adeninas que poseen los humanos (Elkon et al. 2013).

1.3. *Splicing* y enfermedad

El proceso de *splicing* requiere la participación de numerosos factores para su correcto funcionamiento. Cuando alguno de ellos falta o está mutado se suele producir enfermedad.

Las mutaciones que afectan más frecuentemente al *splicing* están en los elementos que regulan este proceso en cis, es decir, en los sitios de *splicing* (5'ss, 3'ss y BP) o en los elementos reguladores que modulan el reclutamiento del espliceosoma (ESEs, ESSs, ISEs e ISSs). Por ejemplo, poco después de que se describiera el *splicing* se descubrió una mutación puntual que genera un nuevo 3'ss en el gen que codifica la beta-globina (*HBB*) a consecuencia de la cual se desarrolla la beta-talasemia, una enfermedad caracterizada por una disminución en los niveles de beta-globina y anemia (Maquat et al. 1980; Spritz et al. 1981; Busslinger et al. 1981). A lo largo de los años se han descrito enfermedades relacionadas con todos los elementos reguladores del *splicing* que son el origen de enfermedades genéticas.

Así, se han descrito mutaciones en los sitios 3'ss y 5'ss (Krawczak et al. 1992; Wang & Cooper 2007; Scotti & Swanson 2015) y mutaciones que dan lugar a la aparición de nuevos sitios de *splicing* (sitios crípticos) en 3' y 5' (Romano et al. 2000; Denecke et al. 2004). Por ejemplo en el caso del gen *MAPT* (proteína tau asociada a microtúbulos), el *splicing* incorrecto del exón 10 es la causa de la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17). En este gen se han descrito mutaciones en un 5'ss (Hutton et al. 1998), en varios ESEs (N279K y N296H/N) y en un ESS (L284L) (Niblock & Gallo n.d.), que son la causa de un funcionamiento defectuoso de la proteína relacionado con la enfermedad.

Como es de esperar en un proceso tan complejo y regulado como el *splicing*, fallos en su maquinaria principal (el espliceosoma) también dan lugar a enfermedades. Entre éstas, la desregulación del espliceosoma suele causar enfermedades degenerativas y cáncer (Scotti & Swanson 2015).

Se ha propuesto que existe un programa de AS específico de tejido (Xu et al. 2002; Ellis et al. 2012; Yeo et al. 2004). Probablemente el órgano más complejo que conozcamos

sea el cerebro humano, y es aquí donde la regulación del AS cobra una especial relevancia, ya que casi la mitad de los exones que se expresan en un único tejido, lo hacen en el cerebro, así como la mayoría de los microexones (Melé et al. 2015). Muchas enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con defectos en el *splicing* (Chabot & Shkreta 2016; Luo et al. 2014; Licatalosi & Darnell 2006).

2. El citoesqueleto celular

Debido a la gran importancia que tiene el citoesqueleto en esta tesis, describiré a continuación algunos aspectos que son interesantes para una mejor comprensión de su funcionamiento.

El citoesqueleto es una estructura presente en todos los organismos (arqueas, bacterias y eucariotas), que lleva a cabo unas funciones esenciales para la vida como ayudar a mantener la morfología celular o la función motora. Con el desarrollo de células más complejas, con núcleos y orgánulos en su interior, el citoesqueleto ha adoptado nuevas funciones. En eucariotas el citoesqueleto organiza en el espacio el contenido de la célula, y conecta física y bioquímicamente a la célula con el medio exterior. Para realizar estas funciones, el citoesqueleto integra la actividad de multitud de proteínas y orgánulos mediante una red interconectada de polímeros filamentosos (Fletcher & Mullins 2010). Un buen símil sobre los componentes del citoesqueleto es el que proponen Fletcher y Mullins; según estos autores, “las proteínas que forman esta estructura son parecidas a las piezas del juego de LEGO[®]. Ambos consisten en muchas copias de unas pocas piezas clave que encajan entre sí, y son capaces de formar objetos más grandes. Ambos pueden ensamblarse en un amplio rango de estructuras con diversas propiedades que dependen de cómo se ensamblen las piezas. Y ambos pueden ser desensamblados y ensamblados de distintas formas de acuerdo a las necesidades. Pero solo el citoesqueleto lleva a cabo estas funciones a través del autoensamblaje” (Fletcher & Mullins 2010).

El citoesqueleto de eucariotas está compuesto por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, a los que acompañan una gran cantidad de moléculas asociadas que regulan su dinámica.

Introducción

2.1. Los microtúbulos

Los microtúbulos (MT) son los filamentos de mayor tamaño y rigidez del citoesqueleto. Son imprescindibles en el mantenimiento de la morfología de las células animales. Son fundamentales en los procesos de migración y de división celular (Akhshi et al. 2014; Etienne-Manneville 2013), forman los carriles sobre los que se mueven proteínas transportadoras (Franker & Hoogenraad 2013; Dent & Baas 2014), forman cilios y flagelos, y juegan un papel muy importante en los procesos de diferenciación celular.

Los MT están formados por heterodímeros de dos proteínas globulares, las tubulinas α y β , que se ensamblan mediante uniones cabeza-cola (*head-to-tail*). Los dímeros de tubulina se unen longitudinalmente formando protofilamentos inherentemente polares, con una tubulina α en un extremo (extremo negativo) y una tubulina β en el otro (extremo positivo). En los protofilamentos la tubulina β de un dímero contacta con la tubulina α del dímero siguiente. Un número variable de protofilamentos se une lateralmente formando un cilindro hueco. En mamíferos los microtúbulos están formados por 13 protofilamentos, con un diámetro exterior de unos 24 nm y un diámetro interior de 12 nm.

La polimerización de los MT se produce principalmente en los centros de organización de MT y consta de dos etapas. La primera fase, de nucleación, es una etapa limitante debido a que los dímeros de tubulina α - β se agregan de forma espontánea muy lentamente, así que es necesaria la presencia del complejo del anillo de tubulina γ (γ -TuRC). Este complejo está formado por tubulina γ y otras proteínas, y actúa como molde sobre el que construye el MT. La segunda etapa, de polimerización, es más rápida y en ella se unen dímeros de tubulina unida a GTP al extremo positivo del MT (Figura I-7). Una vez incorporado, el dímero hidroliza el GTP, de modo que la mayor parte del MT está formado por tubulina unida a GDP excepto el último dímero, que sigue unido a GTP y que proporciona estabilidad al MT (Flynn K C 2013). Por último, los MT entran en una fase estacionaria (Conde & Cáceres 2009) durante la cual se producen ciclos de crecimiento y despolimerización combinados con estadios de pausa, denominados de inestabilidad dinámica (Howard & Hyman 2003). La inestabilidad dinámica de los MT depende en gran medida de la concentración local de tubulina unida a GTP. Cuando esta concentración es alta, los microtúbulos crecen rápidamente, y esto causa una disminución en la concentración de tubulina unida a GTP. Al disminuir la

concentración de tubulina unida a GTP en el medio se produce un crecimiento más lento del MT, se pierde la capa de tubulina unida a GTP, el MT se vuelve inestable y se despolimeriza en un proceso llamado catástrofe. Cuando aumenta la cantidad de tubulina-GTP en el medio se puede revertir la catástrofe y el MT crece nuevamente. De este modo los MT se encuentran en un estado dinámico de crecimiento y despolimerización (Flynn K C 2013). Los MT también pueden entrar en un estado estacionario cuando son estabilizados por proteínas de unión a microtúbulos, cuando están anclados a la membrana de la célula o cuando están unidos a otras estructuras corticales (Flynn K C 2013) (Tabla I-1).

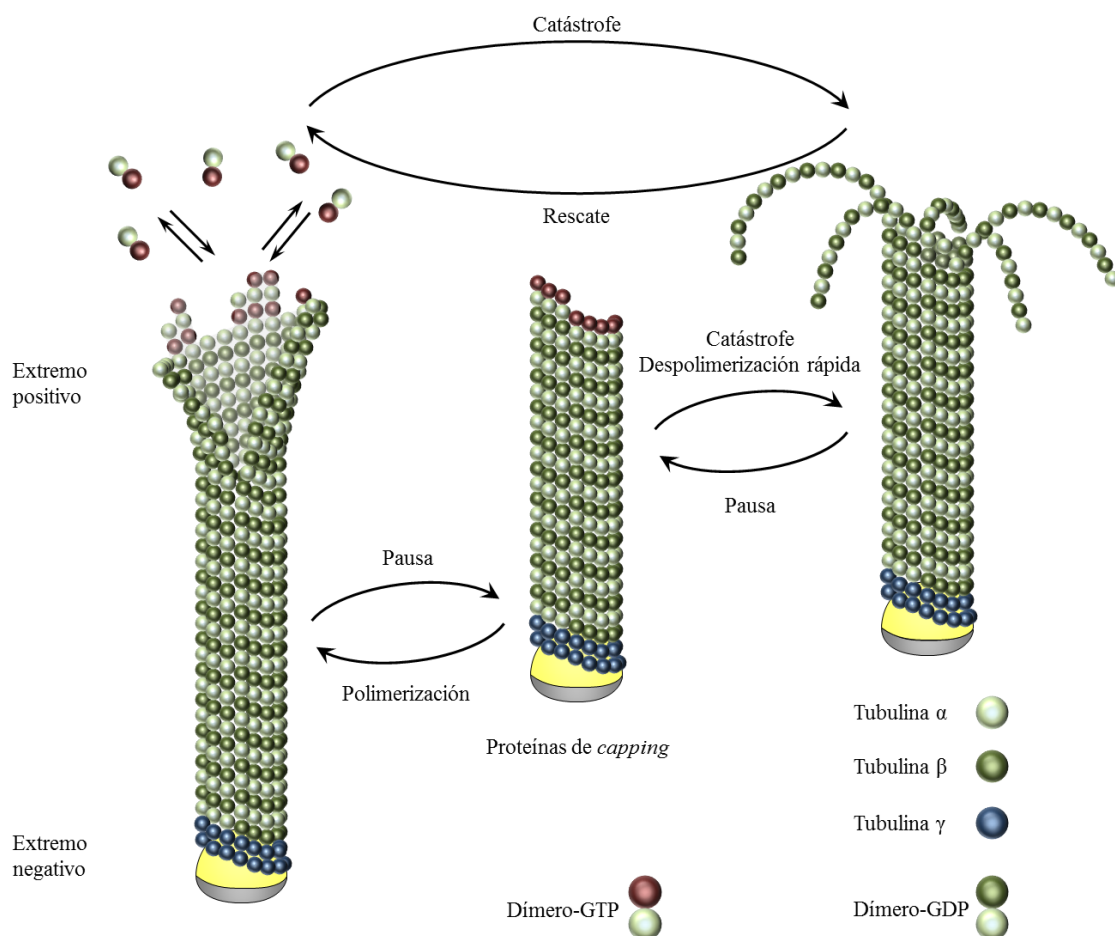


Figura I-7. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La inestabilidad dinámica de los MT supone la coexistencia de fases de crecimiento (rescate) con fases de despolimerización (catástrofe). Durante la fase de crecimiento se incorporan dímeros de tubulina α - β unidos a GTP, mientras que durante la fase de despolimerización se pierden dímeros unidos a GDP. Las proteínas de *capping* evitan la catástrofe en el extremo al que se unen (Adaptado de Flynn 2013 y Conde & Cáceres 2009).

Debido a las distintas funciones que llevan a cabo los microtúbulos, la evolución ha generado diferentes isoformas de sus componentes. En humanos hay cinco tubulinas α y

Introducción

ocho tubulinas β que se diferencian principalmente en su región carboxi terminal. Además las tubulinas pueden sufrir varias modificaciones postraduccionales como acetilaciones, fosforilaciones, poliaminaciones, poliglicilaciones, poliglutamilaciones, y tirosinaciones, que modulan su actividad (Janke 2014).

2.2. Los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios (IF) son proteínas fibrilares que se ensamblan entre sí para formar estructuras fibrosas de mayor tamaño. Como su propio nombre indica, su diámetro es de tamaño intermedio entre el de los microtúbulos y el de los microfilamentos, y está en torno a los 10 nm. Los IF son un grupo amplio y heterogéneo, compuesto por 73 genes (Szeverenyi et al. 2008). La localización de los IF es principalmente citoplasmática y es tan variable entre células que forman una “huella dactilar” celular (Chang & Goldman 2004; Herrmann et al. 2003). Las proteínas que forman los IF (IFP) tienen una estructura secundaria común, necesaria para su autoensamblaje, que consta de una varilla central formada por hélices α flanqueada por dominios de longitud variable que no forman hélices α (Chang & Goldman 2004). Los dominios amino terminales son esenciales para el ensamblaje de los IF, y se cree que los dominios carboxi terminales facilitan las interacciones laterales y la organización de las redes de IF (Herrmann et al. 2003) (Figura I-8). A diferencia de microtúbulos y microfilamentos, los IF forman polímeros apolares.

Las IFP se han clasificado en cinco tipos en función de su estructura primaria, la estructura de sus genes, sus propiedades de ensamblaje y sus patrones de expresión (Strelkov et al. 2003). Los tipos I y II están formados por las queratinas ácidas y básicas respectivamente. Las queratinas forman heteropolímeros entre sí, y se expresan en todas las células epiteliales. En humanos hay descritas hasta la fecha 28 queratinas ácidas y 26 queratinas básicas. El tipo III está formado por la vimentina (VIM), la desmina (DES), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la periferina (PRPH). Estas IFP forman homopolímeros, y se expresan en múltiples tipos celulares, desde células mesenquimales hasta células neuronales, pasando por células musculares o hepáticas. El tipo IV está formado por IFP de expresión neuronal como el triplete de los neurofilamentos (NF-L, NF-M y NF-H) y la internexina α (INA). También están incluidas en este grupo la nestina (NES), que se expresa en células neuronales y musculares; y la sincoilina (SYNC), que se expresa en células musculares. Las IFP del

tipo V, las lamininas, son algo diferentes del resto de grupos, ya que son de expresión nuclear. Además su varilla central es algo mayor que las de los otros grupos de IFPs. Dentro del tipo V están las lamininas A/C (LMNA), la laminina C, que es una variante de *splicing* de la laminina A, y las lamininas B1 y B2. Por último hay dos IFP sin clasificar que se expresan en el cristalino de los vertebrados, que son la Filensina (BFSP1) y la Faquinina (BFSP2).

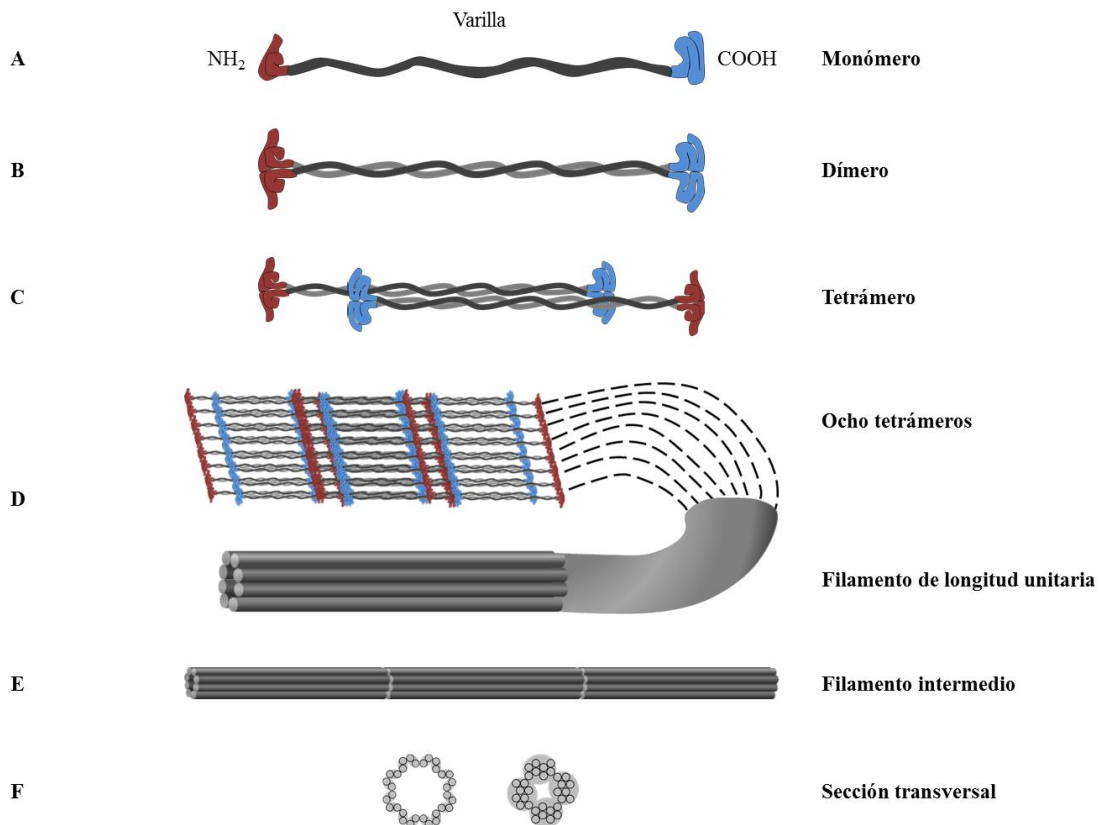


Figura I-8. Estructura de los filamentos intermedios. Las varillas de los monómeros (A) se enrollan entre sí dando lugar a un dímero (B) que tiene forma de hélice superenrollada. Dos dímeros se unen de forma antiparalela y forman un tetrámero (C). Un número variable de tetrámeros (en la figura aparecen representados ocho, como en el caso de la vimentina) se une lateralmente y da lugar a un filamento de longitud unitaria (ULF) (D). Varios ULF se unen longitudinalmente y forman un IF (E). Los IF inmaduros tienen un empaquetamiento laxo (F, panel izquierdo) que al madurar se comprimen (F, panel derecho). Adaptado de (Cooper 2000).

2.3. Los microfilamentos

Los filamentos de actina (actina F) son los componentes del citoesqueleto de menor diámetro, ya que miden entre 6-9 nm de diámetro, y por eso se les llama microfilamentos (MF). Los MF son fundamentales para la capacidad motora de la

Introducción

célula, el mantenimiento de la morfología celular y en los procesos de diferenciación celular. Son imprescindibles durante la exocitosis y la endocitosis, y en el mantenimiento de la estabilidad celular.

Los MF están formados por subunidades de actina globular (actina G) unidas entre sí, formando dos hélices dextrógiras. Al igual que los microtúbulos, los microfilamentos son moléculas polares, pero a diferencia de los primeros, la polaridad de los MF está determinada por la orientación de los monómeros de actina, y por la unión no covalente entre la actina G y nucleótidos de adenina ATP, ADP-Pi y ADP. La polaridad de los MF es fundamental para su dinámica; los filamentos de actina tienen un comportamiento cíclico conocido como *actin treadmilling* (Wegner 1976), y que se puede traducir como cinta transportadora, rueda de andar, o noria de actina.

Como en el caso de los microtúbulos, la nucleación de la actina es una etapa crítica en la formación de los MF. La nucleación espontánea es muy rara debido a inestabilidad de los dímeros de actina G, por eso son necesarios los factores nucleadores de actina. Se han descrito tres tipos de factores que participan en la nucleación de la actina; el complejo Arp2/3, las forminas, y los nucleadores aglutinantes de monómeros en tándem (*tandem-monomer-binding nucleators*) (Firat-Karalar & Welch 2011). Una vez que se forma un oligómero de tres subunidades de actina, se produce la polimerización del filamento (Figura I-9) (Flynn K C 2013).

La cinta transportadora de la actina es el proceso mediante el cual los MF crecen por uno de sus extremos, el extremo positivo o extremo con púas, mientras que a la vez se desmoronan por el otro extremo, el extremo negativo o extremo puntiagudo (Figura I-9). Es un proceso de gran importancia para la función motora mediada por la actina que se produce gracias a la fuerza de empuje que genera la polimerización de los MF en la parte interna de la membrana al mismo tiempo que los MF se despolimerizan por el otro extremo. Durante este proceso se libera al medio actina G desde el extremo negativo del MF y posteriormente se vuelve a incorporar por el extremo positivo. La cinta transportadora de actina se produce porque ambos extremos de los MF necesitan diferentes concentraciones críticas de actina G en el medio para su ensamblaje. De este modo, cuando la concentración de actina G está entre ambas concentraciones la cinta se pone en funcionamiento y se produce el ensamblaje en el extremo positivo, y el desprendimiento en el extremo negativo (Figura I-9). También es importante en este

proceso la actividad ATPasa de la actina. En el citoplasma, la forma más común de encontrar la actina G es cuando está unida a ATP, y en este estado se incorpora al extremo positivo de los MF. Poco después la actina hidroliza el ATP a ADP-Pi, y más tarde se libera el Pi. Por lo tanto se dice que los MF están estratificados, ya que están compuestos por una pequeña capa de actina unida a ATP en su extremo positivo, una región central formada por actina unida a ADP-Pi, y actina unida a ADP en el extremo negativo (Flynn K C 2013). Esta estratificación es fundamental para la dinámica de la actina, ya que la afinidad de muchas de las proteínas que se unen a la actina depende del estado de fosforilación de la adenosina a la que está unida (Pak et al. 2008; Flynn K C 2013). Hay casi 400 proteínas que se unen a la actina según *Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org/>) (Tabla I- 1).

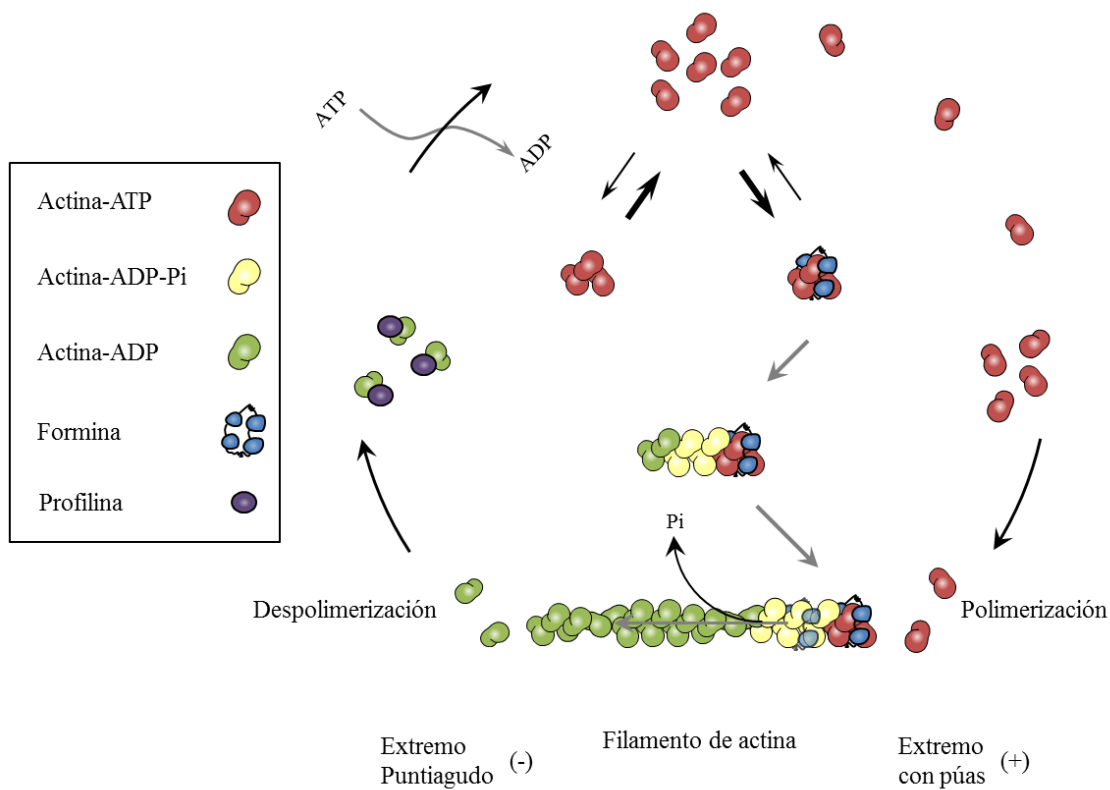


Figura I-9. Crecimiento de los MF y ciclo de la actina. Los monómeros actina G libre en el medio son capaces de unirse entre sí espontáneamente, pero su unión es débil y tiende a romperse. Los factores promotores de la nucleación, como las forminas, estabilizan las uniones de actina G y favorecen la formación de los filamentos de actina. Las forminas acompañan al MF en su crecimiento. La profilina ayuda a la actina unida a ADP, que se desprende del extremo negativo de los MF, a intercambiar el ADP por ATP. La actina-ATP “reciclada” se puede unir de nuevo al extremo positivo del MF. (Adaptado de Flynn 2013 y Gundersen 2008).

Introducción

En determinados procesos celulares, como durante el avance de los conos de crecimiento en la neuritogénesis, es necesaria una elevada tasa de despolimerización de los MF. Proteínas como la cofilina realizan esta función uniéndose directamente a los MF y cortándolos (Pak et al. 2008).

2.4. El citoesqueleto en las neuronas.

La función del sistema nervioso depende de la compleja estructura de sus redes neuronales. Se ha calculado que un cerebro humano posee aproximadamente 86×10^9 neuronas (Azevedo et al. 2009; von Bartheld et al. 2016) ,y cada una de ellas puede formar hasta un millar de conexiones (Uzman et al. 2000). Para formar todas esas conexiones las neuronas han desarrollado una morfología altamente polarizada con estructuras especializadas llamadas axones y dendritas. Esta arquitectura celular es muy diferente de la forma esférica con la que nacen las neuronas, y se logra gracias a un proceso de diferenciación.

Una neurona típica está formada por un soma, o cuerpo celular, de forma poligonal, donde se encuentra el núcleo y la mayor parte de los orgánulos. Del soma parten numerosas prolongaciones muy ramificadas llamadas dendritas, y una prolongación más larga que se llama axón. El axón contiene todos sus microtúbulos orientados en la misma dirección, con el extremo negativo apuntando al soma y unidos por la proteína tau. Las dendritas son el resto de las prolongaciones de las neuronas. Son unas estructuras muy ramificadas que contienen microtúbulos orientados en ambas direcciones y que están unidos entre sí por la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAPT2). Las dendritas contienen orgánulos que no están presentes en el axón, como el retículo endoplasmático rugoso, polirribosomas, o parte del aparato de Golgi.

Las neuronas tienen tres funciones principales que consisten en: recibir información, procesarla y enviar una respuesta. Reciben la información del medio a través de las dendritas (Urbanska et al. 2008), y la envían por medio del axón (Debanne et al. 2011), pero no se sabe con exactitud cómo se procesa la información en la neurona (Stuart & Spruston 2015).

2.4.1. Morfogénesis neuronal

Hay muchos tipos de neuronas con funciones y características diferentes, pero el modelo de desarrollo neuronal mejor estudiado es el de las neuronas piramidales del

hipocampo de roedores (Banker 1994; Dotti et al. 1988; Arimura & Kaibuchi, 2007; Wiggin, Fawcett, & Pawson, 2005,) (Figura I-10 A).

Las neuronas nacen con forma esférica, y su proceso de maduración se puede dividir en cinco fases o etapas consecutivas para su estudio. Estas fases se caracterizan por cambios evidentes en la morfología que se corresponden con reordenamientos del citoesqueleto (Flynn K C 2013).

En primer lugar conviene describir unas estructuras neuronales de gran importancia para el desarrollo de las neuronas; las neuritas y los conos de crecimiento (Figura I-10 B, C). Las neuritas son las prolongaciones citoplasmáticas de las neuronas que darán lugar a axones y dendritas, pero que en los estadios iniciales de su desarrollo carecen de las características que los definen. Los conos de crecimiento (S. Ramon y Cajal 1890) son unas estructuras con forma de abanico localizadas en el extremo de las neuritas que está más alejado del soma. En la zona periférica de los conos de crecimiento se pueden formar dos estructuras diferentes que dirigen el avance de la neurita, son los filopodios y los lamelipodios. Los filopodios son estructuras estrechas y alargadas, ricas en haces de actina. Los lamelipodios, en cambio, son estructuras anchas y cortas, formadas por una malla de actina (Figura I-10 C).

La primera fase del desarrollo de las neuronas piramidales (fase 0) corresponde al momento de su nacimiento (o al momento de su sembrado en una placa de cultivo), y en esta fase las células tienen forma esférica. En respuesta a diferentes estímulos del medio las neuronas forman filopodios y lamelipodios y de esta forma alcanzan la fase 1. Durante la transición entre las fases 1 y 2 se empiezan a formar las primeras neuritas en un proceso conocido como neuritogénesis que se comentará con mayor detenimiento en el siguiente apartado. En la fase 2 las neuronas ya poseen neuritas propiamente dichas (cuando alcanzan una longitud igual o mayor al diámetro del soma). Todas estas neuritas tienen el potencial de convertirse en axón. Durante la transición entre las fases 2 y 3, una de las neuritas empieza a crecer más rápido que las demás, y la neurona se polariza (fase 3). El resto de las neuritas crecen posteriormente y se ramifican, convirtiéndose en dendritas (fase 4). Finalmente se forman las espinas dendríticas y las conexiones sinápticas (fase 5). En cada fase hacen falta cambios en la arquitectura celular y en el citoesqueleto (Flynn K C 2013).

Introducción

2.4.1.1. Neuritogénesis

La formación de las neuritas es el resultado de las fuerzas que se generan en el interior de la neurona en respuesta a estímulos externos. Es necesaria la fuerza de empuje que proporciona el citoesqueleto de actina junto con el soporte estructural que aportan los microtúbulos para construir las neuritas. Para que la neurita se empiece a formar es imprescindible que la malla de actina que rodea a la célula sea lo suficientemente dinámica. Esto se sabe porque el tratamiento con jasplaquinolida, un ciclodepsipéptido que estabiliza la actina, impide la neuritogénesis (Flynn et al. 2012).

En las células de hipocampo cultivadas *in vitro*, la neuritogénesis tiene lugar en tres etapas: protrusión, estrangulamiento, y consolidación (Figura I-10 B). La protrusión comienza poco después del sembrado de las células, cuando éstas emiten un lamelipodio que rodea al soma. El lamelipodio se colapsa en ciertos puntos y se extiende en otros, dando lugar a lo que serán los conos de crecimiento de las nuevas neuritas. A medida que el frente avanza se le unen microtúbulos y neurofilamentos, y se produce el estrangulamiento del lamelipodio circundante que aporta su contenido a la estructura (Dehmelt et al. 2003; Flynn et al. 2012; Flynn K C 2013). Por último, en la fase de consolidación, los microtúbulos se compactan en haces y se forma en torno a ellos el cilindro de la neurita. El borde del soma se consolida y desaparecen los lamelipodios que quedaban.

También se ha descrito que en cultivos de neuronas corticales la neuritogénesis se inicia mediante la extensión de un filopodio (Figura I-10 B asterisco) (Dent et al. 2007). En este caso emerge un filopodio que crece primero lentamente hasta que acumula material citoplasmático y microtúbulos y forma un cono de crecimiento.

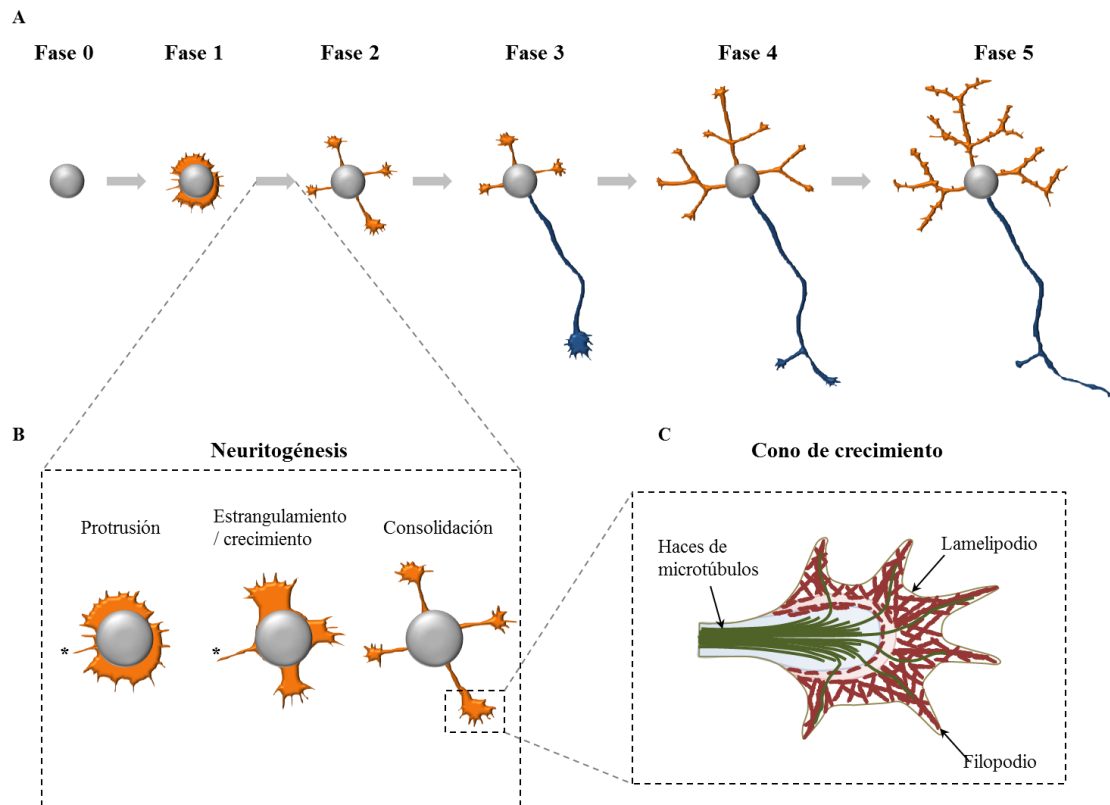


Figura I-10. Fases del desarrollo de una neurona piramidal. **A.** Fases de la diferenciación. El soma de la neurona aparece coloreado en gris, con las neuritas y las dendritas en naranja, y el axón en azul. **B.** Etapas de la neuritogénesis. El proceso de formación de una neurita por medio de un filopodio aparece señalado con un asterisco. **C.** Estructura del cono de crecimiento. Los MT están dibujados en verde y los MF en rojo. (Adaptado de Flynn 2013 y Lowery 2009).

