

Tesis Doctoral

# Regulación del splicing alternativo y de la elongación de la transcripción en plantas por acción de la luz

Godoy Herz, Micaela

2017-03-23

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

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

Cita tipo APA:

Godoy Herz, Micaela. (2017-03-23). Regulación del splicing alternativo y de la elongación de la transcripción en plantas por acción de la luz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Godoy Herz, Micaela. "Regulación del splicing alternativo y de la elongación de la transcripción en plantas por acción de la luz". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-23.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



# UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

## Regulación del *splicing* alternativo y de la elongación de la transcripción en plantas por acción de la luz

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Micaela Godoy Herz

**Director de tesis:** Dr. Alberto Kornblihtt

**Consejera de Estudio:** Dra. Anabella Srebrow

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

**Buenos Aires, 2017**

Fecha de defensa: 23 de marzo de 2017



# Regulación del *splicing* alternativo y de la elongación de la transcripción en plantas por acción de la luz

## Resumen

La luz es un estímulo ambiental que regula varios procesos biológicos en las plantas. A través del cloroplasto, la luz regula el *splicing* alternativo de un conjunto de genes. En este trabajo nos propusimos estudiar los mecanismos por los que la luz realiza esta regulación.

Tomamos como modelo el gen RS31, que codifica para un factor de *splicing* rico en serinas y argininas. Encontramos que los cambios que se observan en las isoformas de RNA mensajero de RS31 por acción de la luz se deben al proceso de *splicing* alternativo y no a una degradación diferencial de sus isoformas.

Por otro lado, encontramos que el tratamiento de plantas que se encuentran en oscuridad con tricostatina A, una droga que promueve la hiperacetilación de histonas, imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo. Además, demostramos que una mutante de *Arabidopsis* deficiente en la deacetilación de histonas HD1 muestra un menor efecto de luz a oscuridad que las plantas salvajes. El efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo implica cambios en la elongación de la transcripción: el tratamiento de plantas con camptotecina, droga que inhibe la elongación, imita el efecto de la oscuridad sobre el *splicing* alternativo. Realizamos mediciones de la tasa de elongación y encontramos que en luz la elongación es más rápida que en oscuridad en el gen de RS31. Finalmente, en plantas de *Arabidopsis* defectuosas en el factor de elongación TFIIIS el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de los eventos estudiados se inhibe por completo.

Estos resultados muestran que el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo depende de cambios en la elongación de la transcripción.

Palabras clave: *SPLICING* ALTERNATIVO – LUZ – TRANSCRIPCIÓN - ARABIDOPSIS

# Light-mediated regulation of alternative *splicing* and transcription elongation in plants

## Abstract

Light is an environmental stimulus that regulates several biological processes in plants. Through the chloroplast, light regulates alternative *splicing* of a subset of genes. In this work, we aim to study the mechanism of light-regulation of alternative *splicing*. We chose the Ser-Arg-rich *splicing* factor *RS31* as a model and found that changes in the abundance of mRNA isoforms are due to changes in alternative *splicing* –and are not caused by degradation of mRNA isoforms.

Treatment of plants with trichostatin A, a drug that suppresses histone deacetylase activity and therefore increases histone acetylation, mimics the effect of light on *RS31* alternative *splicing*. Furthermore, in an *Arabidopsis* mutant defective in the histone deacetylase HD1 the effect of light to dark transition on alternative *splicing* is strongly reduced.

The effect of light on alternative *splicing* involves changes in transcription elongation: treatment of plants with camptothecin, a drug that inhibits transcription elongation, mimics the effect of darkness on alternative *splicing*. We performed measurements of transcription elongation rate and found that in light-treated plants transcription elongation is faster than in dark-treated plants along the *RS31* gene. Finally, in a plant defective in the elongation factor TFIIIS the light/dark effect on alternative *splicing* is completely abolished. These results show that the effect of light on alternative *splicing* involves changes in transcription elongation.

Key words: ALTERNATIVE *SPLICING* – LIGHT – TRANSCRIPTION – ARABIDOPSIS

*Wenn wir wüssten, was wir tun, würden wir es nicht Forschung nennen, oder?*

*(Si supiéramos lo que hacemos, entonces, no lo llamaríamos investigación,  
¿no es cierto?)*

A. Einstein

*Canta, Musa, el microcosmos vegetal.  
Dime del transcripto, que en su largo periplo  
conoció el carácter de innúmeras enzimas y  
padeció primero el corte y después el empalme,  
ora de este modo, ora de aquel otro,  
juguete de la voluntad del cloroplasto.*

G. Corti Bielsa

*Siempre mirando hacia los rayos del sol.*

Parménides



*A mamá, papá, Mauri y Nico*



## PUBLICACIONES Y FINANCIAMIENTO

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

Los hallazgos que relato en la primera parte forman parte de la siguiente publicación:

Petrillo E., Godoy Herz M.A., Fuchs A., Reifer D., Fuller J., Yanovsky M.J., Simpson C., Brown J.W., Barta A., Kalyna M. & Kornblihtt A.R. A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science* **344**, 427-30 (2014).

También participé de la escritura de los siguientes artículos de revisión y capítulo de libro:

Petrillo\* E., Godoy Herz\* M.A., Barta A., Kalyna M. & Kornblihtt A.R. Let there be light: regulation of gene expression in plants. *RNA Biol.* **11**, 1215-1220 (2014).

Godoy Herz M.A., Kornblihtt A.R., Barta A., Kalyna M. & Petrillo E. Shedding light on the chloroplast as a remote control of nuclear gene expression. *Plant Signal Behav.* **9**, e976150 (2014).

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

Los resultados de la segunda parte de la tesis forman parte de un manuscrito que se encuentra actualmente en preparación.

## ABREVIATURAS MÁS USADAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

mRNA: ácido ribonucleico maduro, mensajero

pre-mRNA: RNA mensajero precursor

cDNA: ácido desoxirribonucleico copia

snRNP: complejos nucleares pequeños ribo-núcleo-proteicos

RNAPII: RNA polimerasa II

CTD: dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II

PQ: plastoquinona

DCMU: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea

DBMIB: 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-benzoquinona

Col: Columbia (ecotipo de *Arabidopsis thaliana*)

OSC: oscuridad

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RT: retrotranscripción

qPCR: PCR en tiempo real

mRNA3 y mRNA1: isoformas de *RS31*

ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina

pb: pares de bases

TSA: tricostatina A

CPT: camptotecina

# ÍNDICE

Introducción .....	15
Regulación de la expresión genética en eucariotas: el procesamiento del RNA ...	15
El <i>splicing</i> y sus alternativas.....	17
El <i>splicing</i> es co-transcripcional .....	21
Los modelos de reclutamiento y cinético.....	23
Breve reseña sobre la estructura de la cromatina .....	26
Cromatina y <i>splicing</i> alternativo.....	29
El ciclo de la transcripción.....	31
Regulación del <i>splicing</i> alternativo en plantas .....	33
Antecedentes para esta tesis .....	37
Objetivos .....	41
Materiales y métodos.....	43
1. Plantas y condiciones de crecimiento.....	43
2. Esquema experimental: el protocolo de luz/oscuridad .....	43
3. Análisis de <i>splicing</i> alternativo y de expresión de mRNA.....	43
4. Tratamientos con inhibidores de la cadena de transporte de electrones.....	47
5. Tratamientos con TSA y CPT.....	47
6. Panel de RT-PCR de alta resolución .....	47
7. Protoplastos: preparación y transformación.....	48
8. Preparación de plásmidos .....	49
9. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	50
10. Ensayos de precursores proximal/distal de pre-mRNA .....	54
11. Medición de actividad enzimática de histona deacetilasa .....	55
12. <i>Western blot</i> .....	56
13. HPLC.....	57
14. Plantas mutantes .....	57

Resultados .....	59
1. Primera parte: regulación del <i>splicing</i> alternativo por acción de la luz .....	59
1.1. El efecto de la luz sobre la abundancia de las isoformas de RNA mensajero de RS31 se debe a regulación del <i>splicing</i> alternativo y no a una degradación diferencial del RNA. ....	59
1.1.1. Demostración por incubación con actinomicina D.....	59
1.1.2. Demostración con el uso de mutantes de <i>Arabidopsis</i> defectuosas en proceso de degradación de RNA .....	60
1.1.3. Demostración por sobreexpresión del factor de <i>splicing</i> U2AF65. ....	61
1.2. La luz modifica el estado redox del <i>pool</i> de plastoquinonas .....	65
1.2.1. Drogas que modifican el estado redox del <i>pool</i> de plastoquinonas y su efecto sobre el <i>splicing</i> alternativo.....	65
1.2.2. Estudio del estado redox del <i>pool</i> de plastoquinonas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	68
1. 3. El efecto del medio condicionado sobre el <i>splicing</i> alternativo.....	71
2. Segunda parte: la elongación de la transcripción y el efecto de la luz sobre el <i>splicing</i> alternativo .....	75
2.1. Efecto de drogas que modulan la estructura de la cromatina sobre el <i>splicing</i> alternativo .....	75
2.1.1 La tricostatina A imita el efecto de la luz sobre el <i>splicing</i> alternativo.....	75
2.1.2 La TSA y la luz producen cambios similares en un conjunto de eventos de <i>splicing</i> alternativo de <i>Arabidopsis</i> . ....	79
2. 2. Mutantes de genes que codifican enzimas modificadoras de histonas de <i>Arabidopsis</i> y su efecto sobre el <i>splicing</i> alternativo.....	81
2.3. La luz y la estructura de la cromatina de RS31.....	85
2.3.1. La acetilación global de histonas no cambia por acción de la luz .....	85
2.3.2. La actividad enzimática de histona deacetilasa no se modifica en extractos nucleares de luz y oscuridad .....	86
2.3.2. La acetilación en H3K9 no cambia por acción de la luz en RS31 .....	87

2.3.3. La dimetilación en H3K9 no se modifica por acción de la luz en RS31 .....	90
2.4. Estudio de la elongación de la transcripción.....	92
2.4.1. La camptotecina imita el efecto de la oscuridad sobre el <i>splicing</i> alternativo.....	92
2.4.2. Estudio de la elongación a partir de la abundancia de precursores proximales y distales.....	94
2.4.3. Estudio de la elongación en la mutante para el factor de elongación TFIIS .....	98
2.4.3. Estudio de la elongación a partir de la abundancia de precursores proximales y distales: extensión del análisis.....	102
Discusión .....	105
1. ¿La luz regula los niveles de las isoformas de RS31 a través de cambios en el <i>splicing</i> alternativo?.....	105
2. ¿Producir cambios en la estructura de la cromatina puede modificar el <i>splicing</i> alternativo de RS31? .....	107
3. ¿La luz produce cambios cromatínicos intragénicos a lo largo del gen RS31?.....	108
4. ¿Provoca la luz cambios en la elongación de la transcripción?.....	109
4.1. El tratamiento con camptotecina .....	109
4.2. El factor de elongación TFIIS.....	110
4.3. Mediciones de la elongación de la transcripción.....	113
5. Procesividad o velocidad: esa es la cuestión.....	116
6. Si la luz cambia la elongación de la RNAPII... ¿qué ocurre con el <i>splicing</i> alternativo?.....	117
6.1. Análisis de la fuerza de los sitios de <i>splicing</i> .....	117
7. De cómo la elongación regula el <i>splicing</i> de RS31: modelo.....	118
7.1. El caso del exón EDI del gen de la fibronectina.....	119
7.2. El caso del gen E1a de adenovirus .....	120
7.3. El caso del gen RS31.....	121

8. Observaciones finales .....	123
Conclusiones .....	127
Primera parte: regulación del <i>splicing</i> alternativo por acción de la luz. ....	127
Segunda parte: la elongación de la transcripción y el efecto a la luz sobre el <i>splicing</i> alternativo.....	127
Apéndice.....	129
Bibliografía .....	137

# INTRODUCCIÓN

## Regulación de la expresión genética en eucariotas: el procesamiento del RNA

En organismos eucariotas, la transcripción de los genes que codifican RNA mensajeros es llevada a cabo en el núcleo de las células por la enzima RNA polimerasa II (RNAPII). La transcripción comienza en un nucleótido denominado +1 y continúa hasta río abajo del sitio de corte y poliadenilación, finalizando en alguna posición o secuencia que varía de gen a gen. Por lo tanto, el extremo 5' del transcripto está determinado por el nucleótido +1, mientras que el sitio 3' del transcripto no está definido por el sitio de terminación de la transcripción, sino por el sitio de corte y poliadenilación (Kornblihtt *et al*, 2013). Además del corte y poliadenilación, el procesamiento del transcripto consiste en el agregado de un nucleótido GTP modificado llamado cap al extremo 5' y de una serie de pasos en los que las secuencias de los intrones son eliminadas y las secuencias de los exones unidas entre sí, dando origen a un mensajero maduro (mRNA) (Black, 2003; House & Lynch, 2008). Esta serie de pasos recibe el nombre de *splicing*.

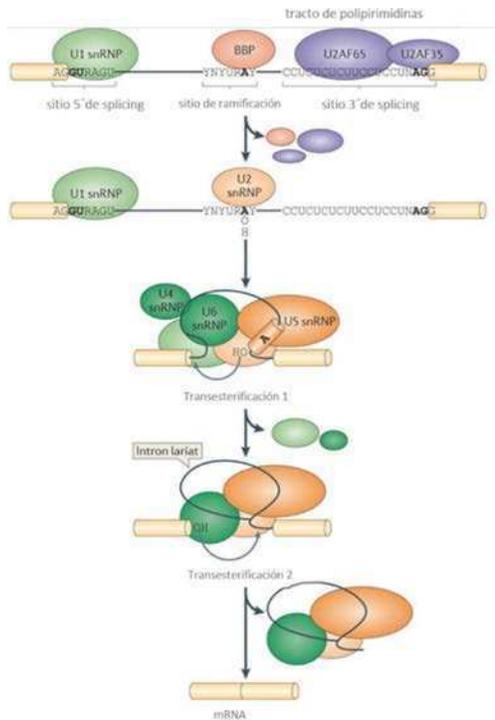
El RNA mensajero que aún no ha sufrido el proceso de *splicing* se conoce con el nombre de transcripto primario. Sin embargo, dada la naturaleza co-transcripcional del *splicing* -que discutiremos más adelante en esta sección- es probable que se trate de una entidad teórica para la mayoría de los genes eucariotas.

El *splicing* es catalizado por un gran complejo llamado spliceosoma, compuesto por ribonucleoproteínas. En la figura I1 se muestran las dos reacciones enzimáticas que explican cómo se elimina un intrón y se unen los dos exones que los flanquean. Los sitios 5' de splicing (5'SS) y 3' de splicing (3'SS) definen el comienzo y el final de cada intrón. Estas dos secuencias consenso, sumadas a una secuencia llamada trecho de polipirimidinas, presente en la región 3' del intrón, conforman los sitios de pegado de los factores de *splicing*, los complejos nucleares pequeños ribo-núcleo-proteicos o snRNPs (por sus siglas

en inglés) U1, U2, U4, U5, U6 y de los factores auxiliares de U2, U2AF65 y U2AF35.

El primer paso de reconocimiento de sitios de *splicing* involucra el pegado del snRNP U1 al 5'SS y el pegado del factor auxiliar U2AF al 3'SS. U2AF35 - la pequeña subunidad de U2AF- se una al borde intrón/exón y la subunidad grande, U2AF65, se una al trecho de polipirimidinas. El snRNP U2 reconoce el sitio de ramificación y un complejo formado por los snRNPs U4, U5 y U6 es reclutado al intrón (Staiger & Brown, 2013).

En la primera reacción de transesterificación se produce un ataque nucleofílico del OH presente en la posición 2' de una adenosina del sitio de ramificación al sitio 5'SS. En la segunda reacción de transesterificación el OH de la posición 3' del exón río arriba lleva a cabo un ataque nucleofílico al sitio 3'SS. Como resultado se obtiene un producto de RNA maduro que está compuesto por los dos exones. El intrón, que da origen a un intermediario de reacción con forma de lazo, es posteriormente degradado (figura I1).



**Figura I1: El spliceosoma cataliza las dos reacciones de *splicing*.** Se indican las secuencias consenso que participan del proceso de *splicing*: sitio 5'SS, sitio de ramificación, tracto de polipirimidinas y sitio 3'SS. La reacción de *splicing* comienza con un ataque nucleofílico del OH presente en la posición 2' de una adenosina del sitio de ramificación al sitio 5'SS. En la segunda reacción de transesterificación el OH de la posición 3' del exón río arriba lleva a cabo un ataque nucleofílico al sitio 3'SS. Como resultado se obtiene un producto de RNA maduro compuesto por los dos exones. (Tomado de Kornblihtt *et al*, 2013).

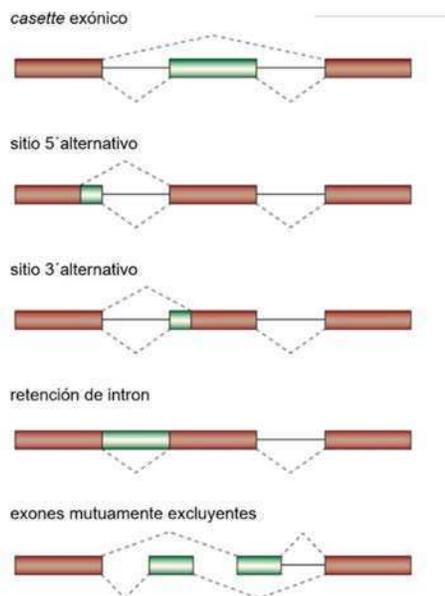
## El *splicing* y sus alternativas

Hasta aquí hemos explicado las reacciones químicas que participan del proceso de *splicing*. Ahora bien, los sitios de *splicing* a los que se pegan los factores que mencionamos pueden corresponder a secuencias débiles o fuertes. La fuerza de una secuencia expresa qué tan similar es una secuencia particular a la secuencia consenso. Esto determina, a su vez, qué tan eficiente es el pegado de los factores de *splicing*. Un sitio de *splicing* fuerte, igual a la secuencia consenso, es siempre reconocido por la maquinaria del spliceosoma. En ese caso de trata de eventos de *splicing* constitutivos.

La existencia de sitios débiles –que se alejan de la secuencia consenso– permite que el reconocimiento sea *parcial*, dando lugar a productos de mRNA *alternativos*. La proximidad entre sitios débiles y fuertes sobre un mismo precursor de RNA mensajero es lo que da origen al *splicing* alternativo (Ast, 2004).

Los primeros trabajos sobre *splicing* son de 1977 y muestran por microscopía electrónica como, al hibridar RNA mensajero de adenovirus con el DNA correspondiente, se forman bucles de hibridación (entre el mRNA y las secuencias correspondientes a los exones del DNA): esto demostró por primera vez la existencia de especies de mRNA producto de *splicing* (Berget *et al*, 1977; Chow *et al*, 1977). (¡Es decir, este año es el cumpleaños número 40 del *splicing*!)

La combinación de sitios de *splicing* fuertes y débiles a lo largo de un gen da como resultado diferentes tipos de eventos *splicing* alternativo: *cassette* exónico, sitios 5'SS alternativos, sitios 3'SS alternativos, la retención de intrón o el evento de exones mutuamente excluyentes (figura I2).



**Figura I2: Tipos de eventos de *splicing* alternativo.** Los exones constitutivos se muestran en rojo. En verde se muestran las regiones procesadas de forma alternativa. Las líneas sólidas corresponden a los intrones y las líneas punteadas muestran las posibles opciones de *splicing* alternativo. (Tomado de Ast, 2004).

Existen dos modelos alternativos para explicar cómo se reconocen los exones e intrones: el reconocimiento puede ocurrir por definición intrónica o por definición exónica. En el caso de la definición intrónica los componentes del spliceosoma reconocen secuencias consenso presentes en un mismo intrón del pre-mRNA. Este mecanismo suele ser el más habitual en especies con intrones cortos, como las levaduras. En especies con genomas más complejos en los que la longitud de los intrones es mucho mayor o los sitios de *splicing* se encuentran menos conservados se recurre a la definición exónica. En este caso, el reconocimiento llevado a cabo por los componentes del spliceosoma de los extremos del exón define la región que será parte del mRNA maduro (Berget *et al*, 1977).

El nivel de reconocimiento de las secuencias débiles presentes en el pre-mRNA está modulado por la participación de elementos regulatorios que actúan en *cis* y por factores proteicos que actúan en *trans*. Las secuencias regulatorias que actúan en *cis* pueden agruparse en sitios que actúan como *enhancers* -es decir, que regulan positivamente el uso de sitios de *splicing*- y en sitios que actúan como *silencers* -que regulan negativamente el mencionado uso. Estos elementos pueden estar presentes tanto en exones como en intrones. Por lo tanto, existen *splicing enhancers* exónicos, *splicing enhancers* intrónicos, *splicing silencers* exónicos y *splicing silencers* intrónicos. Los factores que reconocen

estas secuencias -y actúan en trans- se pueden agrupar en dos familias: las proteínas ricas en serinas y argininas, llamadas proteínas SR, y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP). Las proteínas SR reconocen principalmente a los *enhancers*, mientras que las hnRNPs reconocen principalmente a los *silencers* de *splicing* (figura I3).

**Figura I3: Secuencias y factores regulatorios de *splicing* alternativo.** Se muestran las secuencias que actúan en cis (*splicing silencer* intrónico ISS, *splicing enhancer* exónico ESE, *splicing silencer* exónico ESS, *splicing enhancer* intrónico ISE) y los factores que actúan en trans reconociendo estas secuencias, las proteínas SR y los hnRNPs. (Tomado de Kornblihtt *et al*, 2013).

mutaciones a partir de sitios de *splicing* fuertes, entonces, ¿por qué no son eliminados por selección negativa? Una posible explicación para el origen de los sitios ineficientes es que surgen por mutaciones en secuencias intrónicas, y que el estado de una inclusión de baja eficiencia corresponde con un período de prueba. Durante este período de prueba, además de producirse la nueva variante, se continúa produciendo la variante original. Según esta teoría, la evolución puede a partir de este punto favorecer la adquisición de la nueva variante, o eliminarla por completo. (Ermakova *et al*, 2006).

Sin embargo, la conservación de muchos eventos de *splicing*

## El *splicing* es co-transcripcional

La primera prueba de que el *splicing* alternativo es co-transcripcional surge de fotografías de microscopía electrónica de 1988. En la figura I4 se muestra una unidad transcripcional de embrión de *Drosophila* en la que se observa que el proceso de *splicing* ocurre sobre el transcripto naciente a medida que la RNAPII lo transcribe (Beyer & Osheim, 1988). En la imagen puede observarse la formación de bucles de *splicing* a medida que se eliminan los intrones.