Tabla I-1 Breve resumen de proteínas asociadas al citoesqueleto

Proteína	Gen	Función
Proteínas asociadas a microtúbulos		
APC	<i>APC</i>	Participa en la estabilización de los MT en la corteza celular. Es necesaria para la localización de MACF1 en la membrana, la cual es imprescindible para su función.
CLIP1	<i>CLIP1</i>	Se une al extremo positivo de los MT y favorece su crecimiento y hacinamiento. También une vesículas a los MT, importante para su transporte intracelular.
Subunidad 1 de la dinactina	<i>DCTN1</i>	Relacionada con el movimiento retrógrado de vesículas y orgánulos a lo largo de los MT.
Cadena pesada 1 de la dineína citoplasmática 1	<i>DYNC1H1</i>	Actúa como motor para el movimiento intracelular de vesículas y orgánulos a lo largo de los MT.
Subunidad 1 de la katanina	<i>KATNA1</i>	Corta los MT de forma dependiente de ATP, favoreciendo su salida del centrosoma. Es fundamental para el crecimiento de los axones.
Cadena pesada de la quinesina	<i>KIF5B</i>	Proteína motora dependiente de MT requerida para la distribución normal de mitocondrias y lisosomas.
MACF1	<i>MACF1</i>	Entrelaza los microtúbulos con filamentos de actina. Participa en la estabilización de los MT en la corteza celular.
MAP-2	<i>MAP2</i>	Se desconoce su función exacta, pero parece que estabiliza los MT e impide su despolimerización. Parece que también parece que les aporta rigidez.
EB1	<i>MAPRE1</i>	Se une al extremo positivo de los MT y regula su dinámica. Favorece la nucleación y la elongación de los MT.
Tau	<i>MAPT</i>	Favorece el ensamblaje y la estabilidad de los MT. Puede que esté relacionada con el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de las neuronas. Su extremo carboxi se une a los MT de los axones, y el amino se une a la membrana. Las isoformas cortas permiten la plasticidad del citoesqueleto, mientras que las isoformas más largas favorecen la estabilidad.
Estatmina	<i>STMN1</i>	Desestabiliza los MT: previene su ensamblaje y favorece su despolimerización. Está relacionada con el control del miedo innato y aprendido.
Proteínas asociadas a filamentos intermedios		
Desmoplaquina	<i>DSP</i>	Implicada en la unión entre IF y desmosomas.
Filaggrina	<i>FLG</i>	Entrelaza las fibras de queratina con otros elementos del citoesqueleto en células epiteliales.
Plectina	<i>PLEC</i>	Adaptador entre MF, MT e IF, también conecta el citoesqueleto con la membrana plasmática.

Proteínas asociadas a microfilamentos

Complejo Arp2/3	<i>ARPC2 / ARPC3</i>	Complejo que regula la polimerización de actina, y que junto con algún factor promotor de la nucleación (NPF) regula la formación de las mallas de actina.
Cordon-bleu	<i>COBL</i>	NPF que controla la morfología neuronal, especialmente en sitios con una elevada dinámica de la actina. Favorece la ramificación de axones y dendritas. Se une y secuestra actina G. También puede intervenir en el corte y en la despolimerización de los filamentos de actina.
Cortactina	<i>CTTN</i>	Participa en la organización del citoesqueleto de actina, en la morfogénesis celular, en la formación de lamelipodios e invadopodios. Es importante en la formación de los conos de crecimiento. Es necesaria para la estabilización de canales de potasio en la membrana.
Epsina	<i>EPN1</i>	Proteína formadora de haces de actina. Regula la endocitosis mediada por receptor y la curvatura de la membrana.
Juxtandina (o ermina)	<i>ERMN</i>	Organiza el citoesqueleto de actina en células del sistema nervioso central, principalmente en oligodendrocitos.
Formina 1	<i>FMN1</i>	NPF importante en la formación de uniones tipo <i>adherens</i> .
JMY	<i>JMY</i>	NPF citoplasmático. En el núcleo es un factor de transcripción que se une a p300.
Profilina	<i>PFN1</i>	Se une a la actina G y afecta a la estructura del citoesqueleto. A concentraciones altas previene la polimerización de actina, mientras a bajas concentraciones, la favorece. Inhibe la agregación de HTT.
Spire	<i>SPIRE1</i>	NPF de filamentos de actina no empaquetados ni ramificados. Está relacionado con el transporte de vesículas.
Supervillina	<i>SVIL</i>	Une el citoesqueleto de actina con la membrana celular y con rutas de señalización. Modula la formación de adhesiones focales y de lamelipodios.
Timosina beta (B4)	<i>TMSB4X</i>	Secuestra a la actina G e interacciona con la actina F. Regula el ensamblaje de la actina.
Ena/VASP	<i>VASP</i>	Favorece la elongación de los filamentos de actina. Protege el extremo positivo del <i>capping</i> . También favorece el crecimiento de los filamentos ayudando en la incorporación de actina unida a profilina al extremo positivo del filamento. Es importante en la orientación del axón, y en las dinámicas de lamelipodios y filopodios.
WASP	<i>WAS</i>	NPF que regula la reorganización de los filamentos de actina a través de su interacción con el complejo Arp2/3
SCAR/WAVE	<i>WASF1</i>	NPF que participa en la transmisión de señales desde receptores de membrana hasta el citoesqueleto. Forma parte del complejo WAVE que regula la formación de lamelipodios a través de su interacción con el complejo Arp2/3

Introducción

3. El factor regulador de la elongación de la transcripción 1, TCERG1

TCERG1, también conocido como *CA150*, o *TAF2S*, es un gen que codifica una proteína nuclear que regula la elongación de la transcripción y el *splicing*. En humanos este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5, en la banda 32, y se extiende a lo largo de aproximadamente 64,5 kilobases (chr5: 146.447.311-146.511.961 en el ensamblaje GRCh38/hg38). El gen que codifica a *TCERG1* está formado por 22 exones, el sexto de los cuales es un exón casete que codifica una secuencia de 21 aa que solo está presente en mamíferos. (Figura I-11 A). Se han descrito dos isoformas de la proteína; la forma canónica que contiene los 22 exones y da lugar a una proteína de 1098 aa y 123 kDa (Suñé et al. 1997), y una segunda isoforma que carece del sexto exón y da lugar a una proteína de 1077 aa y 121 kDa. Además esta isoforma posee unas regiones 5' y 3' UTR más cortas que las de la isoforma canónica.

La proteína *TCERG1* está muy conservada entre aves y mamíferos, con una identidad de secuencia mayor del 94% (Figura I-12 A, B). Los dominios funcionales de la proteína están aún más conservados, ya que sus secuencias son idénticas en mamíferos, y solo cambian en algunos residuos en comparación con las aves (Figura I-12 C, D). En otros vertebrados el grado de conservación de la proteína sigue siendo muy elevado, y solo al comparar la secuencia de la proteína humana con insectos o nematodos encontramos una mayor divergencia. *TCERG1* y *tcer-1* (el homólogo de *c. elegans*) tienen un 36% de identidad de secuencia. Este porcentaje varía notablemente entre dominios, desde el 15% de identidad en el dominio WW1 hasta el 70% en el WW3.

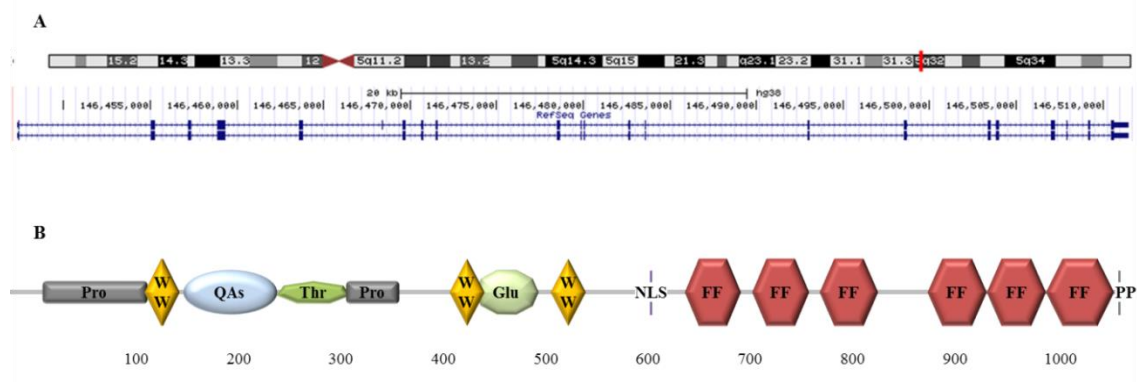


Figura I-11. TCERG1. A. El gen de *TCERG1* de humanos se encuentra en la banda 32 del cromosoma 5 y contiene 22 exones. Se han descrito dos isoformas que generan dos proteínas distintas, a una de ellas le

(continuación pie Figura I-11) falta el exón 6. **B** La proteína humana TCERG1 contiene 1098 aa. En su estructura destacan sus tres dominios WW y sus seis dominios FF.

Según los datos del proyecto de Expresión de Genotipo-Tejido (GTEx, *Genotype-Tissue Expression*) perteneciente al proyecto ENCODE y del *Human Protein Atlas* de *SciLifeLab*, se ha detectado la expresión de TCERG1 en todos los tejidos analizados, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. Los mayores niveles de expresión en ambos casos se encuentran en el cerebro, y los menores en el hígado.

TCERG1 se localiza en el núcleo de las células de mamífero de manera difusa y forma acúmulos siguiendo un patrón granular. Los gránulos en los que se acumula TCERG1 son los *speckles* nucleares (Sanchez-Alvarez et al. 2006), que son estructuras subnucleares en las que se acumulan factores de *splicing* y que se cree que sirven como lugares de almacenamiento, ensamblaje y/o modificación para dichos factores (Lamond & Spector 2003; Sanchez-Alvarez et al. 2011). Los dominios FF4 y FF5 de TCERG1 son imprescindibles para la localización de TCERG1 a los *speckles* nucleares (Sanchez-Hernandez et al. 2012).

3.1. Estructura de la proteína:

En la secuencia de TCERG1 destacan tres dominios WW y seis dominios FF, una secuencia de localización nuclear y seis regiones con una composición de aminoácidos especialmente rica en prolinas, alaninas y glutaminas, treoninas o ácido glutámico (Figuras I-11 B, I-12 A).

Los **dominios WW** (también llamados dominios *rsp5* o *WWP*) (Figuras I-11 B, I-12 A) son pequeñas regiones proteicas que facilitan las interacciones entre proteínas. Son capaces de reconocer y unirse a secuencias ricas en residuos de prolina o en residuos de serinas y treoninas fosforiladas (Chen & Sudol 1995). Los dominios WW están formados por unos 35 aa, que se pliegan formando una triple lámina beta antiparalela (Macias et al. 1996). Reciben su nombre de dos residuos de triptófano muy conservados separados por 20-23 aa. También está muy conservado un residuo de prolina situado a dos residuos de aminoácido del segundo residuo de triptófano. En el caso de los dominios WW de TCERG1, además de los residuos conservados ya mencionados, hay otros siete residuos conservados: las treoninas 12 y 24, el ácido aspártico 14, la tirosina 20, la asparragina 21, y la serina 27. Los dominios WW se clasifican de forma general en seis grupos en función del ligando al que se unen (Otte et al. 2003). El dominio

Introducción

WW1 de TCERG1 pertenece al grupo fosfoserina/fosfotreonina (poS/poT), y podría mediar la interacción con el factor de *splicing* SF1 (Goldstrohm et al. 2001). El dominio WW2 pertenece al grupo de dominios WW que reconoce las secuencias PPPLIPPPP y PPLIPPPP, e interviene en la unión a SF1, al snRNP U2 y a U2AF2 (U2AF65) (Goldstrohm et al. 2001; Lin et al. 2004). El dominio WW3 necesita para su correcto plegamiento una hélice alfa formada por los aminoácidos 567-573 (Fidan et al. 2011). Este dominio interacciona con el factor de *splicing* U2AF2 (Sanchez-Alvarez et al. 2006).

Los dominios WW se encuentran en numerosas proteínas (en humanos hay 50 proteínas con dominios WW según Uniprot) involucradas en diversos procesos, como la transcripción y el procesamiento del ARN, la estabilidad y movilidad de proteínas, la señalización a través de receptores o la estabilidad del citoesqueleto.

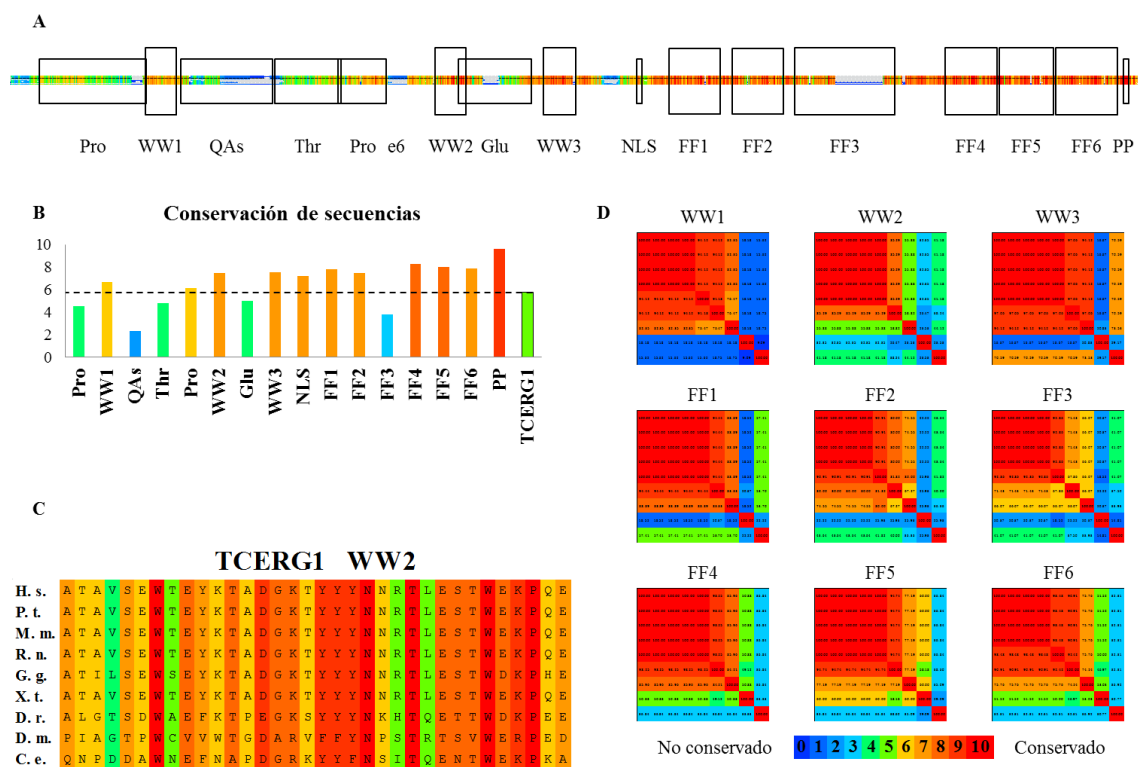


Figura I-12. Conservación de TCERG1 entre especies. Se han comparado las secuencias de TCERG1 (o sus homólogos) de *Homo sapiens* (H. s.), *Pan troglodites* (P. t.), *Mus musculus* (M. m.), *Rattus norvegicus* (R. n.), *Gallus gallus* (G. g.), *Xenopus tropicalis* (X. t.), *Danio rerio* (D. r.), *Drosophila melanogaster* (D. m.), *Caenorhabditis elegans* (C. e.) en este orden en todos los apartados. **A.** Alineamiento de las secuencias de los nueve homólogos realizado con el programa PRALINE. Aparecen enmarcados los dominios (cajas grandes) y las regiones con una composición sesgada. **B.** Gráfico de barras que representa el promedio de la conservación de las regiones de TCERG1. La línea negra

(continuación pie Figura I-12) punteada indica el valor medio de conservación de la proteína completa. C. Ampliación del alineamiento del dominio WW2. D. Identidad de secuencia de los nueve dominios de TCERG1, en la que cada cuadrado representa la similitud de cada dominio de cada especie, comparado con el resto de especies.

Los **dominios FF** (Bedford & Leder 1999) (Figuras I-11 B, I-12 A) están formados por unos 60 aa que se unen a fosfopéptidos y que por lo tanto intervienen en interacciones proteína-proteína. Deben su nombre a dos residuos de fenilalanina altamente conservados situados cerca de los extremos amino y carboxiterminal del dominio. Los dominios FF se pueden encontrar de forma individual o múltiple, pero lo más frecuente es encontrarlos repetidos entre dos y seis veces. Se ha descrito que los dominios FF de TCERG1 reconocen factores de transcripción y de *splicing* a través de múltiples interacciones débiles (Smith et al. 2004). A diferencia de otros dominios de interacción proteína-proteína, que están presentes en diversas proteínas que no están relacionadas entre sí, los dominios FF sólo se encuentran en dos familias de proteínas de eucariotas: los factores de *splicing* relacionados con el factor de *splicing* de levaduras Prp40 (TCERG1, TCERG1L, PRPF40A, PRPF40B), y las proteínas de la familia de Rho GTPasas p190 ARHGAP5 y ARHGAP35).

El plegamiento de los dominios FF da lugar a tres hélices alfa que se organizan formando un haz ortogonal, con una hélice 3_{10} en el bucle entre la segunda y la tercera hélice alfa. Los dos residuos conservados de fenilalanina quedan en el medio de la primera y de la tercera hélice alfa, y forman parte del núcleo hidrofóbico del dominio (Allen et al. 2002). Los estudios sobre la estructura de orden superior que adquieren los dominios FF de TCERG1 revelan diferencias entre la organización de los dominios FF 1-3 y los dominios FF4-6. Los primeros están separados por unas secuencias cortas que se pliegan formando hélices alfa y que actúan como conectores entre los dominios, los cuales se organizarían formando un ángulo de unos 110° , con el dominio FF 2 en el vértice (Lu et al. 2009). Por otra parte, los dominios FF 4-6 están separados entre sí por un solo aminoácido, y su estructura es mucho más compacta (Liu et al. 2013). La primera función que se le atribuyó a los dominios FF fue la capacidad de los dominios FF de TCERG1 de unirse al CTD fosforilado de la RNAPII (Carty et al. 2000). Más tarde se describió que los dominios FF 1-3 de TCERG1 se unen al factor de transcripción y *splicing* HTATSF1 (Tat-SF1) con baja afinidad pero de forma cooperativa, y que podrían unirse al ADN (Smith et al. 2004).

Introducción

Las regiones con una composición de aminoácidos sesgada presentes en la secuencia de TCERG1 se encuentran en las siguientes posiciones (Figuras I-11 B, I-12):

32-132: región rica en residuos de prolina que probablemente esté implicada en la interacción de TCERG1 con otras proteínas con dominios WW o SH3.

169-258: región rica en residuos de alanina y glutamina que contiene 38 repeticiones imperfectas del dipéptido glutamina-alanina, y cuya secuencia exacta es QAQV(QA)₂₉ QVQAQVQAQV(QA)₂ (Suñé et al. 1997). Esta región es susceptible de sufrir expansiones del hexámero de nucleótidos CAGGCC en el exón 4. Se ha descrito una correlación entre la longitud y la secuencia de las repeticiones de QAs de TCERG1 y la edad a la que se empiezan a manifestar los síntomas de la enfermedad de Huntington (Holbert et al. 2001) (ver más adelante).

260-331: región rica en residuos de treonina y serina susceptibles de modificaciones postranscripcionales.

328-378: región rica en residuos de prolina, y que al igual que la región 32-132 puede estar implicada en interacciones con otras proteínas.

454-515: región rica en residuos de ácido glutámico que podría interaccionar con dominios SH3 de otras proteínas, al igual que hace la proteína SH3BGR (proteína rica en ácido glutámico que se une a dominios SH3) (Scartezzini et al. 1997).

1083-1087: región de poliprolinas, que está completamente conservada desde *C. elegans*, y que podría estar relacionada con la estabilidad de la estructura de la proteína.

Entre las modificaciones postraduccionales que modulan la actividad de TCERG1 cabe destacar la fosforilación de las serinas en las posiciones 11, 638, 834 y 933; la metilación de las argininas en las posiciones 20, 28, 30, 41 y 48; y sobre todo la SUMOilación (adición del grupo SUMO, *Small Ubiquitin-like MOdification*) de las lisinas en posición 503 y 608 (<http://www.uniprot.org>), de la que se hablará más adelante.

3.2. Función de TCERG1:

3.2.1. TCERG1 en transcripción

La proteína TCERG1 fue purificada por primera vez a partir del fraccionamiento de extractos nucleares de células HeLa mediante columnas de afinidad de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y ensayos funcionales de complementación de la actividad transcripcional mediada por Tat (Suñé et al. 1997). En aquel trabajo se observó que la inmunodepleción de TCERG1 y de algunos de sus factores asociados reduce la transactivación de la transcripción inducida por Tat *in vitro*, y que la sobreexpresión de una forma truncada de la proteína sin los primeros 250 aa produce una disminución de la activación mediada por Tat del promotor del VIH-1. Poco tiempo después se describió que la sobreexpresión de TCERG1 en células HEK293T también produce una disminución de la transcripción (basal e inducida por Tat) de los promotores del VIH-1 y de la integrina- α 4 en genes reporteros. Este efecto es dependiente de la presencia de una caja TATA en la secuencia del promotor. La represión transcripcional inducida por la sobreexpresión de TCERG1 se debió a una inhibición de la elongación de la transcripción (Suñé & Garcia-Blanco 1999).

TCERG1 interacciona con CDK9 y la ciclina T1, ambos componentes de P-TEFb (Sanchez-Alvarez et al. 2006), que es el factor clave en la transición entre las fases de pausa y de elongación productiva durante la transcripción. También interacciona con el CTD de la RNAPII cuando las serinas 2, 5 y 7 están fosforiladas (Liu et al. 2013), y esto ocurre precisamente durante la salida de pausa de la RNAPII (Figura I-2). En conjunto, los datos funcionales y bioquímicos sugieren que TCERG1 puede ser necesaria durante la transición entre la pausa que ocurre al comienzo de la transcripción, y la elongación productiva. TCERG1 puede ejercer un efecto tanto positivo como negativo sobre la transcripción dependiendo del contexto (Pearson et al. 2008; Sánchez-Álvarez et al. 2010). También se ha descrito que la SUMOilación inhibe la activación transcripcional mediada por TCERG1 en un modelo de plásmido reportero (Sánchez-Álvarez et al. 2010).

Por último, TCERG1 modula la actividad del factor de transcripción CEBPA. La sobreexpresión de TCERG1 inhibe las actividades de activación, represión y de parada del crecimiento celular mediadas por CEBPA (Banman et al. 2010). Cuando se sobreexpresan de forma simultánea CEBPA y TCERG1, CEBPA redirige la

Introducción

localización de TCERG1 a las regiones pericentroméricas, donde se expresa normalmente CEBPA (Banman et al. 2010). El efecto inhibitor de TCERG1 sobre CEBPA no se debe al secuestro de CEBPA (Moazed et al. 2011), pero está mediado por la región de QAs de TCERG1 (Miller et al. 2016).

3.2.2. TCERG1 en *splicing*

La caracterización de TCERG1 avanzó cuando se describió su interacción con el factor de *splicing* SF1 (Goldstrohm et al. 2001). Posteriormente se observó que además interacciona con los snRNPs que forman parte del espliceosoma mayor (U1, U2, U4, U5 y U6) y con el factor U2AF2, y que se asocia con el snRNP U2 17S y con los factores de *splicing* encargados del ensamblaje temprano del espliceosoma (Lin et al. 2004; Sanchez-Alvarez et al. 2006). También se describió su interacción con DDX5 (DEAD-Box Helicase 5), una proteína relacionada con el AS (Ingham et al. 2005) y su identificación en numerosos complejos del espliceosoma (Makarov, Evgeny M; Makarova 2002; Zhou et al. 2002; Neubauer et al. 1998; Deckert et al. 2006; Jurica et al. 2002; Behzadnia et al. 2007).

TCERG1 no afecta al proceso de *splicing in vitro* (Lin et al. 2004), sin embargo, modula el AS de minigenes reporteros en cultivos celulares. TCERG1 regula el AS de minigenes derivados de los genes de la globina β (*HBB*), de la tropomiosina β (*TPM2*), de la fibronectina (*FNI*), del gen *CD44*, o del gen Bcl-x (*BCL2L1*) (Lin et al. 2004; Cheng et al. 2007; Pearson et al. 2008; Montes et al. 2012). La localización de TCERG1 en la periferia de los *speckles* nucleares (donde tiene lugar parte de la transcripción activa y del procesamiento del mRNA de la célula) supone otro argumento a favor de la función de TCERG1 como factor de *splicing* (Sanchez-Alvarez et al. 2006; Sanchez-Hernandez et al. 2012).

Hace unos años el laboratorio donde se ha realizado esta tesis describió un mecanismo molecular por el cual TCERG1 regula el proceso de AS (Montes et al. 2012). Demostraron que TCERG1 modula el AS del gen *BCL2L1* a través de la regulación de la tasa de elongación de la RNAPII, apoyando el modelo cinético de regulación cotranscripcional del AS (Montes review Gene 2012 y de la Mata et al., Genet Res Int 2011). Estos datos funcionales apoyan la hipótesis planteada años atrás que definía a TCERG1 como una proteína acopladora de los procesos de la transcripción y el *splicing* del mRNA (Goldstrohm, Greenleaf & Garcia-Blanco.2001).

3.2.3. Efecto global de TCERG1

Hasta la publicación del trabajo que ha servido de base a esta tesis sólo se había publicado un estudio sobre el efecto del silenciamiento de TCERG1 analizado a nivel de transcripción (Pearson et al. 2008). Para aquel trabajo se utilizaron siRNAs y *microarrays* comerciales de expresión, y se compararon los efectos de la merma de TCERG1 en dos líneas celulares de uso común, células HeLa y HEK293T. Se observaron cambios la expresión de numerosos genes, los cuales aumentan o disminuyen en respuesta al silenciamiento de TCERG1.

3.2.4. TCERG1 y enfermedad

El factor de transcripción y *splicing* TCERG1 está implicado en algunas enfermedades, principalmente relacionadas con el sistema nervioso.

Existen numerosas evidencias experimentales que implican a TCERG1 en el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa de Huntington. La HD es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por movimientos coreicos involuntarios, trastornos conductuales y psiquiátricos, y demencia. La HD está causada por una expansión de repeticiones del triplete CAG en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3) en el gen de la huntingtina (*HTT*). Los datos que implican a TCERG1 en la HD son; i) TCERG1 es capaz de unirse al extremo amino-terminal de la *HTT* *in vitro* e *in vivo* (Holbert et al. 2001); ii) TCERG1 forma agregados intranucleares en células nerviosas de tejido cerebral de pacientes de la HD (Holbert et al. 2001); iii) la sobreexpresión de TCERG1 alivia la neurotoxicidad causada por la *HTT* mutada disminuyendo la muerte celular neuronal (Arango et al. 2006); iv) estudios genéticos sugieren que TCERG1 está implicado en la variabilidad en la edad de inicio de la HD (Holbert et al. 2001; Chattopadhyay et al. 2003). Estos datos sugieren que una interacción anormal de la *HTT* mutada con TCERG1 podría estar afectando la expresión de importantes genes regulados por TCERG1, y esto podría ser importante para la patogénesis de la HD.

Se ha descrito que una interacción incorrecta entre la *HTT* mutada y diversos factores de transcripción y procesamiento del RNA está relacionada con la formación de agregados insolubles en células neuronales. Entre las proteínas identificadas se encuentran PRPF40A, PRPF40B y SETD2 (Faber et al. 1998), TBP (Huang et al.

Introducción

1998), NCOR1 (Boutell et al. 1999), SIN3A (Boutell et al. 1999; Steffan et al. 2000), CREBBP (CBP) y TP53 (Steffan et al. 2000), y SP1 y TAF4 (Takayoshi Shimohata et al. 2000; Dunah 2002). En relación a los agregados insolubles nucleares, se ha descrito que el segundo dominio WW de TCERG1 está relacionado con la formación de depósitos amiloides (Ferguson et al. 2006; Ferguson et al. 2003; Tartaglia et al. 2008; Nguyen et al. 2003), y que son claves en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades neurodegenerativas.

El trabajo de Gau et al. (Gau et al. 2012) ha sugerido una relación entre la deficiencia de TCERG1 y el deterioro cognitivo. Estos autores identificaron una microdelección en la localización cromosómica de TCERG1 junto con una microduplicación en un cromosoma diferente en un paciente varón con autismo. Aunque hay más genes presentes en las regiones cromosómicas alteradas, dados los estudios anteriormente descritos que vinculan a TCERG1 con HD, estos autores propusieron que TCERG1 podría desempeñar un papel relevante en desarrollo neuronal, y que la haploinsuficiencia de este gen podría tener relevancia en los fenotipos clínicos de los pacientes con autismo.

En la búsqueda de mutaciones somáticas relacionadas con el cáncer colorrectal se compararon los exomas de 224 pares de muestras tumorales y normales, y se identificaron 32 genes con mutaciones somáticas recurrentes. Entre estos genes se encuentra *TCERG1*, en cuyos exones se identificaron 23 mutaciones distribuidas prácticamente por todo lo largo del gen. La gran mayoría de estas mutaciones (21 de 23) producen una alteración de la proteína, ya sea porque cambian los aa que codifican o porque introducen un codón de parada prematuro. Aunque en este trabajo se centran en el estudio de la ruta de señalización de WNT, ya que más del 94% de los 224 tumores tiene uno o más miembros de esta ruta afectados, no se puede descartar un posible papel de TCERG1 en el desarrollo de esta enfermedad (Cancer Genome Atlas Network et al. 2012).

Objetivos



El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar la función de TCERG1 en la célula.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio del silenciamiento génico de TCERG1 en el transcriptoma celular
 - 1.1. Estudio del efecto de TCERG1 sobre la transcripción
 - 1.2. Estudio del efecto de TCERG1 sobre el *splicing*: ¿Afecta a todos eventos de *splicing* alternativo?, ¿afecta al *splicing* constitutivo?, ¿están los exones afectados enriquecidos en motivos que indiquen un mecanismo de regulación?
 - 1.3. Estudio de los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1: ¿En qué rutas biológicas participan?, ¿hay algunas funciones biológicas sobrerrepresentadas?, ¿se expresan preferentemente en algún tejido?
 - 1.4. Búsqueda de un fenotipo experimental acusado en función de los datos obtenidos.

Materiales y métodos



1. Cultivos celulares, transfección y transducción

1.1. Cultivos celulares y tratamientos

Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco) bajo en glucosa (1 g/l), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) inactivado (30 min a 56 °C), penicilina/ estreptomicina (100 U y 1 mg/ml respectivamente), L-glutamina (4 mM), y aminoácidos no esenciales (Gibco).

Las células SH-SY5Y y C2C12 (cedidas generosamente por los Drs Juan Ortín [CNB-UAM, Madrid] y Francesc Ventura [Universidad de Barcelona], respectivamente) se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (4,5 g/L), suplementado con 10% de FBS inactivado, y penicilina/streptomicina (100 U y 1 mg/ml respectivamente). Para su cultivo se utilizaron placas revestidas con colágeno (BD biosciences). El revestimiento de las placas de cultivo con colágeno se realizó diluyendo el colágeno a una concentración de 100 µg/ml en ácido acético 0,02 N. Se añadió 1/2 del volumen de cultivo de colágeno, y se incubaron las placas durante 2 a 18 horas a 37 °C en atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂. Se lavaron las placas dos veces con agua miliQ autoclavada, y se dejaron secar. Una vez secas, las placas se almacenaron de forma estéril a 4 °C durante un periodo máximo de un mes.

Siempre que fue necesario contar el número de células a sembrar para un determinado experimento se utilizó azul de tripano al 50% (Gibco) para diferenciar las células vivas de las muertas. Para el contaje de las células se utilizó una cámara de Neubauer.

Para la inducción de la expresión de los shRNAs (control o contra TCERG1) en las células HEK293-T-REx (Coiras et al. 2013) se añadieron 5 µg/ml de tetraciclina (Sigma) durante 72 h.

Para la inducción de la diferenciación de las células SH-SY5Y se sembraron aproximadamente $33,33 \times 10^3$ células/cm², y se les añadió ácido retinoico (Sigma) a una concentración de 10 µM. Se mantuvo a las células en estas condiciones durante 5 días, cambiando el medio cada dos días para refrescar el ácido retinoico.

Materiales y métodos

1.2. Cultivos primarios

Las neuronas de hipocampo se extrajeron de una mezcla de hipocampos de embriones masculinos y femeninos en estadio E117.5 CD1. Se utilizó el medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) con 0,6% de glucosa y 10 mM de HEPES.

1.3. Transfección con siRNAs y plásmidos. Transducción

Para la transfección de siRNAs en las células HEK293T se utilizó el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó una concentración final de 60 nM de los siguientes dúplex de siRNA: siEGFP (5'-CUACAACAGCCACAACGE-3') o siTCERG1 (5'-GGAGUUGCACAAGAUAGUU-3'). Las células se dejaron crecer durante 72 h después de la transfección.

Para la transfección de plásmidos en células SH-SY5Y se sembraron aproximadamente 37×10^3 células/cm² de forma que a las 24 h alcanzaran una confluencia aproximada del 70%. Se transfectaron las cantidades apropiadas de cada construcción utilizando jetPRIME (Polyplus-transfection). Estas cantidades se determinaron transfectando diferentes cantidades de cada una de las construcciones (1, 2 o 3 µg) en pocillos en los que se habían sembrado 37×10^3 o 53×10^3 células/cm². A las 48h de la transfección se analizó el porcentaje de células que expresaban EGFP mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences). Se decidió que las mejores condiciones de transfección, teniendo en cuenta el porcentaje de células que expresaban EGFP y el porcentaje de células muertas, eran sembrar 37×10^3 células/cm² sobre placas de 6 pocillos, transfectar 2 µg de ADN, y utilizar una relación de 1:2 de ADN: jetPRIME.

Para la infección lentiviral, en primer lugar se transfectaron células HEK293T con el plásmido de la envuelta, el empaquetador, y el vector del shRNA (1,5 µg de cada uno), utilizando LipoD293 (SignaGen) (con una ratio de 1:3 de ADN: LipoD293) según las indicaciones del fabricante. Se permitió que las células HEK293T produjeran partículas virales durante 72 h, tras las cuales se recogió el sobrenadante y se concentraron los virus mediante ultracentrifugación a 50×10^3 g durante 90 min a 4°C. Se añadieron las partículas virales a las células SH-SY5Y junto con Polybrene (Sigma) 8 µg/ml centrifugando a 2000 g durante 60 min a 32 °C sin freno en la centrífuga. Se incubaron las células junto con los lentivirus durante 24 h, y a las 48 h de la infección se empezó la selección con puromicina, primero con 1 µg/ml y posteriormente con 1,5 µg/ml.

Para la transfección de los cultivos primarios se siguió el protocolo de cultivo descrito previamente (Pedraza et al. 2014). Los cultivos primarios fueron transfectados el día 3 o el día 7 tras su extracción (DIV, *day in vitro*) con el kit CalPhos Mammalian Transfection (Clontech). Las células se fijaron a los 7 o a los 14 días tras su extracción según fueran para las mediciones o para mostrar en la figura, respectivamente.

2. Técnicas de biología molecular

2.1. Análisis por Western-blot. Anticuerpos

Para la preparación de los extractos celulares, se recogieron las células de las placas de cultivo una vez transcurrido el tiempo adecuado tras la transfección o el tratamiento, y fueron centrifugadas durante 5 min a 1200 rpm a 4 °C. El precipitado obtenido se lisó con tampón de lisis T7 frío (20 mM HEPES, pH 7,9, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM ditioneitol (DTT) y 1 mM fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF)) durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó el volumen a 13 200 rpm durante 5 min y se utilizó el sobrenadante como extracto celular total. La concentración de proteína en el extracto se midió mediante el ensayo de Bradford (BioRad) a 595 nm.

Las proteínas de los extractos fueron separadas en geles al 10% SDS-PAGE. Las muestras se diluyeron en tampón de carga 2 o 5 X (según la concentración de dodecil sulfato sódico (SDS)) que contiene 0,2% azul de bromofenol, 10% de glicerol, 0,1 M TrisHCl pH 6,8, 2% o 5% de SDS y 50 mM DTT, y se calentaron durante 5 min a 95 °C. La electroforesis se realizó en buffer Laemmli (25 mM Tris, 192 mM de glicina y 0,1% SDS) a un voltaje continuo aproximado de 150 V. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciencias) mediante el sistema de transferencia húmeda de proteínas en una solución que contiene 25 mM Tris, 192 mM de glicina y 20% (v/v) de metanol a 300 mA de intensidad durante 1 h. Para el bloqueo de las membranas, la incubación con anticuerpos, y los lavados de éstos, se utilizó el mismo tipo de solución (5% (p/v) leche desnatada, PBS-1X, 0,1% (v/v) Tween-20). Las condiciones, diluciones y tiempos de incubación se ajustaron a cada anticuerpo. Como marcador del peso molecular se utilizó una preparación comercial preteñida con un rango de 175 kDa a 6,25 kDa (New England Biolabs).

Como control de carga de los extractos de proteínas se utilizó el anticuerpo contra CDK9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-484) diluido 1:2000 veces. Además, durante esta

Materiales y métodos

tesis se utilizaron anticuerpos contra TCERG1 (Sanchez-Alvarez et al. 2006) diluido 1:2000 veces, contra VIM (Santa Cruz Biotechnology, sc-6260) diluido 1:1000 veces, y contra GFP (Roche 11814460001). Se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con HRP (peroxidasa de *A. rusticana*) contra ratón, conejo o cabra (según el anticuerpo primario) (PerkinElmer Life Sciences) diluidos 1:5000 veces.

2.2. Preparación de las muestras de ARN y procesamiento del *Exon Array*

Se aisló el ARN total de células HEK293T tratadas con siEGFP o siTCERG1 de cuatro experimentos independientes utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se purificó el ARN con las columnas RNeasy (Qiagen). Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), donde se comprobó su calidad mediante el Bioanalyzer 2100 (Agilent). Todos los procesos de hibridación y lavados del *Exon Array* se llevaron a cabo en la unidad de genómica del CABIMER por técnicos especializados. Se utilizaron los *Affymetrix GeneChIP Human Exon 1.0ST Array* (Affymetrix). El análisis y la visualización de los datos se llevó a cabo utilizando el programa EASANA (GenoSplice, Paris; www.genosplice.com) (de la Grange et al. 2010; de la Grange et al. 2005).

2.3. Plásmidos

Para la generación de lentivirus con shRNAs se utilizó el vector pCMV-VSV-G para producir la proteína de la envuelta de las partículas virales, el vector pCMV-dR8.2 dvpr, como plásmido empaquetador de partículas lentivirales, y los vectores pLKO.1-puro control con un shRNA que no está dirigido contra ningún gen de mamífero, pLKO.1-TRCN0000014939 (sh9) (5'-GCCAAGAATTTAGACTCAGAA-3'), y pLKO.1-TRCN0000230334 (sh4) (5'-TCCTAAAGAAGAGCCTATAAA-3'), contra TCERG1 (Mission shRNA, Sigma).

Para generar el vector de TCERG1 mutante resistente al shRNA contra TCERG1 (sh9), se clonó la secuencia silvestre del ADNc de TCERG1 en el vector pcDNA3-EGFP (Addgene), a partir del vector pEFBOST7-TCERG1 (Suñé & Garcia-Blanco 1999), mediante PCR utilizando los oligonucleótidos: 5'-GGGGAATTCGATGGCCCAACAGCAGGCCTT-3' 3'-GGGCTCGAGTTTTGTTGATCGTCTCGTGGG-5'. Se utilizó el kit QuikChange II

XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) para cambiar las posiciones 2590 (T por C), 2591 (T por C), 2593 (A por G), 2599 (A por C), y 2602 (A por G) empleando el oligonucleótido:

5'-
GTACATTGAAAAAATAGCCAAGAACCTGGACTCCGAGAAAGAAAAGGAGC
TTG-3'. Se comprobó la construcción mediante secuenciación. Los plásmidos se transformaron en células *escherichia coli* DH5 α para su selección mediante protocolos estandard.

2.4. Validación experimental mediante RT-qPCR

Generamos el ADNc a partir del ARN total extraído de células HEK293T que habían sido tratadas con el mismo siRNA (siEGFP o siTCERG1) y en las mismas condiciones que para el *Exon Array*. Para la síntesis del ADNc se midió la cantidad y la pureza del ARN mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Se digirió el ARN con 10 U de RNase-free DNase I (Roche) durante 45 min a 37 °C, y tras la inactivación de la DNasa a 70 °C durante 10 min, se utilizó 1 μ g de ARN para la reacción de retrotranscripción con la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) durante 1 h a 37 °C, utilizando hexanucleótidos aleatorios. También se realizaron controles negativos (sin transcriptasa inversa) para cada reacción. Para la reacción de PCR se utilizó una dilución 1:10 del ADNc sintetizado. Se diseñaron oligonucleótidos de entre 19 y 25 nucleótidos para amplificar regiones de entre 100 y 160 pares de bases (pb) (detallados en el apartado 4 de esta sección). Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó como ayuda la herramienta Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) (Rozen & Skaletsky 2000), y se comprobó la especificidad de estos mediante las herramientas de hibridación *in silico* de UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) y *Friendly Alternative Splicing and Transcripts DataBase* (http://www.fast-db.com/fastdb2/frame_2.html). La cuantificación de los amplicones se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando el iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad), y un termociclador iCycler iQTM (Bio-Rad). Se empleó como normalizador *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) ya que sus niveles de ARNm no cambian al silenciar TCERG1. El programa que se utilizó para la amplificación de las secuencias fue el siguiente: 95 °C durante 3 min, 40 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 s, (la temperatura de unión apropiada para cada pareja de oligonucleótidos) durante 30 s, y 72 °C durante 45 s, seguido por una curva de fusión. Mediante las curvas de fusión y la electroforesis en geles de agarosa de los

Materiales y métodos

productos de PCR se confirmó la presencia de un producto específico del tamaño esperado y la ausencia de dímeros de oligonucleótidos.

Para los genes que cambian a nivel de transcripción, se cuantificó el nivel de ARNm en relación al nivel de GAPDH siguiendo el método de $\Delta\Delta Ct$ (Schmittgen & Livak 2008):

$$\frac{(E_{diana})^{\Delta Ct_{diana (siEGFP-siTCERG1)}}}{(E_{GAPDH})^{\Delta Ct_{GAPDH (siEGFP-siTCERG1)}}$$

donde E es la eficiencia de la PCR, y $\Delta Ct = (\text{umbral de ciclos [Ct]} \text{ para el tratamiento contra EGFP}) - (\text{Ct para el silenciamiento de TCERG1})$. Se realizaron reacciones en duplicado con cada pareja de oligonucleótidos para cada ADNc de tres experimentos independientes de silenciamiento.

Para los genes que cambian a nivel de *splicing* alternativo, se cuantificó la variante de interés de forma relativa a GAPDH, y a un exón común a todas las isoformas, que previamente había sido cuantificado de forma relativa a GAPDH utilizando la fórmula anterior.

2.5. Inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células fueron cultivadas en cubreobjetos tratados con colágeno (siguiendo el mismo protocolo que para las placas de cultivo) que habían sido previamente depositados en placas de 12 pocillos (Nunc). Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en buffer PBS (pH 7,4) durante 20 min a 37 °C. Las preparaciones se lavaron y permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma) al 0,5% en PBS en tres pasos de 5 min cada uno, realizados a temperatura ambiente. Se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente, con BSA (Sigma) al 10% con Triton X-100 al 0,5% en PBS. Posteriormente, se incubaron las preparaciones con 50 µg/ml de faloidina-TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina B) (Sigma) en PBS con BSA al 10%, durante 1 h a temperatura ambiente en cámara de humedad. Por último se lavaron tres veces con PBS con BSA al 0,1%, otras tres veces con PBS, y una vez más con agua mili-Q autoclavada; finalmente se secaron con etanol al 70%. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando el medio de montaje *ProLong Gold antiface reagent with DAPI* (Life Technologies). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal invertido Leica SP2 utilizando un objetivo HCX PL APO CS 63.0x1.40 OIL UV.

3. Técnicas *in silico*

3.1. Análisis bioinformático

El análisis de los resultados obtenidos con el *Exon Array* reveló cambios a nivel de transcripción en 180 transcritos, de los cuales 30 aumentaban su expresión (un 17%), y 150 que la disminuían (un 83%). 52 transcritos no codificaban para ninguna proteína descrita, por lo que fueron excluidos para los análisis posteriores. También se detectaron cambios a nivel de *splicing* en 419 exones, de los cuales 145 (un 35%) disminuían, y 274 (un 65%) aumentaban su expresión al silenciar TCERG1. Estos exones corresponden a 346 genes. La inspección manual mediante la herramienta EASANA de cada uno de los exones identificados en el análisis, reveló que 63 exones (un 15%) no se ajustaban a los criterios de calidad para su inclusión en una lista definitiva de genes (y exones) afectados por el silenciamiento de TCERG1. De forma complementaria se revisaron los exones dentro de la categoría de eventos sin clasificar, comparándolos con las bases de datos de UCSC (*University of California, Santa Cruz*, <https://genome.ucsc.edu/>) y Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), y la lista se redujo de 142 a 77 exones.

Para la asignación de los genes a las distintas categorías de ontología génica nos ayudamos de la herramienta “*DAVID Functional Annotation tool*” (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Huang et al. 2009; Huang et al. 2008). Se introdujeron por separado las listas revisadas de genes que cambian a nivel de transcripción o de *splicing* al silenciar TCERG1, y se estableció como punto de corte para la significancia estadística un valor *P* menor de 0,05. Se eliminaron categorías de ontología génica redundantes utilizando la herramienta REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al. 2011).

Las listas de los exones casete y de los intrones elegidos al azar, utilizadas en el análisis de las secuencias de los exones casete, se obtuvieron mediante una aplicación creada por la Unidad de Bioinformática del IPBLN. Estas listas fueron inspeccionadas manualmente para comprobar que todos sus elementos cumplieran los requisitos deseados, es decir, que fueran auténticos exones casete o auténticos intrones, que no estuvieran en las listas de exones afectados por el silenciamiento de TCERG1, y que solo aparecieran una vez en las listas.

Materiales y métodos

La longitud de los exones se calculó aplicando la función “LARGO” de Excel[®] a cada una de las secuencias.

El contenido de G+C se calculó aplicando la siguiente fórmula “=(LARGO(B1)-LARGO(SUSTITUIR(B1;"G";"")))+LARGO(B1)-LARGO(SUSTITUIR(B1;"C";"")))/LARGO(B1)” a cada secuencia, donde “B1” es la celda donde se encuentra la secuencia del exón.

La posición relativa de los exones casete dentro de sus genes se calculó como porcentaje teniendo en cuenta las posiciones cromosómicas de inicio y fin del gen y de inicio del exón.

Los sitios de *splicing* se obtuvieron a partir de las secuencias de los exones y de las secuencias adyacentes en 5’ y en 3’. Las imágenes se generaron con la herramienta WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks et al. 2004).

Para la búsqueda de motivos sobrerrepresentados dentro de las secuencias se utilizó el conjunto de herramientas MEME suite v.4.11.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) (Bailey et al. 2009). Se analizaron los 66 exones casete de forma conjunta y también diferenciando entre los que aumentan (37) o disminuyen (29) su expresión al silenciar TCERG1. Como controles se analizaron el mismo número de secuencias (con un número total de nucleótidos semejante) de exones casete aleatorios y de exones constitutivos. Se ajustaron los parámetros de la herramienta MEME (Bailey & Elkan 1994) para buscar motivos repetidos un número indeterminado de veces dentro de cada secuencia, ya que los motivos reguladores del *splicing* podían estar repetidos. También se modificaron los parámetros de la búsqueda para encontrar motivos en la hebra dada y no en la reversa complementaria, ya que es lo apropiado para encontrar elementos reguladores del *splicing*. Comparamos los motivos descubiertos en los distintos grupos con la herramienta TOMTOM (Gupta et al. 2007), y descartamos aquellos con una semejanza significativa (valor $P < 0,05$) para descubrir los motivos específicos dentro de los exones y secuencias adyacentes afectados por el silenciamiento de TCERG1.

3.2. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (<https://www.graphpad.com/>). Para comparar las muestras y sus respectivos controles en los experimentos de RT-qPCR, en los experimentos de sobreexpresión y en los

experimentos con cultivos primarios se utilizaron las pruebas t de Student pareadas de dos colas. Para comparar las mediciones de longitud total de neuritas y área del soma de las células SH-SY5Y se utilizaron tablas ANOVA de una variable. Los valores *P* están representados por asteriscos cuya significancia es: **P* = 0,01-0,05; ***P* = 0,001-0,01; y ****P* < 0,001). La ausencia de asteriscos indica que el cambio con respecto al control no es estadísticamente significativo.

3.3. Mediciones morfométricas de las células SH-SY5Y y de los cultivos primarios

Para las mediciones morfométricas de las células SH-SY5Y se sembraron 52×10^4 y 26×10^4 células en placas de 100 mm para los experimentos con y sin ácido retinoico respectivamente. Se dejaron crecer las células durante 48 h antes de capturar las imágenes. Se tomaron al menos trece imágenes de cada réplica y de cada condición (tres réplicas y tres condiciones; no infectadas, shControl, shTCERG1 (sh9)), con una cámara digital (Olympus E-330) acoplada a un microscopio de campo claro utilizando para todas ellas un objetivo 20X. Se midieron al menos 30 células de cada réplica (para un total de 100 células por condición) con la herramienta gvSIG (<http://www.gvsig.org>). En primer lugar hubo que determinar la relación pixel:μm; para ello se fotografió la cámara de Neubauer (con la misma cámara fotográfica y con el mismo objetivo de 20X) y se hicieron seis mediciones de las líneas de 250 μm y seis mediciones de las líneas de 50 μm. Con el valor medio de estas mediciones se creó una escala para cada una de las distancias. Se comprobó la fiabilidad de cada escala comparando el error de cada una al predecir la longitud de la otra. Para realizar las mediciones morfométricas se utilizó siempre la misma ampliación de imagen, estandarizando así el error debido a la medición manual. Se midieron el área y el perímetro del soma de cada célula, así como sus neuritas.

Las mediciones de las neuritas de las células SH-SY5Y shTCERG1 (sh9) se realizaron sobre proyecciones máximas de fotografías a inmunofluorescencias en las que se tiñó la actina F con faloidina-TRITC y el ADN con DAPI (ver protocolo detallado en el apartado 2.5 de esta sección). Se empleó la aplicación Neuron J (Meijering 2010) del programa Image J (Schneider et al. 2012). Se midieron 20 células por condición.

Las mediciones de los cultivos primarios se hicieron con el programa Neuron studio (Wearne et al. 2005). Todas las imágenes fueron tratadas con los mismos filtros para

Material es y métodos

optimizar la medición automática de las neuritas. Además, se corrigieron manualmente los errores en el trazado cuando fue necesario. Se midieron 24 neuronas control y 22 neuronas con TCERG1 silenciada.

4. Oligonucleótidos

Gen	Nombre de la pareja		Secuencia 5' → 3'
Oligonucleótidos usados en RT-qPCR para detectar cambios a nivel de transcripción			
<i>CASP7</i>	Control	>Fwd >Rev	CTGGAGGAGCACGGAAAAG TGGAAGTGTGGGTCATCAGA
<i>GAPDH</i>	Control	>Fwd >Rev	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG GGGTCATTGATGGCAACAATATC
<i>EIF4G2</i>	Control	>Fwd >Rev	TGTTGGAGATTTTGGAAAGGAA TATGGTTTGAGGGGATGGAT
<i>FOXF2</i>	Control	>Fwd >Rev	ACTGGGACGGATTCAAGTCA TCCAGCAGTAGGCAAATAACAG
<i>HIP1</i>	Control	>Fwd >Rev	CTAGAGAAGGAGCGGGACAG GGCCAGTTTGAGCTGAGTGT
<i>ITPK1</i>	Control	>Fwd >Rev	CAAGATCGAGGGCGTGT CCCTGTCTGGTTGTTGATGA
<i>RBM47</i>	Control	>Fwd >Rev	CGTAGACAAGACCCCCAGAG GCACAGCAAAGGAAGAGAGG
<i>SEMA3C</i>	Control	>Fwd >Rev	ATGCGAACCACCAAGGAGT GCCAATACGAACAATCAAAGG
Oligonucleótidos usados en RT-qPCR para detectar cambios a nivel de <i>splicing</i>			
<i>ATM</i>	Control	>Fwd >Rev	AGCCCGGTTTTTCAGATACTC TTCCTCTTTGGCTCTTTTCAG
	Isoforma	>Fwd >Rev	AGTCTACAGGTTGGCTGCATA CCTTATTTCCAAAAGTATTCGATGA
<i>HIPK3</i>	Control	>Fwd >Rev	GCCCGTCAAGGTCAAATAGA ATGGTTACGGTGCTGAAAGC
	Isoforma	>Fwd >Rev	GGGGAGGAGAAATGTGATCC AGCCACCGTAACGAGAGAAG
<i>KPNA5</i>	Control	>Fwd >Rev	TGTTGTTTAGCAGTGACCCAGA CAAAGTTCCACCAATCTTCG
	Isoforma	>Fwd >Rev	ACTGGGTCGCTACGCTTCA CTCTCCGATGCCCTGATTTC
<i>SV2A</i>	Control	>Fwd >Rev	CTTCTCATCTTTTGTCCAGGG CTCGGAGAAATAGGAGAAGAC
	Isoforma	>Fwd	ATGGGAAGAGCATCCTTAGG

		>Rev	GCACTGGGATTACAGGCATG
<i>TMEM39A</i>	Control	>Fwd	TTGTCCCCTATCTCCAGACC
		>Rev	GGCACTGAAGAGGGAGTTGA
	Isoforma	>Fwd	CATCTGGCAGCATTTCATCAC
		>Rev	CAGAAATAGGGTTCCTGAAAATC
<i>TCERG1</i>	Control	>Fwd	TCGATGGAGCAAAGTAAAAGACA
		>Rev	TTCAATGTACTGTTTGAAAAGGTCT
	Isoforma	>Fwd	TGTGCTGTTTGATTCTGACACATAG
		>Rev	ATGGGCTGTCTCTCCCTGAC
<i>UHMK1</i>	Control	>Fwd	ATTCAGACAGACGGGTATCG
		>Rev	AGGCTCCACAGATCAACAGC
	Isoforma	>Fwd	GTCATGGCTGCTTGAAGTCC
		>Rev	CCATCGGTGTGGGTAAAGG
Otros oligonucleótidos			
<i>VIM</i>	Exon 5	>Fwd	GAAATCCAGGAGCTGCAGG
		>Rev	CTTGGATTTGTACCATTCTTCTGC
	Intron 7- exon8	>Fwd	GAATTC GGAACTCAGACTTGGATG
		>Rev	GTCGAC CTGTCCATCTCTAGTTTC
<i>TCERG1</i>	Control	>Fwd	GATCCACGTTACAAAGCAGTAG
		>Rev	CCCTTTCTCGTTCTCGAAGG

Resultados



1. El silenciamiento de TCERG1 produce cambios significativos a nivel de transcripción y a nivel de *splicing*.

Con el objetivo de investigar la función global de TCERG1 en la regulación de la expresión génica, llevamos a cabo un análisis de los cambios producidos a nivel de transcripción y de *splicing* a escala genómica al silenciar la expresión de TCERG1. Para ello tratamos células HEK293T con pequeños ARNs de interferencia (siRNA) contra *TCERG1* (siTCERG1), y como control tratamos la misma línea celular con un siRNA contra *EGFP* (siEGFP). El tratamiento de las células con siTCERG1 (60 nM) reduce la expresión de TCERG1 (Figura R-1 A) y la cantidad de su ARNm (Figura R-2 A). A continuación se extrajo el ARN total de células tratadas con los ARNs de interferencia en cuatro experimentos independientes. Los cambios en transcripción y en *splicing* se midieron utilizando los *Affymetrix Human Exon 1.0 Array*, que contienen sondas que hibridan específicamente con regiones exónicas, intrónicas y UTRs de 16 762 genes humanos (Gardina et al. 2006). Para identificar los cambios a nivel de transcripción y de *splicing* se utilizó el algoritmo EASANA (ver materiales y métodos), que permite la visualización esquemática de los genes con las sondas del *Exon Array* que hibridan en ellos (de la Grange et al. 2010). En respuesta al silenciamiento de TCERG1 se detectaron cambios en los niveles de transcripción de 128 genes que codifican para proteína con respecto a las células control (nivel de cambio $\geq 1,5$; $P \leq 0,05$) (Anexo I, Tabla A-1). De estos 128 genes, 108 (84,5%) disminuyen su expresión, y 20 (15,5%) aumentan su expresión al silenciar TCERG1 (Figura R-1 B).

Asimismo, se detectaron cambios en la expresión de 356 exones en 314 genes (nivel de cambio $\geq 1,5$; $P \leq 0,05$) (Figura R-1) (Anexo I, Tabla A-2). Estos cambios en la expresión de exones se interpretan como cambios en el *splicing* de sus genes. 280 genes tienen un exón desregulado, 31 genes tienen dos exones desregulados, el gen *PCLO* tiene tres exones desregulados, el gen *U2SURP* tiene cuatro exones desregulados, y el gen *EIF4G2* tiene seis exones desregulados (Anexo I, Tabla A-2). Al silenciar TCERG1 en células HEK293T se ven afectados todos los eventos de AS detectados por los *Affymetrix Human Exon 1.0 Array*. Encontramos 14 eventos de 3'ss alternativos (4%), 16 de 5'ss alternativos (4%), 50 de retención de intrones (14%), 60 de uso de primeros exones alternativos (17%), 68 de sitios alternativos de poliadenilación (19%), 71 de exones casete (20%), y 77 eventos de *splicing* que no se han podido clasificar (22%) (Figura R-1 C-E). Cuatro de los exones casete son exones mutuamente excluyentes.

Resultados

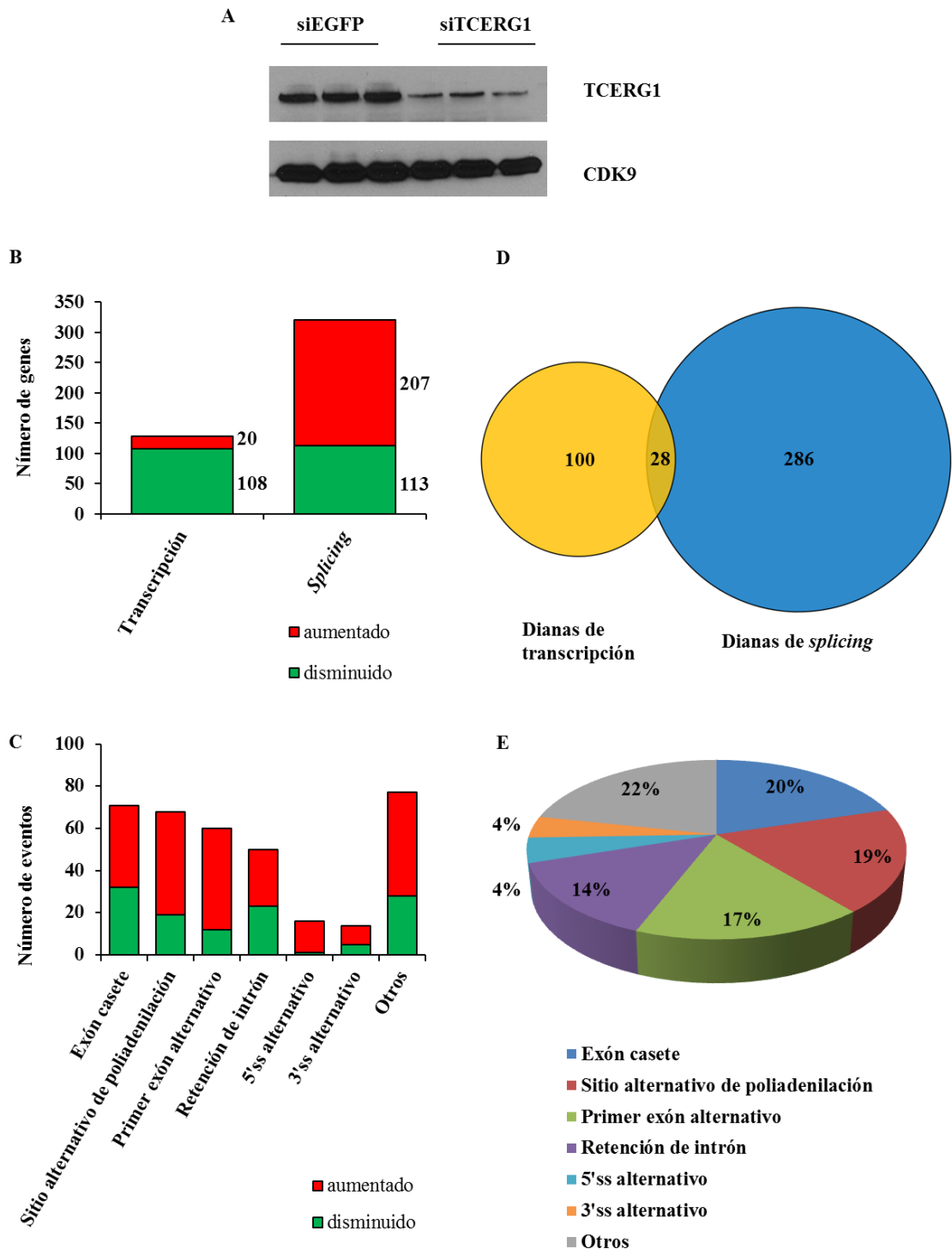


Figura R-1. Identificación de los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1. A. Silenciamiento de TCERG1 en células HEK293T. Las células HEK293T fueron transfectadas con siRNAs control (siEGFP) o contra TCERG1 (siTCERG1). Aproximadamente a las 72h de la transfección se analizó mediante Western blot una fracción del extracto celular con anticuerpos contra TCERG1 y CDK9 (como control de carga). **B.** Número de genes afectados por el silenciamiento. El aumento o la

(continuación pie Figura R-1) disminución en la expresión están representados en color rojo y verde respectivamente. **C.** Número de exones con la expresión aumentada (rojo) o disminuida (verde) dentro de cada uno de los eventos de *splicing*. **D.** Diagrama de Venn que muestra el solapamiento entre los genes afectados a nivel de transcripción y los afectados a nivel de *splicing*. **E.** Clasificación de los eventos de *splicing* encontrados en el *Exon Array*.

La mayoría de los exones afectados por el silenciamiento de TCERG1 aumentan su expresión (66%). En los eventos de primer exón alternativo, sitio alternativo de poliadenilación, y 5'ss alternativos, los porcentajes de exones cuya expresión aparece aumentada son del 72%, 80% y 94%, respectivamente. Estos datos sugieren que TCERG1 podría actuar como un factor represor del *splicing* (Figura R-1 C). También se observa que hay 28 genes afectados tanto a nivel de transcripción como a nivel de *splicing* al silenciar TCERG1 (Figura R-1 D). Este dato sugiere que TCERG1 podría regular la expresión de estos genes mediante el acoplamiento de la transcripción y el *splicing*, un mecanismo con el que TCERG1 ya ha sido relacionado (Montes et al. 2012). No obstante, el número de genes que cambia a nivel de transcripción y de *splicing* no es mucho mayor que el que cabría esperar por azar (23 genes, $P = 0,05$). Esto no quiere decir que TCERG1 no sea un acoplador entre ambos procesos, sino que con los datos que proporciona este abordaje experimental no se puede afirmar que los acople.

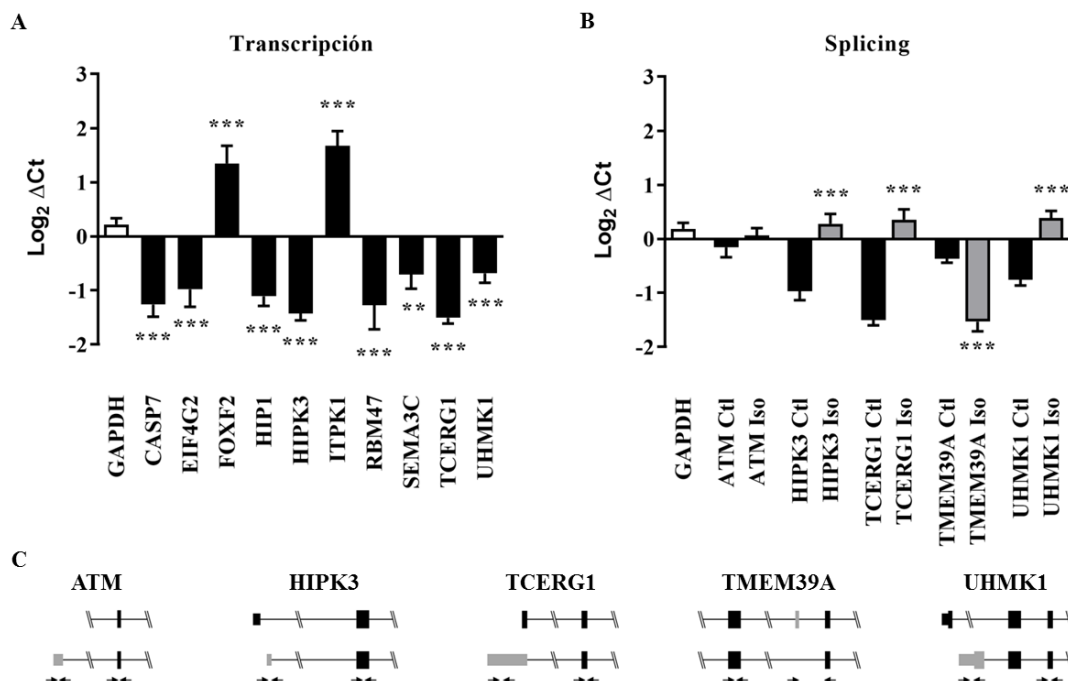


Figura R-2. Análisis mediante RT-qPCR. Análisis de diversas dianas de transcripción (A) y de *splicing* (B). Las isoformas de *splicing* (Iso, barras grises) se cuantificaron con respecto a un ARNm común a

Resultados

(continuación pie Figura R-2) todas las isoformas (Ctl, barras negras). Se utilizó GAPDH como gen de referencia. C. Representación de los genes con los exones constitutivos como cajas negras, los exones alternativos como cajas grises, y los intrones como líneas. Las flechas indican la localización aproximada de los cebadores diseñados. Los niveles de cambio se expresan como \log_2 para una mejor visualización. Los datos representados pertenecen al menos a tres experimentos independientes (medias \pm SEM). ** $P = 0,001-0,01$; *** $P < 0,001$.

A continuación validamos mediante RT-qPCR algunas de las dianas afectadas a nivel de transcripción. Para ello seleccionamos diez genes, tres de los cuales también cambian a nivel de *splicing*. Validamos los diez genes que probamos (Figura R-2 A). También analizamos cinco dianas con exones afectados utilizando cebadores que amplifican los exones alternativos Validamos cuatro de los cinco genes. El gen *ATM* no muestra un cambio significativo, y por lo tanto, no se considera validado (Figura R-2 B).

Como comprobación adicional de la validez de los datos que proporciona el *Exon array* estudiamos los efectos del silenciamiento de TCERG1 mediante un ARN de interferencia diferente. Para ello utilizamos las células T-REx-HEK293T, que poseen un plásmido integrado que expresa de forma inducible por tetraciclina un shRNA. Las células T-REx que empleamos (shTCERG1) expresan niveles de TCERG1 significativamente menores que las células que contienen un shRNA control (Coiras et al. 2013) (Figura R-3 C). Validamos los cambios indicados por el *Exon array* en el gen de la vimentina (*VIM*). Según los datos genómicos, en este gen la retención de los intrones siete y ocho en su extremo 3' produce una 3'UTR más larga que la de la isoforma de referencia. Diseñamos unos cebadores en el intrón 7 y en el exón 8 para poder amplificar la 3'UTR alternativa, y confirmamos mediante RT-PCR la reducción en los niveles de esta isoforma al silenciar TCERG1 (Figura R-3 A-B). Además observamos que la merma de TCERG1 correlaciona con un aumento en la expresión de la proteína vimentina (Figura R-3 C). Por lo que sabemos, es la primera vez que se establece esta correlación entre la retención de estos intrones del gen de la vimentina y el aumento en la expresión de la proteína. También analizamos y validamos otras dianas mediante RT-qPCR en esta línea celular (Figura R-3 D).

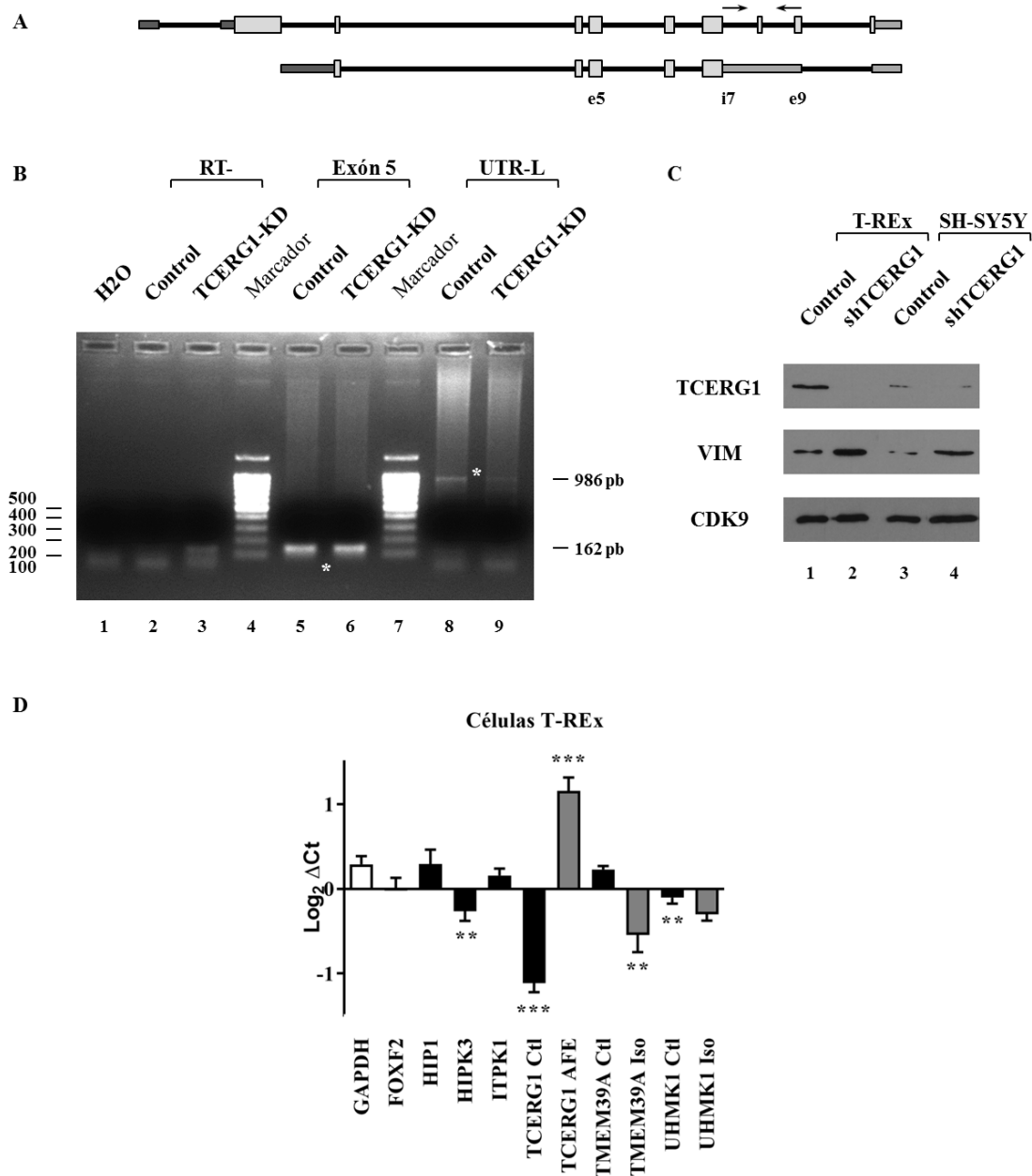


Figura R-3. Validación de los cambios a nivel de transcripción y a nivel de *splicing* en células T-REx-HEK293T con TCERG1 mermado. **A.** Representación esquemática del gen *VIM* y de los oligonucleótidos diseñados para amplificar su exón 5 y su 3' UTR alternativa que incluye a los intrones 7 y 8 y a los exones 8 y 9. **B.** El silenciamiento de TCERG1 correlaciona con la disminución en la retención de los intrones 7 y 8 de la vimentina. Se extrajo el ARN total de las células control y de las que tenían TCERG1 silenciado y se realizó la RT-PCR. Para la reacción de retrotranscripción se utilizaron oligo dT. Los asteriscos señalan los amplicones utilizados como control de expresión total del gen (exón 5, presente en ambas isoformas) en los carriles 5 y 6, y los amplicones con los intrones 7 y 8 retenidos, carriles 8 y 9. Los carriles 1-3 son controles negativos, y los carriles 4 y 7 son los marcadores de peso molecular. **C.** El silenciamiento de TCERG1 correlaciona con el incremento en los niveles de proteína vimentina en células T-REx-HEK293T y en células SH-SY5Y. Se analizó la expresión de las proteínas utilizando

Resultados

(continuación pie Figura R-3) anticuerpos específicos sobre extractos celulares. Como control de carga se utilizó CDK9. **D.** Análisis de RT-qPCR de algunas dianas de TCERG1 a nivel de transcripción y/o *splicing*. Los datos representados pertenecen al menos a tres experimentos independientes (medias \pm SEM). $**P = 0,001-0,01$; $***P < 0,001$.