**Figura I4:** Micrografía electrónica de una unidad transcripcional de embrión de *Drosophila*. Se muestra un gen que está siendo transcrito. La barra corresponde a 0.2  $\mu\text{m}$ . Las flechas muestran los bucles de *splicing*. (Tomado de Beyer y Osheim, 1988).

Desde la publicación de este trabajo se han escrito numerosos estudios con evidencias que muestran que existe acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* (Cramer *et al*, 1997, 1999; Kadener *et al*, 2001; Nogués *et al*, 2002; de la Mata *et al*, 2003). Es necesario señalar que nos referimos a un acoplamiento funcional, es decir, las propiedades de la reacción de *splicing* son afectadas significativamente por el proceso de transcripción. No se trata simplemente de dos reacciones que ocurren simultáneamente: el acoplamiento ocurre si la reacción de *splicing* depende de la transcripción (Lazarev & Manley, 2007) y, a su vez, la transcripción se ve afectada por el *splicing*.

Recientemente, Tilgner y colaboradores mostraron en experimentos de secuenciación de RNA proveniente de fracciones cromatínicas y citosólicas que el *splicing* asociado a la cromatina es predominantemente co-transcripcional. Los exones, cuyos intrones flanqueantes están siendo procesados, están enriquecidos

en marcas de cromatina, y esto es consistente con un rol de la cromatina en el *splicing* durante la transcripción. Para investigar esto, los autores desarrollaron un método que permite estudiar el grado de completitud o procesamiento de un evento de *splicing* en RNAs provenientes de diferentes fracciones. Como era de esperar, en los RNAs poliadenilados provenientes de fracciones citosólicas, el índice de completitud indica que casi el total de los eventos ya ha sido procesado. En los RNAs nucleares sin poliadenilar la mayoría de los eventos ha sido procesada- y esta tendencia es aún mayor en los RNAs provenientes de la fracción de cromatina-. Esto demuestra que en la fracción de cromatina, el proceso de *splicing* ya se ha completado para la mayoría de los RNAs estudiados antes de que finalice la transcripción (Tilgner *et al*, 2012).

En un trabajo realizado en levaduras se demostró que el proceso de *splicing* coincide con la salida de la RNAPII del final del intrón: con técnicas de secuenciación de RNA de alta resolución (una base) se analizaron los RNAs naciente de 87 genes de levaduras (esto representa un tercio de los genes que contienen intrones en este organismo). A las moléculas de RNA se les agregó un adaptador en el extremo 3'. Esto permite conocer la posición de la RNAPII en cada molécula de RNA naciente y estudiar cómo progresa la reacción de *splicing* en función de la posición de la RNAPII. Los autores encontraron que, cuando la RNAPII transcribe aproximadamente 26-27 nucleótidos río abajo del sitio 3'SS comienza la catálisis de *splicing*, y que esta se completa cuando la RNAPII se encuentra por la posición 130-350 (Carrillo Oesterreich *et al*, 2016). Este trabajo es una evidencia de altísima resolución de que el *splicing in vivo* es co-transcripcional (figura I5).

**Figura I5: El comienzo del *splicing* coincide con la salida de la RNAPII del intrón.** Panel superior: el gráfico muestra un esquema de un gen (cuadrados, exones, línea roja, intrón) y la fracción de transcritos en los que el *splicing* ya ha ocurrido en función de la posición de la RNAPII. Panel inferior: diagrama esquemático que muestra que el *splicing* ocurre cuando la RNAPII se encuentra 26-27 nucleótidos río abajo del sitio 3'SS. El spliceosoma y la polimerasa se encuentran separados por 2-3 nucleótidos. (Tomado de Carrillo Oesterreich *et al*, 2016).

diferentes especies. En *Arabidopsis* el CTD tiene 34 repeticiones de la héptada consenso; en humanos, 52 (Koiwa *et al*, 2004). Las modificaciones en el CTD regulan su afinidad por factores que participan del procesamiento del RNA - agregado del *cap*, corte y poliadenilación y *splicing* alternativo -. Si la transcripción es llevada a cabo por una RNAPII que carece de CTD, entonces el *splicing* ocurre de manera ineficiente (McCracken *et al*, 1997).

Una de las modificaciones post-traduccionales de las que puede ser sustrato el CTD es la fosforilación. El resultado de la fosforilación depende del residuo en el cual ocurre. Por ejemplo, la fosforilación en serina 5 se asocia al reclutamiento de enzimas que agregan el *cap* al extremo 5' del RNA, mientras que la fosforilación en serina 2 participa del procesamiento del extremo 3' del RNA (Kim *et al*, 2004). El patrón de fosforilación del CTD determina el reclutamiento de factores de *splicing* a los sitios de transcripción (Muñoz *et al*, 2010; Moore & Proudfoot, 2009; Perales & Bentley, 2009).

Por otra parte, Huang y colaboradores mostraron que el complejo “mediador” regula el *splicing* alternativo a través del reclutamiento de factores de procesamiento del RNA (Huang *et al*, 2012). “Mediador” es un complejo formado por múltiples subunidades que integra el núcleo de la maquinaria transcripcional. Está organizado en los siguientes módulos: “cabeza”, “medio”, “cola” y módulo quinasa. Algunas subunidades del dominio “cola” interactúan con factores activadores o represores de la transcripción, mientras que el módulo “cabeza” interactúa con la RNAPII. A través de la conexión entre la RNAPII y los factores activadores o represores de la transcripción, “mediador” ayuda a establecer el complejo de preiniciación en los promotores. También se encontró que un componente del complejo “mediador” interactúa con factores reguladores de *splicing*, como el regulador hnRNP L (Ji & Fu, 2012; Huang *et al*, 2012).

## El modelo cinético

El modelo cinético postula que la tasa de elongación de la RNAPII afecta las decisiones de *splicing* alternativo. La primera evidencia directa de que la velocidad de la elongación de la RNAPII regula el *splicing* alternativo en células humanas se realizó con una RNAPII con una mutación puntual que le confiere

una menor tasa de elongación y un minigén reportero de *splicing* alternativo. La transcripción llevada a cabo por la RNAPII lenta produce un aumento en la tasa de inclusión del exón alternativo EDI del gen de la fibronectina en comparación con la RNAPII salvaje (de la Mata *et al*, 2003). Como se observa en la figura I6, en el caso del exón EDI de la fibronectina hay dos sitios 3´SS. El sitio 3´SS río arriba del exón alternativo es un sitio débil mientras que el sitio 3´SS río abajo es un sitio fuerte (esto quiere decir que se asemeja más a la secuencia correspondiente al consenso que el sitio débil). Si la tasa de elongación de la transcripción es rápida, o la RNAPII no hace pausas durante la transcripción, entonces, ambos sitios 3´SS son presentados a la maquinaria de *splicing* simultáneamente. Por lo tanto, en la competencia el sitio fuerte le gana al débil, y esto produce la exclusión del exón alternativo. En cambio, si la velocidad de la elongación de la transcripción es lenta, o la RNAPII hace pausas durante la transcripción, la maquinaria de *splicing* se encontrará con el sitio 3´SS río arriba antes de encontrarse con el sitio 3´SS río abajo. Por lo tanto, en este caso se favorece la inclusión del exón alternativo. Esto no quiere decir que necesariamente el primer intrón sea eliminado antes que el segundo: una vez que se alcanza el “compromiso” que conduce a la inclusión del intrón, el orden de remoción de los intrones pasa a ser irrelevante (de la Mata *et al*, 2010; Naftelberg *et al*, 2015).

En la mayoría de los casos estudiados, una RNAPII lenta se asocia al reconocimiento de un sitio de *splicing* débil, y como resultado, produce una mayor inclusión (de la Mata *et al*, 2003). Sin embargo, en algunos casos una RNAPII lenta promueve una mayor exclusión del exón alternativo favoreciendo el reclutamiento de factores negativos a los sitios de *splicing* (Dujardin *et al*, 2014). En ambos casos, la velocidad de elongación de la transcripción es un factor clave en la regulación del *splicing* alternativo.

**Figura I6: El modelo cinético.** Las cajas corresponden a los exones y las líneas a los intrones. Se muestra un evento de exón *cassette* alternativo. El primer sitio 3'SS corresponde a un sitio débil, el segundo 3'SS corresponde a un sitio fuerte. Si la elongación de la transcripción es rápida, los dos sitios son presentados a la maquinaria de *splicing* al mismo tiempo. Esto favorece el reconocimiento del sitio fuerte y promueve la exclusión del exón alternativo. Por el contrario, si la elongación de la transcripción es lenta entonces la maquinaria tiene tiempo de reconocer al sitio débil antes de que le sea presentado el fuerte. Esto promueve la inclusión del exón alternativo.

de que la cromatina está organizada en unidades repetitivas de histonas y aproximadamente 200 pb de DNA data de 1974 (Kornberg & Thomas, 1974) y desde entonces se ha aprendido mucho sobre las funciones de la cromatina, además de la simple compactación del material genético en las células eucariotas.

El nucleosoma es un complejo multimérico formado por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Se compone de un tetrámero de histonas H3 y H4, flanqueado por dos monómeros de histonas H2A y H2B. Alrededor del octámero de histonas se enrollan 147 pb de DNA. El nucleosoma es uno de los complejos de proteína-DNA más estables en condiciones fisiológicas y no debe ser entendido como una unidad estática, sino que posee propiedades dinámicas que están cuidadosamente reguladas. (Li *et al*, 2007).

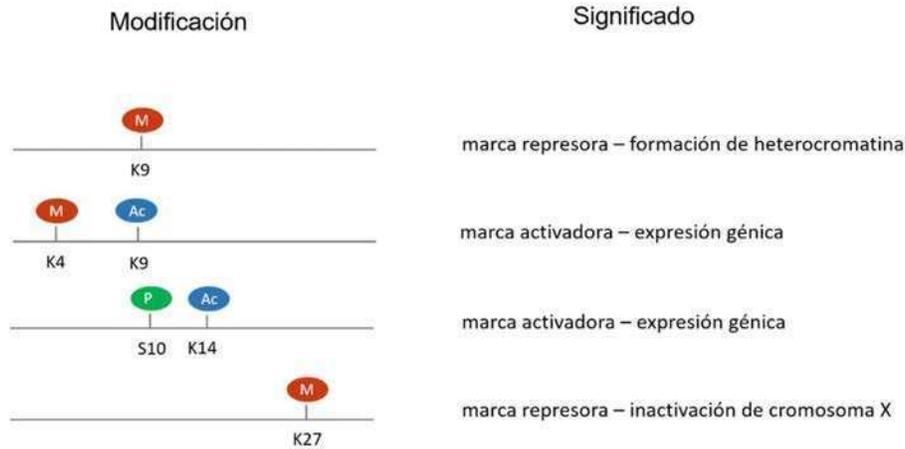
Además de las histonas que conforman el nucleosoma, la histona H1 funciona como histona *linker* entre los nucleosomas, estabilizándolos y promoviendo la formación de estructuras de cromatina de alto orden (Wolffe & Hayes, 1999).

Las histonas que forman el corazón del nucleosoma interactúan fuertemente entre sí, dejando su región N-terminal sobresaliendo del núcleo central. Estos dominios N-terminales de las histonas interactúan entre sí dando origen a estructuras de cromatina de mayor orden. Tanto los dominios globulares como los extremos N-terminales pueden ser sustrato de diversas modificaciones post-traduccionales, que incluyen acetilación, metilación, fosforilación y glicosilación, entre otras. Las modificaciones que están asociadas con una transcripción activa, como la acetilación en histona H3 o en histona H4, o la di- o trimetilación en la lisina 3 de la histona H4, son conocidas como modificaciones de eucromatina. Por el contrario, las modificaciones como la dimetilación en la lisina 9 de la histona H3 o en la lisina 27 de la histona H3 son conocidas como modificaciones de heterocromatina. La acetilación de histonas es llevada a cabo por una variedad de complejos de histona acetiltransferasas. En cambio, modificaciones como la metilación, la fosforilación o la ubiquitinación de histonas son generalmente catalizadas por una única enzima en un sitio específico. Con excepción de la metilación, las modificaciones post-

traduccionales alteran la carga neta del nucleosoma y esto repercute en las interacciones entre las histonas y el DNA (Li *et al*, 2007).

En la década de 1980, algunos estudios encontraron una correlación entre acetilación de histonas y genes que se encontraban transcripcionalmente activos e identificaron el rol que juegan algunas lisinas específicas en el silenciamiento de la transcripción en los telómeros y en el control del *locus* de apareamiento en levaduras. Estos descubrimientos sustentan la hipótesis de que la acetilación de histonas en sitios definidos en el genoma afecta la expresión génica a través de cambios en el grado de compactación de la cromatina (Verdin & Ott, 2014).

En la figura I7 se muestran algunos ejemplos de modificaciones post-traduccionales en los residuos N-terminales de la histona H3 y su significado en cuanto a la activación o represión de la transcripción.



**Figura I7: ejemplos de modificaciones post-traduccionales en residuos de la histona H3 y su significado sobre la expresión génica.** Se indica el residuo aminoacídico con el código de una letra (K, lisina, S, serina). El número corresponde a la posición del aminoácido. Se indican las posibles modificaciones post-traduccionales. M: metilación. Ac: acetilación. P: fosforilación.

Existe un conjunto de enzimas responsables de realizar las modificaciones post-traduccionales en las histonas y también, enzimas encargadas de removerlas. Por ejemplo, en el caso de la acetilación de histonas, las enzimas acetiltransferasas colocan un grupo acetilo en la lisina correspondiente, mientras que las deacetilasas de histonas las remueven. Además de las moléculas que

“escriben” y las que “borran” las marcas en las histonas, hay proteínas que reconocen estas modificaciones, es decir, son capaces de “leerlas”. Por ejemplo, el dominio SRC-homología 2 reconoce específicamente péptidos que contienen tirosinas fosforiladas, mientras que el llamado bromodominio es capaz de reconocer específicamente lisinas acetiladas. Los bromodominios están presentes en diversas proteínas y podrían explicar el reclutamiento de mediadores transcripcionales a una cromatina con diferentes niveles de acetilación (Verdin & Ott, 2014).

Además de las modificaciones post-traduccionales en las histonas otros procesos que regulan la estructura de la cromatina son el desplazamiento de nucleosomas por complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, el desplazamiento de histonas, la incorporación de variantes de histonas, el reclutamiento de y la accesibilidad a factores de transcripción y el desplazamiento de histonas (Verdin & Ott, 2014; Li *et al*, 2007).

## Cromatina y *splicing* alternativo

Entonces, volviendo a la regulación del *splicing* alternativo en general, y al modelo cinético en particular, nos preguntábamos qué factores o condiciones son capaces de modular la tasa de elongación de la transcripción *in vivo*. Uno de ellos es la estructura de la cromatina.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio en células animales en cultivo se encontró que un activador transcripcional que inhibe la elongación de la RNAPII produce cambios en el *splicing* alternativo de EDI. Esto se observa sobre un plásmido al que se le permite replicarse dentro de la célula y por lo tanto tiene una estructura de cromatina similar a la fisiológica (Kadener *et al*, 2001). Además, la tricostatina A (TSA), inhibidor de deacetilasas de histonas, inhibe la inclusión en el minigén de EDI y este efecto solo se observa si el plásmido que contiene al minigén se replica dentro de la célula (Nogués *et al*, 2002).

Por otra parte, otro trabajo demostró que un RNA de interferencia corto (siRNA) dirigido contra una secuencia intrónica próxima a un exón alternativo modula el *splicing* alternativo a través de la formación de heterocromatina (Alló

*et al*, 2009) . Además, el tratamiento con drogas que abren la cromatina produce el efecto contrario sobre el *splicing* alternativo que el tratamiento con el siRNA intrónico.

Siguiendo con esta línea de experimentos, en otro trabajo se demostró que la despolarización neuronal produce cambios cromatínicos intragénicos en el gen de la molécula de adhesión celular neural (NCAM). La despolarización aumenta la acetilación global de histonas en la línea celular N2a y además produce un aumento de la acetilación de histonas en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) en la región del exón alternativo 18 de NCAM, promoviendo la exclusión del exón 18. El cambio en la estructura de la cromatina provocado por la despolarización modula el *splicing* alternativo a través de la regulación de la elongación de la RNAPII (Schor *et al*, 2009). En una publicación reciente se demostró cómo la diferenciación neuronal en la línea celular N2a produce la formación de una cromatina compacta en el *locus* del NCAM, y esto, a su vez, promueve la inclusión del exón alternativo 18. La diferenciación neuronal aumenta la presencia de marcas represoras como la dimetilación en H3K9 o la trimetilación en H3K27 tanto en el gen de NCAM como en el que codifica para G9a, la metiltransferasa de histonas encargada de realizar la dimetilación en H3K9 (Fiszbein *et al*, 2016) y esto correlaciona con menor una tasa de elongación (Schor *et al*, 2013).

En todos estos trabajos una tasa de elongación de transcripción lenta correlaciona con una mayor inclusión de exones alternativos. Sin embargo, en otro trabajo se encontró que una RNAPII lenta es capaz de producir el efecto contrario, es decir, promover la exclusión, en algunos eventos de *splicing* alternativo. Este es el caso del exón 9 del gen CFTR (Dujardin *et al*, 2014). El tratamiento con drogas que inhiben la elongación, como la camptotecina (CPT), promueve la exclusión, mientras que el tratamiento con drogas que provocan una apertura de la cromatina, como la TSA, produce un aumento de la inclusión. En este caso, una menor tasa de elongación promueve el reclutamiento de un regulador de *splicing* negativo, ETR-3, a un sitio de *splicing*, que desplaza a U2AF65 del trecho de polipirimidinas, favoreciendo la exclusión del exón alternativo.

## Cromatina y *splicing* alternativo en plantas

La relación entre la estructura de la cromatina y el *splicing* en plantas no ha sido tan estudiada como en células animales. Si bien aún no se sabe si la estructura de la cromatina puede producir cambios en el *splicing*, se ha demostrado recientemente que la maquinaria de *splicing* puede afectar la metilación de DNA dirigida por el RNA, un mecanismo que involucra a modificadores epigenéticos y que es característico de plantas (Mathieu & Bouché, 2014). En este tipo de metilación de DNA, las metiltransferasas son dirigidas a los *loci* target por ribonucleoproteínas y RNAs pequeños. Esto es importante para mantener el silenciamiento en transposones (Bond & Baulcombe, 2015). Además, plantas de *Arabidopsis* deficientes en una proteína SR, SR45, presentan niveles alterados en esta metilación, sugiriendo la participación de SR45 -y, eventualmente, de la maquinaria de *splicing*- en el establecimiento o el mantenimiento de la marca (Ausin *et al*, 2012). Por otro lado, una planta mutante para la metiltransferasa de histonas PRMT5 presenta cambios en *splicing* alternativo de un subgrupo de genes, entre los cuales se encuentra PRR9, un componente del reloj biológico. PRMT5 es una metiltransferasa de argininas que metila histonas y componentes del spliceosoma. La mutante de *Arabidopsis* y moscas de *Drosophila* deficientes en la enzima presentan alteraciones en sus ritmos biológicos, sugiriendo la existencia de convergencia evolutiva (Sánchez *et al*, 2010).

Si bien hay evidencias de puntos de contacto entre el *splicing* y la estructura de la cromatina en plantas, no sabemos si cambios en la estructura de la cromatina, o en la elongación de la RNAPII, pueden producir cambios en *splicing* alternativo en plantas, como ocurre en células animales.

## El ciclo de la transcripción

Como mencionamos anteriormente, existe un acoplamiento funcional entre la transcripción y el *splicing* alternativo (es decir, las propiedades de la reacción de *splicing* son afectadas significativamente por el proceso de transcripción, y viceversa).

En eucariotas, la transcripción de los genes que codifican para proteínas es llevada a cabo por la RNAPII. El proceso de transcripción es complejo y está regulado en diferentes niveles. El ciclo de la transcripción comienza con la formación del complejo de pre-iniciación, que consiste en el reclutamiento de los factores generales de transcripción y la RNAPII a la región promotora basal o mínima. En este estado, la polimerasa no es capaz de comenzar la transcripción, por lo que un cambio conformacional es requerido para iniciarla. Este cambio está asociado a una fosforilación de las serinas 5 del CTD por Cdk7, la subunidad catalítica del factor de transcripción general TFIIF (Akoulitchev *et al.*, 1995). Luego de una rápida iniciación, la RNAPII realiza una pausa en la región proximal, unos 30-60 nucleótidos río abajo del sitio de inicio de la transcripción (Jonkers & Lis, 2015). La pausa de la polimerasa es un paso regulatorio de la transcripción en diversos genes del desarrollo y de genes que participan en cascadas de respuestas a estímulos. El modelo actual sostiene que el nivel de la pausa depende de un balance entre factores que la promueven y factores que activan la salida de la misma. La salida de la pausa se asocia a un incremento en la fosforilación en las serinas 2 del CTD, del cual es responsable el factor de elongación positivo P-TEFb. Esto constituye un paso crítico y necesario en la regulación de la transcripción (Price, 2000; Jonkers & Lis, 2015).

Luego de que la polimerasa sale de la zona de pausa en la región proximal comienza la etapa de elongación productiva. La tasa de la elongación varía de gen a gen y muchos son los factores que pueden modularla, incluyendo las modificaciones post-traduccionales en las histonas, que se discutieron en el apartado anterior.

En este punto resulta necesario distinguir entre dos conceptos relacionados pero diferentes: *tasa de elongación* y *procesividad*. El primero corresponde a la velocidad de elongación de la RNAPII, medido en cantidad media de nucleótidos añadidos por unidad de tiempo. El segundo corresponde a la capacidad de la RNAPII de poder recorrer un molde en forma completa sin desprenderse, y puede medirse como cantidad media de nucleótidos añadidos por cada evento de iniciación. Si bien estos dos parámetros están relacionados, pueden ser afectados en forma conjunta o en forma independiente por diferentes factores (Mason & Struhl, 2005). Sin embargo, normalmente se los suele tratar

como una medida de lo mismo; esto se debe principalmente a la dificultad de medir ambos parámetros por separado *in vivo*.