La mayor parte de los cambios que detectamos a nivel de *splicing* al silenciar TCERG1 pertenecen a la categoría de exones casete (Figura R-1C). Para investigar si estos exones poseen características de secuencia que ayuden a explicar el mecanismo mediante el cual TCERG1 afecta a su mayor o menor inclusión, analizamos *in silico* los exones casete y sus secuencias adyacentes en 5' y 3'. Estudiamos tres grupos de exones: i) exones constitutivos cercanos a los exones casete afectados, que son un control del gen en el que se encuentra cada exón y además son exones que se incluyen siempre en el transcrito maduro. ii) Exones casete elegidos al azar, un control de exones casete que no están afectados *a priori* por el silenciamiento de TCERG1. Si el sistema de detección de motivos reguladores de la inclusión de exones funciona correctamente, se deben encontrar diferencias en los motivos que regulan la inclusión de exones constitutivos y de exones casete. iii) Exones casete afectados por el silenciamiento de TCERG1, y según el análisis aplicado este grupo se dividió en exones casete que aumentan o que disminuyen al silenciar TCERG1.

No observamos diferencias importantes en las secuencias de los sitios 5' y 3' de *splicing* (Anexo I, Figura A-3 A) ni en la longitud de los exones (Anexo I, Figura A-3 B).

También analizamos la posición relativa de los exones dentro de su gen y observamos una distribución similar entre los exones casete elegidos al azar y los exones casete aumentados al silenciar TCERG1 (posición media del 51%, $P = 0,926$). Sin embargo los exones casete con expresión disminuida tienden a estar localizados hacia el extremo 3' de sus genes (posición media del 65%, $P < 0,05$) (Figura R-4 A).

A continuación estudiamos la composición de nucleótidos de los exones. Los exones casete elegidos al azar tienen una composición de G+C similar a la de los exones casete con expresión aumentada. Los exones casete con expresión disminuida, tienen un contenido de G+C similar al de las secuencias intrónicas (Figura R-4 B). En eucariotas el contenido medio de G+C en exones es mayor que en intrones (Zhu et al. 2009). Se ha propuesto que el mayor contenido de G+C en los exones ayuda a regular la inclusión de

éstos (Amit et al. 2012), y también se ha asociado un mayor contenido en G+C en la secuencia codificante de los genes con una menor tasa de elongación de la transcripción (Jonkers et al. 2014; Veloso et al. 2014). Ya que se ha demostrado que TCERG1 regula el AS modulando la tasa de elongación de la RNAPII (Montes et al. 2012), estos datos podrían indicar un mecanismo relacionado con la transcripción que regularía la inclusión de determinados exones con un menor contenido de G+C, que serían exones transcritos de forma relativamente más rápida que el resto.

Por último, el estudio de los motivos sobrerrepresentados en las secuencias analizadas mediante las herramientas disponibles en MEME Suite (*Motif-based sequence analysis tools*) (Bailey & Elkan 1994; Bailey et al. 2009), permitió identificar diversas secuencias conservadas específicas de los exones con expresión aumentada al silenciar TCERG1, con valores E significativos (Figura R-4 C), así como los factores de *splicing* que se unen potencialmente a estos motivos (Tabla R-1). También encontramos dos motivos distintos conservados en los 100 nucleótidos que flanquean en 3' a los exones con expresión aumentada, y un tercer motivo conservado en los 100 nucleótidos que flanquean en 3' a los exones con expresión disminuida (Figura R-4 D-E y Tabla R-1). Sin embargo, estos motivos están presentes en solo unos pocos de los exones analizados, por lo que estos datos deben tratarse con precaución.

Para caracterizar las diferencias entre las células control y las células con TCERG1 mermado, estudiamos las categorías de ontología génica que están enriquecidas entre los genes afectados. Para ello utilizamos la herramienta DAVID. Entre los genes que cambian a nivel de transcripción, los procesos biológicos sobrerrepresentados son la regulación de procesos metabólicos, procesos de morfogénesis y desarrollo, procesos basados en los microtúbulos o la parada del ciclo celular (Tabla R-2). Un solo componente celular está sobrerrepresentado, los discos Z, al igual que una única función molecular, la actividad inhibidora de fosfolipasa A2.

El análisis de las dianas de *splicing* reveló cambios en genes relacionados con procesos biológicos como el metabolismo del ADN, el transporte intracelular, el ciclo celular, o la transcripción (Tabla R-2). En cuanto a los componentes celulares, hay genes que codifican proteínas que forman parte de los discos Z, de fibras contráctiles, genes que están en membranas (plasmática o de organelas), o que se encuentran en el nucléolo (Tabla R-2). Y el análisis de la función molecular reveló un enriquecimiento en genes

Resultados

relacionados con la transcripción y el procesamiento de ARN (Tabla R-2), apoyando la hipótesis de la existencia de una compleja red reguladora del ARN orquestada por reguladores de la transcripción y del *splicing* (Yeo et al. 2009).

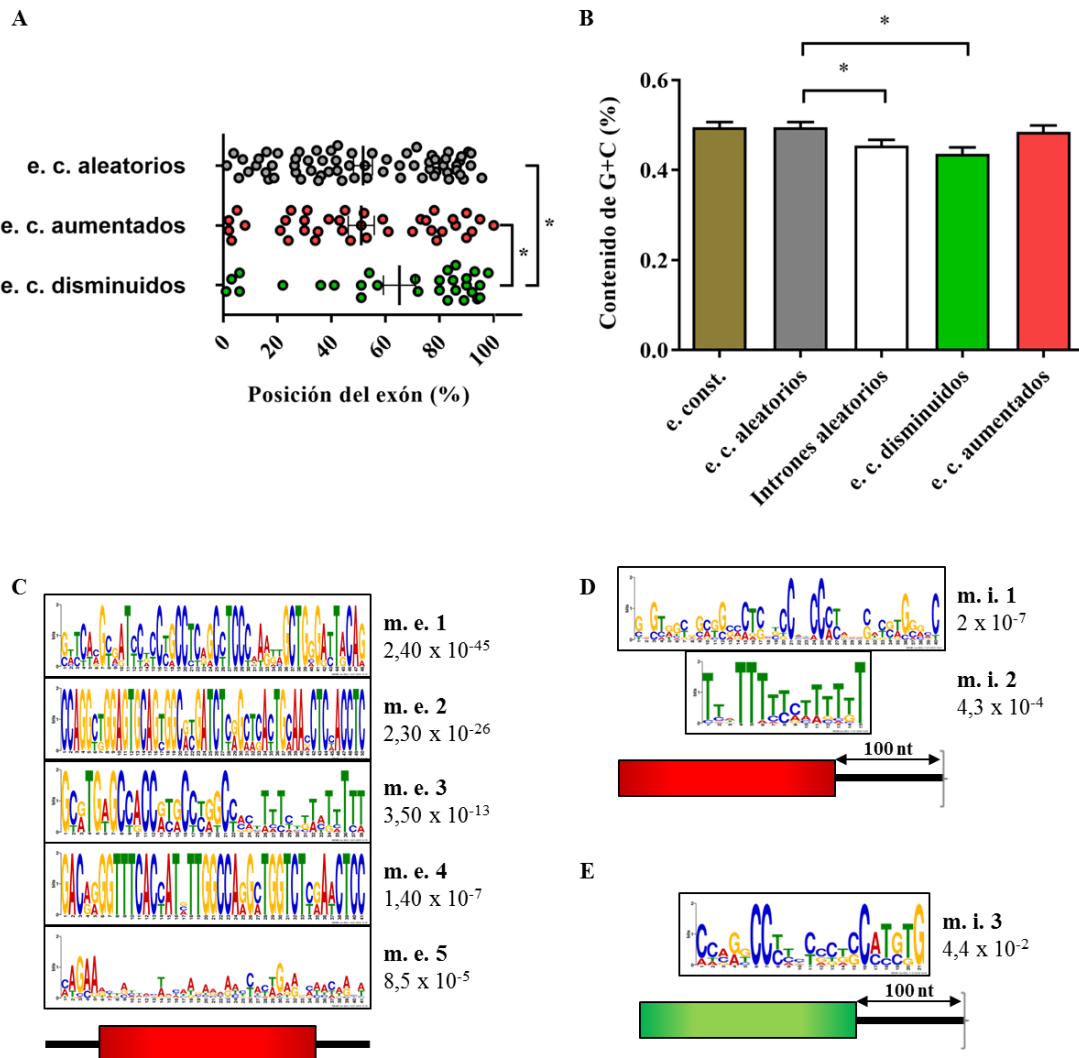


Figura R-4. Análisis de las secuencias de los exones casete (e. c.) afectados por el silenciamiento de TCERG1. **A.** Posición relativa de los e. c. elegidos al azar (e. c. aleatorios) y los e. c. afectados por la merma de TCERG1. **B.** Contenido de G+C de los exones constitutivos (e. const.), e. c. aleatorios y afectados por el silenciamiento de TCERG1, y de intrones aleatorios. **C.** Motivos de secuencia encontrados dentro de los e. c. aumentados (m. e., motivos exónicos) con sus valores *E*. **D.** Motivos encontrados dentro de los 100 nucleótidos adyacentes en 3' (m. i., motivos intrónicos) a los e. c. aumentados. **E.** Motivo encontrado dentro de los 100 nucleótidos adyacentes en 3' a los e. c. disminuidos. Medias \pm SEM **P* = 0,01-0,05.

Tabla R-1 Proteínas de unión a ARN que se pueden unir a los motivos identificados en los exones casete y sus secuencias adyacentes.

Motivo	Valor-E	Símbolo del gen			Proteínas de unión a ARN		
Exones casete aumentados							
Motivo exones 1	2,4 x 10 ⁻⁴⁵	ZNF687 e3 (x4)		C19orf48 e3	HNRNPH2		SRSF9
		FHL2 e4		DIS3L2 e16			
Motivo exones 2	2,3 x 10 ⁻²⁶	ZNF687 e3 (x2)	CASP7 e9	FHL2 e4	MBNL1		SRSF1
Motivo exones 3	3,5 x 10 ⁻¹³	ZNF687 e3 (x4)	C19orf48 e3	DIS3L2 e16	HNRNPC	HNRNPCL1	HNRNPR
					PTBP1	RALY	TIA1
Motivo exones 4	1,4 x 10 ⁻⁷	ZNF687 e3 (x2)		C19orf48 e3			
Motivo exones 5	8,5 x 10 ⁻⁵	VCAN e7 (x21)	SLCO6A1 e7 (x2)	DIS3L2 e16	SRSF1		SRSF7
		U2SURP e14					
100 nt adyacentes en 3' a los exones casete aumentados							
Motivo intrones 1	2 x 10 ⁻⁷	SLC19A3 e3	CACNA1C e37	ZNF618 e14	HNRNPH2		SFPQ
		AKAP8L e10	ABCB6 e19	EFEMP1 e2	SRSF1		SRSF2
		MARK2 e17	PCGF3 e4	C19orf48 e3			
Motivo intrones 2	4,3 x 10 ⁻⁴	HNRPDL e8	TMEM68 e8 (x3)	ELP2 e6 (x2)	HNRNPR		SRSF10
		SLC4A5 e58	CCDC150 e21 (x2)	FHL2 e4	SYNCRIP		U2AF2
		CASP7 e9	U2SURP e14	SGK494 e7	TIA1		SART3
		PLD1 e4	MMS22L ae7		SRSF9		PTBP1
100 nt 3' E.C. disminuidos							
Motivo intrones 3	4,4 x 10 ⁻²	PKM2 e13 (x2)	WNK1 e11	DNM2 e22	HNRNPH2		SRSF1
		UBE3B e22	UNC5A e3		SRSF2		SRSF9

Resultados

Tabla R-2. Categorías de ontología génica sobrerrepresentadas entre los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1.

Categorías sobrerrepresentadas entre los genes afectados a nivel de transcripción			
GO ID	Término de GO	Nº de dianas de TCERG1	Valor P
Procesos biológicos			
GO:0010605	Regulación negativa de procesos metabólicos de macromoléculas	13	8,9 x 10 ⁻³
GO:0048704	Morfogénesis del sistema esquelético embrionario	4	9,5 x 10 ⁻³
GO:0034622	Ensamblaje de complejos macromoleculares celulares	7	3,1 x 10 ⁻²
GO:0007017	Procesos basados en microtúbulos	6	4 x 10 ⁻²
GO:0007050	Parada del ciclo celular	4	4,1 x 10 ⁻²
GO:0048568	Desarrollo de órganos embrionarios	5	4,2 x 10 ⁻²
GO:0042445	Proceso del metabolismo de hormonas	4	4,7 x 10 ⁻²
Componentes celulares			
GO:0030018	Discos Z	3	3,6 x 10 ⁻²
Función molecular			
GO:0019834	Actividad inhibidora de fosfolipasa A2	2	2,9 x 10 ⁻²
Categorías sobrerrepresentadas entre los genes afectados a nivel de <i>splicing</i>			
Procesos biológicos			
GO:0006259	Proceso metabólico del ADN	18	3,9 x 10 ⁻³
GO:0046907	Transporte intracelular	21	5,3 x 10 ⁻³
GO:0048193	Transporte de vesículas de Golgi	8	5,5 x 10 ⁻³
GO:0007049	Ciclo celular	23	8,5 x 10 ⁻³
GO:0022402	Proceso del ciclo celular	18	1,1 x 10 ⁻²
GO:0010639	Regulación negativa de la organización de orgánulos	6	1,1 x 10 ⁻²
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	18	1,4 x 10 ⁻²
GO:0006350	Transcripción	48	1,4 x 10 ⁻²
GO:0006281	Reparación del ADN	11	1,9 x 10 ⁻²
GO:0008654	Proceso de la biosíntesis de fosfolípidos	6	2,6 x 10 ⁻²
GO:0051129	Regulación negativa de la organización de los componentes celulares	7	3 x 10 ⁻²
GO:0045449	Regulación de la transcripción	55	3,3 x 10 ⁻²
GO:0051402	Apoptosis neuronal	3	3,75 x 10 ⁻²
GO:0006511	Procesos catabólicos de proteínas dependientes de ubiquitina	9	4,03 x 10 ⁻²
GO:0045941	Regulación positiva de la transcripción	16	4,44 x 10 ⁻²
GO:0045927	Regulación positiva del crecimiento	5	4,45 x 10 ⁻²
GO:0009314	Respuesta a radiación	8	4,71 x 10 ⁻²
GO:0033554	Respuesta celular al estrés	16	4,75 x 10 ⁻²
Componentes celulares			
GO:0030018	Discos Z	7	9,0 x 10 ⁻⁵
GO:0043292	Fibra contráctil	9	7,7 x 10 ⁻⁴
GO:0031090	Membrana de orgánulos	32	2,4 x 10 ⁻³
GO:0043228	Orgánulos no unidos a membrana	60	2,6 x 10 ⁻³
GO:0005730	Núcleo	22	4,4 x 10 ⁻³
GO:0016323	Membrana plasmática basolateral	10	6,1 x 10 ⁻³
GO:0030055	Unión célula-substrato	7	9,9 x 10 ⁻³
GO:0042598	Fracción vesicular	10	1,9 x 10 ⁻²
GO:0031974	Lumen delimitado por membrana	42	2,33 x 10 ⁻²
GO:0016529	Retículo sarcoplásmico	4	2,48 x 10 ⁻²
GO:0044431	Parte del aparato de Golgi	11	2,75 x 10 ⁻²

GO:0016528	Sarcoplasma	4	$2,82 \times 10^{-2}$
GO:0005794	Aparato de Golgi	23	$3,09 \times 10^{-2}$
GO:0012505	Sistema de endomembranas	21	$3,31 \times 10^{-2}$
GO:0031966	Membrana mitocondrial	13	$3,65 \times 10^{-2}$
GO:0005792	Microsoma	9	$4,02 \times 10^{-2}$
GO:0019718	Microsoma rugoso	2	$4,77 \times 10^{-2}$
GO:0044454	Parte de los cromosomas nucleares	6	$4,77 \times 10^{-2}$
Función molecular			
GO:0003712	Actividad de cofactor transcripcional	16	$6,87 \times 10^{-4}$
GO:0016563	Actividad activadora de la transcripción	17	$9,14 \times 10^{-4}$
GO:0030528	Actividad reguladora de la transcripción	38	$5,83 \times 10^{-3}$
GO:0008134	Unión a factor de transcripción	17	$7,77 \times 10^{-3}$
GO:0003723	Unión a ARN	21	$1,17 \times 10^{-2}$
GO:0019899	Unión a enzima	16	$2,03 \times 10^{-2}$
GO:0004674	Proteínas con actividad serina/ treonina quinasa	14	$2,16 \times 10^{-2}$
GO:0043566	Unión a estructura específica de ADN	7	$2,98 \times 10^{-2}$
GO:0000166	Unión a nucleótido	48	$3,04 \times 10^{-2}$
GO:0017151	Unión a helicasa de ARN DEAD/H-box	2	$3,15 \times 10^{-2}$
GO:0005315	Actividad transportadora de fosfato inorgánico transmembrana	2	$4,69 \times 10^{-2}$
GO:0003707	Actividad receptora de hormonas esteroideas	4	$4,71 \times 10^{-2}$
GO:0008565	Actividad transportadora de proteínas	5	$4,79 \times 10^{-2}$

Como complemento a los análisis de ontología génica, estudiamos los patrones de expresión por tejido de los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1 en base a los datos de un conjunto de *microarrays* realizados con muestras de 126 tejidos primarios humanos. El programa *Gene Expression Profiler*, descrito previamente (Benita et al. 2010) y disponible en <http://xavierlab2.mgh.harvard.edu/EnrichmentProfiler/index.html>, genera un valor de enriquecimiento de la expresión comparable entre genes y ordena los datos siguiendo un agrupamiento jerárquico no supervisado (Figura R-5 A). Al analizar nuestros datos con este programa observamos que muchos de los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1 se expresan principalmente en células nerviosas (Figura R-5 A). El análisis de las categorías de ontología génica de los genes expresados principalmente en tejidos de tipo neuronal indica que muchos de ellos están relacionados con la unión a iones, con el citoesqueleto, la membrana plasmática, o la morfología celular (Figura R-5 C). Entre los genes afectados a nivel de *splicing*, los eventos alternativos mayoritariamente afectados son los exones casete y los sitios de poliadenilación alternativos (Figura R-5 B).

Resultados

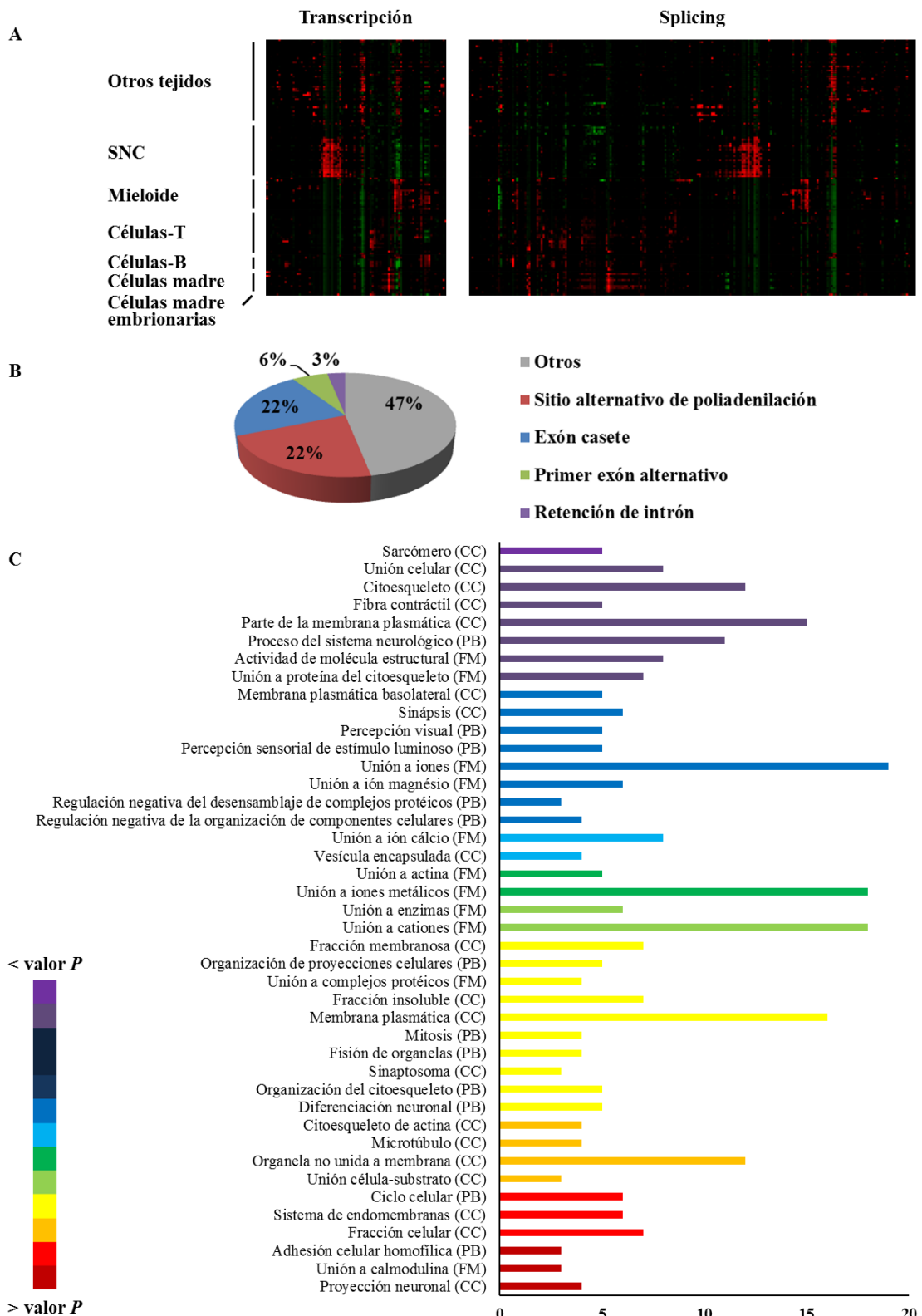


Figura R-5. El silenciamiento de *TCERG1* afecta a genes que se expresan en el SNC. **A.** Mapa de calor de la expresión de los genes afectados por el silenciamiento de *TCERG1* en distintos tejidos. Cada pixel corresponde al nivel de expresión de un gen (eje X) en un tejido (eje Y). El color rojo indica que un gen se expresa principalmente en un determinado tejido, el color verde que no se expresa en ese tejido, y el color negro que se expresa en todos los tejidos por igual. **B.** Clasificación de los eventos de AS de los

(continuación pie Figura R-5) genes afectados por la merma de TCERG1 en el SNC. C. Categorías de ontología génica (GO) sobrerrepresentadas entre los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1, y cuya expresión es específica del SNC. En el eje de ordenadas se indican las categorías de GO y en el eje de abscisas el número de genes afectados dentro de esa categoría. La escala de color indica los rangos de valor P de cada categoría y van del púrpura ($P= 7,4 \times 10^{-5}$) al marrón ($P= 4,5 \times 10^{-2}$).

2. El silenciamiento de TCERG1 produce alteraciones en el crecimiento de las neuritas

El análisis del transcriptoma de células HEK293T en las que la expresión de TCERG1 ha sido mermada indica que un número importante de genes afectados a nivel de transcripción y *splicing* se expresan principalmente en el sistema nervioso central (SNC), y que muchos de ellos están implicados en procesos de morfogénesis y de dinámica del citoesqueleto (Figura R-5 B) (Anexo I, Tabla A-3). Las células HEK293 fueron generadas en la década de 1970 a partir de células normales de riñón de embrión humano y para hacerlas inmortales se transfectaron con el Adenovirus 5 (Graham et al. 1977). A pesar de su origen, las células HEK293 tienen ciertas características neuronales (por ejemplo se sabe que expresan más de 60 genes específicos de neuronas) y actualmente se piensa que las células nefríticas originales se transformaron en células neuronales debido a la acción del adenovirus (Shaw et al. 2002). Debido a estas características, las células HEK293 han sido ampliamente utilizadas en estudios de canales de iones con voltaje específicos de neuronas ((He & Soderlund 2010) y las referencias incluidas), señalización neuronal (Vetter & Lewis 2010), sinaptogénesis (Woo et al. 2009; Mah et al. 2010; Fu et al. 2003; Kim et al. 2006), o en la propagación de virus altamente neurotróficos (Madhusudana et al. 2010; Jahan et al. 2011; Campbell et al. 2005). No obstante, pensamos que estas células no son el mejor modelo experimental para estudiar función neuronal. De modo que para profundizar en el estudio de la función de TCERG1 en neuronas, investigamos los efectos del silenciamiento de TCERG1 en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. La regulación de la dinámica del citoesqueleto en células SH-SY5Y es fundamental para la formación, el crecimiento y el mantenimiento de las neuritas. Para asegurar un nivel de silenciamiento homogéneo, y debido a la baja eficiencia de los métodos convencionales de transfección en estas células, generamos líneas celulares SH-SY5Y que expresan de forma estable el ARN de interferencia contra TCERG1 empleando lentivirus. Creamos las células SH-SY5Y shTCERG1 (sh9), que expresan un shRNA contra TCERG1, y las células shControl, que expresan el shRNA pLKO.1, que no reconoce ningún gen

Resultados

conocido de mamífero. Verificamos la disminución en los niveles de expresión de TCERG1 mediante Western blot (Figura R-6 A) y también mediante RT-qPCR (Figura R-6 B). Además, validamos el incremento en el uso de un primer exón alternativo de TCERG1 al silenciar TCERG1 (Figura R-6 B). El silenciamiento de TCERG1 en células SH-SY5Y también incrementa los niveles de expresión de la proteína vimentina (Figura R-3 C), lo cual sugiere que los cambios observados en células HEK293T son relevantes en células SH-SY5Y. Para estudiar hasta qué punto es cierta esta afirmación se están analizando los cambios producidos en el transcriptoma de las células SH-SY5Y shTCERG1 en comparación con las células shControl mediante RNAseq.

Analizamos los efectos del silenciamiento de TCERG1 sobre la morfología celular mediante microscopía de campo claro. Observamos que las células con menor expresión de TCERG1 tienen una morfología diferente, son más redondeadas y tienen neuritas más cortas en comparación con los controles sin infectar o con el shControl (Figura R-6C). Para cuantificar estas diferencias morfológicas, realizamos mediciones fotogramétricas a las células shTCERG1 y a los controles. Observamos una disminución significativa de la longitud de las neuritas, y un incremento, también significativo, del área del soma al silenciar TCERG1 (Figura R-6 D-E).

El tratamiento de las células SH-SY5Y con ácido retinoico promueve su diferenciación y el crecimiento de las neuritas (Påhlman et al. 1995) (Figura R-6 C). Al exponer las células SH-SY5Y control (no infectadas y shControl) y shTCERG1 al ácido retinoico observamos un incremento en la longitud total de las neuritas acompañado por una reducción en la superficie del soma (Figura R-6 D-E). Estos datos indican que las tres líneas celulares responden de la misma manera al tratamiento con ácido retinoico, pero la longitud total de las neuritas en las células SH-SY5Y shTCERG1 es significativamente menor que la de los controles. En conjunto, estos datos sugieren que TCERG1 es necesario para un crecimiento apropiado de las neuritas en células SH-SY5Y pero no para su diferenciación.

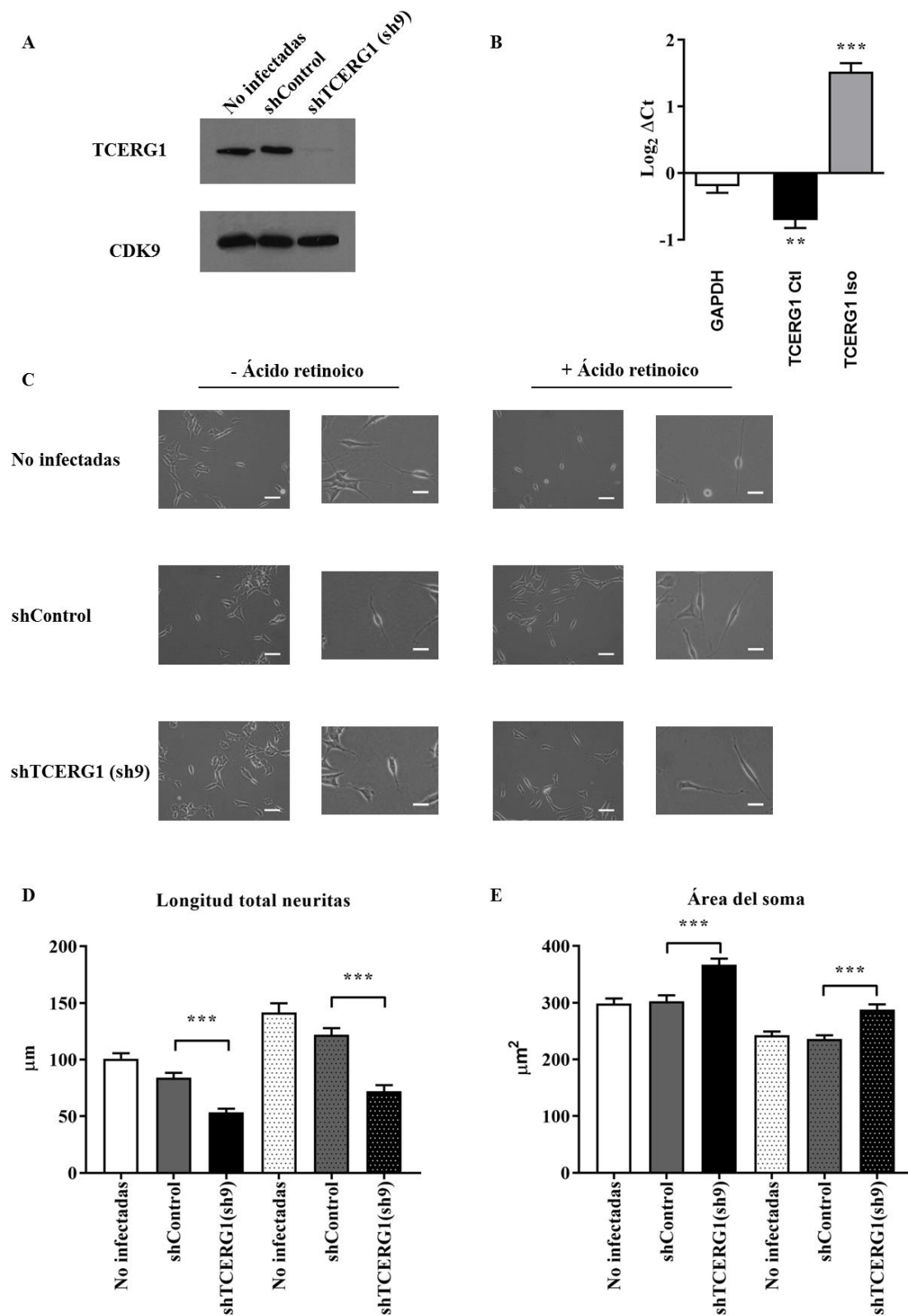


Figura R-6. El silenciamiento de TCERG1 afecta a la morfología y a la longitud de las neuritas de las células SH-SY5Y. **A.** Western blot de la expresión de TCERG1 en las líneas de células SH-SY5Y utilizadas. Como control de carga se utilizó CDK9. **B.** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de TCERG1 y de su isoforma afectada. Como normalizador se empleó GAPDH. Los valores de

Resultados

(continuación pie **Figura R-6**) expresión relativa están representados como \log_2 del ΔCt . Los datos corresponden a tres experimentos independientes (medias \pm SEM). $**P = 0,001-0,01$; $***P < 0,001$. **C.** Imágenes representativas de microscopía de campo claro de células SH-SY5Y control y shTCERG1 tratadas y sin tratar con ácido retinoico. Para cada condición se muestra una fotografía completa y una ampliación. Barra de escala de 20 μm en las imágenes completas y de 10 μm en las ampliaciones. **D- E.** Cuantificación de la longitud total de neuritas por célula y del área del soma. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (n=100 para cada condición) (medias \pm SEM). $**P = 0,001-0,01$; $***P < 0,001$.

A continuación estudiamos la organización del citoesqueleto de estas células mediante la tinción inmunológica con faloidina marcada con rodamina, una toxina que se intercala entre las fibras de actina F. Las alteraciones en los componentes estructurales del citoesqueleto, como los filamentos de actina o los microtúbulos, afectan a la morfología neuronal y al crecimiento de las neuritas (Hotulainen & Hoogenraad 2010). De acuerdo con nuestros resultados previos, las células con TCERG1 silenciado son más redondeadas y tienen neuritas más cortas (Figura R-7, paneles A-F). Estos datos se vieron reforzados tras la inducción de la diferenciación con ácido retinoico (Figura R-7, paneles I-N).

Para asegurarnos de que el fenotipo que observamos no se debe a un efecto indirecto del shTCERG1 (sh9) utilizado, creamos otra línea celular con un shRNA diferente contra TCERG1 (sh4). El análisis de esa línea celular sh4 muestra un efecto similar en la morfología de las neuritas (Figura R7 G-H) aunque es menos acusado en presencia de ácido retinoico (Figura R7 O-P).

En conjunto, estos resultados sugieren que TCERG1 es importante en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina, el cual es necesario para la formación y el crecimiento de las neuritas durante el desarrollo neuronal.

Por último, para confirmar que el efecto observado sobre el crecimiento de las neuritas se debe directamente al silenciamiento de TCERG1, investigamos si la longitud de las neuritas podría ser recuperada al expresar en las células silenciadas una proteína TCERG1 marcada con un fluoróforo y mutada para hacerla resistente al efecto de sh9. Para ello creamos el vector EGFP-TCERG1 resistente al sh9 (Figura R-8 A) y lo transfectamos en las células SH-SY5Y shTCERG1 (sh9). El análisis de los extractos celulares mediante Western blot confirmó la expresión de la proteína TCERG1 marcada (Figura R-8 B).

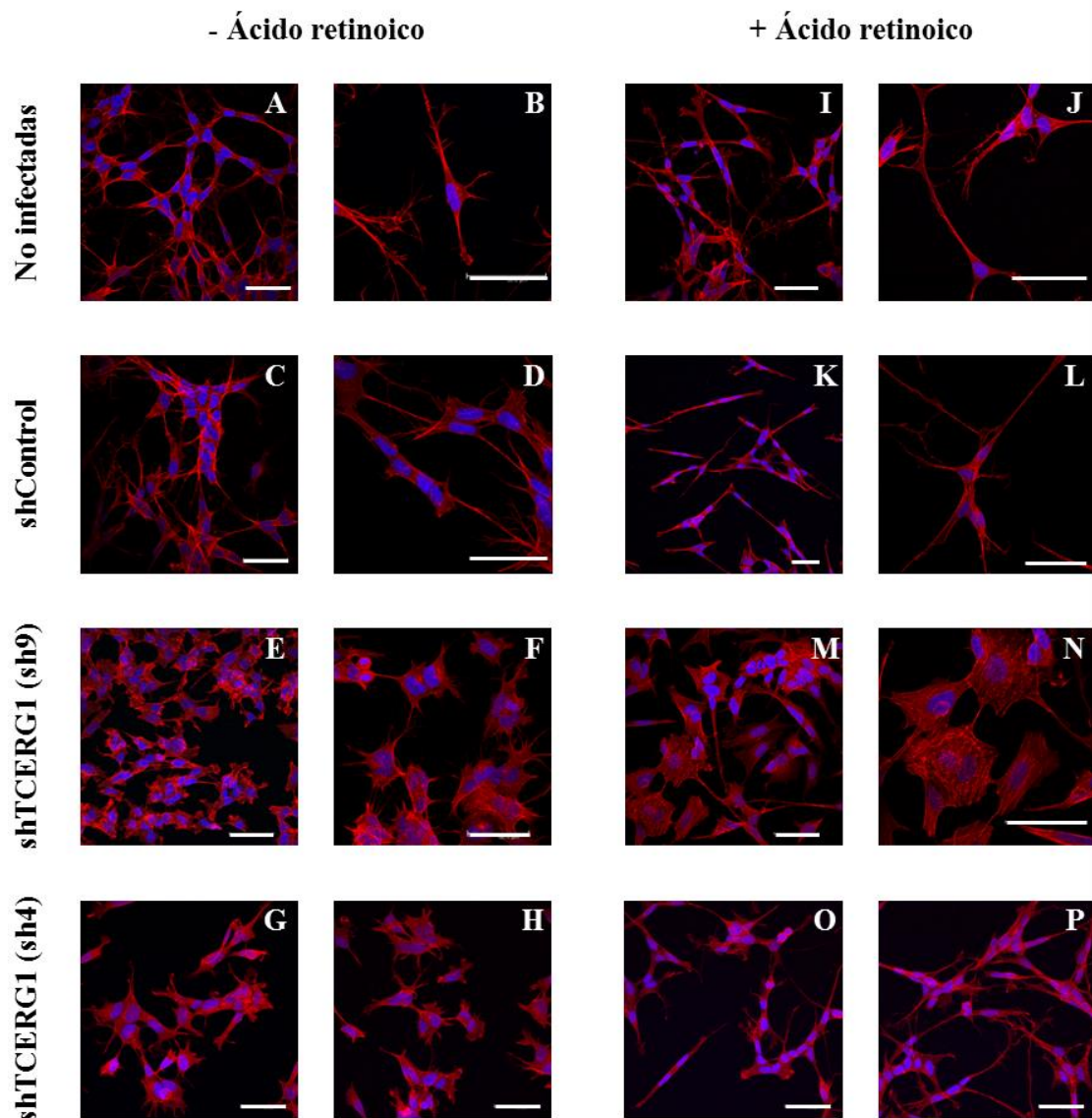


Figura R-7. El silenciamiento de TCERG1 produce alteraciones importantes en el citoesqueleto de actina y en el crecimiento de las neuritas de las células de neuroblastoma SH-SY5Y. Se tiñeron con faloidina-rodamina las células no infectadas, shControl y shTCERG1 (sh9) y (sh4) para observar el citoesqueleto de actina (rojo) en ausencia (A-H) o en presencia (I-P) de ácido retinoico. El ADN está teñido con DAPI (azul). Las barras de escala miden 50 μ m.

Observamos que la expresión del plásmido control (expresando EGFP) no cambia la morfología de las células SH-SY5Y-shTCERG1, que permanecen con forma redondeada y neuritas cortas (Figura R-8 C, EGFP). Sin embargo, observamos un rescate significativo en la morfología celular con un incremento en la longitud de las neuritas tras la expresión de la proteína TCERG1 mutada (Figura R-8 C-D), TCERG1-mut). De estos experimentos concluimos que la expresión de TCERG1 puede compensar el efecto causado por el silenciamiento de la proteína endógena, y que por lo

Resultados

tanto, TCERG1 participa en la regulación del crecimiento de las neuritas en las células SH-SY5Y.

Para estar más seguros de que el efecto de TCERG1 sobre el crecimiento de las neuritas es específico (y no un artefacto debido al uso de una línea celular que puede tener multitud de aberraciones génicas) estudiamos el efecto del silenciamiento de TCERG1 sobre el crecimiento de las neuritas de células de cultivos primarios derivados de hipocampo de ratón. En primer lugar comprobamos *in silico* que la secuencia del shTCERG1-sh9 está conservada entre humano y ratón, y confirmamos que el sh9 es capaz de silenciar Tcerg1 en células murinas utilizando la línea celular C2C12 (Anexo I, Figura A-2 A). A continuación se transfectaron las neuronas de hipocampo con los mismos shRNAs Control o contra TCERG1 que habíamos utilizado en las células SH-SY5Y junto con un vector de expresión de GFP para observar las células transfectadas (Figura R-9 A).

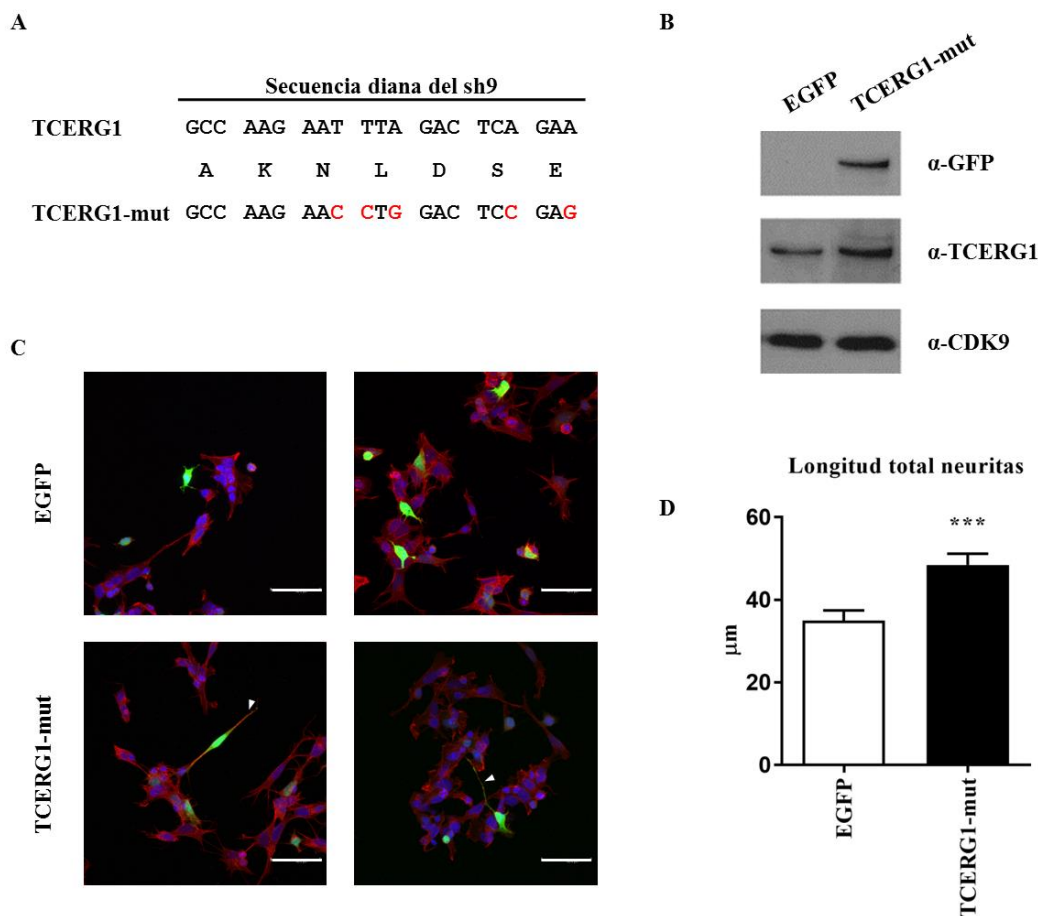


Figura R-8. La reexpresión de TCERG1 recupera los defectos en la morfología neuronal. A. Representación esquemática de las mutaciones silenciosas en la secuencia de TCERG1 diseñadas para

(continuación pie Figura R-8) evitar el silenciamiento por el sh9. **B.** Western blot de extractos de células transfectadas con los vectores de expresión control (EGFP) o resistente al shTCERG1 (TCERG1-mut). El asterisco indica la posición de la proteína sobreexpresada. **C.** Imágenes representativas de las inmunofluorescencias que se utilizaron para cuantificar el efecto de la reexpresión de TCERG1 sobre la longitud total de las neuritas. Las flechas indican ejemplos de neuritas largas en células con TCERG1 reintroducido. La señal verde corresponde a EGFP o a TCERG1-EGFP, la señal roja corresponde a la actina F, y la señal azul corresponde al ADN. Las barras de escala miden 50 μm . **D.** Cuantificación de la longitud total de las neuritas de tres experimentos independientes ($n= 60$ células en cada condición) (medias \pm SEM). *** $P < 0,001$.

Comprobamos que los niveles de ARNm de TCERG1 disminuyen al tratar las células con el shTCERG1 (sh9) en comparación con las células control (Anexo I, Figura A-2 B). Observamos que las neuronas con menores niveles de TCERG1 muestran diferencias morfológicas, principalmente un menor grado de ramificación de las dendritas (Figura R-9 A). La cuantificación de los cambios observados confirmó una reducción significativa en la longitud total de las neuritas en las células tratadas con el shRNA contra TCERG1, y una reducción en la complejidad del árbol dendrítico en las proximidades del soma (Figura R-9 B-F). Estos resultados confirman nuestros datos previos e indican que TCERG1 es esencial para el crecimiento de las neuritas en cultivos celulares tanto en células de neuroblastoma como de hipocampo. De modo que, la falta de expresión de TCERG1 podría producir defectos en las funciones neuronales.

Resultados

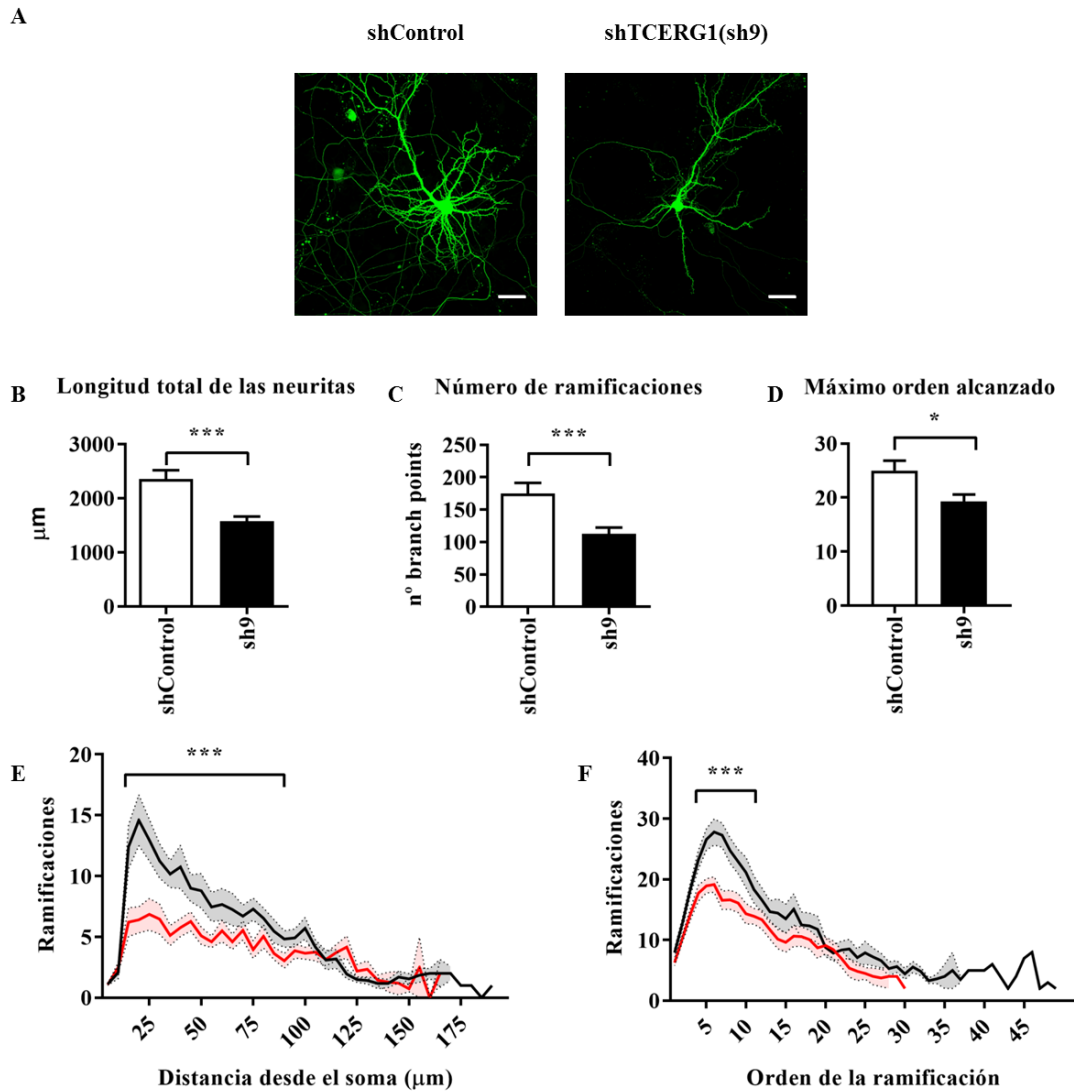


Figura R-9. El silenciamiento de TCERG1 afecta al crecimiento y ramificación de las neuritas en las neuronas del hipocampo de ratón. **A.** Inmunofluorescencias de neuronas individuales transfectadas con shControl o shTCERG1 junto con GFP en DIV 7, y las células fueron fijadas en DIV 14. La morfología de las células transfectadas se detectó en base a la señal de GFP (verde). La barra de escala mide 25 μm. **B-C.** Cuantificación de la longitud total de las neuritas y del número de ramificaciones en tres experimentos independientes (n= 24 shControl y 22 shTCERG1). Las células fueron transfectadas en DIV 3 y fijadas en DIV 7 (medias ± SEM) ** $P = 0,001-0,01$; *** $P < 0,001$. **D.** Máximo orden alcanzado por las ramificaciones de las neuritas calculado a partir de los datos del apartado F. **E.** Análisis de Sholl de la ramificación de las neuritas. Se trazaron círculos concéntricos, con centro en el soma, a intervalos de 5 μm y se contó el número de ramificaciones dentro de cada círculo. El eje de ordenadas indica el número de ramificaciones y el de abscisas la distancia desde el soma. La diferencia entre las ramificaciones a una distancia de entre 15 y 90 μm es muy significativa *** $P < 0,001$. **F.** El etiquetado del orden de cada ramificación se realizó de forma automática con el programa NeuronStudio. Las neuritas que parten directamente del soma tienen orden 1 y se dividen en neuritas de orden 2. Se aprecia una diferencia significativa en el número de ramificaciones con orden comprendido entre 3 y 12. También se observan

Resultados

(continuación pie Figura R-9) diferencias significativas en el máximo orden alcanzado (medias \pm SEM);

* $P = 0,01-0,05$ *** $P < 0,001$.

Conclusiones



Conclusiones

1. El estudio global del transcriptoma humano al silenciar TCERG1 en células HEK293T revela que esta proteína afecta a la expresión de otros genes modulando sus niveles de transcripción y/o sus patrones de *splicing* o de transcripción alternativos.
2. El silenciamiento de TCERG1 afecta principalmente de forma negativa a los niveles de expresión de otros genes.
3. La merma en la expresión de TCERG1 afecta a los principales eventos de *splicing* alternativo. Los eventos más alterados son los exones casete, los primeros y últimos exones alternativos y la retención de intrón. La mayor parte de los exones afectados aumentan su inclusión en los transcritos maduros.
4. TCERG1 no actúa como un acoplador general entre la transcripción y el *splicing* en células HEK293T.
5. Un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado muestra que las células derivadas del linaje nervioso poseen una mayor proporción de genes diferencialmente expresados dependientes de TCERG1.
6. El silenciamiento de TCERG1 en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y afecta a la organización del citoesqueleto de actina. Las células silenciadas tienen un soma de mayor diámetro y producen neuritas más cortas. La reexpresión de TCERG1 en las células con TCERG1 silenciado rescata el efecto sobre la longitud de las neuritas.
7. La merma de TCERG1 en neuronas de hipocampo de ratón afecta el crecimiento y arborización de las dendritas, mayormente en regiones cercanas al soma.

Discusión



Discusión

Mediante este trabajo hemos demostrado que el factor de transcripción y *splicing* TCERG1, una proteína que ha sido relacionada con la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas, participa en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y en el crecimiento de las neuritas. A partir del análisis bioinformático de los cambios en el transcriptoma obtenidos al comparar células HEK293T normales con células con TCERG1 silenciado, observamos que la merma de esta proteína afecta a la expresión de genes neuronales implicados en la morfogénesis y en el crecimiento de neuritas. De acuerdo con estos datos hemos descrito que el silenciamiento de TCERG1 produce alteraciones en la morfogénesis y en el crecimiento de las neuritas en las células derivadas de neuroblastoma SH-SY5Y y en cultivos primarios derivados de hipocampo de ratón.

En conjunto, nuestros datos permiten hipotetizar que TCERG1 podría estar afectando a la síntesis y/o al procesamiento del ARNm de genes importantes en el desarrollo y la homeostasis de las neuronas, y que las alteraciones en la transcripción y/o el AS de los genes regulados por TCERG1 están relacionadas con las enfermedades neuronales con las que está asociado este factor.

1. El silenciamiento de TCERG1 produce cambios significativos en la transcripción y el *splicing* alternativo de genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto

Para este trabajo utilizamos los *Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array*, que poseen sondas diseñadas para detectar más de un millón de exones pertenecientes a más de 250 000 transcritos, para identificar los genes afectados al silenciar la expresión de TCERG1 en células HEK293T. Combinando el uso de los *Exon Array* con el de un software comercial diseñado específicamente para su análisis, identificamos cambios en la expresión de 414 genes que codifican para proteína. Observamos que la merma de TCERG1 cambia los niveles generales de transcripción de 128 genes, el 84,5% de los cuales disminuye, lo que podría indicar una función de TCERG1 como regulador positivo de su transcripción. Inicialmente se identificó a TCERG1 como un factor de elongación que reprime la transcripción de la RNAPII, aunque lo hace de forma específica y no general, es decir, que no reprime la transcripción de todos los genes (Suñé et al. 1997). De acuerdo con estos datos se ha descrito que TCERG1 también actúa como correpresor inhibiendo las actividades transcripcionales de la proteína

CEBPA (McFie et al. 2006). Pero también se ha demostrado que TCERG1 actúa como activador de la transcripción (Sánchez-Álvarez et al. 2010). Así pues TCERG1 es capaz de reprimir o de activar la transcripción de determinados genes según el contexto del tipo celular y/o de la secuencia del gen, si bien todavía no se ha encontrado la forma de predecir si un gen será o no afectado por TCERG1, y si lo hará de forma positiva o negativa. Nuestro estudio indica que TCERG1 no es un factor general de elongación, ya que la mayoría de los 16 762 genes que detecta el *Exon Array* no están afectados por su silenciamiento.

Este trabajo confirma la actividad de TCERG1 como factor de AS *in vivo*. Observamos que la merma de TCERG1 afecta al AS de 356 exones en 314 genes, dos tercios de los cuales aumentan su expresión. En los eventos de uso de primeros exones alternativos, sitios alternativos de poliadenilación y sitios donadores de *splicing* alternativos los porcentajes de exones que aumentan su expresión son del 72, 80 y 94%, respectivamente, lo cual podría indicar que TCERG1 ejercería una función represiva sobre estos eventos.

Nuestros datos también indican que TCERG1 afecta de manera considerable al uso de los sitios alternativos de poliadenilación, algo que ya describieron Pearson y colaboradores (Pearson et al. 2008). El 19% del total de exones afectados a nivel de AS se clasifica dentro de este evento, y el porcentaje aumenta al 22% entre los exones de genes específicos del sistema nervioso. Estos porcentajes son muy superiores al 7% que se encuentra al analizar los datos de ENCODE en UCSC. Las 3'UTR alternativas afectadas por la merma de TCERG1 son más cortas (678 nt) que las 3'UTR de los transcritos de referencia de sus genes (1528 nt), lo cual afecta al número de sitios de unión a micro ARNs y también a las familias de micro ARNs que se unen a estas 3'UTR y modulan la expresión de los ARNm (Jia et al. 2013; McGlincy & Smith 2008). Este efecto sobre la longitud de las 3'UTR podría indicar que TCERG1 participa en la coordinación específica de tejido de la elección de los sitios de poliadenilación (Zhang et al. 2005; Liu et al. 2007).

El evento mayoritario de AS en mamíferos es el uso de exones casete (Kim et al. 2008). Al silenciar TCERG1 la mayoría de los exones afectados que se pueden clasificar dentro de un evento de AS conocido son exones casete (20%). El estudio de las secuencias de estos exones y de pequeñas regiones adyacentes que pueden contar con

Discusión

elementos que regulan su AS, indica que TCERG1 podría reprimir la inclusión de exones que contienen determinados motivos de secuencia. También indica que TCERG1 podría favorecer el uso de exones casete con un bajo contenido de G+C y/o exones que se encuentren en la región final del gen.

Los datos de nuestro *Exon Array* corroboran lo anteriormente descrito por Lin y colaboradores (Lin et al. 2004), en el sentido de que TCERG1 parece no afectar al *splicing* constitutivo de los exones. La mayoría de los exones afectados por el silenciamiento de TCERG1 que sufren un evento de AS es “desconocido”, es decir, están afectados exones cuyo AS no se corresponde con ningún evento descrito en ninguna isoforma de su gen. La causa de estos eventos “desconocidos” se puede explicar de dos formas: puede tratarse de exones constitutivos afectados por el silenciamiento de TCERG1, o puede ser que TCERG1 afecte al AS de isoformas que no han sido descritas todavía. Para estudiar si se trataba del primer caso, analizamos las secuencias de los exones “desconocidos” y observamos que su contenido en G+C es del 45% (datos no mostrados), que es significativamente menor que el de los exones constitutivos que analizamos en la Figura R-3 B, de modo que concluimos que estos exones corresponden a isoformas que no se han descrito.

Previamente se demostró, en el laboratorio donde se realizó esta tesis, que TCERG1 es capaz de regular el AS modulando la elongación de la RNAPII (Montes et al. 2012). Sin embargo, los datos presentados en esta tesis indican que este tipo de regulación solo ocurriría en un limitado número de genes, al menos en las células HEK293T utilizadas en este trabajo y en las células SH-SY5Y shTCERG1 (sh9) analizadas mediante RNA-seq (resultados preliminares; datos no mostrados).

Anteriormente se utilizaron *microarrays* de expresión para identificar dianas de TCERG1 en células HEK293T y células HeLa (Pearson et al. 2008). Tan solo 31 genes (un 3%) coinciden al comparar ambos trabajos. Entre las posibles explicaciones a estas discrepancias están el menor número de genes que son capaces de detectar los *microarrays* de expresión de primera generación (Ha et al. 2009), los cambios en el protocolo y los reactivos para la síntesis del ADNc (Affymetrix 2009; Jaksik et al. 2015), el análisis de los datos mediante metodologías distintas, y/o el nivel de silenciamiento de TCERG1. A pesar de esas diferencias, el análisis de las categorías de ontología génica de los genes descritos en este primer trabajo a escala genómica

también muestra un enriquecimiento en determinados procesos relacionados con la dinámica del citoesqueleto (análisis propio a partir de los datos publicados), lo cual reforzaría los datos obtenidos en este trabajo.

A pesar de los indicios que apuntan a que TCERG1 regula directamente la transcripción y/o el AS de los genes que están afectados por su silenciamiento, somos conscientes de que algunos de estos cambios se pueden deber a un efecto indirecto, por lo que habría que realizar experimentos adicionales para comprobar la especificidad de las dianas.

2. El silenciamiento de TCERG1 afecta a la transcripción y/o al AS de genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto

Existen numerosas enfermedades neurodegenerativas que están causadas por anomalías en el árbol dendrítico de las neuronas y/o en la morfología y densidad de las espinas dendríticas (Kulkarni & Firestein 2012; Parrish et al. 2007; Kasai et al. 2010). La organización del citoesqueleto es clave para la formación y la pérdida de dendritas y espinas dendríticas (Hotulainen & Hoogenraad 2010; Shirao T 2013; Luo 2002).

En nuestros análisis hemos encontrado muchos genes afectados por el silenciamiento de TCERG1 cuya expresión es específica del SNC y que están relacionados con la morfogénesis, el citoesqueleto y con la dinámica de la célula. Encontramos genes relacionados con la actina, como la proteínas de unión a actina ACTN2 (actinina) o ABLIM1 (proteína LIM de unión a actina 1); proteínas relacionadas con los microtúbulos, como TUBB2B (tubulina beta 2B clase IIb), MAP2 y MAP7 (proteínas asociadas a microtúbulos 2 y 7, respectivamente); proteínas implicadas en rutas de transducción de señales, PAK3 (quinasa 3 activada por P21) o SRGAP3 (proteína 3 activadora de la GTPasa SLIT-ROBO) y proteínas que unen el citoesqueleto con la matriz extracelular, como ANK2 (anquirina 2), DMD (distrofina), CLASP2 (proteína 2 asociada al enlace citoplasmático), y EFEMP1 (proteína 1 de la matriz extracelular que contiene EGF similar a fibulina).

También se ha descrito que TCERG1 coprecipita con DIAPH1 (Formina relacionada con Diaphanous 1) (Ingham et al. 2005), una proteína nucleadora de la actina que es necesaria para el ensamblaje de ciertas estructuras de actina F como los cables de actina o las fibras de estrés. DIAPH1 se une al extremo positivo de los filamentos de actina y ralentiza la polimerización y la despolimerización de la actina. También regula la

Discusión

morfología celular, la organización del citoesqueleto y favorece el crecimiento de las neuritas. DIAPH1 se localiza principalmente en el citoplasma, pero se ha descrito que está también presente en el núcleo en células NIH 3T3 (Tominaga et al. 2002).

Cabe destacar que más de la mitad de los genes afectados por el silenciamiento de TCERG1 cuya expresión es específica del SNC (23 genes, un 56%), son componentes del citoesqueleto. Según estos datos, un posible mecanismo mediante el cual la merma en la expresión de TCERG1 afecta negativamente al crecimiento de las neuritas estaría relacionado con alteraciones en la organización del citoesqueleto de actina, por ejemplo, en la polimerización y/o la estabilidad de los filamentos de actina, los cuales son fundamentales en la regulación de la morfogénesis neuronal y en su plasticidad estructural ((Luo 2002) y referencias contenidas). También podrían estar afectados el citoesqueleto de tubulina o la regulación de las uniones célula-substrato, lo que contribuiría al fenotipo observado. Actualmente, en nuestro laboratorio, se están estudiando mediante RNA-seq los cambios que se producen al silenciar TCERG1 en células SH-SY5Y para poder determinar con precisión cuales son las rutas y/o los genes responsables de las alteraciones observadas.

Se ha descrito que también se puede conseguir plasticidad sináptica mediante la reorganización del citoesqueleto a través de la acción de factores que regulan el transporte, la localización o la traducción de gránulos de ARNm. UHMK1 (quinasa 1 con motivo homólogo a U2AF) es una proteína con un dominio especial de unión a ARN que se localiza en los gránulos de ARN y favorece la traducción local del ARNm (Cambray et al. 2009). UHMK1 regula la morfología de las espinas dendríticas y la ramificación de las dendritas al afectar al citoesqueleto de tubulina (Pedraza et al. 2014), el cual controla a su vez la polimerización de la actina en estas estructuras (Jaworski et al. 2009). El silenciamiento de TCERG1 afecta a la expresión de *UHMK1* haciendo que disminuya. También favorece el incremento de la expresión de isoformas de UHMK1 con un sitio de inicio de transcripción alternativo, lo que produce transcritos con una 5'UTR más larga que pueden ser reguladas de manera alternativa.

Somos conscientes de que TCERG1 podría afectar a las dianas del *Exon Array* de forma directa o de forma indirecta. Entre los genes que están alterados por el silenciamiento de TCERG1 hay varios factores de transcripción y factores de *splicing*, al igual que algunos reguladores de la ruta de los micro ARNs, que podrían alterar la expresión de

otros genes. Por tanto, este trabajo abre diversas líneas de investigación que tienen como objetivo determinar la relación de TCERG1 con algunos de los genes más relevantes que están afectados por la merma de TCERG1. En cualquier caso, la reexpresión de TCERG1 en las células silenciadas (shTCERG1 (sh9)) rescata el fenotipo normal de crecimiento de las neuritas, lo cual indica que TCERG1 endógeno regula la elongación de las neuritas en las células SH-SY5Y.

3. El silenciamiento de TCERG1 afecta negativamente al crecimiento de las neuritas

Los análisis morfométricos comparando células de cultivos primarios transfectadas con un shControl o con el shTCERG1 (sh9) muestran una menor longitud total de las neuritas, un menor número de ramificaciones hasta unas 40 μm del soma (sin diferencias en las ramificaciones de las neuritas a distancias mayores), y una menor complejidad de éstas. Aunque no hemos medido de forma independiente axones y dendritas, estos resultados sugieren que TCERG1 regula la ramificación de las dendritas cercanas al soma en neuronas de hipocampo de ratón. Sorprendentemente observamos que al reexpresar TCERG1 en células SH-SY5Y shTCERG1 (sh9), TCERG1 localizaba tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura R-8 C, Anexo I, Figura A-3 C-F). Para descartar que no se tratara de un artefacto debido a la sobreexpresión de la proteína en determinadas células individuales, sobreexpresamos la misma construcción en células HEK293T, donde sabemos que TCERG1 tiene una localización exclusivamente nuclear (Sanchez-Alvarez et al. 2006; Sanchez-Hernandez et al. 2012). Observamos que la construcción TCERG1-mut-EGFP localiza únicamente en el núcleo de las células HEK293T (Anexo I, Figura A-3 A, B). Como comprobación adicional, realizamos inmunofluorescencias contra TCERG1 endógeno en células HEK293T, SH-SY5Y (Control y sh9), y en cultivos primarios de hipocampo de ratón con diversos anticuerpos (datos no mostrados). Los resultados no fueron concluyentes con respecto a la localización de TCERG1 debido a que encontramos señal de esta proteína tanto en núcleo como en citoplasma, de modo que es necesario realizar experimentos adicionales (como fraccionamiento celular) para determinar con precisión la localización subcelular de TCERG1 en las distintas líneas celulares.

Es importante resaltar que las alteraciones en las ramificaciones de las dendritas en las neuronas piramidales afectan a sus propiedades fisiológicas y pueden ser la casusa de

Discusión

numerosas enfermedades neurológicas (Kulkarni & Firestein 2012). Las principales manifestaciones patológicas de la HD son la muerte de las neuronas, principalmente en el cuerpo estriado y las alteraciones dendríticas de las neuronas estratiales supervivientes (Hickey 2013). Existen diversas evidencias de que TCERG1 está relacionada con la patogénesis de la HD: se une a HTT, forma agregados intranucleares en células nerviosas de tejido cerebral de pacientes de la HD, la sobreexpresión de TCERG1 alivia la neurotoxicidad causada por la HTT mutada disminuyendo la muerte celular neuronal, y puede que modifique la edad a la que progresa la enfermedad (Holbert et al. 2001; Arango et al. 2006; Andresen et al. 2007; Chattopadhyay et al. 2003). La interacción anormal de proteínas con plegamientos aberrantes como sucede en el caso de la HTT, pero también con CREBBP (CBP) SP1 y TAF4 (TAFII 130) (Dunah 2002; Steffan et al. 2000; T Shimohata et al. 2000) podría afectar al correcto funcionamiento de TCERG1 y por lo tanto a la expresión de genes importantes que estén regulados por TCERG1, y esto a su vez podría ser importante en la patogénesis de la HD. El hecho de que la sobreexpresión de TCERG1 alivie la neurotoxicidad causada por la HTT mutada sugiere que este efecto se podría deber a una restauración de la función de TCERG1 sobre la transcripción y/o el AS de genes relevantes para el desarrollo de la enfermedad.

Se ha descrito mediante resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica que el segundo dominio WW de TCERG1 está implicado en la formación de los depósitos amiloides, como los que se observan en diversas enfermedades neurodegenerativas (Ferguson et al. 2006; Tartaglia et al. 2008). En el desarrollo de estas patologías podría influir un plegamiento aberrante de TCERG1, que puede estar causado por diversos factores, entre ellos la extensión del hexámero CAGGCC en el exón 4 de TCERG1.

Asimismo, el artículo de Gau y colaboradores (Gau et al. 2012) indica que podría haber una relación entre la falta de expresión de TCERG1 y un deterioro cognitivo. Estos autores identificaron una microdelección en la localización cromosómica de TCERG1 junto con una microduplicación en un cromosoma diferente en un paciente con autismo. Aunque hay otros genes presentes en las regiones cromosómicas afectadas, los estudios que relacionan a TCERG1 con la HD hacen pensar a los autores que TCERG1 podría jugar un papel importante en neuronas, y que la haploinsuficiencia de este gen podría ser relevante en el fenotipo clínico del paciente.