Durante la etapa de elongación productiva, la RNAPII puede realizar pausas en el camino. La polimerasa no se detiene en una única posición, sino que avanza, hace una pausa y luego vuelve hacia atrás (esto recibe el nombre de *backtracking*). El arresto transcripcional es causado por un fuerte desalineamiento de la polimerasa respecto del extremo 3' del RNA naciente (Sims *et al*, 2004). Una pausa que no es resumida rápidamente puede incluso llevar a un arresto transcripcional (Gu & Reines, 1995). Este estado no puede ser revertido por la propia polimerasa y requiere del factor de elongación TFIIS. En este punto, TFIIS promueve el corte del transcrito naciente de la enzima que se encuentra retrocediendo por la RNAPII y permite que el sitio activo, el RNA y el molde vuelvan a alinearse (Fish & Kane, 2002; Conaway *et al*, 2003). La RNAPII reanuda su camino una vez que P-TEFb fosforila las serinas 2 del CTD, continuando de esa manera con la elongación productiva.

La finalización de la transcripción ocurre varios nucleótidos río abajo de la señal de corte y poliadenilación. El principal modelo de terminación propuesto es el mecanismo denominado “torpedo”, que involucra la acción de una exonucleasa que degrada el RNA de 5' a 3' que corresponde a la región río abajo del sitio de corte, hasta alcanzar a la polimerasa y provocar su desprendimiento del DNA (West *et al*, 2004).

Hasta aquí hemos mencionado brevemente algunos puntos críticos de la regulación de la transcripción y del *splicing* alternativo en eucariotas en general. A continuación, vamos a abordar algunos aspectos de la regulación del *splicing* alternativo en plantas, en particular.

## Regulación del *splicing* alternativo en plantas

El *splicing* alternativo es un proceso muy frecuente en plantas: más del 60% de los genes que contienen intrones son procesados por *splicing*. Las proteínas SR, reguladores de *splicing* alternativo, se expresan de manera diferencial en distintos tejidos y estadios del desarrollo. Esto sugiere que existe

una regulación específica de tejidos del *splicing* alternativo en plantas. (Reddy *et al*, 2013).

Las proteínas SR tienen una estructura conservada que consiste en uno o dos dominios de unión al RNA en la región N-terminal y un dominio en la región C-terminal rico en serinas y argininas (RS) que puede ser fosforilado. La unión de las proteínas SR al RNA es mediada por el dominio de unión al RNA, que reconoce a los *splicing enhancers* y *silencers*. El dominio SR participa de interacciones proteína-proteína que promueven el reclutamiento de la maquinaria de *splicing*, y también puede interactuar con el pre-mRNA a través del sitio de ramificación o del sitio 5'SS. Una característica de los genes que codifican para las proteínas SR tanto en humanos como en plantas es que son reguladas por *splicing* alternativo. La mayoría de los genes que codifican para proteínas SR en *Arabidopsis* sufren *splicing* alternativo dando como resultado más de 90 transcritos; esto aumenta la complejidad del universo de proteínas SR en plantas (Duque, 2011)

Muchas de las proteínas SR de plantas funcionan en extractos de células humanas previamente depletados de proteínas SR humanas, confiriendo la capacidad de catalizar reacciones de *splicing* (Duque, 2011).

Por otra parte, la longitud de los exones de plantas y animales es muy diferente: las plantas poseen intrones mucho más cortos que los animales -la longitud promedio de un intrón de plantas es de 160 pb, mientras que la de un intrón de origen animal es de 5000 pb-. Además, en plantas existe casi el doble de tipos de proteínas SR que en humanos (19 genes que codifican para proteínas SR en plantas, 11 en humanos y 7 en *C. elegans*). Además de contar con genes homólogos en plantas y humanos, las plantas poseen proteínas SR específicas que no están presentes en animales. Es probable que la duplicación de genomas enteros -se estima que en *Arabidopsis* ocurrieron tres rondas de duplicación del genoma-, seguida de rearrreglos genómicos a lo largo de la evolución, diera como resultado el escenario complejo de factores de *splicing* actual (Kalyna & Barta, 2004). Cabe preguntarse si los miembros de estas familias cumplen roles meramente redundantes o han adquirido nuevas funciones a lo largo de la evolución (Reddy *et al*, 2013).

Una particularidad de los genes que codifican proteínas SR en *Arabidopsis* es la presencia de uno o dos intrones largos (de entre 400 y 1000 nucleótidos). La posición de estos intrones está conservada entre genes parálogos. En nueve de estos genes, el intrón largo sufre *splicing* alternativo, dando como resultado algunas variantes de *splicing* con codones de terminación prematuros. En algunos casos este evento de *splicing* alternativo se encuentra en la región que codifica el dominio de unión al RNA, mientras que en otros casos está en la región que codifica el dominio rico en serinas y argininas. Los genes que codifican las proteínas SR son regulados por *splicing* alternativo. Las proteínas SR, a su vez, regulan el *splicing* alternativo de otros eventos -entre los cuales se encuentran transcritos que codifican para proteínas SR (Kalyna & Barta, 2004)-.

Trabajos realizados en plantas y animales con un enfoque global muestran que ciertas modificaciones en el DNA, como la metilación de citosinas, y cambios en la estructura de la cromatina, como modificaciones post-traduccionales en histonas o posicionamiento de nucleosomas, delimitan las juntas entre exones e intrones (Braunschweig *et al*, 2013; Reddy *et al*, 2013). Tanto en *Arabidopsis* como en humanos, utilizando la técnica de digestión con MNasa (nucleasa micrococcal que corta el DNA “*linker*” que se encuentra entre nucleosomas) seguida de secuenciación, se encontró que los nucleosomas están preferentemente posicionados en exones (Schwartz *et al*, 2009; Tilgner *et al*, 2009; Chodavarapu *et al*, 2010).

Si bien los mecanismos moleculares básicos del *splicing* son compartidos por plantas y animales -los sitios consenso 5' y 3' de *splicing*, y el sitio de ramificación son comparables en ambos grupos (Simpson *et al*, 2002) - la frecuencia de cada tipo de evento de *splicing* alternativo es muy distinta (ver Figura I8). En animales, el tipo de evento más abundante es el de exón *cassette*, mientras que en plantas es el de retención de intrón.

Evento de <i>splicing</i>	Humano	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	>40%	~8%
	~18.4%	~15.5%
	~7.9%	~7.5%
	<5%	~40%

 Región constitutiva       Región alternativa

**Figura I8:** Frecuencia de tipos de eventos de *splicing* alternativo en humanos y plantas. Se indica el tipo de evento de *splicing* alternativo y la frecuencia de cada uno en humanos y en *Arabidopsis thaliana*. (Tomado de Reddy *et al*, 2013).

Las plantas son organismos sésiles, por lo tanto, responden fuertemente a estímulos ambientales. Se ha estudiado que el estrés abiótico (como los cambios en temperatura, estrés salino o estrés lumínico) o el biótico (la defensa ante patógenos), como así también cambios endógenos (tiempo de floración, regulación por el reloj circadiano) pueden producir cambios en la regulación de la expresión génica afectando la regulación del *splicing* alternativo (Staiger & Brown, 2013). En esta tesis nos vamos a concentrar sobre el efecto que produce la luz sobre el *splicing* alternativo en plantas.

## Antecedentes para esta tesis

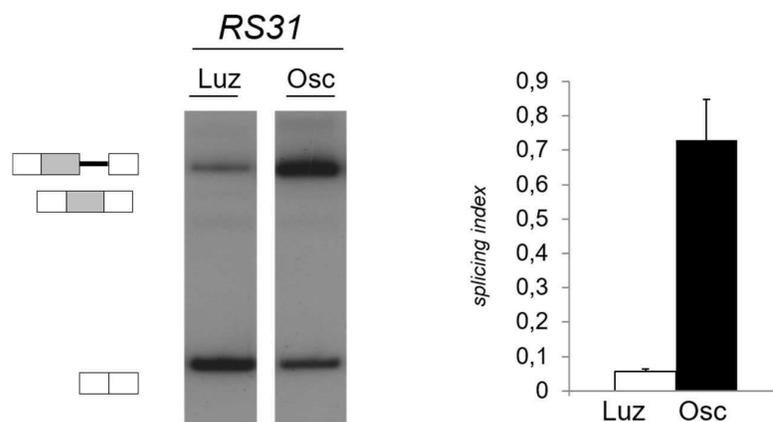
El laboratorio de Alberto Kornblihtt se ha dedicado históricamente a estudiar la regulación del *splicing* alternativo en modelos de células animales. Hace aproximadamente diez años, Ezequiel Petrillo comenzó a estudiar cómo se regula el *splicing* alternativo en plantas.

Como se mencionó en el apartado anterior, las plantas poseen reguladores de *splicing* alternativo que no están presentes en animales. Uno de ellos es el regulador de *splicing* rico en argininas y serinas llamado RS31.

Ezequiel comenzó a estudiar la regulación de la expresión del gen de RS31. RS31 tiene tres isoformas de *splicing* alternativo, llamadas mRNA1, mRNA2 y mRNA3 (mRNA1 corresponde al mensajero más corto, mRNA 3 corresponde al mensajero más largo). Sólo la isoforma mRNA1 es traducida y da origen a la proteína SR. En la figura I9 se muestra un esquema de RS31 y sus tres isoformas de *splicing* alternativo.

plantas fueron crecidas una o dos semanas en luz continua, luego transferidas a oscuridad por 48 hs y posteriormente incubadas en luz o en oscuridad por 6 hs. Al finalizar la incubación, se extrajo el RNA y analizó por RT-PCR los niveles de RS31.

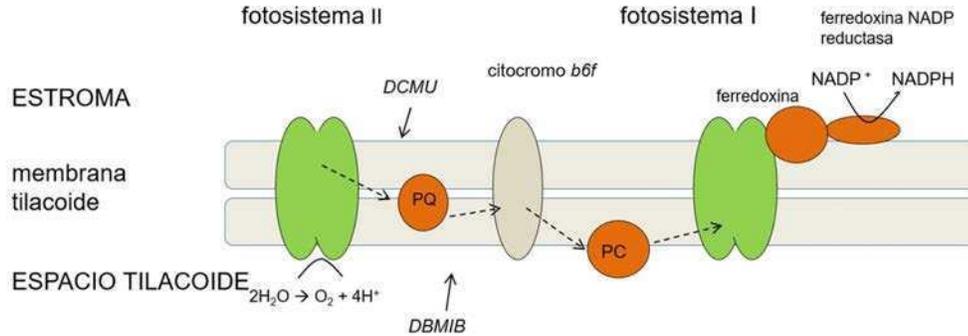
Para cuantificar este cambio se grafica el *splicing index*, que es el cociente de la abundancia de la isoforma más larga (mRNA3) sobre la del total de las isoformas. En este caso (como en la mayoría de los experimentos) los niveles de mRNA2 no se detectan, por lo tanto el *splicing index* se calcula como  $mRNA3/(mRNA1 + mRNA3)$ . En la figura I10 se muestra el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31.



**Figura I10: Efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31.** RT-PCR de RS31. Se observan las bandas correspondientes al mRNA3 y al mRNA1. Se grafica el *splicing index* ( $mRNA3/(mRNA1+mRNA3)$ ) para cada condición. Barra blanca: luz. Barra negra: oscuridad.

Para investigar cómo hacen las plantas para percibir la luz, Ezequiel trabajó con mutantes de fitocromos y criptocromos, y encontró que las plantas mutantes respondían al igual que las salvajes al efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo (datos no mostrados). Entonces se preguntó si el cloroplasto podría estar funcionando como el sensor de luz. Para estudiar esto incubó a las plantas con drogas que interrumpen la cadena de transporte electrónico fotosintético. El DCMU [3-(3,4-dichlophenyl)1,1-dimethylurea] impide el transporte de electrones desde el fotosistema II hacia el *pool* de plastoquinonas, (Khandelwal *et al*, 2008) y el DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone) impide el transporte de electrones desde el *pool* de plastoquinonas hacia el citocromo b6f

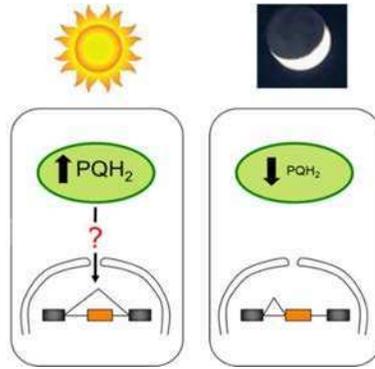
(Schansker *et al*, 2005). En la figura I11 se muestra cómo actúan ambas drogas en la cadena de transporte de electrones.



**Figura I11: Efecto del DCMU y del DBMIB sobre la cadena de transporte de electrones fotosintética.** Se muestra un esquema de la cadena de transporte. El DCMU impide el transporte de electrones desde el fotosistema II hacia el *pool* de plastoquinonas y el DBMIB impide el transporte de electrones desde el *pool* de plastoquinonas hacia el citocromo b6f.

Ezequiel encontró que el DCMU imitaba el efecto de la oscuridad y el DBMIB imitaba el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31. Esto será retomado en la sección de resultados de esta tesis.

Como se puede ver en la figura I11, el DCMU impide el transporte de electrones desde el fotosistema II hacia el *pool* de plastoquinonas. Por lo tanto, el DCMU produce un aumento en la proporción de plastoquinonas oxidadas. Por otra parte, el DBMIB impide el transporte de electrones desde el *pool* de plastoquinonas hacia el citocromo b6f. Entonces, el DBMIB produce un aumento de la proporción de plastoquinonas reducidas. Estos resultados permiten elaborar un modelo en el que, en presencia de luz, aumenta el *pool* de plastoquinonas reducido y esto gatilla una señal que cambia el *splicing* alternativo en el núcleo (figura I12). Aún no conocemos cuál es la naturaleza de la señal, ni el mecanismo que explica cómo se modifica el *splicing* alternativo.



**Figura I12:** El estado redox del *pool* de plastoquinonas regula el *splicing* alternativo. El modelo muestra que, en presencia de luz, aumenta la proporción de plastoquinonas (PQH<sub>2</sub>) reducidas, y esto envía una señal al núcleo de la célula, que regula el *splicing* alternativo. En oscuridad aumenta el *pool* de plastoquinonas oxidadas.

El efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo es el disparador de esta tesis. En la primera parte de la tesis nos proponemos profundizar el estudio del efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31. En la segunda parte de la tesis, que es la más extensa, nos proponemos investigar si el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo en plantas está relacionado con cambios en la cromatina y/o en la elongación de la transcripción por la RNAPII

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar la regulación del *splicing* alternativo y la elongación de la transcripción en plantas.

La tesis está articulada en dos partes. La primera parte de la tesis busca profundizar algunos aspectos sobre la regulación de *splicing* alternativo en plantas por acción de la luz.

Los objetivos particulares de la primera parte son:



# MATERIALES Y MÉTODOS

algunas oportunidades) a un tratamiento con DNasa, empleando la enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega). A partir de aproximadamente 1 µg del RNA (medido por fluorimetría con Qubit de Invitrogen), se sintetizó cDNA utilizando la enzima MMLV-RT o la SuperScript III (Invitrogen), y oligo dT como primer según el siguiente protocolo:

### **Transcripción reversa**

Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

RNA (aproximadamente 1 ug, volumen final 2 ul)

0,5 µl de oligo dT (oligo de 12-18 nucleótidos) 0,5 µg/µl

0,5 µl de dNTPs 10 mM

Se procede con el siguiente protocolo:

Para cuantificar la relación de isoformas de RS31, U2AF65 y RS2Z33 utilizamos la técnica de PCR semi-cuantitativa (en presencia de [

Al finalizar la reacción de PCR radiactiva, se procede a separar los productos corriéndolos en un gel de poliacrilamida 6-8 % nativo. Luego de la corrida se seca el gel sobre un papel *Whatman* 3MM, se le colocan orientadores fluorescentes y se lo expone a una película para generar una autorradiografía. De esta manera se pueden observar las bandas correspondientes a los diferentes productos de PCR que son generados por la amplificación del cDNA de las diferentes isoformas. Para cuantificar estos productos se orienta la película sobre el gel ayudándonos con las marcas generadas por los orientadores fluorescentes, se recortan las bandas correspondientes a los productos de interés, y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador beta. Debido a que utilizamos el isótopo  $^{32}\text{P}$ , que es un emisor beta de alta energía, podemos evitar el uso de líquido de centelleo para amplificar la señal, y contamos la radiactividad en seco, por el método de Cherenkov. Luego, determinamos el *splicing* index ( $\text{mRNA3}/(\text{mRNA1}+\text{mRNA3})$ ) para cada condición. Graficamos el promedio junto con el desvío o el error estándar. Realizamos la prueba estadística Test de Student.

### **PCR en tiempo real o qPCR**

Para evaluar los niveles de RNA mensajero expresados en las distintas condiciones, se realiza, luego de la retrotranscripción, una reacción de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. Paralelamente a las muestras se prepara una curva de calibración, compuesta por diez diluciones sucesivas al medio a partir de una dilución de una mezcla de todas las muestras a medir. Cada una de las muestras es diluida entre 1:10 y 1:50 para que entre en el rango medio de la curva de calibración.

Mezcla de reacción de PCR que se agrega a una dilución del ADNc:



siguiendo el protocolo descrito por Craig Simpson y sus colaboradores (Simpson *et al*, 2008). En el Apéndice detallo los *primers* utilizados (lista de *primers* del panel).

g por cinco minutos y se descarta el sobrenadante. Se resuspende en 1 ml de W5, centrifuga 5 minutos a 100 g y descarta el sobrenadante. Se resuspende en 500  $\mu$ l de W5 y se plaquea la suspensión de protoplastos en una placa de cultivo de 12-pocillos previamente tratada con BSA 5% para evitar que la suspensión se adhiera al plástico. Se incuba el tiempo deseado, centrifuga, descarta el sobrenadante y resuspende en 500  $\mu$ l de TRI-Reagent para extraer RNA.

### **7.3. Experimento de los medios condicionados.**

Se preparan protoplastos como se indica en la sección 6.1. y se los incuba en luz o en oscuridad por 48 hs. Luego se centrifugan los protoplastos y se colectan los medios condicionados. Los medios condicionados se utilizan para incubar protoplastos receptores, que se encuentran en oscuridad, por 6hs. Luego de este tiempo se toman los protoplastos receptores, se los centrifuga y se resuspende el pellet de protoplastos en trizol para posterior extracción de RNA.

Se utiliza esta técnica para preparar DNA plasmídico en una mayor escala. Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100

5 mM, PMSF 0,1 mM). Una vez resuspendida toda la muestra se agrega formaldehído hasta una concentración final de 1% (v/v) para realizar el entrecruzamiento.

**9.2.**

**9.4.**



Luego de la extracción con RNA se trató a las muestras con DNasa RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para eliminar contaminaciones con DNA genómico. Se siguieron las instrucciones del fabricante (se toman 8µl de RNA, 1µl de buffer y 1µl de enzima. Se incuba 20 minutos a 37°C, luego se agrega 1 µl de solución de stop y se incuba 10 minutos a 65°C para inactivar a la enzima). A partir del RNA tratado con DNasa de cada muestra se realizaron tres reacciones de RT diferentes (una por cada amplicón

Brevemente, el ensayo se basa en dos reacciones enzimáticas sucesivas. En la primera reacción, la enzima deacetilasa presente en el extracto que se quiere estudiar remueve el acetilo de un sustrato cromogénico. Luego, una peptidasa corta el péptido liberando aminoluciferina, que actúa como sustrato de luciferasa. Por lo tanto, la medición de actividad de luciferasa es una medida de la actividad deacetilasa presente en el extracto.

sistema de revelado *Odyssey Imager* se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: goat anti-mouse 800 nm (Li-cor 925-32210), donkey anti rabbit 680 nm (Li-cor 925-68073).



# RESULTADOS

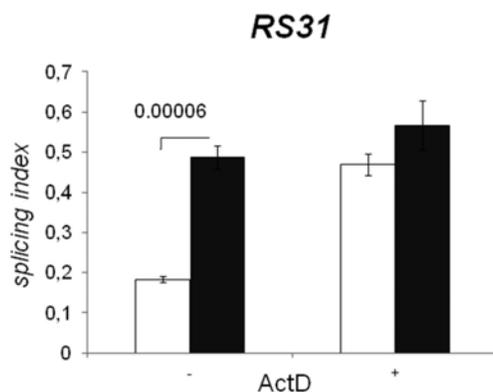
## 1. Primera parte: regulación del *splicing* alternativo por acción de la luz

### 1.1. El efecto de la luz sobre la abundancia de las isoformas de RNA mensajero de RS31 se debe a regulación del *splicing* alternativo y no a una degradación diferencial del RNA.

Como explicamos en la Introducción, al comenzar esta tesis conocíamos el efecto que la luz produce sobre los niveles de las isoformas de RS31. Sin embargo, no sabíamos si ese cambio en la proporción de las isoformas se debía a una regulación del *splicing* alternativo o de la degradación de los RNA mensajeros. En particular, se sabía que la isoforma 2 de RS31 es regulada por *nonsense mediated decay* (NMD) (Kim *et al*, 2009). Para responder esta pregunta llevamos a cabo tres abordajes experimentales diferentes.

#### 1.1.1. Demostración por incubación con actinomicina D

Llevamos a cabo el protocolo de luz/oscuridad (ver Materiales y Métodos) en presencia de actinomicina D, una droga que inhibe la transcripción. Brevemente, las plántulas crecieron en luz continua por dos semanas, luego fueron transferidas a oscuridad por 48 hs. Posteriormente se incubó las plántulas en luz u oscuridad por 6 hs. Dos horas antes de la incubación con luz/oscuridad se agregó actinomicina D o etanol (vehículo). Al finalizar, se extrajo el RNA y se analizaron los niveles de las isoformas de *splicing* alternativo por RT-PCR radiactiva.

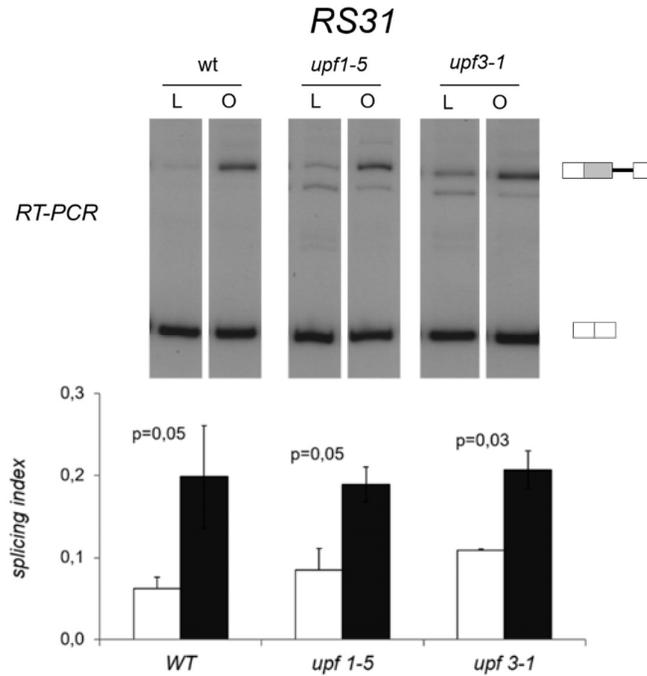


**Figura R1: La actinomicina D inhibe el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31.** Las plantas se incubaron en oscuridad por 48 hs y luego se transfirieron a luz o a oscuridad por 6 hs en presencia de actinomicina D o etanol (vehículo). Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31. Se muestra el promedio del *splicing* index con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.

Se observa que el efecto de luz/oscuridad sobre la proporción de las isoformas de RS31 se anula en presencia de actinomicina D. Si el efecto de la luz provocara una degradación diferencial de sus RNA mensajeros, entonces esta no se vería afectada por la inhibición de la transcripción. Por lo tanto, este resultado es consistente con una regulación del *splicing* alternativo de RS31 que ocurre a nivel co-transcripcional.

### 1.1.2. Demostración con el uso de mutantes de *Arabidopsis* defectuosas en proceso de degradación de RNA

Realizamos el experimento de luz/oscuridad con plantas salvajes y con plantas mutantes para la vía del NMD: *upf1-5* y *upf3-1* (Kim *et al*, 2009). Si el efecto que observamos sobre RS31 se debiera a una degradación diferencial de las isoformas de RNA mensajero, esperaríamos que en las plantas mutantes no se observara, o que fuera modulado de alguna manera.



**Figura R2: Mutantes de *Arabidopsis* deficientes en NMD responden al efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31.** Las plantas se incubaron en oscuridad por 48 hs y luego se transfirieron a luz o a oscuridad por 6 hs. Este protocolo se realizó en plantas salvajes (wt) o en plantas mutantes para la vía del NMD (*upf1-5*, *upf3-1*). Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31. Se grafica el promedio del *splicing* index junto con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.

Encontramos que el efecto de luz/oscuridad se mantiene en las plantas mutantes al igual que en las plantas salvajes (figura R2). Además, notamos que en las mutantes *upf* aumenta la proporción de la isoforma de mRNA2, aquella reportada por ser regulada por esta vía. Esto es consistente con el aumento de esta isoforma: si la vía de degradación se encuentra interrumpida, entonces la isoforma que en condiciones normales se degrada ahora no lo hace y se acumula en el núcleo. El resultado de este experimento indica que en el efecto que produce la luz sobre las isoformas de RNA mensajero de RS31 no participa la maquinaria de degradación de NMD.

### 1.1.3. Demostración por sobreexpresión del factor de *splicing* U2AF65.

La tercera forma de mostrar que la regulación de RS31 se debe a la maquinaria de *splicing* consistió en sobreexpresar transitoriamente el factor de

*splicing* constitutivo U2AF65. Para realizar este abordaje experimental tuvimos un desafío adicional: la puesta a punto de un sistema de preparación y cultivo de protoplastos a partir de mesófilo de hojas de *Arabidopsis*, y posteriormente, la puesta a punto de la transformación de los protoplastos, en este caso con un plásmido de expresión de U2AF65.

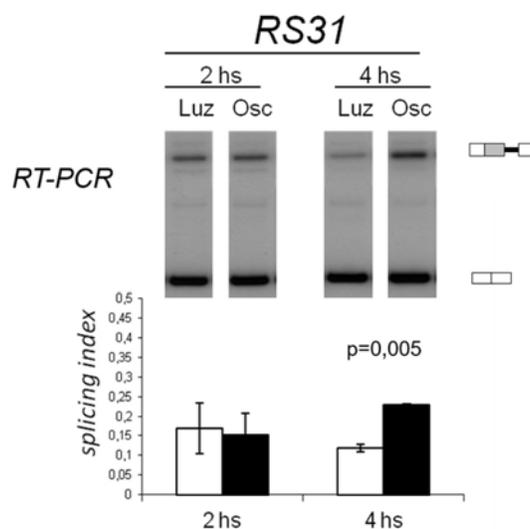
Para la preparación de protoplastos adaptamos protocolos de la literatura (Wu *et al*, 2009; Yoo *et al*, 2007). Brevemente, el protocolo consiste en una remoción de la epidermis inferior de las hojas de *Arabidopsis* seguida de la digestión con enzimas, celulasa y macerozima, que remueven la pared celular. En la figura R3A se muestra un esquema simplificado de los principales pasos del protocolo.

**Figura R3: Puesta a punto del sistema de protoplastos de *Arabidopsis*.** **A.** Esquema general del protocolo de obtención de protoplastos a partir de mesófilo de *Arabidopsis*: se toman hojas de plantas adultas (de entre tres y cinco semanas) y se remueve la epidermis inferior con cintas adhesivas. Esto facilita luego el tratamiento con enzimas que digieren la pared celular. **B.** Transformación de protoplastos con un plásmido que expresa GFP. 24 hs luego de la transformación se tomaron las imágenes por microscopía confocal. Panel superior izquierdo: campo claro. Panel superior derecho: autofluorescencia de clorofila. Panel inferior izquierdo: protoplastos transformados con GFP. Panel inferior derecho: superposición de la señal de clorofila y GFP. Barra: 40

Para la puesta a punto fue necesario optimizar algunas variables, como los tipos de cintas adhesivas que se utilizan en la remoción de la epidermis inferior, los medios de cultivo para los protoplastos (tanto para la obtención de los protoplastos como para las incubaciones posteriores), y las condiciones de cultivo de las plantas que se utilizan para prepararlos. El estado de las plantas que se usan como fuente de hojas para hacer los protoplastos es crítico: si las plantas se encuentran estresadas, los protoplastos obtenidos se rompen con más facilidad (y los protoplastos son células muy frágiles por lo tanto hay que tratarlos con mucho cuidado en toda la preparación). Luego de varios intentos pudimos poner a punto la preparación de protoplastos y su transformación con polietilenglicol (PEG) utilizando un vector de expresión de GFP (figura R3B).

Una vez encontradas las condiciones para la transformación de protoplastos, procedimos a transformarlos con plásmidos que contienen minigenes reporteros de *splicing* alternativo (figura R3C). Construimos dos minigenes reporteros de *splicing* alternativo: el minigén que contiene la región reportera de *splicing* alternativo de RS31 está río abajo del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Los minigenes que contienen la región reportera de *splicing* alternativo de RCA se encuentran bajo el promotor del 35S o del promotor del gen de RS31. RS31 tiene las tres isoformas de mRNA que ya describimos anteriormente. RCA tiene dos isoformas que se originan por la presencia de dos sitios 5' de *splicing* alternativo, que llamamos isoforma larga e isoforma corta. En este experimento de puesta a punto de transformación nos interesa evaluar si es posible analizar por RT-PCR las isoformas de mRNA que provienen de la expresión de los minigenes reporteros.

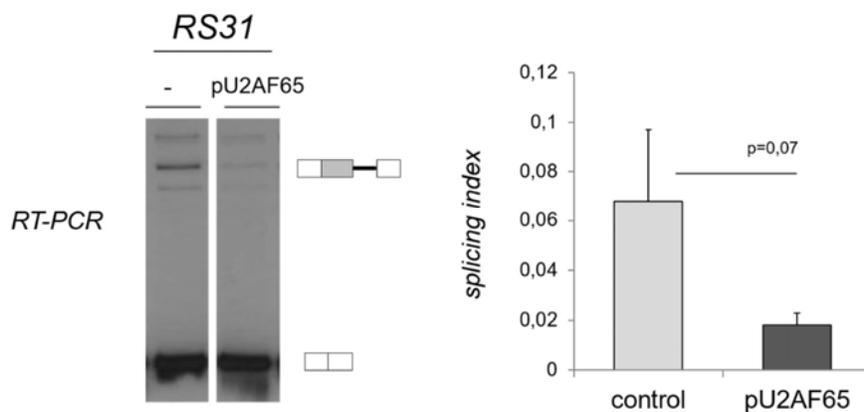
Por otro lado, además de la puesta a punto de la preparación de protoplastos y su transformación, necesitamos estudiar si los protoplastos responden a las transiciones de luz y oscuridad del mismo modo que las plántulas de *Arabidopsis*. Realizamos un experimento en el que preparamos protoplastos, los incubamos en oscuridad por 24 horas y luego los transferimos a luz u oscuridad por 2 o 4 horas, respectivamente. El resultado se muestra en la figura R4.



**Figura R4:** Los protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis* responden al protocolo de luz y oscuridad. Los protoplastos se incubaron en oscuridad por 24 hs y luego se transfirieron a luz o a oscuridad por 2 o 4 hs. Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31. Se grafica el promedio del *splicing* index junto con el desvío estándar para dos réplicas biológicas.

Los protoplastos de *Arabidopsis* responden al protocolo de luz y oscuridad (figura R4). Este control es importante para continuar dado que nos muestra que este modelo recapitula los efectos que produce la luz en las plántulas.

Entonces, los protoplastos transformados expresan los minigenes y podemos detectar por RT-PCR las isoformas de RNA mensajero correspondientes. Por lo tanto, podemos proseguir con el experimento que teníamos en mente: sobreexpresar el factor de *splicing* constitutivo U2AF65 y estudiar si esto modifica los niveles observados para las isoformas de RS31. Como se explicó en la introducción, U2AF65 es un factor de *splicing* que se une al tracto de polipirimidinas. Esperamos que, dado que el evento de *splicing* de RS31 estudiado tiene sitios débiles de *splicing*, la sobreexpresión de U2AF65 modifique los niveles de las isoformas de *splicing* alternativo de RS31. Preparamos protoplastos y los transformamos con un plásmido de expresión de U2AF65. Luego de extraer RNA analizamos por RT-PCR los niveles de mRNA de RS31 en los protoplastos control y en los protoplastos transformados. Encontramos que la transformación con U2AF65 modifica el *splicing* index de RS31 (figura R5).



**Figura R5:** La sobreexpresión del factor de *splicing* U2AF65 en protoplastos imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31. Los protoplastos se transformaron con un vector que expresa el factor de *splicing* U2AF65. Se extrajo RNA y se evaluaron por RT-PCR los niveles de las isoformas de RS31. Se grafica el *splicing* index para RS31. Barra gris claro: control; barra gris oscura: plásmido de U2AF65.

Observamos que los protoplastos transformados con el vector que expresa U2AF65 muestran un *splicing* index menor que el control sin transformar. La sobreexpresión de este factor de *splicing* constitutivo imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo.

En conclusión, los resultados de los tres experimentos demuestran que los cambios en los niveles de las isoformas de RNA mensajero de RS31 en condiciones de luz y oscuridad se deben a cambios en la regulación del *splicing* alternativo. Es decir, la abundancia relativa de las isoformas de RS31 es diferente en luz y oscuridad, y esto se debe a cambios en la regulación del *splicing* alternativo y no a una degradación diferencial de sus isoformas de RNA mensajero.

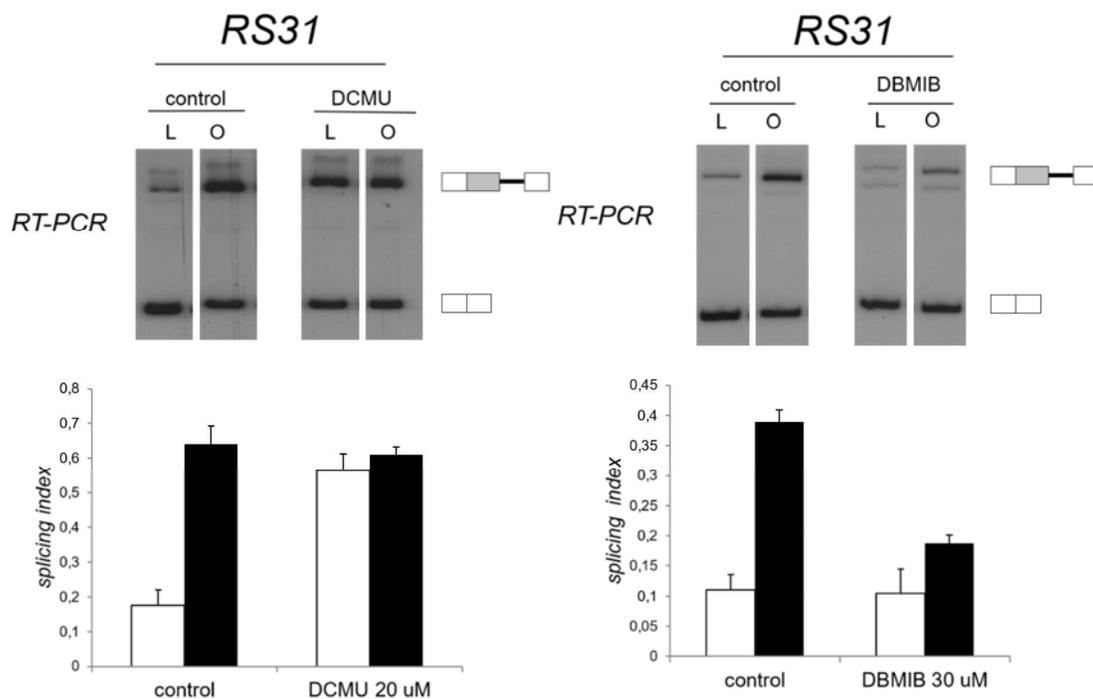
## 1.2. La luz modifica el estado redox del *pool* de plastoquinonas

### 1.2.1. Drogas que modifican el estado redox del *pool* de plastoquinonas y su efecto sobre el *splicing* alternativo

Como parte de su tesis de doctorado el Dr. Petrillo mostró que el uso de drogas que inhiben la maquinaria fotosintética modulan el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo. El DCMU [3-(3,4-dichlophenyl)1,1-dimethylurea], droga

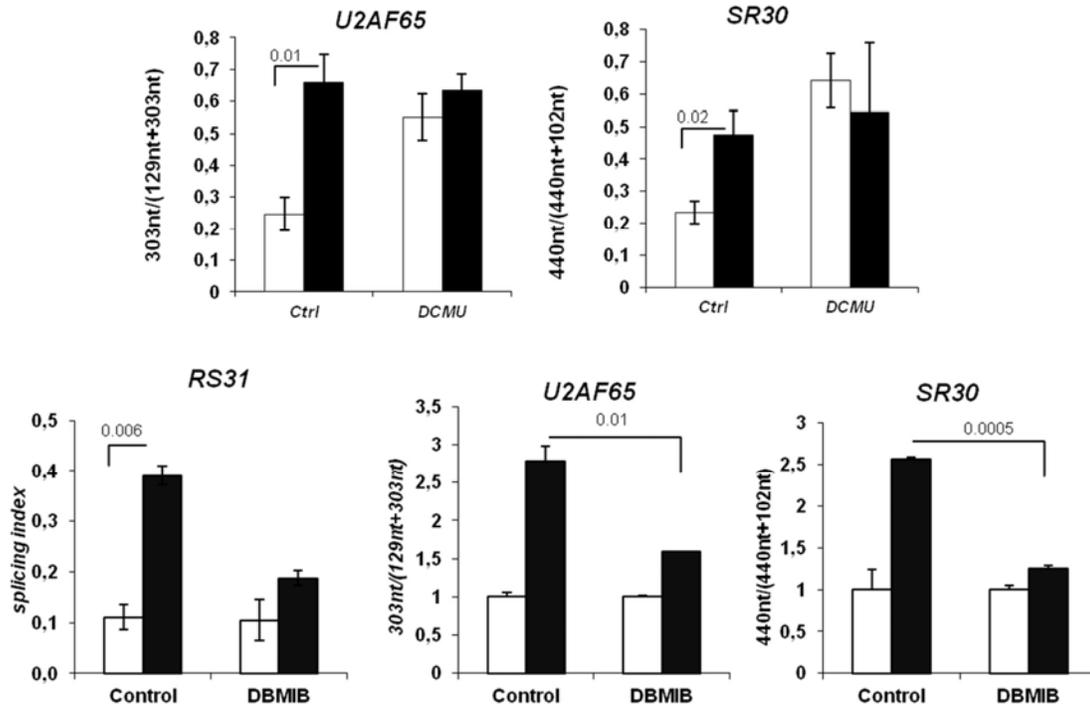
que impide el transporte de electrones desde el fotosistema II hacia el *pool* de plastoquinonas, (Khandelwal *et al*, 2008) imita el efecto de la oscuridad sobre el *splicing* alternativo de RS31. El DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone), droga impide el transporte de electrones desde el *pool* de plastoquinonas hacia el citocromo b6f (Schansker *et al*, 2005) imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo. Si bien ambas drogas inhiben el transporte electrónico fotosintético, lo hacen en pasos diferentes de la cadena de transporte de electrones.

Con el fin de confirmar la hipótesis de que el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo se debe a un aumento del *pool* de plastoquinonas reducidas, repetimos primeramente estos experimentos de Petrillo y analizamos cambios en el *splicing* alternativo de RS31 (figura R6).



**Figura R6:** El DCMU imita el efecto a la oscuridad y el DBMIB imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31. Las plantas se incubaron en oscuridad por 48 hs y luego se transfirieron a luz o a oscuridad por 6 hs en presencia de DCMU (20 uM), DBMIB (30 uM) o de vehículo (etanol). Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31. Se grafica el *splicing index* junto con el desvío estándar para dos réplicas biológicas.

A continuación, analizamos el efecto de la incubación con DCMU y DBMIB sobre otros eventos de *splicing* alternativo que también son regulados por la luz: este es el caso de U2AF65 y SR30 (figura R7).



**Figura R7: A.** El DCMU imita el efecto de la oscuridad sobre el *splicing* alternativo de U2AF65 y SR30. Las plantas se incubaron en oscuridad por 48 hs y luego se transfirieron a luz o a oscuridad por 6 hs en presencia de DCMU (20  $\mu$ M) o de vehículo (etanol). Luego de la incubación de extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de U2AF65 y SR30. Se grafica el *splicing* index junto con el desvío estándar para dos réplicas biológicas. **B.** El DBMIB imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de U2AF65 y SR30. Plántulas de *Arabidopsis* fueron incubadas en luz y oscuridad en presencia de DBMIB (30  $\mu$ M) o de vehículo (etanol). Luego de la incubación de extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31, U2AF65 y SR30. Se grafica el *splicing* index junto con el desvío estándar para dos réplicas biológicas.

Encontramos que, al igual que lo que ocurre con el *splicing* de RS31, la incubación con DCMU imita el efecto de la oscuridad sobre el *splicing* alternativo de U2AF65 y en SR30.

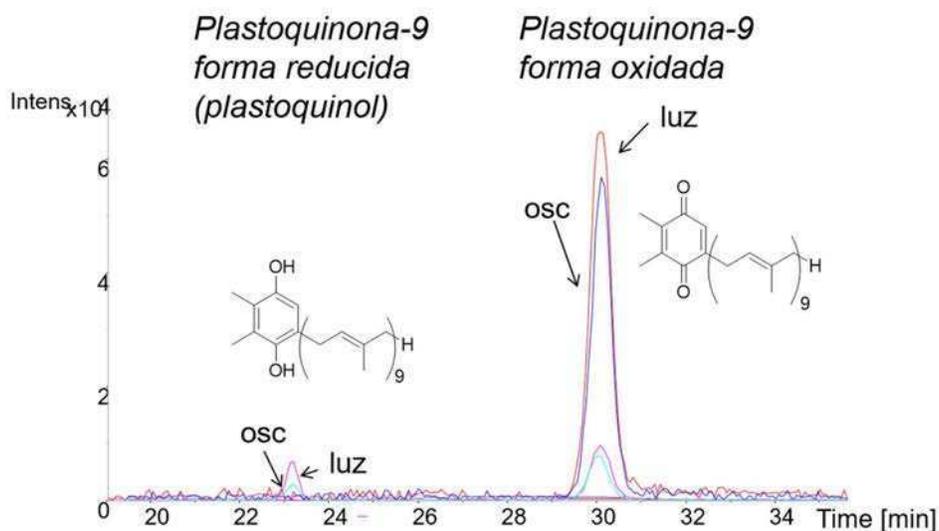
Como mencionamos anteriormente, el DCMU impide el transporte de electrones desde el fotosistema II hacia el *pool* de plastoquinonas. Por lo tanto, el DCMU produce un aumento en la proporción de plastoquinonas oxidadas. Por otra parte, el DBMIB impide el transporte de electrones desde el *pool* de

plastoquinonas hacia el citocromo b6f. Entonces, el DBMIB produce un aumento de la proporción de plastoquinonas reducidas. Dado que ambas drogas tienen efectos opuestos sobre el *splicing* alternativo de RS31, U2AF65 y SR30, confirmamos que el estado redox del *pool* de plastoquinonas es responsable de los cambios que observamos en *splicing* alternativo. Para estudiar si el estado redox del *pool* de plastoquinonas cambia por acción de la luz, llevamos a cabo una colaboración Gastón Siless, Jorge Palermo y Gabriela Cabrera del UMYMFOR, del Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA.

### **1.2.2. Estudio del estado redox del *pool* de plastoquinonas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

Nuestros resultados de los experimentos confirmatorios con las drogas DCMU y DBMIB indican que el estado redox del *pool* de plastoquinonas es el responsable de gatillar la señal retrógrada del cloroplasto hacia el núcleo, y luego desencadenar allí cambios en los niveles de *splicing* alternativo de RS31, SR30 y U2AF65. Para poder estudiar esto en profundidad necesitamos poder contar con una herramienta para medir el estado redox del *pool* de plastoquinonas, y luego estudiar si este se modifica en nuestro protocolo de luz y oscuridad. Con este fin, elegimos realizar una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Realizamos una puesta a punto de preparación de muestras a partir de tejidos de plántulas basándonos en trabajos reportados en la literatura (Martinis *et al*, 2011). Probamos diferentes solventes orgánicos para la extracción y las corridas de HPLC. Una vez encontradas las condiciones para detectar las plastoquinonas en la corrida – utilizamos el acetato de etilo como solvente, ver Materiales y Métodos- tuvimos que obtener estándares para poder correr junto con las muestras y luego cuantificar la abundancia de plastoquinonas reducidas y oxidadas para cada condición. En la figura R8 se muestra un cromatograma representativo de las especies de plastoquinonas en su forma reducida y en su forma oxidada.