Discusión

Seguir avanzando en los mecanismos moleculares por los cuales factores como TCERG1 regulan la morfología y la plasticidad morfológica de las dendritas podría ayudar a conocer su función en condiciones normales y patogénicas.

Bibliografía



Bibliografía

- Adelman, K. & Lis, J.T., 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nature reviews. Genetics*, 13(10), pp.720–31.
- Affymetrix, 2009. GeneChip® 3' IVT Express Kit. *Affymetrix® White Paper*, pp.1–9.
- Akhshi, T.K., Wernike, D. & Piekny, A., 2014. Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskeleton*, 71(1), pp.1–23.
- Allen, M. et al., 2002. The structure of an FF domain from human HYPA/FBP11. *Journal of Molecular Biology*, 323(3), pp.411–416.
- Amit, M. et al., 2012. Differential GC Content between Exons and Introns Establishes Distinct Strategies of Splice-Site Recognition. *Cell Reports*, 1(5), pp.543–556.
- Andresen, J.M. et al., 2007. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *Journal of medical genetics*, 44(1), pp.44–50.
- Arango, M. et al., 2006. CA150 expression delays striatal cell death in overexpression and knock-in conditions for mutant huntingtin neurotoxicity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(17), pp.4649–59.
- Arimura, N. & Kaibuchi, K., 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(3), pp.194–205.
- Azevedo, F.A.C. et al., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5), pp.532–541.
- Bailey, T.L. et al., 2009. MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), pp.202–208.
- Bailey, T.L. & Elkan, C., 1994. Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Bipolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp.28–36.
- Banman, S.L. et al., 2010. Nuclear redistribution of TCERG1 is required for its ability to inhibit the transcriptional and anti-proliferative activities of C/EBP?? *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(1), pp.140–151.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J. & Herculano-Houzel, S., 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of

- cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 0, pp.1–31.
- Bedford, M.T. & Leder, P., 1999. The FF domain: a novel motif that often accompanies WW domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(7), pp.264–265.
- Behzadnia, N. et al., 2007. Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes. *The EMBO journal*, 26(6), pp.1737–48.
- Benita, Y. et al., 2010. Gene enrichment profiles reveal T-cell development, differentiation, and lineage-specific transcription factors including ZBTB25 as a novel NF-AT repressor. *Blood*, 115(26), pp.5376–5384.
- Boise, L.H. et al., 1993. Bcl-X, a Bcl-2-Related Gene That Functions As a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. *Cell*, 74(4), pp.597–608.
- Boutell, J.M. et al., 1999. Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Human Molecular Genetics*, 8(9), pp.1647–1655.
- Buratowski, S., 2003. The CTD code. *Nature structural biology*, 10(9), pp.679–680.
- Burkard, K.T. & Butler, J.S., 2000. A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Molecular and cellular biology*, 20(2), pp.604–16.
- Busslinger, M., Moschonas, N. & Flavell, R.A., 1981. p' Thalassemia: Aberrant Splicing Results from a Single Point Mutation in an Intron. *Cell*, 27(1), pp.289–298.
- Cambray, S. et al., 2009. Protein Kinase KIS Localizes to RNA Granules and Enhances Local Translation. *Molecular and Cellular Biology*, 29(3), pp.726–735.
- Campbell, S.A. et al., 2005. Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. *Journal of virology*, 79(10), pp.6281–6290.
- Cancer Genome Atlas Network et al., 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), pp.330–337.
- Carty, S.M. et al., 2000. Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), pp.9015–9020.

Bibliografía

- Chabot, B. & Shkreta, L., 2016. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *Journal of Cell Biology*, 212(1), pp.13–27.
- Chang, L. & Goldman, R.D., 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Molecular cell biology*, 5(8), pp.601–13.
- Chattopadhyay, B. et al., 2003. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neuroscience Letters*, 345(2), pp.93–96.
- Chen, H.I. & Sudol, M., 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), pp.7819–7823.
- Chen, M. & Manley, J.L., 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(11), pp.741–54.
- Cheng, D. et al., 2007. The Arginine Methyltransferase CARM1 Regulates the Coupling of Transcription and mRNA Processing. *Molecular Cell*, 25(1), pp.71–83.
- Cheng, Y., Miura, R.M. & Tian, B., 2006. Prediction of mRNA polyadenylation sites by support vector machine. *Bioinformatics*, 22(19), pp.2320–2325.
- Coiras, M. et al., 2013. Transcription elongation regulator 1 (TCERG1) regulates competent RNA polymerase II-mediated elongation of HIV-1 transcription and facilitates efficient viral replication. *Retrovirology*, 10(1), p.124.
- Colgan, D.F. & Manley, J.L., 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Development*, 11(21), pp.2755–2766.
- Conde, C. & Cáceres, A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(5), pp.319–332.
- Cooper, G.M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*,
- Corden, J.L., 1990. Tails of RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences*, 15(10), pp.383–387.
- Crick, F.H.C., 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227(5258), pp.561–563.

- Crooks, G. et al., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, 14, pp.1188–1190.
- Debanne, D. et al., 2011. Axon physiology. *Physiological ...*, 91(2), pp.555–602.
- Deckert, J. et al., 2006. Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Molecular and cellular biology*, 26(14), pp.5528–43.
- Dehmelt, L. et al., 2003. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(29), pp.9479–9490.
- Denecke, J. et al., 2004. An Activated 5' Cryptic Splice Site in the Human ALG3 Gene Generates a Premature Termination Codon Insensitive to Nonsense-Mediated mRNA Decay in a New Case of Congenital Disorder of Glycosylation Type Id (CDG-Id). *Human Mutation*, 23(5), pp.477–486.
- Dent, E.W. et al., 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nature cell biology*, 9(12), pp.1347–1359.
- Dent, E.W. & Baas, P.W., 2014. Microtubules in neurons as information carriers. *Journal of Neurochemistry*, 129(2), pp.235–239.
- Derti, A. et al., 2012. A quantitative atlas of polyadenylation in five mammals. *Genome Research*, 22(6), pp.1173–1183.
- Dias, A.P. et al., 2010. A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains. *Nature Communications*, 1, p.97.
- Dunah, A.W., 2002. Sp1 and TAFII130 Transcriptional Activity Disrupted in Early Huntington's Disease. *Science*, 296(5576), pp.2238–2243.
- Elkon, R., Ugalde, A.P. & Agami, R., 2013. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), pp.496–506.
- Ellis, J.D. et al., 2012. Tissue-Specific Alternative Splicing Remodels Protein-Protein Interaction Networks. *Molecular Cell*, 46(6), pp.884–892.
- ENCODE Project et al., 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), pp.57–74.
- Etienne-Manneville, S., 2013. Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and*

Bibliografía

- developmental biology*, 29(July), pp.471–99.
- Evdokimova, V. et al., 2001. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO Journal*, 20(19), pp.5491–5502.
- Faber, P.W. et al., 1998. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Human Molecular Genetics*, 7(9), pp.1463–1474.
- Ferguson, N. et al., 2006. General structural motifs of amyloid protofilaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), pp.16248–16253.
- Ferguson, N. et al., 2003. Rapid amyloid fiber formation from the fast-folding WW domain FBP28. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), pp.9814–9819.
- Fidan, Z. et al., 2011. Chemical synthesis of the third WW domain of TCERG 1 by native chemical ligation. *Journal of Peptide Science*, 17(9), pp.644–649.
- Firat-Karalar, E.N. & Welch, M.D., 2011. New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, 23(1), pp.4–13.
- Fletcher, D.A. & Mullins, R.D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), pp.485–492.
- Flynn, K.C. et al., 2012. ADF/Cofilin-Mediated Actin Retrograde Flow Directs Neurite Formation in the Developing Brain. *Neuron*, 76(6), pp.1091–1107.
- Flynn K C, 2013. The cytoskeleton and neurite initiation. *BioArchitecture* .
- Franker, M.A.M. & Hoogenraad, C.C., 2013. Microtubule-based transport - basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *Journal of cell science*, 126(Pt 11), pp.2319–29.
- Fu, Z. et al., 2003. Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neuroligin and glutamate receptors. *Journal of neurophysiology*, 90(6), pp.3950–3957.
- Gao, M. et al., 2000. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro. *Molecular Cell*, 5(3), pp.479–488.
- Gardina, P.J. et al., 2006. Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC genomics*, 7, p.325.

- Gau, S.S.F. et al., 2012. Identification of two inherited copy number variants in a male with autism supports two-hit and compound heterozygosity models of autism. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 159 B(6), pp.710–717.
- Ge, Y. & Porse, B.T., 2014. The functional consequences of intron retention: Alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression. *BioEssays*, 36(3), pp.236–243.
- Gelev, V. et al., 2014. A new paradigm for transcription factor TFIIB functionality. *Scientific reports*, 4, p.3664.
- Goldstrohm, A.C. et al., 2001. The Transcription Elongation Factor CA150 Interacts with RNA Polymerase II and the Pre-mRNA Splicing Factor SF1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), pp.7617–7628.
- Graham, F.L. et al., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1), pp.59–74.
- Gupta, S. et al., 2007. Quantifying similarity between motifs. *Genome biology*, 8(2), p.R24.
- Ha, K.C., Coulombe-Huntington, J. & Majewski, J., 2009. Comparison of Affymetrix Gene Array with the Exon Array shows potential application for detection of transcript isoform variation. *BMC genomics*, 10(1), p.519.
- Han, J. et al., 2011. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends in Cell Biology*, 21(6), pp.336–343.
- He, B. & Soderlund, D.M., 2010. Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na^v 1.7 sodium channels. *Neuroscience letters*, 469(2), pp.268–272.
- Heidemann, M. et al., 2013. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), pp.55–62.
- Hemani, Y. & Soller, M., 2012. Mechanisms of Drosophila Dscam mutually exclusive splicing regulation. *Biochemical Society transactions*, 40(4), pp.804–9.
- Herrmann, H. et al., 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: From structure to assembly to gene ablation. *International Review*

Bibliografía

- of Cytology*, 223, pp.83–175.
- Hickey, M.A., 2013. Striatal atrophy and dendritic alterations in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Res Bull*, 87(6), pp.571–578.
- Holbert, S. et al., 2001. The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), pp.1811–6.
- Hotulainen, P. & Hoogenraad, C.C., 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*, 189(4), pp.619–629.
- Howard, J. & Hyman, A.A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422(6933), pp.753–758.
- Hsin, J. & Manley, J.L., 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes and Development*, pp.2119–2137.
- Huang, C.C. et al., 1998. Amyloid formation by mutant huntingtin: Threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 24(4), pp.217–233.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp.1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2008. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protocols*, 4(1), pp.44–57.
- Hutton, M. et al., 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 393(6686), pp.702–705.
- Ingham, R.J. et al., 2005. WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Molecular and cellular biology*, 25(16), pp.7092–7106.
- Irimia, M. et al., 2014. A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. *Cell*, 159(7), pp.1511–23.
- Jahan, N., Wimmer, E. & Mueller, S., 2011. A host-specific, temperature-sensitive translation defect determines the attenuation phenotype of a human rhinovirus/poliovirus chimera, PV1 (RIPO). *Journal of virology*, 85(14), pp.7225–

7235.

- Jaksik, R. et al., 2015. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biology direct*, 10, p.46.
- Janke, C., 2014. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions. *Journal of Cell Biology*, 206(4), pp.461–472.
- Jaworski, J. et al., 2009. Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 61(1), pp.85–100.
- Jia, J. et al., 2013. Regulation and dysregulation of 3'UTR-mediated translational control. *Current opinion in genetics & development*, 23(1), pp.29–34.
- Jin, Y., Yang, Y. & Zhang, P., 2011. New insights into RNA secondary structure in the alternative splicing of pre-mRNAs. *RNA Biology*, 8(3), pp.450–457.
- Jonkers, I., Kwak, H. & Lis, J.T., 2014. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *eLife*, 2014(3), pp.1–25.
- Jonkers, I. & Lis, J.T., 2015. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(3), pp.167–177.
- Jurica, M.S. et al., 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(4), pp.426–39.
- Kasai, H. et al., 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), pp.121–129.
- Kim, E., Goren, A. & Ast, G., 2008. Alternative splicing: Current perspectives. *BioEssays*, 30(1), pp.38–47.
- Kim, M.-S. et al., 2014. A draft map of the human proteome A. *Nature*, 509(7502), pp.575–581.
- Kim, S. et al., 2006. NGL family PSD-95–interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nature neuroscience*, 9(10), pp.1294–1301.
- Konarska, M.M., Padgett, R.A. & Sharp, P.A., 1984. Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell*, 38(3), pp.731–736.
- Koren, E., Lev-Maor, G. & Ast, G., 2007. The emergence of alternative 3' and 5' splice

Bibliografía

- site exons from constitutive exons. *PLoS computational biology*, 3(5), p.e95.
- Kornblihtt, A.R., 2005. Promoter usage and alternative splicing. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(3), pp.262–268.
- Krawczak, M., Reiss, J. & Cooper, D.N., 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: Causes and consequences. *Human Genetics*, 90(1–2), pp.41–54.
- Kroll, J.E. et al., 2012. SPLOOCE: A new portal for the analysis of human splicing variants. *RNA biology*, 9(11), pp.1339–43.
- Kulkarni, V. a. & Firestein, B.L., 2012. The dendritic tree and brain disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50(1), pp.10–20.
- de la Grange, P. et al., 2005. FAST DB: A website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Research*, 33(13), pp.4276–4284.
- de la Grange, P. et al., 2010. Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Research*, 38(9), pp.2825–2838.
- Lamond, A.I. & Spector, D.L., 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(8), pp.605–612.
- Lewis, J.D. & Izaurflde, E., 1997. The Role of the Cap Structure in RNA Processing and Nuclear Export. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), pp.461–469.
- Lianoglou, S. et al., 2013. Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression. *Genes and Development*, 27(21), pp.2380–2396.
- Licatalosi, D.D. & Darnell, R.B., 2006. Splicing Regulation in Neurologic Disease. *Neuron*, 52(1), pp.93–101.
- Lin, K.-T., Lu, R.-M. & Tarn, W.-Y., 2004. The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Molecular and cellular biology*, 24(20), pp.9176–9185.
- Liu, D. et al., 2007. Systematic variation in mRNA 3'-processing signals during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Research*, 35(1), pp.234–246.
- Liu, J. et al., 2013. Specific Interaction of the Transcription Elongation Regulator TCERG1 with RNA Polymerase II Requires Simultaneous Phosphorylation at

- Ser2, Ser5, and Ser7 within the Carboxyl-terminal Domain Repeat. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp.10890–10901.
- Lu, M. et al., 2009. Crystal structure of the three tandem FF domains of the transcription elongation regulator CA150. *Journal of molecular biology*, 393(2), pp.397–408.
- Luo, L., 2002. Actin Cytoskeleton Regulation in Neuronal Morphogenesis and Structural Plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 18, pp.601–35.
- Luo, Y.-B., Mastaglia, F.L. & Wilton, S.D., 2014. Normal and aberrant splicing of LMNA. *Journal of medical genetics*, 51(4), pp.215–23.
- Macias, M.J. et al., 1996. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, 382(6592), pp.646–649.
- Madhusudana, S.N., Sundaramoorthy, S. & Ullas, P.T., 2010. Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(12), pp.e1067–e1071.
- Mah, W. et al., 2010. Selected SALM (synaptic adhesion-like molecule) family proteins regulate synapse formation. *The Journal of Neuroscience*, 30(16), pp.5559–5568.
- Makarov, Evgeny M; Makarova, O. V, 2002. Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. *Science*, 298(2205).
- Maquat, L.E. et al., 1980. Processing of human beta-globin mRNA precursor to mRNA is defective in three patients with beta⁺-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 77(7), pp.4287–91.
- McFie, P.J. et al., 2006. Identification of a Co-repressor That Inhibits the Transcriptional and Growth-Arrest Activities of CCAAT/Enhancer-binding Protein . *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), pp.18069–18080.
- McGlinchy, N.J. & Smith, C.W.J., 2008. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends in Biochemical Sciences*, 33(8), pp.385–393.
- Meijering, E., 2010. Neuron tracing in perspective. *Cytometry Part A*, 77(7), pp.693–704.
- Melé, M. et al., 2015. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*,

Bibliografía

- 348(6235), p.660 LP-665.
- Merkhofer, E.C.. P.H.T.L.J., 2014. Introduction to Cotranscriptional RNA Splicing. *Methods Mol Biol*, 1126(310), pp.83–96.
- Meshorer, E. et al., 2004. Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), pp.29740–29751.
- Miller, N.J. et al., 2016. The Glutamine-Alanine Repeat Domain of TCERG1 is Required for the Inhibition of the Growth Arrest Activity of C/EBP α . *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(3), pp.612–620.
- Moazed, B. et al., 2011. TCERG1 Inhibits C/EBP α Through a Mechanism That Does Not Involve Sequestration of C/EBP α at Pericentromeric Heterochromatin. *J. Cell. Biochem*, 112, pp.2317–2326.
- Montes, M. et al., 2012. TCERG1 Regulates Alternative Splicing of the Bcl-x Gene by Modulating the Rate of RNA Polymerase II Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 32(4), pp.751–762.
- Nagasaki, H. et al., 2006. Automated classification of alternative splicing and transcriptional initiation and construction of visual database of classified patterns. *Bioinformatics*, 22(10), pp.1211–1216.
- Napolitano, G., Lania, L. & Majello, B., 2014. RNA Polymerase II CTD Modifications: How many tales from a single tail. *Journal of Cellular Physiology*, 229(5), pp.538–544.
- Neubauer, G. et al., 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature genetics*, 20(1), pp.46–50.
- Nguyen, H. et al., 2003. Tuning the free-energy landscape of a WW domain by temperature, mutation, and truncation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp.3948–3953.
- Niblock, M. & Gallo, J.-M., Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies.
- Nilsen, T.W. & Graveley, B.R., 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463(7280), pp.457–63.

- Otte, L. et al., 2003. WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Science*, 12, pp.491–500.
- Påhlman, S. et al., 1995. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 31(4), pp.453–458.
- Pak, C.W., Flynn, K.C. & Bamberg, J.R., 2008. Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(2), pp.136–47.
- Pan, Q. et al., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics*, 40(12), pp.1413–5.
- Parrish, J.Z. et al., 2007. Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30(August 2015), pp.399–423.
- Pearson, J.L. et al., 2008. Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), pp.7949–7961.
- Pedraza, N. et al., 2014. KIS, a Kinase Associated with Microtubule Regulators, Enhances Translation of AMPA Receptors and Stimulates Dendritic Spine Remodeling. *Journal of Neuroscience*, 34(42), pp.13988–13997.
- Pervouchine, D.D. et al., 2012. Evidence for widespread association of mammalian splicing and conserved long-range RNA structures. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(1), pp.1–15.
- Pohl, M. et al., 2013. Alternative splicing of mutually exclusive exons-A review. *BioSystems*, 114(1), pp.31–38.
- Porrua, O. & Libri, D., 2015. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(3), pp.190–202.
- Romano, M. et al., 2000. Functional characterization of the novel mutation IVS 8 (-11delC) (-14T>A) in the intron 8 of the glucocerebrosidase gene of two Italian siblings with Gaucher disease type I. *Blood cells, molecules & diseases*, 26(3), pp.171–176.
- Rozen, S. & Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. pp. 365–

Bibliografía

386.

- Rué, P. & Martínez Arias, A., 2015. Cell dynamics and gene expression control in tissue homeostasis and development. *Molecular systems biology*, 11(1), p.792.
- S. Ramon y Cajal, 1890. À quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moëlle épinière du poulet? *Anat Anz*, pp.21–22-39.
- Sainsbury, S., Bernecky, C. & Cramer, P., 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Publishing Group*, 16.
- Sakabe, N.J. & de Souza, S.J., 2007. Sequence features responsible for intron retention in human. *BMC genomics*, 8, pp.59–72.
- Sammeth, M., Foissac, S. & Guigó, R., 2008. A General Definition and Nomenclature for Alternative Splicing Events. *PLoS Computational Biology*, 4(8), p.e1000147.
- Sanchez-Alvarez, M. et al., 2006. 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. *Molecular and Cellular Biology*, 26(13), pp.4998–5014.
- Sánchez-Álvarez, M. et al., 2010. Differential effects of sumoylation on transcription and alternative splicing by transcription elongation regulator 1 (TCERG1). *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), pp.15220–15233.
- Sanchez-Alvarez, M., Sanchez-Hernandez, N. & Sune, C., 2011. Spatial Organization and Dynamics of Transcription Elongation and Pre-mRNA Processing in Live Cells. *Genet Res Int*, 2011, p.626081.
- Sanchez-Hernandez, N. et al., 2012. The FF4 and FF5 Domains of Transcription Elongation Regulator 1 (TCERG1) Target Proteins to the Periphery of Speckles. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), pp.17789–17800.
- Sandberg, R. et al., 2008. Proliferating Cells Express mRNAs with Shortened 3' Untranslated Regions and Fewer MicroRNA Target Sites. *Science*, 320(5883), pp.1643–1647.
- Scartezzini, P. et al., 1997. Cloning a new human gene from chromosome 21q22.3 encoding a glutamic acid-rich protein expressed in heart and skeletal muscle. *Human Genetics*, 99(3), pp.387–392.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the

- comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), pp.1101–1108.
- Schneider, C. a, Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675.
- Schwartz, S., Meshorer, E. & Ast, G., 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(9), pp.990–995.
- Scotti, M.M. & Swanson, M.S., 2015. RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews Genetics*, 17(1), pp.19–32.
- Sharp, P.A., 1994. Split Genes and RNA Splicing (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(12), pp.1229–1240.
- Shaw, G. et al., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB journal*, 16(8), pp.869–871.
- Shimohata, T. et al., 2000. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFIII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature genetics*, 26(1), pp.29–36.
- Shimohata, T., Onodera, O. & Tsuji, S., 2000. Interaction of expanded polyglutamine stretches with nuclear transcription factors leads to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases. *Neuropathology*, 20(4), pp.326–333.
- Shirao T, G.-B.C., 2013. Actin filaments and microtubules in dendritic spines. *J. Neurochem*, 126, pp.155–164.
- Smith, C.W.J., 2005. Alternative Splicing — When Two 's a Crowd. *October*, 123, pp.1–3.
- Smith, M.J., Kulkarni, S. & Pawson, T., 2004. FF Domains of CA150 Bind Transcription and Splicing Factors through Multiple Weak Interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), pp.9274–9285.
- Spritz, R.A. et al., 1981. Base substitution in an intervening sequence of a beta+-thalassemic human globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(4), pp.2455–9.
- Steffan, J.S. et al., 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), pp.6763–6768.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. & Aebi, U., 2003. Molecular architecture of intermediate

Bibliografía

- filaments. *BioEssays*, 25(3), pp.243–251.
- Stuart, G.J. & Spruston, N., 2015. Dendritic integration: 60 years of progress. *Nature Neuroscience*, 18(12), pp.1713–1721.
- Sultan, M. et al., 2008. A Global View of Gene Activity and Alternative Splicing by Deep Sequencing of the Human Transcriptome. , 685(August), pp.956–961.
- Suñé, C. et al., 1997. CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Molecular and cellular biology*, 17(10), pp.6029–39.
- Suñé, C. & Garcia-Blanco, M. a., 1999. Transcriptional Cofactor CA150 Regulates RNA Polymerase II Elongation in a TATA-Box-Dependent Manner. *Mol. Cell Biol.*, 19(7), pp.4719–4728.
- Supek, F. et al., 2011. Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7).
- Szeverenyi, I. et al., 2008. The human intermediate filament database: Comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Human Mutation*, 29(3), pp.351–360.
- Tartaglia, G.G. et al., 2008. Prediction of Aggregation-Prone Regions in Structured Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 380(2), pp.425–436.
- Tian, B. & Manley, J.L., 2016. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Tominaga, T. et al., 2002. The Rho GTPase effector protein, mDia, inhibits the DNA binding ability of the transcription factor Pax6 and changes the pattern of neurite extension in cerebellar granule cells through its binding to Pax6. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp.47686–47691.
- Tress, M.L., Abascal, F. & Valencia, A., 2016. Alternative Splicing May Not Be the Key to Proteome Complexity. *Trends in Biochemical Sciences*, xx, pp.1–13.
- Urbanska, M., Blazejczyk, M. & Jaworski, J., 2008. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68(2), pp.264–288.
- Uzman, A. et al., 2000. Molecular Cell Biology (4th edition) New York, NY, 2000, ISBN 0-7167-3136-3. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29, p.Section 1.2The Molecules of Life.

- Veloso, A. et al., 2014. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. , pp.896–905.
- Vetter, I. & Lewis, R.J., 2010. Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochemical pharmacology*, 79(6), pp.908–920.
- Viegas, L.R. et al., 2004. Steroid Hormones Induce bcl-X Gene Expression through Direct Activation of Distal Promoter P4. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), pp.9831–9839.
- Visa, N. et al., 1996. A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *Journal of Cell Biology*, 133(1), pp.5–14.
- Wahl, M.C., Will, C.L. & Lührmann, R., 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), pp.701–18.
- Wang, E.T. et al., 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. , 456(7221), pp.470–476.
- Wang, G.-S. & Cooper, T. a, 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, 8(october), pp.749–761.
- Wearne, S.L. et al., 2005. New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience*, 136(3), pp.661–680.
- Wegner, A., 1976. Head to tail polymerization of actin. *Journal of Molecular Biology*, 108(1), pp.139–150.
- Wiggin, G.R., Fawcett, J.P. & Pawson, T., 2005. Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Developmental Cell*, 8(6), pp.803–816.
- Woo, J. et al., 2009. Trans-synaptic adhesion between NGL-3 and LAR regulates the formation of excitatory synapses. *Nature neuroscience*, 12(4), pp.428–437.
- Xing, Y., Resch, A. & Lee, C., 2004. The multiassembly problems: Reconstructing multiple transcript isoforms from EST fragment mixtures. *Genome Research*, 14(3), pp.426–441.
- Xu, Q., Modrek, B. & Lee, C., 2002. Genome-wide detection of tissue-specific

Bibliografía

- alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic acids research*, 30(17), pp.3754–66.
- Yeo, G. et al., 2004. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biology*, 5(10), p.R74.
- Yeo, G.W. et al., 2009. An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 16(2), pp.130–137.
- Zhang, H., Lee, J.Y. & Tian, B., 2005. Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol*, 6(12), p.R100.
- Zhao, L. et al., 2008. Heart-specific isoform of tropomyosin4 is essential for heartbeat in zebrafish embryos. *Cardiovascular Research*, 80(2), pp.200–208.
- Zhou, Z. et al., 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419(6903), pp.182–185.
- Zhu, L. et al., 2009. Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. *BMC genomics*, 10(1), p.47.

Anexo I; Material suplementario



Anexo I; Material suplementario

Tabla A-1 Genes que cambian a nivel de transcripción. Cambio $\geq 1,5$, valor $P \leq 0,05$.

Símbolo del gen	Regulación	Cambio	Valor-P	Nombre del gen
<i>TCERG1</i>	disminuye	2,85	$8,9 \times 10^{-4}$	<i>transcription elongation regulator 1</i>
<i>UHMK1</i>	disminuye	2,85	$1,57 \times 10^{-3}$	<i>U2AF homology motif (UHM) kinase 1</i>
<i>AP3B2</i>	aumenta	2,51	$1,41 \times 10^{-2}$	<i>adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit</i>
<i>TFPI</i>	disminuye	2,29	$1,48 \times 10^{-2}$	<i>tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)</i>
<i>ITPK1</i>	aumenta	2,28	$8,68 \times 10^{-3}$	<i>inositol-tetrakisphosphate 1-kinase</i>
<i>KLHL15</i>	disminuye	2,24	$7,06 \times 10^{-3}$	<i>kelch-like 15 (Drosophila)</i>
<i>KPNA5</i>	disminuye	2,21	$4,63 \times 10^{-3}$	<i>karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)</i>
<i>SCG3</i>	aumenta	2,14	$3,38 \times 10^{-2}$	<i>secretogranin III</i>
<i>SYP</i>	aumenta	2,04	$2,22 \times 10^{-2}$	<i>synaptophysin</i>
<i>LIN28B</i>	disminuye	2,03	$2,45 \times 10^{-3}$	<i>lin⁻²⁸ homolog B (C. elegans)</i>
<i>RBM47</i>	disminuye	2,01	$7,83 \times 10^{-4}$	<i>RNA binding motif protein 47</i>
<i>TRIM6 / TRIM34</i>	disminuye	1,97	$3,1 \times 10^{-2}$	<i>tripartite motif containing 6 / tripartite motif containing 34</i>
<i>HIPK3</i>	disminuye	1,94	$1,97 \times 10^{-2}$	<i>homeodomain interacting protein kinase 3</i>
<i>TMEM145</i>	aumenta	1,93	$1,13 \times 10^{-2}$	<i>transmembrane protein 145</i>
<i>METTL7A</i>	disminuye	1,88	$4,9 \times 10^{-3}$	<i>methyltransferase like 7A</i>
<i>OR2H2</i>	disminuye	1,86	$2,69 \times 10^{-3}$	<i>olfactory receptor, family 2, subfamily H, member 2</i>
<i>MAL2</i>	disminuye	1,83	$2,57 \times 10^{-2}$	<i>mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)</i>
<i>EIF4G2</i>	disminuye	1,80	$1,66 \times 10^{-3}$	<i>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2</i>
<i>SUZ12</i>	disminuye	1,79	$1,75 \times 10^{-3}$	<i>suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)</i>
<i>RRAGD</i>	disminuye	1,77	$7,75 \times 10^{-3}$	<i>Ras-related GTP binding D</i>
<i>CPLX1</i>	aumenta	1,77	$3,94 \times 10^{-2}$	<i>complexin 1</i>
<i>PROS1</i>	disminuye	1,76	$2,31 \times 10^{-2}$	<i>protein S (alpha)</i>
<i>LUM</i>	disminuye	1,75	$1,42 \times 10^{-3}$	<i>lumican</i>
<i>SLC27A2</i>	disminuye	1,75	$1,26 \times 10^{-2}$	<i>solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2</i>
<i>ANXA1</i>	disminuye	1,75	$4,99 \times 10^{-2}$	<i>annexin A1</i>
<i>SLC16A7</i>	disminuye	1,73	$2,42 \times 10^{-2}$	<i>solute carrier family 16, member 7 (monocarboxylic acid transporter 2)</i>
<i>ANXA3</i>	disminuye	1,71	$9,77 \times 10^{-3}$	<i>annexin A3</i>
<i>FHL2</i>	disminuye	1,70	$4,46 \times 10^{-3}$	<i>four and a half LIM domains 2</i>
<i>CYP2D6</i>	aumenta	1,70	$8,86 \times 10^{-3}$	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6</i>
<i>TYROBP</i>	disminuye	1,70	$1,84 \times 10^{-2}$	<i>TYRO protein tyrosine kinase binding protein</i>
<i>GFRA1</i>	disminuye	1,70	$2,34 \times 10^{-2}$	<i>GDNF family receptor alpha 1</i>
<i>FGF5</i>	disminuye	1,70	$2,62 \times 10^{-2}$	<i>fibroblast growth factor 5</i>
<i>SLC25A24</i>	disminuye	1,68	$3,83 \times 10^{-2}$	<i>solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24</i>
<i>STMN3</i>	aumenta	1,68	$4,6 \times 10^{-2}$	<i>stathmin-like 3</i>
<i>ZNF678</i>	disminuye	1,68	$4,94 \times 10^{-2}$	<i>zinc finger protein 678</i>
<i>IFI44L</i>	disminuye	1,67	$1,64 \times 10^{-2}$	<i>interferon-induced protein 44-like</i>
<i>CYP2E1</i>	disminuye	1,67	$3,76 \times 10^{-2}$	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1</i>
<i>AMMECR1</i>	disminuye	1,65	$5,47 \times 10^{-3}$	<i>Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1</i>
<i>CDS1</i>	disminuye	1,65	$3,84 \times 10^{-2}$	<i>CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1</i>
<i>RB1</i>	disminuye	1,64	$1,14 \times 10^{-2}$	<i>retinoblastoma 1</i>
<i>ASF1A</i>	disminuye	1,64	$1,16 \times 10^{-2}$	<i>ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (S. cerevisiae)</i>
<i>ATP1A3</i>	aumenta	1,64	$2,9 \times 10^{-2}$	<i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 3 polypeptide</i>

Anexo I; Material suplementario

FAM83B	disminuye	1,64	$4,09 \times 10^{-2}$	family with sequence similarity 83, member B
FGF2	disminuye	1,63	$2,33 \times 10^{-2}$	fibroblast growth factor 2 (basic)
ZNF880	disminuye	1,63	$2,92 \times 10^{-2}$	zinc finger protein 880
UGT2B4	disminuye	1,63	$3,14 \times 10^{-2}$	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4
BROX	disminuye	1,62	$6,62 \times 10^{-4}$	BRO1 domain and CAAX motif containing
BSN	umenta	1,62	$1,09 \times 10^{-2}$	bassoon (presynaptic cytomatrix protein)
HOXB8	disminuye	1,62	$1,45 \times 10^{-2}$	homeobox B8
SMOX	umenta	1,62	$1,73 \times 10^{-2}$	spermine oxidase
PDLIM3	disminuye	1,62	$4,98 \times 10^{-2}$	PDZ and LIM domain 3
MLH1	disminuye	1,61	$7,38 \times 10^{-3}$	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
SLITRK3	disminuye	1,61	$1,37 \times 10^{-2}$	SLIT and NTRK-like family, member 3
MAPK8IP2	umenta	1,61	$1,79 \times 10^{-2}$	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2
HIP1	disminuye	1,60	$9,14 \times 10^{-4}$	huntingtin interacting protein 1
TRIM38	disminuye	1,60	$9,03 \times 10^{-3}$	tripartite motif containing 38
REEP3	disminuye	1,60	$1,41 \times 10^{-2}$	receptor accessory protein 3
SPOPL	disminuye	1,60	$1,52 \times 10^{-2}$	speckle-type POZ protein-like
ZNF329	disminuye	1,60	$2,77 \times 10^{-2}$	zinc finger protein 329
LEPR / LEPROT	disminuye	1,60	3×10^{-2}	leptin receptor / leptin receptor overlapping transcript
ZNF608	disminuye	1,59	$3,65 \times 10^{-3}$	zinc finger protein 608
OR1F1	disminuye	1,59	$8,8 \times 10^{-3}$	olfactory receptor, family 1, subfamily F, member 1
EFEMP1	disminuye	1,59	$2,46 \times 10^{-2}$	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
SMAD5	disminuye	1,59	$2,47 \times 10^{-2}$	SMAD family member 5
FRRS1	disminuye	1,59	$4,25 \times 10^{-2}$	ferric-chelate reductase 1
CCDC50	disminuye	1,58	$2,2 \times 10^{-3}$	coiled-coil domain containing 50
SAMD9	disminuye	1,58	$4,5 \times 10^{-3}$	sterile alpha motif domain containing 9
HOXB2	disminuye	1,58	$6,29 \times 10^{-3}$	homeobox B2
GPR126	disminuye	1,58	$1,58 \times 10^{-2}$	G protein-coupled receptor 126
FOXF2	umenta	1,58	$1,66 \times 10^{-2}$	forkhead box F2
NUP35	disminuye	1,58	$3,12 \times 10^{-2}$	nucleoporin 35kDa
HLA-DRB5	disminuye	1,58	$3,96 \times 10^{-2}$	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
RASSF5	disminuye	1,58	$4,09 \times 10^{-2}$	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5
SLCO4C1	disminuye	1,57	$1,24 \times 10^{-2}$	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1
PALMD	disminuye	1,57	$1,38 \times 10^{-2}$	palmdelphin
HIST1H2BN	disminuye	1,57	$2,06 \times 10^{-2}$	histone cluster 1, H2bn
CRBN	disminuye	1,57	$2,18 \times 10^{-2}$	cereblon
PPCS	disminuye	1,57	$3,06 \times 10^{-2}$	phosphopantothencycysteine synthetase
KCNQ1OT1	disminuye	1,57	$3,85 \times 10^{-2}$	KCNQ1 overlapping transcript 1 (non-protein coding)
STEAP1B	disminuye	1,57	$4,02 \times 10^{-2}$	STEAP family member 1B
TUBB2B	umenta	1,56	1×10^{-4}	tubulin, beta 2B
CLOCK	disminuye	1,56	$1,43 \times 10^{-3}$	clock homolog (mouse)
AES	disminuye	1,56	$1,92 \times 10^{-2}$	amino-terminal enhancer of split
UIMC1	disminuye	1,56	$3,97 \times 10^{-2}$	ubiquitin interaction motif containing 1
HERC6	disminuye	1,56	$4,86 \times 10^{-2}$	hect domain and RLD 6
ATG4C	disminuye	1,56	$4,9 \times 10^{-2}$	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)
ITPRIPL2	disminuye	1,55	$2,42 \times 10^{-3}$	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2
FOXP2	disminuye	1,55	$1,28 \times 10^{-2}$	forkhead box P2
RBM44	disminuye	1,55	$2,96 \times 10^{-2}$	RNA binding motif protein 44
RYR2	disminuye	1,55	$3,33 \times 10^{-2}$	ryanodine receptor 2 (cardiac)
RPRM	disminuye	1,54	$1,11 \times 10^{-4}$	reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate

Anexo I; Material suplementario

SLC30A7	disminuye	1,54	$9,85 \times 10^{-3}$	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7</i>
MAP7	disminuye	1,54	$1,74 \times 10^{-2}$	<i>microtubule-associated protein 7</i>
SLC2A12	disminuye	1,54	$1,84 \times 10^{-2}$	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12</i>
HOXB6	disminuye	1,54	$2,05 \times 10^{-2}$	<i>homeobox B6</i>
CASP7	disminuye	1,53	$4,64 \times 10^{-3}$	<i>caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
MAD2L1	disminuye	1,53	$1,68 \times 10^{-2}$	<i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)</i>
SUPT3H	disminuye	1,53	$3,04 \times 10^{-2}$	<i>suppressor of Ty 3 homolog (S. cerevisiae)</i>
SEMA3C	disminuye	1,53	$4,41 \times 10^{-2}$	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C</i>
MRII	umenta	1,52	$1,94 \times 10^{-3}$	<i>methylthioribose-1-phosphate isomerase homolog (S. cerevisiae)</i>
KIF20A	disminuye	1,52	$7,22 \times 10^{-3}$	<i>kinesin family member 20A</i>
KCNQ2	umenta	1,52	$9,24 \times 10^{-3}$	<i>potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2</i>
ITGAV	disminuye	1,52	$1,07 \times 10^{-2}$	<i>integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)</i>
PAFAH1B2	disminuye	1,52	$1,35 \times 10^{-2}$	<i>platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 2 (30kDa)</i>
LYPD1	disminuye	1,52	$1,87 \times 10^{-2}$	<i>LY6/PLAUR domain containing 1</i>
SCML1	disminuye	1,52	$2,19 \times 10^{-2}$	<i>sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)</i>
CHST9	disminuye	1,52	$3,42 \times 10^{-2}$	<i>carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 9</i>
PTPDC1	disminuye	1,52	$4,06 \times 10^{-2}$	<i>protein tyrosine phosphatase domain containing 1</i>
HOXB7	disminuye	1,52	$4,14 \times 10^{-2}$	<i>homeobox B7</i>
GNG4	umenta	1,52	$4,68 \times 10^{-2}$	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4</i>
ACPL2	disminuye	1,51	$6,25 \times 10^{-3}$	<i>acid phosphatase-like 2</i>
SLC9A2	disminuye	1,51	$7,96 \times 10^{-3}$	<i>solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 2</i>
FBXW11	disminuye	1,51	$8,19 \times 10^{-3}$	<i>F-box and WD repeat domain containing 11</i>
HSD17B11	disminuye	1,51	$8,58 \times 10^{-3}$	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11</i>
MRM1	umenta	1,51	$1,05 \times 10^{-2}$	<i>mitochondrial rRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae)</i>
KBTBD8	disminuye	1,51	$1,19 \times 10^{-2}$	<i>kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8</i>
TMED5	umenta	1,51	$1,21 \times 10^{-2}$	<i>transmembrane emp24 protein transport domain containing 5</i>
SLC4A7	disminuye	1,51	$3,14 \times 10^{-2}$	<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7</i>
DNAH1	disminuye	1,51	$3,16 \times 10^{-2}$	<i>dynein, axonemal, heavy chain 1</i>
ABHD14B	umenta	1,51	$3,2 \times 10^{-2}$	<i>abhydrolase domain containing 14B</i>
HIST1H4E	disminuye	1,51	$3,58 \times 10^{-2}$	<i>histone cluster 1, H4e</i>
S100A11	disminuye	1,51	$3,67 \times 10^{-2}$	<i>S100 calcium binding protein A11</i>
PDIK1L	disminuye	1,51	$3,7 \times 10^{-2}$	<i>PDLIM1 interacting kinase 1 like</i>
LMO3	disminuye	1,51	$4,11 \times 10^{-2}$	<i>LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)</i>
NOL8	disminuye	1,50	$4,92 \times 10^{-4}$	<i>nucleolar protein 8</i>
FAM73A	disminuye	1,50	$2,03 \times 10^{-2}$	<i>family with sequence similarity 73, member A</i>
C1orf115	disminuye	1,50	$3,68 \times 10^{-2}$	<i>chromosome 1 open reading frame 115</i>
RAB23	disminuye	1,50	$4,23 \times 10^{-2}$	<i>RAB23, member RAS oncogene family</i>

Tabla A-2 Genes que cambian a nivel de *splicing*. Cambio $\geq 1,5$, valor $P \leq 0,05$.

Símbolo del gen	Exón detectado	Evento alternativo	Regulación del IS	Cambio IS	Valor-P IS	Nombre del gen
ACADVL	ae11	Retención de intrón	disminuye	2,70	1,07 x 10 ⁻³	<i>acyl-CoA dehydrogenase, very long chain</i>
TMEM39A	e5	Exón casete	disminuye	2,70	6,55 x 10 ⁻³	<i>transmembrane protein 39A</i>
CEP57	e2	Exón casete	disminuye	2,52	1,27 x 10 ⁻²	<i>centrosomal protein 57</i>
TFPI	e3	Primer exón alternativo	aumenta	2,51	1,16 x 10 ⁻²	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
SV2A	ae12	PAS alternativo	disminuye	2,49	1,61 x 10 ⁻²	<i>synaptic vesicle glycoprotein 2A</i>
TMED10	ae6	5'ss alternativo	aumenta	2,48	3,91 x 10 ⁻²	<i>transmembrane p24 trafficking protein 10</i>
EPS15	e12	PAS alternativo	aumenta	2,39	3,5 x 10 ⁻²	<i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 15</i>
GLUL	e2	Primer exón alternativo, Exón casete	aumenta	2,33	2,58 x 10 ⁻³	<i>glutamate-ammonia ligase</i>
PHF6	ae8	PAS alternativo	aumenta	2,33	5,23 x 10 ⁻³	<i>PHD finger protein 6</i>
POLI	e7	Exón casete	disminuye	2,31	1,64 x 10 ⁻²	<i>DNA polymerase iota</i>
RNASET2	ae7	3'ss alternativo	aumenta	2,28	2,31 x 10 ⁻²	<i>ribonuclease T2</i>
DOCK9	ae37	PAS alternativo	aumenta	2,27	2,77 x 10 ⁻²	<i>dedicator of cytokinesis 9</i>
RBM6	ae16	Retención de intrón	aumenta	2,26	1,66 x 10 ⁻²	<i>RNA binding motif protein 6</i>
PKM2	e13	Exón casete	disminuye	2,23	5,37 x 10 ⁻³	<i>Pyruvate Kinase, Muscle</i>
ARHGAP17	ae10	Primer exón alternativo	aumenta	2,22	1,78 x 10 ⁻²	<i>Rho GTPase activating protein 17</i>
VDAC3	ae8	PAS alternativo	aumenta	2,19	4,6 x 10 ⁻²	<i>voltage dependent anion channel 3</i>
ZBED5	e4	Desconocido	aumenta	2,15	1,71 x 10 ⁻²	<i>zinc finger BED-type containing 5</i>
AGPAT9	e9	Desconocido	disminuye	2,14	1,06 x 10 ⁻²	<i>Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 3</i>
TMX1	ae3	PAS alternativo	aumenta	2,14	1,08 x 10 ⁻²	<i>thioredoxin related transmembrane protein 1</i>
PDLIM3	e5	Primer exón alternativo	aumenta	2,13	8,04 x 10 ⁻³	<i>PDZ and LIM domain 3</i>
NCOR1	ae45	PAS alternativo	aumenta	2,13	4,48 x 10 ⁻²	<i>nuclear receptor corepressor 1</i>
TCERG1	ae13	Primer exón alternativo	aumenta	2,09	2,48 x 10 ⁻³	<i>transcription elongation regulator 1</i>
C16orf95	ae2	Desconocido	disminuye	2,09	4,98 x 10 ⁻²	<i>chromosome 16 open reading frame 95</i>
EIF4G2	ae3	Primer exón alternativo	aumenta	2,08	2,49 x 10 ⁻³	<i>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>
DCAF6	ae16	Primer exón alternativo	aumenta	2,05	9,77 x 10 ⁻³	<i>DDB1 and CUL4 associated factor 6</i>
ATM	ae28	Primer exón alternativo	aumenta	2,05	1,99 x 10 ⁻²	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
SCG3	e5	Desconocido	aumenta	2,04	3,1 x 10 ⁻²	<i>secretogranin III</i>
PMM2	e9	Desconocido	aumenta	2,03	8,58 x 10 ⁻³	<i>phosphomannomutase 2</i>
LPCAT1	e13	Primer exón alternativo	aumenta	2,03	3,16 x 10 ⁻²	<i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</i>
ZMIZ2	ae19	3'ss alternativo	disminuye	2,02	4,42 x 10 ⁻³	<i>zinc finger MIZ-type containing 2</i>
HMCN1	e59	Desconocido	aumenta	2,02	4,95 x 10 ⁻²	<i>hemicentin 1</i>

<i>NR2C2</i>	ae1	Primer exón alternativo	umenta	1,99	$8,58 \times 10^{-3}$ nuclear receptor subfamily 2 group C member 2
<i>U2SURP</i>	ae15	Primer exón alternativo	umenta	1,99	$3,94 \times 10^{-2}$ U2 snRNP associated SURP domain containing
<i>ERBB2IP</i>	e22	Exón casete	disminuye	1,98	$7,12 \times 10^{-3}$ ErbB2 Interacting Protein
<i>DOPEY1</i>	ae11	PAS alternativo	umenta	1,98	$1,01 \times 10^{-2}$ dopey family member 1
<i>TAF11</i>	ae4	Retención de intrón	umenta	1,98	$3,53 \times 10^{-2}$ TATA-box binding protein associated factor 11
<i>LRRFIP1</i>	e19	Exón casete	disminuye	1,96	$1,66 \times 10^{-2}$ LRR binding FLII interacting protein 1
<i>ZZEF1</i>	ae48	Retención de intrón	umenta	1,95	$2,55 \times 10^{-3}$ zinc finger ZZ-type and EF-hand domain containing 1
<i>FAM126B</i>	ae8	Primer exón alternativo	umenta	1,95	$1,59 \times 10^{-2}$ family with sequence similarity 126 member B
<i>ERBB2IP</i>	e23	Exón casete	disminuye	1,95	$1,84 \times 10^{-2}$ ErbB2 Interacting Protein
<i>CDH1</i>	e7	Exón casete	umenta	1,95	$2,25 \times 10^{-2}$ cadherin 1
<i>MMS22L</i>	ae7	Exón casete	umenta	1,95	$2,44 \times 10^{-2}$ MMS22 like, DNA repair protein
<i>CKAP5</i>	ae26	Primer exón alternativo	umenta	1,95	$3,11 \times 10^{-2}$ cytoskeleton associated protein 5
<i>FAM113A</i>	ae6	Retención de intrón	disminuye	1,94	$1,13 \times 10^{-3}$ PC-Esterase Domain Containing 1A
<i>U2SURP</i>	ae12	PAS alternativo	umenta	1,94	$4,19 \times 10^{-3}$ U2 snRNP associated SURP domain containing
<i>CCDC150</i>	e21	Exón casete	umenta	1,94	$3,91 \times 10^{-2}$ coiled-coil domain containing 150
<i>ALDH18A1</i>	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,94	$4,01 \times 10^{-2}$ aldehyde dehydrogenase 18 family member A1
<i>EIF4G2</i>	ae6	Retención de intrón	umenta	1,93	2×10^{-3} eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2
<i>ZDHHC6</i>	ae3	Retención de intrón	umenta	1,93	$2,09 \times 10^{-2}$ zinc finger DHHC-type containing 6
<i>PPP4R1L</i>	ae16	PAS alternativo	umenta	1,93	$2,76 \times 10^{-2}$ Protein Phosphatase 4 Regulatory Subunit 1 Like (Pseudogene)
<i>CPLX1</i>	e4	Desconocido	disminuye	1,93	$3,27 \times 10^{-2}$ complexin 1
<i>ACPL2</i>	e3	Exón casete	umenta	1,93	$3,76 \times 10^{-2}$ 2-Phosphoxylose Phosphatase 1
<i>MCOLN3</i>	ae9	Primer exón alternativo	umenta	1,92	$1,15 \times 10^{-2}$ mucolipin 3
<i>CCPG1 / DYX1C1</i>	e6	Desconocido	umenta	1,92	$1,88 \times 10^{-2}$ Cell Cycle Progression 1 / Dyslexia Susceptibility 1 Candidate 1
<i>PTPRF</i>	ae15	Primer exón alternativo	disminuye	1,92	$3,78 \times 10^{-2}$ protein tyrosine phosphatase, receptor type F
<i>AKAP8L</i>	e10	Exón casete	umenta	1,91	$1,16 \times 10^{-3}$ A-kinase anchoring protein 8 like
<i>FHL2</i>	e4	Exón casete	umenta	1,91	$1,77 \times 10^{-2}$ four and a half LIM domains 2
<i>SCG3</i>	e4	Desconocido	umenta	1,91	$3,27 \times 10^{-2}$ secretogranin III
<i>VIM</i>	ae7	Retención de intrón	disminuye	1,90	$1,37 \times 10^{-3}$ vimentin
<i>MLLT6</i>	ae10	PAS alternativo	disminuye	1,90	$1,34 \times 10^{-2}$ MLLT6, PHD finger domain containing
<i>DCAF8</i>	ae13	PAS alternativo	disminuye	1,90	$1,64 \times 10^{-2}$ DDB1 and CUL4 associated factor 8
<i>DNAJC24</i>	ae5	PAS alternativo	umenta	1,90	$3,9 \times 10^{-2}$ DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C24
<i>PPP1R12A</i>	ae26	3'ss alternativo	umenta	1,89	$2,69 \times 10^{-3}$ protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A
<i>USP40</i>	e3	Desconocido	disminuye	1,89	$2,51 \times 10^{-2}$ ubiquitin specific peptidase 40
<i>FAM73A</i>	ae10	Retención de intrón	umenta	1,88	$2,18 \times 10^{-2}$ Mitoguardin 1
<i>MRPL44</i>	ae1	Primer exón alternativo	disminuye	1,88	$3,59 \times 10^{-2}$ mitochondrial ribosomal protein L44
<i>CWC25</i>	ae6	5'ss alternativo	umenta	1,87	$1,37 \times 10^{-2}$ CWC25 spliceosome associated protein homolog

<i>SLC20A1</i>	ae6	Primer exón alternativo	umenta	1,87	1,61 x 10 ⁻² <i>solute carrier family 20 member 1</i>
<i>HMGB2</i>	ae3	Retención de intrón	umenta	1,87	4,43 x 10 ⁻² <i>high mobility group box 2</i>
<i>TCTN1</i>	e5	Exón casete	umenta	1,86	9,5 x 10 ⁻³ <i>tectonic family member 1</i>
<i>ABCB6</i>	e29	Desconocido	umenta	1,86	9,9 x 10 ⁻³ <i>ATP binding cassette subfamily B member 6 (Langereis blood group)</i>
<i>U2SURP</i>	e14	Exón casete	umenta	1,86	2,69 x 10 ⁻² <i>U2 snRNP associated SURP domain containing</i>
<i>PDE1A</i>	e5	Primer exón alternativo	umenta	1,86	3,21 x 10 ⁻² <i>phosphodiesterase 1A</i>
<i>DNAH14</i>	e7	PAS alternativo	umenta	1,85	7,36 x 10 ⁻³ <i>dynein axonemal heavy chain 14</i>
<i>LRRC7</i>	e25	Desconocido	umenta	1,84	3,26 x 10 ⁻³ <i>LDL receptor related protein 2</i>
<i>VIM</i>	ae8	Retención de intrón	disminuye	1,84	7,52 x 10 ⁻³ <i>vimentin</i>
<i>FIP1L1</i>	ae2	Retención de intrón	umenta	1,84	9,71 x 10 ⁻³ <i>factor interacting with PAPOLA and CPSF1</i>
<i>RALGAPA1</i>	ae24	PAS alternativo	umenta	1,84	1,7 x 10 ⁻² <i>Ral GTPase activating protein catalytic alpha subunit 1</i>
<i>RBM47</i>	e7	3'ss alternativo	umenta	1,83	5,22 x 10 ⁻³ <i>RNA binding motif protein 47</i>
<i>MSH4</i>	e16	Desconocido	umenta	1,83	3,07 x 10 ⁻² <i>mutS homolog 4</i>
<i>BAGE / BAGE2 / 3 / 4 / 5</i>	e7	Desconocido	disminuye	1,83	3,99 x 10 ⁻² <i>B Melanoma Antigen / B Melanoma Antigen Family Member 2 / 3 / 4 / 5</i>
<i>SCML1</i>	ae2	Retención de intrón	umenta	1,83	4,33 x 10 ⁻² <i>sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)</i>
<i>AKAP8L</i>	ae8	PAS alternativo	umenta	1,82	1,4 x 10 ⁻⁴ <i>A-kinase anchoring protein 8 like</i>
<i>USP21</i>	ae10	Retención de intrón	disminuye	1,82	7,07 x 10 ⁻³ <i>ubiquitin specific peptidase 21</i>
<i>CYP2E1</i>	ae1	Primer exón alternativo	umenta	1,82	1,06 x 10 ⁻² <i>cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1</i>
<i>FAM83B</i>	ae1	Primer exón alternativo	umenta	1,82	4,05 x 10 ⁻² <i>family with sequence similarity 83 member B</i>
<i>CLASP2</i>	e21	PAS alternativo	umenta	1,82	4,82 x 10 ⁻² <i>cytoplasmic linker associated protein 2</i>
<i>TRO</i>	ae9	Retención de intrón	umenta	1,81	2,28 x 10 ⁻³ <i>trophinin</i>
<i>SGK3</i>	e3	Primer exón alternativo	umenta	1,81	1,93 x 10 ⁻² <i>serum/glucocorticoid regulated kinase family member 3</i>
<i>TMEM219</i>	e3	Primer exón alternativo	umenta	1,81	2,54 x 10 ⁻² <i>transmembrane protein 219</i>
<i>SBF2</i>	e30	Primer exón alternativo, Exón casete	umenta	1,80	3,7 x 10 ⁻³ <i>SET binding factor 2</i>
<i>MBOAT7</i>	ae6	Retención de intrón	disminuye	1,80	3,84 x 10 ⁻³ <i>membrane bound O-acyltransferase domain containing 7</i>
<i>BC043601</i>	e6	PAS alternativo	umenta	1,80	2,92 x 10 ⁻² ---
<i>HMCN1</i>	e2	Desconocido	umenta	1,80	4,7 x 10 ⁻² <i>hemicentin 1</i>
<i>RASGRF2</i>	ae4	Primer exón alternativo	umenta	1,79	7,06 x 10 ⁻² <i>Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 2</i>
<i>METTL17</i>	ae10	Retención de intrón	disminuye	1,79	6,4 x 10 ⁻³ <i>methyltransferase like 17</i>
<i>DDX56</i>	ae8	5'ss alternativo	disminuye	1,79	7,5 x 10 ⁻³ <i>DEAD-box helicase 56</i>
<i>CUL4B</i>	ae16	Retención de intrón	disminuye	1,79	1,14 x 10 ⁻² <i>cullin 4B</i>
<i>TYROBP</i>	e3	Desconocido	umenta	1,79	1,28 x 10 ⁻² <i>TYRO protein tyrosine kinase binding protein</i>
<i>HIPK3</i>	e3	Primer exón alternativo	umenta	1,79	3,6 x 10 ⁻² <i>homeodomain interacting protein kinase 3</i>
<i>FXR1</i>	e18	Exón casete	disminuye	1,79	4,87 x 10 ⁻² <i>FMR1 autosomal homolog 1</i>
<i>FNDC3B</i>	e4	PAS alternativo	umenta	1,78	2,95 x 10 ⁻² <i>fibronectin type III domain containing 3B</i>

<i>TRIM38</i>	ae6	Retención de intrón	umenta	1,77	1,11 x 10 ⁻² tripartite motif containing 38
<i>MCM3</i>	e5	PAS alternativo	umenta	1,77	2,17 x 10 ⁻² minichromosome maintenance complex component 3
<i>MYBL2</i>	ae9	PAS alternativo	disminuye	1,77	2,17 x 10 ⁻² MYB proto-oncogene like 2
<i>HNRNPC</i>	ae10	Retención de intrón	disminuye	1,76	6,38 x 10 ⁻³ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
<i>FAM40B</i>	ae13	5'ss alternativo	umenta	1,76	2,09 x 10 ⁻² Striatin Interacting Protein 2
<i>STARD13</i>	e6	Primer exón alternativo	umenta	1,76	3,73 x 10 ⁻² StAR related lipid transfer domain containing 13
<i>MREG</i>	e11	Desconocido	disminuye	1,75	1,03 x 10 ⁻² melanoregulin
<i>FHL2</i>	ae8	3'ss alternativo	umenta	1,75	1,15 x 10 ⁻² four and a half LIM domains 2
<i>MAPK9</i>	ae10	PAS alternativo	disminuye	1,75	1,93 x 10 ⁻² mitogen-activated protein kinase 9
<i>CALCOCO1</i>	ae15	3'ss alternativo	umenta	1,75	2,09 x 10 ⁻² calcium binding and coiled-coil domain 1
<i>DENND4C</i>	ae16	Retención de intrón	umenta	1,75	3,86 x 10 ⁻² DENN domain containing 4C
<i>UBE3B</i>	e22	Exón casete	disminuye	1,74	2,14 x 10 ⁻³ ubiquitin protein ligase E3B
<i>KPNA5</i>	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,74	1,67 x 10 ⁻² karyopherin subunit alpha 5
<i>PHF6</i>	ae10	Retención de intrón	disminuye	1,74	2,54 x 10 ⁻² PHD finger protein 6
<i>SLC19A3</i>	e3	Exón casete	umenta	1,74	3,17 x 10 ⁻² solute carrier family 19 member 3
<i>AKAP6</i>	e7	Desconocido	umenta	1,73	7,22 x 10 ⁻³ A-kinase anchoring protein 6
<i>POLR3H</i>	ae6	5'ss alternativo	umenta	1,73	2 x 10 ⁻² RNA polymerase III subunit H
<i>PCDP1</i>	e17	Desconocido	umenta	1,73	2,04 x 10 ⁻² paired box 6
<i>TMEM150C</i>	ae2	Primer exón alternativo	umenta	1,73	3,91 x 10 ⁻² transmembrane protein 150C
<i>ARL5A</i>	e8	Desconocido	umenta	1,72	5,16 x 10 ⁻³ ADP ribosylation factor like GTPase 5A
<i>REPS1</i>	ae16	5'ss alternativo	umenta	1,72	5,56 x 10 ⁻³ RALBP1 associated Eps domain containing 1
<i>ZC3H11A</i>	ae3	Primer exón alternativo	umenta	1,72	9,16 x 10 ⁻³ zinc finger CCCH-type containing 11A
<i>ACPL2</i>	e2	Exón casete	umenta	1,72	1,1 x 10 ⁻² 2-Phosphoxylose Phosphatase 1
<i>ACAT1</i>	e6	PAS alternativo	umenta	1,72	1,79 x 10 ⁻² acetyl-CoA acetyltransferase 1
<i>AKAP9</i>	ae40	PAS alternativo	umenta	1,72	2,32 x 10 ⁻² A-kinase anchoring protein 9
<i>ZNRF3</i>	e2	Primer exón alternativo	umenta	1,71	2,66 x 10 ⁻³ zinc and ring finger 3
<i>C22orf29</i>	e2	PAS alternativo	umenta	1,71	9,23 x 10 ⁻³ chromosome 22 open reading frame 29
<i>POGLUT1</i>	ae6	3'ss alternativo	umenta	1,71	1,2 x 10 ⁻² protein O-glucosyltransferase 1
<i>AP1S2</i>	e7	PAS alternativo	disminuye	1,71	2,78 x 10 ⁻² adaptor related protein complex 1 sigma 2 subunit
<i>PSMD11</i>	ae13	Retención de intrón	disminuye	1,71	3,03 x 10 ⁻² proteasome 26S subunit, non-ATPase 11
<i>ZMYM5</i>	ae3	PAS alternativo	umenta	1,70	2,82 x 10 ⁻³ zinc finger MYM-type containing 5
<i>VAMP4</i>	ae6	Primer exón alternativo	umenta	1,70	3,03 x 10 ⁻³ vesicle associated membrane protein 4
<i>MPP6</i>	e2	Exón casete	disminuye	1,70	3,49 x 10 ⁻³ membrane palmitoylated protein 6
<i>STAT2</i>	e13	Desconocido	disminuye	1,70	2,55 x 10 ⁻² signal transducer and activator of transcription 2
<i>TMEM175</i>	ae11	PAS alternativo	disminuye	1,70	3,07 x 10 ⁻² transmembrane protein 175
<i>TMEM175</i>	e12	PAS alternativo	disminuye	1,70	3,59 x 10 ⁻² transmembrane protein 175

<i>GUSBP1</i>	e11	PAS alternativo	aumenta	1,70	4,13 x 10 ⁻² glucuronidase, beta pseudogene 1
<i>TPP1</i>	ae5	Retención de intrón	disminuye	1,70	4,99 x 10 ⁻² tripeptidyl peptidase 1
<i>TROAP</i>	ae14	Retención de intrón	disminuye	1,69	1,45 x 10 ⁻² trophinin associated protein
<i>UBR2</i>	e13	PAS alternativo	aumenta	1,69	1,65 x 10 ⁻² ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2
<i>C9orf5</i>	ae9	5'ss alternativo	aumenta	1,69	1,71 x 10 ⁻² Chromosome 9 Open Reading Frame 5
<i>PCLO</i>	e17	Exón casete	disminuye	1,69	2,21 x 10 ⁻² piccolo presynaptic cytomatrix protein
<i>KLHDC1</i>	e10	Desconocido	aumenta	1,69	4,07 x 10 ⁻² kelch domain containing 1
<i>DIS3L2</i>	e16	Exón casete	aumenta	1,68	2,82 x 10 ⁻³ DIS3 like 3'-5' exoribonuclease 2
<i>TH1L</i>	ae5	Retención de intrón	disminuye	1,68	3,44 x 10 ⁻² Negative Elongation Factor Complex Member C/D
<i>UBAP2</i>	ae4	PAS alternativo	aumenta	1,68	4,57 x 10 ⁻² ubiquitin associated protein 2
<i>ELP2</i>	e6	Exón casete	aumenta	1,68	4,63 x 10 ⁻² elongator acetyltransferase complex subunit 2
<i>RBM25</i>	ae15	Primer exón alternativo	aumenta	1,67	8,39 x 10 ⁻³ RNA binding motif protein 25
<i>PYGM</i>	e7	5'ss alternativo	aumenta	1,67	1,89 x 10 ⁻² phosphorylase, glycogen, muscle
<i>USP48</i>	ae12	Primer exón alternativo	aumenta	1,67	2,03 x 10 ⁻² ubiquitin specific peptidase 48
<i>DNMT3B</i>	e23	Exón casete	disminuye	1,67	2,44 x 10 ⁻² DNA methyltransferase 3 beta
<i>CLOCK</i>	e2	Primer exón alternativo	aumenta	1,67	2,89 x 10 ⁻² clock circadian regulator
<i>GPAM</i>	ae20	Retención de intrón	aumenta	1,67	3,44 x 10 ⁻² glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
<i>MARK2</i>	e17	Exón casete	aumenta	1,67	4,07 x 10 ⁻² microtubule affinity regulating kinase 2
<i>CACNA1C</i>	e37	Exón casete	aumenta	1,66	5,9 x 10 ⁻³ calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C
<i>CAPRN2</i>	ae14	Retención de intrón	aumenta	1,66	8,01 x 10 ⁻³ caprin family member 2
<i>EFCAB14</i>	e7	Exón casete	disminuye	1,66	1,42 x 10 ⁻² EF-hand calcium binding domain 14
<i>LRRC7</i>	e23	Desconocido	aumenta	1,66	2,02 x 10 ⁻² leucine rich repeat containing 7
<i>EIF4G2</i>	ae11	Retención de intrón	aumenta	1,66	2,35 x 10 ⁻² eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2
<i>SLC22A5</i>	ae3	Retención de intrón	aumenta	1,66	2,46 x 10 ⁻² solute carrier family 22 member 5
<i>PCLO</i>	e19	Desconocido	aumenta	1,66	3,46 x 10 ⁻² piccolo presynaptic cytomatrix protein
<i>CTSL2</i>	ae10	PAS alternativo	aumenta	1,66	4,1 x 10 ⁻² Cathepsin V
<i>WNK1</i>	e11	Exón casete	disminuye	1,65	1,75 x 10 ⁻³ WNK lysine deficient protein kinase 1
<i>LEPROT</i>	e6	PAS alternativo	aumenta	1,65	3,06 x 10 ⁻³ leptin receptor overlapping transcript
<i>SLC12A6</i>	ae25	5'ss alternativo	aumenta	1,65	5,6 x 10 ⁻³ solute carrier family 12 member 6
<i>CALU</i>	e5	Exón casete	aumenta	1,65	7,6 x 10 ⁻³ calumenin
<i>EIF4G2</i>	ae5	Retención de intrón	aumenta	1,65	2,12 x 10 ⁻² eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2
<i>CHURC1</i>	e5	PAS alternativo	aumenta	1,65	4,51 x 10 ⁻² churchill domain containing 1
<i>SPAG5</i>	e6	Exón casete	aumenta	1,64	1,27 x 10 ⁻³ sperm associated antigen 5
<i>LEPROT</i>	e5	Exón casete	aumenta	1,64	5,16 x 10 ⁻³ leptin receptor overlapping transcript
<i>RYR2</i>	e51	Desconocido	aumenta	1,64	1,18 x 10 ⁻² ryanodine receptor 2
<i>PCLO</i>	e12	Desconocido	aumenta	1,64	1,37 x 10 ⁻² piccolo presynaptic cytomatrix protein

<i>UHMK1</i>	e2	Primer exón alternativo	umenta	1,64	1,64 x 10 ⁻² <i>U2AF</i> homology motif kinase 1
<i>IDH3G</i>	e3	Exón casete	umenta	1,64	1,74 x 10 ⁻² <i>isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) gamma</i>
<i>ZBED5</i>	e7	Desconocido	umenta	1,64	2,56 x 10 ⁻² <i>zinc finger BED-type containing 5</i>
<i>CLCC1</i>	e2	Exón casete	disminuye	1,64	3,37 x 10 ⁻² <i>chloride channel CLIC like 1</i>
<i>EYA4</i>	e11	Desconocido	disminuye	1,64	3,57 x 10 ⁻² <i>EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4</i>
<i>ATP5G3</i>	ae4	Retención de intrón	disminuye	1,64	3,75 x 10 ⁻² <i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit C3 (subunit 9)</i>
<i>POT1</i>	e6	Desconocido	umenta	1,63	1,41 x 10 ⁻³ <i>protection of telomeres 1</i>
<i>C4orf29</i>	e5	Exón casete	disminuye	1,63	1,04 x 10 ⁻² <i>Chromosome 4 Open Reading Frame 29</i>
<i>EFEMP1</i>	e2	Exón casete	umenta	1,63	2,3 x 10 ⁻² <i>EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1</i>
<i>COQ4</i>	ae6	Retención de intrón	disminuye	1,63	2,44 x 10 ⁻² <i>coenzyme Q4</i>
<i>NDUFV1</i>	ae4	PAS alternativo	disminuye	1,63	2,62 x 10 ⁻² <i>NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1</i>
<i>MEAF6</i>	e7	Exón casete	disminuye	1,63	3,52 x 10 ⁻² <i>MYST/Esa1 associated factor 6</i>
<i>STARD9</i>	e12	Desconocido	umenta	1,63	4 x 10 ⁻² <i>StAR related lipid transfer domain containing 9</i>
<i>PIGT</i>	ae5	3'ss alternativo	disminuye	1,62	6,2 x 10 ⁻³ <i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T</i>
<i>ZNF618</i>	e14	Exón casete	umenta	1,62	9,2 x 10 ⁻³ <i>zinc finger protein 618</i>
<i>CRBN</i>	ae7	Retención de intrón	umenta	1,62	1,16 x 10 ⁻² <i>cereblon</i>
<i>HNRPDL</i>	e8	Exón casete	umenta	1,62	1,9 x 10 ⁻² <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D Like</i>
<i>SYCP2L</i>	e38	Desconocido	disminuye	1,62	2,22 x 10 ⁻² <i>synaptonemal complex protein 2 like</i>
<i>CCDC84</i>	ae6	5'ss alternativo	umenta	1,62	2,27 x 10 ⁻² <i>coiled-coil domain containing 84</i>
<i>PACS1</i>	ae7	PAS alternativo	umenta	1,62	3,31 x 10 ⁻² <i>phosphofurin acidic cluster sorting protein 1</i>
<i>ZNF615</i>	ae6	5'ss alternativo	umenta	1,62	3,35 x 10 ⁻² <i>zinc finger protein 615</i>
<i>USF1</i>	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,62	3,76 x 10 ⁻² <i>upstream transcription factor 1</i>
<i>CAPRN2</i>	e15	3'ss alternativo	umenta	1,62	4,85 x 10 ⁻² <i>caprin family member 2</i>
<i>TFCP2L1</i>	e8	Desconocido	umenta	1,61	1,33 x 10 ⁻² <i>transcription factor CP2 like 1</i>
<i>MSL1</i>	ae6	PAS alternativo	disminuye	1,61	2,21 x 10 ⁻² <i>male specific lethal 1 homolog</i>
<i>IL4I1</i>	e12	Desconocido	disminuye	1,61	3,3 x 10 ⁻² <i>interleukin 4 induced 1</i>
<i>VEZT</i>	e18	Exón casete	disminuye	1,61	3,59 x 10 ⁻² <i>vezatin, adherens junctions transmembrane protein</i>
<i>SFXN3</i>	e10	Desconocido	umenta	1,61	4,03 x 10 ⁻² <i>sideroflexin 3</i>
<i>ASIC1</i>	ae12	PAS alternativo, 5'ss alternativo	umenta	1,61	4,1 x 10 ⁻² <i>acid sensing ion channel subunit 1</i>
<i>EPN2</i>	ae10	PAS alternativo	disminuye	1,61	4,40 x 10 ⁻² <i>epsin 2</i>
<i>CDC7</i>	ae9	Retención de intrón	umenta	1,61	4,48 x 10 ⁻² <i>cell division cycle 7</i>
<i>BRWD1</i>	e7	Desconocido	umenta	1,60	1,65 x 10 ⁻³ <i>bromodomain and WD repeat domain containing 1</i>
<i>FOXN2</i>	e2	Desconocido	disminuye	1,60	7,37 x 10 ⁻³ <i>forkhead box N2</i>
<i>AK124262</i>	e2	Desconocido	disminuye	1,60	3,47 x 10 ⁻² ---
<i>EIF4G2</i>	e5	Desconocido	umenta	1,59	1,8 x 10 ⁻³ <i>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>