**Figura R8: Cromatograma HPLC de plastoquinonas reducidas y oxidadas en muestras de plantas tratadas con luz y oscuridad.** Las plántulas se trataron con luz y oscuridad con el protocolo descrito anteriormente. Se prepararon extractos a partir de los tejidos y se realizaron corridas de HPLC de las muestras de luz y oscuridad junto con estándares específicos. Se muestran las trazas de EIC (cromatograma de ion seleccionado) correspondientes a los iones sodiados de la plastoquinona-9 oxidada, a  $m/z$  771.6051 y la reducida a  $m/z$  773.6207. Se usó una ventana de  $\pm 0.25$ Da alrededor de esos valores y una columna de fase reversa C18 (Phenomenex Synergi Fusion). Detector: espectrómetro de masa de alta resolución (ESI-Q-TOF, Bruker MicroTOF-QII). Se distinguen dos picos, uno correspondiente a plastoquinonas reducidas y otro a plastoquinonas oxidadas.

Con los datos obtenidos de las corridas pudimos estimar un cociente de los niveles de plastoquinonas reducidas sobre las plastoquinonas totales. A continuación, realizamos varias corridas de HPLC seguidas para una misma muestra, con el objetivo de comprobar que las plastoquinonas no se oxidan en función del tiempo (en los tiempos de duración del experimento) y asegurarnos de poder detectar las plastoquinonas reducidas (figura R9).

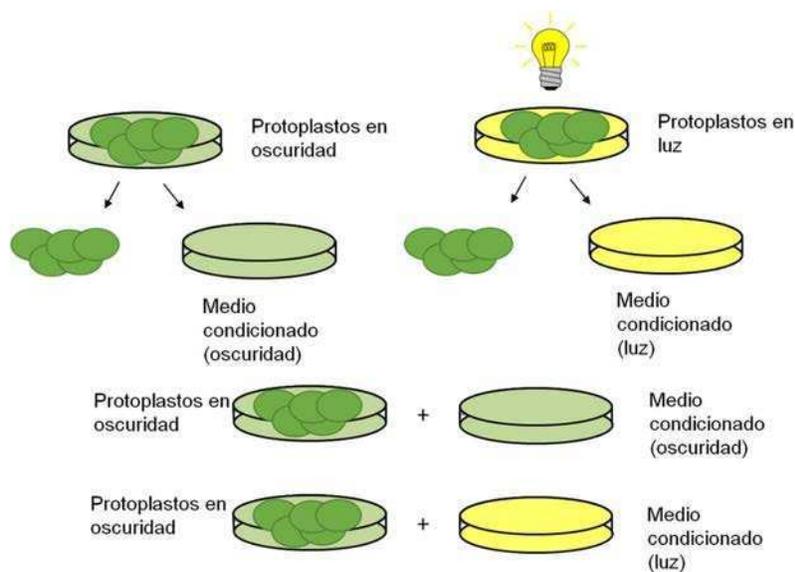
**Figura R9: Estabilidad de las muestras de plastoquinonas en función del tiempo.** Las plántulas se incubaron en luz y oscuridad con el protocolo descrito anteriormente. Se prepararon extractos a partir de los tejidos y se realizaron corridas de HPLC de las muestras de luz (puntos blancos) y oscuridad (puntos negros). Se muestra el cociente de plastoquinonas reducidas/plastoquinonas totales para corridas realizadas en función del tiempo sobre una muestra de luz y una muestra de oscuridad. Se observa que en los tiempos del experimento las plastoquinonas reducidas no se oxidan.

consistente con los resultados obtenidos en los experimentos con las drogas DCMU y DBMIB.

### **1. 3. El efecto del medio condicionado sobre el *splicing* alternativo.**

Una de las preguntas que quisimos abordar en este punto es cuál es la naturaleza de la señal que regula el *splicing* alternativo por acción de la luz. Esta pregunta es muy amplia, por supuesto, y difícil de responder. La señal podría ser, en principio, de muchos tipos diferentes. Por lo pronto, sabemos que el *pool* de plastoquinonas funciona como un interruptor del cloroplasto que gatilla la señal retrógrada que viaja al núcleo. Sin embargo, desconocemos cuál es la naturaleza de la señal que actúa río abajo del *pool* de plastoquinonas.

Decidimos diseñar un abordaje con protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis* para estudiar la señalización involucrada. Diseñamos el “experimento de los medios condicionados”. Este consiste en partir de una preparación de protoplastos que se incuban en oscuridad o en luz. Luego de la incubación se centrifugan los protoplastos para recuperar los medios condicionados de luz y de oscuridad, respectivamente. Estos medios condicionados se utilizan para incubar protoplastos receptores, que se encuentran en oscuridad. El objetivo de este experimento es evaluar si algún factor soluble presente en los medios condicionados tiene la capacidad de producir un cambio en el *splicing* alternativo de los protoplastos receptores del medio. El esquema general del experimento se muestra en la figura R11.



**Figura R11: Esquema del protocolo de los medios condicionados.** Los protoplastos se incuban en luz o en oscuridad por 40 hs y se centrifugan para recolectar los medios condicionados de luz y oscuridad, respectivamente. Por otro lado, se preparan protoplastos receptores en oscuridad y se los incuba con los medios condicionados preparados anteriormente por 6 hs.

Evaluamos el efecto de la incubación con los medios condicionados de luz y oscuridad sobre protoplastos receptores. Luego de la incubación, preparamos RNA y estudiamos por RT-PCR cambios en los eventos de *splicing* alternativo de RS31 y U2AF65 (figura R12).

**Figura R12: Efecto de la incubación de medios condicionados de luz y oscuridad sobre protoplastos de oscuridad.** Los protoplastos provenientes de oscuridad fueron incubados con los medios condicionados de luz o de oscuridad como se muestra en la figura R11. Se extrajo RNA y se realizaron RT-PCRs de RS31 y U2AF65. Se muestra el *splicing* index para cada evento. Barras negras: medio de oscuridad. Barras blancas: medio de luz. El promedio corresponde a dos réplicas biológicas con su desvío estándar.

Intentamos escalar la preparación de protoplastos y no obtuvimos buenos resultados para seguir adelante. Por lo tanto, decidimos suspender esta línea de investigación por el momento, que será retomada en un futuro próximo en el laboratorio.

Para finalizar esta primera parte de la tesis, decidimos medir por PCR cuantitativa los niveles de la isoforma mRNA1 en luz y en oscuridad, relativizados a la expresión de un gen control (actina). Nos preguntamos si los niveles de esta isoforma son diferentes en luz y oscuridad.

## 2. Segunda parte: la elongación de la transcripción y el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo

Antes de comenzar a explicar los resultados obtenidos nos parece importante relatar una idea que resultó ser disparadora de esta parte de la tesis. En octubre de 2013 asistimos junto con Alberto a un congreso sobre procesamiento del RNA mensajero en Oxford, Reino Unido. Además de poder presenciar una serie de charlas sumamente interesantes tuvimos la suerte de mostrar algunos de nuestros resultados en la sesión de pósters a Caroline Dean, investigadora inglesa experta en cromatina y plantas. Cuando le comentamos algunos hallazgos que explicamos en la primera parte de la tesis, Caroline nos preguntó si habíamos estudiado cambios a nivel de la estructura de la cromatina asociados al pasaje de luz y oscuridad. Creo que para ese entonces habíamos realizado un experimento con drogas que modifican la estructura de la cromatina y teníamos pedidas algunas semillas de plantas mutantes, pero su pregunta terminó de decidirnos a meternos de lleno en este terreno nuevo para nosotros, la estructura de la cromatina en las plantas. Así que gracias a esa intervención es que hoy podemos presentar estos resultados.

### **2.1. Efecto de drogas que modulan la estructura de la cromatina sobre el *splicing* alternativo**

#### **2.1.1 La tricostatina A imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo**

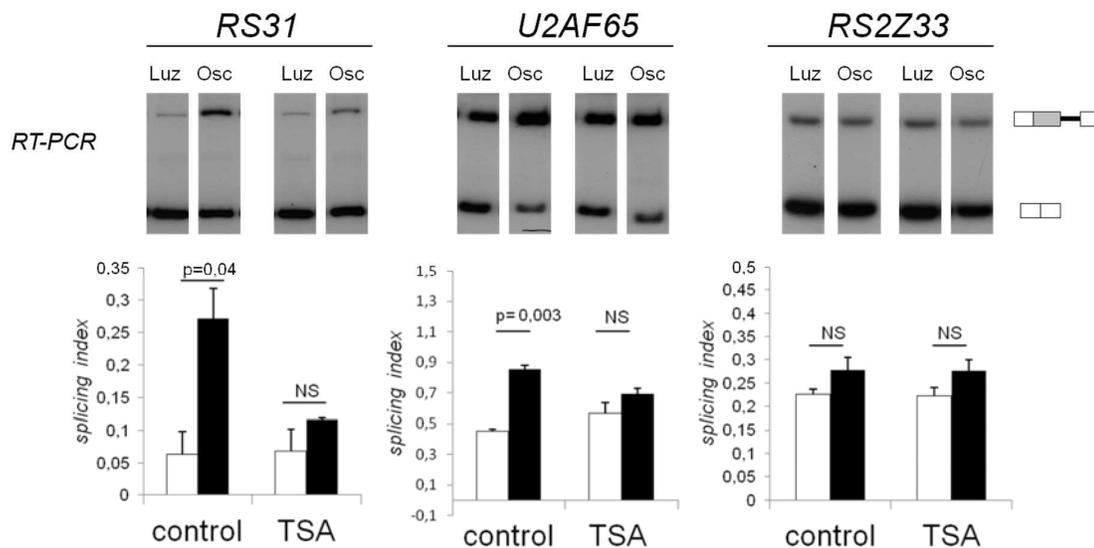
Para estudiar si la estructura de la cromatina juega algún papel en la regulación del *splicing* por acción de la luz realizamos el experimento de luz y oscuridad en presencia de tricostatina A (TSA). La TSA inhibe a las deacetilasas de histonas, por lo tanto, el tratamiento con esta droga promueve la hiperacetilación de histonas (Finnin *et al*, 1999). La hiperacetilación de histonas es una marca asociada a la cromatina abierta y transcripcionalmente activa.

En primer lugar, a modo de control, comprobamos que la TSA promueve la acetilación global de histonas en nuestro protocolo mediante la técnica de

*western blot* usando un anticuerpo que reconoce a la histona 3 acetilada y otro que reconoce a la histona 3 total.

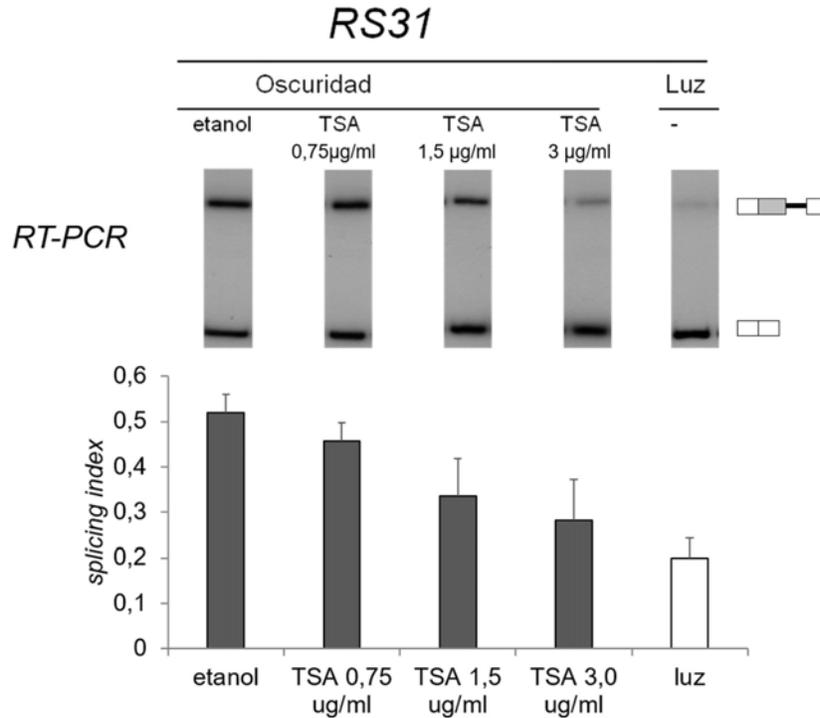


alternativo no se modifica por acción del pasaje de luz a oscuridad ni por el agregado de la TSA (figura R16).



**Figura R16:** La TSA imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de **RS31** y **U2AF65** pero no modifica los niveles de *splicing* de **RS2Z33**. Plántulas de *Arabidopsis* fueron incubadas en luz y oscuridad en presencia de TSA (30 uM) o de vehículo (etanol). Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31, U2AF65 y RS2Z33. Se grafica el promedio del *splicing* index junto con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.

Seguidamente probamos el efecto de dosis crecientes de TSA. Encontramos que hay un efecto de dosis/respuesta sobre la incubación con TSA en plantas sometidas al protocolo de luz y oscuridad: cuanto mayor es la concentración de TSA, menor es el *splicing* index (figura R17).



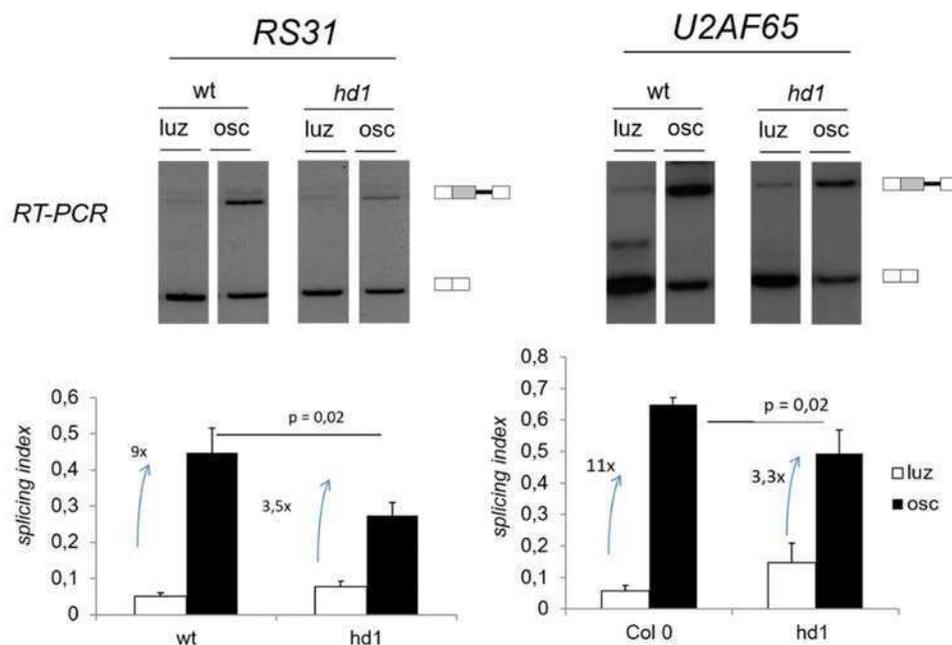
**Figura R17:** El efecto de la TSA sobre el *splicing* alternativo de RS31 es proporcional a la dosis. Plántulas de *Arabidopsis* fueron incubadas en luz o oscuridad en presencia de dosis crecientes de TSA (0,75 µg/ml, 1,5 µg/ml, 3 µg/ml) o de vehículo (etanol). Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31. Se grafica el *splicing* index junto con el desvío estándar para dos réplicas biológicas. Barras negras: oscuridad. Barra blanca: luz.

### 2.1.2 La TSA y la luz producen cambios similares en un conjunto de eventos de *splicing* alternativo de *Arabidopsis*.

Para estudiar la globalidad del efecto de los cambios en la acetilación de histonas sobre el pasaje de luz a oscuridad en el *splicing* alternativo realizamos una colaboración con John Brown y Craig Simpson del James Hutton Institute, Dundee, Escocia. Llevamos a cabo el estudio de un panel de RT-PCR de *splicing* alternativo de alta resolución en el que se evaluaron aproximadamente 100 eventos de *splicing* alternativo. Para este experimento realizamos el protocolo de luz y oscuridad en plantas tratadas con TSA y con etanol como vehículo. Encontramos que en los eventos estudiados, el 34% de ellos muestra cambios en el *splicing* alternativo por acción de la luz. Notablemente, el 76% de

los eventos que cambian por acción de la luz está también regulado por la acción de la TSA (figura R19).

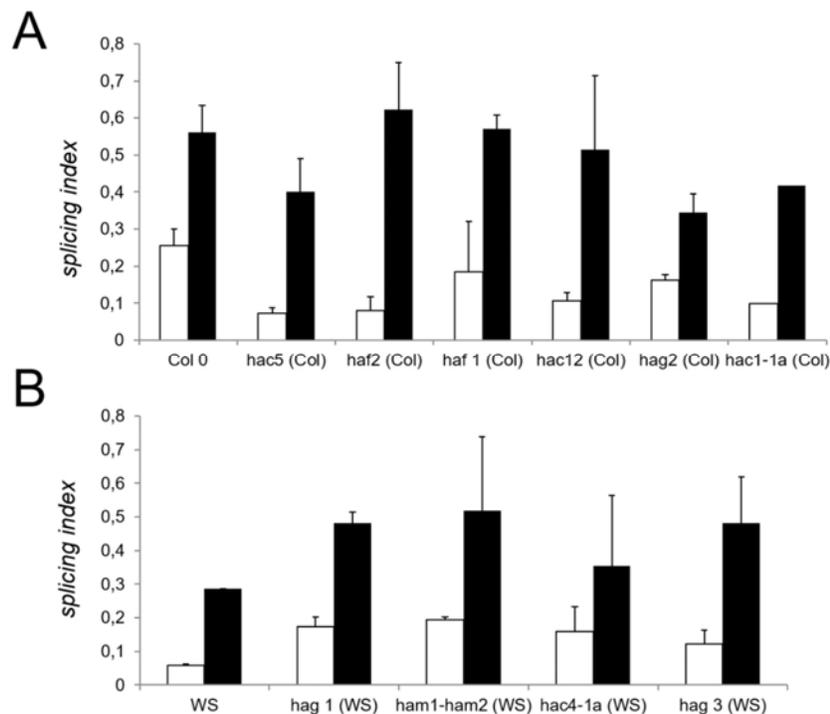
**Figura R19: Panel de *splicing* alternativo de alta resolución.** En cada caso se indica el porcentaje de eventos que se modifica por acción de la TSA. A. Eventos totales del panel. B: Eventos regulados por luz.



**Figura R20:** Una mutante de *Arabidopsis* deficiente en la deacetilación de histonas (*hd1*) muestra un menor efecto en el cambio de luz a oscuridad que las plantas salvajes. Se realizó el protocolo de luz y oscuridad sobre plántulas salvajes y sobre plántulas mutantes para la deacetilasa de histonas HD1. Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de splicing alternativo de RS31 y de U2AF65. Se grafica el promedio del *splicing* index junto con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.

Como se ve en la figura R20, tanto en el caso del *splicing* alternativo de RS31 como en el de U2AF65, el cambio de *splicing* index de luz a oscuridad se encuentra disminuido con respecto al observado en las plantas salvajes. Esto es compatible con que una mayor acetilación de histonas mimetice el efecto de la luz. Por otro lado, si bien en la mutante el efecto del pasaje de oscuridad a luz es menor que en la planta salvaje, este no se anula. Esto quiere decir que la actividad de deacetilasa de histonas HD1 no es suficiente para explicar los cambios en *splicing* alternativo por acción de la luz.

Realizamos el protocolo de luz y oscuridad en plantas salvajes y en plantas mutantes para una serie de acetiltransferasas de histonas y analizamos los cambios en el *splicing* alternativo de RS31 (figura R21).



**Figura R21: Mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la acetilación de histonas muestran un efecto de luz a oscuridad similar al observado en las plantas salvajes.** A. Mutantes de ecotipo Col 0. B. Mutantes de ecotipo WS. Se realizó el protocolo de luz y oscuridad sobre plántulas salvajes y sobre plántulas mutantes para la acetilación de histonas. Luego de la incubación se extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de splicing alternativo de RS31. Se grafica el promedio del *splicing index* junto con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.

Encontramos que en todos los casos las plantas mutantes presentan un efecto de luz/oscuridad comparable con el de las plantas salvajes. Si bien en algunos casos el valor del cociente entre luz y oscuridad varía con respecto a las plantas salvajes, esta diferencia no es reproducible entre experimentos (a diferencia de lo que ocurre con la mutante *hd1*, en la que el efecto de luz/oscuridad siempre es menor que el que se observa en las plantas salvajes). Dado que en *Arabidopsis* existen 12 acetiltransferasas de histonas, es probable que exista redundancia funcional entre ellas y que sea necesario contar con mutantes múltiples para encontrar alguna modulación del efecto sobre el *splicing*.

Además de estudiar qué ocurre con enzimas que modifican la acetilación de las histonas nos interesó evaluar el comportamiento de una mutante que realice otra modificación post-traducciona sobre la misma lisina: la metilación de

residuos de histonas. Existe un diálogo entre ambas modificaciones post-traduccionales: si una lisina se encuentra acetilada, no puede estar metilada, y viceversa. La acetilación de histonas en lisina 9 de histona 3 genera una conformación de cromatina más abierta, mientras que la metilación del mismo residuo se asocia con una cromatina más cerrada.

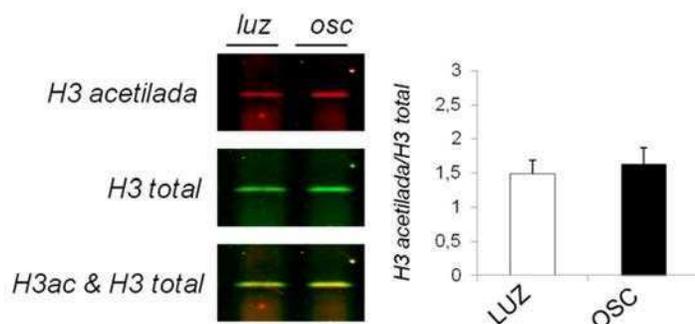
Con este esquema en mente llevamos a cabo el protocolo de luz y oscuridad, esta vez con la mutante para la metiltransferasa de histonas Kryptonite/SUVH4 (*kyp6*) y para una triplemetiltransferasa de histonas, en la que además de estar mutada la metiltransferasa SUVH4 están mutadas la SUVH5 y SUVH6 (*triple mt*) (Jackson *et al*, 2002; Jacobsen, 2015).

Encontramos que tanto en la simple como en la triple mutante para la metiltransferasa de histonas el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo se observa al igual que en las plantas salvajes.

## 2.3. La luz y la estructura de la cromatina de RS31

### 2.3.1. La acetilación global de histonas no cambia por acción de la luz

A continuación, nos preguntamos si la luz modifica la acetilación global de histonas en nuestro protocolo de luz y oscuridad. Para estudiar esto realizamos el experimento de luz/oscuridad y luego preparamos cromatina a partir de los tejidos obtenidos (ver Materiales y Métodos) para enriquecer la muestra en proteínas nucleares. Realizamos un *western blot* sobre la fracción de cromatina, con anticuerpos que reconocen a la variante de histona H3 acetilada y a la histona H3 total. El resultado se muestra en la siguiente figura:



**Figura R23: La acetilación global de histonas no se modifica en luz y oscuridad.** Se preparó cromatina a partir de plántulas tratadas con luz y oscuridad y se realizó la técnica de *western blot* utilizando un anticuerpo contra histona H3 acetilada (H3ac) y un anticuerpo contra histona H3 total revelados por la técnica de Odyssey. Se grafica el promedio de los niveles de H3ac relativizados a H3 junto con el desvío estándar. Barras blancas: luz. Barras negras: oscuridad. Promedio de tres réplicas biológicas.

Encontramos que la acetilación global de histonas no se modifica en luz y oscuridad.

### **2.3.2. La actividad enzimática de histona deacetilasa no se modifica en extractos nucleares de luz y oscuridad**

Para estudiar si los cambios que produce la TSA o la mutante HD1 pueden explicarse por cambios en actividad de histona deacetilasa, preparamos extractos nucleares a partir de plantas incubadas en luz o en oscuridad. Utilizamos un kit comercial (ver Materiales y Métodos). El kit tiene un sustrato acetilado luminogénico. Este se incuba con los extractos nucleares. Luego de remover el acetilo -si hay actividad enzimática de histona deacetilasa- una proteasa corta el péptido deacetilado liberando aminoluciferina, que es utilizada como sustrato por la enzima luciferasa. Por lo tanto, se mide actividad de luciferasa, que es indicativa de la actividad de histona deacetilasa. Controlamos que la actividad enzimática de nuestros extractos pudiera detectarse en un rango lineal y a continuación, realizamos mediciones de actividad de histona deacetilasa en muestras provenientes de luz y oscuridad (figura R24).

**Figura R24: La actividad de histona deacetilasa de extractos nucleares no se modifica por acción de la luz.** Se prepararon extractos nucleares a partir de plántulas tratadas con luz y oscuridad. Se midió la actividad de histona deacetilasa usando el kit HDAC-Glo de Promega (ver Materiales y Métodos). Se grafica la actividad de luciferasa relativizada a la masa de proteínas del extracto. Las barras corresponden al promedio de tres réplicas biológicas.

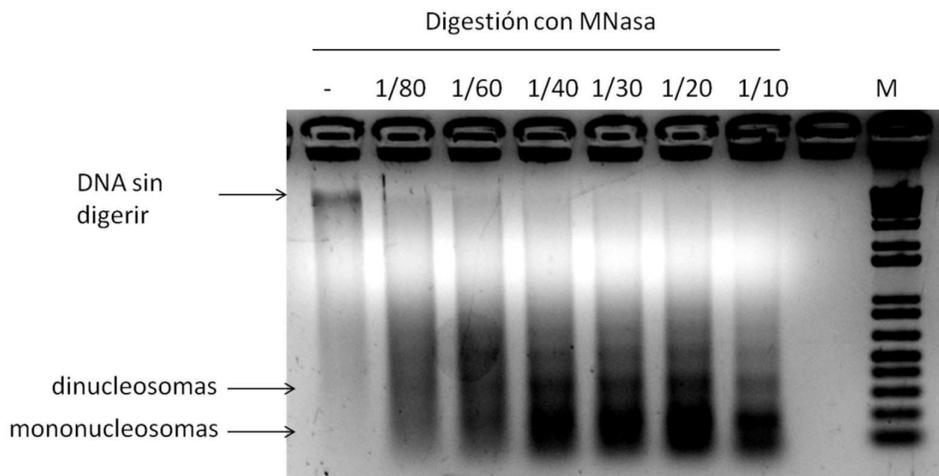
Encontramos que la actividad global de histona deacetilasa de extractos nucleares no se modifica por acción de la luz.

### **2.3.2. La acetilación en H3K9 no cambia por acción de la luz en RS31**

Los resultados anteriores muestran que la acetilación global de histona H3 y la actividad enzimática de deacetilasas de histonas en los extractos nucleares no se modifican en condiciones de luz y oscuridad. Esto, sin embargo, no provee información acerca de posibles cambios locales a lo largo del gen de RS31 -que puedan explicar los cambios que observamos en *splicing* alternativo-. Para estudiar si existen cambios locales en los patrones de modificaciones post-traduccionales de histonas es necesario realizar una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con anticuerpos específicos para las marcas de histonas de interés, y luego estudiar cómo se modifican los niveles de estas en regiones del genoma particulares.

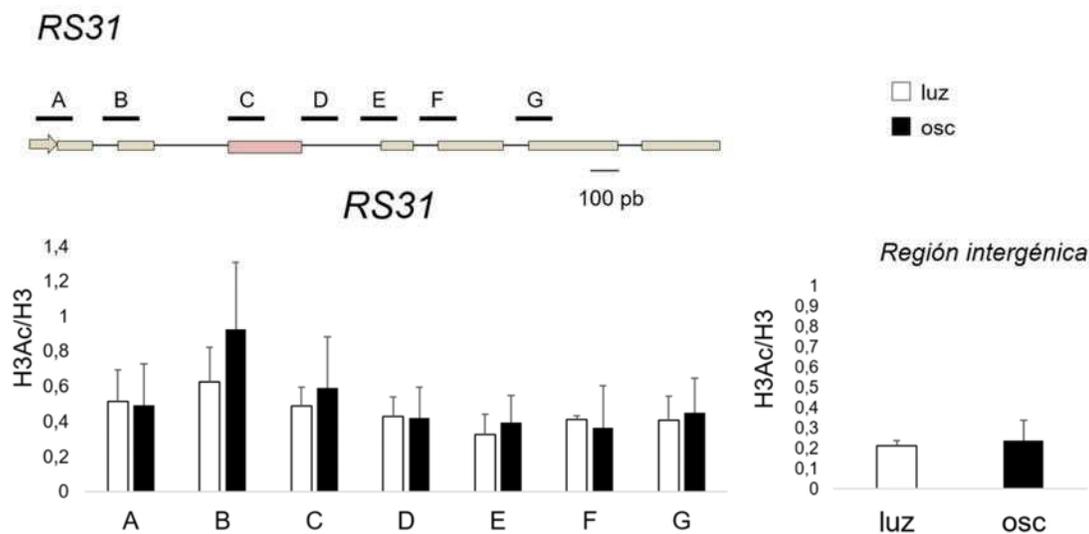
Realizar esto supuso un desafío adicional: la puesta a punto de la técnica de ChIP en plantas en condiciones semi-nativas, que es una buena manera de evaluar las modificaciones en marcas de histonas. La técnica de inmunoprecipitación de la cromatina convencional consiste un paso de entrecruzamiento con formaldehído, en el que se estabilizan las uniones entre las proteínas y el DNA, seguido de una preparación de núcleos. Los núcleos se rompen y la cromatina se parte en fragmentos pequeños por medio de sonicación. Luego se utilizan anticuerpos específicos para precipitar la cromatina, se revierte el entrecruzamiento y se amplifica por PCR en tiempo real los amplicones de interés. La técnica semi-nativa, a diferencia de la mencionada, presenta un paso de entrecruzamiento con formaldehído más corto y suave. Una vez obtenidos los núcleos, en lugar de sonicarlos se los somete a una digestión con nucleasa micrococcal o MNasa. Esta enzima degrada el DNA “linker”, que se encuentra entre los nucleosomas. Ajustando las concentraciones y los tiempos de incubación se puede obtener fragmentos de DNA correspondiente a mono, di o trinucleosomas (figura R25). En el caso de la técnica semi-nativa, se desea obtener mononucleosomas. Si la digestión es exhaustiva entonces se degrada todo el DNA y no se puede proseguir con el

protocolo. Por lo tanto, ajustar las condiciones de la digestión con la nucleasa es un paso crítico para esta técnica.



**Figura R25: Puesta a punto de la digestión de núcleos de plántulas con nucleasa micrococal.** Se preparó cromatina a partir de plántulas (ver Materiales y Métodos) y se la trató con diferentes diluciones de nucleasa micrococal a partir de una solución de concentración 100U/ul. Luego se revirtió el entrecruzamiento y se extrajo DNA de las muestras. Estas se corrieron en un gel de agarosa 2%. Las flechas indican el DNA sin digerir y la presencia de mono y dinucleosomas.

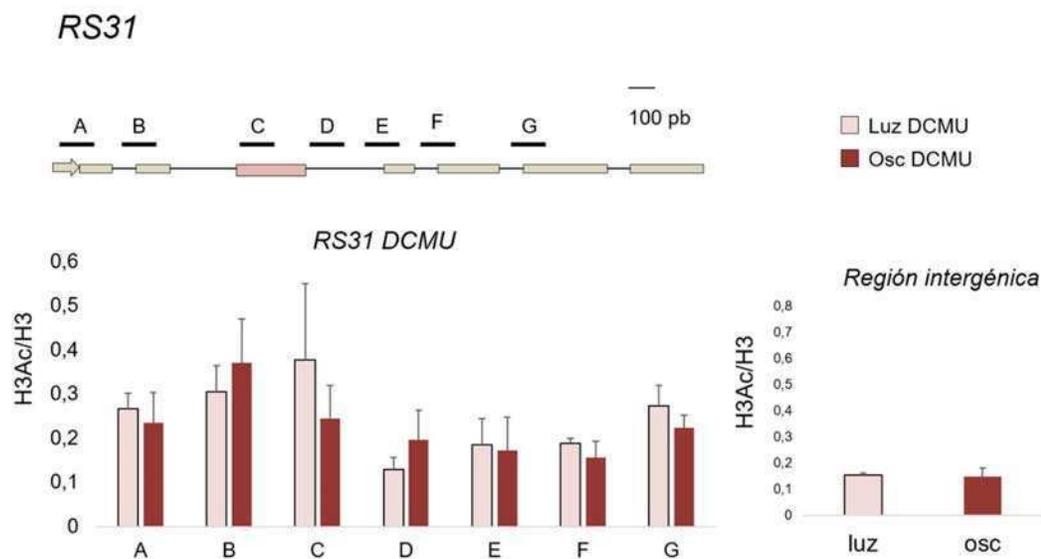
Sobre la base de los resultados obtenidos en los experimentos de plántulas tratadas con TSA y con la mutante deficiente en la histona deacetilasa HD1 nos preguntamos si la acetilación en la histona H3 se modificaría en condiciones de luz y oscuridad en el gen de RS31 (figura R26). Usamos un anticuerpo que reconoce a la histona H3 acetilada tanto en lisina 9 como en lisina 14 y un anticuerpo que reconoce la histona H3 total.



**Figura R26: La acetilación de histonas a lo largo del gen RS31 no se modifica en luz y oscuridad.** Se realizó inmunoprecipitación de la cromatina en condiciones semi-nativas sobre plántulas tratadas con luz y oscuridad, utilizando un anticuerpo contra histona H3 acetilada (H3ac) y un anticuerpo contra histona 3 total (H3). Se muestran los niveles de H3ac relativizados a H3. Barras blancas: luz. Barras negras: oscuridad. Se indica el promedio de tres réplicas biológicas con el error estándar. Como control se muestra un amplicón correspondiente a una región intergénica.

Los resultados de la figura R26 muestran que los niveles de acetilación en la histona 3 no se modifican en condiciones de luz y oscuridad a lo largo del gen RS31. Medimos también los niveles de acetilación en una región intergénica como control (en la que esperamos no encontrar cambios entre luz y oscuridad).

Además de incubar plantas en luz y oscuridad realizamos el experimento en presencia de DCMU, que, como se mencionó anteriormente, inhibe el transporte electrónico fotosintético. En el caso de detectar cambios en acetilación en luz y oscuridad nos pareció interesante explorar si bloquear el transporte electrónico fotosintético produce algún efecto sobre la marca de acetilación de histonas en RS31.



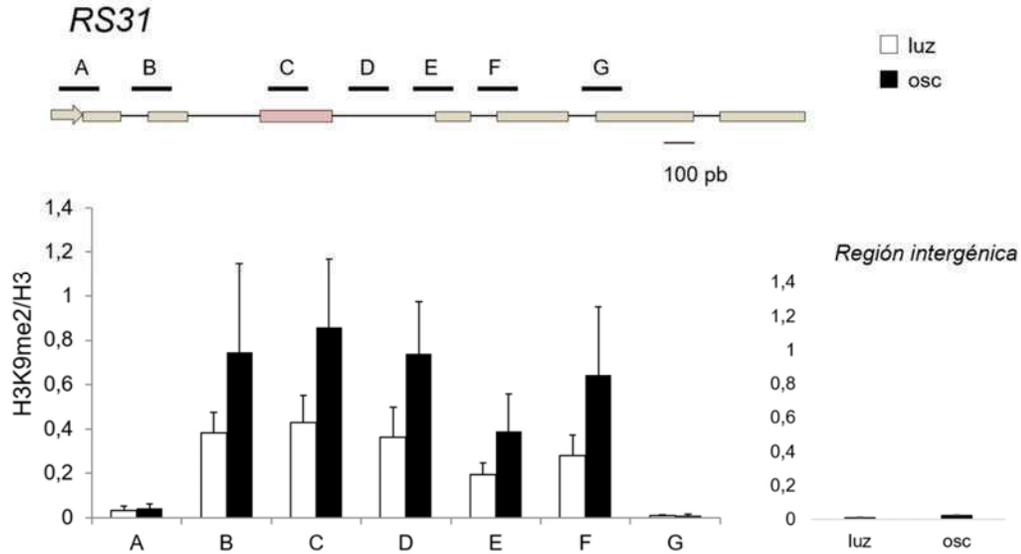
**Figura R27: La acetilación de histonas en RS31 no se modifica en luz y oscuridad en presencia de DCMU.** Se realizó inmunoprecipitación de la cromatina en condiciones semi-nativas sobre plántulas tratadas con luz y oscuridad en presencia de DCMU, utilizando un anticuerpo contra histona H3 acetilada (H3ac) y un anticuerpo contra histona 3 total (H3). Se muestran los niveles de H3ac relativizados a H3. Barras claras: luz. Barras oscuras: oscuridad. Se indica el promedio de tres réplicas biológicas con el error estándar. Como control se muestra un amplicón correspondiente a una región intergénica.

Como vemos en la figura R27, si realizamos el experimento de luz y oscuridad en presencia de DCMU no se observan diferencias en la acetilación de histona H3 entre ambas condiciones.

En resumen, los resultados de la técnica de ChIP muestran que la acetilación en histona H3 no se modifica en luz y oscuridad. Los niveles de esta marca de histonas tampoco cambian en presencia de DCMU.

### 2.3.3. La dimetilación en H3K9 no se modifica por acción de la luz en RS31

Decidimos estudiar por inmunoprecipitación de la cromatina los niveles de otra marca de histonas, la dimetilación en lisina 9 de la histona 3 (H3K9me2). Realizamos la inmunoprecipitación de cromatina de plántulas tratadas con luz y oscuridad y utilizamos un anticuerpo que reconoce la H3K9me2 y un anticuerpo contra histona H3. Los resultados se muestran en la siguiente figura.



**Figura R28: La dimetilación de histonas en RS31 no se modifica en luz y oscuridad.** Se realizó inmunoprecipitación de la cromatina en condiciones semi-nativas sobre plántulas tratadas con luz y oscuridad, utilizando un anticuerpo contra histona H3 dimetilada en lisina 9 (H3K9me2) y un anticuerpo contra histona 3 total (H3). Se muestran los niveles de H3K9me2 relativizados a H3. Barras blancas: luz. Barras negras: oscuridad. Se indica el promedio de tres réplicas biológicas con el error estándar. Como control se muestra un amplicón correspondiente a una región intergénica.

La figura R28 muestra que los niveles de dimetilación en H3K9 no se modifican en condiciones de luz y oscuridad. Si bien existe una tendencia que muestra mayores niveles de dimetilación en oscuridad que en luz, estas diferencias no son significativas. Por lo tanto, concluimos que la dimetilación en H3K9 no cambia a lo largo del gen de RS31 por acción de la luz.

Los resultados de esta sección muestran que no hay cambios en las marcas de histonas estudiadas en luz y oscuridad en el *locus* de RS31. En la próxima sección decidimos investigar si la elongación de la transcripción participa de la regulación del *splicing* alternativo de RS31.

## 2.4. Estudio de la elongación de la transcripción

Los resultados expuestos hasta aquí muestran que, si bien la hiperacetilación de histonas imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo, la exposición a la luz no provoca cambios locales en la cromatina en el locus de RS31, al menos en las marcas de histonas que hemos estudiado, que puedan explicar por qué cambia el *splicing*. Por lo tanto, decidimos investigar qué ocurre con la elongación de la transcripción de la RNA polimerasa II en luz y oscuridad.

### 2.4.1. La camptotecina imita el efecto de la oscuridad sobre el *splicing* alternativo

Para estudiar si el evento de *splicing* alternativo de RS31 está regulado por la elongación de la transcripción, tratamos a las plántulas de *Arabidopsis* con el inhibidor de la topoisomerasa I llamado camptotecina (CPT). Esta droga inhibe la elongación (Dujardin *et al*, 2014) y tiene un efecto opuesto al de la TSA en los eventos de *splicing* alternativo de células de mamíferos regulados por la elongación.



### 2.4.2. Estudio de la elongación a partir de la abundancia de precursores proximales y distales

Para medir la elongación de la transcripción en un gen en particular una técnica que resulta de utilidad en células de mamíferos en cultivo es la diseñada por Singh y Padgett. Brevemente, esta consiste en tratar un cultivo de células con 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- $\beta$ -D-ribofuranoside (DRB). El DRB inhibe la fosforilación en serina 2 del dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II. Esto produce una inhibición reversible de la transcripción (Singh & Padgett, 2009). Luego, la droga se remueve rápidamente, permitiendo que la RNA polimerasa II reinicie desde los promotores, dando lugar a nuevas rondas de transcripción. Los transcriptos primarios nacientes pueden detectarse por PCR cuantitativa. Para detectarlos se diseñan pares de oligonucleótidos iniciadores que reconocen secuencias presentes en juntas de exón-intrón (y no en exones, para detectar transcriptos primarios y no mensajeros maduros). Esto permite comparar la aparición de transcriptos primarios nacientes entre distintos tratamientos y de este modo estudiar cambios en la elongación de la transcripción.

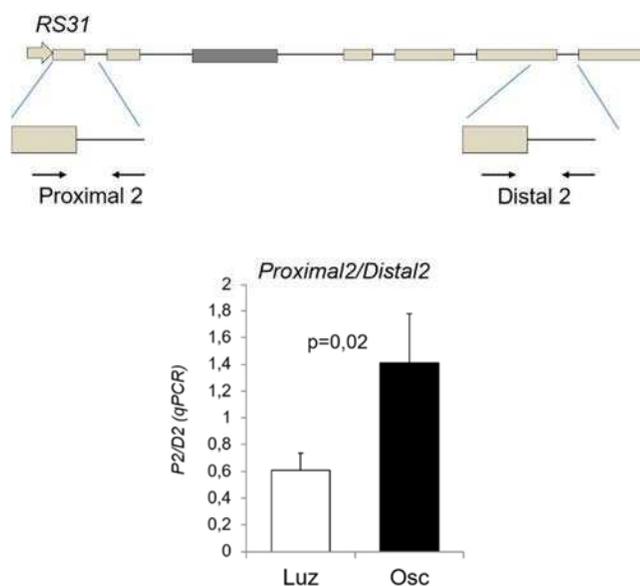
Esta técnica ha sido ampliamente usada desde su publicación para medir cambios en la elongación en estudios de regulación de *splicing* alternativo en distintas líneas de células animales. (Schor *et al*, 2009; Dujardin *et al*, 2014). Sin embargo, en plantas no es posible llevarla a cabo. Si bien en este trabajo realizamos varios experimentos en los que usamos tratamientos con drogas en plantas, es necesario dejar actuar las drogas por varias horas para permitir que ingresen a las células, y no es posible realizar una remoción rápida (lavado) de la droga, como es necesario hacer con el DRB en la técnica de Singh y Padgett. Otra alternativa posible es preparar protoplastos de mesófilo de hoja y hacer el experimento de medición de elongación en este sistema. El problema es que trabajar con protoplastos es técnicamente muy complejo, como discutimos en la primera parte de la tesis, y obtener niveles suficientes de RNA maduro para analizar por RT-PCR es difícil. Por lo tanto, pensamos que obtener una cantidad suficiente de precursores de RNA trabajando con este sistema es muy improbable.

Decidimos entonces optar por un sistema alternativo para medir la elongación: la medición de precursores de RNA en regiones proximales y distales con respecto al inicio de la transcripción en plántulas incubadas en luz y oscuridad, sin tratar a las plántulas con DRB, sino luego de realizar el protocolo convencional de luz/oscuridad que usamos a lo largo de la tesis. Diseñamos un par de oligonucleótidos para detectar a un amplicón proximal y otro para detectar un distal en el gen de RS31 (figura R30). Si la elongación de la transcripción es más lenta, entonces el cociente de los amplicones proximal/distal es más alto.

**Figura R30: La acumulación de precursores proximales y distales con respecto al sitio de inicio de la transcripción cambia en luz y oscuridad en RS31.** Las plántulas se trataron con el protocolo de luz y oscuridad. Luego de la incubación, se extrajo RNA total, se lo trató con DNasa (libre de RNasa) y se realizó una RT con pares de oligonucleótidos iniciadores diseñador al azar. Por PCR cuantitativa se analizaron los niveles de un precursor proximal y de uno distal con respecto al sitio de inicio de la transcripción para RS31 y para RS2Z33. Se grafica el cociente proximal/distal. Las barras corresponden al promedio de tres réplicas biológicas junto con el error estándar.