<i>SLC20A2</i>	e4	Primer exón alternativo	umenta	1,59	1,8 x 10 ⁻³ <i>solute carrier family 20 member 2</i>
<i>COG4</i>	ae7	Retención de intrón	disminuye	1,59	1,04 x 10 ⁻² <i>component of oligomeric golgi complex 4</i>
<i>DBNDD2</i>	e8	Primer exón alternativo	disminuye	1,59	1,2 x 10 ⁻² <i>dysbindin domain containing 2</i>
<i>LRRIQ1</i>	e6	PAS alternativo	umenta	1,59	1,33 x 10 ⁻² <i>leucine rich repeats and IQ motif containing 1</i>
<i>TTC39A</i>	e2	Primer exón alternativo	umenta	1,59	1,98 x 10 ⁻² <i>tetratricopeptide repeat domain 39A</i>
<i>SPAG5</i>	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,59	2,02 x 10 ⁻² <i>sperm associated antigen 5</i>
<i>IRAK1BP1</i>	e5	PAS alternativo	umenta	1,59	2,9 x 10 ⁻² <i>interleukin 1 receptor associated kinase 1 binding protein 1</i>
<i>FAM182A</i>	ae1	Primer exón alternativo	umenta	1,59	3,25 x 10 ⁻² <i>family with sequence similarity 182 member A</i>
<i>TOM1L1</i>	ae7	PAS alternativo	umenta	1,59	4,45 x 10 ⁻² <i>target of myb1 like 1 membrane trafficking protein</i>
<i>C13orf18</i>	e21	PAS alternativo	umenta	1,59	4,51 x 10 ⁻² <i>Chromosome 13 Open Reading Frame 18</i>
<i>RBM5</i>	e32	Exón casete	disminuye	1,58	3,63 x 10 ⁻³ <i>RNA binding motif protein 5</i>
<i>ZNF214</i>	e2	Exón casete	umenta	1,58	4,89 x 10 ⁻³ <i>zinc finger protein 214</i>
<i>MKL2</i>	ae2	PAS alternativo	umenta	1,58	9,81 x 10 ⁻³ <i>MKL1/myocardin like 2</i>
<i>SPAG5</i>	e7	Exón casete	umenta	1,58	1,7 x 10 ⁻² <i>sperm associated antigen 5</i>
<i>BSN</i>	e7	Desconocido	disminuye	1,58	1,93 x 10 ⁻² <i>bassoon presynaptic cytomatrix protein</i>
<i>TSTD2</i>	ae3	Primer exón alternativo	umenta	1,58	2,88 x 10 ⁻² <i>thiosulfate sulfurtransferase like domain containing 2</i>
<i>ZNF274</i>	ae3	PAS alternativo	umenta	1,58	3 x 10 ⁻² <i>zinc finger protein 274</i>
<i>FLNC</i>	e27	Desconocido	umenta	1,58	3,69 x 10 ⁻² <i>filamin C</i>
<i>TTC21B</i>	ae11	PAS alternativo	umenta	1,58	3,79 x 10 ⁻² <i>tetratricopeptide repeat domain 21B</i>
<i>SLCO6A1</i>	e7	Exón casete	umenta	1,58	4,45 x 10 ⁻² <i>solute carrier organic anion transporter family member 6A1</i>
<i>ABLIM1</i>	e8	Desconocido	disminuye	1,57	1,79 x 10 ⁻³ <i>actin binding LIM protein 1</i>
<i>SLC25A39</i>	ae7	Retención de intrón	disminuye	1,57	2,09 x 10 ⁻³ <i>solute carrier family 25 member 39</i>
<i>ZDHHC17</i>	e2	Exón casete	disminuye	1,57	2,24 x 10 ⁻³ <i>zinc finger DHHC-type containing 17</i>
<i>UBE3B</i>	ae9	Retención de intrón	disminuye	1,57	3,68 x 10 ⁻³ <i>ubiquitin protein ligase E3B</i>
<i>DDB2</i>	ae7	Retención de intrón	disminuye	1,57	3,74 x 10 ⁻³ <i>damage specific DNA binding protein 2</i>
<i>EXO1</i>	e3	Exón casete	umenta	1,57	4,86 x 10 ⁻³ <i>exonuclease 1</i>
<i>PAX6</i>	ae10	5'ss alternativo	umenta	1,57	1,25 x 10 ⁻² <i>p21 (RAC1) activated kinase 3</i>
<i>VIPAR</i>	e2	Exón casete, 5'ss alternativo	umenta	1,57	1,42 x 10 ⁻² <i>VPS33B Interacting Protein, Apical-Basolateral Polarity Regulator, Spe-39 Homolog</i>
<i>DMD</i>	e21	Desconocido	disminuye	1,57	1,51 x 10 ⁻² <i>dystrophin</i>
<i>BACH1</i>	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,57	1,85 x 10 ⁻² <i>BTB domain and CNC homolog 1</i>
<i>ABCB6</i>	e19	Exón casete	umenta	1,57	2,65 x 10 ⁻² <i>ATP binding cassette subfamily B member 6 (Langereis blood group)</i>
<i>TMEM218</i>	e2	Exón casete	disminuye	1,57	3,45 x 10 ⁻² <i>transmembrane protein 218</i>
<i>PHTF2</i>	e8	Exón casete	umenta	1,57	3,49 x 10 ⁻² <i>putative homeodomain transcription factor 2</i>
<i>EIF4G2</i>	ae16	Retención de intrón	umenta	1,57	4,53 x 10 ⁻² <i>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>
<i>SPTAN1</i>	e24	Exón casete	umenta	1,57	4,79 x 10 ⁻² <i>spectrin alpha, non-erythrocytic 1</i>

ZNF569	e3	Exón casete	disminuye	1,56	7,5 x 10 ⁻⁴ zinc finger protein 569
NEK3	e12	Desconocido	disminuye	1,56	6,62 x 10 ⁻³ NIMA related kinase 3
TMEM120B	e18	PAS alternativo	aumenta	1,56	7,3 x 10 ⁻³ transmembrane protein 120B
C19orf48	ae5	Retención de intrón	disminuye	1,56	9,6 x 10 ⁻³ chromosome 19 open reading frame 48
NOL8	e5	Exón casete	aumenta	1,56	1,24 x 10 ⁻² nucleolar protein 8
ATP5G1	ae4	Retención de intrón	disminuye	1,56	1,57 x 10 ⁻² ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex subunit C1 (subunit 9)
SMC6	ae7	Primer exón alternativo	aumenta	1,56	1,6 x 10 ⁻² structural maintenance of chromosomes 6
UBN2	e1	Primer exón alternativo	aumenta	1,56	1,69 x 10 ⁻² ubinuclein 2
CASP7	e9	Exón casete	aumenta	1,56	1,85 x 10 ⁻² caspase 7
AKAP9	ae41	Primer exón alternativo	aumenta	1,56	2,65 x 10 ⁻² A-kinase anchoring protein 9
UBAP2	ae19	Retención de intrón	disminuye	1,56	2,71 x 10 ⁻² ubiquitin associated protein 2
PTPN14	e12	Desconocido	aumenta	1,56	2,85 x 10 ⁻² protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14
DMKN	e15	PAS alternativo	aumenta	1,56	3,04 x 10 ⁻² dermokine
C11orf73	e2	Primer exón alternativo	disminuye	1,56	3,52 x 10 ⁻² Chromosome 11 Open Reading Frame 73
PCGF3	e4	Exón casete	aumenta	1,56	3,77 x 10 ⁻² polycomb group ring finger 3
TMEM87A	e6	Desconocido	aumenta	1,56	3,83 x 10 ⁻² transmembrane protein 87A
APPL2	e21	Exón casete	disminuye	1,56	4,67 x 10 ⁻² adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 2
CDC7	e2	Primer exón alternativo	aumenta	1,56	4,7 x 10 ⁻² cell division cycle 7
C19orf48	e3	Exón casete	aumenta	1,55	1,54 x 10 ⁻³ Chromosome 19 Open Reading Frame 48
DNM2	e22	Exón casete	disminuye	1,55	4,71 x 10 ⁻³ dynamin 2
PCSK7	e15	Exón casete	disminuye	1,55	5,2 x 10 ⁻³ proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
RTN2	e3	Desconocido	aumenta	1,55	9,13 x 10 ⁻³ reticulon 2
MARCH6	ae11	PAS alternativo	disminuye	1,55	9,85 x 10 ⁻³ membrane associated ring-CH-type finger 6
ERBB2	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,55	1,14 x 10 ⁻² erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERBB2	ae4	3'ss alternativo	disminuye	1,55	1,67 x 10 ⁻² erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
BID	e10	PAS alternativo	disminuye	1,55	1,79 x 10 ⁻² BH3 interacting domain death agonist
MBNL3	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,55	1,84 x 10 ⁻² muscleblind like splicing regulator 3
COQ9	ae6	Primer exón alternativo	disminuye	1,55	2,06 x 10 ⁻² coenzyme Q9
PLD1	e4	Exón casete	aumenta	1,55	2,47 x 10 ⁻² phospholipase D1
BRD9	ae2	5'ss alternativo	aumenta	1,55	2,64 x 10 ⁻² bromodomain containing 9
FDPS	e7	Desconocido	disminuye	1,55	2,69 x 10 ⁻² farnesyl diphosphate synthase
RPL7L1	ae6	PAS alternativo	disminuye	1,55	2,83x 10 ⁻² ribosomal protein L7 like 1
EML5	e16	Desconocido	aumenta	1,55	2,89 x 10 ⁻² echinoderm microtubule associated protein like 5
KIAA1598	e22	PAS alternativo	aumenta	1,55	3,17 x 10 ⁻² Shootin 1

SLC4A5	e58	Exón casete	umenta	1,55	3,55 x 10 ⁻² <i>solute carrier family 4 member 5</i>
STXBP4	e17	Desconocido	disminuye	1,55	3,94 x 10 ⁻² <i>syntaxin binding protein 4</i>
WDR52	e10	Desconocido	disminuye	1,54	6,39 x 10 ⁻⁴ <i>Cilia And Flagella Associated Protein 44</i>
AP3B2	e13	Retención de intrón, PAS alternativo	disminuye	1,54	6,9 x 10 ⁻⁴ <i>adaptor related protein complex 3 beta 2 subunit</i>
MCRS1	ae4	5'ss alternativo	umenta	1,54	4,44 x 10 ⁻³ <i>microspherule protein 1</i>
ABLIM1	e10	Desconocido	disminuye	1,54	5,72 x 10 ⁻³ <i>actin binding LIM protein 1</i>
DDX42	ae8	3'ss alternativo	umenta	1,54	8,34 x 10 ⁻³ <i>DEAD-box helicase 42</i>
ANK2	e54	Exón casete	disminuye	1,54	8,79 x 10 ⁻³ <i>ankyrin 2</i>
TTC39A	e21	Desconocido	disminuye	1,54	9,18 x 10 ⁻³ <i>tetratricopeptide repeat domain 39A</i>
MRPS5	ae7	PAS alternativo	umenta	1,54	1,06 x 10 ⁻² <i>mitochondrial ribosomal protein S5</i>
FAM135A	ae13	PAS alternativo	disminuye	1,54	1,44 x 10 ⁻² <i>family with sequence similarity 135 member A</i>
KIAA1984	e7	Desconocido	disminuye	1,54	1,8 x 10 ⁻² <i>Coiled-Coil Domain Containing 183</i>
VCAN	e7	Exón casete	umenta	1,54	1,92 x 10 ⁻² <i>versican</i>
SPRED1	e5	Desconocido	umenta	1,54	2,24 x 10 ⁻² <i>sprouty related EVH1 domain containing 1</i>
CTSO	e2	Desconocido	umenta	1,54	2,24 x 10 ⁻² <i>cathepsin O</i>
ALG13	e6	Desconocido	umenta	1,54	2,41 x 10 ⁻² <i>ALG13, UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit</i>
MRPL45	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,54	2,72 x 10 ⁻² <i>mitochondrial ribosomal protein L45</i>
CEP63	ae8	Primer exón alternativo	umenta	1,54	2,8 x 10 ⁻² <i>centrosomal protein 63</i>
SRGAP3	e2	PAS alternativo	umenta	1,54	3,91 x 10 ⁻² <i>SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3</i>
GPAM	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,54	3,92 x 10 ⁻² <i>glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial</i>
RBM6	e18	Desconocido	umenta	1,54	4,06 x 10 ⁻² <i>RNA binding motif protein 6</i>
FAM76B	e8	Exón casete	disminuye	1,54	4,56 x 10 ⁻² <i>family with sequence similarity 76 member B</i>
ETV1	e17	PAS alternativo	umenta	1,54	4,64 x 10 ⁻² <i>ETS variant 1</i>
THRB	ae5	3'ss alternativo	umenta	1,54	4,85 x 10 ⁻² <i>thyroid hormone receptor beta</i>
PLK1S1	ae12	Retención de intrón	umenta	1,54	4,98 x 10 ⁻² <i>Kizuna Centrosomal Protein</i>
AR	e10	Exón casete	disminuye	1,53	4,38 x 10 ⁻⁴ <i>androgen receptor</i>
EIF3G	ae5	PAS alternativo	disminuye	1,53	6,45 x 10 ⁻³ <i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G</i>
SMG1	e27	Primer exón alternativo, Exón casete	umenta	1,53	6,59 x 10 ⁻³ <i>SMG1, nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase</i>
ZNF705G	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,53	1,1 x 10 ⁻² <i>zinc finger protein 705G</i>
AK292586	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,53	1,1 x 10 ⁻² ---
MSH4	e29	Desconocido	umenta	1,53	1,45 x 10 ⁻² <i>mutS homolog 4</i>
U2SURP	e8	Desconocido	umenta	1,53	2,02 x 10 ⁻² <i>U2 snRNP associated SURP domain containing</i>
RBM3	ae3	Retención de intrón	umenta	1,53	2,05 x 10 ⁻² <i>RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3</i>
KPNA5	e8	Desconocido	umenta	1,53	2,23 x 10 ⁻² <i>karyopherin subunit alpha 5</i>
NEK1	e18	PAS alternativo, Exón casete	umenta	1,53	2,27 x 10 ⁻² <i>NIMA related kinase 1</i>

<i>NFE2L2</i>	ae15	Retención de intrón	umenta	1,53	2,42 x 10 ⁻² <i>nuclear factor, erythroid 2 like 2</i>
<i>LRP2</i>	e72	Desconocido	umenta	1,53	3,47 x 10 ⁻² <i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</i>
<i>GPR125</i>	ae14	PAS alternativo	umenta	1,53	3,7 x 10 ⁻² <i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor A3</i>
<i>LEPR / LEPROT</i>	e3	Desconocido	umenta	1,53	3,85 x 10 ⁻² <i>Leptin Receptor / Leptin Receptor Overlapping Transcript</i>
<i>C11orf30</i>	ae4	PAS alternativo	disminuye	1,53	4,59 x 10 ⁻² <i>Chromosome 11 Open Reading Frame 30</i>
<i>LIPA</i>	e1	Primer exón alternativo	disminuye	1,53	4,76 x 10 ⁻² <i>lipase A, lysosomal acid type</i>
<i>UBE2D3</i>	e8	Exón casete	disminuye	1,53	4,97 x 10 ⁻² <i>ubiquitin conjugating enzyme E2 D3</i>
<i>RBM3</i>	ae4	Retención de intrón	umenta	1,52	5,85 x 10 ⁻⁴ <i>RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3</i>
<i>UNC5A</i>	e3	Exón casete	disminuye	1,52	1,17 x 10 ⁻³ <i>unc-5 netrin receptor A</i>
<i>C17orf85</i>	ae4	Retención de intrón	umenta	1,52	1,77 x 10 ⁻³ <i>Chromosome 17 Open Reading Frame 85</i>
<i>RXRβ</i>	ae6	PAS alternativo	disminuye	1,52	2,63 x 10 ⁻³ <i>retinoid X receptor beta</i>
<i>ATG14</i>	e10	Exón casete, 5'ss alternativo	umenta	1,52	3,46 x 10 ⁻³ <i>autophagy related 14</i>
<i>PPP2R5C</i>	ae9	PAS alternativo	umenta	1,52	1,03 x 10 ⁻² <i>protein phosphatase 2 regulatory subunit B'gamma</i>
<i>NUP35</i>	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,52	2,03 x 10 ⁻² <i>nucleoporin 35</i>
<i>PRKCSH</i>	ae18	3'ss alternativo	disminuye	1,52	2,39 x 10 ⁻² <i>protein kinase C substrate 80K-H</i>
<i>MYO5C</i>	e34	Exón casete	umenta	1,52	2,8 x 10 ⁻² <i>myosin VC</i>
<i>COQ4</i>	ae4	PAS alternativo, 5'ss alternativo	disminuye	1,52	2,9 x 10 ⁻² <i>coenzyme Q4</i>
<i>NAA35</i>	e1	Primer exón alternativo	umenta	1,52	3,19 x 10 ⁻² <i>N(alpha)-acetyltransferase 35, NatC auxiliary subunit</i>
<i>ZFYVE26</i>	ae29	Primer exón alternativo	umenta	1,52	3,41 x 10 ⁻² <i>zinc finger FYVE-type containing 26</i>
<i>TAF1B</i>	ae13	PAS alternativo	umenta	1,52	3,47 x 10 ⁻² <i>TATA-box binding protein associated factor, RNA polymerase I subunit B</i>
<i>GPR125</i>	e6	Desconocido	disminuye	1,52	3,72 x 10 ⁻² <i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor A3</i>
<i>PAK3</i>	e8	Desconocido	disminuye	1,52	4,1 x 10 ⁻² <i>P21 (RAC1) Activated Kinase 3</i>
<i>RASEF</i>	e16	Desconocido	umenta	1,52	4,3 x 10 ⁻² <i>RAS and EF-hand domain containing</i>
<i>PPIE</i>	ae4	Retención de intrón	umenta	1,51	1,44 x 10 ⁻³ <i>peptidylprolyl isomerase E</i>
<i>CCNC</i>	ae5	PAS alternativo	umenta	1,51	1,85 x 10 ⁻³ <i>cyclin C</i>
<i>USP48</i>	ae11	PAS alternativo	umenta	1,51	6,96 x 10 ⁻³ <i>ubiquitin specific peptidase 48</i>
<i>COL14A1</i>	e28	Exón casete	disminuye	1,51	7,56 x 10 ⁻³ <i>collagen type XIV alpha 1 chain</i>
<i>LIMK1</i>	e4	Primer exón alternativo	umenta	1,51	7,85 x 10 ⁻³ <i>LIM domain kinase 1</i>
<i>ARL6</i>	e6	Exón casete	disminuye	1,51	8,69 x 10 ⁻³ <i>ADP ribosylation factor like GTPase 6</i>
<i>TCF25</i>	e7	PAS alternativo	umenta	1,51	8,99 x 10 ⁻³ <i>transcription factor 25</i>
<i>NSUN4</i>	ae2	5'ss alternativo	umenta	1,51	1,74 x 10 ⁻² <i>NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 4</i>
<i>ANKRD49</i>	ae2	Retención de intrón	umenta	1,51	1,79 x 10 ⁻² <i>ankyrin repeat domain 49</i>
<i>MPHOSPH9</i>	ae10	5'ss alternativo	umenta	1,51	1,87 x 10 ⁻² <i>M-phase phosphoprotein 9</i>
<i>TBC1D8</i>	ae10	PAS alternativo	umenta	1,51	2,13 x 10 ⁻² <i>TBC1 domain family member 8</i>
<i>ZNF207</i>	ae3	3'ss alternativo	disminuye	1,51	2,3 x 10 ⁻² <i>zinc finger protein 207</i>

<i>TMEM68</i>	e8	Exón casete	aumenta	1,51	2,41 x 10 ⁻² <i>transmembrane protein 68</i>
<i>RAB3GAP2</i>	e19	Exón casete	aumenta	1,51	2,73 x 10 ⁻² <i>RAB3 GTPase activating non-catalytic protein subunit 2</i>
<i>ACTN2</i>	e12	Primer exón alternativo, Exón casete	aumenta	1,51	4 x 10 ⁻² <i>actinin alpha 2</i>
<i>MAP2</i>	e18	Desconocido	disminuye	1,51	4,81 x 10 ⁻² <i>microtubule associated protein 2</i>
<i>LSS</i>	ae21	Primer exón alternativo	disminuye	1,50	1,07 x 10 ⁻² <i>lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)</i>
<i>LMNA</i>	ae17	PAS alternativo	aumenta	1,50	1,62 x 10 ⁻² <i>lamin A/C</i>
<i>LUZP2</i>	e3	Desconocido	disminuye	1,50	2,27 x 10 ⁻² <i>leucine zipper protein 2</i>
<i>ZNF687</i>	e3	Exón casete	aumenta	1,50	3,42 x 10 ⁻² <i>zinc finger protein 687</i>

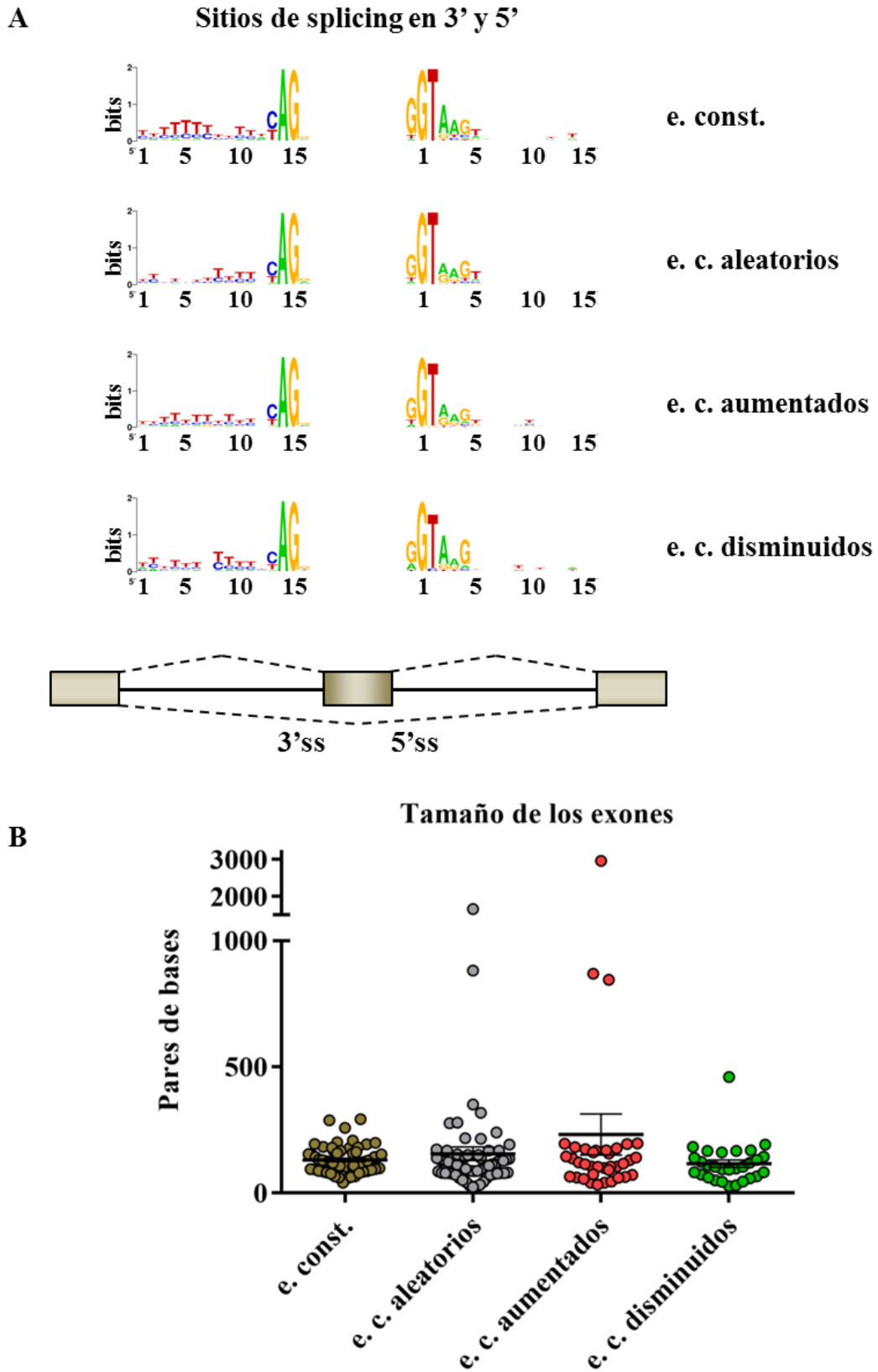


Figura A-1. Análisis de los sitios de splicing y de la longitud de los exones casete afectados por el silenciamiento de TCERG1. A. Logo generado a partir de los 3'ss y 5'ss de las secuencias de los exones

(continuación pie Figura A-1) pertenecientes a los distintos grupos analizados. Todos los exones analizados tienen sus 3'ss iguales al consenso. Todos los exones constitutivos (e. const.) y todos los exones casete elegidos al azar (e. c. aleatorios) analizados tienen sus 5'ss iguales a la secuencias consenso. Uno de los treinta y siete exones casete que **aumentan** su expresión al silenciar TCERG1 (e. c. **aumentados**) tiene un 5'ss diferente del consenso, y dos de veintinueve exones casete que **disminuyen** su expresión al silenciar TCERG1 (e. c. **disminuidos**) tienen 5'ss diferentes del consenso. **B.** Representación de los tamaños de los exones analizados. No hay diferencias significativas entre los distintos grupos. La longitud media de los e. const. es de 180,33 pb; la longitud media de los e. c. aleatorios es de 155,33 pb; la longitud media de los e. c. **aumentados** es de 231,51 pb; y la longitud media de los e. c. **disminuidos** es de 131,14 pb.

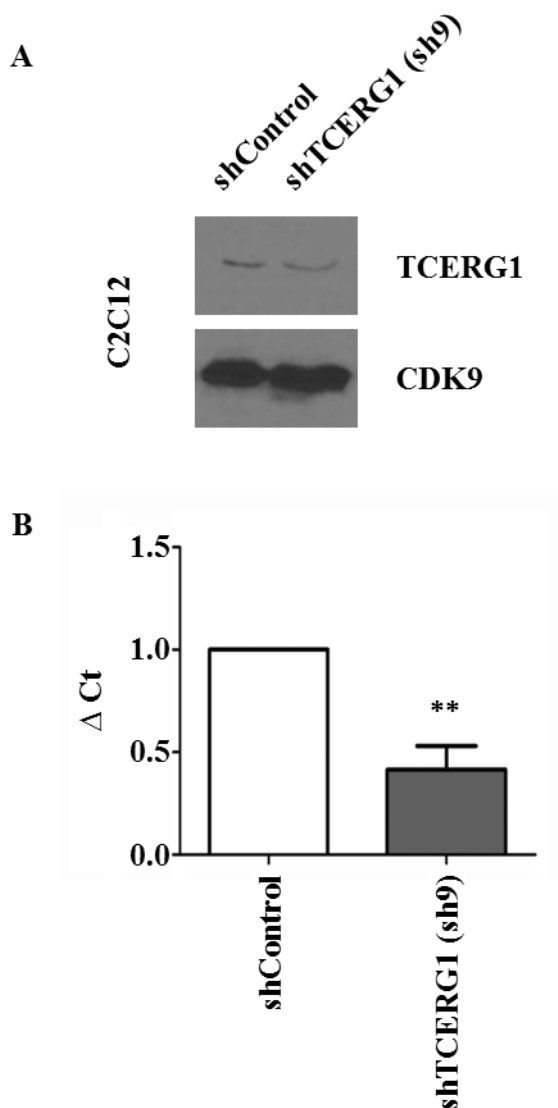


Figura A-2. El uso del shTCERG1 (sh9) en células murinas produce una disminución en la expresión de la proteína y del ARNm de TCERG1. **A.** Western blot de extractos celulares de células C2C12 incubados con anticuerpo específico contra TCERG1. Como control de carga se utilizó CDK9. **B.** Análisis de RT-qPCR de cultivos primarios de células de hipocampo de ratón. Se utilizaron

Anexo I; Material suplementario

(continuación pie Figura A-2) oligonucleótidos diseñados para amplificar TCERG1 y se cuantificaron con respecto a la expresión de GAPDH. Los datos representados pertenecen a tres experimentos independientes (medias \pm SEM). $**P = 0,001-0,01$.

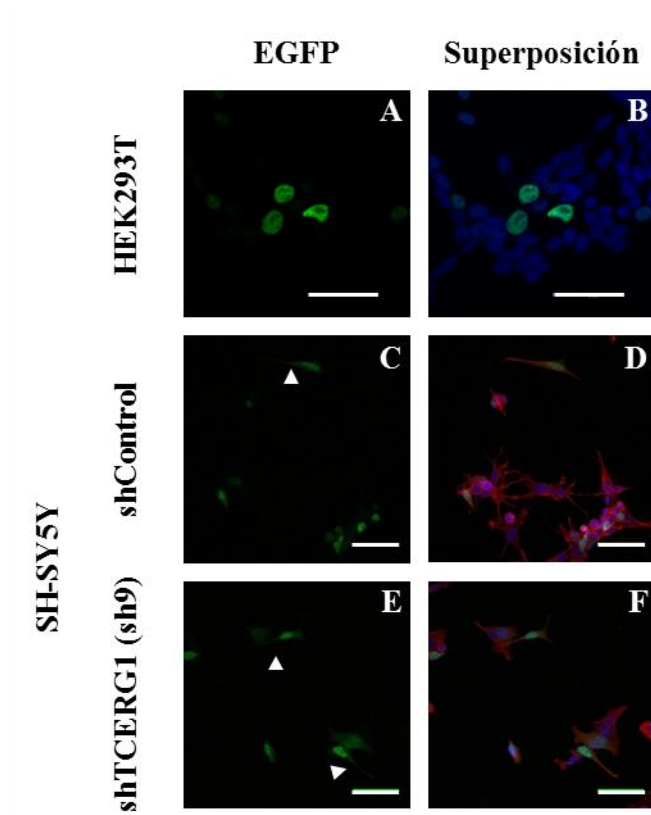


Figura A-3. Localización de la construcción pcDNA3-EGFP-TCERG1-mut. Inmunofluorescencias sobre células HEK293T (A-B), SH-SY5Y Control (C-D) y SH-SY5Y (sh9) (E-F) en las que se sobreexpresó la construcción pcDNA3-EGFP-TCERG1-mut. La señal roja corresponde a la actina F. El ADN está teñido con DAPI (azul). Las flechas indican la locación de TCERG1 en el citoplasma. Las barras de escala miden 50 μ m.

Tabla A-3 Genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto que se expresan en el sistema nervioso

Símbolo del gen	Nombre del gen
<i>ABLIM1</i>	<i>actin binding LIM protein 1</i>
<i>ACTN2</i>	<i>actinin, alpha 2</i>
<i>ANK2</i>	<i>ankyrin 2, neuronal</i>
<i>AP3B2</i>	<i>adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit</i>
<i>ATP1A3</i>	<i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 3 polypeptide</i>
<i>BSN</i>	<i>bassoon presynaptic cytomatrix protein</i>
<i>C1orf115</i>	<i>chromosome 1 open reading frame 115</i>
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
<i>CDS1</i>	<i>CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1</i>
<i>CLASP2</i>	<i>cytoplasmic linker associated protein 2</i>
<i>DBNDD2</i>	<i>dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 2</i>
<i>DMD</i>	<i>dystrophin</i>

Anexo I; Material suplementario

<i>DOCK9</i>	<i>dedicator of cytokinesis 9</i>
<i>EFEMP1</i>	<i>EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>
<i>ETV1</i>	<i>ets variant 1</i>
<i>ITPK1</i>	<i>inositol-tetrakisphosphate 1-kinase</i>
<i>KCNQ2</i>	<i>potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2</i>
<i>KIAA1598</i>	<i>KIAA1598 (Shootin-1)</i>
<i>LMO3</i>	<i>LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)</i>
<i>LUM</i>	<i>lumican</i>
<i>MAP2</i>	<i>microtubule-associated protein 2</i>
<i>MAP7</i>	<i>microtubule-associated protein 7</i>
<i>MAPK8IP2</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2</i>
<i>MKL2</i>	<i>MKL/myocardin-like 2</i>
<i>NEK1</i>	<i>NIMA-related kinase 1</i>
<i>NEK3</i>	<i>NIMA-related kinase 3</i>
<i>PAK3</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3</i>
<i>PAX6</i>	<i>paired box 6</i>
<i>PCLO</i>	<i>piccolo presynaptic cytomatrix protein</i>
<i>PTPRF</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, F</i>
<i>RPRM</i>	<i>reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate</i>
<i>RRAGD</i>	<i>Ras-related GTP binding D</i>
<i>RTN2</i>	<i>reticulon 2</i>
<i>RYR2</i>	<i>ryanodine receptor 2 (cardiac)</i>
<i>SCG3</i>	<i>secretogranin III</i>
<i>SPTAN1</i>	<i>spectrin, alpha, non-erythrocytic 1</i>
<i>SRGAP3</i>	<i>SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3</i>
<i>SV2A</i>	<i>synaptic vesicle glycoprotein 2A</i>
<i>SYP</i>	<i>synaptophysin</i>
<i>TRO</i>	<i>trophinin</i>
<i>TUBB2B</i>	<i>tubulin, beta 2B class IIb</i>

Anexo II; Publicación