Si bien este resultado es consistente con lo obtenido con el tratamiento con CPT (la CPT que inhibe la elongación imita a la oscuridad, y el cociente de proximal/distal es mayor en oscuridad que en luz), el amplicón que diseñamos en la región proximal (Proximal 1) incluye al sitio 5' de *splicing* alternativo del evento estudiado. Entonces, el resultado de la figura R30 podría deberse tanto a un cambio en la elongación, como a los cambios producidos por el *splicing* alternativo. Decidimos entonces diseñar un nuevo par de oligonucleótidos iniciadores para la región proximal de RS31 que no incluyan al sitio 5' de *splicing* alternativo. Diseñamos también un nuevo amplicón distal, río abajo del anterior y optimizamos la preparación de precursores de RNA incluyendo un paso de preparación de núcleos a partir de los tejidos de plántulas, previo a la extracción de RNA, para enriquecernos en precursores de RNA.

Luego realizamos nuevamente el experimento de medición de precursores proximal/distal con estos nuevos oligonucleótidos, y encontramos que, al igual que en la figura anterior, en luz el cociente de precursores proximal/distal es menor que en oscuridad (figura R31).



**Figura R31: La acumulación de precursores proximales y distales con respecto al sitio de inicio de la transcripción cambia en luz y oscuridad en RS31.** Las plántulas se trataron con el protocolo de luz y oscuridad. Luego de la incubación, se prepararon núcleos, se extrajo RNA, se lo trató con DNasa (libre de RNasa) y se realizó una RT con pares de oligonucleótidos iniciadores diseñador al azar o bien con un primer específico. Por PCR cuantitativa se analizaron los niveles de un precursor proximal (Proximal 2) y de uno distal (Distal 2) con respecto al sitio de inicio de la transcripción para RS31. En este caso, el precursor

“Proximal 2” se encuentra río arriba del sitio 5´ de *splicing* alternativo del evento estudiado. Las barras corresponden al promedio de tres réplicas biológicas junto con el error estándar.

### 2.4.3. Estudio de la elongación en la mutante para el factor de elongación TFIIS

Primeramente, llevamos a cabo el protocolo de luz oscuridad en una mutante nula para TFIIS (Grasser *et al*, 2009). TFIIS es un factor de elongación que forma parte de la holoenzima de la RNA polimerasa II y le permite a la enzima sobrepasar sitios de pausado que se encuentran presentes en el molde (Kulish & Struhl, 2001; Kireeva *et al*, 2005).

Estos primeros experimentos con la mutante nula no mostraron cambios en los eventos de *splicing* de RS31 o de U2AF65 (datos no mostrados). Realizamos un panel de *splicing* alternativo para estudiar si había cambios globales en la mutante nula de TFIIS y encontramos que la mayoría de los eventos estudiados no mostraba ningún cambio (datos no mostrados). Un trabajo publicado en 2015, que utilizó la misma mutante nula, reportó resultados similares (Dolata *et al*, 2015). Los autores diseñaron entonces una nueva planta en la que mutaron la secuencia de DNA correspondiente a dos aminoácidos de TFIIS, tomando como base un trabajo previo realizado en levaduras (Sigurdsson *et al*, 2010). Estas mutaciones dan como resultado una proteína que no puede activar el corte endonucleolítico producido por la RNA polimerasa II y que, además, lo bloquea. La construcción se expresó en plantas salvajes, y estas plantas transgénicas que expresan la variante mutada de TFIIS presentan problemas en el desarrollo, un tamaño menor y morfología de las hojas aserradas en comparación con las plantas salvajes. Concluyen que esta planta transgénica para TFIIS mutado tiene una proteína que actúa como negativo dominante para este factor (Dolata *et al*, 2015). En la figura R33 se pueden ver fotografías correspondientes a las plantas salvajes (ecotipo Col 0) y a las plantas transgénicas para el factor TFIIS mutado.

Realizamos nuevamente el protocolo de luz y oscuridad, esta vez sobre la planta transgénica para TFIIS mutado (TFIISmut) que actúa como negativa dominante. Dado que las plantas transgénicas son estériles, es necesario cruzarlas con polen salvaje para obtener semillas. Para distinguir a las plantas heterocigotas transgénicas de las plantas salvajes se las crece en tierra por unas tres semanas hasta poder seleccionarlas por el fenotipo característico (figura R33).



Col 0



TFIIS  
(TFIISmut)

**Figura R33: Fenotipo de la planta mutante TFIIS (TFIISmut).** Panel superior, planta salvaje (Col 0), panel inferior, planta transgénica para el factor de elongación TFIIS. Se muestran plantas de tres semanas. Notar la diferencia en el tamaño y en la morfología de las hojas aserradas en la mutante.

El resultado obtenido del análisis de *splicing* alternativo para RS31, U2AF65 y RS2Z33 se muestra en la figura R34.

**Figura R34: El efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo está anulado en la planta mutante para el factor de elongación TFIIIS.** Se realizó el protocolo de luz y oscuridad sobre plántulas salvajes (Col 0) y sobre plántulas transgénicas para el factor de elongación TFIIIS (*tfiismut*). Luego de la incubación de extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR las isoformas de *splicing* alternativo de RS31, U2AF65 y RS2Z33. Se grafica el promedio del *splicing index* junto con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.

responde al efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo). Las plántulas muestran un *splicing* index alto tanto en luz como en oscuridad, similar al *splicing* index de oscuridad que se encuentra en las plantas salvajes.

A continuación, decidimos analizar si la expresión total de mRNA de RS31 se modifica en la planta mutante. Realizamos una RT-PCR cuantitativa con un par de oligonucleótidos iniciadores que reconocen a todas las isoformas de RS31 y relativizamos la expresión a un gen control. Encontramos que la expresión total de RS31 no se modifica en la planta mutante para TFIIS, y esto ocurre tanto en condiciones de luz como en oscuridad.

**Figura R35: La expresión total de mRNA de RS31 no se modifica en la planta mutante para el factor de elongación TFIIS.** Se realizó el protocolo de luz y oscuridad sobre plántulas salvajes (Col 0) y sobre plántulas transgénicas para el factor de elongación TFIIS (*tfiis*). Luego de la incubación de extrajo RNA y se analizaron por RT-PCR cuantitativa los niveles totales de RS31 relativizados a un gen control (ubiquitina). Se grafica el cociente de RS31 sobre ubiquitina. Se muestra el promedio junto con el desvío estándar para tres réplicas biológicas.





cambio en el cociente de proximal/distal en RS31 (figura R37 B). Por último, en la planta transgénica para el factor de elongación TFIIS mutado el cociente proximal/distal es más alto que en plantas salvajes. En la mutante *tfiis* no hay diferencias en el cociente de proximal/distal entre luz y oscuridad (figura R37C).

Todos los resultados de la figura R37 son consistentes con un escenario en el que la acetilación de histonas producto del tratamiento con la TSA o la que ocurre en la mutante de HD1 producen una elongación más rápida de la RNA polimerasa II, mientras que la mutante del factor TFIIS presenta una elongación de la transcripción más lenta -o una menor procesividad.

# DISCUSIÓN

Nos proponemos en esta sección realizar un recorrido sobre los principales resultados de esta tesis. Es nuestra intención someter a discusión las observaciones y dejar abiertas algunas reflexiones para continuar con la línea de investigación en el futuro cercano.

El cuerpo de resultados presentado en este trabajo indica que la luz regula el *splicing* alternativo en plantas a través de la elongación de la transcripción. A continuación, discutiremos las evidencias que sustentan esta afirmación.

- 1.

codificados por el genoma del cloroplasto. En general, se trata de genes que codifican proteínas que participan en el proceso de la fotosíntesis (Jarvis & López-Juez, 2013).

Con respecto al valor adaptativo de la regulación del *splicing* de RS31, podemos aventurar que, dado que sólo la isoforma correspondiente al mRNA1 produce una proteína funcional, el efecto de la luz sea, en última instancia, el de regular los niveles de proteína de RS31, a través de la regulación del *splicing* alternativo (figura R13). Esto no parece ser el método más eficiente para hacerlo, pero no deja de ser un nivel de regulación posible y demostrado en otros casos (Lareau & Brenner, 2015) (la célula no siempre es didáctica).

Los cambios en la calidad de luz pueden, entonces, producir cambios en el estado redox de componentes transportadores de electrones de la cadena fotosintética, como es el caso del *pool* de plastoquinonas -la luz alta produce un aumento de los equivalentes reducidos de dichos transportadores de electrones-. El *pool* de plastoquinonas se ha propuesto como un posible candidato para el origen de señales retrógradas que salen del cloroplasto (Piippo *et al*, 2006). Además de la luz, cambios en la temperatura, la disponibilidad de dióxido de carbono o de nutrientes pueden impactar sobre la eficiencia de fotosíntesis, modificando el estado redox de sus componentes. El *pool* de plastoquinonas podría entonces integrar distintos estímulos ambientales que luego podrían, a su vez, regular la expresión génica. En el caso de RS31, los eventos que transcurren luego de la señal inicial y que culminan con el cambio en el *splicing* nuclear permanecen por el momento desconocidos.

Por otra parte, la regulación del *splicing* alternativo de RS31 parece ser importante si las plantas de *Arabidopsis* se encuentra en condiciones de stress, como la exposición a alta luz continua: las plantas mutantes que no pueden regular correctamente el *splicing* de RS31 se estresan más que las plantas salvajes (Petrillo *et al*, 2014). Esto sugiere que la regulación del *splicing* alternativo es un mecanismo adicional de adaptación de las plantas a su entorno. El cloroplasto actúa como una organela que puede detectar y a su vez responder a cambios ambientales -y no sólo a cambios externos: podemos imaginar un escenario en el que el cloroplasto responde también a señales

provenientes de otros tejidos o a lo largo de distintos momentos del desarrollo del organismo.

2.

luz es menor que en la planta salvaje, este no se anula en la mutante *hd1*, como ocurre en algunos experimentos realizados con plantas salvajes incubadas con TSA (ver figura R16). Esto indica que la actividad de deacetilasa de histonas HD1 no es suficiente para explicar los cambios en *splicing* por acción de la luz. Ahora bien, ambos experimentos dan como resultado evidencias consistentes. *Arabidopsis* tiene una familia de 12 enzimas acetiltransferasas de histonas (Fina & Casati, 2015) y 19 deacetilasas de histonas: encontramos que la anulación de la expresión de una histona deacetilasa (mediante el uso de la mutante *hd1*) produce un cambio en el *splicing*, pero no es suficiente para anular el efecto de la luz. Esto puede explicarse por redundancia funcional entre los otros genes que codifican para deacetilasas de histonas. Probar esto sería, ciertamente, muy complejo, pues requeriría realizar cruces hasta obtener la mutante múltiple para los 19 genes -si es que esta mutante fuera, en efecto, viable. Por lo tanto, que el uso de la mutante dé un resultado consistente con el tratamiento con la TSA refuerza la idea de que cambios en la estructura de la cromatina (alcanzados tanto por el uso de inhibidores farmacológicos como por el uso de una mutante de un gen que codifica una enzima modificadora de histonas) pueden modular el *splicing* alternativo en plantas.

### 3.

cambios entre las condiciones de luz y oscuridad, nos pareció razonable comenzar por la acetilación (dado que el tratamiento con TSA y la mutante *hd1* producen cambios en la acetilación de histonas). La dimetilación en el mismo residuo fue elegida como contrapunto (esta marca produce el efecto opuesto a la acetilación en el mismo residuo sobre la apertura de la cromatina). Dado que no encontramos cambios en condiciones de luz y oscuridad, no consideramos relevante explorar otras marcas (teniendo en cuenta, además, lo laborioso de realizar otra inmunoprecipitación de la cromatina para averiguarlo). Pero es necesario señalar que nuestro análisis de modificaciones post-traduccionales de histonas es acotado y sólo podemos extraer conclusiones sobre aquellas que hemos evaluado.

En segundo lugar, si la exposición a la luz no provoca cambios cromatínicos intragénicos a lo largo del gen RS31, pero la hiperacetilación de histonas produce cambios en el *splicing* alternativo, nos preguntamos qué puede estar ocurriendo en la célula que sea *imitado* por una cromatina más abierta. Decidimos, en este punto, comenzar a estudiar la elongación de la transcripción.

4.

extraer la conclusión parcial de que el tratamiento con una droga que afecta la elongación produce cambios en el *splicing* alternativo. Más adelante, y luego de abordar otras evidencias, explicaremos de qué manera proponemos que la elongación regula el *splicing* alternativo de RS31.

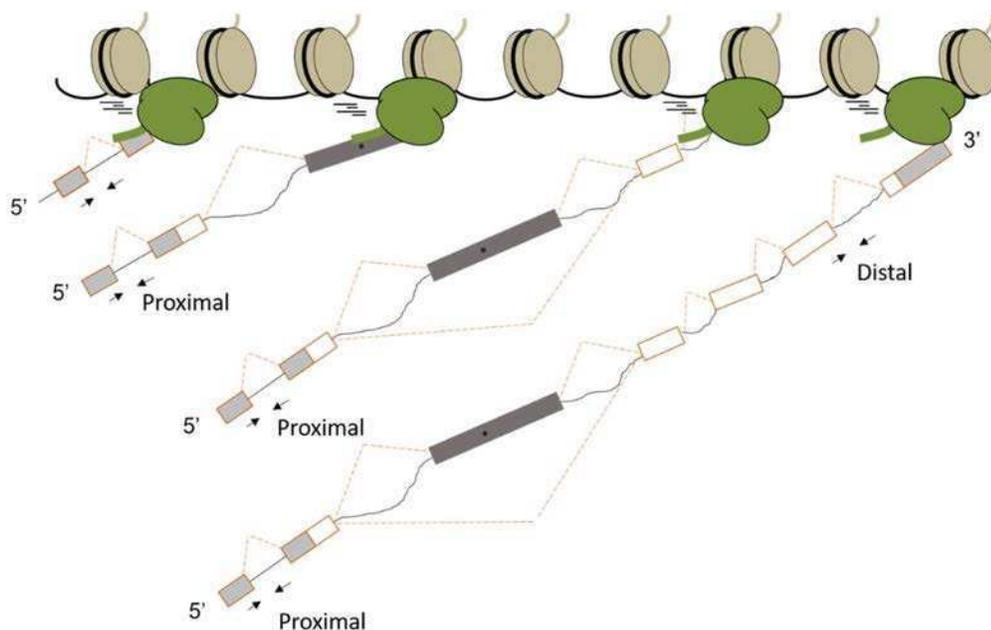
#### **4.2.**

En la figura D1 se muestran las etapas de elongación, arresto transcripcional, corte del RNA y reanudación de la elongación. El arresto transcripcional se produce cuando existe algún obstáculo en el molde de DNA. Al encontrarse con este obstáculo, la RNAPII retrocede (con respecto al DNA y al RNA naciente). Esto produce que el sitio activo de la polimerasa quede desplazado con respecto al extremo 3' del RNA. Este des-alineamiento entre el extremo 3' del RNA y el sitio activo de la RNAPII es lo que da como resultado el arresto transcripcional: la elongación no puede continuar. Para poder sobreponerse al arresto transcripcional, es necesario que el sitio 3' del RNA se corte y el nuevo extremo 3' quede alineado con el sitio activo de la polimerasa. El factor TFIIS estimula a la RNAPII de modo que realice el corte del extremo 3' del RNA, y este nuevo extremo 3' del RNA sirve como sustrato para continuar la elongación. Luego del corte -y de que P-TEFb fosforile las serinas 2 del CTD-, se reanuda la elongación y la RNAPII continúa con la transcripción del molde (Fish & Kane, 2002; Adelman *et al*, 2005) (figura D1).

**Figura D1: Modelo que explica las pausas que se producen durante la elongación de la transcripción. 1. Elongación:** La RNAPII (en verde) se encuentra transcribiendo un molde de DNA. **2. Arresto:** Al encontrarse con un obstáculo (en amarillo), la RNAPII retrocede y se produce un des-alineamiento entre el sitio activo de la RNAPII (círculo verde claro) y el extremo 3' del RNA. Como resultado, la transcripción se frena. **3. Corte:** El factor de elongación TFIS (en naranja) interacciona con la RNAPII, promoviendo que la polimerasa corte el extremo 3' del RNA. **4. Elongación:** Luego del corte, la elongación se reanuda. (Adaptado de Fish y Cane, 2002).

Los resultados de la figura R34 muestran que el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo se encuentra anulado en la planta mutante para el factor de elongación TFIIIS. Esto es un primer indicio de que el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31 y de U2AF65 depende de la elongación de la transcripción. Ese resultado no es menor por ser una evidencia directa, *in vivo*, de que la elongación de la transcripción regula el *splicing* alternativo en plantas.

#### **4.3.**



**Figura D2: Estructura del gen RS31 y esquema de precursores de RNA naciente proximal y distal con respecto al sitio de inicio de la transcripción.** Los exones se indican con rectángulos y los intrones, con líneas. En gris oscuro se marca la región de *splicing* alternativo de RS31. A medida que la RNAPII (en verde) transcribe el gen, emergen precursores de RNA que son procesados por la maquinaria de *splicing*. Se muestra un amplicón correspondiente a un precursor proximal y otro correspondiente a uno distal, a modo de ejemplo.

Los resultados de las figuras R30 y R31 demuestran que la acumulación de precursores proximales y distales con respecto al sitio de inicio de la transcripción cambia en luz y en oscuridad en RS31. En luz, el cociente proximal/distal es menor, lo que es compatible con una mayor velocidad de elongación y/o mayor procesividad de la transcripción.

Los niveles de pre-mRNA detectados en la célula dependen de la tasa de generación de un nuevo transcripto y de la tasa de eliminación del mismo (remoción de intrones). Por lo tanto, en este punto es importante destacar el resultado de un control importante, que se muestra en la figura R32: la eficiencia de eliminación del primer intrón es igual en luz y en oscuridad. Esto implica que el precursor proximal detectado es proporcional al RNA naciente, por lo que los cambios observados en la abundancia de precursores proximales y distales se deben a una mayor procesividad, o a una mayor velocidad de la elongación en luz (y no a que el primer intrón sea eliminado por *splicing* más rápidamente en luz que en oscuridad).

Además de la anulación del efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31 en la mutante TFIIS es interesante mostrar que el cociente de precursores proximal/distal es mayor en la planta mutante TFIIS que en la planta salvaje (figura R36). Este resultado es consistente con que en la mutante la elongación de la transcripción es más lenta (o bien, la procesividad es menor). Además, nos permite, de alguna manera, contar con un control interno que valida a la medición de precursores proximal/distal como indicador de la velocidad de la elongación (puesto que, si en efecto por este método no pudiéramos detectar diferencias entre la planta salvaje y la mutante no lo consideraríamos un buen enfoque para buscar cambios en la velocidad de la elongación en condiciones de luz y oscuridad, o en otras condiciones cualesquiera que fueran).

A continuación, el análisis de precursores proximal/distal se extendió a otras condiciones. Demostramos que la incubación con TSA en plantas que se encuentran en oscuridad da como resultado un cociente proximal/distal similar al que se obtiene en luz (figura R37A). Más aún: si las plantas se encuentran en luz y en presencia de TSA, entonces, el cociente proximal/distal es aún menor que en luz. Esto se corresponde con los cambios en *splicing* alternativo que se observan en presencia de TSA (figura R15). Por otra parte, se muestra en la figura R37B que no hay diferencias en el cociente de precursores proximal/distal en plantas de la mutante *hd1* incubadas en luz y en oscuridad. Esto es consistente con los cambios que se observan en esta planta en el *splicing* alternativo de RS31 (figura R20). Para completar el análisis, mostramos que en la mutante TFIIS no se observan diferencias en el cociente proximal/distal en luz y oscuridad (figura R37C). Este resultado es compatible con un escenario en el que en la mutante TFIIS, a diferencia de la salvaje, la elongación o la procesividad son iguales, tanto en luz como en oscuridad. El factor TFIIS mutado, que actúa como negativo dominante, impide que la RNAPII pueda sobrepasar las pausas que ocurren durante la transcripción. Por lo tanto, si bien en plantas salvajes incubadas en luz se produce un aumento en la velocidad o procesividad, esto no ocurre en la mutante, y el cociente proximal/distal (indicador de estos fenómenos) permanece constante en luz y oscuridad (o al menos, no se detectan diferencias con la sensibilidad del método que empleamos).

Para un futuro próximo pretendemos extender la medición de precursores proximales y distales y ampliar el análisis a otros tratamientos, como la incubación con DCMU y DBMIB, o el tratamiento con azúcares. Con esto buscamos profundizar el análisis sobre la elongación de la transcripción en la regulación del *splicing* en plantas.

5.

la mutante para el factor de elongación TFIIIS) pueden afectar también la velocidad de elongación, y viceversa.

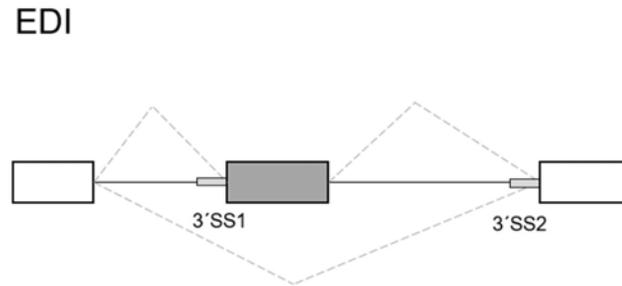
A la hora de referirnos a los cambios en la elongación de la transcripción detectados en luz y oscuridad no debemos perder de vista de que puede tratarse de cambios en la velocidad de la elongación, en la procesividad de la polimerasa, o en ambos. No sabemos cuál de las dos (o si acaso las dos) es o son las que están cambiando en este caso.

6.



### 7.1. El caso del exón EDI del gen de la fibronectina

El exón EDI del gen de la fibronectina es un evento de *splicing* exón *cassette*. Como mencionamos en la Introducción, en el caso del exón EDI hay dos sitios 3'SS. El sitio 3'SS río arriba del exón alternativo es un sitio débil mientras que el sitio 3'SS río abajo es un sitio fuerte (figura D4).



**Figura D4:** Esquema del *splicing* alternativo de EDI. En gris se muestra el exón alternativo. El 3'SS 1 es un sitio débil y el 3'SS 2 es un sitio fuerte.

Si la tasa de elongación de la transcripción es rápida, o la RNAPII hace pocas pausas durante la transcripción, entonces, ambos sitios 3'SS son presentados a la maquinaria de *splicing* simultáneamente. Por lo tanto, en la competencia el sitio fuerte le gana al débil, y esto produce la exclusión del exón alternativo. En cambio, si la velocidad de la elongación de la transcripción es lenta, o la RNAPII hace pausas durante la transcripción, la maquinaria de *splicing* se encontrará con el sitio 3'SS río arriba antes de encontrarse con el sitio 3'SS río abajo. Por lo tanto, en este caso se favorece la inclusión del exón alternativo (figura I6) (de la Mata *et al*, 2003). Como mencionamos en la Introducción, esto no quiere decir que necesariamente el primer intrón sea eliminado antes que el segundo: una vez que se alcanza el “compromiso” que conduce a la inclusión del intrón, el orden de remoción de los intrones pasa a ser irrelevante (de la Mata *et al*, 2010; Naftelberg *et al*, 2015).

En el mismo trabajo (de la Mata *et al*, 2003) se analiza cómo se modifica el *splicing* alternativo del transcripto del gen E1a de adenovirus.

**7.2.**

elongación. Para este análisis tomamos en cuenta los valores de la fuerza de los sitios de *splicing* de los sitios 3'SS alternativos.

### 7.3. El caso del gen RS31

El evento de *splicing* del transcripto de RS31 tiene un sitio 5'SS y dos sitios 3'SS. Del análisis de la fuerza de los sitios de *splicing* obtuvimos que el sitio 3'SS1 o proximal (con respecto al sitio de inicio de la transcripción) es un sitio débil, mientras que el sitio 3'SS2 o distal es un sitio fuerte (figura D3).

También sabemos que el tratamiento con CPT imita el efecto de la oscuridad sobre el *splicing* alternativo de RS31 y que, en luz, la acumulación de precursores proximales y distales indica que la elongación es más rápida, o bien, que la procesividad de la RNAPII es mayor, que en oscuridad.

Por otra parte, los resultados de los experimentos con la mutante para el factor de elongación TFIIS señalan que en la mutante el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo de RS31 se encuentra anulado: tanto en luz como en oscuridad, la planta mutante presenta valores de *splicing* index altos, como los que se observan en una planta salvaje incubada en oscuridad. Es decir, en una situación en la que la procesividad de la RNAPII es menor -o bien, la velocidad de la elongación es más lenta- los valores de *splicing* index de RS31 son altos, como los que se obtienen en oscuridad.

Con todas estas cartas sobre la mesa podemos proponer un modelo que explica cómo la elongación de la transcripción regula el *splicing* alternativo de RS31 (figura D6). En luz, la velocidad de la elongación es rápida -o bien, la procesividad de la RNAPII es mayor. En esta situación, el sitio 3'SS débil y el sitio 3'SS fuerte son presentados a la maquinaria de *splicing* al mismo tiempo. En la competencia, gana el sitio 3'SS fuerte. Esto da como resultado una mayor abundancia de la isoforma mRNA1 (la isoforma corta). Por el contrario, en oscuridad la velocidad de la elongación es más lenta -o bien, la procesividad de la polimerasa es menor. En esta situación, la maquinaria de *splicing* tiene tiempo de reconocer al 3'SS proximal *antes* de que se transcriba el sitio 3'SS distal. Por lo tanto, esto da como resultado una mayor abundancia de la

isoforma mRNA3 (la isoforma larga, que incluye a la región alternativa del transcripto) (figura D6).

**Figura D6: Modelo de trabajo. La elongación de la transcripción regula el *splicing* alternativo en plantas.** En plantas expuestas a la luz, la velocidad de elongación de la polimerasa es rápida o la procesividad de la enzima es alta. En estas condiciones los dos sitios 3' SS son presentados a la maquinaria de splicing simultáneamente y el sitio fuerte gana en la competencia, por lo tanto, se obtiene una mayor abundancia relativa de la isoforma corta de RS31. En cambio, en oscuridad la elongación de la transcripción es más lenta o la procesividad de la polimerasa es menor. En esta situación, la maquinaria de *splicing* se encuentra con el sitio 3' SS proximal *antes* de que se transcriba el sitio 3' SS distal. Esto da como resultado una mayor abundancia relativa de la isoforma larga de RS31.

ajustan mejor a resultados experimentales cuando se tiene en cuenta a la elongación como un paso crítico (además del ensamblado del spliceosoma y la catálisis de la reacción de *splicing* en sí misma) (Schmidt *et al*, 2011).

Retomamos en este punto nuestras observaciones sobre el estudio de la acetilación de histonas. Como mostramos en la sección de Resultados (figura R26, R28), no encontramos diferencias en la acetilación o en la dimetilación en la lisina 9 de la histona H3 a lo largo del gen RS31 en muestras de plantas incubadas en luz o en oscuridad. Sin embargo, el resultado de la incubación con TSA (droga que imita el efecto de la luz sobre el *splicing* alternativo) no deja de ser compatible con el modelo de trabajo propuesto en la figura D6: el tratamiento con TSA produce una mayor acetilación de histonas y esto genera una cromatina más abierta. La cromatina abierta *imita* lo que ocurre en presencia de luz: un aumento en la velocidad de elongación, o en la procesividad, en el gen de RS31.

Además de las modificaciones post-traduccionales en las histonas, el posicionamiento de los nucleosomas puede afectar la velocidad de la elongación. Como mencionamos en la Introducción, los nucleosomas se encuentran preferencialmente posicionados en exones (Tilgner *et al*, 2009; Schwartz *et al*, 2009). El posicionamiento constituye una especie de señal: los nucleosomas funcionan como una barrera física a la elongación de la transcripción de la RNAPII y el encuentro con los nucleosomas puede otorgar más tiempo a la maquinaria de *splicing* para el correcto reconocimiento del comienzo de los exones. Se ha demostrado en un trabajo que realiza mediciones de la elongación de la RNAPII a nivel de molécula única que la presencia de nucleosomas en el molde aumenta el número de pausas y también el tiempo de recuperación que sucede a las mismas. El nucleosoma es, en resumen, una barrera fluctuante a la elongación. (Hodges *et al*, 2009).

cambios en el molde (cambios en la estructura de la cromatina que limitan o promueven la elongación, tanto en modificaciones post-traduccionales en las histonas o en el posicionamiento de los nucleosomas) o bien, a factores intrínsecos que afectan la actividad de la polimerasa, como la fosforilación del CTD o la asociación de la enzima con factores de elongación.

Una posibilidad a explorar es que el posicionamiento de los nucleosomas cambie por acción de la luz.

Otra hipótesis posible es que la luz puede producir cambios en el patrón de la fosforilación del CTD de la RNAPII, como se ha informado en células de mamíferos al irradiarlas con luz ultravioleta (Muñoz *et al*, 2009). Esto daría como resultado diferentes velocidades de elongación o niveles de procesividad. Para evaluar esta hipótesis se podría realizar un *western blot* sobre muestras de extractos nucleares de plantas incubadas en luz y oscuridad utilizando anticuerpos específicos para ciertas modificaciones del CTD (existen anticuerpos que reconocen el CTD de la RNAPII fosforilado en la serina 2, o en la serina 5, de la héptada consenso). Mediante esta técnica podríamos estudiar cambios en la proporción de la RNAPII fosforilada respecto a la polimerasa total en extractos nucleares de plantas incubadas en luz u oscuridad.

Otra hipótesis posible es que la incubación con luz provoque cambios en la asociación de la RNAPII con factores de elongación, como el factor TFIIS, o alguno de los otros factores de elongación que mencionamos en la Introducción. Para investigar esto se podría hacer experimentos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos que reconocen a la RNAPII y a los factores de elongación elegidos en muestras de plantas incubadas en luz y oscuridad.

Nuevamente, las posibilidades mencionadas (cambios en la estructura de la cromatina, o en los patrones de fosforilación del CTD de la RNAPII o en la asociación de la RNAPII con factores de elongación) no son excluyentes y podemos imaginar un escenario en el que ocurre una combinación -en el mejor de los casos, no lineal- de todas ellas.

Tal vez uno de los aspectos más emocionantes que caracteriza a todo trabajo de investigación es que plantea más preguntas que respuestas.

La regulación del *splicing* alternativo por cambios en la elongación de la transcripción es un fenómeno que se ha descrito en levaduras (Alexander *et al*, 2010; Carrillo Oesterreich *et al*, 2016), *Caenorhabditis elegans* (Ip *et al*, 2011), *Drosophila* (Khodor *et al*, 2011) y en células de mamíferos (de la Mata *et al*, 2003; Muñoz *et al*, 2009; Schor *et al*, 2009, 2013; Ip *et al*, 2011; Dujardin *et al*, 2014). Proponemos en esta tesis que es posible extender este concepto - conservado a lo largo de la evolución- a la regulación del *splicing* alternativo en plantas.

En resumen, los hallazgos de esta tesis sustentan la idea general de un rol para la elongación de la transcripción en la regulación del *splicing* alternativo en plantas.



## CONCLUSIONES

A continuación, se presenta un punteo de las conclusiones principales del trabajo.

Primera parte: regulación del *splicing* alternativo por acción de la luz.



# APÉNDICE

1.



**2.**











# BIBLIOGRAFÍA

- Adelman K, Marr MT, Werner J, Saunders A, Ni Z, Andrulis ED & Lis JT (2005) Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIS. *Mol. Cell* **17**: 103–112
- Akoulitchev S, Makela TP, Weinberg R a, Reinberg D, Mäkelä TP, Weinberg R a & Reinberg D (1995) Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **377**: 557–560
- Alexander RD, Innocente SA, Barrass JD & Beggs JD (2010) Splicing-Dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Mol. Cell* **40**: 582–593
- Alló M, Buggiano V, Fededa JP, Petrillo E, Schor I, de la Mata M, Agirre E, Plass M, Eyraas E, Elela SA, Klinck R, Chabot B & Kornblihtt AR (2009) Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 717–725
- Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* **5**: 773–782
- Ausin I, Greenberg MVC, Li CF & Jacobsen SE (2012) The splicing factor SR45 affects the RNA-directed DNA methylation pathway in Arabidopsis. *Epigenetics* **7**: 29–33
- Berget SM, Moore C & Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 3171–5
- Beyer AL & Osheim YN (1988) Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev.* **2**: 754–765
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 291–336
- Bond DM & Baulcombe DC (2015) Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 201413053
- Braunschweig U, Guerousov S, Plocik AM, Graveley BR & Blencowe BJ (2013) Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* **152**: 1252–1269

- Carrillo Oesterreich F, Herzel L, Straube K, Hujer K, Howard J & Neugebauer KM (2016) Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell* **165**: 372–381
- Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute Y V., Chen P-Y, Stroud H, Yu Y, Hetzel JA, Kuo F, Kim J, Cokus SJ, Casero D, Bernal M, Huijser P, Clark AT, Krämer U, Merchant SS, Zhang X, Jacobsen SE & Pellegrini M (2010) Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* **466** VN-: 388–392
- Chow LT, Gelinis RE, Broker TR & Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**: 1–8
- Conaway RC, Kong SE & Conaway JW (2003) TFIIIS and GreB: Two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers. *Cell* **114**: 272–274
- Cramer P, Cáceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE & Kornblihtt AR (1999) Coupling of Transcription with Alternative Splicing. *Mol. Cell* **4**: 251–258
- Cramer P, Pesce CG, Baralle FE & Kornblihtt a R (1997) Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 11456–11460
- Dolata J, Guo Y, Kowcz A, Smolinski D, Brzyzek G, Jarmowski A & Swiezewski S (2015) NTR1 is required for transcription elongation checkpoints at alternative exons in Arabidopsis. *EMBO J.* **34**: 544–558
- Dujardin G, Lafaille C, de la Mata M, Marasco LE, Muñoz MJ, Le Jossic-Corcós C, Corcos L & Kornblihtt AR (2014) How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping. *Mol. Cell* **54**: 683–690
- Duque P (2011) A role for SR proteins in plant stress responses. *Plant Signal. Behav.* **6**: 49–54
- Ermakova EO, Nurtdinov RN & Gelfand MS (2006) Fast rate of evolution in alternatively spliced coding regions of mammalian genes. *BMC Genomics* **7**: 84
- Fina JP & Casati P (2015) HAG3, a histone acetyltransferase, affects UV-B responses by negatively regulating the expression of DNA repair enzymes and sunscreen content in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **56**: 1388–1400

- Finnin MS, Donigian JR, Cohen a, Richon VM, Rifkind R a, Marks P a, Breslow R & Pavletich NP (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**: 188–193
- Fish RN & Kane CM (2002) Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1577**: 287–307
- Fiszbein A, Giono LE, Quaglino A, Berardino BG, Sigaut L, von Bilderling C, Schor IE, Steinberg JHE, Rossi M, Pietrasanta LI, Caramelo JJ, Srebrow A & Kornblihtt AR (2016) Alternative Splicing of G9a Regulates Neuronal Differentiation. *Cell Rep.* **14**: 2797–2808
- Gracheva EO, Cordero-morales JF, Nicholas T, Manno C, Aranguren CI, Weissman JS, Julius D, Francisco S, Francisco S, Francisco S & Francisco S (2011) Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. *Nature* **476**: 88–91
- Grasser M, Kane CM, Merkle T, Melzer M, Emmersen J & Grasser KD (2009) Transcript Elongation Factor TFIIS Is Involved in Arabidopsis Seed Dormancy. *J. Mol. Biol.* **386**: 598–611
- Gu W & Reines D (1995) Identification of a Decay in Transcription Potential That Results in Elongation Factor Dependence of RNA Polymerase II. *J Biol Chem* **270**: 11238–11244
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580
- Hodges C, Bintu L, Lubkowska L, Kashlev M & Bustamante C (2009) Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science (80-. ).* **325**: 626–628
- House AE & Lynch KW (2008) Regulation of alternative splicing: More than just the ABCs. *J. Biol. Chem.* **283**: 1217–1221
- Huang Y, Li W, Yao X, Lin Q jiang, Yin J wen, Liang Y, Heiner M, Tian B, Hui J & Wang G (2012) Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the MED23 Subunit. *Mol. Cell* **45**: 459–469
- Ip JY, Schmidt D, Pan Q, Ramani AK, Fraser AG, Odom DT & Blencowe BJ (2011) Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res.* **21**: 390–401

- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X & Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556–60
- Jacobsen SE (2015) Genome-wide Hi-C analyses in wild type and mutants reveal high-resolution chromatin interactions in Arabidopsis. **55**: 694–707
- Jarvis P & López-Juez E (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 787–802
- Ji X & Fu XD (2012) The Mediator Couples Transcription and Splicing. *Mol. Cell* **45**: 433–434
- Jonkers I & Lis JT (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 167–177
- Kadener S, Cramer P, Nogués G, Cazalla D, de la Mata M, Fededa JP, Werbajh SE, Srebrow A & Kornblihtt AR (2001) Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J.* **20**: 5759–5768
- Kalyna M & Barta A (2004) A plethora of plant serine/arginine-rich proteins: redundancy or evolution of novel gene functions? *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 561–564
- Khandelwal A, Elvitigala T, Ghosh B & Quatrano RS (2008) Arabidopsis transcriptome reveals control circuits regulating redox homeostasis and the role of an AP2 transcription factor. *Plant Physiol.* **148**: 2050–2058
- Khodor YL, Rodriguez J, Abruzzi KC, Tang CHA, Marr MT & Rosbash M (2011) Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in Drosophila. *Genes Dev.* **25**: 2502–2512
- Kim M, Krogan NJ, Vasiljeva L, Rando OJ, Nedeá E, Greenblatt JF & Buratowski S (2004) The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* **432**: 517–22
- Kim SH, Koroleva OA, Lewandowska D, Pendle AF, Clark GP, Simpson CG, Shaw PJ & Brown JWS (2009) Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *Plant Cell* **21**: 2045–57
- Kireeva ML, Hancock B, Cremona GH, Walter W, Studitsky VM & Kashlev M (2005) Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol. Cell* **18**: 97–108

- Koiwa H, Hausmann S, Bang WY, Ueda A, Kondo N, Hiraguri A, Fukuhara T, Bahk JD, Yun D-J, Bressan RA, Hasegawa PM & Shuman S (2004) Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 14539–44
- Kornberg R & Thomas J (1974) Chromatin Structure: Oligomers of the Histones. *Science (80-. )*. **184**: 865–868
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E & Muñoz MJ (2013) Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 153–65
- Kulich D & Struhl K (2001) TFIIS enhances transcriptional elongation through an artificial arrest site in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 4162–8
- de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D & Kornblihtt AR (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol. Cell* **12**: 525–532
- de la Mata M, Lafaille C & Kornblihtt AR (2010) First come, first served revisited: factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. *RNA* **16**: 904–12
- Lareau LF & Brenner SE (2015) Regulation of splicing factors by alternative splicing and NMD is conserved between kingdoms yet evolutionarily flexible. *Mol. Biol. Evol.* **32**: 1072–1079
- Lazarev D & Manley JL (2007) Concurrent splicing and transcription are not sufficient to enhance splicing efficiency. *Rna* **13**: 1546–57
- Li B, Carey M & Workman JL (2007) The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**: 707–719
- Listerman I, Sapra AK & Neugebauer KM (2006) Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. TL - 13. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 815–822
- Martinis J, Kessler F & Glauser G (2011) A novel method for prenylquinone profiling in plant tissues by ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Methods* **7**: 23
- Mason PB & Struhl K (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol. Cell* **17**: 831–840

- Mathieu O & Bouché N (2014) Interplay between chromatin and RNA processing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **18**: 60–65
- Mccarty M (1944) From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research. *Strain* **79**: 137–58
- McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M & Bentley DL (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**: 357–361
- Moore MJ & Proudfoot NJ (2009) Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation. *Cell* **136**: 688–700
- Muñoz MJ, de la Mata M & Kornblihtt AR (2010) The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 497–504
- Muñoz MJ, Santangelo MSP, Paronetto MP, de la Mata M, Pelisch F, Boireau S, Glover-Cutter K, Ben-Dov C, Blaustein M, Lozano JJ, Bird G, Bentley D, Bertrand E & Kornblihtt AR (2009) DNA Damage Regulates Alternative Splicing through Inhibition of RNA Polymerase II Elongation. *Cell* **137**: 708–720
- Naftelberg S, Schor IE, Ast G & Kornblihtt AR (2015) Regulation of Alternative Splicing Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure. *Annu. Rev. Biochem.* **84**: 165–198
- Nogués G, Kadener S, Cramer P, Bentley D & Kornblihtt AR (2002) Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **277**: 43110–43114
- Perales R & Bentley D (2009) ‘Cotranscriptionality’: The Transcription Elongation Complex as a Nexus for Nuclear Transactions. *Mol. Cell* **36**: 178–191
- Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, Simpson C, Brown JWS, Barta A, Kalyna M & Kornblihtt AR (2014) A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science*. **344**: 427–430
- Piippo M, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Suoranta U, Battchikova N, Aro E, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Battchikova N & Aro E (2006) Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol. Genomics* **2**: 142–152

- Price DH (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2629–2634
- Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M & Barta A (2013) Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* **25**: 3657–83
- Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, Cuevas JC, Godoy Herz MA, Depetris-Chauvin A, Simpson CG, Brown JWS, Cerdán PD, Borevitz JO, Mas P, Ceriani MF, Kornblihtt AR & Yanovsky MJ (2010) A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature* **468**: 112–6
- Schansker G, Tóth SZ & Strasser RJ (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1706**: 250–261
- Schmidt U, Basyuk E, Robert MC, Yoshida M, Villemin JP, Auboeuf D, Aitken S & Bertrand E (2011) Real-time imaging of cotranscriptional splicing reveals a kinetic model that reduces noise: Implications for alternative splicing regulation. *J. Cell Biol.* **193**: 819–829
- Schor IE, Fiszbein A, Petrillo E & Kornblihtt AR (2013) Intragenic epigenetic changes modulate NCAM alternative splicing in neuronal differentiation. *EMBO J.* **32**: 2264–74
- Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Alló M & Kornblihtt AR (2009) Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 4325–4330
- Schwartz S, Meshorer E & Ast G (2009) Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 990–995
- Sigurdsson S, Dirac-Svejstrup AB & Svejstrup JQ (2010) Evidence that Transcript Cleavage Is Essential for RNA Polymerase II Transcription and Cell Viability. *Mol. Cell* **38**: 202–210
- Simpson CG, Fuller J, Maronova M, Kalyna M, Davidson D, Mcnicol J, Barta A & Brown JWS (2008) Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA splicing in multiple gene transcripts. *Plant J.* **53**: 1035–1048
- Simpson CG, Thow G, Clark GP, Jennings SN, Watters J a & Brown JWS (2002) Mutational analysis of a plant branchpoint and polypyrimidine tract required for constitutive splicing of a mini-exon. *RNA* **8**: 47–56

- Sims RJ, Belotserkovskaya R & Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II : the short and long of it. *Genes Dev.* **18**: 2437–2468
- Singh J & Padgett RA (2009) Rates of in situ transcription and splicing in large human gene. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1128–1133
- Staiger D & Brown JWS (2013) Alternative Splicing at the Intersection of Biological Timing, Development, and Stress Responses. *Plant Cell* **25**: 3640–3656
- Tian L & Chen ZJ (2001) Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 200–205
- Tilgner H, Knowles DG, Johnson R, Davis CA, Chakraborty S, Djebali S, Curado J, Snyder M, Gingeras TR & Guigó R (2012) Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Res.* **22**: 1616–1625
- Tilgner H, Nikolaou C, Althammer S, Sammeth M, Beato M, Valcárcel J & Guigó R (2009) Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 996–1001
- Verdin E & Ott M (2014) 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation To Epigenetics, Metabolism and Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 258–264
- West S, Gromak N & Proudfoot NJ (2004) Human 5' to 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* **432**: 522–525
- Wolffe AP & Guschin D (2000) Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription. *J. Struct. Biol.* **129**: 102–122. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4217
- Wolffe AP & Hayes JJ (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* **27**: 711–720
- Wu F-H, Shen S-C, Lee L-Y, Lee S-H, Chan M-T & Lin C-S (2009) Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* **5**: 16
- Yeo G & Burge CB (2004) Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *J. Comput. Biol.* **11**: 377–394

Yoo S-D, Cho Y-H & Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**: 1565–1572